



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102083462 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 01

(21) 申请号 200880110278. 7	CNCM I-4058 2008. 07. 31
(22) 申请日 2008. 08. 01	CNCM I-3843 2007. 10. 10
(30) 优先权数据	CNCM I-4056 2008. 07. 31
07290979. 9 2007. 08. 03 EP	CNCM I-3842 2007. 10. 10
07290980. 7 2007. 08. 03 EP	CNCM I-3840 2007. 10. 10
07291251. 2 2007. 10. 12 EP	
08156405. 6 2008. 05. 16 EP	(71) 申请人 巴斯德研究院
(85) PCT申请进入国家阶段日	地址 法国巴黎
2010. 04. 02	申请人 国立科学研究中心
(86) PCT申请的申请数据	泰拉韦克蒂斯公司
PCT/IB2008/002930 2008. 08. 01	(72) 发明人 P·沙尔诺 A-S·贝尼翁
(87) PCT申请的公布数据	F·P·库唐 K·库贝雷泰
W02009/019612 EN 2009. 02. 12	(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
(83) 生物保藏信息	72002
I-2328 1999. 10. 11	代理人 康健 林晓红
CNCM I-3841 2007. 10. 10	(51) Int. Cl.
CNCM I-3076 2003. 08. 27	A61K 39/21 (2006. 01)
I-2330 1999. 10. 11	C07K 14/16 (2006. 01)
CNCM I-4059 2008. 07. 31	C12N 15/62 (2006. 01)
CNCM I-4057 2008. 07. 31	C12N 15/867 (2006. 01)
CNCM I-4055 2008. 07. 31	A61K 48/00 (2006. 01)

权利要求书 8 页 说明书 66 页 附图 99 页

(54) 发明名称

慢病毒基因转移载体及其医学应用

(57) 摘要

本发明涉及基因转移载体的设计,特别提供了适于一次或者重复给予宿主的慢病毒基因转移载体,以及其药物学应用(如特别适于在人宿主中使用的免疫缺陷病毒的免疫接种)。基因转移载体依赖于其使用目的是整合型或非整合型(N1)载体。本发明涉及基因转移载体在一次或多次在体内给予需要其的宿主的应用。本发明的应用领域特别涉及动物治疗或者人体治疗(例如预防性或者治疗性或者对症或者治愈性治疗),基因治疗或者体内免疫接种。这些载体可用于引起免疫应答以预防或治疗病理状态,包括病毒感染(例如治疗或者预防免疫缺陷病毒,特别是AIDS)、寄生虫和细菌感染或者癌症,优选用于引起保护性长期免疫应答。

1. 相继给予哺乳动物宿主以引起针对免疫缺陷病毒感染的保护性特异性细胞免疫应答的化合物组合,其包含至少:

(i) 慢病毒载体颗粒,其用第一种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装;

(ii) 慢病毒载体颗粒,其用与所述第一种确定的包膜蛋白不同的第二种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装;

其中所述(i)和(ii)的慢病毒载体颗粒在其基因组中包含编码一个或若干多肽的重组多核苷酸,所述多肽包含至少一种衍生自免疫缺陷病毒的GAG抗原的抗原;

其中所述第一种和第二种病毒包膜蛋白不彼此血清中和,且适于哺乳动物细胞体内转导。

2. 权利要求1的化合物组合,其进一步包含:

(iii) 慢病毒载体颗粒,其用第三种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装,其中所述第三种病毒包膜蛋白与所述第一种和第二种病毒包膜蛋白不彼此血清中和。

3. 权利要求1或2的化合物组合,其中载体颗粒的基因组的重组多核苷酸不编码生物学活性的POL多蛋白。

4. 权利要求1-3任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及可能存在的所述第三种病毒包膜蛋白源自人病毒。

5. 权利要求1-4任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及可能存在的所述第三种病毒包膜蛋白源自RNA病毒。

6. 权利要求1-5任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及可能存在的所述第三种病毒包膜蛋白源自选自如下一个或若干病毒目order或病毒科的病毒:弹状病毒科(Rhabdoviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、单股负链病毒目(Mononegavirales)包括副粘病毒科(Paramyxoviridae),或者丝状病毒科(Filoviridae)。

7. 权利要求2的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白源自RNA病毒,尤其源自副粘病毒科,或者源自弹状病毒科,尤其源自水泡性病毒属,包括水泡性口炎病毒(VSV)或者麻疹病毒(MV),或者呼吸道合胞病毒(RSV)或者源自非人逆转录病毒,尤其源自鼠逆转录病毒,或者源自正粘病毒科如流感病毒。

8. 权利要求1-4任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包膜蛋白源自相同病毒科的病毒。

9. 权利要求5的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包膜蛋白源自不同属的病毒。

10. 权利要求5的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种如果有的话)包膜蛋白源自不同血清型的病毒,且特别选自由以下质粒表达的包膜,所述质粒保藏在CNCM,保藏号为pThV-VSV.G(IND-CO)CNCMI-3842,或者是另一种形式pThV-VSV.G(IND-CO)CNCMI-4056, pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCMI-3843,或者是另一种形式pThV-VSV.G(NJ-CO)CNCMI-4058,或者pThV-VSV.G(COCAL-CO)CNCMI-4055, pThV-VSV.G(ISFA-CO)CNCMI-4057,以及pThV-VSV.G(SVCV-CO)CNCMI-4059。

11. 权利要求5的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)包

膜蛋白源自相同属或者源自相同血清型但是不同毒株。

12. 权利要求 1-8 任一项的化合物组合,其中至少一种所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白作为单体或者多聚体蛋白质产生。

13. 权利要求 1-8 任一项的化合物组合,其中至少一种所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白能由树突细胞摄取。

14. 权利要求 1-9 任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)病毒包膜蛋白是 VSV 病毒的跨膜糖基化(G)蛋白,所述 G 蛋白具有不同的 VSV 型特异性。

15. 权利要求 1-11 任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种病毒包膜蛋白分别是 Indiana VSV-G 毒株和 New Jersey VSV-G 毒株,或者反之亦然。

16. 权利要求 4-15 任一项的化合物组合,其中一个或若干慢病毒载体用包膜蛋白假型包装,所述包膜蛋白相对于参照的确定的天然病毒包膜蛋白而被修饰。

17. 权利要求 16 的化合物组合,其中一个或若干慢病毒载体用重组包膜蛋白假型包装,所述重组包膜蛋白包含源自不同病毒特别是源自水泡病毒的不同属或者 VSV 的不同种的不同包膜蛋白的结构域或片段。

18. 权利要求 17 的化合物组合,其中所述第一种和第二种包膜蛋白的至少一种是 VSV 重组包膜蛋白,且所述重组包膜蛋白包含 Indiana 血清型毒株的 VSV-G 的输出决定簇 YTDIE。

19. 权利要求 18 的化合物组合,其中所述第三种和/或进一步的包膜蛋白是 VSV 的重组包膜蛋白,且所述重组包膜蛋白包含 Indiana 血清型毒株的 VSV-G 的输出决定簇 YTDIE。

20. 权利要求 7 或 18 的化合物组合,其中所述重组包膜蛋白包含 Indiana 血清型毒株的 VSV-G 的胞质尾区。

21. 权利要求 17-20 任一项的化合物组合,其中一个或若干慢病毒载体是用包含 IndianaVSV 的跨膜结构域以及不同 VSV 血清型毒株的胞外结构域的重组包膜蛋白假型包装的。

22. 权利要求 20 或 21 的化合物组合,其包含 IndianaVSV 的跨膜结构域和胞质结构域以及 New JerseyVSV 的胞外结构域。

23. 权利要求 13-19 任一项的化合物组合,其中一个或若干慢病毒载体用包膜蛋白假型包装,所述包膜蛋白与确定的天然病毒包膜蛋白相比是突变的,特别是通过取代、添加或者缺失一个或若干氨基酸残基突变。

24. 权利要求 23 的化合物组合,其中突变的包膜蛋白是突变的 VSV-G 蛋白,所述突变影响 VSV-G 的跨膜结构域的一个或若干氨基酸残基。

25. 权利要求 13-24 任一项的化合物组合,其中一个或若干慢病毒载体用修饰的包膜蛋白假型包装以增加其糖基化或者增加其表达能力或者其由慢病毒颗粒摄取的能力。

26. 权利要求 1-25 的化合物组合,其中包膜蛋白假型包装载体颗粒是在生产载体颗粒的生产细胞中由于密码子优化的核酸分子的表达结果而获得。

27. 权利要求 12-26 任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种以及第三种(如果有的话)G 蛋白的至少一种相对于天然 G 蛋白是修饰的。

28. 权利要求 1-27 任一项的化合物组合,其中所述第一种和第二种包膜蛋白是不同

的,由包含于保藏号 1-3842 的质粒 pThV-VSV-G(IND-co) 或者保藏号 1-4056 的其变体或者保藏号 1-3843 的质粒 pThV-VSV-G(NJ-co) 或者保藏号 1-4058 的其变体中的核酸分子编码。

29. 权利要求 1-27 任一项的化合物组合,其中第一种或者第二种包膜蛋白由包含图 6、7 或 19 的序列的核酸分子编码。

30. 权利要求 1-27 任一项的化合物组合,其中第一种或者第二种包膜蛋白是不同的,且具有图 6、7 或 19 所示那些选择的氨基酸序列。

31. 权利要求 1-28 任一项的化合物组合,其中第三种或进一步的包膜蛋白选自核酸分子编码的或者具有图 6-13 或者 14-18 所示氨基酸序列的蛋白质。

32. 权利要求 1-31 任一项的化合物组合,其中所述假型包装的慢病毒载体是基于人慢病毒的载体。

33. 权利要求 32 的化合物组合,其中假型包装的慢病毒载体颗粒是基于 HIV 的载体,特别是基于 HIV-1 或 HIV-2 的载体。

34. 权利要求 32 或 33 的化合物组合,其中假型包装的慢病毒载体颗粒是不能复制的慢病毒载体。

35. 权利要求 26-28 任一项的化合物组合,其中假型包装的慢病毒载体颗粒是不能整合的慢病毒载体,尤其是由于整合酶蛋白中突变的结果,由此当所述载体作为颗粒在宿主细胞中产生时或者所述慢病毒载体已经给予患者时,所述整合酶在慢病毒载体中不被表达或者不被功能性表达。

36. 权利要求 1-35 任一项的化合物组合,其中慢病毒载体基因组包含功能性慢病毒 DNA 活瓣,尤其是 HIV-1 的 DNA 活瓣。

37. 权利要求 32-36 任一项的化合物组合,其中慢病毒载体基因组的 3' LTR 序列缺乏至少 U3 区域的激活物(增强子)。

38. 权利要求 36 的化合物组合,其中 3' LTR 缺乏 U3 区域或者具有部分 U3 区域缺失。

39. 权利要求 1-34 任一项的化合物组合,其中慢病毒载体基因组具有图 2(A)、23、24、25 所示序列特征。

40. 权利要求 32-38 任一项的化合物组合,其中 LTR5' 的 U3 区域由非慢病毒 U3 或者由适于驱动 tat 非依赖性初级转录的启动子代替。

41. 权利要求 1-35 任一项的化合物组合,其中所述慢病毒载体颗粒的慢病毒基因组-载体衍生自在 1999 年 10 月 11 日保藏在 CNCM 的保藏号为 I-2330 的质粒 pTRIP Δ U3. CMV-GFP, 或者衍生自在 2007 年 10 月 10 日保藏在 CNCM 的保藏号为 I-3841 的质粒 pTRIP Δ US. CMV-SIV-GAGco-WPRE, 或者衍生自在 2007 年 10 月 10 日保藏在 CNCM 的保藏号为 I-3840 的质粒 pTRIP Δ U3CMV-SIV-GAG-WPRE, 特别是通过用 HIV-GAG 衍生的抗原置换 GFP 或者 SIV-GAG 编码序列而衍生自这些质粒之一。

42. 权利要求 1-41 任一项的化合物组合,其中所述多核苷酸编码衍生自人免疫缺陷病毒(HIV) 抗原的多肽。

43. 权利要求 1-42 任一项的化合物组合,其中所述多核苷酸编码衍生自 HIV、尤其是 HIV-1 或 HIV-2 以及 SIV、尤其是 SIV_{MAC} 或者 FIV 的 GAG 抗原的抗原。

44. 权利要求 1-41 任一项的化合物组合,其中所述多核苷酸编码衍生自免疫缺陷病

毒的 GAG 且具有天然 GAG 抗原、特别是 GAG 多蛋白或者基质蛋白或者衣壳蛋白或者核衣壳蛋白的氨基酸序列的抗原,或者是这种多蛋白或这种蛋白质的片段,或者是与天然 GAG 抗原相比修饰的 GAG 抗原,特别是通过突变包括通过在氨基酸序列中缺失、取代或者添加一个或若干氨基酸残基进行修饰,或者通过翻译后修饰进行修饰,选择的修饰的 GAG 抗原是生物学功能性或者生物学非功能性抗原。

45. 权利要求 1-41 任一项的化合物组合,其中所述重组多核苷酸编码衍生自 HIV 或 SIV 或 FIV 的 GAG 抗原的生物学无功能多肽,其中所述多肽不能使 GAG 假型颗粒或者 GAG-POL 假型颗粒从慢病毒载体转导的细胞中形成。

46. 权利要求 1-42 任一项的化合物组合,其中 GAG 衍生的抗原是缺乏十四烷基化的 GAG Δ myr 蛋白质。

47. 权利要求 1-43 任一项的化合物组合,其中 GAG 衍生的抗原具有图 21、26 或 38 所示氨基酸序列。

48. 权利要求 1-44 任一项的化合物组合,其中编码 GAG 多蛋白的多核苷酸或者从中衍生的多肽由密码子优化的核苷酸序列表达,与天然基因的核苷酸序列相比改良在哺乳动物细胞、特别是人细胞中的翻译。

49. 权利要求 1-45 任一项的化合物组合,其中所述重组多核苷酸进一步编码选自衍生自 NEF 抗原、TAT 抗原、免疫缺陷病毒的 REV 抗原、免疫缺陷病毒的 POL 抗原或者其组合的多肽。

50. 权利要求 1-49 任一项的化合物组合,其中所述重组多核苷酸编码融合蛋白,所述融合蛋白包含具有图 21 所示序列的 GAG 衍生的抗原、包含或具有图 21 所示氨基酸序列的 POL 衍生的抗原,以及包含或具有图 21 所示氨基酸序列的 NEF 衍生的抗原,其中所述融合蛋白具有如下之一的序列:5'GAG POL NEF 3',或者 5'POL NEF GAG 3'或 5'POL GAG NEF3',或者 5' NEF GAG POL 3' 或 5' NEF POL GAG 3' 或 5' GAG NEF POL3'。

51. 权利要求 1-50 任一项的化合物组合,其中所述慢病毒载体 (i) 和 / 或 (ii) 配制或缺乏免疫应答佐剂的组合物。

52. 权利要求 1-51 任一项的化合物组合,其进一步包含免疫调节剂。

53. 权利要求 1-52 任一项的化合物组合,其中所述慢病毒载体配制或适于注射给宿主、尤其适于皮下注射的组合物。

54. 权利要求 1-53 任一项的化合物组合用于包含激发 (priming) 免疫应答及随后加强哺乳动物宿主中免疫应答的给药方案中,其中所述 (i) 用所述第一种病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体与所述 (ii) 用所述第二种病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体以及如果有的话所述 (iii) 用第三种病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体在不同时间单独给予,给予每种所述慢病毒载体 (i) 和 (ii) 以及如果有的话 (iii) 是用以激发或者加强免疫应答。

55. 权利要求 15-54 任一项的化合物组合,其中所述用 Indiana 毒株的 VSV-G 蛋白假型包装的慢病毒载体用于激发,用 New Jersey 毒株的 VSV-G 蛋白假型包装的慢病毒载体用于加强。

56. 权利要求 12-51 任一项的一组化合物,其中用 New Jersey 毒株的 VSV-G 蛋白假型包装的慢病毒载体用于激发,用 Indiana 毒株的 VSV-G 蛋白假型包装的慢病毒载体用于加强。

57. 权利要求 1-56 任一项的化合物组合用于治疗性治疗感染人免疫缺陷病毒 (HIV)、特别是 HIV-1 或 HIV-2 的人宿主。

58. 权利要求 1-54 任一项的化合物组合用于预防性治疗感染人免疫缺陷病毒、特别是 HIV-1 或 HIV-2 的人宿主。

59. 权利要求 1-58 任一项的慢病毒载体颗粒,其适于制备引起或者加强抗免疫缺陷病毒感染保护性特异性细胞免疫应答的组合物。

60. 权利要求 1-59 任一项的慢病毒载体,在其基因组中包含重组多核苷酸,所述重组多核苷酸具有编码衍生自人免疫缺陷病毒 (HIV) 的 GAG 抗原的抗原的人密码子优化的序列。

61. 权利要求 60 的慢病毒载体,其中重组多核苷酸编码衍生自 HIV-1 共有 B 毒株的 GAG 抗原的抗原,其是非十四烷基化 GAG 抗原。

62. 权利要求 60 或 61 任一项的慢病毒载体,其中重组多核苷酸具有在人细胞中密码子优化表达的核苷酸序列,且编码衍生自 GAG 多蛋白及 HIV 的 NEF 抗原表位簇以及任选 HIV 的 POL 多蛋白表位簇的抗原,特别是具有图 21 所示序列的 GAG 衍生的抗原、包含或具有图 21 所示氨基酸序列的 POL 衍生的抗原,包含或者具有图 21 所示氨基酸序列的 NEF 衍生的抗原之间的融合蛋白,其中融合蛋白具有如下之一的结构:5' GAG POL NEF 3',或者 5' POL NEF GAG 3',或者 5' POL GAG NEF 3',或者 5' NEF GAGPOL 3',或者 5' NEF POL GAG 3',或者 5' GAG NEF POL 3'。

63. 权利要求 56-58 任一项的慢病毒载体,其用权利要求 27-30 所述的包膜蛋白或者包膜蛋白 VSV-G 假型包装。

64. 权利要求 1-59 任一项的的化合物组合或者权利要求 58-62 任一项的慢病毒载体用于治疗方案中,所述治疗方案还包含给予阻止逆转录病毒复制的抗逆转录病毒化学药物。

65. 权利要求 64 的化合物组合或慢病毒载体,其中抗逆转录病毒药物选自逆转录病毒逆转录酶 (RT) 的抑制剂与逆转录病毒蛋白酶的抑制剂。

66. 权利要求 65 的化合物组合或慢病毒载体,其中给予逆转录病毒逆转录酶的一或几种抑制剂以及逆转录病毒蛋白酶的一或几种抑制剂。

67. 权利要求 64-66 任一项的化合物组合或慢病毒载体,与抗逆转录病毒药物同时使用。

68. 权利要求 64-67 任一项的化合物组合或慢病毒载体,其中在给予抗逆转录病毒药物结束后延长时间给予所述化合物。

69. 权利要求 64-67 任一项的化合物组合或慢病毒载体,其中在给予所述化合物期间在确定的时间中断几次给予抗逆转录病毒药物。

70. 适于制备慢病毒载体的质粒载体组合物,其包含

a. 慢病毒载体质粒,包含

i. 含有慢病毒基因组的顺式作用序列的多核苷酸,其包含 5'LTR 或者其中启动子被置换的修饰的 5' LTR,包壳信号 (Ψ), RRE 序列, DNA 活瓣以及 3' LTR 序列,其中所述 3' -LTR 序列至少缺失 U3 区域的增强子和病毒启动子及任选完整的 U3 区域,所述载体质粒进一步含有

ii. 编码包含至少一种衍生自人免疫缺陷病毒的 GAG 抗原的抗原的一个或若干多肽的

多核苷酸,其中所述多核苷酸在适于人宿主在体内使用的内部启动子控制下,

b. 包装质粒,其含有 (i) 适于在人宿主体内使用的内部启动子及 (ii) 编码慢病毒的 GAG、POL 及任选 TAT 和 REV 蛋白的慢病毒多核苷酸,所述包装质粒缺乏慢病毒 Ψ 包壳信号,具有末端 poly A 尾部;

c. 包膜质粒,其含有 (i) 适于在人宿主体内使用的内部启动子及 (ii) 编码一或多个异源病毒包膜蛋白的多核苷酸,所述病毒包膜蛋白选自 VSV-G 包膜蛋白或者衍生自其中的蛋白质以及 poly A 尾部,特别是由选自如下的质粒表达的包膜蛋白或者衍生自其中的蛋白质,所述质粒是在 CNCM 保藏的 pThV-VSV.G (IND-CO) CNCM I-3842,或者另一种形式 pThV-VSV.G (IND-CO, CNCM I-4056, pThV-VSV.G (NJ-CO) CNCM I-3843,或者另一种形式 pThV-VSV.G (NJ-CO) CNCM I-4058,或者 pThV-VSV.G (COCAL-CO) CNCM I-4055, pThV-VSV.G (ISFA-CO) CNCM I-4057,以及 pThV-VSV.G (SVCV-CO) CNCM I-4059。

71. 权利要求 70 的质粒载体组合物,其中提供多核苷酸的慢病毒是人免疫缺陷病毒,特别是 HIV-1 或 HIV-2。

72. 权利要求 70 或 71 的质粒载体组合物,其中至少一个质粒优选所有质粒具有在人细胞中密码子优化表达的编码多核苷酸。

73. 权利要求 70-72 的质粒载体组合物,其中至少一个优选所有质粒的内部启动子不具有增强子活性。

74. 权利要求 70-73 任一项的质粒载体组合物,其中内部启动子选自如下基因启动子: EF1 α 、人 PGK、PPI (前胰岛素原)、thiodextrin、HLADR 不变链 (P33)、HLA DR α 链、铁蛋白 L 链或铁蛋白 H 链、 β 2 微球蛋白、凝乳酶 β 4、凝乳酶 β 10,或者 Cystatin 核糖体蛋白 L41。

75. 权利要求 70-74 任一项的质粒载体组合物,其中编码 POL 蛋白的包壳质粒编码缺陷的整合酶,防止载体基因组的编码多核苷酸在细胞基因组中整合。

76. 权利要求 70-74 任一项的质粒载体组合物,其中编码衍生自 GAG 抗原的抗原的多核苷酸是权利要求 43-50 任一项的多核苷酸。

77. 权利要求 70-76 任一项的质粒载体组合物,其中所述假型包装的包膜蛋白是权利要求 28-30 任一项的包膜蛋白。

78. 权利要求 70-77 任一项的质粒载体之一。

79. 是权利要求 70-77 任一项的质粒载体组合物的表达产物的慢病毒载体颗粒,其适于制备引起或加强针对免疫缺陷病毒感染的保护性特异性细胞免疫应答的组合物。

80. 嵌合的 HIV-1 衍生的抗原,其是包含或者由具有图 21 所示序列的 GAG 衍生的抗原与衍生自 HIV-1 毒株的 NEF、POL、TAT 或 REV 的抗原的组合或者与这种抗原的组合组成的融合蛋白。

81. 权利要求 80 的嵌合的 HIV-1 衍生的抗原,其中 POL 衍生的抗原包含或具有图 21 所示氨基酸序列。

82. 权利要求 80 或 81 的嵌合的 HIV-1 衍生的抗原,其中 NEF 衍生的抗原包含或具有图 21 所示氨基酸序列。

83. VSV-G 包膜蛋白,其具有选自图 14-20 所示序列的氨基酸序列,或者由如下质粒表达,所述质粒选自在 CNCM 保藏的 pThV-VSV.G (IND-CO) CNCM I-3842,或者另一种形式

pThV-VSV. G (IND-CO), CNCM I-4056, pThV-VSV. G (NJ-CO) CNCM I-3843, 或者另一种形式 pThV-VSV. G (NJ-CO) CNCM I-4058, 或者 pThV-VSV. G (COCAL-CO) CNCM I-4055, pThV-VSV. G (ISFA-CO) CNCM I-4057 以及 pThV-VSV. G (SVCV-CO) CNCM I-4059。

84. 编码具有选自图 14-20 所示序列的氨基酸序列的 VSV-G 包膜蛋白之一的核酸分子, 其中所述核酸分子被密码子优化用于在人细胞中表达, 或者其是编码由如下质粒表达的包膜的插入序列, 所述质粒选自在 CNCM 保藏的 pThV-VSV. G (IND-CO) CNCM I-3842, 或者另一种形式 pThV-VSV. G (IND-CO, CNCM I-4056, pThV-VSV. G (NJ-CO) CNCM I-3843, 或者另一种形式 pThV-VSV. G (NJ-CO) CNCM I-4058, , 或者 pThV-VSV. G (COCAL-CO) CNCM I-4055, pThV-VSV. G (ISFA-CO) CNCM I-4057 以及 pThV-VSV. G (SVCV-CO) CNCM I-4059, 或者其具有选自图 6-12 所示核酸序列的序列。

85. 包含于权利要求 28 或 41 任一项的质粒中的核酸分子, 其中所述核酸分子编码至少一种衍生自 GAG 抗原的抗原, 或者所述核酸分子在严格条件下与所述核酸分子杂交且能编码 HIV-1 或 HIV-2GAG 抗原或者其片段。

86. 适于抑制哺乳动物宿主体内 HIV-1 或 HIV-2 感染或者 SIV 或 FIV 感染的免疫原性组合物, 其包含权利要求 1-58 任一项的慢病毒颗粒。

87. 在包括在哺乳动物宿主中激发免疫应答及随后加强免疫应答的给予方案中权利要求 1-86 任一项的化合物组合,

- 在暴露于或者感染逆转录病毒、特别是 HIV 之后控制宿主病毒血症, 及特别限制或降低宿主病毒负荷 ; 和 / 或

- 诱导宿主体内抗逆转录病毒、特别是 HIV 的保护性细胞免疫 ; 和 / 或

- 在暴露于或者感染 HIV 逆转录病毒之后抗病毒复制的保护作用 ; 和 / 或

- 在逆转录病毒、特别是 HIV 感染急性期抗中枢记忆性 CD4+T 细胞应答耗竭的保护作用 ; 和 / 或

- 在逆转录病毒、特别是 HIV 感染慢性期保持中枢记忆性 CD4+ 细胞应答 ; 和 / 或

- 在逆转录病毒、特别是 HIV 原发感染期间天然和记忆性 CD8+T 细胞应答的更早和 / 或更高反弹 ; 和 / 或

- 抗病毒逃逸免疫压力的保护作用, 从而使得可以长期控制逆转录病毒、特别是 HIV 感染。

88. 包含缺陷的整合酶蛋白及进一步包含编码至少一个抗原性多肽的多核苷酸的慢病毒载体在生产免疫原性组合物中的应用, 所述免疫原性组合物用于引起给予所述免疫原性组合物的宿主中针对所述至少一个多肽的免疫应答。

89. 权利要求 88 的慢病毒载体的应用, 其中所述免疫应答是体液免疫应答, 尤其是保护性体液免疫应答。

90. 权利要求 88 或 89 的慢病毒载体, 其中所述免疫应答是细胞免疫应答, 如 CD8- 介导的细胞免疫应答或者 CD4- 介导的细胞免疫应答。

91. 权利要求 88-90 任一项的慢病毒载体, 其中所述慢病毒基因组缺乏 gag、pol 和 / 或 env 慢病毒基因, 优选缺乏功能性 gag、pol 和 / 或 env 慢病毒基因。

92. 权利要求 88-91 任一项的慢病毒载体的应用, 其中所述慢病毒基因组缺乏所有内源编码慢病毒序列。

93. 权利要求 88-92 任一项的慢病毒载体的应用,其中所述至少一个多肽由源自病毒基因组、特别是逆转录病毒、慢病毒、黄病毒或冠状病毒、细菌或寄生虫的序列编码。

94. 权利要求 93 的慢病毒载体的应用,其中所述至少一个多肽衍生自 AIDS 病毒包括 HIV-1 或 HIV-2 的包膜、衍生自 HIV 的衣壳或者衍生自黄热病毒、西尼罗河病毒、登革热病毒(DV)、日本脑炎病毒(JEV) 或者 SARS- 相关冠状病毒的包膜。

95. 权利要求 88-92 任一项的慢病毒载体的应用,其中所述至少一个多肽包含肿瘤表位或者抗原。

96. 权利要求 88-95 任一项的慢病毒载体的应用,其中所述慢病毒载体用 VSV-G 蛋白假型包装。

97. 权利要求 88-96 任一项的慢病毒载体的应用,其中所述免疫应答是早期免疫应答。

98. 权利要求 88-97 任一项的慢病毒载体的应用,其中所述免疫应答是长期免疫应答。

99. 权利要求 88-98 任一项的慢病毒载体的应用,其中所述宿主中的所述免疫应答通过一次给予实现。

100. 权利要求 88-99 任一项的慢病毒载体在治疗病原体如病毒、细菌或寄生虫所致感染或者不利后果中的应用。

101. 权利要求 88-99 任一项的慢病毒载体在治疗恶性状态中的应用。

102. 权利要求 88-99 任一项的慢病毒载体在预防宿主的病原体如病毒、细菌或寄生虫感染中的应用。

103. 权利要求 88-99 任一项的慢病毒载体在预防恶性状态中的应用。

慢病毒基因转移载体及其医学应用

[0001] 本发明涉及基因转移载体的设计,特别提供了适于单独一次(unique)给予或者重复给予宿主的慢病毒基因转移载体,以及其医学应用。

[0002] 在特异的实施方案中,本发明特别依赖于在同源模型中用慢病毒基因转移载体进行的超过5个月的临床前试验中获得的结果,用以设计免疫缺陷病毒的疫苗候选物,特别适于用于人宿主中。

[0003] 本发明特别涉及基因转移载体在体内一次或多次给予需要其的宿主的应用。本发明的应用领域涉及特定的动物治疗或者人体治疗(例如预防性或者治疗性或者对症或者治愈性治疗)。

[0004] 本发明的慢病毒载体的组合特别适用于基因治疗领域或者体内免疫接种。然而,其也更常用于需要在体内一次或者多次注射载体的任何药物学治疗。

[0005] 本发明特别提供了适于重复给予慢病毒载体用于预防或治疗哺乳动物宿主、特别是人类疾病的方式与方法。这些载体的特异应用是引起免疫应答,用于预防或治疗病理状态,包括病毒感染、寄生虫和细菌感染或者癌症,优选用于引起保护性长期免疫应答。根据本发明的特异实施方案,设计的载体特别感兴趣用于免疫缺陷病毒、特别是AIDS的治疗或预防领域。

[0006] 本发明另一方面是基因转移载体是整合型或者非整合型(NI)载体。载体形式的选择应依赖于其使用目的。

[0007] 病毒、特别是RNA病毒且尤其是慢病毒在过去已经用于设计基因转移载体,因为慢病毒具有实现有丝分裂非依赖性核输入的能力,使得其在未分裂的靶细胞中可以有效复制。因此,基于慢病毒的载体已经用于包括预防或者治疗性免疫接种等各种应用中,或者使用这些载体作为基因治疗的工具。

[0008] 然而当在体内检测慢病毒载体时,观测到体内注射的次数受到宿主针对用于假型包装载体颗粒的包膜蛋白引起的体液应答的限制。

[0009] 在宿主体内针对假型包装的载体颗粒的包膜引起的应答因此是当需要在体内多次给予时有效使用这种载体的障碍。

[0010] 本发明提供了当在预防或治疗情况中给予宿主几次假型包装的载体颗粒时用于至少部分补救由于针对包膜产生的免疫应答引起的障碍。

[0011] 本发明因此涉及适用于需要其的宿主中的慢病毒载体的不同结构,也特别涉及其在化合物组合(也称作化合物试剂盒)中的关联,可以一次或重复给予所述慢病毒载体。

[0012] 特别地,本发明相继使用不同的慢病毒载体以在宿主体内输送转基因。

[0013] 本发明的慢病毒载体、特别是其组合特别适用于药物学治疗领域,其中由内源表达的抗原引起的免疫应答包括细胞免疫应答是有益的或必需的;因此本发明提供了设计用于需要对于胞内病原性生物体包括病毒、特别是逆转录病毒或者更一般性针对病理状态进行预防性或者治愈性治疗的宿主的免疫接种方案的工具,包括进行体内基因治疗。本发明特别适于需要在体内多次注射载体的任何药物学治疗。

[0014] 本发明人特别提供了这样的迹象,即本发明所述慢病毒载体特别是在组合使用时

适于在非人灵长类动物模型中引起细胞免疫应答,当所述慢病毒载体表达所述病毒抗原时可以防止病毒攻击。

[0015] 在本发明的特异的实施方案中,本发明人特别揭示在用猿猴免疫缺陷病毒攻击非人灵长类动物模型中已经获得细胞保护性免疫应答。本发明人特别揭示在初免(prime)-加强(boost)策略中使用来自两个非交叉反应性 VSV 血清型的糖蛋白 G 假型包装的慢病毒载体,这些载体引起针对载体编码的抗原的强力和广泛的细胞免疫应答。这个结果在由 cynomolgus 猕猴(cynomolgus macaque)组成的模型中已经揭示,并因此设计特别适合载体编码的抗原的载体,以提供特别适用于人宿主的载体。

[0016] 鉴于这些结果,本发明人设计了当给予宿主时特别是在预防或者治疗病毒感染以及特别在人宿主中的情况中适于引起有效且优选保护性免疫应答的工具,以提供针对这种病毒、特别是逆转录病毒如慢病毒感染的免疫应答,包括针对人免疫缺陷病毒的免疫应答,且可以防止与感染相关的疾病发生。

[0017] 因此,本发明的慢病毒载体的组合特别提供了用于重复给药的有效初免-加强系统,成功地使得在宿主中初免及加强免疫应答,特别是在注射进需要其的宿主中之后。“重复”是指由于本发明揭示的慢病毒载体给予结果而将有效成分即包含于本发明慢病毒载体中的异源多核苷酸给予宿主两或多次,特别是给予三次。

[0018] 本发明因此涉及化合物组合,其包含至少:

[0019] (i) 慢病毒载体颗粒(也称作慢病毒载体),其用第一种确定的一个或多个异源病毒包膜蛋白假型包装;

[0020] (ii) 慢病毒载体颗粒(也称作慢病毒载体),其用与所述第一种确定的包膜蛋白不同的第二种确定的一个或多个异源病毒包膜蛋白假型包装;

[0021] 其中所述(i)和(ii)慢病毒载体颗粒编码(即含有)异源确定的多核苷酸,其特别是编码一或几种多肽的重组多核苷酸(或者转基因);

[0022] 其中所述第一种和第二种病毒包膜蛋白彼此不发生血清中和反应,且适于哺乳动物细胞的体内转导。

[0023] 由慢病毒载体编码(含有)的多核苷酸被称为“异源”,是因为其作为插入体进入载体基因组构建体中。在特异的实施方案中,所述基因组载体和多核苷酸可源自相同组的抗病毒(Antiviruses),甚至源自相同类型的抗病毒。

[0024] 在本发明的特异的实施方案中,所述异源确定的多核苷酸编码一或几种多肽,所述多肽包含衍生自免疫缺陷病毒的 GAG 抗原的至少一种抗原。特别地,所述抗原是或者包含一或多个免疫原性表位。衍生自 GAG 的抗原在本申请中定义且在实施例中例证。其特别包含 GAG 的片段。根据用于测定抗 SIV 感染的保护作用的模型设计,实施例中例证的 GAG 抗原源自 SIV。当用于设计适于人宿主的载体时,GAG 抗原衍生自人免疫缺陷病毒、特别是 HIV-1 或 HIV-2 的 GAG 多蛋白。

[0025] 在本发明的特异的实施方案中,是编码一或几种多肽的重组多核苷酸(或者转基因)的所述异源确定的多核苷酸不编码免疫缺陷病毒的生物学活性的 POL 抗原。

[0026] 在特异的实施方案中,衍生自 GAG 的编码的抗原、特别是衍生自 GAG 的免疫原性表位,不是生物学功能性 GAG 抗原,且不包含这种生物学功能性 GAG;换句话说,所述抗原是生物学非功能性 GAG。

[0027] 本发明中定义的慢病毒载体是由携带（特定多蛋白包膜的）包膜蛋白的载体颗粒（因此也称作“慢病毒载体颗粒”）组成的假型包装的慢病毒载体，其中所述包膜蛋白源自与提供慢病毒载体基因组的特定慢病毒不同的病毒。因此，所述包膜蛋白是所谓的“异源一个或多个病毒包膜蛋白”。在下文中，提及的“包膜蛋白”包含适于实施本发明的任何类型包膜蛋白。

[0028] 本发明的慢病毒载体是置换载体，是指使编码慢病毒蛋白的原始慢病毒序列基本缺失载体基因组，或者当存在时是修饰的，且特别防止生物学活性的 POL 抗原以及任选进一步的慢病毒的结构和 / 或辅助和 / 或调节蛋白的表达。

[0029] 载体颗粒的“载体基因组”也包含感兴趣的多核苷酸或者转基因。在特异的实施方案中，所述转基因也缺乏编码生物学活性的 POL 抗原的多核苷酸。因此，所述载体基因组不能恢复生物学活性的 POL 抗原。生物学活性的 POL 抗原包含通过 GAG-POL 多蛋白裂解产生的病毒酶蛋白酶 (RT)、逆转录酶 (RT 和 RNase H) 以及整合酶 (IN)。当至少一种这些酶的生物学活性未被激活时，POL 抗原不是生物学活性的。这些酶的生物学活性在 Fields(Virology-Vol 2 Chapter 60, pages 1889-1893 Edition 1996) 中描述。

[0030] 在特定的实施方案中，载体基因组中的多核苷酸或转基因缺乏功能性 pol 基因，特别是不含有完整 pol 基因。

[0031] 本文定义的载体基因组除了置于适当调节序列控制下的在治疗方面感兴趣的所谓异源多核苷酸之外，还含有是所述基因组非编码区且是提供 DNA 或 RNA 合成和加工的识别信号必需的慢病毒基因组序列。这些序列是顺式作用序列。用于制备本发明的慢病毒载体的载体基因组的结构和组成是基于现有技术中的原理。这种慢病毒载体的例子披露于 (Zennou et al, 2000 ;Firat H. et al, 2002 ;VandenDriessche T. et al)。特别地，可以从载体基因组制备最小慢病毒基因输送载体，其置于适当调节序列控制下的在治疗方面感兴趣的所谓异源多核苷酸之外，仅含有是所述基因组非编码区的提供 DNA 或 RNA 合成和加工的识别信号必需的慢病毒基因组序列。

[0032] 因此，载体基因组可以是置换载体，其中 2 个长末端重复 (LTR) 之间的病毒蛋白编码序列被感兴趣多核苷酸置换。

[0033] 除非另有说明，或除非技术上不相关，本申请中公开的特征，对于慢病毒载体的结构或应用的各种特征、实施方案或实施例，特别是关于它们的包膜蛋白或异源多核苷酸，可以根据任何可能的组合而组合。

[0034] 术语“化合物组合”或“化合物试剂盒”是指组成试剂盒或组合的活性成分的慢病毒载体在所述试剂盒或组合中以独立的化合物提供，并且目的在于独立给予宿主，特别是在时间上独立给予。因此，本发明使得能在需要的宿主中进行初免 - 加强给予，其中第一次给予步骤引起免疫、特别是细胞免疫应答，后面的给予步骤加强所述免疫反应。

[0035] 因此试剂盒的各化合物独立提供给需要的宿主，特别是哺乳动物宿主，特别是人类患者。

[0036] 因此，所述慢病毒载体抗原以独立包装提供，或者可以存在于一个包装中用于独立使用。

[0037] 因此，包装中包括的记载使用指导的说明书可以指示用独立的包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体颗粒用于在时间上独立给予，特别是用于在宿主中初免和随后加强免疫

反应。

[0038] 根据本发明,提供了用第一种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒,以及用第二种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒。因此,所述第一种和第二种异源病毒包膜蛋白是不同的,特别是源自不同的病毒毒株。因此,本发明的化合物试剂盒的慢病毒载体颗粒是独立的,至少是用于假型包装载体颗粒的特定包膜蛋白所致。

[0039] 在本发明的特定实施方案中,化合物组合包含第三种或进一步类型的慢病毒载体颗粒,其中第三种慢病毒载体的包膜蛋白不同于所述第一种和第二种包膜蛋白,特别是源自不同的病毒毒株。

[0040] 除了它们的假型包装包膜蛋白之外,本发明的慢病毒载体可以是相同的,特别是可以具有相同的载体基因组。

[0041] 或者,它们的载体基因组可以不同,条件是它们携带相同的异源的确定的多核苷酸(也称作转基因),特别是具有治疗兴趣的相同多核苷酸。

[0042] 在本发明另一个实施方案中,慢病毒载体的载体基因组通过具有不同的多核苷酸而不同,条件是所述不同的多核苷酸编码具有共同抗原决定簇或共同表位的多肽。因此,所述不同的多核苷酸可以是彼此的变体。

[0043] 如上所述,术语“载体基因组”是指核酸,即慢病毒起源的核酸,其组成慢病毒载体颗粒的基因组。因此,该术语涉及任何合适的核酸,即 DNA 或 RNA,双链或单链,包括含有 DNA 活瓣的形式,作为三链体序列。核酸(DNA、RNA)的性质及其组构依赖于颗粒周期的阶段,包括载体质粒-用于与包壳质粒和包膜质粒共转染细胞-用于表达颗粒,或者颗粒的 RNA 基因组,当形成时,或者这一基因组的核酸在被给予颗粒的宿主的转导细胞中的各种形式(包括基因组 mRNA 转录物、线性未整合 DNA 逆转录物、或未整合的一或两个 LTR DNA 环状形式或整合的前病毒)(见 Fields Virology),包括载体整合前复合物。

[0044] 作为将颗粒给予宿主的结果,异源多核苷酸允许其编码的多肽在用慢病毒载体转导的宿主细胞中的内源表达。

[0045] 所述第一种和第二种及如果有的所述第三种和可能的进一步的包膜蛋白根据它们不彼此血清中和(即不交叉反应)的能力选择。因此,用于假型包装组合中的载体颗粒的所述第一种和第二种及如果有的所述第三种和可能的进一步的包膜蛋白的每一种不与所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白的另一个反应,特别是不被抗其的抗体识别。因此,所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白的每一个,当在慢病毒载体内被给予时,不引起识别其它病毒包膜蛋白的抗体产生,其中所述抗包膜抗体的这种产生(所谓的抗载体免疫)将导致不能引起抗从所述多核苷酸表达的产物的免疫应答。

[0046] 在特定实施方案中,在化合物试剂盒中,所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自人类病毒, DNA 或者 RNA 病毒。

[0047] 在本发明的化合物试剂盒的特定实施方案中,所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自同一病毒科的病毒。

[0048] 根据本发明的特定实施方案,所述第一种和第二种包膜蛋白源自相同病毒的不同毒株类型,或源自相同病毒的非交叉反应性血清型。

[0049] 在所述化合物试剂盒的另一个实施方案中,所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自不同属的病毒。

[0050] 在所述化合物试剂盒的另一个实施方案中,所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自相同属或者源自相同血清型但不同毒株类型,或源自病毒的非交叉反应血清型。

[0051] 本发明特别涉及化合物试剂盒,其中在所述化合物试剂盒的另一个实施方案中,所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的包膜蛋白源自弹状病毒科(Rhabdoviridae)(包括狂犬病),特别是源自水泡性病毒属(Vesiculovirus),包括水泡性口炎病毒(VSV),源自副粘病毒科(Paramyxoviridae),特别是麻疹病毒(MV),呼吸道合胞病毒(RSV),或者源自非人类逆转录病毒或者源自正粘病毒科(Orthomyxoviridae),如流感病毒。

[0052] 上述病毒是RNA病毒,能感染哺乳动物宿主,特别是人类宿主。它们中的一些,特别是单股负链病毒目(Mononegavirales),特别是弹状病毒科,特别是水泡性病毒属,特别是VSV已被提议提供包膜蛋白,也称为表面蛋白,以假型包装病毒载体,特别是慢病毒载体颗粒。

[0053] 水泡性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)是跨膜蛋白,作为野生型病毒颗粒的表面外壳。它也是用于工程化慢病毒载体的共同外壳蛋白。目前,9个病毒物种被确定分类为VSV类别,19个弹状病毒被临时分类为这一类别(见下述),全部显示各种程度的交叉中和。当被测序时,蛋白G基因显示序列相似性。VSV-G蛋白存在N-末端胞外域、跨膜区和C末端胞质尾区。其经过高尔基体外侧网络(内质网和高尔基体)输出到细胞表面。

[0054] VSV毒株包括几种血清型,可提供用于制备慢病毒载体的包膜蛋白:VSV-G糖蛋白可特别选自分类于水泡性病毒属的物种:Carajas病毒(CJSV),Chandipura病毒(CHPV),Cocal病毒(COCV),Isfahan病毒(ISFV),Maraba病毒(MARAV),Piry病毒(PIRYV),水泡性口炎Alagoas病毒(VSAV),水泡性口炎Indiana病毒(VSIV)和水泡性口炎New Jersey病毒(VSNJV)和/或临时分类于水泡性病毒属的毒株,如Grass carp弹状病毒,BeAn 157575病毒(BeAn 157575),Boteke病毒(BTKV),Calchaqui病毒(CQIV),Eel病毒American(EVA),Gray Lodge病毒(GLOV),Jurona病毒(JURV),Klamath病毒(KLAV),Kwatta病毒(KWAV),La Joya病毒(LJV),Malpais Spring病毒(MSPV),Mount Elgon蝙蝠病毒(MEBV),Perinet病毒(PERV),Pike fry弹状病毒(PFRV),Porton病毒(PORV),Radi病毒(RADIV),鲤鱼病毒Spring病毒血症(SVCV),Tupaia病毒(TUPV),溃疡病弹状病毒(UDRV),YugBogdanovac病毒(YBV)。

[0055] 水泡性口炎Indiana病毒(VSIV)和水泡性口炎New Jersey病毒(VSNJV)是优选用于假型包装本发明慢病毒载体或设计用于假型包装慢病毒载体的重组包膜蛋白的毒株。但是,Isfahan和SVCV包膜也提供用于制备假型包装的颗粒的良好候选者。Cocal也是感兴趣的,当其不用于第一个给予的颗粒中时,特别是对于初免-加强方案中的晚期或最后给予是优选的。当具有不同的假型包装包膜的颗粒依次被给予时,对于所述包膜下述给予顺序可以是优选的,Indiana;New Jersey;Isfahan;SVCV/Cocal。引物Cocal假型包装的慢病毒载体血清中和几种其它包膜,优选的是在疫苗时间表(chronology)中,当Cocal包膜用于制备颗粒时,它们在最后被给予。

[0056] Indiana 和 New Jersey 血清型的 VSV 毒株特别有兴趣用于本发明的慢病毒载体。它们的 VSV-G 蛋白披露于 Genebank, 其提供了几种毒株。对于 VSV-G New Jersey 毒株, 特别参照具有登录号 V01214 的序列。

[0057] 在 VSV 中, Chandipura 病毒 (CHPV), Cocal 病毒 (COCV), Perinet 病毒 (PERV), Piry 病毒 (PIRYV), SVCV 或 Isfahan 病毒可能是良好的候选物用于设计替代的包膜蛋白, 特别是设计第三种包膜蛋白, 或多个第三种包膜蛋白, 或进一步的包膜蛋白。但是, 实施例 1 中示出当比较用不同包膜制备的颗粒获得的载体效价时, Chandipura 病毒 (CHPV) 和 Piry 病毒 (PIRYV) 提供了具有低假型包装能力的包膜蛋白。因此, 在第一个途径中这些包膜可被排除了包膜选择之外以制备具有有效转导能力的颗粒。

[0058] 根据另一个实施方案, 病毒包膜蛋白源自其它 RNA 病毒, 例如非人类逆转录病毒, 如鼠逆转录病毒或源自流感病毒。

[0059] 适合慢病毒假型包装的包膜蛋白的其它例子在后面说明书给出, 特别是参考它们的宿主中的靶细胞。

[0060] 根据特定的实施方案, 本发明的化合物试剂盒利用第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白, 其源自弹状病毒科, 特别是 VSV, 或源自副粘病毒科, 其中所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白源自不同属的病毒, 或者源自相同血清组特别是水泡性口炎血清组的不同病毒毒株, 或者源自相同属的不同血清型。

[0061] 在本发明的特定实施方案中, 适合用于设计化合物试剂盒的假型包装的慢病毒载体的蛋白质或糖蛋白特别作为单体或多聚体蛋白产生。

[0062] 在本发明的特定实施方案中, 所述第一种和第二种及如果有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白能够被抗原呈递细胞摄取, 特别是被树突细胞摄取, 通过融合和 / 或胞吞方式摄取。在特定实施方案中, 摄取效率可以用作选择用于假型包装的 VSV 包膜的特征。在这个方面转导的相对效价 (效价 DC/ 其它转导细胞例如 293T 细胞的效价) 可以被考虑, 具有与 DC 融合的相对较好能力的包膜是优选的。转导的相对效价在实施例 1 中示出。

[0063] 抗原呈递细胞 (APC) 及特别是树突细胞 (DC) 是假型包装的慢病毒载体的合适的靶细胞, 其被用作疫苗组合物, 用于预防或治疗目的。

[0064] 用于假型包装慢病毒载体颗粒的包膜蛋白可因此根据宿主中的靶细胞选择。

[0065] 编码 VSV 包膜蛋白 (VSV-G) 的多核苷酸也靶向脾细胞, 特别是抗原呈递细胞 (APC) 或树突细胞 (DC), 或肝脏细胞, 包括肝细胞或非实质细胞。

[0066] 编码适合靶向确定的细胞并用于假型包装本发明的慢病毒载体的包膜蛋白的多核苷酸在以下举例示出: 编码 VSV (VSV-G)、LCMV (淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒) 或 RRV (Ross River 病毒) 的包膜蛋白的多核苷酸可用于制备适合靶向肝脏细胞的载体 (Park 2003) (Kang et al, 2002)。

[0067] Ebola 或 Marburg 病毒的包膜蛋白可以用于靶向 apical 表面气道表皮 (Kobinger et al, 2001)。

[0068] 弹状病毒科 (包括狂犬病或狂犬病相关病毒如 Mokola 病毒) 或 VSV 科的病毒的包膜蛋白可提供嗜神经组织的慢病毒载体。

[0069] 沙粒病毒如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 的包膜糖蛋白可用于转导成纤

维细胞、上皮细胞、造血细胞、神经母细胞瘤和胶质瘤细胞系。

[0070] α 病毒包膜蛋白乳 RRV 或 SFV (Semliki Forest 病毒) 的蛋白可以靶向抗原呈递细胞 (APC)、神经元或肌肉细胞。

[0071] 其它包膜蛋白可用于假型包装本发明的慢病毒载体, 如 HA 蛋白 (流感血凝素)、RD114 蛋白、披膜病毒科的包膜病毒或正粘病毒科 (如流感病毒)、冠状病毒科、黄病毒科、丝状病毒科的包膜蛋白。

[0072] 包膜病毒, 在特定病毒中有时也称作表面蛋白, 被称为“源自”不同生物, 特别是源自不同的 RNA 病毒毒株, 是指在所述蛋白质中, 在确定的 RNA 病毒中表达的相应蛋白质的关键特征被保持。所述关键特征涉及结构或者涉及蛋白质的功能并且是特别能使获得的蛋白质在载体颗粒表面表达用于假型包装所述载体。包膜蛋白然后当存在于载体颗粒上时能够被识别并在宿主细胞中内化。

[0073] 在特定实施方案中, 适用于设计化合物试剂盒的假型包装的慢病毒载体的蛋白质或糖蛋白用作多聚体蛋白质, 如三聚 VSV-G。

[0074] 包膜蛋白从含有所述蛋白质的编码序列的多核苷酸表达, 所述多核苷酸插入在用于制备本发明的慢病毒载体的质粒 (包膜表达质粒或假型包装 env 质粒) 中。编码包膜蛋白的多核苷酸在转录和 / 或表达编码序列 (包壳任选地如来自 Invitrogen 的 WPRE 序列的多核苷酸) 的调节序列的控制下。

[0075] 本发明因此涉及核酸构建体, 其包含适合体内用于哺乳动物特别是人细胞的内部启动子及在所述启动子控制下的编码包膜蛋白的核酸。本发明还涉及含有这个构建体的质粒。启动子可以特别选择其性质如组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。合适的启动子的例子包括下述基因的启动子: EF1 α 、人 PGK、PPI (前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR 不变链 (P33)、HLA DR α 链、铁蛋白 L 链或铁蛋白 H 链、 β 2 微球蛋白、凝乳酶 β 4、凝乳酶 β 10 或 Cystatin 核糖体蛋白 L41。

[0076] 用于表达假型包装慢病毒载体颗粒所需的包膜蛋白的核苷酸序列还可以针对编码用作参照的天然包膜蛋白的核酸被修饰。可以进行修饰以改良在用于制备载体颗粒的细胞中和 / 或在宿主的转导细胞中的密码子使用 (密码子优化)。其可以被修饰以表达不同于天然蛋白质的蛋白质, 特别是具有改良的假型包装能力、改良的生产水平的能力或改良的防止与化合物试剂盒中使用的其它包膜蛋白的血清中和的能力的蛋白质。

[0077] 这种包膜蛋白的修饰可影响并特别改良它们在细胞宿主细胞中的生产水平或者它们假型包装载体颗粒的能力, 可能是通过改良与假病毒粒相关的包膜蛋白的密度导致。这种修饰可以衍生自在所述蛋白质的氨基酸序列中的突变, 例如通过添加、缺失或取代一个或若干核苷酸或核苷酸片段所致突变, 或者可以涉及翻译后修饰, 特别是所述包膜蛋白的糖基化状态。

[0078] 用于假型包装本发明的慢病毒载体的包膜蛋白事实上特别是糖蛋白。

[0079] 已经显示用水泡性口炎病毒糖蛋白 (VSV-G) 假型包装病毒载体使得能转导来自不同物种的大范围细胞类型。这种 VSV-G 糖蛋白除了其广谱嗜性外, 当用于载体假型包装时还具有令人感兴趣的稳定性。因此, VSV-G 已用作评估其它假型的效率的标准 (Cronin J. et al, 2005)。因此, VSV-G 是用于假型包装本发明的慢病毒载体的合适候选物。

[0080] 本发明特别涉及如本申请定义的化合物试剂盒, 其中所述第一种和第二种及如果

有的所述第三种或进一步的病毒包膜蛋白是 VSV 病毒的跨膜糖基化 (G) 蛋白,所述 G 蛋白在试剂盒的慢病毒载体中具有不同的 VSV 类型特异性。

[0081] 特别地,所述第一种 G 蛋白源自 VSV-Indiana 血清型,所述第二种 G 蛋白源自 VSV-New-Jersey 血清型,或者反之。

[0082] 在下述实施例中已经显示和报道在试剂盒中具有对假型包装的病毒颗粒的 recourse 使得引发和加强免疫学反应,其中包膜蛋白分别是 VSV-Indiana 血清型和 VSV-New Jersey 血清型的 G 蛋白,当用所述 G 蛋白的任一种假型包装的慢病毒载体被依次使用以引起它们被给予的宿主中的反应时。在这种情况下,已经示出当用第二种不同的包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体被给予时,所述慢病毒载体没有产生抗所使用的第一种包膜蛋白的体液应答(无交叉反应体液应答)或产生很低的体液应答(低交叉反应体液应答),所述体液应答会破坏在宿主引起的抗多核苷酸的表达产物的应答。这是通过这样的事实实现,所述不同的包膜蛋白彼此不交叉中和或不显著交叉反应,因此不产生抗载体免疫应答。

[0083] 在特定的实施方案中,本发明涉及源自 VSV 的 G 蛋白,其针对天然形式被修饰,和/或由针对天然核酸分子被修饰的核酸分子编码,以改良假型包装。其可以是慢病毒颗粒摄取包膜蛋白的改善,其允许慢病毒载体颗粒转导被给予其的宿主细胞的改善。

[0084] 特定的化合物试剂盒包含慢病毒载体,其中它们中的一个、两个或多个用重组包膜蛋白假型包装,所述重组包膜蛋白包含源自不同病毒的不同包膜蛋白的结构域或片段,特别是不同属不同物种的 VSV。

[0085] 在本发明的特定实施方案中,至少一个所述第一种、第二种及如果有的第三种或进一步的包膜蛋白是包含 Indiana 毒株的 VSV-G 的输出决定簇的重组包膜蛋白。

[0086] Indiana 毒株的 VSV-G 的输出决定簇是由包膜的开放读框的胞质片段编码的多肽。

[0087] Indiana 毒株的 VSV-G 的输出决定簇是包含或具有胞质尾区中的氨基酸序列 YTDIE 的多肽(Nishimua N. et al. 2002)。

[0088] 所述重组包膜蛋白可包含 Indiana 毒株的 VSV-G 的胞质尾区,其是由疏水性跨膜结构域限定的 VSV-G 的胞内部分。

[0089] 特定的化合物试剂盒包含慢病毒载体,其中它们中的一个、两个或多个用重组包膜蛋白假型包装,所述重组包膜蛋白包含 Indiana VSV 的胞质结构域和一不同 VSV 血清型毒株的胞外结构域。跨膜结构域也抗原是 Indiana VSV-G 的跨膜结构域。

[0090] 特定的化合物试剂盒包含慢病毒载体,其中它们中的一个或两个用重组包膜蛋白假型包装,所述重组包膜蛋白包含 Indiana VSV 的跨膜结构域和胞质结构域和 New Jersey VSV 的胞外结构域。

[0091] 合适的其它修饰包含改良假型包装的突变,特别是点突变。这种 VSV-G 蛋白的突变可以在跨膜结构域通过取代或缺失一个或若干氨基酸残基进行。合适突变的其它例子见 Fredericksen B. L. et al (1995) 或 Nishimua N. et al. (2003)。

[0092] 本说明书中的“片段”是指具有至少或长于 6 个核苷酸的核苷酸序列的多核苷酸,具有至少或长于 2 个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽。

[0093] 还特别可能的是修饰 VSV-G 的糖基化状态,以改良用这些 VSV-G 蛋白假型包装的

慢病毒状态给予宿主时的转导效率。

[0094] 来自各种 VSV 毒株的 VSV-G 蛋白在附图中公开,它们的序列也可衍生自数据库,特别是 Genbank。

[0095] 考虑到 VSV 的 New-Jersey 和 Indiana 毒株的糖蛋白,已经提议在两个天冬酰胺残基 (N180 和 N336) 的糖基化有利于慢病毒载体的有效假型包装。这个特征可以应用于本发明慢病毒载体的制备。

[0096] 本发明特别涉及编码 VSV-G 衍生的包膜蛋白的下述构建体,以及它们在制备本发明的慢病毒载体颗粒的组合中的应用。本发明还涉及由所述构建体编码的包膜蛋白:

[0097] 密码子优化的 VSV-G Indiana 基因在图 6 中公开并且是本发明的一部分。本发明还涉及含有 VSV-G Indiana 包膜基因的包壳质粒。一特定包壳质粒是 pThV-VSV. G(IND-CO), 2007 年 10 月 10 日保藏在 CNCM(Paris, France), 保藏号 I-3842, 或者以质粒构建体的另一版本在 2008 年 7 月 31 日保藏, 保藏号 I-4056。可以从这个特定质粒衍生其它构建体,特别是通过用本申请所列的那些启动子取代启动子。

[0098] 密码子优化的 VSV-G New-Jersey 基因在图 7 中公开并且是本发明的一部分。本发明还涉及含有 VSV-G New Jersey 包膜基因的包壳质粒。一特定包壳质粒是 pThV-VSV. G(NJ-CO), 2007 年 10 月 10 日保藏在 CNCM(Paris, France), 保藏号 I-3843, 或者以质粒构建体的另一版本在 2008 年 7 月 31 日保藏, 保藏号 I-4058。可以从这个特定质粒衍生其它构建体,特别是通过用本申请所列的那些启动子取代启动子。本发明涉及这些质粒及它们所含的编码 VSV-G 包膜蛋白的插入序列。

[0099] 适合进行本发明的具有密码子优化序列的其它包膜基因示于图 6-12 及 14-19 并特别包含 VSV-G Chandipura 基因及其表达产物, VSV-G Cocal 基因及其表达产物, VSV-G Piry 基因及其表达产物, VSV-G Isfahan 基因及其表达产物, VSV-G Spring 病毒血症鲤鱼病毒基因及其表达产物。含有 VSV-G Cocal 的包膜基因的一特定包壳质粒是 pThV-VSV. G(COCAL-CO), 2008 年 7 月 31 日保藏在 CNCM(Paris, France), 保藏号 I-4055。含有 VSV-G Isfahan 的包膜基因的另一特定包壳质粒是 pThV-VSV. G(ISFA-CO), 2008 年 7 月 31 日保藏在 CNCM(Paris, France), 保藏号 I-4057。含有 VSV-G Spring 病毒血症鲤鱼病毒的包膜基因的另一特定包壳质粒是 pThV-VSV. G(SVCV-CO), 2008 年 7 月 31 日保藏在 CNCM(Paris, France), 保藏号 I-4059。本发明涉及这些质粒及它们所含的编码 VSV-G 包膜蛋白的插入序列。

[0100] 本发明还涉及融合包膜蛋白,特别是涉及不同病毒的 VSV-G 蛋白的几个不同片段的融合蛋白以及编码这种蛋白质的核酸构建体。一特定的融合包膜是 New-Jersey 包膜蛋白的胞外结构域和 Indiana 包膜蛋白的跨膜结构域和胞质结构域之间的融合,如附图所示。

[0101] 本发明的另一个融合包膜蛋白是选自 VSV-G Chandipura、VSV-G Cocal、VSV-G Piry、VSV-G Isfahan 或 VSV-G SVCV 的一种 VSV-G 蛋白的胞外结构域和 VSV-G Indiana 的跨膜及胞质结构域。本发明还涉及编码附图所示的所示融合蛋白的核酸分子,特别是编码附图所述的融合蛋白的密码子优化的核酸。

[0102] 本发明还涉及表达载体,特别是含有编码融合蛋白的核酸构建体的质粒。

[0103] 以上描述了用于构建本发明的假型包装的慢病毒载体颗粒的载体基因组的基本

关键特征。制备合适载体基因组（也称为转移载体）的额外特征在以下揭示，包括在实施例和附图中。

[0104] 在本发明特定实施方案中，假型包装的慢病毒载体是基于人类慢病毒的载体。因此它们的基因组衍生自人类慢病毒，特别是 HIV 慢病毒。特别地，假型包装的慢病毒载体是基于 HIV 的载体，如基于 HIV-1 或 HIV-2 的载体，特别是衍生自 HIV-1M，例如来自 BRU 或 LAI 分离株。

[0105] 在另一个实施方案中，假型包装的慢病毒载体是基于灵长类或猫科慢病毒载体。

[0106] 如上所述，当考虑其与其最终所含的转基因分离时，载体基因组是置换载体，其中在原始慢病毒基因组中的 2 个长末端重复 (LTR) 之间的核酸已被限制为用于 DNA 或 RNA 合成和加工的顺式作用序列，或者至少被缺失或突变使得表达慢病毒结构蛋白，包括生物学功能 GAG 多蛋白和可能的 POL 和 ENV 蛋白的关键核酸节段。

[0107] 在特定实施方案中，载体基因组是生物学功能 Gag 表达缺陷的，有利的是生物学功能 POL 和 ENV 蛋白缺陷的。

[0108] 慢病毒的 5' LTR 和 3' LTR 序列用于载体基因组中，但是 3' -LTR 至少针对原始慢病毒的 3' LTR 至少在 U3 区域被修饰。5' LTR 也可被修饰，特别是其启动子区。

[0109] 在特定实施方案中，载体基因组因此缺少 Vif-, Vpr, Vpu- 和 Nef 辅助基因的编码序列（对于 HIV-1 慢病毒载体），或者缺少它们的完整或功能基因。

[0110] 在优选的实施方案中，慢病毒载体颗粒的载体基因组包含作为插入的顺式作用片段的至少一个组成 DNA 活瓣或含有这种 DNA 活瓣的多核苷酸。在特定实施方案中，DNA 活瓣插入到感兴趣多核苷酸的上游，有利但非必须位于载体基因组大约中心位置。适合本发明的 DNA 活瓣可以得自逆转录病毒，特别是慢病毒，特别是人类慢病毒，或者得自逆转录病毒样生物如反转录转座子。其可以得自 CAEV（山羊关节炎脑炎病毒）病毒，EIAV（马传染性贫血病毒）病毒，VISNA 病毒，SIV（猿免疫缺陷病毒）病毒或 FIV（猫免疫缺陷病毒）病毒。DNA 活瓣可以合成制备（化学合成）或如用聚合酶链反应 (PCR) 扩增来自上述合适来源的提供 DNA 活瓣的 DNA 制备。在更优选实施方案中，DNA 活瓣得自 HIV 逆转录病毒，如 HIV-1 或 HIV-2，包括这两个类型的然后分离株。

[0111] DNA 活瓣（定义于 Zennou V. et al, 2000, Cell vol 101, 173-185 或 W099/55892 及 W001/27304），是位于一些慢病毒特别是 HIV 的基因组的中心的结构，其产生 3 链 DNA 结构，在特别是 HIV 逆转录期间正常合成并且作为 HIV 基因组核输入的顺式决定簇。DNA 活瓣使得在逆转录期间发生由中心多嘌呤序列段 (cPPT) 和中心终止序列 (CTS) 顺式控制的中心链置换事件。当插入到慢病毒衍生的载体中时，使得 DNA 活瓣在逆转录期间产生的多核苷酸刺激基因转移效率并互补核输入水平至野生型水平 (Zennou et al, Cell, 2000)。

[0112] DNA 活瓣的序列已在现有技术中披露，特别是上述专利申请中。这些序列还公布于附图中作为 SEQ ID NO :1 至 SEQ ID NO :7。它们优选作为可能具有额外侧翼序列的片段插入载体基因组中，位于所述载体基因组中心附近。或者它们可以插入控制本发明多核苷酸表达的启动子的立即上样。插入到载体基因组中的所述包含 DNA 活瓣的片段可以具有大约 80 至大约 200bp 的序列，取决于其来源和制备。

[0113] 根据特定实施方案，DNA 活瓣具有大约 90 至大约 140 个核苷酸的核苷酸序列。

[0114] 在 HIV-1 中，DNA 活瓣是稳定的 99 个核苷酸长加上链重叠。当用于本发明的慢病

毒载体的基因组载体中时,其可以作为更长序列插入,特别是当其制备为 PCR 片段时。包含提供 DNA 活瓣的结构的多核苷酸是 178 个碱基对聚合酶链反应 (PCR) 片段,包含 HIV-1 DNA 的 cPPT 和 CTS 区域 (Zennou et al 2000)。

[0115] 这个 PCR 片段可特别衍生自 HIV-1 LAI 的感染性 DNA 克隆,特别是 HIV1 的 pLAI3,作为相应于核苷酸 4793-4971 的序列的片段。如果合适,向获得的片段的一端或两端加入限制位点用于克隆。例如, Nar I 限制位点可加入用于进行 PCR 反应的引物的 5' 末端。

[0116] 因此,在本发明中使用 DNA 活瓣,其缺少 pol 基因的非必需的 5' 和 3' 部分,并与不同来源的序列重组。DNA 活瓣可以合成制备(化学合成)或如用聚合酶链反应 (PCR) 扩增来自上述合适来源的提供 DNA 活瓣的 DNA 制备。在更优选实施方案中, DNA 活瓣得自 HIV 逆转录病毒,如 HIV-1 或 HIV-2,包括这两个类型的然后分离株。

[0117] 规定用于基因组载体中的 DNA 活瓣和编码 GAG 和 POL 多蛋白的包壳质粒的多核苷酸应源自相同慢病毒亚科或源自相同逆转录病毒样生物。

[0118] 优选地,基因组载体的其它顺式活化序列也源自相同慢病毒或逆转录病毒样生物,与提供 DNA 活瓣的一样。

[0119] 载体基因组可进一步包含一个或几个独特限制位点用于克隆感兴趣多核苷酸。

[0120] 根据本发明,假型包装的慢病毒载体是不能复制的慢病毒载体,其是 gag 和 pol 功能基因被绝对反式提供及因此不存在于载体基因组上这一事实的结果。在这种情况下,当慢病毒载体被给予宿主时,其不能在宿主细胞中复制。因此,其提供治疗感兴趣的多核苷酸进入宿主细胞用于表达但不形成进一步的慢病毒载体颗粒。慢病毒载体的这种不能复制状态特别是当慢病毒 gag、pol、env 基因不被提供在载体基因组中或不被提供为功能基因时实现。“功能”是指基因被正确转录,和 / 或正确表达。因此,这个实施方案中的本发明的慢病毒载体基因组含有不转录或不完整转录的 gag、pol 和 env 基因的至少一个;术语“不完整转录”是指转录物 gag、gag-pro 或 gag-pro-pol 中的改变,这些之一或这些中的几个不转录。参与慢病毒复制的其它序列也可以在载体基因组中被突变以实现这种状态。

[0121] 在优选的实施方案中,在所述载体基因组中,慢病毒载体基因组的 3' LTR 序列缺少至少激活物(增强子)及可能的 U3 区域的启动子。在另一个特定实施方案中,3' LTR 区缺少 U3 区域(delta U3)。在这个方面,参考 W001/27300 及 W001/27304。

[0122] 在特定实施方案中,在载体基因组中,LTR 5' 的 U3 区域被非慢病毒 U3 或适合驱动 tat 不依赖性初级转录的启动子置换。在这种情况下,载体不依赖于 tat 反式激活物。

[0123] 载体基因组还包含 psi (Ψ) 包装信号。所述包装信号衍生自 gag ORF 的 N-末端片段。在特定实施方案中,其序列可以被移码突变修饰以防止 gag 肽的可能的转录 / 翻译干扰转基因的转录 / 翻译。

[0124] 载体基因组可任选含有选自剪接供体位点 (SD)、剪接受体位点 (SA) 和 / 或 Rev 响应元件 (RRE) 的元件。

[0125] 根据特定实施方案,载体质粒(或加入的基因组载体)包含下列顺式作用序列用于转基因表达盒:

[0126] 1. LTR 序列(长末端重复),逆转录、病毒 DNA 整合及转录所需的。3' LTR 在 U3 区域中被缺失,不干扰基因转移所需的功能,因为两个主要原因:首先,一旦 DNA 整合进基因组中,为避免宿主基因的反式激活,第二,允许在逆转录后病毒顺式序列的自身失活。任

选地,驱动基因组转录的来自 5' -LTR 的 tat 依赖性 U3 序列被启动子序列置换。因此,在靶细胞中仅来自内部启动子的序列被转录(转基因)(图 23 和图 24)。

[0127] 2. Ψ 区域,病毒 RNA 包壳所需的。

[0128] 3. RRE 序列(Rev 响应元件),在结合 Rev 蛋白后允许病毒信使 RNA 从核输出到细胞溶胶。

[0129] 4. DNA 活瓣序列(cPPT/CTS,正常包含于 Pol 中),促进核输出。

[0130] 5. 任选地,WPRE 顺式活性序列(土拨鼠乙型肝炎病毒后响应元件)也被加入以优化 mRNA 的稳定性(Zufferey et al.,1999)。WPRE 不被翻译。

[0131] 在特定实施方案中,除了可衍生自慢病毒编码区的治疗感兴趣多核苷酸之外,根据上述顺式作用序列披露的载体质粒缺少其它慢病毒核苷酸序列。

[0132] 本发明的慢病毒载体是非复制型的,即载体及慢病毒载体基因组不能形成从感染的宿主细胞芽生的新颗粒。这可以通过慢病毒基因组中不存在 gag、pol 或 env 基因而实现,如上段所述;这也可以通过缺失颗粒形成所需的其它病毒编码序列和/或顺式作用遗传元件而实现。慢病毒载体复制的不存在应该与慢病毒基因组的复制区分开。事实上,如前所述,慢病毒基因组可含有复制起点保证慢病毒载体基因组的复制而非必须保证载体(或颗粒)的复制。

[0133] 在进一步的实施方案中,特别是当编码至少一种抗原多肽的多核苷酸源自慢病毒时,所述的慢病毒载体基因组不包含完整的慢病毒 gag、pol 或 env 编码多核苷酸,是指所述慢病毒载体基因组包含比慢病毒 gag、pol 或 env 基因短的多核苷酸。因此,gag 编码序列对于 HIV-1 或 HIV-2 短于 1500bp;pol 编码序列对于 HIV-1 短于 3000bp,对于 HIV-2 短于 3300bp;env 编码序列对于 HIV-1 短于 2700bp,对于 HIV-2 短于 2500bp。这个大小是指在天然慢病毒基因组中发现的最长的连续核苷酸序列。但是,在另一个特定实施方案中,慢病毒基因组缺失全部内源编码慢病毒序列。

[0134] 为了获得本发明的慢病毒载体,载体基因组(作为载体质粒)必须被包壳为颗粒或假颗粒。因此,慢病毒蛋白质,除了包膜蛋白之外,必须在生产系统中特别是生产细胞中被反式提供给载体基因组,与载体基因组一起,求助于(recourse)至少一种携带 gag 和 pol 慢病毒基因或整合不相容 pol 基因的包壳质粒,优选缺少 Vif-、Vpr、Vpu 和 Nef 辅助基因的编码序列(对于 HIV-1 慢病毒载体)。

[0135] 使用另一个质粒,其携带编码选自用于假型包装每个慢病毒载体的包膜蛋白的多核苷酸。

[0136] 在优选的实施方案中,包装质粒编码仅病毒颗粒合成必需的慢病毒蛋白。存在于质粒中可导致安全性关注的辅助基因因此被除去。反式带来的病毒蛋白以 HIV-1 举例分别为:

[0137] 1. Gag 蛋白,用于构建基质(MA,具有表观分子量 p17),衣壳(CA, p24)及核衣壳(NC, p6)。

[0138] 2. Pol 编码的酶:整合酶、蛋白酶和逆转录酶。

[0139] 3. Tat 和 Rev 编码调节蛋白,Tat 是起始 LTR 介导的转录所需的;其可以被省略,如果 5' LTR 的 U3 区被驱动 tat 不依赖性转录的启动子取代。

[0140] 为了避免产生自包装质粒所含基因的 mRNA 包装在病毒颗粒中,从包装质粒中除

去 Ψ 区域。将异源启动子插入到质粒中以避免重组问题,将 polyA 尾加入到编码蛋白质的序列的 3'。

[0141] 包膜质粒编码用于假型包装的包膜蛋白,其如本文披露,在内部启动子的控制下。

[0142] 用于制备本发明的慢病毒载体颗粒的任何或全部所述质粒可以在编码蛋白质的节段被密码子优化 (CO)。根据本发明的密码子优化优选被进行以改良质粒所包含的编码序列在哺乳动物细胞特别是人类细胞中的翻译。根据本发明,密码子优化特别适合直接或间接改良载体颗粒的制备或改良它们被给予的宿主细胞的摄取,或者改良感兴趣的多核苷酸(转基因)转移进宿主的转导细胞的基因组中的效率。优化密码子的方法是本领域熟知的,密码子优化特别使用可利用的程序进行。密码子优化针对所述 pTRIP 质粒和附图例证的本发明的 pThV 质粒中所包含的编码序列而例证。

[0143] 在本发明的特定实施方案中,假型包装的慢病毒载体还是或者是不能整合的。在这种情况下,载体基因组及因此治疗感兴趣的异源多核苷酸不整合进转导细胞的基因组中或其被给予的宿主的细胞中。

[0144] 本发明涉及慢病毒载体的应用,其中表达的整合酶蛋白是缺陷的并且其进一步包含特别编码至少一种抗原多肽的多核苷酸,以产生适合在需要的宿主中引起抗所述至少一种多肽的免疫应答的免疫原性组合物。所述多核苷酸是具有本文披露的特征的多核苷酸。

[0145] 所述多核苷酸(或慢病毒载体基因组)包含核输入及编码至少一种抗原多肽的多核苷酸的正确表达所需的全部元件。可被插入本发明的慢病毒载体的慢病毒基因组中的元件的例子是至少一个(优选两个)长末端重复(LTR),如 LTR5' 和 LTR3', 参与慢病毒基因组包壳的 psi 序列和任选地至少一种包含 cPPT 和 CTS 结构域的 DNA 活瓣。慢病毒载体基因组还可包含选自剪接供体位点(SD)、剪接受体位点(SA)和/或 Rev 响应元件(RRE)的元件。

[0146] 在特定实施方案中,所述慢病毒载体用如本文所述的 VSV-G 蛋白假型包装。

[0147] “缺陷”是指整合酶、优选慢病毒来源的整合酶,缺少将慢病毒基因组整合进宿主细胞的能力,即整合酶蛋白被突变以特异地改变其整合酶活性。

[0148] 不能整合的慢病毒载体通过修饰编码整合酶的 pol 基因获得,产生编码整合缺陷的整合酶的突变的 pol 基因,所述修饰的 pol 基因包含在包壳质粒中。这种不能整合的慢病毒载体已在 W02006/010834 中描述。因此蛋白质的整合酶能力被改变,而 GAG、PRO 和 POL 蛋白从包壳质粒的正确表达和/或衣壳及因此载体颗粒的形成,以及在整合步骤之前或之后的病毒周期的其它步骤如逆转录,核输入,保持完整。当其应实现的整合被改变从而与含有相应野生型整合酶的慢病毒相比整合步骤发生低于 1/1000,优选低于 1/10000 时,整合酶被称为是缺陷的。

[0149] 在本发明的特定实施方案中,缺陷的整合酶来自 1 类突变,优选氨基酸取代(单氨基酸取代)或短缺失,满足缺陷的整合酶表达的需要。突变在 pol 基因内进行。这些载体可携带在酶的催化结构域具有突变 D64V 的缺陷整合酶,其特异性阻断整合步骤中的 DNA 裂解和结合反应。D64V 突变降低假型包装的 HIV-1 的整合达野生型的 1/10000,但是保持它们转导非分裂细胞的能力,允许有效的转基因表达。

[0150] 适合影响 HIV-1 整合酶的整合酶能力的 pol 基因中的其它突变如下: H12N, H12C, H16C, H16V, S81R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N,

D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D-35-E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199C, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A 及 K264H。

[0151] 在特定实施方案中, pol 基因中的突变在下述位置 D64, D116 或 E152 的任一中进行, 或者在这些位置的几个中进行, 它们是在蛋白质的催化位点中。这些位置的任何取代均是合适的, 包括上述那些。

[0152] 另一种推荐的取代是由氨基酸残基 AAH 置换氨基酸残基 RRR (位置 262-264)。

[0153] 在本发明的特定实施方案中, 当慢病毒载体是不能整合的时, 慢病毒基因组进一步包含复制起点 (ori), 其序列依赖于慢病毒基因组被表达的细胞的性质。所述复制起点可来自真核来源, 优选哺乳动物来源, 最优选人来源。其可以是病毒来源, 特别是来自 DNA 环状 episomic 病毒, 如 SV40 或 RPS。本发明的有利的实施方案是使复制起点插入本发明的慢病毒载体的慢病毒基因组中。事实上, 由于慢病毒基因组不整合进细胞宿主基因组 (由于缺陷整合酶), 所以慢病毒基因组在经历频繁细胞分裂的细胞中丢失; 这在免疫细胞如 B 或 T 细胞中尤其如此。复制起点的存在保证了至少一个慢病毒基因组存在于每个细胞中, 甚至在细胞分裂后, 使得免疫应答效率最大化。

[0154] 在本发明的特定实施方案中, 慢病毒载体基因组是基于 HIV 的基因组并具有图 2 或 23-25 显示的序列特征, 其中所述感兴趣的序列根据其治疗兴趣选择, 使得其表达的内部启动子 (附图中由 CMV 启动子代表) 有利地被选择以示于在人类中给予。

[0155] 转基因或者载体基因组的表达盒中包含的内部启动子可以选自下述基因的启动子: EF1 α 、人 PGK、PPI (前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR 不变链 (P33)、HLA DR α 链、铁蛋白 L 链或铁蛋白 H 链、 β 2 微球蛋白、凝乳酶 β 4、凝乳酶 β 10 或 Cystatin 核糖体蛋白 L41。

[0156] 本发明所述慢病毒载体的慢病毒载体基因组可特别衍生自 HIV-1 质粒 pTRIP Δ U3. CMV-GFP, 其 1999 年 10 月 11 日保藏于 CNCM (Paris, France), 保藏号 I-2330。该质粒包含的各种序列的结构及限制位点示于图 2D。pTRIP Δ U3. CMV-GFP 的序列示于图 6。

[0157] 在本发明的特定实施方案中, 慢病毒载体基因组可衍生自 HIV-1 质粒 pTRIP[Δ U3EF1[α]-GFP, 其 1999 年 10 月 11 日保藏于 CNCM, 保藏号 I-2328。该质粒的组成序列的描述见图 2E, 各种序列的限制位点被示出。

[0158] 当载体基因组衍生自这些特定质粒时, 本申请公开的异源多核苷酸序列被插入其中, 除了 GFP 编码片段之外或置换该片段。GFP 编码序列还可用不同的标记取代。CMV 启动子也可以由另一个启动子取代, 特别是上述启动子之一, 特别是与转基因表达相关的启动子。

[0159] 适于进行本发明的其它慢病毒载体基因组是以下所列的保藏材料中包含的那些, 或者衍生自这些保藏质粒, 特别是通过用不同的感兴趣多核苷酸和 / 或不同的内部启动子取代转基因。特定保藏的 pTRIP 载体中包含的 WPRE 序列也可以被缺失。

[0160] 本发明因此涉及由质粒 pTRIP Δ U3-CMV-SIV-GAGco-WPRE 提供的慢病毒载体基因组, 该质粒 2007 年 10 月 10 日保藏于 CNCM (Paris, France), 保藏号 I-3841。质粒的组成在附图中公开, 其序列被提供。这个质粒表达 SIV 的 GAG 蛋白为非十四烷基化蛋白。所

述转基因的 ORF 已被密码子优化用于在人类细胞中表达。

[0161] 本发明还涉及由质粒 pTRIPDeI taU3-CMV-SIV-GAG-WPRE 提供的慢病毒载体基因组,该质粒 2007 年 10 月 10 日保藏于 CNCM(Paris,France),保藏号 I-3840。质粒的组成在附图中公开,其序列被提供。这个质粒表达 SIV 的 GAG 蛋白为非十四烷基化蛋白。所述转基因的 ORF 未被密码子优化。

[0162] 载体颗粒可在所述质粒转染合适细胞如 293T 细胞后产生,或通过其它方法产生。在用于表达慢病毒颗粒的细胞中,所有或一些质粒可用于稳定表达它们的编码多核苷酸,或瞬时或半稳定表达它们的编码多核苷酸。

[0163] 产生的颗粒浓度可以通过测量细胞上清的 P24(HIV-1 的衣壳蛋白)含量而确定。

[0164] 本发明的慢病毒载体,一旦被给予宿主,即感染宿主细胞,可能是特殊细胞,这取决于其被假型包装的包膜蛋白。感染导致释放慢病毒基因组进入宿主细胞的细胞质,在此发生逆转录。一旦呈三链体形式(经 DNA 活瓣),慢病毒基因组被输入核中,在此感兴趣的多核苷酸经细胞机制表达。当非分裂细胞被转导时(如 DC),表达可以是稳定的。当分裂细胞被转导时,如 B 细胞,表达在慢病毒基因组不存在复制起点条件下是暂时的,因为核酸稀释和细胞分裂。表达可以通过提供复制起点保证慢病毒基因组在细胞分裂后扩散至子代细胞中而更长。稳定性和/或表达也可以通过插入 MAR(基质相关区)或 SAR(支架相关区)元件而增加。

[0165] 事实上,这些 SAR 或 MAR 区是富含 AT 序列,使得将慢病毒基因组锚定细胞染色体的基质,由此调节编码至少一种抗原多肽的多核苷酸的转录,特别是刺激转基因的基因表达及改良染色质可及性(accessibility)。

[0166] 如果慢病毒基因组是非整合的,其不整合进宿主细胞基因组。然而,由转基因编码的至少一种多肽被足够表达和足够长以被加工,与 MHC 分子结合及最终导向细胞表面。根据感兴趣多核苷酸的性质,与 MHC 分子结合的所述至少一种多肽表位触发体液或细胞免疫应答。不能整合的慢病毒载体的制备在本文公开:用于反式互补载体基因组的包壳质粒在整合酶蛋白区域被突变,从而在慢病毒载体被给予患者后,当所述载体在细胞宿主中作为假型包装颗粒产生时,所述整合酶在慢病毒载体中不表达或不功能性表达。

[0167] 术语“免疫原性组合物”是指包含至少本发明的慢病毒载体作为活性成分的组合物,所述组合物适合给予宿主。当用于系统或局部给予时,这个组合物可包含进一步的药理学合适赋形剂或载体和/或运载体。“药理学可接受载体”是指任何常规类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包囊材料或配制辅料。“药理学可接受载体”在采用的剂量和浓度对于受体是无毒的,并与配方中的其它成分相容。合适的载体包括但非限于磷酸盐缓冲液,蒸馏水,乳液如油/水乳液,各种类型的湿润剂无菌溶液等,右旋糖,甘油,盐水,乙醇,及其组合。

[0168] 本发明的免疫原性组合物尽管不存在转基因整合进宿主细胞基因组也具有引起免疫应答的能力,即宿主免疫系统抗所述至少一种多肽(由所述转基因编码)的任何反应。

[0169] 免疫应答可以是体液应答,即产生由所述组合物引起的抗所述至少一种慢病毒载体的多肽的抗体。在特定实施方案中,所述体液应答是保护性体液应答。保护性体液应答主要导致成熟的抗体,具有对其抗原的高亲和性,如 IgG。在特定方面,保护性体液应答是 T 细胞依赖性的。在特定实施方案中,保护性体液应答诱导产生中和抗体。

[0170] 免疫应答可以是细胞免疫应答 (T 细胞免疫应答), 特别是 CD8 介导的细胞免疫应答或 CD4 介导的细胞免疫应答, 即由携带 CD8 或 CD4 受体的活化细胞介导的免疫应答, 优选细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。

[0171] 在本发明的特定实施方案中, 本发明的慢病毒载体尽管整合酶缺陷仍能引起早期免疫应答。术语“早期免疫应答”是指保护性免疫应答 (抗携带所述至少一种多肽的病原体或肿瘤细胞的保护) 在给予组合物后大约 1 周内被赋予。

[0172] 在另一个实施方案中, 由本发明组合物赋予的免疫应答是持久免疫应答, 即所述免疫应答在给予组合物后至少 2 个月、优选至少 3 个月、最优选至少 6 个月仍可以检测到。当免疫应答是体液免疫应答时, 持久应答可以通过任何合适方法检测特异抗体而显示, 所述方法如 ELISA, 免疫荧光 (IFA), 转化灶降低中和测试 (focus reduction neutralization test, FRNT), 免疫沉淀或 Western 印迹。

[0173] 在另一个独立于上述实施方案的实施方案中, 本发明的组合物赋予的免疫应答的强度取决于慢病毒载体的注射剂量; 剂量越高, 免疫应答强度越高。

[0174] 令人感兴趣地, 所述免疫应答, 体液或细胞免疫应答, 早期免疫应答和 / 或持久免疫应答, 在单次给予本发明组合物后由非整合基因转移载体引起。

[0175] 考虑到使用慢病毒载体颗粒特别是化合物试剂盒设计医学治疗方案, 本发明的慢病毒载体在其载体基因组中携带具有治疗兴趣的异源多核苷酸 (或转基因)。术语“异源多核苷酸”是指载体基因组, 与源自慢病毒基因组的及载体活性所需或有用的载体基因组中的顺式作用序列无关, 包含至少一种多核苷酸, 其不是载体活性所需或有用的, 但是其适合获得生物学作用, 特别是医学作用, 当其在宿主特别是人类宿主中表达时。在优选的实施方案中, 感兴趣的多核苷酸编码多肽并优选包括在表达盒中。

[0176] 本发明的异源多核苷酸编码一个多肽或几个多肽, 其适合在宿主中引起免疫应答, 所述免疫应答是细胞免疫应答和可能是体液免疫应答。编码的多肽 (即抗原) 包含一个或几个抗原表位或由抗原表位组成。在特定实施方案中, 其可以是多表位。其可以在宿主细胞中被加工用于经宿主的 APC 特别是 DC 呈递以产生免疫应答, 或者其可以直接引起免疫应答。因此, 感兴趣多核苷酸包含一个或若干抗原的 B 表位和 / 或 T 表位序列或由其组成, 包括两类表位的结合, 产生嵌合 (即非天然) 多肽。

[0177] 表位可以依赖于特异性三维抗原构象 (构象表位), 或者可以相应于简单的一级序列区域 (线性表位)。多肽的大小从至少 9 个氨基酸直至 500 个氨基酸, 并优选小于 200 个氨基酸。

[0178] 在特定实施方案中, 所述异源多核苷酸编码病原体或致病因子或化合物的一个抗原或几个抗原或其片段, 包括表位 (B 和 / 或 T 表位), 所述病原体如病毒, 特别是逆转录病毒、慢病毒、黄病毒或冠状病毒, 细菌或寄生虫。其可以编码病原体的抗原或重组抗原, 程度是当慢病毒载体被给予时其不能表达病原体。

[0179] 异源多核苷酸可以在宿主细胞中表达为内源抗原, 特别是在所述多核苷酸转移进宿主细胞基因组之后, 并且在所述细胞中被加工以与 MHC 分子结合呈递。

[0180] 感兴趣的多核苷酸可以被选择从而用载体引起的免疫应答可能在被 APC 呈递后可以特别包含引起 T 淋巴细胞应答, 包括 T 辅助细胞或 CTL 细胞 (细胞毒性的)。宿主中的抗所述多核苷酸的加工表达产物的 CD8⁺T 细胞应答是特别感兴趣的。

[0181] CD4⁺T 细胞应答也可以被表达（诱导或引起）。

[0182] 由整合或非整合形式的本发明慢病毒载体靶向的特定细胞是参与免疫应答的细胞，如抗原呈递细胞（APC）、树突细胞（DC）包括常规 DC（cDC）或浆细胞样（pDC）、T 细胞包括 CD4⁺ 或 CD8⁺、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞、天然杀伤 T 细胞、内皮细胞和上皮细胞。令人感兴趣地，B 细胞最近已显示与循环成熟 DC 相互作用，由此激活这些 B 细胞，其进而有效呈递抗原至原初 T 细胞（成熟 APC 群的扩增）；因此，这指出 B 细胞在初免参与细胞免疫应答中的细胞特别是原初 CD8⁺T 细胞中的关键作用（Diaz de Durana ;2006）。

[0183] 感兴趣的多核苷酸可以被选择以便本发明的慢病毒载体还可以或者另外被用于在宿主中引起抗所述多核苷酸的表达产物的体液免疫应答，特别是中和性体液免疫应答。

[0184] 在本发明的特定实施方案中，其中慢病毒载体颗粒意在防止或治疗非慢病毒感染，具有生物学或治疗兴趣的异源多核苷酸与组成载体基因组的多核苷酸具有不同的来源。特别地，其源自与提供载体基因组序列的慢病毒不同的生物体。

[0185] 在特定实施方案中，当需要防止或治疗慢病毒感染时，所述异源多核苷酸可以源自提供载体的慢病毒同一科或相同血清型，特别是当慢病毒载体颗粒是基于 HIV 的慢病毒载体时。

[0186] 在特定实施方案中，所述异源多核苷酸编码衍生自慢病毒蛋白的抗原或其抗原片段或这种抗原的组合。在这种情况下，所述慢病毒蛋白抗原或其抗原片段用于防止天然或能复制慢病毒载体颗粒形成的情况中。

[0187] 在特定实施方案中，其用于还防止慢病毒假颗粒如 GAG 或 GAG-POL 假颗粒形成的情况中。这些抗原可以衍生自与用于设计慢病毒载体相同的慢病毒，特别是 HIV，特别是 HIV-1。

[0188] 因此，所述多核苷酸可以是一个或若干 HIV 多肽或多表位的编码序列，特别是 HIV-1 多肽或多表位的编码序列，其适合在宿主中引起细胞、特别是细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）应答及可能的 T 辅助细胞应答。

[0189] 在本发明的优选实施方案中，慢病毒载体在其基因组中包含编码一个或若干多肽的重组多核苷酸，所述多肽包含至少一种衍生自免疫缺陷病毒特别是 HIV、SIV 或 FIV 的 GAG 抗原或多蛋白的抗原。

[0190] GAG 多蛋白包含基质蛋白（MA）、衣壳蛋白（CA）及核衣壳蛋白（NP）。其还可包含 p7 蛋白。

[0191] 上述定义的 GAG 衍生的抗原包含衍生自每种这些蛋白质的多肽，包括其片段或突变版本（经缺失、取代或添加）。其还包含衍生自每种这些蛋白质的这种多肽的组合。

[0192] 在特定的实施方案中，衍生自免疫缺陷病毒的 GAG 的抗原具有天然 GAG 抗原的氨基酸序列，特别是 GAG 多蛋白或基质蛋白或衣壳蛋白或核衣壳蛋白的氨基酸序列，或者是相对于天然 GAG 抗原被修饰的 GAG 抗原，特别是经突变修饰包括在氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或若干氨基酸残基，或者经翻译后修饰而修饰。修饰的 GAG 抗原经选择为生物学有功能的或生物学无功能的。

[0193] 在特定的实施方案中，编码包含衍生自免疫缺陷病毒的 GAG 多蛋白的至少一种抗原的一个或若干多肽的重组多核苷酸编码这样的多肽，其是 SIV 特别是 SIV_{MAC} 或 FIV 或 HIV 特别是 HIV-1 或 HIV-2 的生物学无功能的 GAG 多肽（包括 GAG 的抗原片段），并且在用慢病

毒载体转导的细胞内不能形成生物学有功能的衣壳,特别是不诱导从这些细胞分泌能形成 GAG 假颗粒或 GAG-POL 假颗粒的衣壳蛋白。

[0194] 在特定的实施方案中,包括编码衍生自 GAG 的抗原的核酸的多核苷酸不能表达 POL 生物学活性多肽(也称作前体的多蛋白),因此不包含 pol 天然基因或等价功能基因。

[0195] 在特定实施方案中,编码包含衍生自免疫缺陷病毒的 GAG 抗原的至少一种抗原的一个或若干多肽的重组多核苷酸还编码衍生自免疫缺陷病毒的 NEF、TAT 或 REV 抗原和/或任选地免疫缺陷病毒的 POL 抗原的多肽,或其组合。这些多肽特别是所述抗原的抗原片段。

[0196] 编码衍生自(HIV-1 的)GAG 的重组多核苷酸及编码融合蛋白中的其它 HIV-1 抗原的进一步的核苷酸片段的例子是编码图 21 所示 GAG 蛋白的多核苷酸, POL 片段或/和 NEF 片段或这种 POL 和 NEF 片段的融合体也在图 21 中示出。这些片段可以融合在 GAG 抗原的 5' 和/或 3', 可以彼此连续和/或与 GAG 抗原连续,或者可以由肽如来自小 RNA 病毒的 2A 肽分隔开。这种构建体在附图中示出。2A 肽的序列如下:APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP。融合蛋白的结构的一种特定组构是如下之一:5' GAG POL NEF 3', 或 5' POL NEF GAG 3' 或 5' POL GAG NEF 3', 或 5' NEF GAG POL 3' 或 5' NEF POL GAG 3' 或 5' GAG NEF POL 3'。

[0197] 在优选的方案中,衍生自 GAG 和/或 NEF 和/或 POL 抗原的抗原衍生自人免疫缺陷病毒(HIV),特别是 HIV-1 或 HIV-2。

[0198] 在特定的实施方案中,衍生自 GAG 抗原的多肽是 GAG Δ myr 蛋白,其与天然 GAG 相反不是十四烷基化的。

[0199] 非十四烷基化的 HIV-1 GAG 可以得自突变密码子 2 的 GAG 编码序列以将 Gly 残基[GGA] 改变为 Ala 残基[GCA],或者缺失所示密码子 2。

[0200] 本发明其它感兴趣的 GAG 衍生抗原是由 GAG 的基质、衣壳和核衣壳蛋白中的至少一个的片段形成的抗原,特别是由每种所述蛋白的片段的融合体形成。

[0201] 观测到编码的衍生抗原可以衍生自 HIV-1、特别是 HIV-1 亚型 B 或 HIV-1 组 O 的 GAG 抗原(图 21),并可用于化合物组合中以引起抗各种 HIV 组包括不同的 HIV-1 亚型、HIV-1 和可能的 HIV-2 的免疫应答。

[0202] 本发明还涉及本文定义的慢病毒载体,在其基因组中包含重组多核苷酸,所述多核苷酸具有密码子优化的序列,编码衍生自人免疫缺陷病毒(HIV)的 GAG 多蛋白的抗原,或者编码融合抗原,包括衍生自 GAG 的抗原及本文公开的 NEF、TAT、REV 或 POL 的至少一个抗原片段。

[0203] 本发明的嵌合 HIV-1 衍生抗原在特定的实施方案中是一种融合蛋白,其包含或由具有图 21 的序列的 GAG 衍生抗原与衍生自 HIV-1 毒株的 NEF、POL、TAT 或 REV 的抗原或与这些抗原的组的组合组成。

[0204] 上述特定融合蛋白是其中 POL 衍生抗原包含或具有图 21 的氨基酸序列的融合蛋白。

[0205] 上述特定融合蛋白是其中 NEF 衍生抗原包含或具有图 21 的氨基酸序列的融合蛋白。

[0206] 由载体基因组的多核苷酸编码的抗原、特别是 GAG 衍生抗原,可以是天然的、合成的或重组来源的,因此由任何常规方法表达。

[0207] 本发明还涉及编码这种融合抗原的核苷酸构建体,包括它们的密码子优化版本用于在哺乳动物特别是人类细胞中表达。

[0208] 根据特定的实施方案,重组多核苷酸编码衍生自 HIV-1 共有 B 毒株的 GAG 多蛋白的抗原。

[0209] 在另一个特定实施方案中,重组多核苷酸编码衍生自 GAG 多蛋白的抗原及 HIV 的 NEF 抗原的表位簇及任选地 HIV 的 POL 多蛋白的表位簇。

[0210] 本发明涉及编码本文公开的抗原的核酸分子。其特别涉及插入到保藏在 CNCM 的质粒中的核酸分子,特别是保藏在 CNCM 的质粒 pTRIPDeltaU3-CMV-SIV-GAG-WPRE 或 pTRIPDelta U3-CMV-SIV-GAG co-WPRE,或者保藏在 CNCM 的质粒 pThV-VSV-G(IND-co), pThV-VSV-G(NJ-co), pThV-VSV-G(COCAL-co), pThV-VSV-G(ISFA-co) 或 pThV-VSV-G(SVCV-co),或者涉及在严格条件下与这些核酸分子杂交的序列,特别是具有相同长度或较短。特定的核酸编码至少 GAG 抗原或其片段,特别是编码 HIV-1 或 HIV-2 GAG 抗原或其片段。

[0211] 当比较用表达编码 HIV 抗原或其衍生抗原的异源多核苷酸的慢病毒载体颗粒获得的应答与用不表达所述抗原的颗粒获得的应答时,测量细胞应答的特异性。观察到给予能表达所述 HIV 可以或 HIV 衍生抗原的颗粒引起 T 细胞免疫应答,其用不表达所述抗原的颗粒不能引起。

[0212] 这在实施例中用表达 SIV 衍生抗原的颗粒例证。

[0213] 所述应答有利的是保护性的,其意味着其能实现在用免疫缺陷病毒感染的宿主的血浆中测得的病毒负荷的降低或者控制病毒负荷,所述宿主接受至少一次初免及一或几次加强给予化合物或化合物组合以预防或治疗性用于抗免疫缺陷病毒感染,特别是人类宿主中 HIV 感染或非人灵长类宿主中 SIV_{MAC} 感染。

[0214] 换句话说,当用于预防或治疗性治疗免疫缺陷病毒特别是 HIV 感染时,给予的化合物组合使得从身体中消除病毒或控制病毒负荷,长时间持续(超过 6 个月),并且优选能保护抗体内 AIDS 病。发明人特别示出当被给予感染免疫缺陷病毒的宿主时,本发明的化合物组合能在感染急性期保持中枢记忆 CD4+T 细胞应答,其是与抗逆转录病毒病理发生的保护有价值的相关性,即抗 AIDS 在人类宿主中的发展(Letvin, N. L. et al, 2006)。

[0215] 化合物组合提供工具在人类宿主中引起保护性特异性细胞免疫应答的能力衍生自实验结果,所述实验结果是在猕猴/SIV_{mac} 非人灵长类模型中在基本上模拟在人/HIV-1 情况中观察到的条件下获得。

[0216] 因此,本发明涉及化合物组合在制备药品中的应用,所述药品用于依次给予哺乳动物宿主以引起抗免疫缺陷病毒特别是 HIV 的保护性特异性细胞免疫应答。

[0217] 根据本发明已设计了特定的慢病毒载体,以引起特异性细胞免疫应答,其示出对于病毒攻击是保护性的。尽管因众所周知原因,这一证实尚未在人类中进行,但是在非人灵长类中公开的结果高度倾向于人类中的相似预期。

[0218] 所获得的特定慢病毒载体提供了特别感兴趣的候选者,用于抗 AIDS 的治疗性免疫接种或预防性免疫接种。

[0219] 在本发明的一个特定方面,编码源自病原生物的 B 表位和/或 T 表位的多核苷酸是编码 West Nile 病毒(WNV)的包膜 E-糖蛋白(E_{WNV})或 YellowFever 病毒或登革热病毒

(DV)、日本脑炎病毒 (JEV) 或 SARS 相关冠状病毒的包膜的多核苷酸。其它感兴趣的病毒多肽来自 HIV 的衣壳。

[0220] 在特定实施方案中,至少一种多肽由慢病毒来源的多核苷酸编码(例如来自上述 gag 或 pol,或来自例如 env)。在特定实施方案中,所述编码多核苷酸不是完整的气袋或 pol 基因或者不是完整 env 基因,或者不是这些基因的功能形式,即编码功能蛋白的基因。例如,它们具有从 30 到 1000、优选从 30 到 500bp、优选 30-300bp、更优选 30-100bp 的大小,或其可溶形式或编码其表位。插入 WNV 的可溶性 E 糖蛋白 (sE_{WNV}) 的编码序列可以通过 Reimann et al. (J. Virol. ;2005) 的公开,使用 Hel et al. (J. Immunol. ;2006) 所述的 sE_{WNV} 实现。

[0221] 根据本发明另一特定方面,异源多核苷酸编码多肽,所述多肽是肿瘤相关抗原 (TAA) 或其片段。

[0222] TAA 的非限制性已知例子特别是:

[0223] - 在黑素瘤中发现的突变肽如 β -catenin, MART-2 或者在白血病中发现的突变肽如 bcr-abl,

[0224] - 组织特异性蛋白如在黑素瘤中发现的 gp100, MART-1, 酪氨酸酶,或者在前列腺癌中发现的 PSA, PAP, PSM, PSMA,

[0225] - 睾丸癌抗原如 MAGE,

[0226] - 与肿瘤发生相关的分子如 Survivin, hTERT, 在各种癌症中发现,

[0227] - 粘蛋白如在乳腺癌、子宫癌或胰腺癌中发现的 MUC-1,

[0228] - 转化正常细胞为肿瘤细胞的病毒(肿瘤病毒)的病毒蛋白,包括 HPV(人乳头状瘤病毒)特别是 HPV16 或 HPV18 的病毒蛋白,包括 HPV16-E7 抗原(发现在宫颈癌中表达),导致淋巴瘤的 EBV(Epstein-Barr 病毒)包括 EBV-EBNA 蛋白(在淋巴瘤中),HBV(乙型肝炎病毒),HCV(丙型肝炎病毒),HHV(人疱疹病毒)如 HHV8 或 HTLV(人 T 白血病病毒)如 HTLV-1,如 HTLV-1 tax 蛋白(在急性 T 白血病中)。

[0229] 更一般地,这些多肽可以衍生自名称为 Cancer Immunity 的肽数据库中公开的肽序列。多核苷酸可特别选自共享的肿瘤特异性抗原、分化抗原、在肿瘤中过表达的抗原或者产生自突变的肿瘤抗原。这些多肽(或其部分)可以以野生型或突变形式源自细胞(自身肽)。

[0230] 在特定实施方案中,感兴趣的多核苷酸编码人抗原。

[0231] 在本发明另一个实施方案中,感兴趣的多核苷酸可编码多肽,其表达或功能性表达在由所考虑的病理学影响的宿主中被破坏。在特定实施方案中,本发明的慢病毒载体用于输送多核苷酸至宿主中的靶细胞,以在基因治疗的医学治疗中寻求例如导致血清蛋白缺陷的遗传病的基因校正,或用于抗癌症、感染性疾病、病毒性疾病或自身免疫疾病的遗传免疫接种策略。在另一个实施方案中,可以用本发明的化合物试剂盒治疗其它病理学如糖尿病。

[0232] 最后,所述至少一种多肽可以是人工(非天然)多肽,优选是多表位多肽。这种多表位多肽编码至少两种表位,源自病原生物包括病毒和/或肿瘤来源。在特定实施方案中,所述至少两种表位源自相同病毒或源自相同肿瘤细胞;在该情况中,所述至少两种表位可以选择其不同 CMH(HLA) 限制。在另一个实施方案中,所述至少两种表位源自不同病毒,或者源自不同肿瘤细胞。所述表位可以连续排列,即表位的 3' 末端直接与第二个表位的 5'

末端（以此类推），相应于编码仅由连续表位组成的肽序列的多核苷酸。本发明的所述至少两种表位或者可以由单氨基酸间隔基或肽间隔基分隔开，即不同的多核苷酸单位由编码一个或若干氨基酸的一个或若干密码子分隔开。作为改良多个表位的加工间隔基，优选的是由在 C 末端位置的精氨酸 (R) 和其它位置的亲水性残基 (A、K、D 和 / 或 T) 组成的 4 氨基酸肽。特别地，可使用在 C 末端具有带正电残基或酸性残基的 4 氨基酸肽，依赖于或不依赖于在其它位置的亲水性残基 (A、K、D 和 / 或 T)。在特定实施方案中，所述间隔基是内部加工序列如内体或溶酶体加工序列，使得更好加工多个表位并避免加工由重叠切割产生的新肽。间隔基的这种分隔可用于分隔所有或部分表位。

[0233] 异源多核苷酸被插入载体基因组中，在转录和表达调节序列包括启动子和可能的增强子的控制下。在特定实施方案中，调节序列不是慢病毒来源的。合适的启动子包括 CMV，也称为 CMVie 启动子，或 EF1 α 启动子，CGA 启动子，CD11c 启动子和管家基因启动子如 PGK 启动子，遍在蛋白启动子，肌动蛋白启动子，组蛋白启动子， α 微管蛋白启动子， β -微管蛋白启动子，过氧化物歧化酶 1 (SOD-1) 启动子，二氢叶酸还原酶 (DHFR) 启动子，次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 启动子，腺苷酸脱氨酶启动子，胸苷酸合成酶启动子，二氢叶酸还原酶 P1 启动子，葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶启动子或 nucleolin 启动子。其它合适启动子包括下述基因的启动子：EF1 α 、人 PGK、PPI (前胰岛素原)、thiodextrin、HLA DR 不变链 (P33)、HLA DR α 链、铁蛋白 L 链或铁蛋白 H 链、 β 2 微球蛋白、凝乳酶 β 4、凝乳酶 β 10 或 Cystatin 核糖体蛋白 L41。

[0234] 本发明的化合物试剂盒特别适用于医学治疗，其中用所述第一种病毒包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体与用所述第二种病毒包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体在时间上分开给予，并且如果合适所述初免和第一次加强晚些时候后接一个或若干加强步骤。

[0235] 因此，本发明的化合物试剂盒特别适于重复给予活性成分，特别是在初免 - 加强型反应中，可能包括几个加强步骤。

[0236] 特别地，试剂盒的化合物是这样的，用所述第一种病毒包膜蛋白或者用所述第二种病毒包膜蛋白假型包装的所述慢病毒载体分别用于引发免疫原性反应或者用于在需要的宿主中加强所述免疫原性反应。免疫反应可以进一步用具有本文所述第三种包膜蛋白的慢病毒载体及任选的具有进一步的不与所述其它慢病毒载体之一血清中和的包膜蛋白的额外加强步骤加强。

[0237] 在特定实施方案中，用 Indiana 毒株的 VSV-G 假型包装的慢病毒载体被首先给予，以引发免疫学反应，用 New Jersey 毒株的 VSV-G 或用本文公开的重组或修饰的 VSV-G 假型包装的慢病毒载体被第二个给予，以加强所述免疫学反应。

[0238] 在另一个特定实施方案中，用 New Jersey 毒株的 VSV-G 或用本文公开的重组或修饰的 VSV-G 假型包装的慢病毒载体被首先给予，以引发免疫学反应，用 Indiana 毒株的 VSV-G 假型包装的慢病毒载体被第二个给予，以加强所述免疫学反应。

[0239] 本发明特别涉及相应于这样的给予方案，用试剂盒的两种化合物一轮给予可足以引起强应答。

[0240] 为了可能地改良应答强度或范围或持续时间，可进行进一步的给予步骤。特别地，可以使用如本文所述的用选自 VSV-G, Cocal, Perinet, SVCV 或 Isfahan 病毒的包膜或包含这些包膜之一的结构域的重组包膜假型包装的慢病毒载体。

[0241] 本发明的化合物试剂盒适用于抗病毒疾病或抗感染性或肿瘤疾病的预防性治疗或治疗性包括治愈性治疗,其中所述慢病毒载体包含编码适合引起免疫应答的一个或若干抗原或其片段的多核苷酸。

[0242] 除了适合制备化合物组合用于治疗性治疗免疫缺陷病毒感染的哺乳动物宿主特别是 HIV 感染的人类宿主或 SIV_{MAC} 感染的非人灵长类宿主或 FIV 感染的动物之外,本文公开的慢病毒载体还提供了设计化合物组合的工具,用于抗免疫缺陷病毒感染、特别是人类宿主中 HIV 感染或非人灵长类宿主中 SIV_{MAC} 感染或动物中 FIV 感染的预防用途。

[0243] 本文公开的化合物组合可特别用于治疗性治疗 HIV-1 或 HIV-2 感染的人类宿主。

[0244] 本文公开的化合物组合可特别用于预防性治疗人类宿主抗 HIV-1 或 HIV-2 感染。

[0245] 以下实验部分提供的数据提供了设计的慢病毒载体转化为人类医学应用的相关性的有力证据。在实施例中描述的非人灵长类模型上实现的保护水平比用其它疫苗候选物的文献中报道结果更强,并且值得注意的是其是在用特别高剂量的感染性 SIV_{mac} 病毒的病毒攻击情况下获得的。

[0246] 从获得的实验数据,甚至观测到用于引起抗免疫缺陷病毒的保护性特异性细胞免疫应答的化合物组合可以无需添加免疫应答佐剂而制备。

[0247] 然而,本领域技术人员可决定在所述化合物组合中包括与所有或部分慢病毒载体结合的免疫调节剂和 / 或作为另外的单独的化合物的免疫调节剂。例如,细胞因子如 IL12 可以包括在组合中。

[0248] 本发明特别提供了化合物组合,其中所述慢病毒载体被配制成为适于注射宿主、特别是用于皮下注射的组合物。在另一个实施方案中,本发明化合物的给予可以有利地经肌肉内途径进行,特别是注射。发明人在实验性小鼠模型中已示出当包括表达 SIV GAG 抗原的基因转移载体颗粒的化合物经肌肉内途径被给予时,所引起的免疫应答高于当它们经皮下注射被给予相同模型时。

[0249] 所述化合物组合因此特别用于涉及注射宿主的给予方案中,并包括在哺乳动物宿主中引发免疫应答及随后加强免疫应答,其中所述 (i) 用所述第一种病毒包膜假型包装的慢病毒载体与所述 (ii) 用所述第二种病毒包膜假型包装的慢病毒载体在时间上分开给予,及如果有的话与所述 (iii) 用所述第三种病毒包膜假型包装的慢病毒载体在时间上分开给予,所述慢病毒载体 (i)、(ii) 和如果有的 (iii) 的每种被给予用于初免或用于加强免疫应答。

[0250] 给予方案的选择可以由本领域技术人员进行适应,考虑用选择的剂量获得的应答的强度和范围及进行的加强步骤的数量。

[0251] 在特定实施方案中,本发明涉及化合物组合,用于依次给予人类宿主,引起抗 HIV 的保护性特异性细胞免疫应答,给予方案包括给予相同剂量的慢病毒载体用于初免和加强步骤。

[0252] 根据另一方案,化合物试剂盒适用于体内基因治疗。可用本发明的试剂盒的化合物治疗的疾病的例子对于体内基因治疗是神经变性疾病如帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、脊柱肌肉萎缩 (SMA),它们是运动神经元疾病。可用本发明的化合物试剂盒治疗的疾病的另一个例子是脊髓损伤。

[0253] 本发明的化合物试剂盒还适于治疗癌症,其中慢病毒载体的重复给予可能是必需

的。

[0254] 本发明还涉及免疫原性组合物,其包含本申请限定的慢病毒颗粒,适用于体内抑制 HIV-1 或 HIV-2 感染或哺乳动物宿主中的 SIV 或 FIV 感染。

[0255] 本发明还涉及治疗需要治疗的宿主或患者的方法,包括相继给予宿主:

[0256] (i) 慢病毒载体,其用第一种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装;

[0257] 接着

[0258] (ii) 慢病毒载体,其用不同于所述第一种确定的包膜蛋白的第二种确定的一或多个异源病毒包膜蛋白假型包装;

[0259] 其中 (i) 和 (ii) 的所述慢病毒载体编码具有治疗兴趣的异源多核苷酸。

[0260] 在特定实施方案中,进行第三个将用本文所述第三种包膜蛋白假型包装的慢病毒载体给予宿主的步骤。

[0261] 根据本发明的特定实施方案,进行额外的给予步骤以进一步加强免疫反应。

[0262] 两个第一次给予步骤之间的时间可以是 3-12 周或更长,取决于对初免的应答。第一次加强和最后一次加强步骤之间的时间可以是几周,特别是 12 周以上,例如 6 个月,甚至可以一或几年。

[0263] 根据另一个实施方案,本发明的基因转移载体可用作单一活性成分,即用于单次给予宿主。

[0264] 因此,本发明实施方案、基因转移载体的特征或其性质的描述适用于作为唯一给予的化合物(与组合相反)的载体,特别是它们的非整合形式。

[0265] 本发明的治疗或医学治疗目的在于改善需要的患者特别是人类的临床条件,其已被诊断为被病原体感染(甚至在原发感染阶段)或者患有病理状态,或者这种治疗目的在于消除疾病的致病因子或生物体,或者降低所述因子或生物体。在病毒感染情况中,治疗可导致宿主血浆中病毒负荷显著降低,可能地,病毒负荷低于当测量时可被检测的水平,或者降低肿瘤大小或发生,如果有的话。

[0266] 当指诊断具有病理状态的患者时,医学治疗包括改善所述患者的临床状态,在优选实施方案中,恢复健康。

[0267] 其还包括在需要的宿主中预防性治疗,特别是免疫接种以防止宿主中发生病理状态。

[0268] 发明人获得的实验结果能够限定本申请中公开的化合物组合、试剂盒、方法和一般的治疗或预防应用的特异用途,特别是与免疫缺陷病毒特别是 HIV、特别是 HIV-1 或 HIV-2 相关的医学应用领域的用途。

[0269] 本发明的这些特异用途包括,彼此独立或组合的下述适应症,其可能与免疫缺陷病毒特别是 HIV 感染的不同阶段相关,或者在所述感染之前或者在暴露于逆转录病毒之前:

[0270] - 在暴露于及特别是在由逆转录病毒感染后控制病毒血症,特别是限制或降低宿主中的病毒负荷;

[0271] - 诱导宿主中抗逆转录病毒、特别是人类中抗 HIV 的保护性细胞免疫;

[0272] - 在暴露于及特别是在由逆转录病毒特别是 HIV 逆转录病毒感染后抗病毒复制的保护;

[0273] - 保护抗中枢记忆 CD4+T 细胞应答的耗竭,特别是在逆转录病毒特别是 HIV 感染的急性期;

[0274] - 保持中枢记忆 CD4+T 细胞应答,特别是在逆转录病毒特别是 HIV 感染的慢性期;

[0275] - 在逆转录病毒特别是 HIV 原发感染期间引起更早和 / 或更强的原初和中枢记忆 CD8+T 细胞应答的反弹;

[0276] - 防止病毒逃逸免疫压力,由此允许长期控制逆转录病毒特别是 HIV 的感染。

[0277] 这些特异用途对于在免疫缺陷病毒感染领域开发预防或治疗应用的有效免疫应答是有利的。它们还允许将本发明应用于各类宿主,这取决于其临床谱,与逆转录病毒感染阶段(包括感染前或暴露于逆转录病毒之前)或病理发生相关,因为它们影响免疫系统的各个区室,根据感染阶段而参与免疫应答的不同阶段。

[0278] 尽管在给予表达 SIV 或 HIV 抗原的慢病毒载体时看起来不需要,但是在其它应用中可以决定当用于系统性或局部给予时在化合物组合中进一步包括佐剂和 / 或运载体,或者可以缺少这些成分。

[0279] 在任何情况中均可以加入用于配制医学组合物的赋形剂。

[0280] 上述组合物可以经不同途径注射进宿主中:皮下(s.c.)、皮内(i.d.)、肌肉内(i.m.)或静脉内(i.v.)注射,口服给予及粘膜给予,特别是鼻内给予或吸入。被给予的数量(剂量)取决于待治疗的对象,包括考虑患者状况、个体免疫系统状态、给予途径及宿主大小。合适的剂量范围参照等价的状态颗粒的 p24 抗原(对于 HIV-1 慢病毒状态)的含量表示,并可以被确定。

[0281] 当用于单次给予时,本发明的载体可以以范围为从 1 到 100 μ g、优选 1-50 μ g、最优选 1-10 μ g 的剂量给予,并且可以根据情况由本领域技术人员修改。当配制为用于皮下注射时,本发明的免疫原性组合物优选包含 1-100 μ g 慢病毒载体 / 宿主体重,更优选从 1 到 30 μ g/剂,特别是 10 μ g/剂,单次注射。

[0282] 本发明的其它实施例和特征在实施例和附图中变得明了。

[0283] 图 1:衍生自不同病毒的 DNA 活瓣序列的各种例子。

[0284] 图 2:(A) 用于本发明目的的载体基因组构建体结构,基于典型的 HIV-1 基因组序列;(B) TRIP/sEwnv 载体的示意图;(C) TRIP/Es(WNV)的示意图;(D) 质粒 pTRIP Δ U3. CMV-GFP 的示意图;(E) 质粒 pTRIP Δ U3EF1 α -GFP 的示意图。

[0285] 使用下述缩写:U3、R 和 U5 代表 LTR 的结构域; Δ U3:缺失 U3 结构域;RRE:Rev 响应元件; Ψ :包壳信号;cPPT 和 CTS 代表 DNA 活瓣;CMVie:巨细胞病毒立即早期启动子。

[0286] 构建体及特别是 DNA 活瓣及其插入基于 HIV-1 的基因组的细节见(Zennou et al 2000)。

[0287] 图 3:(A) 来自水泡性病毒属中 VSV 物种已知的各种血清型的 VSV-G 蛋白质序列的对比:Indiana(NCBI 登录号 J02428),Chandipura(J04350),Piry(D26175),New Jersey, Cocal(AF045556),Isfahan(AJ810084)及鲤鱼病毒的 Spring 病毒血症(SVCV)(AY527273)。Indiana 蛋白和 New Jersey 蛋白是用于实施例中。(B) 来自水泡性病毒属中 VSV 物种已知的各种血清型的 VSV-G 蛋白质序列:Indiana,Chandipura,Piry,New Jersey,Cocal,Isfahan 及鲤鱼病毒的 Spring 病毒血症(SVCV)。

[0288] 图 4:TRIPsEwnv 载体的核苷酸序列。cPPT/CTS 区域下划线。在这个区域中,cPPT

和 CTS 结构域以小写字母出现。sEwv 序列以粗体表示,是 BsiWi-BssHII DNA 插入序列。这一载体在 2003 年 8 月 27 日保藏在 CNCM(Paris, France),保藏号 I-3076。

[0289] 图 5:TRIP GFP 载体的核苷酸序列。cPPT/CTS 区域下划线。在这个区域中, cPPT 和 CTS 结构域以小写字母出现。GFP 序列位于核苷酸 2816-3573。这个载体已于 1999 年 10 月 11 日保藏在 CNCM,保藏号 I-2330(pTRIP[deltaU3]CMV GFP)。

[0290] 图 6-12:各种 VSV 毒株的 VSV-G 蛋白序列(跨膜结构域下划线)(A)及编码密码子优化的核酸(B)。包含每个密码子优化序列的包膜质粒被描述(C)。质粒衍生自 pThv 质粒并包含

[0291] - 可由另一启动子取代的 CMV 启动子;

[0292] - 编码 VSV-G 的密码子优化的多核苷酸;

[0293] -WPRE(Δ ATG) 序列,其是任选的;

[0294] -polyA 序列

[0295] -kanR(卡那霉素抗性基因),其可以被取代或缺失

[0296] - 复制起点(pUC ORI)

[0297] 代表的 VSV-G 包膜分别是:

[0298] 图 6:Indiana VSV-G。这个包膜已插入质粒 pThV-VSV-G(IND-CO),以 I-3842 保藏。

[0299] 图 7:New Jersey VSV-G。这个包膜已插入质粒 pThV-VSV-G(NJ-CO),以 I-3843 保藏。保藏质粒是在大肠杆菌细胞中。它们的合适生长培养基是 LB 卡那霉素 10 μ g/ml,保温温度是 37 $^{\circ}$ C。为了储存,它们可以悬浮于具有 50% LB 和 50%甘油的液体中。

[0300] 图 8:Chandipura VSV-G

[0301] 图 9:Cocal VSV-G

[0302] 图 10:Piry VSV-G

[0303] 图 11:Isfahan VSV-G

[0304] 图 12:SVCV-VSV-G

[0305] 图 13:代表 VSV-G New Jersey 和 VSV-G Indiana 基因之间的融合基因。跨膜结构域粗体下划线。披露了用于制备融合基因的 PCR 策略。描述了用作引物的寡核苷酸。

[0306] 图 14-19公开了通过重组各种 VSV-G 蛋白的不同结构域获得的融合蛋白。对于每个蛋白,提供了密码子优化的(用于在人细胞中表达)核酸(A),及包含所述核酸的质粒(B)。

[0307] 图 14:VSV-G Chandipura/Indiana 的融合蛋白

[0308] 图 15:VSV-G Cocal/Indiana 的融合蛋白

[0309] 图 16:VSV-G Piry/Indiana 的融合蛋白

[0310] 图 17:VSV-G Isfahan/Indiana 的融合蛋白

[0311] 图 18:VSV-G SVCV/Indiana 的融合蛋白

[0312] 图 19:VSV-G New Jersey/Indiana 的融合蛋白

[0313] 图 20:显示了密码子优化对用 New Jersey VSV-G 糖蛋白假型包装的慢病毒载体的作用。VSV-G 基因(NJ 血清型)的人密码子优化刺激基因转移 100 倍。

[0314] 图 21:示出了用于本发明的感兴趣抗原的序列。编码这些抗原的核酸、特别是以

用于人细胞的密码子优化版本可以插入载体基因组的异源多核苷酸中。示出的抗原是：

[0315] HIV-1 LAI 分离株 (亚型 B) 的天然 GAG 抗原 (D) 及相应核酸序列 (E)；

[0316] 修饰的 HIV-1 GAG, 其是 delta Myr-GAG 抗原, 抑制十四烷基化, 衍生自 B 亚型的共有序列 (A)；

[0317] 衍生自 HIV-1 POL 的抗原, 其是 POL 多蛋白的片段 (B)；

[0318] 衍生自 HIV-1 NEF 的抗原, 其是 NEF 蛋白的片段 (C)。

[0319] 这些抗原可以组合用于融合蛋白中。POL 和 / 或 NEF 片段可以插入 GAG 衍生抗原的 5' 或 3'。

[0320] 它们可以是彼此连续的并插入 GAG 衍生的抗原的 5' 或 3'。

[0321] 它们可以是分离的并一个插入在 GAG 衍生的抗原的 5', 另一个插入 3'。

[0322] POL、NEF 和 GAG 衍生的抗原可以被一个肽特别是使得自裂解的肽分离, 或者不分离。合适的分离肽是 2A 肽, 来自细小 RNA 病毒, 具有序列: APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP。

[0323] 图 22 示出根据图 21 的各种抗原构建体, 用于设计抗 AIDS 免疫接种的人 HIV-1 抗原。

[0324] 图 23-27: TRIP 慢病毒载体产生原理及制备表达衍生自 SIVmac239GAG 多蛋白的慢病毒载体的应用。相同原理适用于其它抗原。这些基本上描述下述特征：

[0325] 图 23: TRIP 慢病毒载体产生的原理。

[0326] HIV-1 基因组 (A) 分裂成载体质粒 (B), 含有顺式作用序列 (LTR、包壳信号、RRE、DNA 活瓣) 和在异源启动子 (CMV) 或另一启动子控制下的感兴趣的基因 (用于免疫接种的抗原), 包装质粒 (C), 其含有包壳 (在载体颗粒产生期间) 和病毒复制循环的早期步骤 (在转导细胞中) 的基因 gag、pol、tat 和 rev, 及包膜质粒 (D), 其含有来自 VSV 的糖蛋白的 Indiana 血清型。包装质粒和包膜质粒具有来自 CMV 的异源转录调节元件并缺失包壳序列, cPPT 和 CTS。

[0327] 图 24: U3' 缺失的慢病毒载体的原理

[0328] 在病毒单链 RNA 的逆转录期间, 有 U3' 和 U5' 序列的复制, 其允许随后形成双链病毒 DNA 中的 5' LTR 和 3' LTR。病毒 DNA 的转录在细胞中从 LTR5' 开始。如果 U3' 区在载体质粒中缺失 ($\Delta U3$), 病毒 RNA 也是 $\Delta U3$, 结果是, 在逆转录后, 病毒 DNA 在 5' LTR 中缺少 U3 序列, 没有从病毒 LTR 启动子开始的转录。结果是, 转录仅由转基因的内部启动子介导。

[0329] 图 25: 用于 TRIP 载体产生的 2 个载体质粒的示意图

[0330] A: TRIP-SIVmac239 Gag, 这个载体质粒含有编码抗原 SIVmac239 gag 的序列, 缺失十四烷基化序列。这使得仅在 L1, P1 生物安全性水平工作, 因为其废除了转染细胞和转导细胞中的蛋白质分泌。

[0331] B: TRIP-GFP, 这个载体质粒含有无关抗原绿色荧光蛋白 (GFP)。

[0332] 两个载体质粒均含有上游 CMV 启动子用于抗原表达及下游 WPRE 序列以改善抗原表达。它们还含有载体颗粒形成及在转导细胞中病毒复制早期步骤所需的病毒序列: 长末端重复 (LTR)、DNA 活瓣 (cPPT, CTS)、RRE、包壳信号 Ψ 。

[0333] C. 载体基因组的 pTRIP $\Delta U3$ -CMV-SIVGag-WPRE 限制图谱 (C1) 及其核酸序列 (C2)。载体构建体保藏在 CNCM, 保藏号 I-3840。

[0334] D. 载体基因组的 pTRIP DeltaU3-CMV-SIVGag co-WPRE 限制图谱 (D1) 及其核酸序列 (D2)。载体构建体保藏在 CNCM, 保藏号 I-3841。

[0335] 保藏质粒导入大肠杆菌细胞。细胞的培养基是 LB Ampⁱ 100 μ g/ml, 保温是在 37°C。储存是在具有 50% LB 50% 甘油的悬浮液中。

[0336] 图 26: 分成 15mer 长肽的 SIVmac239 GAG 蛋白的示意图

[0337] SIV mac239 GAG 蛋白长度为 511 个氨基酸。这个蛋白质分成 125 个肽。这些肽长度为 15 个氨基酸; 依次肽之间有 11 个氨基酸重叠。

[0338] 肽分配于 11 个集合, 命名为从 M 到 W, 含有 5-12 个肽。

[0339] 图 27: (A) 用于载体滴定的引物和探针序列及 qPCR 程序; (B) 用于创建 Q-PCR 载体滴定中的标准曲线的标准化质粒, 具有探针和引物退火位点的位置。

[0340] 图 28(1): 基于初免 / 加强慢病毒载体的免疫接种策略诱导强细胞免疫。

[0341] 在各个时间点初免后、加强后及攻击后的 SIVmac239 GAG 特异性 T 细胞应答的长期跟踪通过用包含 SIVmac239 GAG p55 的重叠肽集合再刺激全部 PBMC 后进行 IFN- γ ELISPOT 测定而进行。显示了用 TRIP-SIVmac239GAG 注射的所有 6 个免疫接种的动物 (低剂量: 20022, 20089; 中剂量: 20293, 20056; 高剂量, 20195 和 20158, 图 28a)、用无关抗原 (TRIP-GFP) 在高 p24 剂量 (21544 和 20456, 图 28b) 免疫接种的 2 个对照动物及未接种动物 (15661, 14184, 15885 和 14468, 图 28c) 的个体 GAG 特异性累积应答。

[0342] 简而言之, 0.2 10^6 PBMC/孔用 11 个集合的 5-12 个重叠 15 聚体肽 (2 μ g/ml 每种肽) 体外重刺激 40 小时。每百万个 PBMC 的 IFN- γ 斑点形成细胞 (SFC) 平均数从 3 个重复孔计算, 减去对照孔 (无肽) 的数。显示的累积应答相应于用每个肽集合获得的每百万个 PBMC 的 IFN- γ SFC 之和。符合 + 表示累积应答的低估, 是由于对于至少一个肽集合的饱和 ELISPOT 孔所致 (见图 29(2))。攻击后 2 周, 不能定量对照孔中的斑点数, 因此计算动物 20022 的累积应答 (记为 ++) (nd, 未确定)。

[0343] 图 28(2): 皮下注射慢病毒载体不导致系统性炎症。

[0344] 通过 ELISA 测量皮下注射稍后血浆中 IFN- α (PBL Biomedical Laboratories) (图 28(2)a)、IL-6 (U-Cytech Bioscience) (图 28(2)b) 和 TNF- α (U-Cytech Bioscience) (图 28(2)c) 的存在。它们水平中的显著 (IFN- α 和 TNF- α) 或主要 (IL-6) 增加的缺乏提示不存在体内给予慢病毒载体颗粒诱导的系统性炎症, 即使在高剂量也如此 (2.5 10^8 TU/动物)。这些数据不排除可能由固有 PAMP 触发的局部炎症 (Brown B, D et al, 2007; Pichlmair A et al, 2007; Georgel P. et al, 2007)。

[0345] 图 29(1): 免疫接种的猕猴于未接种和对照动物相比具有改善的病毒血症的控制。

[0346] 血浆病毒负荷在攻击后跟踪 5 个月, 在前 3 周每周 2 次, 然后在接下来的 3 周每周 1 次, 最后一个月 1 次。未免疫接种的 (图 29a 15661; 14184; 15885; 14468 品系, 标记为 \square ; \diamond ; \triangle ; ∇), 对照 (图 29a 21544, 标记为 x) 和免疫接种动物 (图 29b) 的病毒血症以及首次实验和对照组 (黑色) 相对于免疫接种组 (灰色) (图 29a, 29b 和 29c) 的平均值被示出。在所测试的所有时间点免疫接种组的病毒复制水平的平均值均较低 (图 29c)。P 值 < 0.05 被注意到 *。在原发感染峰值观测到病毒血症平均降低 2 \log_{10} 倍 (图 29e)。免疫接种动物的平均病毒血症 (灰色) 还与橙色的进展者动物 (14184-21544-20456) 的平均

病毒血症进行了比较并与浅蓝色的非进展者动物 (15661-15885-14468) 的平均病毒血症进行了比较 (图 29d)。免疫接种动物中急性期后病毒血症比进展者动物低。P 值 < 0.05 被注意到*。在感染后前 154 天期间病毒复制的测量通过积分第 0 天和第 154 天之间的病毒负荷 (曲线下面积, AUC) 比较免疫接种动物和首次实验对照动物而确定 (图 29f)。

[0347] 简而言之,病毒 RNA 从血浆 (200 μ l) 中用 TRI Reagent BD (Molecular Research Center) 分离。RNA 拷贝数在定量一步 RT-PCR 中使用 Taqman EZRT-PCR (Applied Biosystem) 和 Mastercycler ep realplex (Eppendorf) 确定。引物分别在 SIVmac251 GAG mRNA 基因组的位置 389 和 456 (正向, TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA; 反向, GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC)。选择 Taqman 定量法,使用内部探针,其在 5' 和 3' 分别含有 Fam 和 Tamra 荧光团 (TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA)。病毒拷贝数量通过外推阈值荧光到内部标准曲线上而评估,所述标准曲线从 RNA 在 dH₂O 中的系列稀释液制备,所述 RNA 通过用 MAXIscript 试剂盒 (Ambion) 体外转录 SpeI 线性化 pGEM-5Zf (+)GAG 质粒而获得。检测阈值是 375 个 RNA 拷贝 /ml (2.57 log₁₀RNA 拷贝 /ml)。

[0348] 图 29(2):ELISPOT 测得的饱和

[0349] 用 PBMC 的系列稀释液进行 IFN- γ ELISPOT 以确定 ELISPOT 分析仪的饱和曲线 (280 个斑点 / 孔, 相应于 1400 个斑点 / 百万 PBMC, 因为 200000 个细胞被应用) 图 29(2) a。当特异性 T 细胞频率高且斑点重叠时 (获得), IFN- γ SFC / 百万的数目因此在减去背景之前被低估为 1400 (分析)。给出了来自动物 20056 的 PBMC 的例子, 所述动物用覆盖 SIVmac339 GAG :385-443 和 SIVmac339 GAG :443-491 的肽集合在攻击后 2 周再刺激 (图 29(2)b)。

[0350] 图 30(1):中枢记忆 CD4⁺T 细胞区室在免疫接种猕猴中被很好保持。

[0351] 外周血中中枢记忆 (CM) CD4⁺T 细胞数目中的变化与进展强相关, 在攻击后被跟踪 5 个月。其它细胞区室的动力学 (总 CD4⁺、原初 CD4⁺、总 CD8⁺、原初 CD8⁺、CM CD8⁺ 及效应记忆 (EM) CD8⁺T 细胞) 见图 32(2)。

[0352] 原初动物 (图 30a 15661-14184-15885-14468)、对照动物 (图 30a 21544-20456, 标记为 O 或 x) 和免疫接种动物 (图 30b, 除了用 \blacklozenge 标记之外所有品系) 的基线 CM CD4⁺T 细胞的%, 以及首次实验和对照组 (用 \blacktriangle 标记, 黑色) 相对于免疫接种组 (用 \blacklozenge 标记, 灰色) 的平均值被示出 (图 30a、30b、30c)。免疫接种动物显示在原发感染期间完全保留它们的 CM CD4⁺T 细胞区室, 在慢性期中无逐渐耗竭, 与首次实验和对照动物 (图 30c) 及与标记为 \blacktriangle 的进展者动物 (14184-21544-20456) (图 30d) 相反 (p 值 < 0.05 被注意到*)。在原发感染 (primo-infection) 峰值比较了所有动物的 CM CD4⁺T 细胞 (图 30e)。

[0353] 绝对淋巴细胞计数、CD3⁺CD4⁺T 细胞比例及原初、EM 和 CM T 细胞的比例 (定义为 CD28⁺CD95⁻, CD28⁺CD95⁺ 及 CD28⁻CD95⁺ 细胞) 先前被描述 (Karlsson et al 2007)。

[0354] 图 30(2):疫苗诱导的 T 细胞应答是广泛的, 它们识别衍生自 AT2 灭活的 SIV 的抗原

[0355] GAG 编码的蛋白质 (基质 MA、衣壳 CA、核衣壳 NC 和 p6) 的多样性及对疫苗诱导的、病毒诱导的和病毒回忆的 GAG 特异性 T 细胞应答的相对贡献经 IFN- γ ELISPOT 测定在初始应答峰值 (初免后 2 周, 图 30(2)a)、加强后 1 周 (图 30(2)b) 及感染急性期期间 (攻击后 3 周, 图 30(2)c) 研究。还使用 AT-2 灭活的 SIVmac251 (5 μ g/ml 总病毒蛋白) 以在完全

PBMC IFN- γ ELISPOT 测定中在加强后 2 周再刺激 GAG 特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞 (图 30(2)d)。用对照微泡共培养后的背景被减去。饱和应答表示为 +。AT-2 灭活的 SIVmac251 及其对照微泡通过 EU Program EVA Centralized Facility for AIDS Reagents (NIBSC, Potters Bar, UK) 得自 JD Lifson (Frederick, MA)。

[0356] 图 31(1):保护的免疫相关

[0357] 原发感染峰值的血浆病毒负荷的控制被测试与 GAG 特异性 T 细胞应答的相关性 (Spearman's rank)。在初免注射后 (图 31a), 加强注射 (图 31b) 及攻击后 (图 31c) IFN- γ 分泌 T 细胞的高频率与原发感染峰值病毒血症的更好的控制相关。由于 ELISPOT 孔偶然的饱和导致相关性的显著性被低估。急性期中枢记忆 CD4⁺T 细胞 (CM) 的保留也与原发感染峰值的病毒负荷的降低强相关 (图 31d)。

[0358] 图 31(2):注射的动物产生针对用于假型包装载体颗粒的来自 VSV 的糖蛋白 G 的体液应答

[0359] 抗用于假型包装的包膜的中和抗体的存在用体外转导测定测量。P4 细胞 (HeLa 衍生的) 在编码 GFP 的慢病毒载体存在下培养, 所述慢病毒载体用 VSV-G Indiana (图 31(2)a) 或 VSV-G New Jersey (图 31(2)b) 假型包装, 与在各个时间点收集的免疫动物的 1:20 稀释的血浆预保温。转导效率用流式细胞术评估。在不存在血浆和在所用载体剂量, 用经 VSV-G Indiana 和 New Jersey 假型包装的编码 GFP 的慢病毒载体转导后分别有 61% 和 23% 的 P4 细胞是 GFP⁺。

[0360] 图 32:在接种者中总、原初及记忆 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的动力学在感染后与未免疫接种的和对照猕猴中的不同

[0361] 跟踪了基线 CD4⁺T 细胞 (图 32a)、原初 CD4⁺T 细胞 (图 32b)、总 CD8⁺T 细胞 (图 32c)、原初 CD8⁺T 细胞 (图 32d)、中枢记忆 (CM) CD8⁺T 细胞 (图 32e) 和效应子记忆 (EM) CD8⁺T 细胞 (图 32f) 的 %。首次实验和对照组 (黑色三角形) 相对于免疫接种组 (灰色菱形) 的平均值被示出。注意到 P 值 < 0.05*。

[0362] 图 33:密码子优化关键性改善由基于 TRIP.NI LV 的疫苗诱导的 CTL 应答。经四聚体染色 (A) 或 IFN- γ ELISPOT (B) 评估抗免疫显性 gag CD8⁺T 细胞表位的 Gag 特异性细胞免疫应答。SFC, 斑点形成细胞。(C) IFN- γ ELISPOT 测定应答 gag 的 CD8⁺T 细胞优势免疫表位和 CD4⁺T 细胞表位。小鼠用 100ng TRIP.N gag Δ myr LV 或 TRIP.NI gag Δ myr CO LV 腹膜内初免。10 天后, 来自免疫小鼠的脾细胞用相应的肽刺激并经 ELISPOT 测定分析。在绘图前减去背景频率。误差杆代表每组 3 个小鼠的 SD。(D) 由 TRIP.NI gag Δ myr LV 和 TRIP.NI gag Δ myr CO LV 免疫诱导的 gag 特异性裂解活性的比较。在免疫后 10 天用 20 小时体内 CTL 测定测量 CTL 活性, 如材料和方法中所述, 平均值 +/-SD 三个小鼠被示出。

[0363] 图 34:用 TRIP.NI GAG Δ myr CO 颗粒单次免疫接种诱导强的可持续的细胞免疫应答。在注射后 8 周来自用或未用 TRIP.NI GAG Δ myr CO 或 TRIP.I GAG Δ myr 野生型颗粒免疫的小鼠的脾细胞 (A) 或骨髓细胞 (B) 上进行的 ELISPOT 测定。

[0364] 图 35:小鼠用 VSV-G Indiana 假型包装的 TRIP.NI GAG Δ myr CO 或 TRIP.I GAG 野生型颗粒免疫接种, 13 周后分别用 VSV-G New Jersey 假型包装的 TRIP.NI GAG Δ myr CO 或 TRIP.I GAG 野生型颗粒加强。初免-加强方案的对照组包括仅用 VSV-G Indiana 假型包装的 TRIP 颗粒 (灰色图) 或 VSV-G New Jersey 假型包装的 TRIP 颗粒 (蓝色图) 注射一次

的小鼠。所有小鼠在免疫接种后 10 天牺牲,抗 GAG 的细胞免疫应答经 IFN- γ ELISPOT (A) 或四聚体染色 (B) 评估。

[0365] 图 36 :用编码 SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE 的慢病毒载体免疫接种小鼠。2-5 个 129 小鼠一组的每个小鼠用 1.10^7 TU 免疫接种一次。单次给予后 10 天,经体内细胞毒性测定分析特异性免疫应答,所述测定利用同基因 (congenic) 原初脾细胞作为靶细胞,所述细胞用 CFSE 染色并用 15 聚体肽 (SIVmac239 Gag (73-87) 和 SIVmac239 Gag (309-323), 含有亚优势或优势免疫 CTL 表位) 脉冲。i. d., 皮内 ;i. p., 腹膜内 ;s. c., 皮下。

[0366] 图 37 :用编码 SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE 的慢病毒载体免疫接种小鼠。2-3 个 129 小鼠组每个小鼠用 300ng p24 免疫接种一次。单次给予后 10 天,经体内细胞毒性测定分析特异性免疫应答,所述测定利用同基因原初脾细胞作为靶细胞,所述细胞用 CFSE 染色并用 15 聚体肽 (SIVmac239Gag (73-87) 和 SIVmac239 Gag (309-323), 含有亚优势或优势免疫 CTL 表位) 脉冲。t. c. i, 透皮, i. d., 皮内 ;i. p., 腹膜内。

[0367] 图 38 :用编码 SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE 的慢病毒载体免疫接种小鼠。5-6 个 C57BL/6j 小鼠一组的每个小鼠用 1.10^7 TU 免疫接种一次。单次给予后 10 天,经体内细胞毒性测定分析特异性免疫应答,所述测定利用同基因 (congenic) 原初脾细胞作为靶细胞,所述细胞用 CFSE 染色并用 15 聚体肽 (SIVmac239 Gag (73-87) 和 SIVmac239 Gag (309-323), 含有亚优势或优势免疫 CTL 表位) 脉冲。i. m., 肌肉内 ;i. p., 腹膜内 ;s. c., 皮下。

[0368] 图 39 :用编码 SIVmac239 Gag Δ Myr WPRE 的慢病毒载体免疫接种小鼠。6 个 C57BL/6j 小鼠一组的每个小鼠用 2.10^6 TU 免疫接种一次。单次给予后 12 天,经 IFN γ ELISPOT 测定分析特异性免疫应答,所述测定用 15 聚体肽 (SIVmac239 Gag (73-87) 和 SIVmac239 Gag (309-323), 含有亚优势或优势免疫 CTL 表位) 刺激细胞。i. p., 腹膜内 ;i. m., 肌肉内。“*”表示由于饱和的 ELISPOT 孔所致的应答的低估。

[0369] 图 40 :体外中和用经 Indiana VSV-G 或 New Jersey VSV-G 假型包装的慢病毒载体对细胞的转导,其中细胞是来自首次实验小鼠或来自先前用经 Indiana VSV-G 假型包装的慢病毒载体免疫接种的小鼠。

[0370] 图 41 :抗含有优势免疫 -CD8 表位的肽 (A) 或抗含有亚优势 CD8 表位的肽 (B) 的体内特异性裂解。初免或初免 - 加强反应在个体小鼠上进行,在初免和加强反应中用具有相同 VSV-G 包膜的慢病毒载体或用具有不同 VSV-G 包膜的慢病毒载体。

[0371] 图 42 :用于确定抗含有优势免疫 -CD8 表位的肽 (A) 或抗含有亚优势 CD8 表位的肽 (B) 或抗含有 CD4 的肽 (C) 的 CTL 活性的 IFN- γ Elispot 测试。初免或初免 - 加强反应在个体小鼠上进行,在初免和加强反应中用具有相同 VSV-G 包膜的慢病毒载体或用具有不同 VSV-G 包膜的慢病毒载体。

[0372] 图 43 :用整合缺陷的 LV 有效转 5BFC 非分裂细胞。用蛭栖菌素处理的 HeLa 细胞用梯度剂量 (每 ml 培养基从 1 到 100ng p24 抗原) 的 eGFP 整合性 LV (eGFP-ILV) 或 eGFP 非整合性 LV (eGFP-NILV) 转导。转导后 48 小时,经流式细胞术分析 eGFP 表达。上组示出 GFP 阳性细胞百分比,下组示出 GFP 阳性细胞的 MFI (平均荧光强度)。

[0373] 图 44 :慢病毒载体导致在常规树突细胞 (cDC) 和浆细胞样 DC (pDC) 中的有效抗原表达。(A) 用 eGFP 整合性 LV (eGFP-ILV) 或 eGFP 非整合性 LV (eGFP-NILV) 或用 300ng/ml 热灭活 (HI) eGFP-ILV 或 eGFP-NILV 进行的剂量 - 应答转导实验 (从 0 到 300ng/ml)。

在第 6 天, FL-DC 暴露于载体颗粒 48 小时, CD11c 阳性细胞的转导通过用流式细胞术测量 eGFP 表达而评估。数字代表表达 eGFP 的 CD11c 细胞的百分比。(B) 用 LV 转导 pDC 和 cDC。cDC(CD11c⁺B220⁻) 和 pDC(CD11c⁺B220⁺) 对 eGFP 的表达被示出。细线, 对照细胞 (Ct1); 填充的谱 (profiles), 用 300ng/ml 载体颗粒转导的 FL-DC。

[0374] 图 45: 单剂 sE_{WNV} -NILV 引起强的特异性抗体应答。成年小鼠各组用梯度剂量的 sE_{WNV} -NILV (从 1 到 100ng p24 抗原) (A、B) 或 sE_{WNV} -ILV (B) 腹膜内免疫接种。对照小鼠用热灭活的 sE_{WNV} -LV NI (A、B) 或 I (B) (HI 100) 注射。21 天后, 评估集合的血清 (每组 6 个小鼠) 的 WNV 特异性抗体。

[0375] 图 46: 由 sE_{WNV} -NILV 免疫接种赋予的抗 WNV 感染的快速保护。6 个小鼠 / 组用 100ng sE_{WNV} -NILV 或 100ng sE_{WNV} -ILV 免疫接种。对照组小鼠用磷酸缓冲盐水 (PBS) 接种。免疫接种后 1 周, 小鼠用 1000i. p. LD₅₀s 的 WNV 毒株 IS-98-ST1 攻击。记录 21 天存活。

[0376] 图 47: sE_{WNV} -NILV 导致的抗 WNV 感染的有效长期保护。用梯度剂量 sE_{WNV} -NILV (1-100ng p24 抗原) (A、B) 或 sE_{WNV} -ILV (B) 免疫接种后 2 个月, 小鼠用 1000i. p. LD₅₀s 的 WNV 毒株 IS-98-ST1 接种。记录 21 天存活。

[0377] 图 48: 密码子优化对 gag Δ myr 表达水平的影响。293T 细胞用含有 gag Δ myr 的野生型序列 (左侧组) 或密码子优化序列 (右侧组) 的 TRIP 载体质粒、包壳质粒 p8. 7D64V 和 VSV-G 表达质粒共转染。

[0378] 图 49: 各组小鼠 (n = 5) 用经 VSV-G Indiana 假型包装的 TRIP. NI GAG Δ myr CO (100ng) 或 TRIP. I GAG 野生型颗粒 (100ng) 免疫接种或未接种 (首次实验组), 13 周后, 分别用经 VSV-G New Jersey 假型包装的 TRIP. NI GAG Δ myr CO (100ng) 或 TRIP. I GAG 野生型颗粒 (100ng) 加强。所有小鼠在免疫接种后 10 天牺牲, 抗 GAG 的细胞免疫应答经 IFN- γ ELISPOT (A) 或四聚体染色 (B) 评估。

[0379] 图 50: 当可利用时, 用各种 VSV-G 血清型密码子优化 (CO) 或野生型 (WT) 假型包装的慢病毒载体颗粒的滴定。

[0380] 图 51: 用于定量血清中和活性的体外测定。从动物收集小鼠血清, 所述动物以 2 个月间隔用每次 300ng P24 慢病毒载体颗粒注射 2 次, 所述载体颗粒用不同血清型的 VSV. G 蛋白假型包装。编码萤光素酶的载体颗粒同样用各种血清型的 VSV. G 蛋白假型包装, 在各种稀释度血清存在下于 37°C 保温 1 小时。保温后, 编码萤光素酶的慢病毒载体颗粒用于转导 96 孔板中的 293T 细胞, 每孔 1ng P24。保温 48 小时后, 用发光检测试剂盒根据厂商指导测量萤光素酶活性 (Boehringer)。结果以无血清保温后的发光活性百分比表示。

[0381] 图 52: 慢病毒载体颗粒与不同小鼠血清的交叉中和作用: 用不同 VSV. G 蛋白假型包装的病毒颗粒在各种小鼠血清存在下在转导实验中测试。A: 转导被完全抑制 (++)、部分抑制 (+ 或 +/-) 或未被 (-) 抑制。B: 这些实验的细节。

[0382] 图 53: Indiana 假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A: 来自免疫前猴的血清, B: 来自用各种剂量的 Indiana 假型包装颗粒注射的猴的血清 (初免), C: 用 New Jersey 假型包装颗粒注射后的猴血清 (加强)。

[0383] 图 54: New Jersey 假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A: 来自免疫前猴的血清, B: 来自用各种剂量的 Indiana 假型包装颗粒注射的猴的血清 (初免), C: 用 New Jersey 假型包装颗粒注射后的猴血清 (加强)。

[0384] 图 55 :Cocal 假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A :来自免疫前猴的血清, B :来自用各种剂量的 Indiana 假型包装的慢病毒载体颗粒注射的猴的血清(初免), C :用 New Jersey 假型包装的慢病毒载体颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0385] 图 56 :Isfahan 假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A :来自免疫前猴的血清, B :来自用各种剂量的 Indiana 假型包装颗粒注射的猴的血清(初免), C :用 New Jersey 假型包装颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0386] 图 57 :SVCV 假型包装颗粒在各种猴血清存在下的活性。A :来自免疫前猴的血清, B :来自用各种剂量的 Indiana 假型包装颗粒注射的猴的血清(初免), C :用 New Jersey 假型包装颗粒注射后的猴血清(加强)。

[0387] 图 58 :人血清中抗 VSV-G 蛋白抗体的流行(prevalence)。抗 VSV-G 蛋白的中和抗体的存在在加热或未加热的各种人血清的存在下用颗粒的转导测定确定,所述颗粒用 A :VSV-G Indiana, B :VSV-G New Jersey, C :VSV-G Cocal, D :VSV-G SVCV 和 E :VSV-G Isfahan 假型包装。

[0388] 图 59 :人血清中抗 Cocal VSV-G 蛋白抗体的流行。96 个人血清(加热和未加热)在存在病毒颗粒的条件下在转导实验中(以 1/2 稀释度)测试,所述病毒颗粒用 A :Indiana, B :New Jersey, C :Cocal, D :Isfahan, E :SVCV VSV-G 蛋白假型包装。这些实验在每种条件下进行两次。

[0389] 图 60 :患者的人血清中和 VSV-G 蛋白的分析。经转导测定研究血清中存在抗 VSV-G 蛋白的中和活性的患者(A :Indiana, B :New Jersey, C :SVCV, D :Cocal, E :Isfahan 颗粒,系列稀释)。

[0390] 图 61 :用不同 VSV-G 包膜假型包装的载体颗粒与 mDCh 融合或不融合的能力。人单核细胞衍生的 DC(mDC)用 GFP 载体颗粒转导,所述载体颗粒用 Indiana、New Jersey、Isfahan、SVCV、Cocal 和 Chandipura 的 VSV-G 包膜假型包装。转导后 5 天,经流式细胞术分析 mDC 以确定效价。相对效价表示为在 mDC 上确定的效价与在 293T 细胞中确定的效价之间的比率。

[0391] 在抗 SIV 感染免疫接种策略中应用 TRIP 慢病毒载体作为模型例证抗 HIV 感染免疫接种

[0392] I. TRIP 载体在小鼠模型中诱导抗 SIV 特异性 T 细胞应答的潜力

[0393] 为确定携带源自 VSV 病毒的包膜蛋白的慢病毒载体是否能被修饰以允许加强免疫应答,我们开发了新的载体策略,其基于表达来自预期不交叉反应的不同 VSV 血清型的糖蛋白的慢病毒载体。

[0394] 水泡性口炎病毒(VSV)分离株是有包膜的、非分节段的、负链 RNA 病毒,属于弹状病毒科水泡性病毒属。VSV 感染家畜如牛、猪和马,导致在舌、口腔组织、乳房和蹄中疱疹损害。

[0395] VSV 基因组被输送到宿主细胞细胞质,在此发生复制,经病毒颗粒的受体介导的胞吞及随后 pH 诱导的病毒包膜与内体膜融合进行。VSV G 蛋白是唯一的病毒表面糖蛋白,是附着和融合所需的。VSV 有两种主要血清型,Indiana 和 New Jersey,它们通过抗 G 糖蛋白的中和抗体区分。除了它们的抗原结构之外,Indiana 和 New Jersey 糖蛋白也在氨基酸数目(分别为 511 和 517)和组成(仅 50% 相同性)、在翻译后修饰及在折叠方面不同。相应

地,Indiana 和 New Jersey 毒株对于 VSV 致病性不是同等重要的。相比于由 Indiana 毒株导致的爆发,由 New Jersey 毒株导致的爆发是更经常的和更严重的。

[0396] 材料和方法

[0397] 小鼠. 雌性 C57BL/6 小鼠 (élevage Janvier, France) 在巴斯德研究所设施中培育。

[0398] 细胞培养物. HeLa (人宫颈腺癌, 得自 ECACC) 和人胚肾 293T 细胞 (得自 ATCC) 用于慢病毒载体产生, 在补加 10% 热失活胎牛血清 (FCS) 和抗生素 (青霉素 - 氯霉素) 的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基 (DMEM) Glutamax (GIBCO) 中生长。

[0399] 载体构建和产生

[0400] 载体质粒 pTRIP. Δ U3. CMV. SIVmac239gag Δ myr 含有非十四烷基化形式的 SIVmac239 gag 序列, 其在巨细胞病毒立即早期启动子 (CMVie) 控制下。

[0401] 载体颗粒通过用载体质粒、包壳质粒 (p8. 7) 和 VSV-G 包膜表达质粒, Indiana 血清型 (pHCMV-G) (10) vs New Jersey 血清型 (pcDNA3. 1(-)NJ-G) (衍生自得自 Invitrogen 的市售 pcDNA3. 1 质粒) 经瞬时磷酸钙共转染 293T 细胞而产生。蛋白质序列见图 3。

[0402] 克隆策略包含下述步骤:

[0403] 使用含有来自 New Jersey VSV 血清型的糖蛋白的基因的质粒 (pBSVSV-G NJ)。

[0404] 其在 XhoI/NotI 消化后被克隆进 pcDNA3. 1(-) 载体 (Invitrogen)。由此方法衍生的质粒命名为 pcDNA3. 1(-) VSV-G NJ。

[0405] WPRE 序列 (早发肝炎病毒调控后元件) (11) 是已知显著增加基因表达的转录后调节元件。其被克隆进 **TOPO®** 克隆载体 (Invitrogen)。

[0406] WPRE 序列在 EcoRI 消化及去磷酸化之后克隆进 pcDNA3. 1(-) VSV-GNJ 中。以此方法衍生的质粒命名为 pcDNA3. 1(-) VSV-G NJ WPRE。

[0407] 浓缩载体颗粒的 p24 抗原含量的 WPRE 定量用商业 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒 (Perkin-Elmer Life Sciences) 进行。对于载体原液滴定, 293T 细胞用不同载体浓度转导 72 小时并裂解。裂解液用 Rnase 和蛋白酶 K 处理, 然后用作定量 PCR (Lightcycler)。

[0408] 体外转导抑制测定. HeLa 细胞以每个 96 孔平板 10000 个细胞铺板。1 天后, 与 1 : 6 稀释的去补体小鼠血清预保温 30 分钟后, 细胞用编码 eGFP (增强的 GFP) 并用来自 VSV Indiana 或 New Jersey 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体转导细胞。小鼠是首次实验小鼠或用 0.25×10^7 转导单位 (TU) 的编码非十四烷基化形式的 SIVmac239 Gag 并用来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体免疫一次的小鼠。在 72 小时后, 转导经流式细胞术测定。计算转导中和百分比, 与不存在血清时的转导相比。

[0409] 小鼠免疫接种. 所有动物实验均根据巴斯德研究所 Office Laboratory of Animal Care 的指导进行。9 周龄小鼠用在 0.2ml Dulbeccos' s PBS 中的 0.25×10^7 转录单位 (TU) 的 pTRIP. Δ U3. CMV. SIVmac239gag Δ myr 载体颗粒腹膜内 (i. p.) 接种两次, 分别在第 0 天和第 21 天。小鼠在第 14 天放血。免疫应答在第 28 天分析。

[0410] 对于初免, 编码非十四烷基化形式的 SIVmac239 Gag 并用来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体被给予, 而对于加强, 用来自 VSV New Jersey 血清型的糖蛋白假型包装的相同载体被注射。

[0411] 使用两次随后注射用来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体用

同源初免 / 加强策略进行比较。作为对照,在单次注射用来自 VSVIndiana 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体后鉴定初始 (第 7 天) 和记忆 (第 28 天) 应答。还测定了用来自 VSV New Jersey 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体仅免疫一次的小鼠的初始 (第 7 天) 应答。

[0412] IFN- γ Elispot 测定

[0413] 硝基纤维素微滴板 (MAHA S4510, Millipore) 用捕获抗体 (小鼠 IFN- γ Elispot pair, BD Pharmingen) 包被过夜并用完全培养基封闭,所述培养基由补加 10% FCS、抗生素、hepes、非必需氨基酸、b- 巯基乙醇和丙酮酸钠的 RPMI1640 Glutamax 组成。来自载体免疫小鼠的脾细胞以一式三份以 0.25×10^6 细胞 / 孔加入平板中,并用 SIVmac239 gag 肽 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)、伴刀豆球蛋白 A ($1 \mu\text{g/ml}$) 刺激。40 小时后,用生物素缀合抗体 (小鼠 IFN- γ Elispot pair, BD Pharmingen) 随后链霉抗生物素蛋白-AP (Roche) 和 BCIP/NBT 底物溶液 (Promega) 揭示斑点。斑点用 Bioreader 2000 (Biosys, Karben, Germany) 计数,结果表示为 IFN-g 斑点形成细胞 (SFC) / 百万脾细胞。

[0414] 体内细胞毒性测定

[0415] 为靶细胞制备,将来自首次实验小鼠的脾细胞用各种浓度 (高, $5 \mu\text{M}$; 中, $1 \mu\text{M}$; 低, $0.2 \mu\text{M}$) 的 CFSE (carboxyfluorescein-diacetate succinimide ester, Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit, Molecular Probes) 标记。脾细胞然后用 $5 \mu\text{g/ml}$ 的肽脉冲。每个小鼠经眶后静脉接受含有来自每一级分相等数目细胞的混合物的 10^7 CFSE 标记的细胞。15-18 小时后,来自脾的单细胞悬浮液经流式细胞术分析 (Becton Dickinson, CellQuest software)。肽脉冲细胞的消失通过比较免疫的小鼠和首次实验小鼠的脉冲的 (高 / 中 CFSE 荧光强度) 与未脉冲 (低 CFSE 荧光强度) 群体的比率而确定。特异杀伤百分比经下列计算建立: $[1 - ((\text{CFSE}_{\text{低}}^{\text{首次实验的}} / \text{CFSE}_{\text{高/中}}^{\text{首次实验的}}) / (\text{CFSE}_{\text{低}}^{\text{免疫的}} / \text{CFSE}_{\text{高/中}}^{\text{免疫的}}))] * 100$ 。

[0416] 结果 (图 40-42)

[0417] 我们首先显示用低剂量 (0.25×10^7 TU / 小鼠, 相应于对于这一批次 650ng p24) 经来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白进行包装的慢病毒载体仅免疫接种 1 次的小鼠确实产生强体液应答,其中和用经相同包膜假型包装的慢病毒载体对细胞的体外转导。相反,仅有经用来自 VSV New Jersey 血清型的糖蛋白假型包装的载体的转导的低血清中和可检测到。

[0418] 使用编码非十四烷基化形式的 SIVmac239 Gag 并用来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的慢病毒载体进行的初步剂量应答实验使得我们鉴定了免疫应答并鉴别了含有免疫显性 CD8 表位的肽 (SIVmac239gag :309-323 (QTDAAVKNWMTQTLL) 以及含有亚显性 CD8 表位的肽 (SIVmac239 gag :73-97 (ENLKSLYNTVCVIWC) (数据未示出)。低至 0.45×10^7 TU / 小鼠的剂量就足以达到 100% 稳态响应小鼠,具有对于含有免疫显性 CD8 表位的肽的几乎 100% 的特异性裂解。相反,在含有亚显性 CD8 表位肽情况中,即使高剂量 (高至 23×10^7 TU / 小鼠) 也不足以刺激 100% 的体内细胞裂解活性。

[0419] 平行地,最近公布的论文使用编码相同抗原的腺病毒载体,鉴别了含有 CD4 表位的肽 (SIVmac239gag :297-311 (YVDRFYKSLRAEQTD))。

[0420] 因此,我们选择监测抗这 3 个肽的免疫并且用亚最佳剂量载体 (0.25×10^7 TU / 小鼠) 以便能够检测在响应小鼠数目和应答幅度方面的加强作用。

[0421] II- 在非人灵长类模型中抗 SIVMAC 的保护应答

[0422] 介绍

[0423] 1. HIV 感染和 AIDS

[0424] 1.1 HIV 及其影响

[0425] 1.1.1 流行病学

[0426] 自从第一例获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 在 1981 年被报道, 人免疫缺陷病毒 (HIV) 的全球传播已经达到全球流行比例, 现在代表了全球发展和公共健康威胁 (Girard et al., 2006)。事实上, 全世界携带 HIV 生存的人数现在已 39.5 百万, 并仍然指数增长, 在去年有 4.3 百万人被感染, 预计每天有 14000 人被感染 (<http://www.unaids.org>)。

[0427] 1.1.2 HIV 生物学

[0428] 感染的生理病理学直接与 HIV 的特征相关。这个病毒属于逆转录病毒科, 慢病毒属。其是有包膜病毒, 直径大约 110-120nm。gp120 糖蛋白负责病毒嗜性; 事实上其允许固定于细胞受体 CD4 和共同受体 CCR5 或 CXCR4, 因此使得 CD4⁺ 淋巴细胞是其主要靶细胞。一旦病毒附着于 CD4⁺ 淋巴细胞, 病毒周期分为 2 个主要步骤: 早期和晚期步骤。在细胞质中, 病毒 RNA 被逆转录成双链 DNA, 位于病毒衣壳内并主动输出至核, 在此其可以整合进细胞基因组中 (Arhel et al., 2007)。病毒 DNA 的转录和病毒 mRNA 的翻译允许形成新的病毒颗粒。

[0429] 大多数 AIDS 病理学研究是在具有 HIV 猴等价物 SIV 的非人灵长类中进行。事实上, SIV 病毒结构和生物学与 HIV 密切相关。

[0430] 1.1.3 HIV 感染的生理病理学

[0431] 疾病进展由组合测量血浆 HIV-1 RNA 和 CD4⁺ 淋巴细胞而精确定义。天然 HIV 感染可以分成 3 个主要阶段: 原发感染或急性感染, 特征是病毒负荷峰值 (大约 10⁶ 拷贝 RNA/ml 血液) 以及快速但瞬时的循环 T CD4⁺ 降低 (Weber, 2001)。另外, 在这个感染早期阶段, HIV 特异性 CD4⁺T 细胞是病毒的主要靶并在不存在任何治疗情况下被优先摧毁 (Rosenberg et al., 2000)。但是, 病毒负荷的这一增加通常被特异性免疫应答主要是细胞免疫应答良好控制。事实上, 有证据表明 HIV 特异性 CD8⁺T 细胞的出现和原始病毒血症的下降之间的时间相关性 (Koup et al., 1994)。结果是, T CD4⁺ 数目回到较高水平 (低于感染前水平) 及病毒血症稳定化 (在 10³ 和 10⁶ RNA 拷贝 /ml 之间): 达到调定点 (set-point); 其水平经常与疾病进化相关 (Mellors, 1996)。感染个体然后进入无症状期, 其可以持续几个月至几年。这一时期特征是循环 CD4⁺ 数目缓慢线性降低, 这是由于免疫系统和 HIV 复制之间的平衡所致。在缺乏治疗时, 这一无症状期随后是 AIDS。在这个时间, 病毒血症进行性回到高水平, 观测到 CD4⁺T 细胞耗竭斜率拐折 (inflection) (CD4 计数低于 200 个细胞 /mm³ 血液)。最终, 免疫系统崩溃, 通常可以完全控制或容易清除的致病因子变得潜在致死的。

[0432] 2. 医学治疗

[0433] 2.1 从单一疗法到 HAART

[0434] 为了减缓疾病进展到 AIDS, 新的治疗法在 1986 年上市。它们被称为抗逆转录病毒药, 它们的目的是防止 HIV 复制因此延迟 CD4⁺T 细胞耗竭。这些药物中最注明的当然是 AZT (Zidovudine), 病毒逆转录酶 (RT) 的抑制剂。但是, 这个单一治疗途径最终发现有效性有限, 因为 HIV 是具有快速产生对任何抗逆转录治疗的抗性 (通过突变) 的潜力的病毒。

1996年,RT的新抑制剂被商品化;它们与AZT样抑制剂在化学上不同。最终,新的一类HIV治疗出现于1995年,蛋白酶抑制剂(PI)。所述组合目前是抗HIV治疗的“标准”,称为高活性抗逆转录病毒疗法(HAART),其由3类抗逆转录病毒治疗的结合组成,通常是2种不同的RT抑制剂和1种PI。HAART允许强有力的持久的病毒负荷降低(图5B),对于大多数患者,血液中的病毒拷贝甚至变得不可检测(Gulick et al.,2000)。结果是,CD4计数增加,免疫系统部分恢复并且可以再次驱逐机会病原体(Autran et al.,1997)。对于接触治疗的患者,HAART允许令人印象深刻的AIDS相关发病率的降低(Palella et al.,1998)。

[0435] 2. 2HAART 限制

[0436] 尽管HAART成功是毋庸置疑的,但是其存在一些限制,考虑到其长期应用可产生问题。首先,HAART治疗非常昂贵,对于发展中国家仍不可及。然后,这些治疗的毒性相对较高,它们经常触发主要副作用(糖尿病、脂肪营养不良、腹泻、头痛...)。另外,已经表明HIV能产生抗HAART治疗抗性。突变经常出现于由治疗限制的HIV的区域。HAART治疗还限制了HIV抗原的产生,显然到达低于刺激HIV特异性效应T细胞或扩增HIV特异性原初T细胞所需的阈值。但是,对HIV的免疫记忆仍然持续,如当治疗中断后免疫系统重新暴露于病毒时针对HIV的CD4和CD8免疫应答的瞬时恢复所示(Autran et al.,2004)。

[0437] 2. 3HIV 免疫接种

[0438] 2. 3. 1 预防性 / 治疗性疫苗

[0439] 因为药物的功效仍然有限及因为HAART应该是终生治疗,在大多数第三世界环境中太贵且难以给药,需发现其它策略以持久防止AIDS发生。HIV疫苗的开发可代表降低全球性流行的唯一办法。两种不同免疫接种策略被测试。一方面,预防疫苗应能够诱导无菌免疫(sterilizing immunity),并防止感染及其并发症。这种疫苗应该能够在病毒进入及在感染非常早期在病毒传播至淋巴器官之前起作用。另一方面,治疗性疫苗被设计用于在HAART治疗下的慢性感染患者(Autran et al.,2004)。其包括首先用HAART治疗患者以恢复免疫能力,然后免疫接种他们以在中断治疗之前加强他们的静止的对HIV的免疫应答。最终,如果病毒的免疫控制能被增强,疾病进展会被减弱,允许治疗中断,结果限制HAART的应用,因此使它们的毒性和成本最小化。

[0440] 2. 3. 2 目前 AIDS 疫苗研究的状态

[0441] 不管选择何种策略,疫苗开发正面临巨大科学挑战,如病毒的高遗传可变性,缺少保护的免疫相关性及现有动物模型的限制。直至目前,50种以上疫苗候选物已在I/II期临床试验中被测试(www.iavi.org)(参见附件1关于正在进行的试验中的抗HIV-1概述)。目前已测试多种免疫接种策略(Tonks,2007)。最初,传统的活减毒疫苗被测试,因为它们过去针对天花、脑灰质炎或麻疹的成功。在Nef基因中具有缺失的活减毒病毒(SIV- Δ nef)在SIV/猕猴模型中是最有效的疫苗。但是,其应用是受限的因为疫苗病毒以低水平一直持续存在于免疫接种的猕猴中,对于新生儿是致病性的。另外,HIV- Δ nef免疫接种几年后可在成年动物中导致疾病。无论如何,这些活的减毒疫苗提供了HIV疫苗开发可行性的关键原理验证并允许鉴定保护免疫的性质(Koffet al.,2006)。另一种传统疫苗策略是诱导广泛的和持久的中和抗体以使病毒不能进入并防止感染。为此,开发了亚单位疫苗。它们由HIV蛋白或肽组成,经常是重组的。我们可以在次引述VaxGen试验,在美国II期中评估,疫苗基于单体gp120,在明矾中给予。但是,这些亚单位疫苗试验无一显示被接种者中HIV

感染的统计学显著降低。因为引起体液应答的疫苗未能给出令人鼓舞的结果,研究人员已转向细胞介导的装备。事实上,先前已示出 CD8⁺ 细胞毒性效应 T 细胞能够清除在它们的 I 类 MHC 分子上展示病毒肽的感染细胞。另外,CD8⁺T 细胞已知在控制 SIV 和 HIV 感染中是重要的,因为 (i) 在猴中慢性 SIV 感染期间 CD8⁺T 细胞的耗竭增加了病毒负荷 (Jin et al., 1999), (ii) 在 I 类 HLA 基因座杂合的 HIV 阳性患者具有更慢的疾病进展速率 (Carrington et al., 1999) 及 (iii) 病毒在 CD8⁺T 细胞表位中积累突变 (Goulder and Watkins, 2004)。刺激 T 细胞应答的疫苗不以传统方式防止感染但是可以至少抑制其足够长时间以防止 AIDS 发生。在 T 细胞疫苗中发现 DNA 疫苗,目前在 I 期试验,使用由质粒编码的分离的 HIV 基因,但是其面临免疫原性问题。引起 T 细胞应答的最常用策略是重组载体。其包括使用病毒载体 (衍生自痘病毒、痘苗病毒或腺病毒) 以转运分离的 HIV 基因进入人类细胞。

[0442] 最后,还值得一提的是基于树突细胞的免疫接种技术,其抗 SIV 攻击的结果非常令人鼓舞。其包括用自体树突细胞 (DC) 免疫接种猕猴, DC 用化学灭活的 SIV (用 aldrithiol-2, AT-2) 脉冲。灭活病毒不能逆转录但是病毒颗粒保留它们的结构完整和大部分全部融合能力。这一技术在慢性感染的未治疗的人类中甚至被测试成功,自体 DC 用灭活的自体 HIV 脉冲 (Andrieu and Lu, 2007)。尽管其有效性,但是这一技术相当昂贵和耗时。

[0443] 2.3.3 现有技术疫苗策略遇到的问题

[0444] 虽然许多类型的疫苗已经且正在被测试,它们迄今无一完全成功。事实上,用 DNA 疫苗从未观测到对病毒负荷的长期作用,即使 CTL 特异性应答被刺激。引起体液应答的疫苗的病毒有巨大可变性,即使产生抗体,它们也从未足够通用而对付 HIV 遗传多样性。甚至用中和单克隆抗体被动免疫接种 HIV 感染个体也失败了,说明体液免疫在控制 HIV-1 感染中的限制 (Trkola et al., 2006)。痘病毒载体成功引起特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞应答,但是在许多周 HAART 中断后不能更好控制病毒负荷。结果,需要测试其它免疫接种策略。我们在此推荐测试一种新的 HIV-1 疫苗策略,基于应用衍生自 HIV-1 的慢病毒载体 (LV) 作为候选疫苗。

[0445] 3. 慢病毒载体作为 HIV 免疫接种候选物

[0446] 3.1 慢病毒载体技术

[0447] 20 年前 LV 首次被描述 (Poznansky et al., 1991)。作为重组载体, LV 能整合转基因 (直至 8-10kb) 进入宿主细胞 DNA。HIV-1 衍生载体及全部 LV 的独特性是它们能转导非分裂细胞。事实上, LV 像慢病毒一样能够独立于细胞有丝分裂而整合。这一能力来自病毒 DNA (或载体 DNA) 主动核输出通过宿主细胞核膜。这种主动核输出的一个解释是形成独特的三链 DNA, 称为 DNA 活瓣或 Triplex, 其通过 pol 序列中的两个顺式活性序列形成: 实验室发现的 cPPT (central Polypurine Tract) 和 CTS (Central Termination Sequence) (Zennou et al., 2000)。

[0448] 我们的免疫接种计划利用 HIV-1 衍生的 LV, 通常称为 TRIP (因为其含有中心 DNA 活瓣/Triplex 结构)。这个载体属于第三代 LV, 已在设计、生产、转导效率和生物安全性参数方面被优化 (Delenda, 2004)。

[0449] 用 HIV-1 作为基因转移载体的一个主要兴趣是逆转录病毒与 RNA 正或 DNA 病毒不同, 是不直接感染性的。事实上 RNA 正基因组需要逆转录和许多辅助蛋白以开始病毒复制和体内病理发生。但是, 为了用作基因转移载体, HIV-1 基因组已被降低到转基因表达和包

装所需的最小病毒序列（图 8）。转基因表达盒所需的顺式作用序列是下述这些；

[0450] LTR 序列（长末端重复）是逆转录、病毒 DNA 整合和转录所需的。3' LTR 已在 U3 区域中缺失，不干扰基因转移所需的功能，这为了两个主要原因：首先，为避免一旦 DNA 整合进基因组宿主基因的反式激活，第二，允许病毒顺式序列在逆转录后的自身失活。因此，在靶细胞中仅来自内部启动子的序列被转录（转基因）（图 9）。

[0451] Ψ 区域是病毒 RNA 包壳所需的。

[0452] RRE 序列（REV 应答元件）在结合 Rev 蛋白后允许病毒信使 RNA 从核输出至细胞溶胶。

[0453] DNA 活瓣序列（cPPT/CTS，正常含于 Po1 中）促进核输入。

[0454] WPRE 顺式活性序列（旱獭乙型肝炎病毒响应后元件）也被加入以优化 mRNA 的稳定性（Zufferey et al., 1999）。WPRE 不翻译。

[0455] 感兴趣的基因（即编码抗原）插入到转移载体质粒中在强且通常遍在的启动子控制下。

[0456] 为了产生病毒颗粒（RNA、衣壳和包膜），一些 HIV-1 辅助包装蛋白需要被同时带进生产者细胞。它们由两个额外质粒编码，称为包装或包壳质粒和包膜表达质粒。包装质粒仅编码病毒颗粒合成必需的病毒蛋白。其存在于质粒中会引起安全考虑的辅助基因被除去。反式带进来的病毒蛋白分别是：

[0457] Gag 蛋白，用于构建基质（MA、p17）、衣壳（CA、p24）和核衣壳（NC、p6）。

[0458] Po1 编码的酶：整合酶、蛋白酶和逆转录酶。

[0459] Tat 和 Rev 编码调节蛋白，Tat 是 LTR 介导的转录的起始所需的。

[0460] 为了编码这些产生的 mRNA 包装在病毒颗粒中， Ψ 区域被除去。选择异源启动子以避免重组问题。

[0461] 包膜表达质粒不编码 HIV-1 天然 env 蛋白（gp120, gp41）。事实上，这些蛋白质太不稳定不能允许有效生产和经载体颗粒的超离心的浓缩。另外，HIV-1 的 env 蛋白具有有限的嗜性（CD4, CCR5, CXCR4）。为面对这些问题，LV 产生利用一种称为假型包装的过程。其包括用异源包膜糖蛋白产生病毒颗粒。在第一个和更广泛用于假型包装 LV 的糖蛋白是来自 Indiana 血清型的水泡性口炎病毒糖蛋白（VSV-G）。用 VSV-G 假型包装的 LV 提供了显著优点，VSV-G 与细胞上的遍在细胞受体相互作用，使载体具有广谱宿主细胞范围。另外，VSV-G 赋予高载体颗粒稳定性，允许病毒颗粒的下游加工：主要经超离心浓缩。

[0462] 3. 2. 为什么慢病毒是抗 HIV-1 免疫接种的有前景的候选物？

[0463] 3. 2. 1DC 的转导

[0464] LV 最初用于基因治疗，它们作为基因转移系统的独特能力在今天是不可否认的。

[0465] 首先并且与腺病毒和痘苗病毒衍生的载体相反，在人类中没有抗慢病毒的预先存在的免疫。自从它们出现，LV 已成功在许多治疗重要的细胞和组织中在基因治疗方案范畴体外测试，包括肝脏、脑和树突细胞（DC）。

[0466] DC 是抗原呈递细胞（APC）的异质组，其在先天免疫以及在起始适应性免疫应答中起关键作用。DC 通过连续捕获外周组织中的抗原而作为免疫系统的岗哨。一旦由微生物产物或炎性信号激活，它们经历成熟，迁移进引流淋巴组织，在此它们随后加工和呈递在 MHC I 和 II 环境中的捕获的抗原到 CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞。令人感兴趣地，在能有效被 LV 转导的

细胞类型中,发现了有丝分裂活性低的人 CD34⁺ 衍生的和单核细胞衍生的 DC 以及小鼠骨髓衍生的 DC。在体外,由 LV 的转导不影响它们的存活性。最终,DC 的稳定转导允许在细胞的整个寿命期间内源呈递抗原。因此,其使得 LV 成为良好的候选疫苗。

[0467] 3. 2. 2LV 用于免疫接种目的的历史

[0468] 除了有效表达转基因蛋白之外,体外用 LV 转导的 DC 显示有效加工和呈递从所述蛋白质衍生的肽。事实上,人和鼠的慢病毒转导的 DC 能够体外再次刺激特异性 T 细胞系或克隆。更重要地,几个小组报道了当使用人 DC 时体外引发原初 T 细胞抗相关抗原。

[0469] 许多小组然后评估了慢病毒转导的 DC 作为体内免疫治疗剂的用途,主要在小鼠模型中,但是最近也在灵长类模型中。其包壳用离体慢病毒转导的 DC 免疫动物,体外分析产生的 CD8⁺T 细胞应答。当可能时,保护能力也在攻击情况中体内测试。大部分这些研究使用肿瘤抗原作为模型并测试诱导的 CTL 应答消除肿瘤细胞的能力。非常少研究团队证实离体慢病毒转导的 DC 抗病毒感染的持久性。Zarei et al, 例如证实了在小鼠中抗 LCMV 攻击的保护能力,所述小鼠用 DC 免疫接种,所述 DC 用编码病毒糖蛋白的 LV 转导 (Zarei et al., 2004)。

[0470] 但是,这个技术看起来难以在人类免疫接种方案中应用,结果 LV 经直接体内给予而快速测试。许多小组证实在小鼠中体内注射 LV 以引起转基因特异性免疫应答的功效。再一次,主要应用肿瘤抗原。例如,实验室示出在 HLA-A*0201 转基因小鼠中直接体内接种黑素瘤多表位编码慢病毒可引起强 CTL 应答,抗大多数编码的黑素瘤表位 (Firat et al., 1999)。已经证实注射 LV 优于离体转导的 DC 注射,在 CTL 应答的幅度和长久性方面均如此 (Esslinger et al., 2003)。另外,功能性 CD8⁺T 细胞记忆应答可以在用 TRIP 载体直接体内免疫接种后产生,即使在 CD4⁺T 细胞不存在下也是如此,这是针对 HIV 免疫接种的不可否认的优点 (Iglesias et al., 2007)。许多研究团队现在正在研究可有助于 LV 作为免疫接种工具的高潜力的错综复杂的机制。持续的抗原表达,特别是在 DC 中,以及先天免疫的激活可能起关键作用 (Breckpot et al., 2003)。

[0471] 4. 在猕猴中的疫苗试验

[0472] 4. 1 实验室先前工作,计划的早期日子

[0473] 在实验室中,免疫原性研究证实抗 SIV 特异性 T 细胞应答在近交小鼠中的潜力,所述小鼠用 TRIP 载体免疫接种,所述 TRIP 载体编码非十四烷基化形式的 SIVmac239 Gag (上述)。这些小鼠模型允许描述 TRIP 载体作为抗 HIV 免疫接种候选物的潜力。但是,它们不允许测试在病毒攻击环境中 TRIP 载体免疫接种的保护能力。

[0474] 4. 2 猕猴模型

[0475] 为此目的,非人灵长类模型被选择用于保护功效研究,更特别是猕猴。人 /HIV-1 模型被翻译为猕猴 /SIVmac 非人灵长类模型。猕猴对 SIVmac 感染高度易感并进行性发生免疫缺陷综合征,其模拟人类 AIDS。令人感兴趣地,在初始和慢性感染期间的血浆病毒负荷与在人类中观测到的平行,如在 HIV-1 感染的人中,非进展者 (non-progressor) 以及快速进展者可以被观测到。如在使用 HIV-1 感染的人中,在初始和长期感染期间对 SIVmac 的细胞免疫应答显著不同,免疫逃避的证据容易记录。如在 HIV-1 感染个体中,肠道相关淋巴组织是病毒复制和 CD4⁺T 细胞耗竭的主要部位。

[0476] 目前, AIDS 疫苗 / 攻击数据主要在 3 种主要猕猴物种中产生:主要是印度起源的

猕猴 (rhesus macaque), 中国起源的猕猴及 *Cynomolgus* 猕猴。每种物种模型具有研究对病毒感染的应答的优缺点。*Cynomolgus* 猕猴被用于我们的研究因为它们在欧洲比猕猴更易获得。Reinman et al. 显示 SIV 的病原性在 *Cynomolgus* 猕猴中相比于印度猕猴减弱 (更低的血浆病毒血症、CD4⁺T 相比数保持, 增加的存活时间)。这种减弱的病原性与比 rhesus 物种中更早及更强的对 GAG 和 ENV 的 IFN- γ ELISPOT 应答相关。这些观测因此支持了早期 T 细胞免疫应答的作用。最终, 尽管血浆病毒负荷较低, 但是攻击后病毒血症可以显著用作 *Cynomolgus* 猕猴中的实验终点, 假定用于攻击的病毒剂量足够高, 以及首次实验组足够大, 能够限制自发对照者 (controller) 的统计学显著性。令人感兴趣地, *Cynomolgus* 猕猴展示更类似于人类感染中见到的病毒负荷 (Reimann et al., 2005)。

[0477] 4.3. 抗原的选择

[0478] 在非人灵长类中的疫苗试验中, 抗原选择的问题被提出。GAGSIVmac239 非十四烷基化蛋白被选作抗原。先前结果和观测以及关于 HIV-1 感染和病毒结构的数据可以证明选择这一蛋白质作为潜在有效抗原是正确的。首先, HIV-1 毒株中的重要可变性限制我们选择蛋白质在不同 HIV-1/SIV 毒株中很好地保守。仅 GAG、POL 和 NEF 可满足这个标准。但是, 已经显示 CTL 主要识别位于 gag 和 nef 上的表位 (Addo et al., 2003)。最近, 证实靶向的 HIV-1 蛋白, 仅 GAG 特异性应答与降低病毒血症相关并且独立于特定 HLA- 类型 (Kiepiela et al., 2007)。另外, GAG 特异性应答越多样, 血浆病毒血症越低。另外, 因为其包含病毒基质, GAG 是第一个被 MHC I 类加工和呈递的蛋白质 (Sacha et al., 2007), 因为进入 / 捕获是足够的并且无需病毒复制。GAG 还是 HIV-1 蛋白中最表现的 (1000-1500CA) (Briggs et al., 2004)。所有这些数据表明选择这个蛋白质作为相关抗原用于我们首次疫苗试验是正确的。另外, 这个试验设计给出 TRIP 载体作为免疫接种工具的效率的概念证明。为此, 简单抗原被自愿选择以说明由载体本身所起的保护作用 (基因转移功效)。另外, 用简单的 GAG 蛋白作为抗原可以与先前疫苗研究进行比较。

[0479] 4.4. 免疫接种方案

[0480] 选择初免 - 加强策略以增强初始应答。第二次注射预期增加响应者数目、抗原特异性 T 细胞的频率及亲和力以及 T 细胞应答的强度。其还应改善应答的多样性及 T 细胞功能如杀伤或迁移至外周。

[0481] 对于初免, 各 2 个猕猴的 3 组用 3 种不同剂量的用 Indiana 血清型 VSV-G 假型包装的 LV 载体 TRIP-SIVmac239 Gag 免疫接种。2 个动物接受作为无关载体的用 Indiana 血清型 VSV-G 假型包装的 TRIP-GFP 载体。对于加强, 在初免后 3 个月, 所有免疫接种动物均接受类似剂量的用 Indiana 非交叉反应血清型 VSV-G 假型包装的 TRIP-SIVmac239 Gag 或 TRIP-GFP。

[0482] 为了测试由这种基于 TRIP 载体的疫苗触发的保护能力, 加强后 2 个月 8 个动物用 500 动物感染剂量 50 (AID50) 的 SIVmac251 直肠内攻击。接种途径和用于攻击的非常高剂量病毒通过群组大小证明是正确的, 事实上通过增加感染剂量, 我们希望限制在仅有 4 只猕猴组成的研究的原初动物装备中的自发对照者数目。

[0483] 在初免、加强及攻击后的细胞免疫应答的长期跟踪通过在 PBMC 上进行 IFN- γ ELISPOT 而进行。

[0484] 材料和方法

[0485] 1. 材料

[0486] 1.1 抗原

[0487] SIVmac239 GAG Δ myr 蛋白被选作抗原。其是 511 个氨基酸的蛋白质。蛋白质十四烷基化结构域被缺失以允许在生物安全性水平 L1 实验室中操作, 以及促进 APC 的 I 类呈递。来自 SIV mac239 的 GAG 多蛋白的完整序列可通过蛋白质 ID :AAA47632 发现。GFP 蛋白选作无关抗原。

[0488] 1.2. 质粒

[0489] 用于转染的所有质粒均在菌株 JM109 E.coli K12 细菌 (F' traD36 pro⁺A⁺B⁺lacI^q Δ (lacZ)M15/ Δ (lac-proAB)glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thihsdR17), 在补加氨苄青霉素的 LB 培养基中生长, 用来自 Macherey-Nagel (Hoerd, France) 的 Maxi-prep Nucleobound 试剂盒提取。

[0490] 用三个质粒构建体产生 TRIP- Δ U3-CMV-Gag Δ myr-WPRE (在此称为 TRIP-SIVmac239 Gag, 图 25A) 或 TRIP- Δ U3-CMV-eGFP-WPRE (在此称为 TRIP-GFP, 图 25B) 的颗粒。含有 HIV-1 顺式活性基因 (LTR, 在 3' 的 Δ U3, 包壳信号 Ψ , RRE 和 DNA 活瓣即 cPPT/CTS) 和编码 SIVmac239 GAG Δ myr 蛋白或 GFP 蛋白的转基因的载体质粒, 在异源转录调节元件: 巨细胞病毒启动子的控制下。加入 WPRE (早发肝炎病毒调控后元件) (Donella J. E. et al, 1998) 序列以增加转基因表达。

[0491] 包装质粒 (包壳质粒), 含有在生产细胞系中构建病毒颗粒所需的 HIV-1 基因 gag、pol、tat 和 rev, 可以如 Zufferey et al, 1998 中 p. 8. 7. 1 设计。

[0492] 包膜质粒 (包膜表达质粒), 编码来自水泡性口炎病毒 (VSV-G) 血清型 Indiana 的糖蛋白 G (VSV-G) (phCMV VSV-G) (Yee J. et al, 1994, Genebank AJ318514) 或 Indiana 非交叉反应血清型如血清型 New Jersey (pcDNA3. 1(-)NJ-G WPRE)。pcDNA3. 1(-)NJG 衍生自自得自 Invitrogen 的 pcDNA3. 1 质粒。特别地, 为构建 pcDNA3. 1(-)NJ-G WPRE, 用 XhoI 和 NotI 消化 pBS-NJG (Genebank V01214)¹⁷ 并克隆进 pcDNA3. 1(-) 载体 (Invitrogen)。为增加表达, 通过 EcoRI 消化加入 WPRE (早发转录后调节元件) 序列, 该序列经 PCR 预扩增并克隆进 TOPO TA 克隆载体中。

[0493] 包装和包膜质粒具有异源转录元件 (CMV 启动子, 和聚腺苷酸化信号)。所有质粒均含有氨苄青霉素抗性基因以易于在细菌中生长选择。

[0494] 1.3 细胞培养

[0495] 人胚肾细胞系 (人 293T) 用于 TRIP 载体产生。为抑制转导测得, 使用 P4 细胞系, 一种 HeLa 衍生细胞系。

[0496] 这些细胞在由含有谷氨酰胺的 Dulbecco 修改的 Eagle 培养基 (DMEM, GlutaMAX-1 Supplement, GIBCO) 组成的完全培养基中生长, 所述培养基补加 10% 热灭活胎牛血清 (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) 和青霉素、链霉素 (100 单位/ml 青霉素 G (钠盐) 和 100U/ml 硫酸链霉素, GIBCO, Invitrogen)。猕猴原代细胞在 RPMI GlutaMAX-1 完全培养基 (10% FCS 和抗生素, 类似于 DMEM 中的浓度) 中培养。

[0497] 1.4 非人灵长类

[0498] 来自印度洋毛里求斯岛的 12 个雄性成年 Cynomolgus 猕猴 (Macaca fascicularis) 包括在免疫接种试验中。在包括在研究之前它们对于 SIV、疱疹病毒 B、线状病毒、

STLV-1、SRV-1、SRV-2、麻疹、肝炎 B-HbsAg 及肝炎 B-HBcAb 是阴性的。免疫、攻击及采血根据使用非人灵长类实验的 EU 指导进行。

[0499] 1.5 用于攻击的 SIV 病毒

[0500] SIVmac251 毒株（完整前病毒基因组及侧翼序列；登录号：M19499）用于攻击。

[0501] 1.6 SIVmac239 GAG 和 SIVmac251 NEF 肽集合

[0502] ELISPOT 中的 PBMC 体外再刺激用 SIVmac239 GAG 或 SIVmac251NEF 肽集合进行，所述肽集合分别含有 125 个肽或 64 个肽（NIH AIDS Research and Reference Reagent Program）。肽长度为 15 个氨基酸，在依次各肽之间有 11 个氨基酸的重叠。GAG 肽分布在 11 个集合中，所述集合含有 5-12 个连续和重叠的肽，从字母 M 到 W 命名并覆盖 SIVmac239 GAG 蛋白（图 26）。NEF 肽分成 12 个集合，各 8 个肽，覆盖 NEF SIV mac251 蛋白并以字母 a 至 h 命名。大多数肽 80% 以上纯。它们以每个 1mg 冻干输送。收到时，将它们重悬为 2mg/ml 于 5% DMSO（针对 GAG 肽）及 1mg/ml 于纯 DMSO（针对 NEF 肽），这基于肽含量百分比和 HPLC 纯度。

[0503] 2. 方法

[0504] 2.1 载体产生

[0505] 载体颗粒通过 293T 细胞的瞬时磷酸钙转染产生（CaCl₂ 0.125mM, 1XHEPES 缓冲盐水 pH7.10, 70mM NaCl, 0.75mM Na₂HPO₄ 2H₂O, 25mMHEPES）。10 μg 编码 GAG Δmyr 或 GFP 的质粒需要 5-10 μg 编码 VSV-G 糖蛋白包膜的质粒，以及 10 μg Zennou et al 2000 先前描述的包装质粒（Zennou et al., 2000）。在转染前 24 小时，细胞以完全培养基中 6.10⁶ 接种于 10cm² 聚苯乙烯处理的组织培养 Petri 皿（Falcon），培养基在转染前更换。细胞至少 80% 铺满。转染后 24 小时，不含 FCS 的完全培养基以较小体积加入细胞以浓缩颗粒。转染后 48 小时，从 Petri 皿收集上清，离心沉淀漂浮细胞（2500rpm, 5 分钟），在 37°C 用 DNase I（Roche Boehringer, 20U）和 MgCl₂（Sigma, 1mM）处理 15 分钟以消除残余质粒 DNA。载体在上清超离心后收集（22000rpm; 1 小时）并重悬于冷 PBS 中。载体以小体积等份保存在 -80°C。

[0506] 2.2. 测量 p24 GAG 抗原产生

[0507] 载体 HIV-1 p24 GAG 抗原含量用酶联免疫法确定（Perkin-Elmer LifeSciences, Paris, France）。p24 浓度以 ng/ml 载体给出。

[0508] 2.3 载体滴定

[0509] 用 3 种不同体积的载体转导 293T 细胞（在转导前 24 小时以 5.10⁵ 细胞 / 孔接种于 6 孔 Petri 皿）进行滴定。细胞还用相同量的预先在 70°C 热灭活的载体转导。转导后 72 小时，用含有无 DNase 的 RNase（Roche Boehringer, 50 μg/ml 最终）的裂解缓冲液 1X（Tris 20mM pH = 8.8; NP40 0.1%; Tween 0.1% 最终）裂解细胞。通过加入蛋白酶 K（蛋白酶 K 稳定于 100 μg/ml 最终, Eurobio）降解细胞蛋白。

[0510] 通过用 Light Cycler 仪器（Roche Diagnostics, Meylan France）在细胞裂解物上进行实时 PCR 而评估载体效价。总 HIV-1 DNA 拷贝数通过检测位于 LTR U5 区的病毒 DNA 序列而确定（引物 AASM 反向及 M667 正向）。每个 PCR 使用 2 个杂交探针，一个探针用荧光素（FL）标记作为 3' 末端供体，另一个用 LightCycler Red 640（FC）标记作为 5' 接受体。细胞数的标准化通过用引物 CD3 于 3' 和 CD3 于 5' 及探针 FL 和 FC 检测 CD3 序列（管家基因）而进行。为进行 PCR，在 15 μL PCR- 混合物（Jumpstart taq readmix for Q-PCR，

Sigma 1X, MgCl₂ 1.9mM, 1.5U Taq 聚合酶 (Invitrogen), 1.5 μM 正向和反向引物及 0.2 μM 荧光杂交探针) 中, 针对每种条件以双份测试 5 μL 裂解物。拷贝数参照标准曲线确定, 标准曲线通过用匹配序列 (U5R 和 CD3) 扩增在小鼠细胞裂解物 (3T3) 中稀释的 10² 至 10⁸ 克隆的质粒而制备 (图 27)。

[0511]

PCR	寡聚物序列 5' → 3'	
U5R 正向引物	M667	GGCTAACTAGGGAACCCACTG
U5R 反向引物	AASM	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA
U5R3' 末端供体探针	LTR FL	CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FL
U5R5' 末端供体探针	LTR LC	LC-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC
CD3 正向引物	CD3 于 5'	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3 反向引物	CD3 于 3'	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
CD3 3' 末端供体探针	CD3 FL	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FL
CD3 5' 末端供体探针	CD3 LC	LC-CTAGTGATGGGCTCTCCCTTGAGCCCTTC

[0512]

循环步骤及数目	温度	时间
1 个循环	1: 变性 95°C	3 分钟
40 个循环	2: 变性 95°C	5 秒
	3: 退火 57°C	10 秒
	4: 延伸 72°C	8 秒

[0513] 2.4 猕猴免疫接种

[0514] 猕猴分成 4 组, 各 2 个动物 (表 A), 在 2 个位点皮下注射用 VSV-G 包膜血清型 Indiana 假型包装的 TRIP-SIVmac239Gag, 分别为 3 个不同剂量 (高剂量 2.5 · 10⁸ 转导单位 (TU), 6863ng p24; 中剂量 1 · 10⁸TU, 2745ng p24 或低剂量 2.5 · 10⁷TU, 686ng p24), 或以相同于 TRIP-SIVmac239 Gag 的高剂量 (6863ng p24) 的 p24 剂量注射 TRIP-GFP。

[0515] 对于在初免后 87 天进行的第二次免疫接种, 动物在 4 个位点皮下注射用 Indiana 非交叉反应 VSV-G 糖蛋白血清型 (VSV-G 血清型 New Jersey) 假型包装的载体。当用 GAGΔtamyra 抗原初免时, 猕猴接受 1 · 10⁸TU TRIP-SIVmac239 Gag, 60185ng p24 或者当用 GFP 抗原初免时, 接受 60185ng TRIP-GFP 载体的 p24。

[0516]

Cynomolgus 猕猴 tattoo 数	在初免时接受的载体	分类
20022	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10 ⁷ TU	低剂量
20089	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10 ⁷ TU	
20293	TRIP-SIVmac239 Gag 1 10 ⁸ TU	中剂量
20056	TRIP-SIVmac239 Gag 1 10 ⁸ TU	
20195	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10 ⁸ TU	高剂量
20158	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10 ⁸ TU	
21544	TRIP-GFP 6862ng p24	对照
20456	TRIP-GFP 6862ng p24	
15661	无	未接种的
14184	无	
15885	无	
14468	无	

[0517] 表 A :TRIP 免疫接种试验中使用的 Cynomolgus 猕猴的重新分配

[0518] 动物根据 tattoo 数及在初免时接受的 TRIP 载体的性质 / 剂量分配

[0519] 2.5SIVmac251 攻击

[0520] 免疫接种的及首次实验的猕猴（总共 12 个猕猴）在加强后 57 天（即初免后 136 天）用单剂量在 1ml 中的 500 AID₅₀（足以感染 50%动物的动物感染剂量）的病原性 SIVmac251（原液来自 A. M. AUBERTIN, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France, 由 ANRS 经销, 或得自 NIH 的等价原液）直肠内攻击。动物用 10-20mg/kg 氯胺酮 (Imalgen, Rhone-Merieux) 麻醉, 整个程序根据 EU regulations and guidelines of Animal Care and Use 进行。接种后猕猴单独饲养, 预防措施符合 Level 3 生物安全性动物房。

[0521] 2.6 IFN- γ ELISPOT

[0522] 动物用 10-20mg/kg 氯胺酮 (Imalgen, Rhone-Merieux) 麻醉采血。每个猕猴收集 8ml 血液于具有柠檬酸钠的细胞制备试管 (BD Vacutainer™CPT™) 中, 用于 PBMC 和柠檬酸

血浆收集,及 3ml 于血清分离试管 (Vacuette®) 中,用于血清收集。离心后 (Vacuette® 试管为 10 分钟,2500rpm, CPT™ 为 30 分钟,3000rpm,无刹车),用 3-5ml 1X 裂解缓冲液 (Iotest® 10X 裂解缓冲液, Beckman-Coulter) 裂解红细胞,经 10 分钟 1600rpm 离心沉淀 PBMC,然后在 Kova's chamber Hycor® 中计数,分配于 96 孔 ELISPOT 平板中,一式三份, 2×10^5 细胞 / 孔,如果可获得足够细胞。

[0523] 具有 Immobilon® -P (Polyvinylidene Fluoride, PVDF) 膜 (MultiScreen HTS Assay System, MSIP; Millipore) 的 96 孔板预湿润 (乙醇 35%) 并用捕获抗体 (小鼠 IgG1 抗人-猴-IFN- γ 单克隆抗体 GZ-4 纯化的 (Mabtech), $10 \mu\text{g/ml}$ 最终于 PBS 中; $50 \mu\text{L}$ 每孔) 在 4°C 包被过夜。平板在 Dulbecco's PBS 1X 中洗涤 4 次,用完全 RPMI 封闭。

[0524] 细胞通过加入一个集合的肽 ($2 \mu\text{g/ml}$ 每种肽)、AT-2 灭活的 SIVmac251 ($5 \mu\text{g/ml}$ 总病毒蛋白) 或作为阳性对照的 PMA-iono ($0.1 \mu\text{M}$ PMA 和 $1 \mu\text{M}$ ionomycin) 而刺激 (4000 细胞 / 孔),或用 DMSO/RPMI 模拟刺激。

[0525] 40 小时后,斑点如下揭示:应用生物素缀合抗体 (小鼠 IgG1 抗人-猴-IFN- γ 单克隆抗体 7-B6-1 纯化的 (Mabtech); $1 \mu\text{g/ml}$ 最终于 PBS 0.5% FCS 中; $100 \mu\text{L}$ 每孔, 37°C 2 小时),随后链霉抗生物素蛋白-AP (1h , $1/5000$ 于 PBS 0.5% FCS, $100 \mu\text{L}$ 每孔, 1h , 37°C) 和 BCIP/NBT 底物溶液 (Ready to use mixture, $60 \mu\text{L}$ 每孔; 15 分钟, RT, 黑暗中)。斑点用 Bioreader 2000 (Biosys, Karben, Germany) 计数。结果表达为每 1 百万个 PBMC 中 IFN- γ 斑点形成细胞 (SFC) 数。产生自 5% DMSO/RPMI 刺激的 IFN- γ SFC / 百万个 PBMC 作为背景信号从结果中减去。

[0526] 2.7 ELISA

[0527] 用商业试剂盒 (来自 U-Cytech Bioscience (Utrecht, Netherlands) 的猴 IL-6 和 TNF- α ELISA 试剂盒,来自 PBL Biomedical Laboratories (New Jersey, United States) 的人 INF- α 试剂盒) 经 ELISA 进行先天细胞因子 (IL6; TNF- α 和 IFN- α) 的定量。初免注射前 40 天、初免注射后 1 小时、6 小时、24 小时和 7 天测试每个动物的血浆。

[0528] 2.8. 体外血清中和测定

[0529] P4 细胞在转导前 24 小时以 1×10^5 / 孔接种于 96 孔平板的完全培养基中。转染当天,用与不同稀释度的血浆预保温的 TRIP-GFP (用 Indiana 血清型 VSV-G 或用 Indiana 非交叉反应 VSV-G 如 New Jersey VSV-G 假型包装) 培养细胞。细胞用相同体积的完全培养基模拟转导。转导后 72 小时,转导效率通过用 FACScalibur (BD) 经流式细胞术分析 GFP 荧光而评估。

[0530] 2.9 病毒负荷确定

[0531] 简而言之,病毒 RNA 用 Roche 的高纯病毒 RNA 试剂盒分离自柠檬酸-血浆 (总共 $200 \mu\text{L}$)。在 $50 \mu\text{L}$ 洗脱缓冲液 (无核酸酶, 无菌, 双蒸水) 中进行洗脱。分离自血浆的 SIV-RNA 数用来自 Invitrogen 的 Platinum qRT-PCR 在定量单步骤 RT-PCR 中确定。反应一式二份在来自 Abgene (AB1100) 的 96 孔板中在 Mastercycler ep realplex (Eppendorf) 中进行,终体积为 $25 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{L}$ RNA 提取物和 $15 \mu\text{L}$ Mix)。选择 Taqman 定量法,使用含有分别位于 5' 和 3' 的 Fam 和 Tamra 荧光团的内部探针 (500nM 最终)。引物 (450nM 最终) 分别在 SIVmac251 GAG mRNA 基因组的位置 389 和 456 (表 B)。

[0532] 最初存在的病毒 RNA 拷贝的数量通过外推阈值荧光到内部标准曲线上而评估,所

述标准曲线从先前通过“分支 DNA”技术滴定的病毒原液 SIVmac251 的在 dH₂O 中的系列稀释液制备。作为 PCR 的阳性对照,使用 TRIP-SIVmac239Gag 载体质粒 (10⁴ 拷贝 / μL)。

[0533]

名称	序列 5' → 3'	大小	
引物正向 :SIVmac389F	GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC	24bp	
引物反向 :SIVmac456R	CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT	25bp	
Taqman 探针 :SIVmac TM Fam-TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA-Tamra		23bp	
循环步骤及数目		温度	时间
1 个循环	1: 逆转录(1 个循环)	46°C	30 分钟
	2: 酶活化	95°C	4 分钟
50 个循环	3: 步骤 1, PCR 变性	95°C	15 秒
	3: 步骤 2, PCR 退火及延伸	60°C	1 分钟
1 个循环	4: 冷却	20°C	保持

[0534]

[0535]

[0536] 表 B :用于血浆病毒负荷确定的引物和探针序列及 Taqman RT-PCR 程序

[0537] 结果 :慢病毒载体初免 - 加强免疫在猕猴中赋予抗大量 SIVmac 251 攻击的强保护作用

[0538] 许多研究表明了 CD8⁺T 细胞在控制 HIV 感染中所起的关键作用,并提示有效疫苗应该诱导强力的广泛的持久的 CD8⁺T 细胞应答。但是,显示引起特异性 SIV CD8⁺T 细胞应答的几种病毒载体随后未能控制 SIV/ 猕猴模型中的病毒血症 (Schoenly, K. A. & Weiner, 2007)。因为我们和其它人证实慢病毒载体非常强力诱导细胞免疫 (综述见 He, Y. & Faló, L. D., 2007, Breckpot, K, Aerts, J. L. & Thielemans, K., 2007), 我们评估了它们是否能赋予抗 SIV 感染和猴 AIDS 的保护性细胞免疫。我们选择了猕猴的 SIVmac251 感染模型,其显示类似于人类中 HIV-1 感染所见的病毒载荷水平和各种进展速率 (Karlsson, I. et al, 2007 and Reimann, K. A., et al, 2005)。

[0539] 6 只猕猴皮下注射 HIV-1 衍生的慢病毒载体 2 次而免疫,所述载体编码天然序列的非分泌型 SIVmac239 GAG 蛋白 (TRIP-SIVmac239 GAG)。这一单个和非优化抗原被选择用于显示用于免疫的慢病毒载体系统的潜力。为了克服中和性抗载体抗体的存在,及因此允许有效的加强作用,设计了包膜交换策略。事实上在小鼠中的准备实验已经显示用来自两个非交叉反应性血清型 Indiana 随后 New Jersey 的 VSV-G 假型包装的 TRIP-SIVmac239GAG 颗粒的初免 - 加强方案比同源初免 - 加强更有效。免疫组和实验设计总结在表 1 中。

[0540] 单次注射慢病毒载体在每个免疫动物中足以诱导强细胞免疫,无论接受的剂量如何 (图 28a) 并且不刺激系统性炎症 (图 28(2))。SIVmac239 GAG 特异性 T 细胞应答在初

免后 16 天达到峰值,达到 IFN- γ 分泌细胞的高频率(直至 3000 个 IFN- γ SFC/ 百万个 PBMC),在免疫后 2 个月回到免疫前水平(图 28(1)a 和 28(1)b)。除了强初始免疫之外,还发现它们是广泛的,覆盖几个肽集合(图 32(2)a 和表 2a)。在我们的远交群组中,我们观测到 SIVmac239GAG 特异性 IFN- γ 应答优势抗 GAG 的 C 末端区域内覆盖 p27CA 和 p9 NC 部分的两个集合。所有 6 个疫苗均引起抗集合 SIVmac239 GAG :337-395 的强应答,6 个中有 4 个抗集合 SIVmac239 GAG :385-443。

[0541] 动物还产生了抗 VSV 血清型 Indiana 的中和性体液应答(图 31(2)a),但是重要地,来自免疫动物的血清不中和用 VSV-G New Jersey 体外假型包装的载体(图 31(2)b)。因此猕猴随后在初免后 11 周用中剂量的用 VSV-G New Jersey 假型包装的 TRIP-SIVmac239 GAG 颗粒注射。SIVmac239GAG(15-mers)Peptides-Complete Set 通过 AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH 获得。

[0542] SIVmac239 GAG 特异性 T 细胞应答有效地由第二次注射再刺激(图 28(1)a)。应答幅度增加,具有次级应答典型的动力学,即更快的发生及更长的持续。IFN- γ 分泌细胞早在第二次免疫后 1 周即检测到并直至 2 个月或更长。细胞应答的宽度未改善(图 30(2)b 或表 2b)。为更紧密模拟发生在感染细胞中用于抗原呈递的但是被肽脉冲绕过的加工和运输步骤,A T-2 灭活的 SIVmac251 也用作抗原。弱的(猕猴 20089)至强的(猕猴 20022、20195 和 20056)应答被观测到(图 30(2)d)。加强后 10 周进行的细胞内染色表明 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞均对应答肽集合的 IFN- γ 产生有贡献(数据未示出)。

[0543] 鉴于疫苗诱导的强和广泛的细胞免疫应答,我们测试了其抗 SIV 感染的保护功效。猕猴在加强后 11 周用直肠内接种高剂量 SIVmac251 (500AID₅₀) (表 1) 而攻击。在攻击稍后(1 周内)在免疫动物的外周血中观测到大量回忆性 SIV GAG 特异性应答,与未免疫和对照动物相反。这些应答更早达到峰值且更强烈(大于 4000 SIV GAG 特异性 INF- γ SFC/ 百万 PBMC) (图 28)。与未免疫和对照 (TRIP GFP) 动物相比,在免疫动物中在原发感染期间也记录了总的原初和中枢记忆 CD8⁺T 细胞的更早和更高的反弹(图 32(2))。免疫后定位的 GAG 区被攻击回忆,新的免疫原性区域也在感染后检测到。GAG 特异性应答的多样性在免疫和未免疫或对照动物之间相当(图 30(2)c 和表 2c)。

[0544] 尽管病毒攻击导致所有动物感染,但是免疫赋予抗病毒复制的强保护作用及在急性期中枢记忆 CD4⁺T 细胞的耗竭。TRIP GFP 注射的对照动物具有与未免疫猕猴非常相当的感染进程,因此作为单组集合。在这些首次实验对照动物中,病毒复制峰值很高,平均为 1.02×10^7 RNA 拷贝/ml。病毒负荷然后在所有 6 个未接种和对照动物中下降到低至中度调定点 (set-point) 血浆病毒 RNA 水(第 70-154 天),平均为 3.44×10^5 RNA 拷贝/ml (图 29(1)a 和 29(1)c)。相反,在所有 6 个免疫动物原发感染的高峰病毒血症低于首次实验和对照动物至少两个数量级幅度,平均为 9.25×10^4 RNA 拷贝/ml (图 29(1)b 和 29(1)c)。从 6 个免疫的猕猴,4 个抑制病毒血症高峰大于 2 log₁₀ 倍 (20022, 20293, 20158), 2 个抑制大于 3log₁₀ 倍 (20293 和 20158), 1 个抑制大于 4 log₁₀ 倍 (20195) (图 29(1)e)。分辨病毒血症高峰后,病毒负荷下降并持久保持在低于未免疫和对照动物的大约 10 倍,在感染后第 49 天统计学更低(图 29(1)c)。当比较感染头 154 天期间的累积复制(表示为作为时间函数的病毒负荷曲线下面积)时,免疫提供的益处是统计学显著的(图 29(1)f)。

[0545] 我们还监测了 CD4⁺T 细胞在感染进程期间在外周血中的进化,更特别是中枢记

忆 (CM) CD4⁺T 细胞, 因为它们的耗竭与血浆病毒负荷相关 (Karlsson, I. et al, 2007), 它们在急性和慢性 SIV 感染期间的保持预测免疫猴的长期存活, 好于调定点病毒负荷水平 (Mattapallil, J. J. et al, 2006 and Letvin, N. L., et al, 2006)。

[0546] 在急性感染期间, 在未免疫和对照动物的外周血中的 CM CD4⁺T 细胞快速极度下降 (图 30a)。CM CD4⁺T 细胞计数保持很低, 它们中的 3 个有逐渐耗竭的迹象 (21544, 14184 和 20456), 而对于其它 3 个耗竭是瞬时的随后回到基线 (15661, 15885 和 14468)。这两个亚组相应地进一步证实中等和低急性期后病毒血症并因此被分类为进展者 (14184-21544-20456) 和非进展者动物 (15661-15885-14468)。

[0547] 相反, 免疫接种动物显示在病毒血症高峰完全保持或仅低耗竭它们的 CM CD4⁺T 细胞并且全部快速恢复它们的 CM CD4⁺T 淋巴细胞, 除了猕猴 20089 (图 30(1)b 和 30(1)c)。

[0548] 所有首次实验和对照动物均经历在原发感染高峰时的极度 CM CD4⁺T 细胞丧失及高病毒血症, 但是其中半数快速恢复它们的 CM CD4⁺T 细胞区室, 相反其余半数显示缓慢的 CM CD4⁺T 细胞数下降。这两个亚组相应地证实低和中等急性期后病毒血症并因此被分类为非进展者 (15661-15885-14468) 和进展者动物 (14184-21544-20456)。重要地, 晚期时间点的免疫接种动物的病毒血症当与进展者未免疫接种动物相比时降低大约 2log₁₀ 倍, 而急性期后病毒血症和 CM CD4⁺T 细胞计数在疫苗和非进展者未免疫接种动物之间是相似的 (图 29d 和 30d)。

[0549] 尽管由于一些 ELISPOT 孔的饱和导致细胞应答评估过低, 但是发现了疫苗诱导的免疫应答和病毒负荷之间的相关性 (图 29(2))。重要地, 在高峰病毒血症水平与在初免后 2 周、加强后 1 周和根据后 1 周测量的 GAG 特异性 IFN- 应答之间有倒相关 (图 32a, 32b 和 32c)。这些发现与显示 HIV61 GAG 特异性 CD8⁺T 细胞与低病毒负荷及缓慢疾病进程之间的相关的大群组 HIV-1 感染患者中的研究 (Kiepiela, P. et al, 2007) 非常符合。我们还观测到急性感染期间 CM CD4⁺T 细胞保持和病毒负荷之间的强相关 (图 32d)。

[0550] 总之, 这个研究提供了证据表明基于慢病毒载体的初免 / 加强免疫方案在猕猴中引起强的广泛的细胞免疫并通过降低病毒血症和完全防止在原发感染高峰时 CD4⁺T 细胞和 CM CD4⁺T 细胞的丧失而赋予抗大量 SIVmac251 感染的有效保护。

[0551] 长期跟踪会告诉在这一猕猴群组中是否会发生病毒逃避免疫压力。在 5 个月跟踪后, CD4⁺T 细胞数的稳定性及在免疫接种动物中病毒负荷降低倾向赞成长期控制。在尽管有限的猕猴群组中的这一第一次临床前试验是非常令人鼓舞的, 因为保护仅依赖于抗非优化 GAG 抗原的应答。我们预期通过增加抗原表达控制复制及通过密码子优化控制免疫原性 (Deml, L. et al, 2001 and zur Megede, J. et al, 2000), 及通过融合其它 SIV 抗原及 GAG 增加细胞应答多样性 (Wilson, N. A. et al, 2006 and Hel, Z. et al, 2006)。在这一方面, 本文后面提供一些在小鼠模型上的结果, 完全实现功效和安全性需要的这一免疫策略的优化版本之后会进入人类治疗性免疫临床试验。

[0552]

表 1: 免疫组及实验设计

组	疫苗	亚组	动物#	初免	加强	攻击
接种的	TRIP-SIVmac239 GAG	低剂量	20022, 20089	用 VSV-G Indiana 假型 包装的颗粒 第 0 天	用 VSV-G New Jersey 假型 包装的颗粒 初免后第 79 天	加强后第 76 天
n=6		中剂量	20293, 20056	1 108TU	1.2 108TU	500 AID50
		高剂量	20195, 20158	2.5 108TU		SIVmac251
对照	TRIP-GFP		21544, 20456	6863ng p24	6018ng p24	500 AID50
n=2						SIVmac251
未接种的	无		15661, 14184	无	无	500 AID50
n=4			15885, 14468			SIVmac251

来自印度洋毛里求斯岛的 12 个远交雄性成年猕猴(*Macaca fascicularis*)包括在临床前试验中。在包括在研究之前它们对于 SIV、疱疹病毒 B、线状病毒、STLV-1、SRV-1、SRV-2、麻疹、肝炎 B-HBsAg 及肝炎 B-HBeAb 是阴性的。免疫、采血及攻击根据使用非人灵长类实验的 EU 指导(decret No 2001-486)进行。在第 0 天和第 79 天皮下注射 2 种不同包膜假型包装的慢病毒颗粒进行免疫, 2 种包膜是来自 2 种非交叉反应 VSV 血清型 Indiana 和 New Jersey 的糖蛋白 G。慢病毒载体颗粒剂量表示为转导单位(TU)/动物及 ng p24/动物。6 个动物用 3 剂编码非分泌型 SIVmac239 GAG 的慢病毒载体(十四烷基化缺陷的)免疫。因为在首次注射后缺乏剂量应答, 所有 6 只接种动物接受第二次注射相同中等剂量的载体。2 个对照动物用编码无关抗原 GFP 的慢病毒载体在高剂量相关亚组相同 p24 剂量免疫。接种的、对照及未接种的猕猴在加强后 76 天用高剂量致病性 SIVmac251(A-M Aubertin, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France)经直肠内攻击, SIVmac251 表达与疫苗密切匹配的 GAG 蛋白(同源攻击)。选择高剂量病毒(500 AID₅₀, 疫苗保护功效研究中通常使用 20-50 AID₅₀)以限制自发对照者(controller)数目⁵。

[0553] 表 2 疫苗诱导的 T 细胞应答是广泛的
[0554]

低剂量
中剂量
高剂量

	p17 MA:1-132			p27 CA:133-380					p9 NC and p6:381-511			
	GAG:140	GAG:49-158	GAG:90	GAG:14	GAG:19	GAG:24	GAG:28	GAG:33	GAG:38	GAG:41	GAG:481	
20022	140	113	90	160	17	100	63	743	613	1190	23	3/11
20049	158	133	11	138	0	0	1	433	185	70	68	1/11
20293	28	542	27	180	0	10	45	388	265	37	62	2/11
20056	100	35	102	405	77	60	15	1280	845	325	0	3/11
20195	255	1060	12	245	28	203	95	690	543	31	24	3/11
20058	92	150	165	297	55	47	218	900	503	128	8	2/11
	0/6	2/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	6/6	4/6	1/6	0/6	

Table 2b

低剂量
中剂量
高剂量

	p17 MA:1-132			p27 CA:133-380					p9 NC and p6:381-511			
	GAG:1-35	GAG:45-102	GAG:97-151	GAG:145-213	GAG:191-251	GAG:241-293	GAG:289-347	GAG:337-392	GAG:383-441	GAG:439-491	GAG:481-511	
20022	173	153	207	132	93	123	85	623	402	1347	65	3/11
20049	321	291	150	198	59	176	49	449	434	135	72	2/11
20293	167	41	0	3	49	0	27	140	302	45	79	0/11
20056	168	82	88	160	222	125	102	1275	1150	308	62	2/11
20195	84	430	2	21	11	4	9	432	432	432	432	5/11
20058	197	70	24	134	279	30	88	1029	909	177	46	2/11
	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	5/6	2/6	1/6	

Table 2c

低剂量
中剂量
高剂量
对照
原初

	p17 MA:1-132			p27 CA:133-380					p9 NC and p6:381-511			
	GAG:1-39	GAG:46-107	GAG:97-151	GAG:145-213	GAG:191-251	GAG:241-293	GAG:289-347	GAG:337-392	GAG:383-441	GAG:439-491	GAG:481-511	
2002	190	85	78	82	182	103	55	850	872	1197	92	3/11
2004	735	161	93	52	523	322	106	513	550	187	110	4/11
2029	0	495	40	12	0	40	240	510	520	40	128	3/11
2005	60	0	4	270	0	117	33	602	788	530	9	3/11
2019	99	34	0	16	0	3	172	58	14	60	62	0/11
2005	142	135	4	447	65	58	192	586	658	633	178	4/11
2154	147	178	142	647	70	118	147	513	807	198	192	3/11
2045	13	252	18	205	105	119	272	217	152	123	59	0/11
15661	288	911	408	228	0	513	161	906	893	503	102	6/11
14184	170	173	78	268	33	88	403	312	288	137	292	1/11
15985	148	136	159	251	188	598	326	491	331	229	12	2/11
14468	0	46	122	72	29	0	153	37	320	1033	92	1/11
	1/12	2/12	1/12	2/12	1/12	2/12	1/12	8/12	7/12	5/12	0/12	

[0555] 由 GAG 编码的蛋白质 (基质 MA、衣壳 CA、核衣壳 NC 和 p6) 的多样性及对疫苗诱导的、病毒诱导的和病毒回忆的 GAG 特异性细胞应答的贡献经 IFN- γ ELISPOT 测定研究, 测定在初始应答高峰 (初免后 2 周, 补充表 1a), 加强后 1 周 (补充表 1b) 和感染急性期期间 (攻击后 3 周, 补充表 1c) 进行, 使用表的第 2 行所示的 11 个肽集合。头 2 列示出动物标识符。数字相应于 IFN- γ SFC/ 百万个 PBMC。下划线表示饱和的 ELISPOT 孔。浅灰色方框相应于阳性应答 (> 375 IFN-g SFC/ 百万个 PBMC), 深灰色方框代表在个体动物中的最强应答。最右栏显示由每种动物识别的肽集合数, 而最底一行代表产生抗每个肽集合的应答的群组动物数。

[0556] 在用编码 GAG 抗原或所述抗原的密码子优化形式的慢病毒载体免疫的小鼠中获得的免疫应答的比较

[0557] 1. 编码抗原的多核苷酸的密码子优化改善 CTL 应答

[0558] 首次实验小鼠 (n = 3/ 组) 用各种剂量的 TRIP.NI gag delta myr 或编码密码子优化形式的 gag delta myr 的 TRIP.NI LV (TRIP.NI gag Δ myr CO) 经腹膜内单次注射免疫。免疫后 10 天, 经四聚体染色 (A) 或 IFN- γ ELISPOT (B) 评估抗免疫显性 gag CD8+T 细胞表位的 gag 特异性细胞免疫应答 (图 33)。SFC 斑点形成细胞 (C) IFN- γ ELISPOT 测定应答 CD8+T 细胞优势免疫表位和 gag 的 CD4+T 细胞表位。小鼠用 100ng TRIP.NI gag Δ myr LV 或 TRIP.NI gag Δ myr CO LV 腹膜内初免。10 天后, 来自免疫小鼠的脾细胞用相应的肽刺激并经 ELISPOT 测定分析。在绘图前减去背景频率。误差杆代表每组 3 个小鼠的 SD。 (D) 由 TRIP.NI gag Δ myr LV 和 TRIP.NI gag Δ myr CO LV 免疫诱导的 gag 特异性裂解活性的比较。在免疫后 10 天用 20 小时体内 CTRL 测定测量 CTL 活性, 如材料和方法中所述, 平均值 +/-SD 三个小鼠被示出。

[0559] 所获得的结果显示密码子优化关键性改善了由基于 TRIP.NI LV 的疫苗诱导的

CTL 应答。

[0560] 2. 编码优化抗原的慢病毒载体颗粒甚至在单次注射后也诱导强的可持续的细胞免疫应答

[0561] 获得的结果显示密码子优化关键地改善了由基于 TRIP.NI LV 的疫苗诱导的 CTL 应答。

[0562] 在单次注射 TRIP.NI gag Δ myr 或 TRIP.NI gag Δ myr CO 颗粒后,在小鼠中测定由非整合慢病毒载体诱导的记忆 T 细胞应答。图 34 显示编码密码子优化抗原的慢病毒载体颗粒甚至在单次注射后也诱导强的可持续的细胞免疫应答。

[0563] 3. 基于用来自非交叉反应性 VSV 血清型的糖蛋白 G 假型包装的 TRIP.NI gag Δ myr CO 颗粒的初免 - 加强策略增强细胞免疫应答

[0564] 用 VSV-G Indiana 假型包装的 TRIP.NI GAG Δ myr CO 或 TRIP.I GAG 野生型颗粒免疫小鼠,13 周后分别用 VSV-G New Jersey 假型包装的 TRIP.NI GAG Δ myr CO 或 TRIP.I GAG 野生型颗粒加强。初免 - 加强方案的对照组包括用 VSV-G Indiana 假型包装的 TRIP 颗粒 (灰色图) 或用 VSV-G New Jersey 假型包装的 TRIP 颗粒 (蓝色图) 注射 1 次。所有小鼠在免疫后 10 天牺牲,用 IFN- γ ELISPOT (A) 或四聚体染色 (B) 评估抗 GAG 细胞免疫应答 (图 35)。获得的结果显示基于慢病毒的颗粒的密码子优化增强初免 - 增强疫苗方案。

[0565] 在小鼠上获得的数据显示慢病毒载体颗粒中编码抗原的多核苷酸的密码子优化提供了在单次注射后或初免 - 增强注射后细胞免疫应答水平特别是宿主中 CTL 应答的改善。另外,获得的应答是强的和可持续的。

[0566] 在通过不同途径免疫小鼠中获得的免疫应答的比较

[0567] 几组两种不同类型小鼠用编码 SIVmac239Gag Δ 的慢病毒载体颗粒免疫。在单次注射颗粒后 10 天在每组中分析引起的免疫应答,所述单次注射肌肉内 (i. m.)、皮内 (i. d.)、腹膜内 (i. p.)、皮下 (s. c.) 或透皮 (t. c. i.) 进行。

[0568] 特别地所述应答在体内细胞毒性测定 (图 36-38) 或 IFN γ ELISPOT 中分析。

[0569] 在肌肉内途径进行的注射的小鼠组 (C57Bl/6j) 中,引起比其它途径注射更强的应答。

[0570] 用于当在疫苗方案中保护给予时引起免疫应答的非整合慢病毒载体

[0571] 材料和方法

[0572] 细胞培养及病毒制备

[0573] HeLa 细胞 (ATCC CCL-2)、人 293T 细胞和非洲绿猴肾 Vero 细胞 (ATCC CCL-81) 在补加 10% (HeLa 细胞、293T 细胞) 或 5% (Vero 细胞) 热灭活胎牛血清 (FCS)、青霉素、氯霉素和 Glutamax 的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基 (DMEM) (GIBCO) 中培养。西尼罗病毒 (WNV) 毒株 IS-98-ST1 (GenBank 登录号 AF 481 864), 其是 NY99 毒株¹⁰ 的一种密切相关变体,在蚊子 *Aedes pseudoscutellaris* AP61 细胞单层中增殖。在蔗糖梯度中纯化及用抗 WNV 超免疫小鼠腹水 (HMAF) 经转化灶免疫检测测定 (FIA) 在 AP61 细胞 (*Aedes pseudoscutellaris* 细胞) 上进行病毒滴定如前所述进行。感染性效价以转化灶形成单位 (FFU) 表示。

[0574] 慢病毒载体产生

[0575] 如先前所述构建 TRIP_{SEWNV} (图 12) 和 TRIP_{GFP} 载体质粒 (Iglesias et al. J. Gene Med. 2006 Mar ;8(3) :265-74)。这两个载体的寡核苷酸序列分别在图 4 和图 5 显示。载体

颗粒通过用载体质粒 pTRIP_{SEWNV} 或 pTRIP_{GFP}、一种 VSV-G 包膜表达质粒 (pHCMV-G) 和包壳质粒 (p8.74 或 pD64V, 分别用于产生整合 proficient 或整合缺陷载体) 如前所述瞬时磷酸钙共转染 293T 细胞而产生。浓缩载体颗粒的 p24 抗原含量的定量用市售 HIV-1 p24 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Perkin Elmer Life Sciences) 进行。TRIP.I 和 TRIP.NI 颗粒的载体效价通过转导用蛭蛭菌素处理的 HeLa 细胞并如 Iglesias et al. (J. GeneMed. 2006 Mar ;8(3) :265-74) 所述进行定量 PCR 而确定。整合和非整合慢病毒载体的效价根据 p24 含量及在生长停滞细胞中测量的定量 PCR 是相似的。

[0576] 骨髓衍生 DC 的制备

[0577] 骨髓细胞通过用补加 10% FCS 的 RPMI 冲洗小鼠股骨和胫骨而分离。细胞然后通过 45 μ m 细胞过滤器, 离心及重悬于 IOTest®3 裂解溶液 (红细胞裂解溶液, 氯化铵、碳酸氢钾和乙二胺四乙酸 (EDTA) 的混合物 ;BeckmanCoulter) 中, 在 4°C 保温 5 分钟以裂解红细胞。离心细胞, 在培养基中以 1×10^6 细胞 /ml 培养 8 天, 所述培养基由具有 10% FCS、L- 谷氨酰胺、青霉素、氯霉素、1mM 丙酮酸钠、10mM HEPES 和 50 μ M 2- 巯基乙醇的 RPMI 并补加 100ng/ml 重组小鼠 FLT3 配体 (R&D Systems) 组成。

[0578] 转导实验及流式细胞术分析

[0579] 为在非分裂细胞上进行转导实验, 将 HeLa 细胞在 8 μ M 蛭蛭菌素 (Sigma) 存在下以 40000 个细胞 / 孔接种在 48 孔板中。在蛭蛭菌素阻断后 24 小时, 细胞用浓度范围为 1-100ng/ml 的慢病毒载体转导, 蛭蛭菌素在转导时补充在培养基中。转导后 2 天, 收获细胞, 经流式细胞术分析 eGFP 表达。

[0580] 对于 DC 转导实验, 在分化第 6 天, 将 500000 个 FLT3L 产生的骨髓衍生的 DC (FL-DC) 用浓度范围为 50-300ng/ml 的慢病毒载体转导。转导后 2 天, 收获 FL-DC 并重悬于具有 2% FCS 及 0.01% 叠氮化钠的 PBS (染色缓冲液) 中。细胞用 APC (allophycocyanine) 缀合的抗 CD11c 抗体和 PerCP (Peridinin 叶绿素蛋白) 缀合的抗 B220 抗体染色, 洗涤 2 次, 在 FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 上经流式细胞术分析。

[0581] 小鼠免疫

[0582] 所有动物实验均符合巴斯德研究所 Office Laboratory of Animal Care 的指导。6 周龄 C57/BI6 小鼠用在 0.1ml 补加缓冲的 0.2% 牛血清白蛋白的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液盐水 (DPBS ;pH7.5) (DPBS/0.2% BSA, Sigma) 中的各种剂量的 TRIP/sE WNV 载体颗粒 (从 1 到 100ng/ml) 腹膜内 (i. p.) 接种。

[0583] 测量血清抗体应答

[0584] 小鼠经眶骨膜途径放血, 血清样品在 56°C 热灭活 30 分钟。经 ELISA 检测抗 WNV 抗体, 使用用蔗糖纯化的 WNV IS-98-ST1 包被的微滴定板。过氧化物酶山羊抗小鼠免疫球蛋白 (H+L) (Jackson Immuno Research) 以 1 : 4000 稀释度用作第二抗体。终点效价计算为引起来自非免疫小鼠的血清的光密度 (OD) 的两倍的最后稀释度的倒数。

[0585] WNV 攻击

[0586] 在慢病毒载体免疫后一周或两个月, 如前所述通过 i. p. 接种神经毒性 WNV 毒株 IS-98-ST1 (i. p. LD50 = 10FFU) 进行 WNV 攻击。攻击的小鼠每日监测发病率或死亡率迹象, 直至 WNV 毒株接种后 21 天。

[0587] 结果

[0588] 用整合缺陷的 TRIP 载体转导非分裂细胞导致高转基因表达水平

[0589] 为了测试整合缺陷性 LV (TRIP.NI 载体) 可以是输送抗原 (Ag) 至非分裂 APC 如 DC 的有效工具的假设, 我们最初评估了它们转导生长停滞细胞的效率。为此目的, 用细胞周期特异性抑制剂羟基脲处理的 HeLa 细胞被暴露于梯度剂量的编码 eGFP 的 TRIP.NI 或 TRIP.I 颗粒。转导效率然后经流式细胞术确定。如图 43 (上组) 所示, TRIP.NI 载体以高效率 and 剂量依赖方式转导非分裂细胞。另外, eGFP 阳性细胞百分比分析揭示 TRIP.NI 载体与 TRIP.I 载体相比转导能力的边际差异。用 TRIP.NI 颗粒转导也产生高水平转基因表达 (图 43, 下组), 尽管比 TRIP.I 转导的细胞显著低 2 倍。

[0590] TRIP 非整合慢病毒载体转导导致在常规和浆细胞样树突细胞中的有效抗原表达

[0591] 我们接下来研究了 TRIP.NI 载体转导 DC 的能力。DC 被分类为常规 (cDC) ($CD11c^+B220^-$) 和浆细胞样 (pDC) ($CD11c^+B220^+$), 这两个 DC 亚型均能刺激 Ag 特异性免疫应答。我们然后研究了在 Flt3L 存在下分化的骨髓衍生 DC (FL-DC) 的转导, 其允许产生大量 pDC 和 cDC。FL-DC 暴露于梯度剂量的 TRIP.NI_{GFP} 或 TRIP.I_{GFP} 颗粒。如图 44A 所示, TRIP.I 及 TRIP.NI 载体均能够诱导转导 FL-DC, 最大转导效率分别为 60% 及 56%。令人感兴趣地, 我们观测到用 TRIP.I 颗粒转导导致小比例表达高水平 eGFP 的 DC, 而用 TRIP.NI 进行的转导实验不这样 (见斑点印迹右上角中的斑点的存在, 在细胞已用本发明慢病毒载体转导的实验中, 与 HI 载体相比)。为了排除由污染载体原液的残余 eGFP 蛋白赋予的假转导的可能性, 我们还评估了在暴露于热处理前提供的颗粒后转导的 DC 的百分比, 热处理已表明废除了 LV 在不同细胞类型上的转导能力。如预期, 热处理显著降低了 eGFP 阳性细胞百分比 (图 2A)。

[0592] 我们接下来在 $CD11c^+B220^+$ 树突细胞和 $CD11c^+B220^-$ 树突细胞上 gated 以评估 LV 转导每种 DC 亚集的能力。如图 44B 所示, 不仅 FL 衍生的 cDC 而且 FL- 衍生的 pDC 也能有效用 LV 转导, 无论它们整合如何。

[0593] 用 TRIP.NI 颗粒的转导效率是剂量依赖性的, 比用 TRIP.I 颗粒获得的效率稍低但不显著低。令人感兴趣地, 我们观测到用 TRIP.I 载体转导导致小比例表达高水平转基因的 DC, 而暴露 DC 于 TRIP.NI 载体不这样 (图 44A)。这一细胞群仅在用 TRIP.I 载体进行的转导实验中观测到, 可能是多载体整合或者载体整合进这个基因组的活性转录区的结果。

[0594] TRIP 非整合慢病毒载体诱导产生 Ag 特异性抗体

[0595] 考虑 TRIP.NI 能有效输送外来基因至 DC, 我们进行了探索了它们引起特异性免疫应答的能力。在最近的研究中, 我们设计了编码分泌形式的 WNY 包膜 (TRIP.I E_{WNY}) 的 TRIP.I 载体, 所述包膜具有中和表位, 我们证实了 TRIP.I E_{WNY} 在 WNV 感染小鼠模型中可以刺激基于抗体的保护免疫。为研究 TRIP.NI 载体引起 B 细胞应答的能力, 用各种剂量的 TRIP.NI E_{WNY} 颗粒免疫动物, 所述剂量范围为每个小鼠 1-100ng p24 抗原。作为对照, 小鼠用 100ng 加热灭活 (HI) 除去转导能力的 TRIP.NI E_{WNY} 颗粒接种。免疫后 3 周, 小鼠眶骨膜放血, 个体或合并的血清经 ELISA 测试抗 WNY 总抗体。如预期, 用热灭活 TRIP.NI E_{WNY} 载体免疫未产生抗体 (图 45A)。相比之下, 用低至 10ng 剂量的 TRIP.NI E_{WNY} 载体免疫的小鼠也显示可检测水平的抗 WNY 抗体, 用 100ng sE-NILV 免疫诱导了大量抗 WNY Ig 的分泌, 平均效价达到 8×10^4 。

[0596] 我们接下来比较了由 TRIP.NI E_{WNY} 和 TRIP.I E_{WNY} 载体引起的免疫应答的强度。如

图 45B 所示,用低至 3ng 颗粒的剂量的 TRIP. I E_{WNY} 免疫产生非常高的抗 WNY 抗体的分泌,效价在 3-100ng 免疫剂量范围相对恒定,没有明显剂量应答。相比之下并且与所有预期相反,来自用 TRIP. NI E_{WNY} 载体免疫的小鼠的血清中的效价与注射的颗粒剂量成比例。尽管在低于 30ng 的剂量 TRIP. I 载体比 TRIP. NI 载体引起更高的免疫应答,但是用 100ng 每种载体免疫导致等价应答。

[0597] 总之,这些结果证实用 TRIP. NI 载体单次免疫足以引起体液特异性免疫应答,强度与用 TRIP. I 载体获得的相当,高于颗粒阈值剂量。令人感兴趣地及令人惊奇地,使用非整合载体能够获得强度依赖于注射的慢病毒载体的剂量的免疫应答。

[0598] 用单剂 TRIP. NisEwnv 免疫小鼠给出下列抗体效价:

[0599]

剂量	WNV 特异性抗体效价 (O. D.)
HI NI 100	0
NI 1	0
NI 3	0
NI 10	152
NI 30	569
NI 100	83000

[0600] 如图 45A 所示,获得了特异性 WNV 抗体的强分泌,在 100ng p24 抗原剂量平均效价达到 8×10^4 。在这个剂量,用 TRIP. NI 免疫导致用 TRIP. I 获得的等价的应答。但是剂量-应答实验揭示与 TRIP. NI 颗粒相比用 TRIP. I 颗粒诱导 B 细胞应答所需的最小剂量更低。这个结果的一个可能解释可能与 TRIP. I 载体产生 Ag 高表达 DC 的能力相关,因为理论上 Ag 在 DC 中的高表达水平可以有利于抗原肽的更长久的呈递,因此可以解释为什么低剂量 TRIP. I 颗粒足以引起特异性免疫应答。这个假设也可解释在用 TRIP. I 载体进行的剂量-应答免疫实验中观测到的 WNV 抗体产生的非线性(图 45B)。事实上,在 DC 上进行的体外剂量应答实验揭示了 Ag 高表达 DC 的出现看起来不与 TRIP. I 颗粒的剂量相关(图 44A)。因此,产生 Ag 高表达 DC 的能力可帮助解释用低剂量注射颗粒在 TRIP. I 和 TRIP. NI 之间观测到的差异。另一个可能性是与如下实施相关, VSV-G 假型包装的 LV 具有大的细胞嗜性,因此可在注射部位转导非 DC 的其它细胞类型,包括分裂细胞。这可导致在用 TRIP. I 颗粒进行的免疫实验中更持久的 Ag 表达。在体内注射 LV 后哪些细胞类型被转导及它们参与 TRIP. I 和 TRIP. NI 载体引起的免疫应答的幅度的程度是正在进行的研究的课题。

[0601] 用 TRIP. NI E_{WNY} 载体免疫赋予抗 WNV 攻击的早期保护

[0602] 我们先前显示 TRIP. I E_{WNY} 赋予抗 WNY 攻击的保护免疫。为确定由 TRIP. NI 载体引起的免疫应答是否也可以导致快速保护,小鼠用 100ng TRIP. NI E_{WNY} 颗粒免疫并在 7 天后用 10000FFU 的高毒力 WNY 毒株 IS-98-ST1(杀死 50%感染动物所需剂量的 1000 倍)攻击。

我们在这个攻击实验中还包括一组用 100ng TRIP. I E_{WNY} 免疫的小鼠作为保护的阳性对照及另一组用 D-PBS 接种的小鼠用作阴性对照。如预期,接受 D-PBS 的所有小鼠均在攻击后 12 天内死亡(图 46)。相反,用单剂 TRIP. NI E_{WNY} 免疫的小鼠被保护免受攻击,与用 TRIP. I E_{WNY} 免疫的小鼠一样。

[0603] 被保护免于 WNY 攻击的小鼠在 3 周攻击后观察期不出现临床疾病迹象。这些结果证实用单次给予整合缺陷的 TRIP. E_{WNY} 实现了抗 WNY 的早期保护免疫。

[0604] TRIP. NI E_{WNY} 诱导持久保护

[0605] 如早些时候证实,用 TRIP. I E_{WNY} 免疫小鼠导致建立抗 WNV 攻击的长期保护免疫。为评估由 TRIP. I E_{WNY} 引起的保护免疫的持续时间,以及诱导长期保护所需的颗粒最小剂量,用不同量的颗粒免疫小鼠(1、3、10、30 和 100ng p24 抗原)并在免疫后 2 个月等待期之后攻击。如图 47A 所示,在给予的 TRIP. I E_{WNY} 颗粒剂量与保护程度之间有剂量依赖关系,在 100ng 注射疫苗颗粒剂量实现完全保护。

[0606] 因此,TRIP. I E_{WNY} 载体诱导抗 WNV 感染的持久免疫。

[0607] 讨论

[0608] 本实验的重要结果是证实用 TRIP. NI 颗粒接种可以提供有效的强免疫应答,其是早期及长期持续的免疫应答,并且是进一步抗原剂量依赖性的,即使不存在给予的慢病毒基因组的整合。因此,证实了抗致死剂量 WNV 攻击的完全保护。

[0609] 如所预期,记忆保护免疫直接与由 TRIP. NI 颗粒诱导的抗 WNV 抗体效价相关(图 45 和图 47)。事实上,熟知体液免疫是建立抗 WNV 完全保护免疫的关键成分,因为特异性抗体限制感染的传播。令人感兴趣地,热灭活的 TRIP. NI 颗粒及 HI-TRIP. I 颗粒能够赋予抗 WNV 攻击的部分保护(30%)(数据未示出),尽管在注射 HI-TRIP 颗粒 3 周后动物血清中未检测到 WNV 抗体(图 45A,B)。这提示细胞免疫也可以在建立抗 WNV 保护中起部分作用。与这一假设相符,缺乏 CD8⁺ 细胞的小鼠在 WNV 感染后死亡率增加(Shoresta and Diamonds, 未公开数据)。另外,细胞毒性 T 细胞表位已在几种黄病毒包膜的结构域 III 中被限定。需要另外的工作以澄清 CTL 应答对由 TRIP. NI 及 TRIP. I 疫苗赋予的长期保护的相对贡献。另外,还需要进一步研究以限定允许 HI-TRIP 颗粒进入 DC 的分子学机制,因为热处理变性 VSV-G 包膜并示出废除了 LV 在不同细胞系中的转导能力。但是尝试推测,关于 DC 的优异的内化能力,一部分 HI-TRIP 颗粒可以通过 VSV-G 不依赖性机制掺入 DC 中,使得低的但足够的 Ag 表达,从而接受由 HI-TRIP 颗粒赋予的部分保护。

[0610] 对接种小鼠的动力学攻击实验揭示 TRIP. NI 疫苗不仅赋予长期保护免疫而且早在单次注射颗粒后一周就引起保护。尽管这一早期保护涉及的精确机制不完全了解,但是在用 TRIP. NI 和 TRIP. I 颗粒免疫后一周我们检测了特异性 WNV 抗体。我们先前示出这一早期抗体波仅由特异性 IgM 组成,衍生自注射后 4 天的小鼠,完全保护小鼠抗 WNV 感染。

[0611] 在我们的研究中,基于直接注射单剂 TRIP. NI 颗粒的免疫方案引起强的、快速的长期特异性免疫应答,实现抗 WNV 的完全保护。因此,基于 TRIP. NI 的疫苗策略代表了安全有效平台,用于开发抗病原体如黄病毒的需要 B 细胞免疫的疫苗。

[0612] 密码子优化使得改善非整合载体的细胞免疫应答,进一步改善用初免 - 加强方案获得

[0613] 材料和方法

[0614] gag p27 的细胞内染色. 293T 细胞用含有 gag Δ myr 的野生型序列或密码子优化序列的 TRIP 载体和包壳质粒 p8.7 D64V 及 VSV-G Indiana 表达质粒共转染。48 小时后, 洗涤细胞并在 Cytotfix-Cytoperm 溶液 (BD Pharmingen) 中透化 20 分钟。用 PermWash 缓冲液 (BD Pharmingen) 洗涤 2 次后, 透化细胞与在 PermWash 缓冲液中 1 : 3 稀释的抗 gagSIV p27 抗体 (55-2F12, AIDS Research and Reference Reagent Program) 在 4°C 保温 30 分钟。洗涤细胞 2 次, 并与在 PermWash 缓冲液中 1 : 30 稀释的 FITC 缀合的大鼠 IgG2b kappa 单克隆抗体 (553988, BD Biosciences) 4°C 保温 30 分钟。2 次洗涤后, 细胞经流式细胞术分析。

[0615] 小鼠免疫. 对于初免实验, 各组小鼠腹膜内接种各种剂量的用来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的 TRIP.NI gag Δ myr 野生型或密码子优化 (CO) 颗粒。对于初免-加强实验, 各种小鼠腹膜内接种 100ng 的 TRIP.NI gag Δ myr 密码子优化 (CO) 的 p24 或 100ng 的用来自 VSV Indiana 血清型的糖蛋白假型包装的 TRIP. I gag Δ myr 颗粒的 p24。13 周后, 用 TRIP.NI gag Δ myr CO 颗粒初免的小鼠用 100ng 的用来自 VSV New Jersey 血清型的糖蛋白假型包装的 TRIP.NI gag Δ myr CO 颗粒的 p24 加强。平行地, 用 TRIP. I gag Δ myr 颗粒初免的小鼠用 100ng 的用来自 VSV New Jersey 血清型的糖蛋白假型包装的 TRIP. I gag Δ myr 颗粒的 p24 加强。

[0616] Elispot 测定. 硝基纤维素微滴板 (MAHA S4510, Millipore) 用捕获抗体 (Mouse IFN γ Elispot pair, BD Pharmingen) 包被并用由 RPMI 1640 Glutamax 组成的完全培养基封闭, 该培养基补加 10% FCS、抗生素、Hepes、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇和丙酮酸钠。来自载体免疫的小鼠的脾细胞以三份重复加入平板中, 0.25x10⁶ 细胞/孔, 并用 SIVmac 293 gag 肽 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) 刺激。40 小时后, 用生物素缀合抗体 (Mouse IFN γ Elispot pair, BD Pharmingen) 随后链霉抗生物素蛋白-AP (Roche) 和 BCIP/NB 底物溶液 (Promega) 揭示斑点。斑点用 Bioreader 2000 (Biosys, Karben, Germany) 计数, 结果表达为每 1 百万个脾细胞中 IFN γ 斑点形成细胞 (SFC) 数。

[0617] 体内细胞毒性测定. 对于靶细胞制备, 将来自首次实验小鼠的脾细胞用各种浓度 (高, 5 μ M; 低, 1 μ M) 的 CFSE (carboxyfluorescein-diacetatesuccinimide ester, Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit, Molecular Probes) 标记。用高浓度 CFSE 标记的脾细胞用 5 μ g/ml 的肽脉冲。用低剂量 CFSE 染色的对照群体在无肽培养基中保温。每个小鼠经眶后静脉接受含有来自每一级分相等数目细胞的混合物的 10⁷ CFSE 标记的细胞。15-18 小时后, 来自脾的单细胞悬浮液经流式细胞术分析 (Becton Dickinson, CellQuest software)。肽脉冲细胞的消失通过比较免疫的小鼠和首次实验小鼠的脉冲的 (高 CFSE 荧光强度) 与未脉冲 (低 CFSE 荧光强度) 群体的比率而确定。特异杀伤百分比经下列计算建立: $(1 - ((CFSE_{低} \text{首次实验的} / CFSE_{高} \text{首次实验的}) / (CFSE_{低} \text{免疫的} / CFSE_{高} \text{免疫的}))) * 100$ 。

[0618] 四聚体染色. 来自免疫小鼠的 2x10⁶ 脾细胞用抗 CD3-FITC (Becton Dickinson)、抗 CD8-APC (Becton Dickinson) 和特异于 GAG_{SIV} 免疫显性肽的 PE-四聚体在室温染色 5 分钟。用 FACSCalibur 收集数据并用 CellQuest 分析。

[0619] 结论

[0620] 本发明提供了改善由非整合慢病毒载体诱导的细胞免疫应答的解决方案, 其使用:

[0621] 1. 编码抗原的转基因的密码子优化形式和 / 或

[0622] 2. 初免 - 加强方案。

[0623] 1. 我们证实编码 gagdmyr_{SIV} 野生型抗原的非整合慢病毒载体在诱导特异性 T 细胞应答方面比编码相同抗原的整合慢病毒载体强度差很多。更重要地,我们证实这一差免疫原性可以通过使用编码 Gagdmyr_{SIV} 的转基因的密码子优化形式克服。非整合慢病毒载体绝对需要密码子优化抗原诱导强 T 细胞应答不能预见。这个结果是出乎意料的,因为我们证实非整合载体能有效转导非分化细胞特别是最有效的抗原呈递细胞树突细胞,整合慢病毒载体也是一样。但是,非密码子优化的转基因的表达在用非整合慢病毒载体转导的细胞中比用整合慢病毒载体转导的细胞低 2 倍。这个结果提示在体内,由非整合慢病毒载体诱导的应答与由整合慢病毒载体诱导的应答相比可以低 2 倍,可以预见注射两次更多的非整合慢病毒载体可以给出与整合慢病毒载体获得的类似应答。这绝对不是这样,因为由非整合慢病毒载体引起的特异性 T 细胞应答比用整合慢病毒载体观测的低 5-10 倍。另外,用非整合慢病毒载体诱导特异性 T 细胞应答仅可以通过用高剂量注射颗粒实现(用非整合慢病毒载体诱导可定量 T 细胞应答所需的最小剂量比用整合慢病毒载体所需的最小剂量至少高 10 倍)。密码子优化(CO)克服了这一不良免疫原性。因此,在 100ng 剂量,携带密码子优化形式的 gagdmyr_{SIV} 的非整合慢病毒载体诱导针对抗原的记忆 T 细胞应答,而携带野生型形式的载体不诱导。但是,由 TRIP.NI gagdmyr_{SIV} CO 引起的应答仍然比由 TRIP.Igagdmyr_{SIV} 野生型引起的低 2 倍。

[0624] 2. 基于 TRIP.NI gagdmyr_{SIV} CO 的初免 - 加强方案引起在强度方面与基于 TRIP.I gagdmyr_{SIV} 野生型的初免 - 加强方案类似的应答。在初免 - 加强实验中,小鼠用 100ng TRIP.NI gagdmyr_{SIV} CO 或 100ng TRIP.I gagdmyr_{SIV} 野生型免疫。慢病毒载体用 VSV-G Indiana 包膜假型包装。13 周后,用 TRIP.NI 颗粒免疫的小鼠用 100ng 用非交叉反应性 VSV-G New Jersey 包膜假型包装的 TRIP.NI gagdmyr_{SIV}CO 颗粒加强。平行地,用 TRIP.I 颗粒初免的小鼠用 100ng 用 VSV-G New Jersey 包膜假型包装的 TRIP.I gagdmyr_{SIV} 野生型加强。在来自免疫小鼠的脾细胞上进行的 Gagdmyr_{SIV} 特异性免疫应答的分析(IFN γ ELISPOT,四聚体染色)揭示基于 TRIP.NI gagdmyr_{SIV} CO 的初免 - 加强方案引起在幅度方面与基于 TRIP.I gagdmyr_{SIV} 野生型颗粒的初免 - 加强方案类似的应答。这个结果未被公开,不能预见,因为用 TRIP.NI gagdmyr_{SIV}CO 颗粒单次注射引起比用 TRIP.I gagdmyr_{SIV} 野生型单次注射低的应答。

[0625] 不同血清型 VSV-G 包膜蛋白用于假型包装慢病毒载体颗粒的用途

[0626] Indiana 血清型的水泡性口炎病毒 G 糖蛋白(VSV-G)是通常用作外壳蛋白工程化慢病毒载体的跨膜蛋白。

[0627] 目前,有 9 个病毒物种确定分类在 VSV 类别,19 个弹状病毒被临时分类在这个类别,所有均显示不同程度的交叉中和作用。当被测序时,蛋白 G 基因显示序列相似性。VSV-G 蛋白具有 N-末端胞外域、跨膜区和 C 末端胞质尾区。其经过高尔基体外侧网络(内质网和高尔基体)输出到细胞表面。

[0628] 已产生密码子优化基因并克隆在 pThV 载体的 BamHI 和 EcoRI 位点之间,产生 pThV-VSV.G(IND-CO)(图 6)。密码子优化用于在人细胞中表达 VSV-G 蛋白可以刺激基因转移效率 100 倍,如在 New Jersey 血清型中所示(图 20)。我们进一步显示在假型慢病毒载

体颗粒的特殊环境中的几种血清型的 VSV-G 蛋白在体内注射后不诱导交叉中和抗体。

[0629] 当需要进一步的 VSV-G 血清型以设计合适组合用于包括至少一个加强注射的疫苗测定中时,已测试其它 VSV-G 血清型的颗粒包被。第一个使用的是 VSV-G_{NewJersey} 血清型。合成密码子优化的基因,并克隆在 pThV 质粒的 BamH1 和 EcoR1 位点之间,产生 pThV-VSV. G(NJ-CO) 载体(图 7)。

[0630] 目前,5 个其它 VSV-G 基因被测序(鲤鱼病毒的 Chandipura, Cocal, Piry, Isfahan 和 spring 病毒血症,图 3),并制备为密码子优化版本。

[0631] 材料和方法

[0632] 1. 材料

[0633] 1.1 质粒

[0634] 针对 5 个鉴定的 VSV-G 血清型由 Gene Art AG(Germany) 产生密码子优化的基因。这些基因克隆在 pThV 质粒的 BamH1 和 EcoR1 位点之间,产生下列载体:pThV-VSV. G(CHANDI-CO; 图 8), pThV-VSV. G(COCAL-CO; 图 9), pThV-VSV. G(PIRY-CO; 图 10), pThV-VSV. G(ISFA-CO;图 11), pThV-VSV. G(SVCV-CO;图 12)。

[0635] 2. 方法

[0636] 2.1 交叉中和作用测定

[0637] C57BI/6 小鼠(单元型 H2b, 12-23 周龄之间)用经 VSV-G 血清型假型包装的慢病毒载体颗粒腹腔内注射(Indiana、New Jersey、Isfahan、Cocal 和 SVCV, 每组 6 个小鼠, 450 μ l/ 小鼠)。4 周后,小鼠用相同颗粒加强(500 μ l/ 小鼠)。在加强后 15 天进行第一次眶后采血(于 Capiject 试管中),在加强后 21 天进行第二次。血液在 3500rpm 离心 6 分钟,收集血清并在 -20°C 保持。转导测定在存在各种稀释度的这些血清存在下进行。

[0638] 2.2 人单核细胞衍生 DC 的产生

[0639] 从法国血库(EFS-Rungis)获得血沉棕黄层,所有对象知情同意并符合伦理指导。经 Ficoll 密度离心分离 PBMC。单核细胞通过粘附在组织培养物处理的平板上富集。粘附步骤后,在含有 10% FCS、青链霉素(Penistrptomycine)、丙酮酸 0.1mM+Hepes 1mM 并补加粒细胞-巨噬细胞 rhGM-CSF(50ng/ml, R&D systems) 和 rIL-4(20ng/ml, R&D systems) 的 RPMI 培养基中培养细胞。4 天后这一培养基用含有 rhGM-CSF(50ng/ml) 和 rIL-4(20ng/ml) 的新鲜培养基置换。在第 7 天,细胞表型分型并用慢病毒载体转导。转导后 2 小时加入含有 rhGM-CSF 和 rIL-4 的 RPMI(INVITROGEN) 培养基。在转导后 5 天收集细胞并用 LSR II 流式细胞术(Becton Dickinson) 分析。DC 表达的 GFP 在荧光素异硫氰酸酯通道经流式细胞术直接检查。

[0640] 2.3 人单核细胞衍生 DC 的表型分析

[0641] 为进行表型分析,DC(1×10^6 细胞于 100 μ l 中)在室温与浓度为 0.1 μ g/ μ l 的用 FITC 或 PE 标记的抗 CD14、CD86、CD1a 和 HLA-dr 抗体(BectonDickinson) 保温 5 分钟。染色细胞用 LSR II 流式细胞术分析(BectonDickinson)。

[0642] 结果

[0643] 1. 不同 VSV-G 血清型的假型包装能力的评估

[0644] 针对 5 种鉴定的 VSV-G 血清型已经产生人密码子优化基因并克隆在 pThV 质粒中,产生了下述载体:pThV-VSV. G(CHANDI-CO), pThV-VSV. G(COCAL-CO), pThV-VSV.

G(PIRY-CO), pThV-VSV. G (ISFA-CO) 和 pThV-VSV. G (SVCV-CO), (图 8-12)。这些包膜质粒用于慢病毒载体颗粒产生, 它们的假型包装能力通过确定载体效价 (TU/ml) 而评估。如图 50 所述, 除了 VSV-G Indiana 和 New Jersey 之外, 5 种 VSV-G 蛋白中仅 3 种能有效假型包装我们的载体颗粒: Cocal、Isfahan 和 SVCV 血清型。最佳效价用 Indiana 血清型观测到 (野生型和密码子优化蛋白之间未能观测到显著差异)。其它血清型给出 Indiana 效价的 54% (New Jersey)、25% (Cocal)、22% (SVCV) 和 7% (Isfahan)。

[0645] Chandipura 和 Piry VSV-G 血清型均给出仅 Indiana 效价的 0.07%。看起来它们非常低的融合活性阻止它们有效用于假型包装我们的慢病毒载体颗粒, 因为它们不能转导足够的靶细胞。Chandipura VSV-G 蛋白的低效率可以解释报道的其在 VSV-G 假型包装的复制缺陷性人免疫缺陷病毒颗粒环境中缺乏加强免疫应答的能力 (Baliga CS, et al, Molecular Therapy, 2006)。

[0646] 2. 交叉中和作用测定

[0647] 鉴定我们的 VSV-G 蛋白产生中和抗体的能力及检查这些抗体是否潜在中和异源 VSV-G 血清型可能有助于确定假型包装的载体在接种试验中注射的优选顺序。

[0648] 用有效的 VSV-G 蛋白 (Indiana, New Jersey, Cocal, Isfahan 和 SVCV) 假型包装的慢病毒载体颗粒注射 C57BI/6 小鼠 2 次, 注射之间间隔 4 周。第二次注射后 15 天, 从小鼠收集血液, 测试其中和用各种 VSV-G 蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒的能力。如图 51 和 52 所示, VSV-G Indiana、New Jersey、SVCV 和 Isfahan 假型不诱导可检测的抗任何其它 VSV-G 蛋白的抗体。因此, 它们可以以任何顺序用于第一次注射。相反, 抗 Cocal 抗体强烈抑制 Indiana 和 SVCV 假型包装颗粒。因此, 如果使用, 则 Cocal 假型包装颗粒应用于最后注射, 以避免任何中和反应抑制接种效果。总之, 当各种被测试 VSV-G 蛋白相继用于初免 - 加强方案中时, 假型包装颗粒的组合应特别考虑如下事实, 即 VSV-G 假型包装颗粒应以如下顺序注射: Indiana-New Jersey-Isfahan-SVCV/Cocal。

[0649] 3. 猴和人血清中的抗体优势

[0650] 人血清中能中和 VSV-G 蛋白的抗体的存在应在使用它们假型包装我们的载体颗粒之前确定。为了评估可用人血清获得的中和应答的强度, 我们首先决定测试在各种猴血清存在下用选择的 VSV-G 蛋白假型包装的我们的颗粒, 猴血清得自我们的试验中使用的动物。因此我们从 4 只猴采集血清 (一只未接种, 三只用各种剂量的用 VSV-G Indiana 假型包装的颗粒接种 - 低、中和和高剂量 - 并用独特剂量的 VSV-G New Jersey 假型包装颗粒加强), 在各种时间采集 (注射前、初免后及加强后)。这些猴血清中和用选择的 VSV-G 蛋白 (Indiana, New Jersey, Cocal, Isfahan 和 SVCV) 假型包装的颗粒的能力随后被测试, 结果分别示于图 53-57。如预期的, 在来自用 Indiana 假型包装颗粒 (图 53) 接种的猴的血清中发现剂量依赖方式的抗 VSV-G Indiana 的强中和活性, 在来自用 New Jersey 假型包装颗粒加强的猴的血清中还发现抗 New Jersey 颗粒 (图 54)。因此, 我们可以看出同源中和活性特征在于 IC50 大约 1/1024 血清稀释度 (50% 总活性用 1/1024 血清稀释度获得)。在图 55 中, 我们可以看出抗 VSV-G Cocal 血清型的中和活性由接受高剂量 Indiana 颗粒的猴特异发生 (这一应答用低剂量 Indiana 颗粒未观测到)。然而, 在来自免疫前或接种的猴的血清中未发现特异的抗 Isfahan 或 SVCV 血清型的中和活性 (图 56 和 57)。

[0651] 在人血清中能中和 VSV-G 蛋白的抗体的存在随机选择的 96 个人血清中确定。

用所选择的 VSV-G 蛋白假型包装的慢病毒载体颗粒进行的转导实验在人血清（加热及未加热的）存在下进行。图 58 总结的结果（实验细节在图 59 中示出）显示一些患者的血清表明抗 VSV-G 蛋白的强中和活性（2 个患者抗 Indiana, 4 个患者抗 New Jersey, 3 个患者抗 Cocal）。为了确定这种中和活性是同源的或者是非特异性的, 进一步研究这些患者, 在这些血清的系列稀释液存在下进行用不同 VSV-G 假型包装的颗粒的转导测定。如图 60 所示, 在他们的血清的 2 倍稀释液存在下显示抗 VSV-G Indiana 的中和活性的患者（患者 #39、47、54、83、94 和 99）在进一步稀释倍数下不再显示这一中和活性。相同观测在先前显示抗 New Jersey VSV-G 蛋白的中和活性的患者（患者 #7、9、63、70、84 和 88）、抗 SVCV VSV-G 蛋白的中和活性的患者（患者 #10、78、94、39、84 和 98）、抗 Isfahan VSV-G 蛋白的中和活性的患者（患者 #10、79、9、94、70、84 和 98）中可见。相反, 在显示抗 Cocal VSV-G 蛋白的中和活性的患者（患者 #9、57、67、80、88、88、54、62、69、83 和 93）中, 2 个患者在高血清稀释度下仍显示中和活性（患者 #67 和 69）, IC50 在大约 1/512 血清稀释度。这些结果表明如果 Cocal 血清型用于假型包装我们的慢病毒载体颗粒则可能需要确定患者中抗 Cocal 优势。

[0652] 4. 用经不同 VSV-G 包膜假型包装的载体颗粒转导人单核细胞衍生树突细胞

[0653] 在本发明推荐的接种方案中, 用 Indiana VSV-G 假型包装的慢病毒载体首先被注射以引发免疫学反应。为了加强该免疫学反应, 用一种先前描述的 VSV-G 血清型假型包装的慢病毒载体用于慢病毒载体颗粒的第二次注射。树突细胞在先天及继承性免疫中起中心作用。因此, 我们鉴定了用不同 VSV-G 蛋白假型包装的载体颗粒与人 DC 融合的能力。因此, 人单核细胞衍生的树突细胞 (mDC) 用经各种 VSV-G 蛋白 (New Jersey, Isfahan, SVCV, Cocal 或 Chandipura) 假型包装的慢病毒载体转导, 导致确定对不同颗粒的效价 (TU/mL), 其与每种 VSV-G 的融合性 (fusogenicity) 直接相关。

[0654] 另外, 在 293T 细胞上经典进行的载体颗粒的效价也被鉴定以建立转导的相关效价 (效价 DC/ 效价 293T)。实验证实所有测试的 VSV-G 包膜均显示与 mDC 融合的相对能力, 显著的例外是 VSV-G 的 Chandipura 血清型 (图 61)。VSV-G Indiana 看起来与其它测试的相比是最融合的包膜。然而, VSV-G New Jersey、Isfahan、SVCV 和 Cocal 也显示与 mDC 融合的良好能力。考虑不同的包膜, 2 个不同实验提供的数据 (图 61) 显示相同模式的融合性, 而无论相对效价值 (DC 效价 / 293T 效价) 如何。这是由于在转导时使用的 mDC 的生理状态的差异所致。

[0655] 参考文献

[0656] Addo, M. M., Yu, X. G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R. L., Strick, D., Johnston, M. N., Corcoran, C., Wurcel, A. G., Fitzpatrick, C. A., et al. (2003). Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 77, 2081-2092.

[0657] Andrieu, J. M., and Lu, W. (2007). A dendritic cell-based vaccine for treating HIV infection: background and preliminary results. *J Intern Med* 261, 123-131.

[0658] Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S.,

Rutherford, S. , Prevost, M. C. , Allen, T. D. , and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNAFlap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclearpore. *Embo J* 26,3025-3037.

[0659] Autran, B. , Carcelain, G. , Combadiere, B. , and Debre, P. (2004). Therapeuticvaccines for chronic infections. *Science* 305,205-208.

[0660] Autran, B. , Carcelain, G. , Li, T. S. , Blanc, C. , Mathez, D. , Tubiana, R. , Katlama, C. , Debre, P. , and Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviraltherapy on CD4₊ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*277,112-116.

[0661] Andreas Bergthaler, Nicolas U, Gerber, Doron Merkler, Edit Horvath, Juan Carlos dela Torre, Daniel D.Pinschewer,3-PloS Pathogens Vol. 2, No.6, e51, EnvelopeExchange for the Generation of Live-Attenuated Arenavirus Vaccines

[0662] Betts, M. R. , Nason, M. C. , West, S. M. , De Rosa, S. C. , Migueles, S. A. , Abraham, J. , Lederman, M. M. , Benito, J. M. , Goepfert, P. A. , Connors, M. , et al. (2006). HIVnonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8₊ T cells. *Blood* 107,4781-4789.

[0663] Breckpot, K. , Dullaers, M. , Bonehill, A. , van Meirvenne, S. , Heirman, C. , de Greef, C. , van der Bruggen, P. , and Thielemans, K. (2003). Lentivirally transduced dendriticcells as a tool for cancer immunotherapy. *J Gene Med* 5,654-667.

[0664] (3)Breckpot, K. , Aerts, J. L. & Thielemans, K. Lentiviral vectors for cancerimmunotherapy :transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther* Esslinger, C. , Chapatte, L. , Finke, D. , Miconnet, I. , Guillaume, P. , Levy, F. , andEsslinger, C. , Chapatte, L. , Finke, D. , Miconnet, I. , Guillaume, P. , Levy, F. , and S. , MacDonald, H. R. (2003). In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs bialand induces efficient CD8(+)T cell responses. *J Clin Invest* 111,1673-1681. NatFirat, H. , Garcia-Pons, F. , Tourdot, S. , Pascolo, S. , Scardino, A. , Garcia, Z. , Michel, M. L. , Jack, R. W. , Jung, G. , Kosmatopoulos, K. , et al. (1999). H-2 class I knockout, and HLA-A2.1-transgenic mice :a versatile animal model for preclinical evaluation of **3iol** antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 29, 3112-3121.

[0665] Firat H. et al. *The Journal of Gene Medicine* 2002 ;4 :38-45

[0666] Frank, I. , Santos, J. J. , Mehlhop, E. , Villamide-Herrera, L. , Santisteban, C. , Gettie, A. , Ignatius, R. , Lifson, J. D. , and Pope, M. (2003). Presentation of exogenous wholeinactivated simian immunodeficiency virus by mature dendritic cells induces CD4₊ J. , and CD8₊T-cell responses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34, 7-19. **1-1**;

[0667] Fredericksen B. L. et al. *J. Virol.* (1995)69 :1435-1443

[0668] Gauduin, M. C. , Yu, Y. , Barabasz, A. , Carville, A. , Piatak, M. , Lifson, J. D. , **1 of** Desrosiers, R. C. , and Johnson, R. P. (2006). Induction of a virus-specific

effector-memory CD4⁺T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med* 203, 2661-2672.

[0669] Girard, M. P., Osmanov, S. K., and Kieny, M. P. (2006). A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 24, 4062-4081.

Goulder, P. J., and Watkins, D. I. (2004). HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 4, 630-640.

[0670] Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Meibohm, A., Condra, J. H., and Valentine, F. T., McMahon, D., Gonzalez, C., Jonas, L., et al. (2000). 3-year virologic suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Ann Intern Med* 133, 35-39.

[0671] Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Dev Cell* 5, 421-430.

[0672] He, Y., & Falo, L. D., Jr. Lentivirus as a potent and mechanistically distinct vector for genetic immunization. *Curr Opin Mol Ther* 9, 439-46 (2007).

[0673] Esslinger, C., Chapatte, L., Finke, D., Miconnet, I., Guillaume, P., Levy, F., and MacDonald, H. R. (2003). In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J Clin Invest* 111, 1673-1681.

[0674] Firat, H., Garcia-Pons, F., Tourdot, S., Pascolo, S., Scardino, A., Garcia, Z., Michel, M. L., Jack, R. W., Jung, G., Kosmatopoulos, K., et al. (1999). H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 29, 3112-3121.

[0675] Firat H. et al. *The Journal of Gene Medicine* 2002 ;4 :38-45

[0676] Frank, I., Santos, J. J., Mehlhop, E., Villamide-Herrera, L., Santisteban, C., Gettie, A., Ignatius, R., Lifson, J. D., and Pope, M. (2003). Presentation of exogenous whole inactivated simian immunodeficiency virus by mature dendritic cells induces CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34, 7-19.

[0677] Fredericksen B. L. et al. *J. Virol.* (1995) 69 :1435-1443

[0678] Gauduin, M. C., Yu, Y., Barabasz, A., Carville, A., Piatak, M., Lifson, J. D., Desrosiers, R. C., and Johnson, R. P. (2006). Induction of a virus-specific effector-memory CD4⁺ T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med* 203, 2661-2672.

[0679] Girard, M. P., Osmanov, S. K., and Kieny, M. P. (2006). A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 24, 4062-4081. Goulder, P. J., and Watkins, D. I. (2004). HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 4, 630-640.

[0680] Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Meibohm, A., Condra, J. H.,

Valentine, F. T., McMahon, D., Gonzalez, C., Jonas, L., et al. (2000). 3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Ann Intern Med* 133, 35-39.

[0681] Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.

[0682] He, Y. & Falo, L. D., Jr. Lentivirus as a potent and mechanistically distinct vector for genetic immunization. *Curr Opin Mol Ther* 9, 439-46 (2007).

[0683] Hel, Z. et al. improved vaccine protection from simian AIDS by the addition of nonstructural simian immunodeficiency virus genes. *J Immunol* 176, 85-96 (2006).

[0684] Iglesias, M. C., Mollier, K., Beignon, A. S., Souque, P., Adotevi, O., Lemonnier, F., and Charneau, P. (2007). Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. *Mol Ther* 15, 1203-1210.

[0685] Iglesias, M. C. et al. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J Gene Med* 8, 265-74 (2006).

[0686] Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., et al. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189, 991-998.

[0687] Karlsson, I. et al. Dynamics of T-cell responses and memory T cells during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques. *J Virol* 81, 13456-68 (2007).

[0688] Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., et al. (2007). CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13, 46-53.

[0689] Koff, W. C., Johnson, P. R., Watkins, D. I., Burton, D. R., Lifson, J. D., Hasenkrug, K. J., McDermott, A. B., Schultz, A., Zamb, T. J., Boyle, R., and Desrosiers, R. C. (2006). HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines. *Nat Immunol* 7, 19-23.

[0690] Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68, 4650-4655.

[0691] Gallione, C. J. and Rose, J. K. - *J. Virol.* 46(1), 162-169.

[0692] Georgel, P. et al. Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates

a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* 362, 304-13 (2007).

[0693] Iglesias, M. C. et al. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. *Mol Ther* 15, 1203-10 (2007).

[0694] Iglesias MC, et al, A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective protective humoral immunity against West Nile virus. *J. Gene Med.* 2006 Mar ;8(3) :265-274.

[0695] Iglesias MC et al, Polyepitopes Induce Broad CTL Responses In Vivo. *Mol Ther.* 2007 Jun, 15(6) :1203-10.

[0696] Isidoro Martinez and Gail W. Wertz, *The Journal of Virology*, Mar. 2005, p. 3578-3585 Vol. 79, No. 6, Biological Differences between Vesicular Stomatitis Virus Indiana and New Jersey Serotype Glycoproteins: Identification of Amino acid Residues Modulating pH-Dependent Infectivity

[0697] Kiepiela, P. et al. CD8₊ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13, 46-53 (2007).

[0698] Letvin, N. L. et al. Preserved CD4₊ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 312, 1530-3 (2006).

[0699] Mattapallil, J. J. et al. Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med* 203, 1533-41 (2006).

[0700] zur Megede, J. et al. Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 74, 2628-35 (2000).

[0701] Mellors, J. W. (1996). Closing in on human immunodeficiency virus-1. *Nat Med* 2, 274-275.

[0702] Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., et al. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 24, 687-696.

[0703] Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., and Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-860.

[0704] Pichlmair, A. et al. Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-Uke receptor 9. *J Virol* 81, 539-47 (2007).

[0705] Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* 65, 532-536.

- [0706] Reimann, K. A. , Parker, R. A. , Seaman, M. S. , Beaudry, K. , Beddall, M. , Peterson, L. , Williams, K. C. , Veazey, R. S. , Montefiori, D. C. , Mascola, J. R. , et al. (2005).
- [0707] Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses. *J Virol* 79, 8878-8885.
- [0708] Rose, N. F. , et al. An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell* 106, 539-49 (2001).
- [0709] Nina F. Rose, Anjeanette Roberts, Linda Buonocore, and John K. Rose, *The Journal of Virology*, Dec. 2000, p. 10903-10910 Vol. 74, No. 23, Glycoprotein Exchange Vectors based on Vesicular Stomatitis Virus Allow Effective Boosting and Generation of Neutralizing Antibodies to a Primary Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1
- [0710] Nina F. Rose, Preston A. Marx, Amara Luckay, Douglas F. Nixon, Walter J. Moretto, Sean M. Donahoe, David Montefiori, Anjeanette Roberts, Linda Buonocore, and John K. Rose, *Cell*, Vol. 106, 539-549, September 7, 2001, An Effective AIDS Vaccine Based on Live Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Recombinants
- [0711] Nishimura N. et al (PNAS(2002)99 :6755-6760
- [0712] Rosenberg, E. S. , Altfeld, M. , Poon, S. H. , Phillips, M. N. , Wilkes, B. M. , Eldridge, R. L. , Robbins, G. K. , D' Aquila, R. T. , Goulder, P. J. , and Walker, B. D. (2000). Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 407, 523-526.
- [0713] Saag, M. S. (1997). Use of virologic markers in clinical practice. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16 Suppl 1, S3-13.
- [0714] Sacha, J. B. , Chung, C. , Rakasz, E. G. , Spencer, S. P. , Jonas, A. K. , Bean, A. T. , Lee, W. , Burwitz, B. J. , Stephany, J. J. , Loffredo, J. T. , et al. (2007). Gag-specific CD8⁺ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J Immunol* 178, 2746-2754.
- [0715] Schoenly, K. A. & Weiner, D. B. HIV-1 Vaccine Development : Recent Advances in the CTL Platform " Spotty Business " . *J Viral* (2007).
- [0716] Steven AC. And Spear PG, Viral Glycoproteins and an Evolutionary Conundrum.
- [0717] Tonks, A. (2007). Quest for the AIDS vaccine. *Bmj* 334, 1346-1348.
- [0718] Trkola, A. , Kuster, H. , Rusert, P. , Joos, B. , Fischer, M. , Leemann, C. , Manrique, A. , Huber, M. , Rehr, M. , Oxenius, A. , et al. (2005). Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* 11, 615-622.
- [0719] VandenDriessche T. et al. *Blood*, 1 August 2002-vol. 100, n° 3, p. 813-822
- [0720] Vargas, J. , Jr. , Gusella, G. L. , Najfeld, V. , Klotman, M. E. , and Cara, A. (2004). Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene*

Ther 15,361-372.

[0721] Weber, J. (2001). The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull* 58, 61-72.

[0722] Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373,117-122.

[0723] Wilson, N. A. et al. Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J Virol* 80,5875-85 (2006).

[0724] Wiseman, R. W., Wojcechowskyj, J. A., Greene, J. M., Blasky, A. J., Gopon, T., Soma, T., Friedrich, T. C., O'Connor, S. L., and O'Connor, D. H. (2007). Simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection of major histocompatibility complex-identical cynomolgus macaques from Mauritius. *J Virol* 81,349-361.

[0725] Yee J. et al, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,9564-9568.

[0726] Zarei, S., Abraham, S., Arrighi, J. F., Haller, O., Calzascla, T., Walker, P. R., Kundig, T. M., Hauser, C., and Piguet, V. (2004). Lentiviral transduction of dendritic cells confers protective antiviral immunity in vivo. *J Virol* 78,7843-7845.

[0727] Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101,173-185.

[0728] Valentine, F. T., McMahon, D., Gonzalez, C., Jonas, L., et al. (2000). 3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Ann Intern Med* 133,35-39.

[0729] Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302,415-419.

[0730] He, Y. & Falo, L. D., Jr. Lentivirus as a potent and mechanistically distinct vector for genetic immunization. *Curr Opin Mol Ther* 9,439-46 (2007).

CAEV

GTTCCAGCCACAATTTGTGCTGTAGAATCAGCCATAGCAGCAGCCCTAGTCGC
CATAAATATAAAAAGAAAGGGTGGGCTGGGGACAAGCCCTATGGATATTTTTAT
ATATAATAAAGAACAGAAAAGAATAAATAATAATAATAATAAAAATTCTCAAAA
AATTCAATTCTGTTATTACAGAATAAGGAAAAGAGGAC (SEQ ID NO:1)

EIAV

CTTGTAAACAAAGGGAGGGAAAGTATGGGAGGACAGACACCATGGGAAGTATTTA
TCACTAATCAAGCACAAGTAATACATGAGAACTTTTACTACAGCAAGCACAAT
CCTCCAAAAAATTTTGTTTTTACAAAATCCCTGGTGAACATGATTGGAAGGGAC
CTACTAGGGTGTGTGGAAGGGTGTGGTGCAGTAGTA (SEQ ID NO:2)

VISNA

GGACCCTCATTACTCTAAATATAAAAAGAAAGGGTGGGCTAGGGACAAGCCCTA
TGGATATATTTATATTTAATAAGGAACAACAAGAATACAGCAACAAGTAAAT
CAAAACAAGAAAAAATTCGATTTTGTATTACAGAACAAGAAAAAGAGGGCATC
CAGGAGAGTGGCAAGGACCAACACAGGTACTIONTTGGGGC (SEQ ID NO:3)

SIV_{AGM}

TACTGATGGCTTGCATACTTCACAATTTTAAAAGAAAGGGAGGAATAGGGGGAC
AGACTTCAGCAGAGAGACTAATTAATATAATAACAACAATTAGAAATACAAC
ATTTACAAACCAAAATTCAAAAATTTTAAATTTTAGAGTCTACTACAGAGAAG
GGAGAGACCCTGTGTGGAAGGACCGGCACAATTAATC (SEQ ID NO:4)

HIV-2 ROD

TGCATGAATTTTAAAAGAAGGGGGGAATAGGGGATATGACTCCATCAGAAAGA
TTAATCAATATGATCACCACAGAACAAGAGATACAATTCCTCCAAGCCAAAAAT
TCAAAATTAAAAGATTTTCGGGTCTATTTTCAGAGAAGGCAGAGATCAGTTGTGG
AAAGGACCTGGGGACTIONTGTGGAAGGAGAAGGAGC (SEQ ID NO:5)

HIV-1 LAI

CAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAG
GGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACTAAAGAAATTACAAA
AACAAATTACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATC
CACTTTGGAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAGGT (SEQ ID NO:6)

HIV1

TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA
CATAATAGCAACAGACATACTAAAGAAATTACAAAACAATTACAAAAT
TCAAAATTTTC (SEQ ID NO:7)

图 1

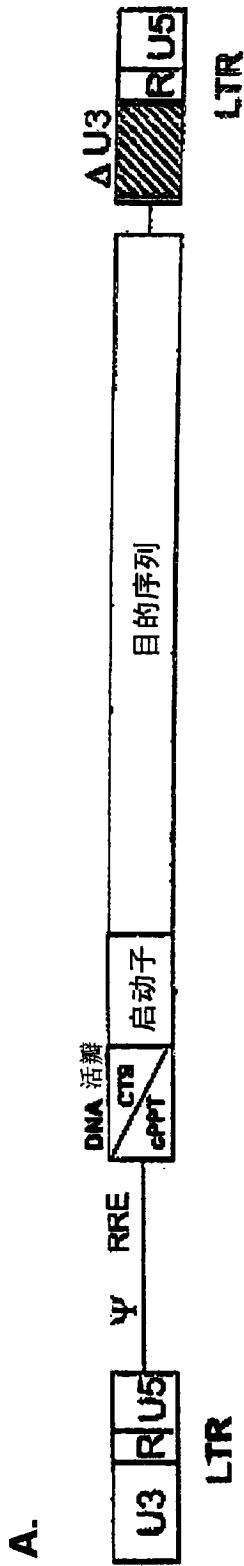


图 2A

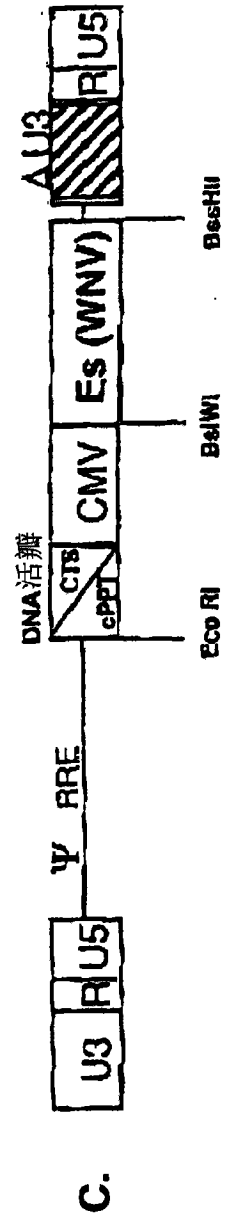
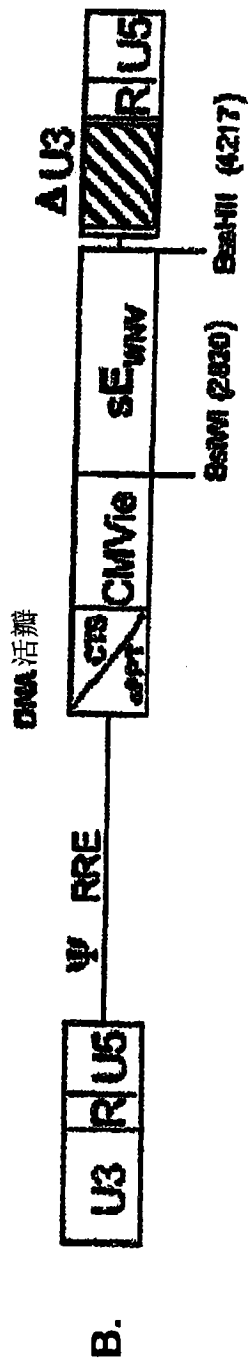


图 2B

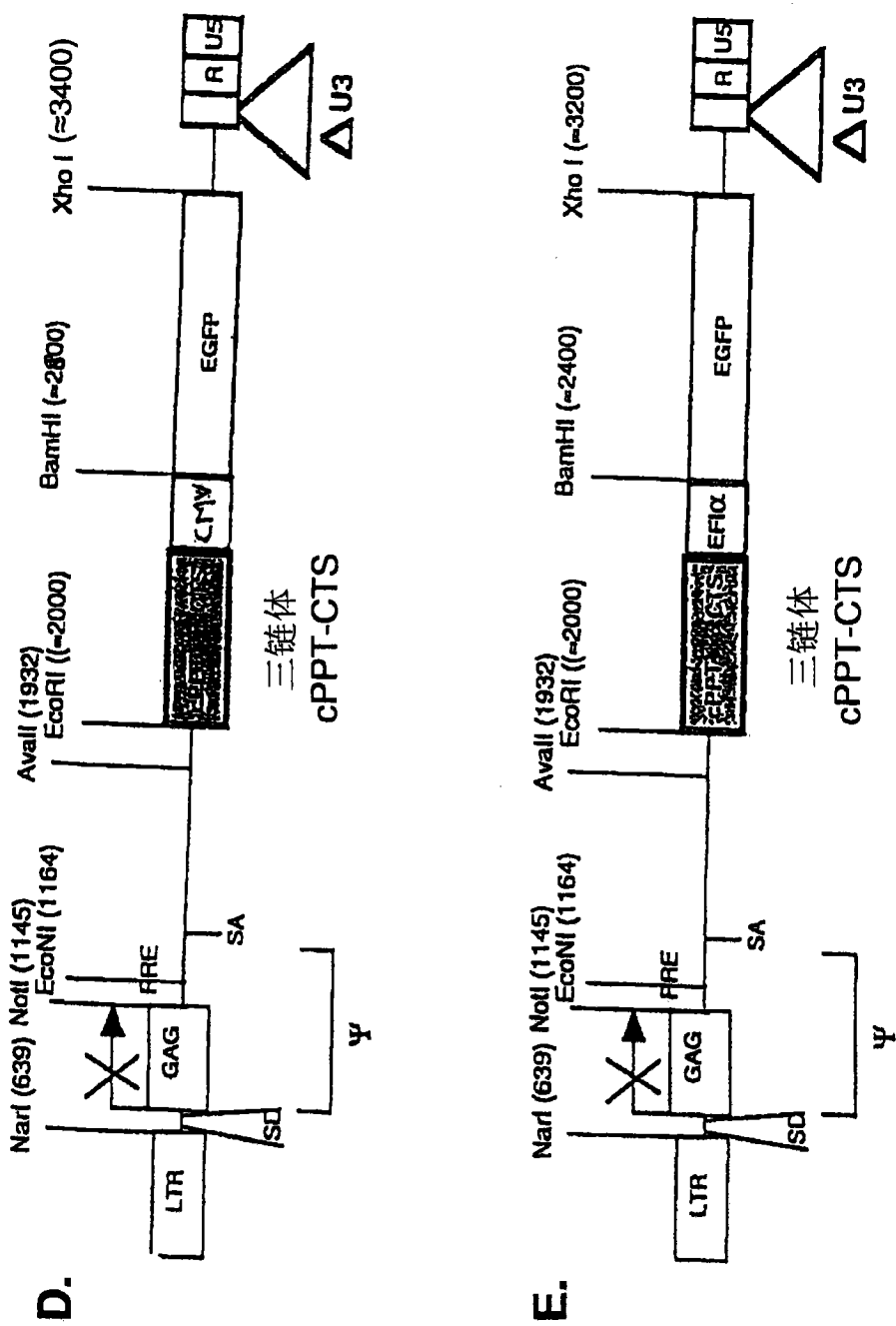


图 2C

CHP MTSSVTISVLLISFITPLYSYLSIAPFENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEEESFLSSTPIGATPSKSD
 COCAL MNFLLLTFFIVLPLCASHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQAD
 IND MKCLLYLAFLEFVGNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLVGTALQVKMPKSHKAIQAD
 NJ MLSYLILAIWVSPILGKIEVFPQHTFGDWKRVPEYNYCPTSADKNSHGTQGTGPIELTMPKGLTTHQVD
 ISFA MTSVLFMVGVLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLWVKPVLKGTTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPVIGITPNSND
 PIRY MTDTVLGKFQIVFPDQNELEWTPVVGDSRHCPOSSEMDFGSRSTILTGKAPVGTIPSKSD
 SVCV MSII SYIAFLLIDSTLGIPIFVPSGQNI SWQPVIQPFQDQCPHGNLPTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVS

CHP GFLCHAAKVVTTCDFRWYGPKYITHSIHNIKPTRSDCTALASYKSGTLVSLGFFPEPCGYASVTDSEFLVIMITP
 COCAL GWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSEVAVVQATP
 IND GWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFPTSEQCCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVDAEAAIIVQVTP
 NJ GFMCHSALWMTTCDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKAYKDGVSFNPGFPPQSCGYATVDAEAAIITVTP
 ISFA GYLCHAAKVVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPPEPCGYASITDSEFVYMLVTP
 PIRY GFICHAAKVVTTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPPEPCGYATVTDSEAMLVQVTP
 SVCV GWICHAAEWKTTCDYRWYGPQYITHSIHPISTIDECKRIISRIASGTDEDLGFFPPQSCGWASVTTVSNNTYKVVV

CHP HHVGVDDYRGHWVDPLFVGGECDSYCDTIHNSVWIPADQTKKNICGQSFTPLTVTVAYDKTK--EIAAGGI VFK
 COCAL HHVLVDEYTG EWIDSQFPNGKCEETEECTVHNSTVWYSDYKV-TGLCDATLVDTTEITFFSEDGKKE SIGKPNTRYR
 IND HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTVWYSDYKV-KGLCDSNLI SMDITFFSEDEGLSSLGKKTGFR
 NJ HSKVDEYTG EWIDPHFIGGRCKGQICETVHNSTKWTSSDG-ESVCSQLFTLVGGTFFSDSEBITSMGLPETGIR
 ISFA HPVGVDDYRGHWVDPLFPTSECNFNFCETVHNATMMWIPKDLKTHDVCSDQFQIRVSVMPQTK--PTKGDALTLK
 PIRY HHVGVDDYRGHWIDPLFPGGECSTNFCDTVHNSSVWIPKSSQK-TDICAQSFKNIKMTASYPSEG--ALVSDRFAFH
 SVCV HSHVLEPYGGHWIDHDFNGGECREKVCMEKGNHSIWTDETV-QHECEKHIEEVEGIMYGNAPR-GDAIYINNFII

CHP SKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGIKFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKMCPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRI
 COCAL SNYFAYEKGDVKCKMNYCKHAGVRLPSGVWF EFDVQDVYAAK----LPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERI
 IND SNYFAYETGDKACKMNYCKHWGVRVLP SGVWFEMADKDLFAAR----FPECEGSSISAPSQTSDVDVSLIQDVERI
 NJ SNYFPIYISTEGICKMPFCRKP GYKLNLDLWFQITDPLDKTVRDLPHIKDCDLSSSIITPGEHATDISLISDVERI
 ISFA SKFHAKMGDRVCKMKFCNKNGLRNLGNWEI EVGDEVMLDNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGQVQALWETDRL
 PIRY SAYHPNMPGSTVCMDFCEQKGLRFTNGEWMGLNVEQSIREKKISAI FPNVAGTEIRATLESEGARTLTWETQRM
 SVCV DKHHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKFTRGDWVEKTAGTLTNIYEN---IPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENV

CHP LDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASKSPGKGLAYTVINGTLSFAHTRYVRMWIDGPVLKEPKGKRESPSGIS
 COCAL LDYSLCQNTWSKIRSKQVSPVDLSYLA PKNPGTGPAFTI INGTLYKFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISG-SQTE
 IND LDYSLCQNTWSKIRAGLPI SPVDLSYLA PKNPGTGPAFTI INGTLYKFETRYIRVDIAAPILSRMVGMI SG-TTTE
 NJ LDYSLCQNTWSKIEAGEPITPVLDLSYLGPNPGVGPVFTI INGS LHYFTSKYL RVELENPVI PRMEGRVAG-TRIV
 ISFA LDYSLCQNTWEEKIDRKEPLSAVDLSYLA PRSPGKGMAYIVANGS LMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKKEASAGID
 PIRY LDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLS PRAPGKGMAYTVINGT LHS AHAKYIRTWIDY GEMKEIKGGRGEYSKAP
 SVCV VEYTLCEGTRKRINKQEKLTSDVLSYLA PRIGGFGSVFRVRNGTLERGSTTYIRIEVEGPPVDSLNGIDPR-TNAS

CHP SDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGMGI VDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDS---EIFFFG
 COCAL RELWTEWFPYEGVEIGPNGLLKTPTGYKFP LFMIGHGMLDSDLHKTSAEVEFHPHLAEAPKQLPEE---ETLFFG
 IND RVLWDDWAPYEDVEIGPNGLRTSSGYKFP LYMIGHGMLDSDLHLS SQAQVFEHPHIQDAASQLPDD---ETLFFG
 NJ RQLWDQWF PFGAEIGPNGLKTKQGYKFP LHIIGTGEVSDIKMERVVKHWEHPHIEAAQTLK KODTGEVLYYG
 ISFA TVLWEQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFP LYLIGMGI VQDQLQELSSVNPVDHPHVP IAAQAFVSEG---EVEFFG
 PIRY ELLWSQWFDFGPFKIGPNGLLHTGKTFKFP LYLIGAGI DEDLHELDEAAPEDHPQMPDAKSVLPED---EIFFFG
 SVCV RVFWDDWELDGNLYQFNGVYKGDGKIHIP LNMIESGI DDELQHAFAQADI IHPHYDDEIREDD---IFFD

CHP DTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLRCPPLFPFGIVYVYLQKAQME-----ERGER**SDSFE**MRIFKPNM
 COCAL DTGISKNPVELTEGWFSWKSSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVAVRYRYQGS---NNKR**YNDIE**MSRFRK---
 IND DTGLSKNPTEFVEGWFSWKSSTIASFFF IGLIIGLFLVLRVGIYLCIKLKH---KKRQ**YTDIE**MRLGK---
 NJ DTGVSKNPVELVSGWFSWRSSTIMGVLAVIIGFVILIFLIRLIGVLSLFRPK---RRPIY**KSDVE**MAHFR---
 ISFA DTGVSKNPIELISGWFSWKEATAALGFAAISVILIGLMRLPLLCRRR---QKKV**YKDV**ELNSFDRQA
 PIRY DTGVSKNPIELIQWFSWRESVMAIVGVLLIIVTFLAIKTVRVNLWRPRKRIVRQEV**DVESR**LNHFMERGF
 SVCV NTGENGNPVDVAVVWVSGWGTSLKFFGMTLVALILIFLLIRCCVACTYLMK-----KSKR**PATESE**MRSLV
 Transmembrane Domain

CHP RARV--
 COCAL -----
 IND ----
 NJ ----
 ISFA FHR---
 PIRY PEYVKR

图 3A

Indiana 病毒

MKCLLYLAFLEFIGVNCCKFTIVFPHNQGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTT
CDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGVEWVDSQFIN
GKCSNYICPTVHNSTWHSYKVKGLCDNSLISMDITFFSEDELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPS
GVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVLDLSYLAPKNPGTGPAF
TIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMI SGTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPPLYMIGHGMLDSDLHLS
SKAQVFEHPHIQDAASQLPDESLEFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWKSISAFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKLKHKKR
QIYTDIEMNRLGX

Chandipura 病毒

MTSSVTISVLLISFITFLYSYLSIAFPENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEEFSSSTPIGATPSKSDGFLCHAA
KWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESECGYASVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGRHWVD
PLFVGGECDQSYCDTIHNSVWIPADQTKKNICQGSFTPLTVTVAYDKTKEIAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGI
KFPNGEWSLMLKLRSKRNLYFCLKMCPGTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASK
SPGKGLAYTVINGTLSFAHTRYVRMWIDGPVLEKPKGKRESGSISSDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGMG
IVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDSSEIFFGDTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAGSCLPDLRCPPLFFGIVYYLQKA
QMEERGERSDSFEMRIFKPNNMRARV

Piry 病毒

MDLFPILVVVLTMDTVLGGKQIVFPDQNELEWRPVVGDSTRHCPOSSEMQFDGSRSTILTGPAPVGIPTPSKSDGFI CHAAKWV
TTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCAYATVTDSEAMLVQVTPHHVGVDDYRGRHWIDPLF
PGGECSTNFCDTVHNSVWIPKSKQTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDRFAFHSAHYHNMPPGSTVCIMDFCEQKGLRFTN
GEWMGLNVBQSIREKKSIAIFPNCVAGTEIRATLESEGARTLTWETQRMLDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLSPRAPCK
GMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWIDYGEKKEIKGGRGEYSKAPPELLWSQWDFGPFKIGPNGLLHTGKTFKFPYLYLIGAGIIDE
DLHELDEAAPIDHPQMPDAKSVLPEDEEIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVNLCLWR
PRKKRIVRQEVDESRLNHFEMRGFPEYVKK

New Jersey 病毒

MLSYLIFALAVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYCPTSADKNSHGQTGTGIPVELTMPKGLTTHQVEGFMCBSALWMTT
CDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIXSYKDGVSFNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVGVDDYRGRHWIDPLF
GRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGEVCSQLFTLVGGIFFSDSEBITSMGLPETGIRSNYFPYISTEGICKMPFCRQGYKLN
DLWFQIMDPDLKTVRDLPHIKDCDLSSSIITPGEHATDISLISDVERILDYALCQNTWSKIESGEPITPVLDLSYLGPKNPGV
GPVFTIINGSLHYFTSKYLVELESPIVPRMEGKVAGTRIVRQLWDQWFPFGEVEIGPNGVLKTKQYKFPPLHIIGTGEVDS
IKMERUVKHWEHPHIEAAQTFLLKDDTGEVLYYGDVGSKNPVELVEGWFSWGRSSMLMGVLAIVIGFVILMFLIKLIGVLSL
FRPKRRPIYKSDVEMAHFR

Cocal 病毒

MNLFLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSYHYCPSSSDQNWHNDLIGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWIT
TTCDFRWYGPKYITHSIHQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSGFPFPQNCGYATVTDVAVVVQATPHHVLDVEYTGWIDSDQFP
NGKCEETECEVHNSTVWYSYKVTGLCDATLVDEITFFSEDKKESIGKPNYGRSNYFAYEKDKVKCMNYCKHAGVRLPS
GVWFEPVQDQVYAAAKLPECVPGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAF
TIINGTLKYFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPGTGYKFPPLFMIGHGMLDSDLHKT
SQAQVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSWKSSTVVTFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNK
RIYNDIEMSRFRK

Isfahan 病毒

MTSVLFMVGVLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLWVKPVLKGRYCPQSAELNLEPDLKTMFDSKVPIGITPSNSDGYLCHAAK
WVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESECGYASITDSEFYVMLVTPHPVGVDDYRGRHWVDP
LFPTSECNSEFCETVHNATMWIPKDLKTHDVCSDQDFQTIIRVSVMYPTKPTKGADLTLKSKFHAHMKGDRVCKMKFCNKNGLR
LGNGEWIEVGDVEMLDNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGVTALWETDRLLDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRS
PGKGMAYIVANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKESASGIDTVLWEQWLPFNGMELGNLIKTKSGYKFPYLYLLGMGI
VDQDLQELSSVNPVDHPHVPVIAQAFVSEGEVFFGDTGVSKNPIELISGWFSWVKETAALGFAAISVILIIGLMRLLPLLCR
RRKQKVIYKDELNSFDPRQAFHR

SVCV 病毒

MSIISYIAFLLLIDSTFGPIFVPSGQNIWQPVIIQFPDYQCPHGNL PNTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVSGWICHAAEWK
TTCDFRWYGPQYITHSIHPTIDECKRIISRIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTVSNTNYKVVPHSVHLEPYGGHWIDHEF
NGGECREKVCCKMGNHSIWIITDETQHECEKHEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNFIDKHHRVRYRFGGSCRMKFCNKDGIKFT
RGDWVEKTAETLTNIYANIPCADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYTLCEGTRKINNQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGS
VFRVRNGTLRGSTTYIKIEVEGPIVDSLNGTDPRTNASRVFDDWELDGNIVQGFNGVYKGDGKIHIPLNMIESGIDDEL
QHAFAQDIIPHPHYDDEIREDDIFDNTGNGNPDVAVEWVSWGWTSLKFFGTTLVALILIFLLIRCCVACTYLMKKSKRP
ATESHEMRSFV

图 3B

TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG
ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGG
GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC
CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAGAACACCAGC
TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGT
GTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGGTGGCCCGA
GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGATATCGAGCTTGCTACAA
GGGACTTCCGCTGGGGGACTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT
GGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCT
GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC
TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC
TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA
GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT
CGGCTTGCTGAAGCGCGGAATTCGCGCCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGG
CGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAG
AGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGAT
GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATATAAATTA
CATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGG
CCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAAC
CATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTA
GCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAACAAAAGTAAGACCACCGCAC
AGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA
TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATGAACCATTAG
GAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGA
GCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAG
CACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTAT
TGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCG
CAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGC
AAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGA
TTTGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTCACCACTGCTGTGCCTTGGAAAT
GCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTG
GATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCT
TAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTG
GAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTG
GCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTT
TAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGA
TATTCACCATTTATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGA
CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGAT
CCATTGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGG
CAGTATTCATCCACAATTTTaaaagaaaaggggggATTGGGGGTACAGT
GCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGA
ATTACAAAACAAATTACaaaaattcaaaattttCGGGTTTATTACAGGG
ACAGCAGAGATCCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCCGCGTTACAT
AACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA

图 4A

TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
 CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
 TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
 GGTAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT
 TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
 TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGG
 GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCA
 CCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGA
 CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT
 CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA
 CCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAggaCGTACGATGAGAGTTGTGTTT
GTCTGTCTATTGCTTTTGGTGGCCCCAGCTTACAGCTTCAACTGCCTTG
AATGAGCAACAGAGACTTCTTGGGAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGG
ATTTGGTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAG
CCTACCATCGATGTGAAGATGATGAATATGGAGGCGGTCAACCTGGCAGA
GGTCCGCAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAG
CTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCA
GCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTG
CGGATTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAATTTGCCTGCT
CTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTA
CTCCACACAGGTTGGAGCCACTCAGGCAGGGAGATTCAGCATCACTCCTG
CGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGAGAGGTGACAGTG
GACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACCTACGTGATGAC
TGTTGGAACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCA
ACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGTACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACG
TTAATGGAGTTTGAGGAACCACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATAGCATT
GGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTTG
TGGAATTTTCAAGCAACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCAATTTGAAGTGT
AGAGTGAAGATGGAAAATTCAGTTGAAGGGAACAACCTATGGCGTCTG
TTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCA
CTGTGGTGTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTT
CCTATCTCGTCAGTGGCTTCATTGAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATT
GGTCACTGTCAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGCTAAGGTCC
TGATTGAATTGGAACCACCCTTTGGAGACTCATACATAGTGGTGGGCAGA
GGAGAACAACAGATCAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGG
CAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGCGCAGAGACTAGCCGCTCTAG
GAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGTT
GGGAAGGCTGtctaatagcgcgcGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
GCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGatcgctcgagAGATGCTGCATATAA
GCAGCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA
AGCTTGCTTGGAGTGCCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAAGTGTGGAAAATCTCTA
GCAGT

图 4B

TGGAAGGGCTAATTCACCTCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG
 ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGG
 GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC
 CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAGAAACACCAGC
 TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGT
 GTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTTCATCACGGTGGCCCGA
 GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGATATCGAGCTTGCTACAA
 GGGACTTTCCGCTGGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT
 GGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCT
 GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC
 TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCT
 TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC
 TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA
 GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT
 CGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG
 TACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCG
 AGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAAT
 CGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAATATAAATTA AACATATAGTATG
 GGCAAGCAGGGAGCTAGAACCATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAG
 ACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTA
 TTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACA
 AGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCC
 GCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTG
 AATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTAACCATTAGGAGTAGCACCC
 ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAAT
 AGGAGCTTTGTTCCCTGGGTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
 CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
 GTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT
 GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG
 CTGTGAAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
 TCTGGAAACTCATTTGCACCCTGCTGTGCCCTTGAATGCTAGTTGGAG
 TAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGG
 ACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA
 TCGCAAACAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAA
 ATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATA
 TAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTT
 TTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATT
 ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG
 GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTA
 GTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGGCAGTATTCATC
 CACAATTTTaaaagaaaaggggggATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG
AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAC
AAATTACaaaaattcaaaattttCGGGTTATTACAGGGACAGCAGAGAT
 CCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTA
 AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAAT

图 5A

AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
CAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGCGGATTTCCAAG
TCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATCAAC
GGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC
GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA
CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAA
GACACCGACTCTAGAggatccccaccggtcgccaccatggtgagcaaggg
cgaggagctgttcaccggggtggtgcccacctcctggtcgagctggacggcg
acgtaaaccggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgcc
acctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcc
cgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgt
tcagccgtacccccgaccacatgaagcagcagacttcttcaagtcgcc
atgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacgg
caactacaagaccgcgcccagggtgaagttcgagggcgacaccctggtga
accgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctg
gggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggc
cgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaaca
tcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccc
atcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccca
gtccgcccctgagcaaagacccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgc
tggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggcatggacgagctgtac
aagtaaagcggccggactctagctcgagACCTAGAAAAACATGGAGCAAT
CACAAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAG
CACAAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTA
AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGA
AAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGatcgtc
gagAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCT
GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCA
CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGC
CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT

图 5B

A.

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLVGTALQVKMPKSHKAIQ
 ADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYIITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTD
 EAAIVQVTPHHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDNLSMDITFFSE
 DGELSSSLGKKGTFGRSNYFAYETGDKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSIS
 APSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPI SPVDLSYLAPKNPGTGPVFTIINGTLKYFETR
 YIRVDIAAPILSRMVGMI SGT TTERVLWDDWAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLY MIGHGMLDSDLHL
 SSKAQVFEHPhiQDAASQLPDETLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLR
 VGIYLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (GenBank # M11048)

B.

1 M K C L L Y L A F L F I G V N C K F T I V F P H N Q K G N W K N V P .
 ATGAAATGCC TCGTCTATCT GCCCTTCCTC TTTATCGGGG TGAAGCTGAA GTTCACGATC GTGTTTCCCC ACAATCAGAA GGGAAACTGG AAGAACGCTC
 TACTTTACGG ACGAGATAGA CCGGAAGGAG AATAGCCCGC ACTTGACATT CAAGTGTCTAG CACAAAGGGG TGTAGTCTT CCCTTGACC TTCCTGCGG

101 . S N Y H Y C F S S S D L N W K N D L I G T A I Q V K M P K S H K A .
 CGAGCAACTA CCACTACTGC CCTAGCTCAA GCAGCTGAA CTGGCACAAC GACCTGATCG GCACCCGCTAT CCAGGTGAGG ATCCCAAAGA CCCACAAGCG
 GCTCCTGAT GGTGATGAGC GATCGAGTTC CGCTGGACTT GACCGTGTGT CTGGACTAGC CGTGGCGATA GGTCCACTTC TACCGTCTCT CCGTGTCTCC

201 . I Q A D G W M C H A S K W V T T C D F R W Y G P K Y I T Q S I R S .
 CATCCAAGCC GACGGCTGGA TGTGTACGC CAGCAAATGG GTGACGACGT GCGATTTTCG CTGGTATGGC CCCAAGTACA TCACCCAATC AATCCGCTCA
 GTAGTTTCGG CTGCCGACCT ACACAGTGGC GTCGTTTACC CACTGCTGCA CCGTAAAAGC GACCATACCG GGTTCATGT AGTGGGTAG TTAGCGGAGT

301 F T P S V E Q C K E S I E Q T K Q G T W L N P G F P P Q S C G Y A T .
 TTACACCCA CGCTGAGCA ATGTAAGGAG AGCATCGAGC AGACCAAGCA GGGACCTCG CTCAACCCCG GCTTCCCACC GCAAAGCTGC GGATACGCCA
 AAATGTGGCT CGCACCTCGT TACATTCCTC TCGTAGCTCG TCTGGTCTGT CCCCTGGACC GAATGGGGC CGAAGGGTGG CGTTTCGACC CCTATCCGCT

401 . V T D A E A V I V Q V T P K H V L V D E Y T G E W V D S Q F I N G .
 CCGTGACCGA CGCTGAGGCC GTCATCGTC AGGTGACCCC GCACCAAGTG CTGGTGGAGC AGTACACCGG CGAGTGGGTG GATTACAGT TTATCAACGG
 GGCAGTCTCA GCGACTCGCG CAGTAGCAGC TCCACTGGGG TCCACTGCGC GACCACCTGC TCA TGTGGCC GCTCACCCAC AATAGTTGCC

501 . K C S N Y I C P T V H N S T T W H S D Y K V K G L C D S N L I S M .
 AAAGTGTAGC AATTACATCT GCCCCACCTG GCACAACACC ACCACTGGCC ACTCAGACTA TAAGGTGAAG GGCCTCTGCC ACAGCAATCT GATCTCAATG
 TTTACATCG TTAATGTAGA CCGGTGGCA CCGTGTGTGC TGGTGGACCG TGAGTCTGAT ATTCCACTTC CCGGAGACGC TGTCTTAGA CTAGAGTTAC

601 D I T F F S E D G E L S S L G K E G T G F R S N Y F A Y E T G G K A .
 GACATCACCT TCTTTAGCGA AGACGGCGAA CTCTCAAGCC TCGCAAGGGA AOGCACCGGG GTGTGGTTTG AGATGGCTGA TAAGGACCTG TTCGCCGCTG CCCGCTTCCC
 CTGTAGTGGG AGAAATCGCT TCTGCCCTGT GAGAGTTCGG AGCCCTTCTT TCCCTGGCCC AAGGCTCTGT TAATGAAACG AATGCTTTGG CCGCCGTTCC

701 . C K M Q Y C K H W G V R L P S G V W F E M A D K D L F A A A R F P .
 CCTGCAAGAT GCAATACTGC AAGCACTGGG GCGTGCCTCT GCAAGCGGGC GTGTGGTTTG AGATGGCTGA TAAGGACCTG TTCGCCGCTG CCCGCTTCCC
 GGACGTTCTA COTTTAGAGC TTCGTGACCC CCGCACCGGA CCGTTCGCCC CACACCAAAC TCTACCGACT ATTCCTGACG AAGCGCGGAC GGGCGAAGGG

801 . E C P E G S S I S A P S Q T S V D V S L I Q D V E R I L D Y S L C .
 GGAATGCCCC GAGGGAGGCA GCATCAGCCG CCCCAGCCAG ACATCAGTGG ACGTGAAGCT GATCCAGGAT GTGGAACGCA TCCCTGAGTA CAGCCTGTGT
 CCTACCGGG CCGCCCTCGT COTAGTCCGC GGGCTCGCTG TGTAGTACC TGCCTCGGA CTAGGTTCTA CACCTTCCGT AGGACCTGAT GTCCGACACA

901 Q E T W S K I R A G L F I S P V D L S Y L A P K N P G T G P A F T I .
 CAGGAAACCT GGAGCAAGAT CCGCGCCGGA CTGCTATCA CCCCCTGGA TCTCAGTAC CTGGCCCCAA AGAACCCAGG CACCCGACCC GCCTTTACAA
 GTCCCTTCCA CCTCCTTCTA GCGCGGCTT GACGGATAGT CCGGACACTT AGAGTCTGAT GACCGGGGTT TCTTGGGTCC GTGGCCTGG CCGAAATGTT

1001 . I N G T L K Y F E T R Y I R V D I A A P I L S R M V Q M I S G T T .
 TCATCAACGG CACCCGAAAG TACTTTGAAA CACGCTACAT CCGCGTGCAC ATCGCCGCTC CCATCCTCTC ACGCATGGT GGCATGATCT CAGGACGAC
 AGTAGTTGCC GTGGGACTTC ATGAACTTT GTGCGATGTA GCGCGACGTC TAGCCGCGAG GGTAGGAGAG TGGTACCAC CCGTACTAGA GTCCCTGCTG

1101 . T E R E L W D D W A P Y E D V E I G P N G V L R T S S G Y K F P L .
 CACGGAGCCG GAGCTGTGGG ATGACTGGGC CCGTATGAA GATGTGGAGA TCGGACCTAA CCGCGTCTG CCGACATCAA CCGGTACAA GTTCCCCTG
 GTCCCTCGCG CTCGACACCC TACTGACCCG GGGCATACTT CTACACTCTT AGCTGGATT CCGCACGAC CCGTGTAGTT CCGCCATGTT CAAGGGCCAG

1201 Y M I G H G M L D S D L H L S S K A Q V F E H P H I Q D A A S Q L P .
 TACATGATCG CCGACGGCAT GCTGGACAGC GACCTGCACC TCAGCTCAA GCGCCAGTCT TTTGAGCACC CACACATCCA GGACGCTGCC AGCCAGCTCC
 ATGTACTAGC CCGTCCCGTA CGACCTGTGC CTGGACGTGC AGTCCAGTTC CCGGTCCAG AAACCTGTTG GTGTGTAGGT GTGTGAGG CCGTCCGAGG TCGGTGAGG

1301 . D D E S L F F G D T G L S K N P I E L V E G W F S S W K S S I A S .
 CCGACGACGA AAGCCTGTTT TTTGGAGATA CAGGGCTCAG CAAGAACCCC ATCGAGCTGG TCGAGGGCTG GTTCTCAAGC TGAAGAGCA GCATCGCTTC
 GGCTGTCTGT TCCGACAAAG AAACCTCTAT GTCCCGAGTC GTTCTTGGGG TAGCTCGACC AGCTCCGAC CAAGAGTTTC ACCTTCTGT CGTAGCGAAG

1401 . F F F I G L I I G L F L V L R V G I H L C I K L K H T K K R Q I .
 ATTTTTTTTC ATCATCGCC TCATCATCGG GCTGTTTCTG GTGCTCGCC GGTGGATCCA CCTGTGCATC AAGCTGAAGC ACACCAAGAA CCGCCAGATC
 TAAAAAAAAG TAGTAGCCGG AGTAGTAGCC CGACAAGAC CACGACCGCC AGCCGTAGGT GGACACGTAG TTCGACTTCT TGTGTCTCTT CCGGCTCTAG

1501 Y T D I E M N R L G K *
 TATACCGACA TCGAGATGAA TCGCCTGGGG AAGTAA
 ATATGGCTGT AGCTCTACTT AGCGGACCCC TTCATT

C.

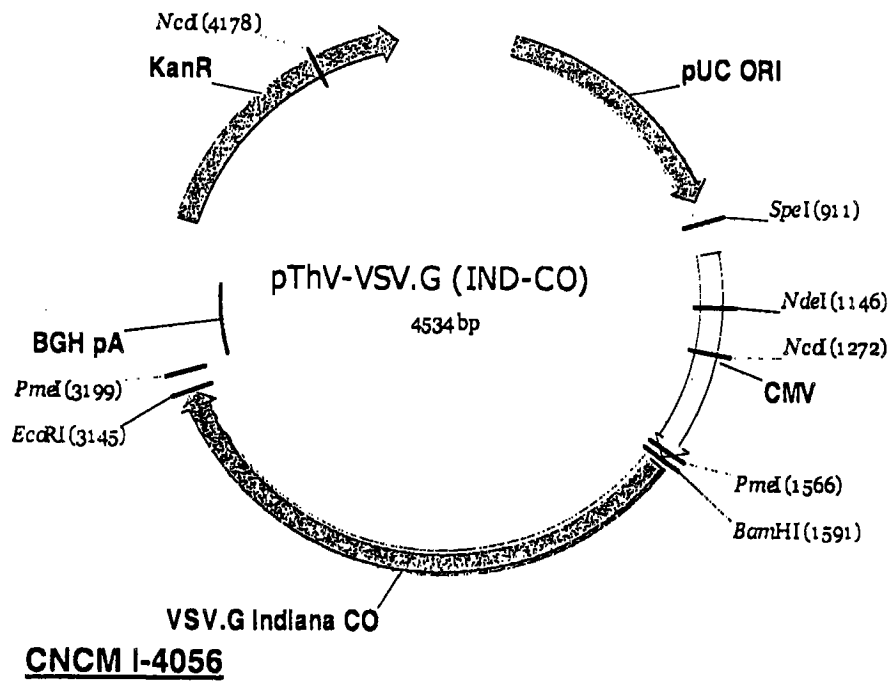
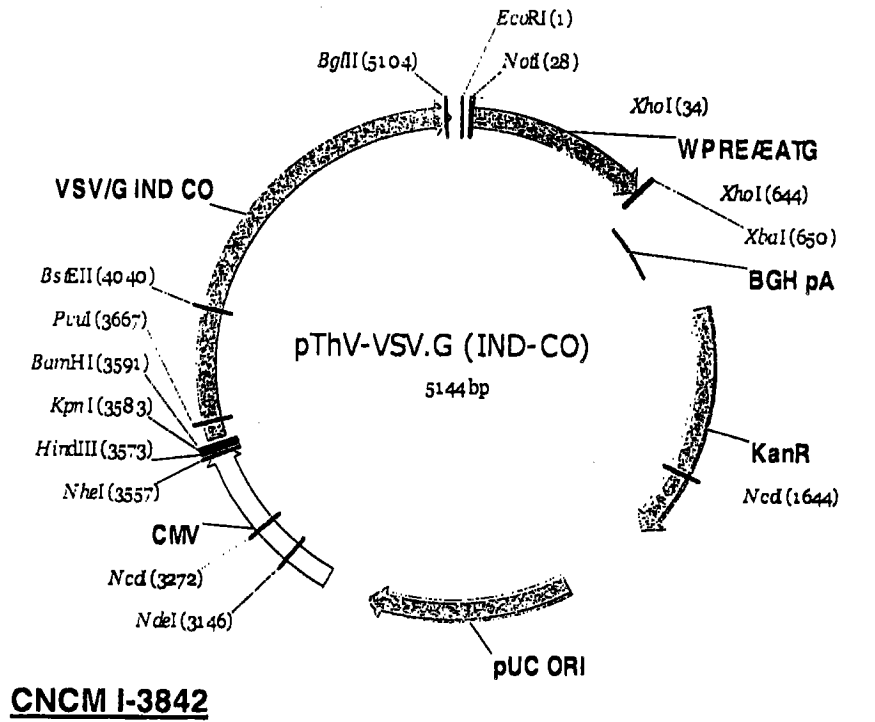


图 6

A.

MLSYLILAIIVVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYPCTSADKNSHGTQTGIPIELTMPKGLTHQ
 VDFMCHSALWMTTCDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKAYKDGVSFNPGFPPQSCGYGTVTD
 EAHIIIVTPHSVKVDEYTGWIDPHFIGGRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGESVCSQLFTLVGGTFFSD
 SEEITSMGLPETGIRSNYPYISTEGICKMPFCRKPQYKLNLDLWFQITDPDLDKTVRDLPHIKDCDLS
 SSIITPGEHATDISLISDVERILDYSLCQNTWSKIEAGEPITPVDLSYLGPKNPGVGVFTIINGSLHY
 FTSKYLRVELENPVI PRMEGRVAGTRIVRQLWDQWFFPGEAEIGPNGVLKTKQYKFFLHIIGTGEVDS
 DIKMERVVKHWEHPHIEAAQTFLLKDDTGEVLYYGD TGVSKNPVELVEGWFSGWRSSIMGLAVIIGFV
ILIFLIRLIGVLSSLFRPKRRPIYKSDVEMAHFR (GenBank # AF170624)

B.

```

1      M L S Y L I F A L A V S P I L G K I E I V F P Q H T T G D W K R V P
      ATGCTGTCAAT ATCTGATCTT TGCCCTGGCT GTGAGCCCAA TCCTCGGAAA GATCGAAATC GTGTTCACAC AACACACCAC AGGGGACTGG AAGCCGCTGC
      TACGACAGTA TAGACTAGAA ACGGGACCQA CACTCGGGTT AGGAGCCTTT CTAGCTTTAG CACAAGGGTG TTGTGTGTGT TCCCTGACC TTCGCCACG

101    . H E Y N Y C P T S A D K N S H G T Q T G I P V E L T M P K G L T T
      CCCACGASTA CAACTACTGC CCGACCTCAG CCGACAAGAA TAGCCAGCCG ACCGAGACCG GCATCCCTGT GGAGCTGACC ATGCCCAAGG GGCTCACAAAC
      GGTGTCTCAT GTTGATGACG GCGTGGAGTC GCGTCTCTTT ATCGGTGCGG TCGCTCTGGC CGTAGGGACA CCTCGACTGG TACGGGTCTC CCGAGTGTGG

201    . H Q V E G F M C H S A L W M T T C D F R W Y G P K Y I T H S I H N
      GCACCAAGTC GAAGGCTTCA TGTGCCACAG CCCTCTCTCG ATGACAACCT GCGATTTTCG CTGGTATGGC CCCAAGTACA TCACGCACAG CATCCACAAT
      CGTGGTTTCA GTTCCGAAAT ACACGGTGTG GCGAGAGACC TACTGTGGGA CGCTAAAAAG CACCATACCG GGGTTCATGT AGTCCGCTGC GTAGGTGTTA

301    . E E P T D Y Q C L E A I K S Y K D G V S F N P G F P P Q S C G Y G T
      GAGGAACCAA CCGACTACCA GTGCCCTGAA GCCATCAAGT CATACAAGGA TGGGGTGAGC TTCAACCCCG GCTTCCCGCC CCAATCATGT GGCTACGGCA
      CTCTGTGGTT GGCTGATGGT CACCGAGCTT CCGTAGTTCA GATATTTCT ACCCCACTCG AAGTTGGGGC CGAAGGGCGG GGTAGTACA CCGATGCCGT

401    . V T D A E A H I V T V T P H S K V D E Y T G E W I D P H F I G G
      CCCTGACCGA CCGCGAGGCC CACATCGTGA CCCTGACACC CCACTCAGTC AAGGTGGAGC AGTACACAGG CGAATGGATC GACCCCCACT TCATCGGGGG
      GGCACCTGGT GCGGCTCCGG GTGTAGCACT GGCACTGTGG GGTGAGTCAG TTCCACCTGC TCATGTGTCC GCTTACCTAG CTGGGGGTGA AGTAGCCCCC

501    . R C K G Q I C E T V H N S T K W F T S S D G E S V C S Q L F T L V
      CCCTGTAAAG GCGCAAACTC GCGAGACCGT GCACAACAGC ACCAAGTGGT TTACGTCAIC AGACGGCGAA AGCOTGTGCA GCCAACTGTT TACGCTCGTG
      GCGGACATTC CCGGTTTAGA CGCTTGCCA CGTGTGTGCG TGTTCACCA AATGACAGTAG TCTGCCGCTT TCACACAGCT CCGTTGACAA ATCCGAGCAC

601    . G G I F F S D S E E I T S M G L P E A T T A G I R S N Y P F Y I S T E G I
      GCGCTGTAAG GCGCAAACTC GCGAGACCGT GCACAACAGC ACCAAGTGGT TTACGTCAIC AGACGGCGAA AGCOTGTGCA GCCAACTGTT TACGCTCGTG
      CCGGACATTC CCGGTTTAGA CGCTTGCCA CGTGTGTGCG TGTTCACCA AATGACAGTAG TCTGCCGCTT TCACACAGCT CCGTTGACAA ATCCGAGCAC

701    . C K M P F C R K Q G Y K L K N D L W F Q I M D P D L D K T V R D L
      TCTGTAAGAT GCTTTTTCG CCGAAGCAGG GATATAAGCT GAAGAATGAC CTGTGGTTCC AGATCATGGA CCGGACCTGC GACAAGACCG TCCGCGATCT
      AGACATTTTA CCGAAAAACG GCGTTCGTCC CTATAATTGA CTCTTACTG GACACCAAGG TCTAGTACCT GGGCTCTGGC CTGTCTGGC AGCCGCTAGA

801    . P H I K D C D L S S S I I T P G E H A T D I S L I S D V E R I L D
      GCGCCACATC AAGGACTGTG ATCTGTCAIC AAGCATCAIC ACCCCCGGAC AACACGCCAC GGACATCAGC CTCATCAGCG ATGTGGAGCG CATCTCTGAC
      CCGGGTGTAG TTCTGTAGAC TAGACAGTAG TTCTGTAGTAG TGGGCGCTGC TTGTGCGGTC CCTGTAGTGC GAGTAGTGCG TACACCTCCG GTAGGAGCTG

901    . Y A L C Q N T W S K I E S G E P I T P V D L S Y L G P K N P G V G P
      TACGCTCTCT GCGAGAACAC ATCGAGCAAG ATCGAAAGCG GCGAACCAT CACCCAGTGC GACCTGAGCT ATCTCGGCC AAAGAACCCT GCGGTGGGGC
      ATCGGAGAGA CCGTCTGTG TACCTGTGTC TAGCTTTCGC CCGTGGGTA GTGGGTTCAC CTGGACTCGA TAGACCCGGG TTCTCTGGG CCGCACCCCG

1001   . V F T I I N G S L H Y F T S K Y L R V E L E S P V I P R M E G K V
      CCCTGTTCAC CATCATCAAC GGGAGCCTGC ACTACTTTAC AAGCAAGTAT TTACGTCAIC AGACGGCGAA AGCOTGTGCA GCCAACTGTT CCGGCAATGG
      GGCACAAGTG GTAGTAGTTG CCCTCGGACG TGATGAAATG TTCTGTCAIC GACCGCGACC TCGAGCTTTC GGGTCAAGTAG GGGCGTACC TCCCTTCCA

1101   . A G T R I V R Q L W D Q W F P F G E V E I G P N G V L K T K Q G Y
      GCGCGGACCG CCGATCTGTG CCGAGCTGTG GGACCAAGTG TTCCCTTTTG CCGAGGTGGA AATCGGCCCC AACCGCGTGC TGAAGACCAA GCAAGGATAT
      CCGCCCTCGG CCGTAGCAGC CCGTCGACAC CCGTGTCAAC AAGGAAAAAC CGCTCCACT TTAGCCGGGG TTCCCGCAGC ACTTCTGGTT CGTTCGTATA

1201   . K F P L H I I G T G E V D S D I K M E R V V K H W E H P H I E A A Q
      AAGTTCCTCG TGCACATCAT CCGGACCGGC GAAGTGGACA CCGATATCAA GATGAGCCGC GTGGTCAAGC ACTGGGAGCA CCCACACATC GAGGCTGCTC
      TTCAAGGCGC ACGTGTAGTA CCGTCCCGC CTTCACCTGT CCGTATAGTT CTACCTCGCG CACCAGTTCG TGACCTCTGT GGGTGTGTAG CCGGACGAG

1301   . T F L K K D D T G E V L Y Y G D T G V S K N P V E L V E G W F S G
      AGACCTTTCT CAAGAAGGAC GATACCGGCG AAGTCTGTGA TTACCGGGAT ACCGGAGTGA GCAAGAACC TGTGGAGCTG CTGGAAGCCT CCTTCAACCG
      TCTGGAAGA GTTCTTCTGT CTATGCGCCG TTCAGGACAT AATGCCCTTA TGCCCTCACT CCGTCTTGGG ACACCTCGAC CACTTCCGA CCAAGTCCGC

1401   . W R S S L M G V L A V I I G F V I L M F L I K L I G V L S S L F R
      ATGGCGTCA AGCTGATGG CCGTCTGGC CCGTCAICAT GGATTTGTGA TCCTGATGTT CCGTCAICAA GCGATCGGGG TGCTGTCAAG CCGTCTCGGC
      TACCGGAGT TCGGACTACC CCGACGACCG CAGTAGTAG CCTAAACACT AGGACTACAA GGAGTAGTTC GACTAGCCCG ACGACAGTTC GGACAAGCCG

1501   . P K R R P I Y K S D V E M A H F R
      CCTAAGCCCG GCCCAATCTA CAAGAGCGAC GTCGAGATGG CCGCATTTCT CTA
      GGATTCGGGG CCGGTTAGAT GTTCTCGCTG CAGCTCTACC GGGTGAAGC GAT
  
```

C.

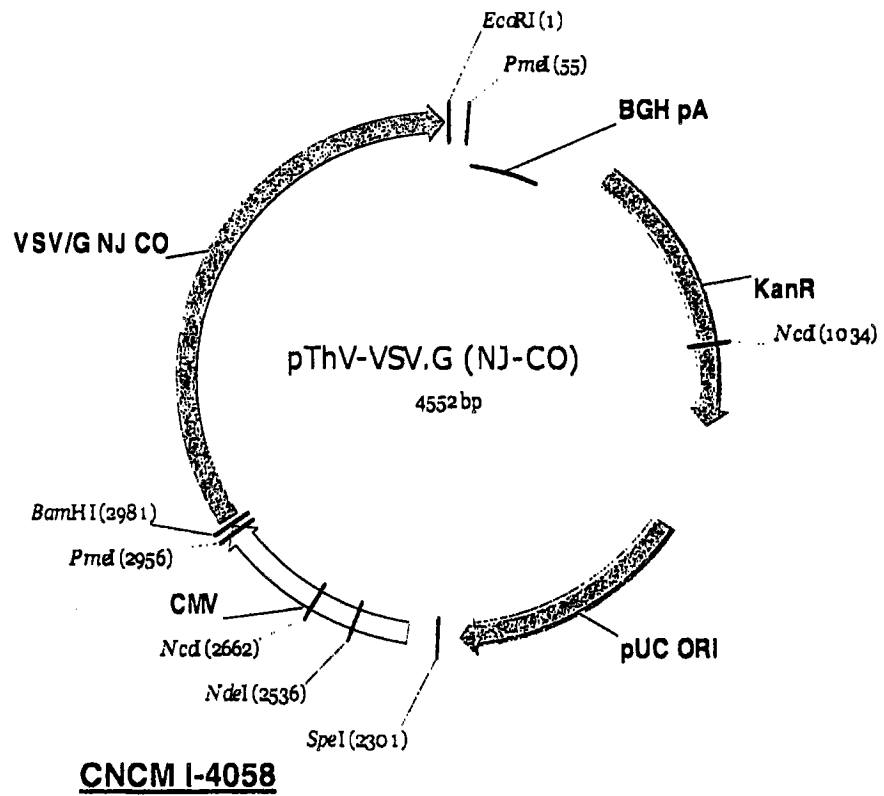
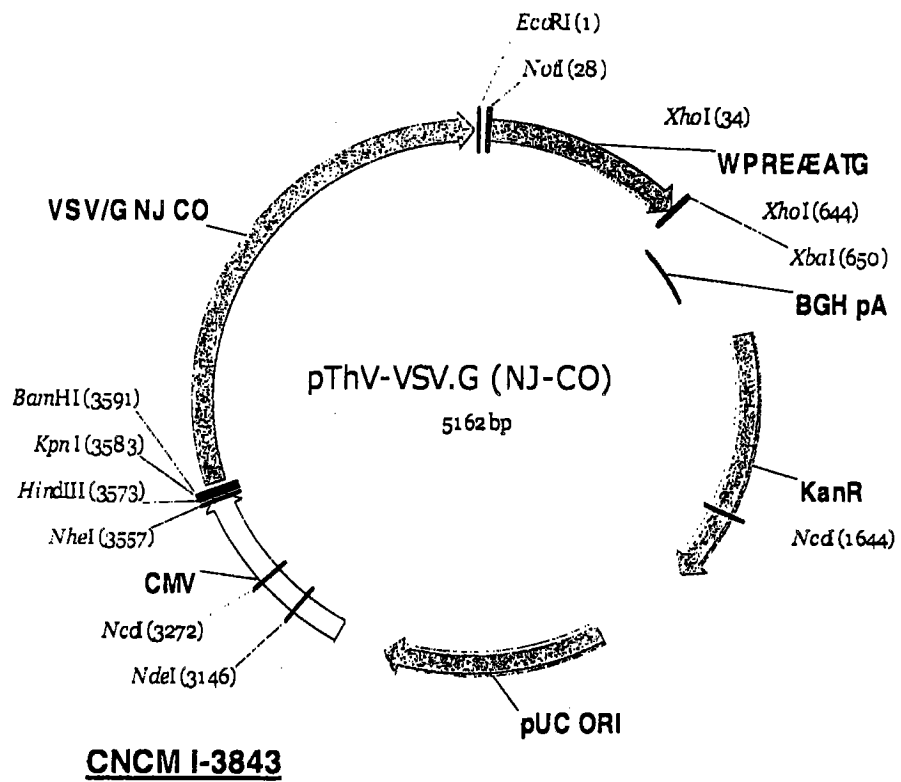


图 7

A.

MTSSVTISVLLISFITPLYSYLSIAFPENTKLDWKVPVTKNTRYCPMGGGEWFLPEPLQEESFLSSTPIG
 ATPSKSDGFLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNIKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYA
 SVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGHWVDFLVGGGECDSYCDTIHNSVWI PADQTKKNICGQSFTPLT
 VTVAIDKTKIEAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGIKFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKM
 CPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASKSPGKGLAYTVING
 TLSFAHTRYVRMWDGPNLKEPKGKRESPGSISSDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGM
 GIVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDSEEIFFGDTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLR
 CPPLFPGIVYYLQKAQMEERGERSDSFEMRIFKPNNMRRARV (GenBank # J04350)

B.

BamHI
 1 1 GGCGCCGG ATCCTGATCA GCCACCATGA CCAGCAGCGT GACCAACAGC GTGGTCTGTC TGATCAGCTT CATCACCACC CTGTACAGCT ACCTGACCAT
 CCCGCCGGCC TAGGACTAGT CGGTGTACT GGTCTGCACA CTGCTGTGCG CACCACGACG ACTAGTGGAA GTAGTGGGGG GACATGTGCA TGACTCGTA
 . A P P E N T K L D H K F V T K N T R Y C P M G G E W F L E P G L Q
 101 101 TCCCTTCCCC GAGAACACCA AGCTGGACTG KAAGCCCCTG ACCAAGAACA CCCGTACTG CCCCATGGGC GCGGAGTGGT TTTCTGAAAC CGGCTGACG
 ACCGAAGGGG CTCCTGTGGT TCGACCTGAC CTTCCGGGAC TGGTCTGTGT GGGCCATGAC GGGGTACCCG CCCTCACCA AAGACCTTGG GCCGGACCTC
 . E E S F L S S T P I G A T P S K S D G F L C H A A K W V T T C D F R
 201 201 GAAGAGCT TCCGTAGCAG CACCCCCATC GCGCCACACC CCAGCAAGAG CGACGGCTTC CTGTGCCACG CCGCCAAGTG GGTGACCACC TCCGACTTCC
 CTCTCTCGA AGGACTCTGT GTGGGGTAG CCGCGTGGG GGTCTGTCTC GCTCCGGAAG GACACGGTGC GCGGTTTCC CCACTGGTG ACCGTAAGG
 . W Y G P K Y I T H S I H N I X P T R S D C D T A L A S Y K S G T L
 301 301 SGTGGTACGG CCCCAAGTAC ATCACCACCA GCATCCACAA CATCAAGCCC ACCAGAAGCC ACTGCGACAC AGCCCTGGCC TCTTACAAGA GCGCACCTT
 CCACCATGCC GGGGTTCATG TAGTGGGTGT CGTAGGTGTT GTAGTGGGG TGGTCTTCCG TGACCTGTG TCGGGACCGG AGAATGTCTT CCGCTGGGA
 . V S L G F P P E S C G Y A S V T D S E F L V I M I T P H H V G V D
 401 401 GGTGTCCCTG GCTTCCCTC CCGAGAGCTG CCGCTACGCC ACAGCGAOTT CTTGTGTGAT CTGATTACCC CCCACCAGCT GCGCGTGAC
 CCACAGGAC CCGAAGGGAG GCTCTCGAC GCCGATCCG TCGCACTGG GTCTGCTCAA GGACCACTAA TACTAAATGG GGTGTGTGCA CCGCACCTG
 . D Y R G H W V D P L F V G G E C D Q S Y C D T I H N S S V W I P A D
 501 501 GACTACGGGG GCCACTGGGT GGACCCCTCTG TTCGTGGGAG GGAATTCGGA CCAGAGCTAC TCGATACCA TCCACAACCT CAGCCGTGGG ATTCCCGCCG
 CTGATGGCCC GGTGTGACCA CTTGGGAGAG AAGCACCCCT CCGTACCGT GTCTGCTCAA GGACCACTAA TACTAAATGG GGTGTGTGCA CCGCACCTG
 . Q T X K N I C G Q S F T P L T V T V A Y D K T K E I A A G G I V F
 601 601 ACCGAGCAA GAAGAAGCAT TCGCGCCAGA GCTTCCACCC TCTGACCTG ACCGTGGCCT ACGACAAGC CAAAGAGATT GCCGCCGAG CCGATCGTGT
 TGGTCTGGTT CTCTGTGTAG ACGCCGTGCT CGAAGTGGGG AGACTGGCAC TGGCACCCGA TGCTGCTGCT GTTCTCTTAA GCGCGGCTC CCTAGCACAA
 . K S K Y H S H M E G A R T C R L S Y C G R N G I K F P N G E W V S
 701 701 CAAGAGCAAG TACCACAGCC ACATGGAAGG CCGCAGGACC TCGACAGTGT CCTACTCGCG CCGGAACGGC ATCAAGTCC CCAAGCCGA GTCTGTCTG
 GTCTCGCTC ATGTGTGCTG TGTACTTCC CGCGTCTGG AGCTGAGCA GGATGACCCG GCGCTTGGCG TAGTTCAAGG GGTGTGGCTT CACCCACAGG
 . L M L K L R S K R N L Y F P C L K M C P T G I R G E I Y P S I R W A
 801 801 CTGATCGTGA ACTTCCGGAG CAAGCGGAAC CTGTACTTCC CCGTCCGTA GATGTGCCCC ACCCGCATCC GCGCGGAGAT CTACCCGAGC ATCAGCTGG
 GACTACGACT TCGACGCTC GTTCCGCTTG GACATGAAGG GGACGGACT CTACAGGGGG TGCCGCTAGG CCCCCTCTA GATGGGCTG TAGTCTACCC
 . Q V L T S E I Q R I L D Y S L C Q N T W D K V E R K E P L S P L D
 901 901 CCCAGCTCCT GACCAGCAG ATCCAGAGAA TCCTGGACTA CAGCCCTGTC CAGAACACCT GGGACAAGGT GGAGCGGAAA GAGCCCTGA GCCCCCTGA
 GGTCCACGA CTGTGTGCTC TAGGTCTCTT AGGACTGTAT GTCGACAGC GTCTGTGGA CCTGTCTCA CCTCGCTTT CTGCGGGACT CCGGGACCT
 . L S Y L A S K S P G K G L A Y T V I N G T L S F A H T R Y V R M W
 1001 1001 CCTGAGCTAC CTGGCCAGCA AGTCCCCCGG CAAGGGGCTG GCCTACACC TGATCAACGG CACCTGAGC TTCGCCACA CCAGATACCT CGGATGTGG
 GGACTCGATG GACCGGTCTG TCAGGGGGCC GTTCCCGGAC CCGATGTGGC ACTAGTTGCC GTGGACTCG AAGCGGCTG GTCTATGCA CCGCTACCC
 . I D G P V L K E P K G K R E S P S G I S S D I W T Q W F K Y G D M E
 1101 1101 ATCGACGGCC CCGTCTGAA AGACCCCAAG GGCAAGAGAG AGAGCCCGAC CGGCATCAGC AGCGACATCT GGACCCAGTG GTTCAAGTAC GCGGACATGG
 TAGCTCGCGG GGCACGACTT TCTCGGCTC CCGTCTCTC TCTCGGGTCC GCGTAGTCTG TCGCTGTAGA CCTGGGTAC CAAGTCTATG CCGCTGTACC
 . I G P N G L L K T A G G Y K F P W H L I G M G I V D N E L H E L S
 1201 1201 AAATCGGCC CAACGGCCTG CTGAAACAG CCGCGGATA CAAGTTTCTT TGOCACCTGA TCGGCATGG CATCTGGAC AAGCAGCTG ACAGCTGTG
 TTTAGCCGG GTTCCCGGAC GACTTTTCTC GCGCCCTAT GTTCAAAGGA ACCGTGGACT AGCCGTACCC GTAGCACCTG TTTCTGACG TCTCTGACG
 . E A N P L D H P Q L P H A Q S I A D D S E E I F F G D T G V S K N
 1301 1301 CGAGGCCAAC CCGCTGATC ACCCCAGCT GCCCCAGCC CAGAGCATTG CCGACGACG CGAGGAAATC TTTCTGCGG ACACCGCGT GAGCAAGAAC
 GCTCCGCTG GGGAGCTAG TGGGGTCCA CCGGCTGCG GTCTGTAAAC GCTGCTTCTG AAGAGCCCG TGTGGCCCA CTCTCTTCTG
 . P V E L V T G W F T S W K E S L A A G S C P D L R C P L F P G I V
 1401 1401 CCCGTGGAAC TGTGACAGG CTGGTTCACC AGCTGGAAG AGAGCCCTGC CCGCGATCT TGCCCGACC TCGGTTGCC CCTCTGTCT CCGGCTAG
 GCGCACCTG ACCACTGTCC GACCAAGTGG TCGACCTTTC TCTCGAGCG GCGGCTAGA ACGGGGTG ACGCCACGG GGGAGACAG GCGGCTAGC
 . Y Y L Q K A Q M E E R G E R S D S F E M R I F K P N N M R A R V
 1501 1501 TGTACTACCT GCAGAAAGCC CAGATGGAAG AGCGGGCGGA GCGAGCCGAC AGCTTGGAGA TCGCGATCTT CAAGCCCAAC AACATGCGGG CCAGAGTGTG
 ACAATGATGA CGTCTTCCG GTCTACCTTC TCGCCCGCT CCGCTCGCTG TCGAAGCTCT ACGCTTAGAA GTTCCGGTGG TGTACGCCC GGTCTCACAC
 EcoRI

 1601 1601 ATGAGAATTC TTAATTA
 TACTCTAAG AATTAAT

C.

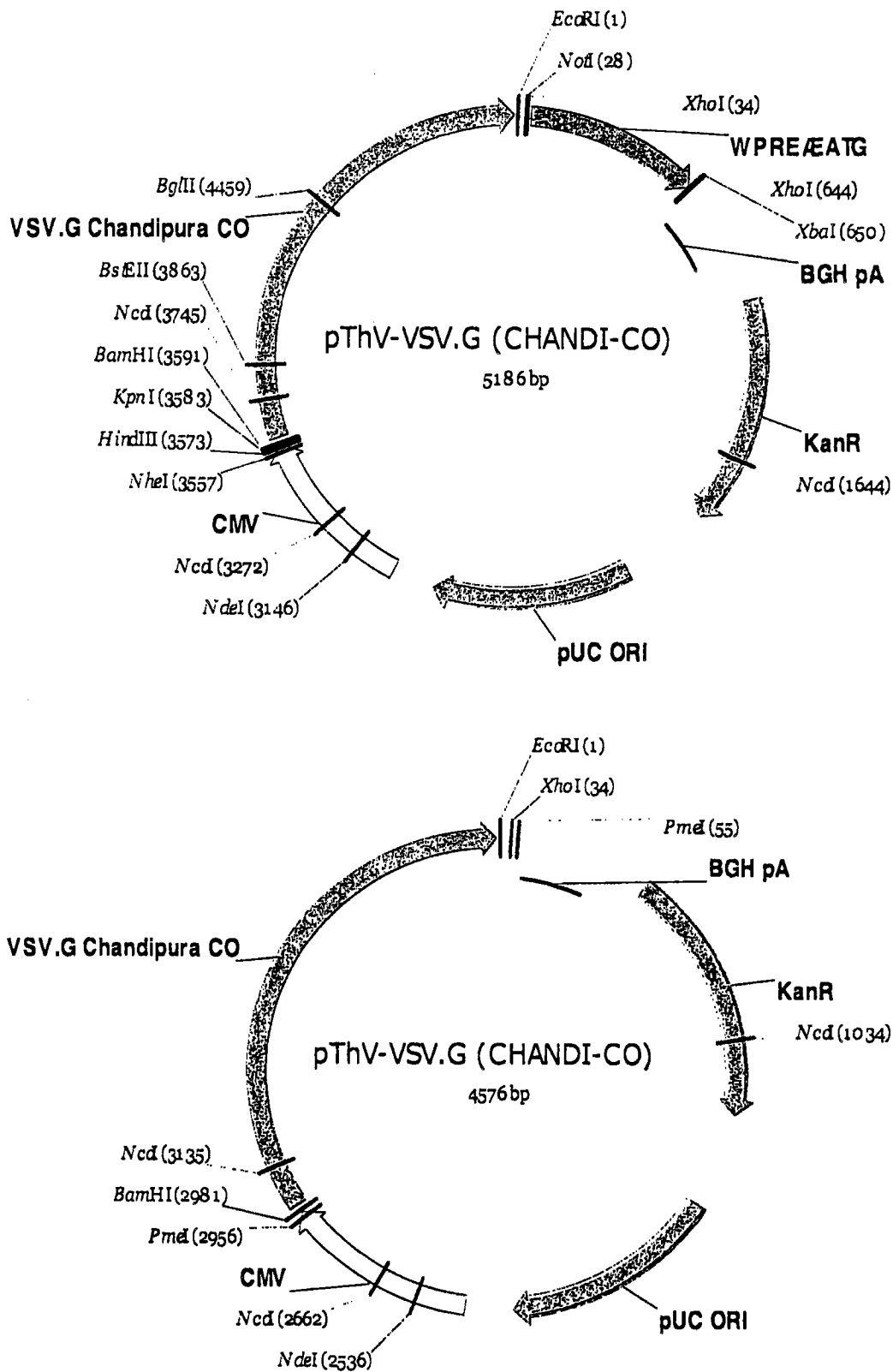


图 8

A.

MN FLL LTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAI
 QADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTD
 SVAVVVQATPHHVLVDEYTG EWIDSQFPNGKCEETEECTVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDEITFFS
 EDGKESIGKPNTRYRSNYFAYEKGDVKCMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECVPGATI
 SAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFET
 RYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGLKTPGTGYKFFPLFMIGHGMLDSDLH
 KTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVA
 RIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (GenBank # AF045556)

B.

BarHI
 1 GGCDCGCGG ATCCTGATCA GCCACCATGA ACTTTCTGCT GCTGACATTC ATCGTGTGTC CTCTGTGCAG CCACGCCAAG TTCAGCATCG TGTTCCGCCA
 CCGCGCGCC TAGGACTAGT CGGTGGTACT TGAAGACGA CGACTGTAAG TAGCACGACG GAGACACGTC GGTCCGGTTC AAGTCGTAGC ACAAGGGGGT
 101 . S Q K G N W K N V P S S Y H Y C P S S S D Q N W H N D L L G I T M
 GAGCCAGAAG GGCAACTGGA AGAACGTGCC CAGCAGCTAC CACTACTGCC CCAGCAGCAG CGACCAGAAC TGGCACAACG ACCTGTGGG CATCACCATG
 CTCGGTCTTC CCGTTCACCI TCTTGCACGG GTCTGTCGAT GTGATGACGG GGTCTGCTCT GCTGTCTTTC ACCGTCTTTC TGGACGACCC GTACTGGTAC
 201 . K V K M P K T K K A I Q A D G W M C H A A K W I T T C D F R W Y G P
 AAGTGAAMA TCCCAAGTC CCACAAGCC ATTCAGGCT ACCGCTGGAT GTGCCACGCC GCCAAGTGA TCACCACCTG CGACTTCGGG TGGTACGCCG
 TTCACCTTTT ACGGTTCCTG GGTGTCCGG TAAGTCCGAC TGCAGCCTA CACGGTTCGG CCGTTCACCT AOTGGTGGAC GCTGAAGGCC ACCATGCCGG
 301 . K Y I T H S I H S I Q P T S E Q C K E S I K Q T K Q G T W M S P G
 CCAAGTACAT CACCCACAGC ATCCACTCCA TCCAGCCACC CTCCGAGCAG TCCAAGAGA GCATCAAGCA GACCAAGCAG GGCACCTGGA TCAGCCCGGG
 GGTTCATGTA TGTGGTGTG TAGGTGAGGT AGTCTGGGTG GAGGCTCGTC ACCTTCTCT CTAGTTCCT CTGGTTCGTC CCGTGGACCT ACTCGGGGCC
 401 . F P P Q N C G Y A T V T D S V A V V V G A T P H H V L V D E Y T G
 GTTCCACCC CAGAAGTGG CACTACGCC COTGACCCG AGCTGGCCG TGGTGGTGA GGCACCCCC CACCACCTGC TGGTGCAGG ATACCCCGG
 GAAGGGTGG GTCTTGCAGC CGATCGGGTG GCATCGGCT TCGCAGCCG ACCACCACCT CCGGTGGGG GTGGTGCAGC ACCAGCTGCT CATGTGGCCG
 501 . E H I D S Q F P N G S K C E T E E C E T V H N S T V W Y S D Y K V T G
 GAGTGGATG ACAGCCAGT CCCCACCGC AAGTCCGAGA CAGAGGAATG CGAGACAGTG CACAACAGCA CCGTGTGGTA CAGCGACTAC AAGTACGCCG
 CTCACCTAGC TGTGGTCAA GGGGTTCGG TTCACGCTCT GTCTCTTAC GCTCTGTAC GTGTGTGCTG GGCACACCAT GTCTGTATG TTCACCTGGC
 601 . L C D A T L V D T E I T F F S E D G K K E S I G K P N T G Y R S N
 SCCTGTGCGA CGCCACCTTG GTGCACCCG AGATCACCTT TTTCCAGCAG GACGGCAAGA AAGAGTCCAT CGGCAAGCC AACACCCTG ACAGAACCAA
 CGACACCTG CCGGTGGGAC CACTGTGGC TCTAGTGGAA AAGTCCGTC CTGCCGTCT TTTCCAGGTA GCGTTCGGG TGTGGCCGA TGTCTCTGTT
 701 . Y F A Y E K G D K V C K M N Y C K H A G V R L P S G V W F E F V D
 CTACTTCGCC TACGAGAAG GCGACAAGT GTGCAAGATG AACTACTGCA AGCATGCCCG AGTGAAGCTG CCTAACCCTG TGTGGTTCGA GTTCTGGGAC
 GATGAAGCGG ATGCTCTTCC CGTGTGTCA CAGCTTCTAC TTGATGAGT TCGTACGGCC TCACCTCCGAC GATTCGCGC ACACCAAGCT CAAGCACCTG
 801 . Q D V Y A A A K L P E C P V G A T I S A P T Q T S V D V S L I L D V
 CAGGCTGTG ACGCCCGCC CAAGCTGCC GAGTCCCGC TGGGCGCAC CATCAGCCG CCCACCCAGA CCAGCTGGA CGTGAGCTG ATCTCGGACG
 GTACTCTACA TGGCGCGGG GTTCGACCGG CTCACGCGGG ACCCGCGGTG GTAGTCCGG GTTGTGGTCT GGTTCGACCT GACTTCGGAC TAGGACCTGC
 901 . E R I L D Y S L C Q E T W S K I R S K Q P V S P V D L S Y L A P K
 TGGAGAGAAT CCTGGACTAC TCTCTGTGTC AGGAAACCTG GTCCAAGATC AGATCCAAGC AGCCCGTGAG CCGTGTGGAC CTGAGCTACC TGGCCCTTAA
 ACCTCTCTTA GGACTGTATG AGAGACACAG TCTTGTGGAC CAGGTTCTAG TCTAGGTTTC TGGGGCACTC GGGACACCTG GACTCGATGG ACCGGGATTT
 1001 . N P G T G P A F T I I N G T L K Y F E T R Y I R I D I D N P I I S
 GAACCCCGG ACCGCGCTG CPTTACCAT CATCAAGCC ACCCTGAGT ACTTCCAGAC ACGGTACATC CCGATCGACA TCGACAACC CATCATCAGC
 CTTGGGCGCG TGGCCGGAC GGAAGTGGTA GTAGTTGCC TGGACTTCA TGAAGCTCTG TCCCATGTAG GCTTAGCTGT AGCTGTGGG GTAGTAGTGC
 1101 . K M V G K I S G S Q T E R E L W T E W F P Y E G V E I G P N G I L K
 AAGATGTGG GCAAGATCAG CGGACGCCG ACCGAGCGGG AGCTGTGGAC CGAGTGGTTC CCGTACGAGG CCGTGGAGAT CGGCCCCAAT GGCATCTTGA
 TTCTACCACC CTTCTATGTC CCGTCCGGTC TGGCTCGCCC TCGACACCTG GCTCACCAG GGGATGCTCC CGCACCTGTA GCGGGGGTGA CCGTAGGACT
 1201 . T P T G Y K F P L F M I G H Q M L D S D L H K T S Q A E V F E H P
 AAACCCCTAC CGCTACAAG TTCCCCCTGT TCATGATCGG CCACGGCATG CTGGACAGCG ACCTGCACAA GACCTCCAG GCGGAGGTGT TCGAGCACCC
 TTTGGGGATG GCCGATGTT AAGGGGACA AGTACTAGCC GGTGCCGTAC GACCTGTCCG TGCACCTCTT CTGGAGGCTC CCGCTCCACA ACCTGTGTGG
 1301 . H L A E A P K Q L P E E E T L F F G D T G I S K N P V E L I S G W
 CCACCTGCC GAGGCCCCA AGCAGCTGCC CGAAGAGGAA ACCCTGTACT TCGCGCACAC CGGCATCTCC AAGAACCTGT TGGAGCTGAT CGAGGCTGG
 GSTGGACCG CTCCGGGGT TCTGACAGG GCTTCTCTT TGGACAAGA AGCCGCTGTG GCGGTAGAGG TTTCTGGGAC ACCTCGACTA GCTCCCGACC
 1401 . F S S W K S T V V T F F F A I G V F I L L Y V V A R I V I A V R Y R
 TTCAGCAGCT GGAAGACAC CGTGGTGAAC TTTTCTCTG CCACTGGCGT GTTATCTCTG CTGTACGTGG TGGCCCGGAT CGTGATGCC GTGCGGTACA
 AAGTCTGCA CTTTCTCTG GCACCACTGG AAAAAGAAG GGTAGCCCA CAAGTAGGAC GACATGCACC ACCGGCCCTA GCATAGCGG CACGCCATGT
 EcoRI
 1501 . Y Q G S N N K R I Y N D I E M S R F R K * *
 GATACCAGG CAGCAACAAC AAGCCGATCT ACAACGACAT CGAGATGAGC CCGTCCCGA AGTGTGAGA ATTCTTAAAT AA
 CTAATGCTCC GTCTGTGTG TTCGCTTAGA TGTGCTGTA GCTCTACTG GCCAAGCCCT TCACACTCT TAAGAAATA TT

C.

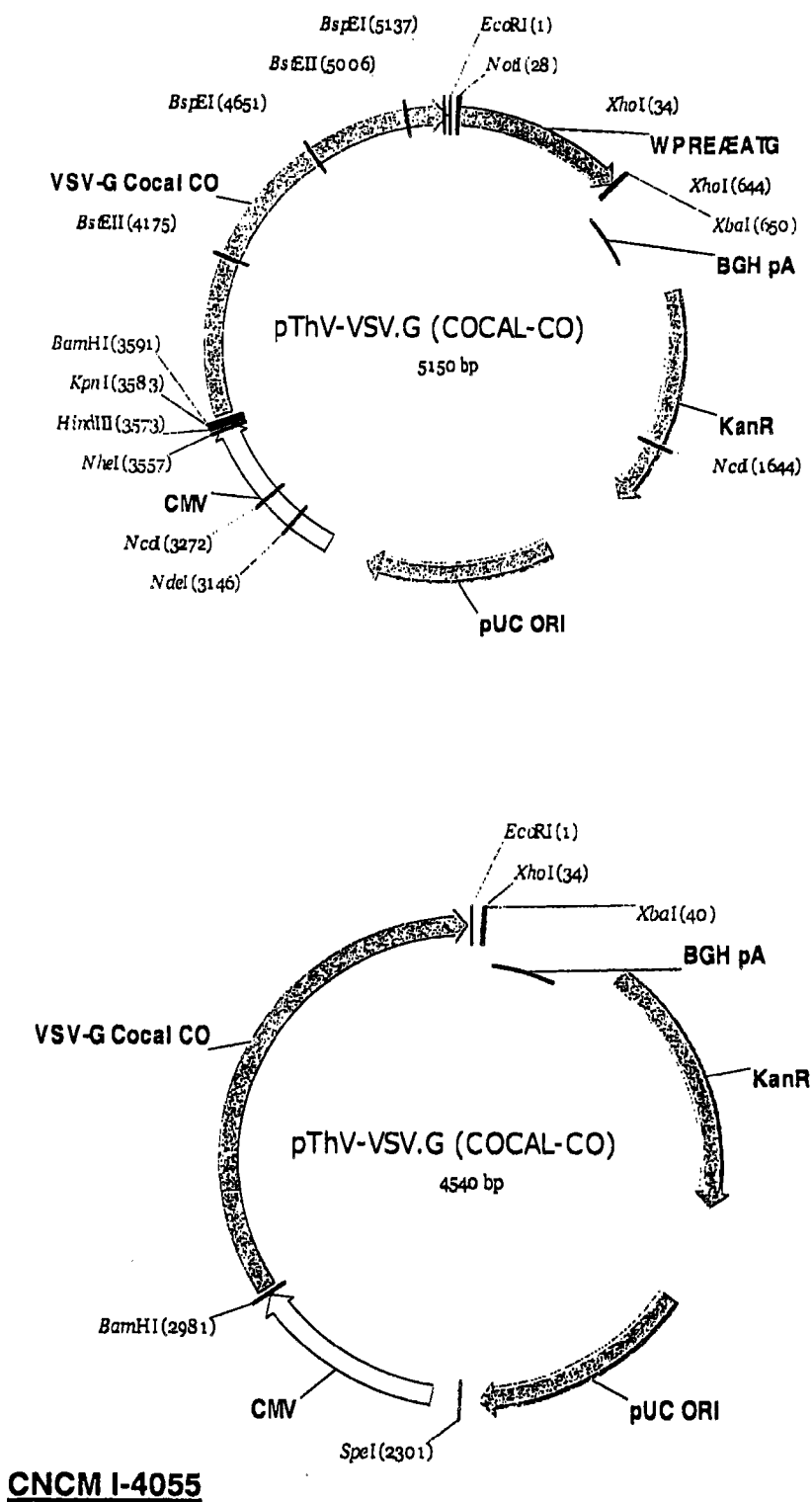


图 9

A.

MTDVTVLGKFQIVFPDQNELEWTVVVGDSTRHCPOSSEMQFDGSRSQITLTGKAPVGITPSKSDGFICHAA
 KWVTTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCXYATVTDSEAMLVQVTP
 HHVGVDDYRHWIDPLFPGGECSTNFCDTVHNSVWIPKSOQTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDR
 FAFHSAYHPNMPGSTVCIMDFCEQKGLRFTNGEWMGLNVEQSIREKKISAI FPNCVAGTEIRATLESEG
 ARTLTWETQRM LDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLS PRAPGKGMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWID
 YGEMKEIKGGRGEYSKAPELLWSQWDFGPFKIGPNLLHTGKTFKPLYLIGAGI IDEDLHELDEAAP
 IDHPQMPDAKSVLPEDEEIFFGDTGVSKNPIELIQGWF SNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLN
 CLWRPRKKRIVRQEV DVESRLNHFEMRGFPEYVKR (GenBank # D26175)

B.

BanHI

1 GGGCGCGCGG ATCTGATCA GCCACCA TGA CCGATACAGT GCTGGCAAG TTCAGATCG TGTTCGCCA CCAGAACGAG CTGGAATGGA CCCCCTCGT
 CCGCGCGGCC TAGACTAGT CCGTGGTACT GGCTATGTCA CGACCCGTTT AAGGTCTAGC ACAAGGGGCT GGTCTTGCTC GACCTTACCT GGGGGCAGCA
 101 GGGCGCAGCC CCGCATTGCC CTCAGTCCAG CGAGATGCAG TTCCGACGGA GCAGAAGCCA GACCATCCTG ACCGGCAAG CCCCCTGGG CATTACACCC
 CCGCTGCTCG GCCCTAACCG GAGTCAGGTC GCTCTACGTC AAGCTGCCGT CGTCTCGGT CTGGTAGGAC TGGCCGTTC GGGGGCACCC GTAGTGTGGG

201 S K S D G F I C H A A K W V T T C D F R W Y G P K Y I T H S I H H L .
 AGCAAGAGCC ACCGGTTCAT CTGCCACGCC GCCAAGTGGG TGACCACCTG CGACTTCGGG TGGTACGGCC CCAAGTACAT CACCCACAGC ATCCACCACC
 TCGTCTCGC TGGCAAGTA GACGGTCCGG CCGTTCACCC ACTGGTGCAC GCTGAAGGCC ACCATGCCGG GGTTCATGTA GTGGGTGTC TAGTGGTGG
 R P T S D C E T A L Q R Y K D G S L I N L G F P P E S C G Y A T .
 TCGGGCCAC CACCTCCGAC TGCAGACAG CCCTGCAGCC GTACAAGGAC GGCAGCCTGA TCAACCTGGG CTTCCTCCC GAGAGCTGG GCTACGCCAC
 ACCCGGGTG GTGGAGGCTG ACGTCTGTC GGGACGTCG CATGTCCCTG CCGTCGGACT AGTTGGACC GAAGGGAGG CTTCGACCC CGATCGCGTG

401 V T D S E A M L V Q V T P K H V G V D D Y R G H W I D P L F P G G .
 COTGACAGC AGCGAGGCCA TGCTGGTGCA GGTGACCCCC CACCACCTGG GCGTGGACGA CTACCGGGCC CACTGGATCG ACCCCCTGTT CCGTGGCGCC
 GCACCTGCTG TCGCTCCGT ACGACCCAGT CCACTGGGGG GTGGTGACC CGCACCTGCT GATGCCCCCG GTGACCTAGC TGGGGACAA GGGACCGCCG

501 E C S T N F C D T V H N S S V W I P K S Q K T D I C A Q S F K N I K .
 GAGTCAGCA CCAATTTCTG CGATACCGTG CACAACAGCA CCGTGTGGAT TCCCAAGAGC CAGAAAACCG ACATCTCGCC CCAGAGCTTC AAGAATCA
 CTCACGCTGT GGTAAAGAC GCTATGGCAC GTGTGTCTGT CGCACACCTA AGGGTCTCTG GTCMTTGGC TGTAGAGCGG TCTCTGTAGT

601 M T A S Y P S E G A L V S D R F A F H S A Y H P N M P G S T V C I .
 AGATGACCCG CAGCTACCCC AGCGAGGGAG CCCTGGTGTG CGACCCGTTT GCCTTCCACA GCGCTACCA CCCCAGCATG CCGCCAGCA CCGTGTGCT
 TCTACTGGG TCGCTCCCTG TCGCTCCCTG GGGACACAG CCGGAGTGGT CCGGATGGT GGGGTGTGAC GGGCGTCTG CCGACACGTA

701 M D F C E Q K G L R F T N G E W M G L N V E Q S I R E K K I S A I .
 CATGGATTTC TCGGAGCAGA AGGGCCTGGG GTTCAACCAAC GCGAGTGGTA TGGCCCTGAA CGTGGAGCAG AGCATCCGGG AGAAGAAGT CAOCGCCATC
 GTACTAAAG ACCTCGCTCT TCCCGGAGCC CAAGTGGTTG CCGCTCACCT ACCCGGACTT GCACCTCGTC TCGTAGGCC TCTCTCTTA GTGGCGGTAG

801 F P N C V A G T E I R A T L E S E G A R T L T W E T Q R M L D Y S L .
 TGTCCAGAA CACCTGGAC AAGCTGTCCC GGAAGAGCC TCTGTCCCC CTGGACCTGA GCTACCTGAG CCGTAGAGCC CCGGCAAG GCATGGCCTA
 AAGGGTTGA CCGACCCGCC GTGGCTTAG GCGCGGTGG ACCTTAGGCT CCGCGGTC TGGGACTGGA CCCTCTGTGT CCGCTACGAC CTGATGTCGG

901 C Q N T W D K V S R K E P L S P L D L S Y L S P R A P G K G M A Y .
 ACAGGCTCTT GTGGACCTG TTCCACAGGG CCTTCTCCG AGACAGGGG GACCTGGACT CGATGGACT GGGATCTCGG GGACCGTTCC CDTACCGGAT

1001 T V I N G T L H S A H A K Y I R T W I D Y G E M K E I K G G R G E .
 CACCGTATC AAGGCCACC TGCACAGCC CCACGCCAAG TATATCCGGA CCTGGATCGA CTACGGCGAG ATGAAAGAGA TCAAGGGCGG CAGGGCCGAG
 GTGGACTAG TTGGCTGGG ACGTGTCCG GGTGCGGTT ATATAGCCCT GGACCTAGCT GATGCCGCT TACTTCTCT AGTTCGCCCC GTCCCGCTC

1101 Y S K A P E L L W S Q W F D F G P F K I G F N G L L H T G K T F K F .
 TACAGCAAG CCGCTGAGCT GCTGTGGAGC CAGTGGTTCG ACTTCGGCCC CTTCAAGATC GCGCCCAACG GCTGCTGCA CACCGCAAG ACCTCAAGT
 ATCTCGTTC GGGACTCGA CGACACCTCG GTCAACCAAG TGAAGCCGG GAATCTTAG CCGGGGTTC CCGACGACCT GTGGCCCTTC TGAAGTTCA

1201 P L Y L I G A G I D E D L H E L D E A A P I D H P Q M P D A K S .
 TCCCTCTGTA TCTGATCGA GCGGCATCA TCGACGAGGA CCTGGACGAG CTGGAGCAAG CCGCCCTAT CAGACACCC CAGATGCCCG ACGCAAGAG
 AGGGAGACAT AGACTAGCT CCGCCGTAGT AGTCTCTCT GGACGTGCT GACTGTCTT GCGGGGATA GCTGGTGGG GTCTACGGG TCGGTTCTC

1301 V L P E D E E I F F G D T G V S K N P I E L I Q G W F S N W R E S .
 CGTCTGCCC GAGGACGAG AAATCTTCTT CCGCGACACC GCGGTGAGCA AGAACCCAT CGAGCTGATC CAGGCTGGT TCAGCAACTG CCGCGAGAGC
 GCACGACGG CTCTGCTCC TTAGAAGAA GCGGTGTGG CCGCACTCT TCTTGGGTA GCTCGACTAG GTCCCGACA AGTCTGTGAC CCGCCCTCTC

1401 V M A I V G I V L L I V V T F L A I K T V R V L N C L W R P R K K R .
 GTGATGCCA TCGTGGGAT CGTGCTGCT ATCTGTGTGA CCTTCTGGC CATCAAGACC GTGGGGTGC TGAAGTCCCT GTGGCGCCC AGGAAGAAAG
 CACTACCGGT AGCACCCGTA GCACGACGAC TAGCACCACT GGAAGGACCG GTAGTCTGG CACGCCACG ACTTGACGGA CACCGCCCG TCTTCTTGG

EcoRI

1501 G G A T C G T C G G C C A G A A G T G A C G T C G A G A G C C G C T G A A C C A C T C G A G A T G A G A G C C T C C C G A G T A C G T G A A G C C G C G T G A A G A A T T A A
 C T A G C A G C C G T C C T C A C C T G C A G C T C G G C C G A C T G T G A A G C T T A C T C T C C G A A G G G G C T A T G C A C T T C G C C A C T A C T A C T C T T A A G A A T T A A T T

C.

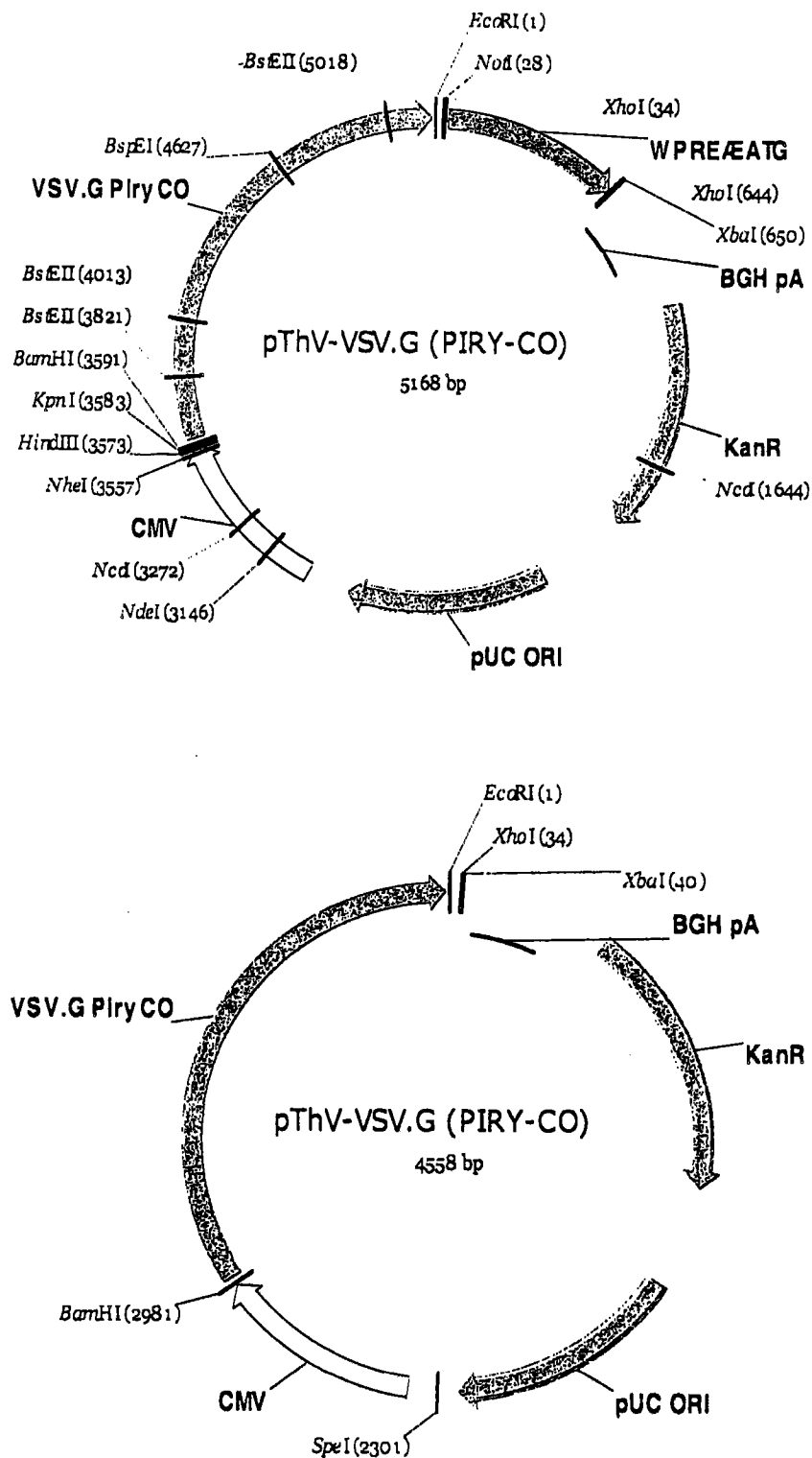


图 10

A.

MTSVLFMVGVLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLWKPVLKGRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVP
 IPTPSNSDGYLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFP
 PESCGYASITDSEFYVMLVTPHPVGVDDYRGRHWVDPLFPTSECNSNFCETVHNATMWI
 PKDLKTHDVCSDQDFQIRVSVMPQTKPTKGADLTLKSKFHAKMKGDRVCKMKFCNKNGLR
 LRLNGEWIEVGVDEVMLDNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGVQ TALWETDRL
 LDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRSPGKGMAYI VANGSLMSAPARYIRVWID
 SPILKEIKGKESASGIDTVLWEQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFPL YLLGMGIVDQD
 LQELSSVNPVDHPHVPIAQAFVSEGEVFFGDTG11VSKNPIELISGWFSW
 KETAALGFAAISVILIIGLMRLPLLCRRRKQKKVIYKDVELNSFDPRQAFHR (genBank # AJ810084)

B.

BarH2

1 GGCSCCCGG ATCCTGATCA GCCACCATGA CGGATACAGT GCTGGGCAAG TTCAGATCG TGTTCGCCA CCAGAACGAG CTGGAATGGA CCCCGTCTG
 CCGCGCGGCC TAGGACTAGT CGGTGGTACT GGCATGTCA CGACCCGTTT AAGTCTAGC ACAAGGGGCT GGTCTTCTC GACCTTACCT GGGGGCAGCA
 G D S R H C P Q S S E M Q F D G S R S Q T I L T G K A P V G I T P
 101 GGGCGACAG CCGCATGCC CTCAGTCCAG CGAGATGCAG TTCGACGGCA GCAGAAGCCA GACCATCTG ACCGGCAAG CCCCGTGGG CATCACACC
 CCCGCTCTG GCGTAACGG GAGTCAGGTC GCTCTACGTC AAGCTCCGCT COTCTTCGGT CTGGTAGGAC TGGCCGTTC GGGGGCACCC GTAGTGTGGG
 S K S D G F I C H A A K W V T T C D F R W Y G P K Y I T H S I H H L
 201 AGCAAGCGC ACGGCTTCAI CTGCCACGCC GCCAAGTGGG TGACCACCTG CGACTTCCGG TGGTACGGCC CCAAGTACA CACCCACAGC ATCCACACC
 TCGTTCCTG TCCGGAAGTA GACGGTCCGG CGGTTCACCC ACTGGTGGAC GCTGAAGGCC ACCATGCCGG GGTTCATGTA GTGGGTCTG TAGGTGTGG
 R P T T S D C E T A L Q R Y K D G S L I N L S F P P E S C G Y A T
 301 TCCGGCCAC CACTCCGAC TCCGAGACAG CCCGACCGC GTACAAGAC GGCAGCCTGA TCAACCTGG CTTCCCTCC GAGAGCTGG GCTACGGAC
 ACGCCGGTG GTGGAGGCT ACCGCTCTGTC GGGACGTCGC CATGTCTCTG CCGTCGGACT AGTTGGACCC GAAGGGAGGG CTCTCCGACG CGATCGGGT
 V T D S E A M L V Q V T P H H V G V D D Y R G H W I D P L F P G G
 401 CGTGACAGAC AOCGAGGCA TGCTGGTGCA GGTGACCCCC CACCACCTGG GCGTGGACGA CTACCCGGGG CACTGGATCG ACCCCCTGT CCCTGGCGG
 GCACTGTCTG TCGCTCCGCT ACGACCACGT CCACCTGGGG GTGGTCGACC CGACCTGCT GATGGCCCG GTGACCTAGC TGGGGACAA GGGACCCCG
 E C S T N F C D T V H N S S V W I P K S Q K T D I C A Q S F K N I K
 501 GAGTGCAGCA CCAATTCCTG CGATACCCTG CACAACAGCA CGGTGTGGAT TCCCAAGACC CAGAAAACCG ACATCTGCC CCAGCCCTTC AAGAATCA
 CTCACCTCTG GGTAAAGAC GCTATGCCAC GTGTGTCTGT CGCACACCTA AGGGTCTCG GTCTTTTGG TGTAGACGG GGTCTCGAAG TCTCTGTAGT
 M T A S Y P S E G A L V S D R F A F H S A Y H P N M P G S T V C I
 601 AGATGACCG CAGCTACCC AGCGAGGGAG CCCTGGTGTG CGACCCGTTT GCTTCCACA GCSCCTACCA CCCCAACATG CCCCGCAGCA CCGTGTGAT
 TCTACTGCTG TCGCATGGG TCGCTCCCTC GGAACACAG GCGAAGGTGT CCGGAATGAT GGGGTGTAT GGGCCGCTG GGCACAGTA
 M D F C E Q K G L R F T N G E W M G L N V E Q S I R E K K I S A I
 701 CATGGAATTC TCCGAGGACA AGGGCCTGG GTTCACCAAC GCGGAGTGA TGGCCCTGAA CGTGGAGCAG AGCATCCCG AGAAGAGAT CAGCGCCATC
 GTACCTAAG ACGCTGCTT TCCGGACCG CAAGTGTGTG CCGCTCACCT ACCCGGACTT GCACCTCTG TCTAGGCC TCTTCTCTA GTCCGGGTG
 F P N C V A G T E I R A T L E S E G A R T L T W E T Q R M L D Y S L
 901 TTCCCAACT CCGTGGCGG CACCGAGATC CCGGCCACCC TGAATTCGA GGGGCCAGG ACCCTGACCT GGGGACACA CCGGATGCT GCGTACAGC
 AAGGGTGTGA CCGACCCGGC GTGGCTCTAG GCCCGTGGG ACCTTAGGCT CCCCGGTC TGGGACTGA CCCCTGTGT CCGCTACGAC CTGATGTGG
 C Q N T W D K V S R K E P L S P L D L S Y L S P R A P G K G M A Y
 901 TGTGCCAGA CACCTGGAG AAGGTGTCC GGAAGAGCC TCTGTCCCC CTGGACCTGA GCTACCTGAG CCTAGAGCC CCGGCAAGG GCATGGCCTA
 ACACGGTCTT GTGGACCCGT TTCACAGGG CCTTCTCCG AGACAGGGGG GACCTGGACT CGATGGACT GGGATCTCG GACCCGTTC CGTACCCGAT
 T V I N G T L H S A H A K Y I R T W I D Y G E M K E I K G G R G E
 1001 CACCGTATC AACGACACC TGCACAGCG CCACGCAAG TATATCCGA CCGGATCGA CTACGGCGAG ATGAAAGAGA TCAAGGGCGG CAGGGCGAG
 CTGGCACTAG TTGCGTGGG ACGTGTCCG GGTGCGGTTT ATATAGGCTT GGAACCTAGT GATGCCGCT TACTTCTCT AGTTCGCCG GTCCCGGCT
 Y S K A P E L L W S Q W F D F G P F K I G P N G L L H T G K T F K F
 1101 TACAGCAAG CCCCTGAGCT GCTGTGGAGC CAGTGGTTCG ACTTCGGCC CTTCAGATC GGGCCCAAG GCTGTGCA CACCCGCAAG ACCTTCAAGT
 ATGTCTGTCC GGGGACTCGA CGACACCTCG GTTACCAAGC TGAAGCGGG GAAATTTAG CCGGGTTCG CGGACGACT GTGGCCGTT TGAAGTTCA
 F L Y L I G A G I I D E D L H E A A P I J H P Q M P D A K S
 1201 TCCCTCTGTA TCTGATCGGA GCCGGCATCA TCGACAGGA CCGTGCAGAG CTGGACGAAG CCGCCCTAT CGACACCCC CAGATCCCG ACGCAAGAG
 AGGGAGACAT AGACTAGCT CCGCCGTAGT AGCTGTCTCT GGCATGCTC GACCTGCTT GCGGGGATA GCTGTGGGG GTCTACGGGC TCGGTTCTC
 V L P E D E E I F F G D T G V S K N P I E L I Q G W F S N W R E S
 1301 CBTGCTGCC GAGGACGAG AAATCTCTT CCGCGACACC GCGTGGACA AGAACCCAT CGAGCTGAT CAGGGCTGT TCAGCAACT GCGGGAGAGC
 GCACGACGG CTCTCTCTC TTTAGAAGAA GCGCTGTGG CCGCACTCT TCTTGGGTA GCTCQACTAG GTCCCGACA AGTCTGTGAC CGCCCTCTG
 V M A I V G I V L L I V V T F L A I K T V R V L N C L W R P R K K R
 1401 GTGATGCCA TCGTGGCAT CBTGCTCTG ATCTGTGTGA CCTTCTGCG CATCAAGACC GTGCGGGTGC TGAACCTGCT GTGGCCGCC AGGAAGAAAC
 CACTACCGT AGCACCCGA GCACGACGAC TAGCACCACT GGAAGGACCG GTAGTCTGG CACGCCACG ACTTGACGGA CACCCCGGG TCTTCTTPT
 I V R Q E V E V E S R L N H F E M R G F P E Y V K R * *
 1501 GGATCGTCC GCGAAGTG GACGTGAGA CCGCGTGA CCACCTCGAG ATGAGAGCT TCCCGAGTA CGTGAAGCG TGATGAAAT TCTTAATTA
 CCTAGCAGC CBTCTCTAC CTGCAGCTCT CCGCCGACTT GGTGAAGCT TACTCTCCGA AGGGCTCAT GCACTTCCC ACTACTCTTA AGAATTAAT

Score

C.

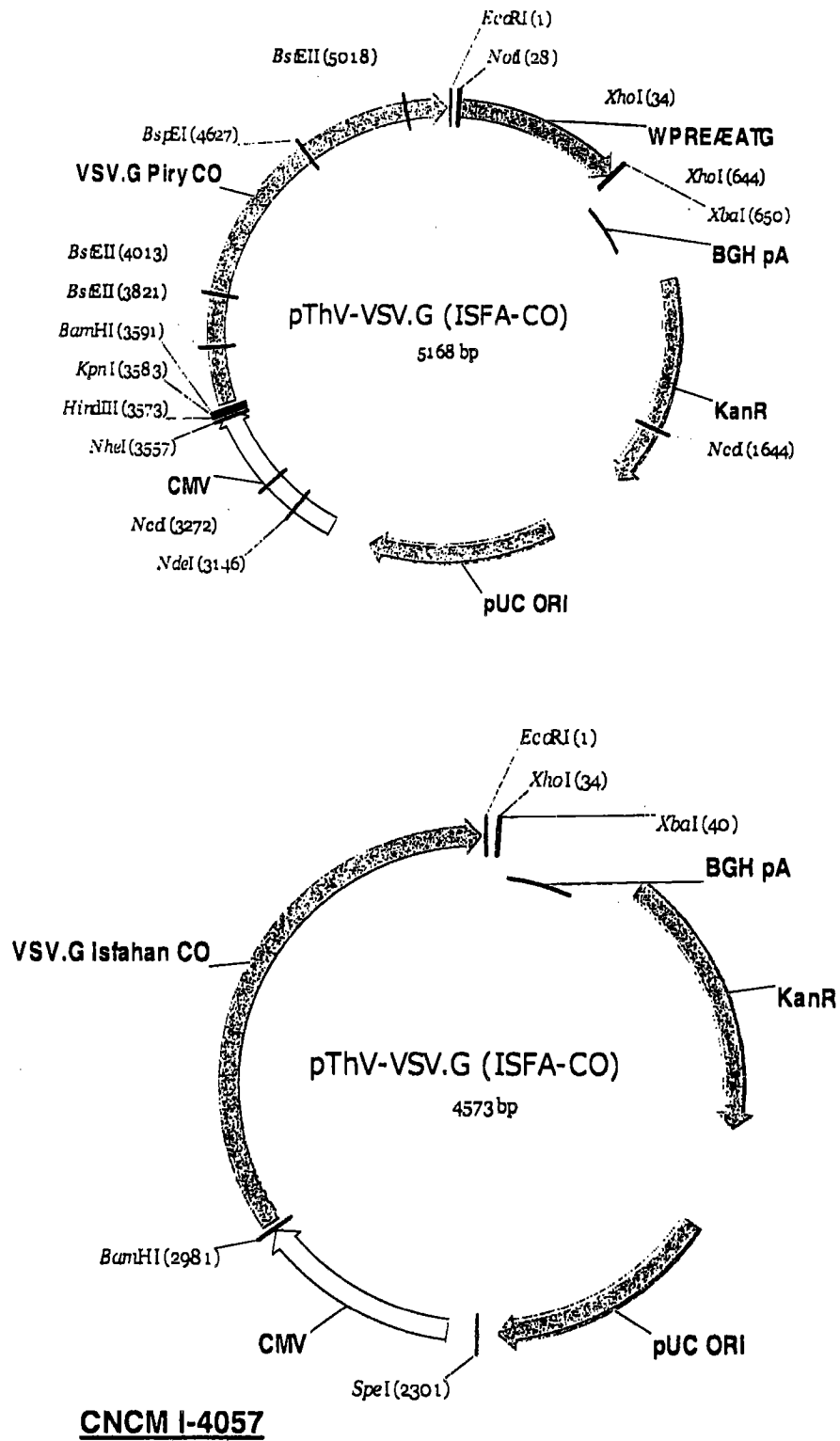


图 11

A.

MSIISYIAFLLLIDSTLGIPIFVPSGQNIWQPVIPFDYQCPHGNLPTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVSGW
 ICHAAEWKTTCDYRWYGPQYITHSIHPISPTIDECKRIISRIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTTVSNTNYKVVP
 SVHLEPYGGHWIDHDFNGGECREKVCCEMKNHSIWITDETQHECEKHIEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNFIDK
 HHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKIFTRGDWVEKTAGTLTNIYENIPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYT
 LCEGTRKINKQEKLTVDLSYLA PRIGGGFVSFRVRNGLTLEGGSTTYIRIEVEGPPVDSLNGIDPRTNASRVFW
 DDWELDGNIQGFNGVYKGDGKIHIPLNMIESGIIDDELQHAFAQADIIPHPHYDDEIREDDIFFDNTGENGNP
 VDAVVEWVSGWGTSLKFFGMTLVALILIFLLIRCCVACTYLMKSKRPATESHEMRSLV (GenBank
 #AAZ20272)

B.

BankI
 1 GGGCGCCGG ATCCGTGATCA GCCACCATGA GCATCATCAG CTATATCCGC TTTCTGCTGC TGATCGACAG CACCCTGGGC ATCCCATCT TCGTGCCAG
 CCGCGCGCC TAGGACTAGT CGGTGCTACT COTAAGTATC GATATAGCCG AAAGACGACG ACTAGCTGTG GTGGGACCCG TAGGGGTAGA AGCAGCGGT
 101 . G Q N I S W Q P V I Q P F D Y Q C P I H G N L P N T M G L S A T K
 CGGCCAGAAC ATCAGCTGGC AGCCCGTAT CACAGCCCTC GACTACCACT GATCTGCCAC CGGCAACCTG GCAAAACCA TGGCCCTGAG CGCCACCAAG
 GCGCGTCTTG TAGTCGACCG TCGGGCACTA GGTGCGGAAG CTGATGGTCA CCGGGTAGGT CCGCTTGGAC GGGTGTGTT ACCCGGACTC CGGTGTGTT
 201 L T I K S P S V F S T D K V S G W I C H A A E W K T T C D Y R W Y G .
 CTGACCATCA AGAGCCCGAG CGTGTTCAGC ACCGACAAGG TGTCCGGCTG GATCTGCCAC GCGCCGAGT GCAAAACCA CTTCCGACTC CGGTGTGTT
 GACTGATAGT TCTGGGGTTC GCACAAGTCG TGGCTGTTC ACAGCCCTAC CTAGACGGTG CCGCCGCTCA CCTTTTGGTG GACCGTATG GCCACCATGC
 301 . P Q Y I T H S I H P I S P T I D E C K R I I S R I A S G T D E D L .
 GCCCCAGTA CATCACCAC AGCATCCACC CCATCAGCCC CACCATCGAC GAATGCAAGC GGATCATCAG CCGATCGCC AGCCGACCG ACAGGAGCT
 CCGGGTCTAT GTAAGTGGTG TCGTAGGTGG TGTAGTCTGG GATAGTCTGG CTACAGTTCG CCTAGTAGTC GGCCTAGCGG TCGCCGTGGC TGCTCTGGA
 401 . G F P P Q S C G W A S V T T V S N T N Y K V V P H S V H L E P Y G
 GGGCTTCCCA CCCCAGAGCT GCGGCTGGGC CAGCGTACCC ACCGTGAGCA ACACCAACTA CAAGGTGGTG CCCCACAGCG TGCACCTGGA ACCCTACCGC
 CCGGAAGGTT GGGTCTCGA CCGCGACCCG GTCCGACTGG TGGCACTCTG TGTGGTTGAT GTTCCACCAC GGGGTGTCCG ACGTGGACCT TGGGATGCCG
 501 G H W I D H D F N G G E R E K V C E M K G N H S I W I T D E T V Q .
 GGCCACTGGA TCGACCACGA CTTCAACGCG GCGGAGTCC GGGAGAAAGT GTGCGAGATG AAGGGCAACC ACAGCATCTG GATCACCAGC GAGACACCA
 CCGGTGACCT AGCTGTGTTG GAAGTTCGGC CCGCTCACGG CCGCTCTTCA CACCGTCTAC TTCCCGTGGG TGTCTAGACG CTAGTGGGTG CTCTGTCCAG
 601 . H E C E K H I E E V E G I M Y G N A P R G D A I Y I N N F I I D K .
 AGCAGAGTG CAGAAAGCAC ATCGAGGAAG TGGAGGGCAT CATGTACGGC AACSCCCCA GGGCGGACGC CATCTACATC AACAACTCA TCACTGACAA
 TCGTCTCTAC GCTCTCTAGT TAGCTCCTTC ACCTCCCGTA GTACATCGCC TTGCGGGGT CCCCCTGCGG GTAGATGTAG TTGTTGAAGT AGTAGCTGT
 701 . H H R V Y R F G G S C R M K F C N K D G I K F T R G D W V E K T A
 GCACCACCGG GTGTACCGCT TCGCCGGCTC CTGCGGATG AAGTTCGTCA ACAAGGACGG CATCAAGTTC ACCAGAGCGG ACTGGGTGGA GAAAACCCCG
 CCGTGTGGCC CACATGGCCA AGCCGCGGAG GAGCGCCCTAC TCAAGAGACT TGTCTCTGCC CCTAGTCTGC GTAGTCTAAG TGTCTCTCCG TGACCCCACT CTTTGGCGG
 801 G T L T N I Y E N I P E C A D G T L V S G H R P G L D L I D T V F N .
 GGCACCTGTA CCAACATCTA CGAACAATC CCGAGTGGC CCGACCGGAC ACTGTGTCC GGGCACAGAC CCGGCTGGA CCTGATGACG ACCGTGTCTA
 CCGTGGAGTT GGTGTAGAT GCTCTTGTAG GGGTCAACCG GCGTCCCGTG TGACCAAGCG CCGGTGTCTG GCGCCGACCT GGACTAGCTG TGGCACAAGT
 901 . L E N V V E Y T L C E G T K R K I N K Q E K L T S V D L S Y L A P .
 ACCTGGAAAA CGTGGTGGAG TACACCCTGT CAGAGGGCAC CAAGCGAAG ATCAACAAGC AGGAAAAGCT GACCAGCTC GACCTGAGCT ACCTGGCCCC
 TGGACCTTTT GCACCACCTC ATGTGGGACA CCGTCCCGTG GTTCCCTTTC TAGTGTCTCG TCGTCTTGA CTGGTCCGAG CTGGACTCGA TGGACCAGGG
 1001 . R I G G F G S V F R V R N G T L E R G S T T Y I R I E V E G P V V
 CAGGATCGGC GCGTTCGGCA GCGTGTCTCC CGTGCGGAAT GGGACCTGG AAAGAGGAAG CACAACATAC ATTCCGATCG AAGTGGAAAG CCCCCTGTGT
 GTCTAGCCG CCGAAGCCGT CGCACAAGGC GCACGCCTTA CCGTGGGACC TTTCTCTTC GTGTGTATG TAAGCTAGC TTCACCTTCC GGGCCACCAC
 1101 D S L N G I D P R T N A S R V F W D D W E L D G N I Y Q G F N G V Y .
 GACAGCTGA ACAGCATCGA CCCCAGGACC AACGCCAGCC GCGTGTCTG GGACGACTGG GAGCTGGAGC GCAACATCTA CCAGCGCTTC AATGGCTGT
 CTGTCCGACT TCCCTAGCT GGGGCTGG TTCCGGTCCG CCCAAGAGC CCGTCTGACC CTGACCTGC CTTTGTAGAT GGTCCCGAAG TTACCCGACA
 1201 . K G K D G K I H I P L N M I E S G I I D D E L Q H A F Q A D I I P .
 ACAAGGCAAA GGATGGCAAG ATCCACATCC CCTGAACAT GATCGAGAGC GGCATCATCG ACAGCAGCT GACAGCAGCC TTCCAGGCGG ACATCATCCC
 TGTTCCTGTT CCTACCTTC TAGGTGTAG GGGACTGTGA CTAGCTCTCG CCGTAGTAGC TGCTGCTGCA CCGTGTCCG AAGCTCCGCG TGTAGTAGGG
 1301 . H P K Y D D D E I R E D D I F F D N T G E N G N P V D A V V E W
 CCACCCACAC TACGACGAGC ACGAGATCCG GGAGGACGAC ATCTTCTTCC ACAACACCGG CGAGAACCGC AACCCCGTGT ACGCCCTGTT GGAATGGGTG
 GCTGGGGTGT ATCTCTCTCC TCTCTAGCC CTTCTCTCTG TAGAAGAAGC TGTCTGGCC GCTCTTCCG TTGGGGACCC TGGGGACCA CTTTACCCAC
 1401 S G W G T S L K F F G M T L V A L I L I F L L I R C C V A C T Y L M .
 TCCGGATGGG GCACCAGCCT GAAGTCTTTC GGCATGACCC TGGTGGCCCT GATCTGATC TTCTGCTGA TCCGGTGTG CCGTGGCTGC ACCTACCTGA
 AGGCTACCC CCGTGTGGGA CTTCAAGAA GCGTACTGG ACCACCGGGA CTAGGACTAG AAGGACGACT AGGCCACGAC GCACCGGACG TGGATGGACT
 EcoRI
 1501 . K K S K R P A T E S H E M R S L V * *
 TGAAGAAGAG CAAGAGCCG GCCACCGAGA GCCACGAGAT CCGAGCCCTG GTGTGATGAG AATCTTAAAT TAA
 ACTTCTCTC GTTCTCCGG CCGTGGCTCT CCGTGTCTTA CCGCTCGGAC CACACTACT TTAAGAAATA ATT

C.

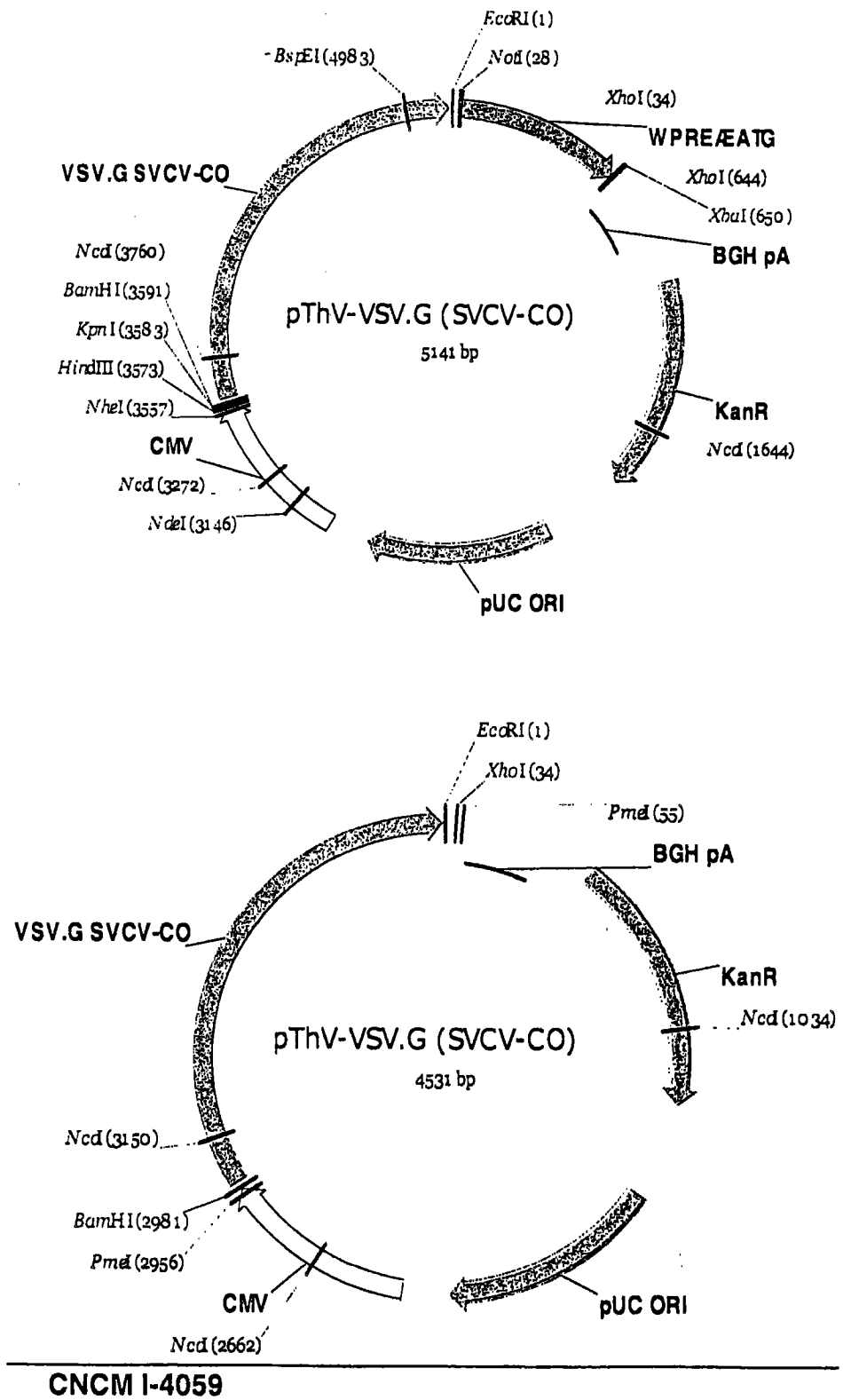


图 12

1- Indiana PCR 片段

VSV-G_{Indiana} 序列 (优化密码子)

BamH1
 5' CTGGGATCCTGATCAGCCACCATGAAAATGCCTGCTCTATCTGGCCTTCCTCTTTATCGGCCTGAACTGTAAGTTCACGATC
 GTGTTTCCCACAAATCAGAAGGGAAACTGGAAGAACGTCCCAGCAACTACCACTACTGCCCTAGCTCAAGCGACCTGAACTG
 GCACAACGACCTGATCGGCACCGCTATCCAGGTGAAGATGCCAAGAGCCACAAGGCCATCCAAGCCGACCGGTGGATGTGTC
 ACGCCAGCAAATGGGTGACGACGTGCGATTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACCCAAATCCGCTCATTACACCC
 AGCGTGAGCAATGTAAGGAGAGCATCGAGCAGACCAAGCAGGGGACCTGGCTCAACCCCGCTTCCCACCGCAAAGCTGCGG
 ATACGCCACCGTGACCGACCGTGAGGCCGTCTCGTGCAGGTGACCCCGCACCACGTGCTGGTGGACGAGTACACCGGCGAGT
 GGGTGGATTACAGTTTATCAACGGAAAGTGTAGCAATTACATCTGCCCCACCGTGACACAACAGCACCACCTGGCACTCAGAC
 TATAAGGTGAAGGGCCTCTGGCAGCAATCTGATCTCAATGGACATCACCTTCTTTAGCGAAGACGGCGAACTCTCAAGCCT
 CCGGAAGGAAGGCACCGGGTTCGCGACAACTACTTTGCTTACGAAACCGGGCGGCAAGGCCTGCAAGATGCAATACTGCAAGC
 ACTGGGGCGTGGCCCTGCCAAGCGCGTGTGGTTTGGATGGCTGATAAGGACCTGTTTCGCCGCTGCCCGTTCGCCGAAATGC
 CCCGAGGGGAGCAGCATCAGCGCCCCAGCCAGACATCAGTGACGTGAGCCTGATCCAGGATGTGGAACGCATCCTGGACTA
 CAGCCTGTGTGACGAAACGTGGAGCAAGATCCGCGCCGACTGCCTATCAGCCCCGTGGATCTCAGCTACCTGCCCCAAAGA
 ACCCAGGCACCGGACCGCCTTTACAATCATCAACGGCACCTGAACTACTTTGAAACACGCTACATCCCGGTGACATCGCC
 GCTCCCATCCTCTCAGCATGTTGGGCATGATCTCAGGACGACACCGGAGCGCGAGCTGTGGGATGACTGGGCCCCGTATGA
 AGATGTGGAGATCGGACCTAACCGCGTGTGCGCACATCAAGCGGGTACAAGTTCGCCGTGTACATGATCGGCCACGGCATGC
 TGGACAGCGACCTGCACCTCAGCTCAAAGGCCAGGTCTTTGAGACCCACACATCCAGGACCTGCCAGCCAGTCCCGGAC
 GACGAAAGCCTGTCTTTGGAGATACAGGGCTCAGCAAGAACCCATCGAGCTGGTTCGAGGGCTGGTTCCTAAGCTGGAAGAG
CAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCTCATCATCGGGCTGTTTCTGGTGCTGCCGCTCGGCATCCACCTGTGCATCA
 AGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCAGATATCCA
 GCA-3'

EcoR1

寡核苷酸 Indiana

- 1 (5'-AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGG-3')
- 2 (5'-GCTGGATATCTGCAGAACTCTTACTTCCCCAGGCG-3')

PCR 片段 (160bp):

Indiana 跨膜结构域
 5' AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCTCATCATCGGGCTGTTTCTGGTGCTGCCGCTCGGCATCCACCTGTGC
 ATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCAJ'

2. NewJersey PCR 片段

VSV-G_{NewJersey} 序列 (优化密码子)

BamH1
 5' TACCGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTGCATATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGAT
 CGAAATCGTGTCCCACAAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGGTGCCCCACGAGTACAACCTACTGCCCGACCTCAGCCGACA
 AGAATAGCCACGGCAGCAGACCGGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTCAAGGCTTC
 ATGTGCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGA
 GGAACCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCAACAAGGATGGGGTGGCTTCAACCCCGGCTTCCCGCCCAAT
 CATGTGGCTACGGCACCGTGACCGACGCCGAGGCCACATCGTGACCGGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACA
 GCGAATGGATCGACCCCACTTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGCACAACAGCACCAGTGGTT
 TACGTATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACCTGTTTACGCTCGTGGGCGGCATCTTCTTTAGCGACAGCGAGGAGATCA
 CCAGCATGGGCCTCCCGGAGACAGGAATCCGACGAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTT
 TGCCGCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGATGACCTGTGGTTCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCCGGATCT
 GCCCACATCAAGGACTGTGATCTGTATCAAGCATCATCACCCCGGAGAACACCGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATG
 TGGAGCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCATCACCCAGTGGACCTG
 AGCTATCTCGGCCCAAAGAACCCCGGCTGGGGCCGCTGTTACCATCATCAACGGGAGCCTGCCTACTTTACAAGCAAGTA
 TCTGCGCGTGGAGCTCGAAAGCCAGTATCCCCCGCATGGAGGGGAAGGTGGCCGGGACCCGCATCGTGCAGCAGCTGTGGG
 ACCAGTGGTTCCCTTTTGGCGAGGTGGAATCGGCCCAACGGCGTGTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTTCGCCCTGCAC
 ATCATCGGGACGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCGTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCAGGCTGC
 TCAGACCTTTCTAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGG
 TGAAGGCTGGTTCAGCGGATGGCGTCAAGCCTGATGGGCGTGCCTGGCCGTATCATCGGATTTGTGATCCTGATGTTCCCT
ATCAAGCTGATCGGCGTGTGTAAGCCTGTTCCGCCCTAAGCGCCGCCAATCTACAAGAGCGACGTGAGATGGCCACTT
 TCCTAAGAATTCTGCAGATAT-3'

EcoR1

图 13A

寡核苷酸NewJersey :

- 3 (5'-CGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTC-3')
- 4 (5'-GAATAAATGAAGCGATGCTGCTGCGCCATCCGCTGAACCAGCCTTCCAC-3'),

oligo 4的粗体和加下划线部分对应前28个Indiana跨膜结构域核苷酸

PCR NewJersey (1446bp):

BamH1

5' CGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTGTCATATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGATCGA
AATCGTGTCCCAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGCGTGCCCCACGAGTACAACACTACTGCCCGACCTCAGCCGACAAGA
ATAGCCACGGCACGCAGACCCGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTGAAGGCTTCATG
TGCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGAGGA
ACCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCCGGCTTCCCGCCCCAATCAT
GTGGTACGGCACCGTGACCGACGCGAGGCCACATCGTGACCGTGACACCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACAGGC
CAATGGATCGACCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGACAACAGCACCAGTGGTTTAC
GTCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACCTGTTTACGCTCGTGGCGGCATCTTCTTTAGCGACAGCGAGGAGATCACCA
GCATGGCCCTCCCGAGACAGGAATCCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTTTCG
CGAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCCGCATCTGCC
CCACATCAAGGACTGTGATCTGTTCATCAAGCATCATCACCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATGTGG
AGCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCATCACCCCAAGTGGACCTGAGC
TATCTCGGCCCCAAGAACCCCGGCGTGGGGCCGTTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTATCT
GCGCGTGGAGCTCGAAAGCCAGTCAATCCCGCATGGAGGGGAAGTGGCCGGGACCCGCATCGTGGCCAGCTGTGGGACC
AGTGGTTCCTTTGGCGAGGTGGAATCGGCCCCAACGGCGTGTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTCCCGCTGCACATC
ATCGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGCTCA
GACCTTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGGTGG
AAGGCTGGTTCAGCGGATGGCGAGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTC-3'

Indiana 跨膜结构域

3. 重叠 PCR (1620bp)

利用寡核苷酸2和3进行的PCR

OLIGO 3

BamH1

5' GAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTCATATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGATCGAA
ATCGTGTCCCAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGCGTGCCCCACGAGTACAACACTACTGCCCGACCTCAGCCGACAAGAA
TAGCCACGGCACGCAGACCCGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTGAAGGCTTCATGT
GCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGAGGAA
CCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCCGGCTTCCCGCCCCAATCATG
TGGCTACGGCACCGTGACCGACGCGAGGCCACATCGTGACCGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACAGGCG
AATGGATCGACCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGACAACAGCACCAGTGGTTTACG
TCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACCTGTTTACGCTCGTGGCGGCATCTTCTTTAGCGACAGCGAGGAGATCACCAG
CATGGCCCTCCCGGAGACAGGAATCCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTTTCG
GCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCCGTCGCGCATCGCCC
CACATCAAGGACTGTGATCTGTTCATCAAGCATCATCACCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATGTGGA
GCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCATCACCCCAAGTGGACCTGAGCT
ATCTCGGCCCCAAGAACCCCGGCGTGGGGCCGTTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTATCTG
CGCGTGGAGCTCGAAAGCCAGTCAATCCCGCATGGAGGGGAAGTGGCCGGGACCCGCATCGTGGCCAGCTGTGGGACCA
GTGGTTCCTTTTGGCGAGGTGGAATCGGCCCCAACGGCGTGTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTCCCGCTGCACATCA
TCGGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATACAAGATGGAGCGCTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGCTCAG
ACCTTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGGTGGAA
AGGCTGGTTCAGCGGATGGCGAGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTC
AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCATCATCGGCTGTTTTCTGGTGTG
CGCGTGGCATCCACCTGTGTCATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCTGGG
GAAGTAAGAAATCTGCA]-3'

EcoR1

OLIGO 2

图 13B

A

3601 M T S S V T I S V V L L I S F I T P L Y S Y L S I A F P E N T
 ATG ACCAGCAGCG TGACCATCAG CGTGGTGCCTG CTGATCAGCT TCATCACCCC CCTGTACAGC TACCTGACCA TTGCCCTTCCC CGAGAACACC
 TAC TGGTCTGTCG ACTGGTAGTC GCACCACGAC GACTAGTCCA AGTAGTGGGG GGACATGTCC ATGGACTCCT AACCGAAGGG GCTCTTCTGG

3701 K L D W K P V T K N T R Y C P M G G E W F L E P G L Q E E S F L S S
 AAGCTGGACT GGAAAGCCCGT GACCAAGAAC ACCCGGTACT GCCCAATGG CGGCAGTGG TTTCTGGAAC CCGCCCTGCA GGAAGAGAGC TTCCCTGAGCA
 TTCCGACCTGA CCTTCGGGCA CTGGTCTTGG TGGGCCATGA CCGGGTACCC GCGGCTACCC AAAGACCTTG GCCCGGACGT CCTTCTCTCG AAGGACTCGT

3801 T P I G A T P S K S D G F L C H A A K W V T T C D F R W Y G P K Y
 GCACCCCAT CGCGCCACC CCCAGCAAGA GCGACGGCTT CCTGTGCCAC GCGCCAAAT GGGTGAACAC CTGGACTTC CGGTGTACG GCCCAAGTA
 CGTGGGGTA GCCCGGTGG GGGTGGTCTT CGTGGCCGAA GGACACGGTG CCGCGGTCA CCACTGGTG GACGCTGAAG GCCACCATGC CCGGGTTCAT

3901 I T H S I H N I K P T R S D C D T A L A S Y K S G T L V S L G F P
 CATCACCCAC AGCATCCACA ACATCAAGCC CACCAGAAG GACTGGACA CAGCCCTGGC CTCTTACAAG AGCGGCACC TGGTGTCCCT GGGCTTCCCT
 GTAGTGGGTG TCGTAGGTGT TGTAGTTCGG GTGGTCTTGG CTGACCGCTGT GTCCGGACC GAGATGTYC TCGCCGTGG ACCACAGGGA CCGGAAGGGA

4001 P E S C G Y A S V T D S E F L V I M I T P H H V G V D D Y R G H W V
 CCCGACAGCT GGGCTACGC CAGCGTAGC GACAGCGAGT TCCTGTGAT TATGATTACC CCCCACCACG TGGCGGTGA CGACTACCGG GGCCACTGGG
 GGGCTCTCGA CGCCGATCCG GTCCCACTGG CTGTCCCTCA AGGACCACTA ATACTAATGG GGGTGTGTGC ACCCGCACCT GCTGATGGCC CCGGTACACC

4101 D P L F V G G E C D O S Y C D T I H N S S V W I P A D Q T K K N I
 TGGACCCCTCT GTTCGTGGGA GGGGAATCCG ACCAGAGCTA CTGGATACC ATCCACAAT CCAGCGTGTG GATTCGCCGC GACCAGACCA AGAAGAACAT
 ACCTGGGAGA CAACACCCCT CCCCCTTACCG TGGTCTCCAT GACGCTATGG TAGGTGTGA GGTGGCACAC CTAAGGGCGG CTGGTGTGGT TCCTCTGTGA

4201 C G Q S F T P L T V T V A Y D K T K E I A A G G I V F K S K Y H S
 CTGGCCAG AGCTTACCC CTCTGACCCGT GACCGTGGCC TAGGACAAGA CCAAGAGAT TGCCCGCCGA GGGATCGTCT TCAAGACAA GTACCACAGC
 GACCCCGTTC TCGAAGTGG GAGACTGGCA CTGGCACCCG ATGCTCTTCTT GGTTCCTCTA ACCGGGCCCT CCTAGCACA AGTTCCTGTT CATGGTGTGC

4301 H M E G A R T C R L S Y C G R N G I K F P N G E W V S L M L K L R S
 CACATGGAAG GCGCCAGGAC CTGCAGACTG TCCTACTGG GCGGAAACGG CATCAAGTTC CCCAACGGG AGTGGGTGT CCTGATGCTG AAGCTGCGGA
 CTGTACCTTC CGCGGTCTTG GACGTCTGAC AGGATGACC CCGCCCTTACC GGTTCCTCAAG GGGTGGCCG TCACCCACAG GGACTACGAC TTCGACGCCCT

4401 K R N L Y F P C L K M C P T G I R G E I Y P S I R W A Q V L T S E
 GCAGCGGAA CCTGTACTTC CCCCCTCTGA AGATGTGCC CACCGCATC CCGGGCCGAGA TCTTACCCAG CATCAGATGG CCCCAGGTGC TGACAGGCGA
 CCTTCCCTT GGACATGAAG GGCACGGACT TCTACACCGG GTGGCCGTAG GCCCCCTCT AGATGGGTG GTAGTCTTACC CCGGTCCACG ACTGGTCTGCT

图 14A

. I Q R I L D Y S L C Q N T W D K V E R K E P L S P L D L S Y L A S
 4501 GATCCAGAGA ATCTGGACT ACAGCCTGTG CCAGAACACC TGGACAAAGG TGGACCCCTG AGCCCCCTGG ACCTGAGCTA CCTGGCCAGC
 CTAGGTCCT TAGGACCTGA TGTCCGACAC GGTCTTGTGG ACCCTGTGCC ACCTCGCCTT TCTCGGGGAC TCGGGGGACC TGGACTCGAT GGACCGGTCC

 K S P G K G L A Y T V I N G T L S F A H T R Y V R M W I D G P V L K
 4601 AAGTCCCCG GCAGGGCCT GGCCTACACC GTGATCAACG GCACCCCTGAG CTTCCGCCAC ACCAGATACG TCCGGATGTG GATCGACGGC CCCGTGCTGA
 TTTAGGGGC CTTCCCGGA CCGGATGTGG CACTAGTTGC CGTGGACTC GAAGCGGTG TGGTCTATCC AGCCCTACAC CTAGCTGCCG GGGCAGCACT

 . E P K G K R E S P S G I S S D I W T Q W F K Y G D M E I G P N G L
 4701 AAGAGCCCA GGGCAAGAGA GAGAGCCCCA GCGGCATCAG CAGGCATC TGGACCCAGT GGTTCAGTA CCGGACATG GAAATCGCC CCAACGGCCT
 TTTCCGGGT CCCCTTCTCT CTCTCGGGGT CCCCCTAGTC GTCCCTGTAG ACCTCGGTCA CCAAGTTTCA TCCCGCTGAC CTTTAGCCCG GGTTCGCCGA

 . L K T A G G Y K F P W H L I G M G I V D N E L S E A N P L D
 4801 GCTGAAAACA GCGCGGGAT ACAAGTTTCC TTGGCACCTG ATCGGCATGG GCATCCTGGA CAACGAGCTG CACGAGCTGT CCGAGGCCAA CCCCCTGGAT
 CGACTTTTGT CCGCGGCCTA TGTTCAAAAG AACCGTGGAC TAGCCCTACC CGTAGCACCT GTTCTCGAC GTGCTCGACA GGCCTCCGTT GGGGACCTA

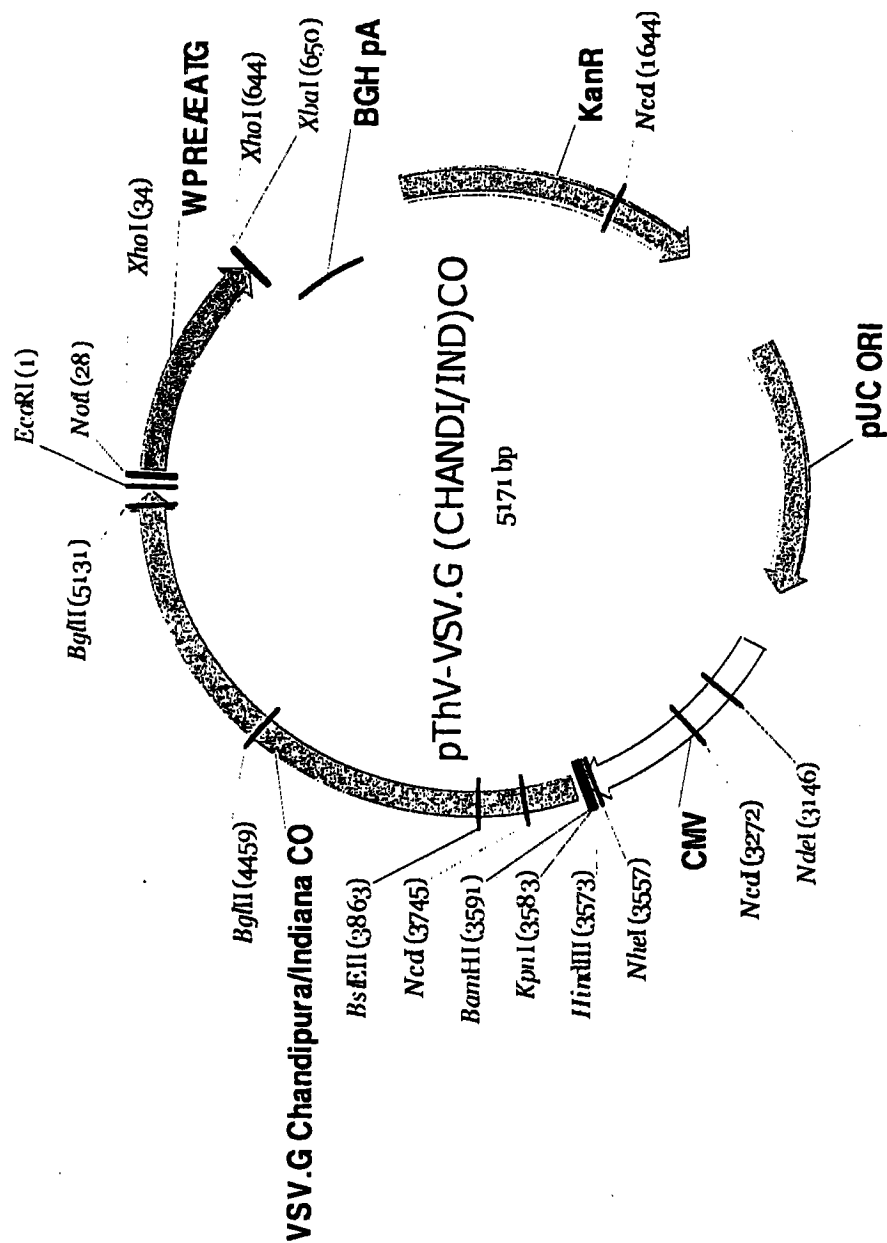
 H P Q L P H A Q S I A D D S E I F G D T G V S K N P V E L V T G
 4901 CACCCACGC TGGCCACGC CCAGAGCAIT GCCGACGACA GCGAGAAAT CTTCTTCGGC GACACCGGC TGAGCAAGAA CCCCCTGGAA CTGGTGACAG
 GTGGGTTCG ACGGGTGG GCTCTCGTAA CCGCTGCTGT CGCTCCTTTA GAAGAAGCCG CTGTGGCCCG ACTCGTTCCTT GGGGCACCTT GACCACTGTC

 . W F T S W K
 5001 GCTGCTAC CACTGGAAA
 CGACCAAGTG GTCGACCTTT



5101

图 14B



B.

图 14C

A.

3601 M N F L L L L T F I V L P L C S H A K F S I V F P Q S Q K G N W
 ATG AAC TTG TGC TGG TAC ATT CAT TTTGCA GGCACGCAAA GTTACAGATC GTTGTCCCC AGACCCAGAA GGGCAACTGG
 TAC TTGAAAGAGC ACCACATCAA GTAGTACCA CAGAGACACT CGGTCCGTT CAAGTCTTAG CAAAGGCGG TTTTGTCTTT CCGTTTAC

 3701 K N V P S S Y H Y C P S S D Q N W H N D L L G I T M K V K M P K T
 AAGAACCTGC CAGCAGCTA CCACTACTGC CCGAGACCA GCGACTAGAA CTGGCAACAG CACTTGTGG; GATTCACAT GAAGGTGAAA ATGTCCTAAGA
 TTCTTGCAGC GGTCTGTGAT GCTCAATGAG CGGTCTGTCT CGTGTCTTT GACCTGTGTC CTTAGTCTTA CTTTCCATTT TACTCGTGTG

 3801 H K A I Q A D G W M C H A A K W I T T C D F R W Y G P K Y I T H S
 CCGACAAAGC CATTCAGCT GACTGCTGGA TGTTCAGCC CGGCAGTGG ATTCACACT GCGACTTCCG GTTGTACCG CCGAACATCA TCCACCCACG
 GGGTGTCCG GTAAGTCTGA CTTCCAGCT ACACGTGGG GCGTTCAC TAGTGTGGA CGCTGGAAGC CACTGTGCG GCGTTCATTT AGTGGGTGTC

 3901 J H S I Q P T S E Q C K E S I K Q T K Q G T W M S P G F P P Q N C
 CATTCAGCTC ATTCAGCTCA CCGCCAGCA GTTCCAAAG AGCATCAAG GCGCACTGG; ATGAGCTCCG GGTTCAGC CCGAACATCA TCCACCCACG
 GTAGTTCAG; TAGTGTGCT GAGGTGTCT CACTTTTCT TCGTAGTTC TCTGTGTC CCGTTCAGT TACTGTGCG CCGAGGCTGG; GGTCTTGC

 4001 G Y A T V T D S V A V V O A T P H H V L V D E Y T G E W I D S Q F
 GGTTCAGCTCA CCGTACCGA CAGGTGGC GTTGTGTTC AGTCAGCC CCGCAGTGG; CTGTTCAGC AGTTCAGCG CCGTGTGATC GACAGCAGT
 CCGATGCTTT GGCATGCTT GTTCCAGCG CAGCCAGC TCCGTGTGG GGTGTGTGC GACCAGTTC TCAATGTGCG GCTCACCTTAG CTTGTGCTCA

 4101 P N G K C E T E E C E T V H N S T V W Y S D Y K V T G L C D A T L
 TCCCAAGCG CAAGTGTGAG ACACAGCAAT GCGAGCAGT GCACAAAGC ACCGTGTGTT ACAGCAGCTA CAAGCTGAGC GGTGTGCG ACCCTACTT
 ACCGTTGCT GTTCAGCTC TGTCTCTTA CGCTGTGTA CTTGTGTC TGGCACACA TGTGCTGAT GTTCCATGG; CCGCACAGCC TGGGTGTGGA

 4201 V D T E I T F F S E D G K K E S I G K P N T G Y K S N Y F A Y F K
 CCGTACAGC GAGATCACT TTPTTACGCA GAGCGGAG AAGAGTCA TGGCAAGC CAACAGCTGT TACAGAGCA ACTACTTTC CTACTAGAG
 CCGCTGTTC; CTTTGTGGA AAGATGCTT CTTGCTTTC TTTTCACTT ACTCTTTC; GTTGTGCG; ATTTCTTCT TCAATGAGCG; CATCTTCTT

 4301 G D K V C K M N Y C K H A G V R L P S G V W F E F V D Q D V Y A A A
 GCGCACAAAG TGTCAAGAT GAACTACTGC ACGATGCG; GATGTAGCT GGTACGCG GTTGTGTC; ATTTGTGGA CCGAGACTG; TACTGCGCG
 CCGTGTTC ACAGCTTCTA CTTGATGAG; TTTGATGCG; CCGATGCG; CACAGAGC TCAAGCCTT GGTCTTGC; ATTTGTGCG

 4401 K L P E C P V G A T I S A P T Q T S V D V S L I L D V F E R I L D Y
 CCGAGTTC; GAGTTC; GTTGTGCA CCAATGCT CCGCAGCAG ACCAGGTTG AGTGTGCT GATCTGTGAG GTTGTGAGAA TTTTGTGCTA
 GGTTCAGCG; GCTTACGCG; CAGCCGCTT GGTGTGCG; TGTACTGGA TTAGACTG; CACTTCTT; ACCAGCTGAT

图 15A

- 5 L C Q E T W S K I R S K O P V S P V D L S Y L A P K N P G T G P
 4501 CTTCTTCTTCTT CAGCAAACT GTTCUAKGAT CAGATKCAAG CAGKCCCTTGA GKKCTTTRGA CCTTCAGCTAC CTRKCCCTTA AGAATCCCGG CACCCGCTCT
 CAGAGACACA GTCTTTTRGA CCAGGTTCTA GTTACTGTTT GTTCTGACTT GTTCTGACTT CAGGACACTT CGACTTCATG CACTTCTTCTT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTCTT
 A F T I I N G T L K Y F E T R Y I R I D I D N P I I S K M V G K I S
 4601 GCTTTCACCA TCAATCAAG CACTCTCAAG TACTTTCGAGA CACTTACTAT CCGATTCGAC ATTCGACAACT CCATCAATG CAAATATCTG GCAAGATCA
 CCGAATCTTCTT ACTTACTTCTT GTTCTGACTT ATCAAGCTTCTT GTTCTGACTT GACTTACTTCTT TACTTCTTCTT GCTTCTTACTT GCTTCTTACTT CCGTTCCTTCTT
 - G S O T E R E L W T E W F P Y E G V E I G P N G I L K T P T G Y K
 4701 GCTTTCACCA GACTTCTTCTT GACTTCTTCTT CCGTTCGAG CACTTCTTCTT CCGTTCGAG CACTTCTTCTT TCTTCTTCTT TCTTCTTCTT TCTTCTTCTT
 CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT
 - F P L F M I G H G M L D S D L H K T S O A E V F E H P H L A E A P
 4801 GTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT GCTTCTTCTT GACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT TCTTCTTCTT TCTTCTTCTT TCTTCTTCTT
 CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT
 K Q L P E E E T L F F G D T G I S K N P V E L I E G W F S S W K
 4901 AACTTCTTCTT CCGTTCGAG AACTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT CACTTCTTCTT CACTTCTTCTT TCTTCTTCTT TCTTCTTCTT
 TTTCTTCTTCTT CACTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT TTTCTTCTTCTT
 5001
 5101

图 15B

B.

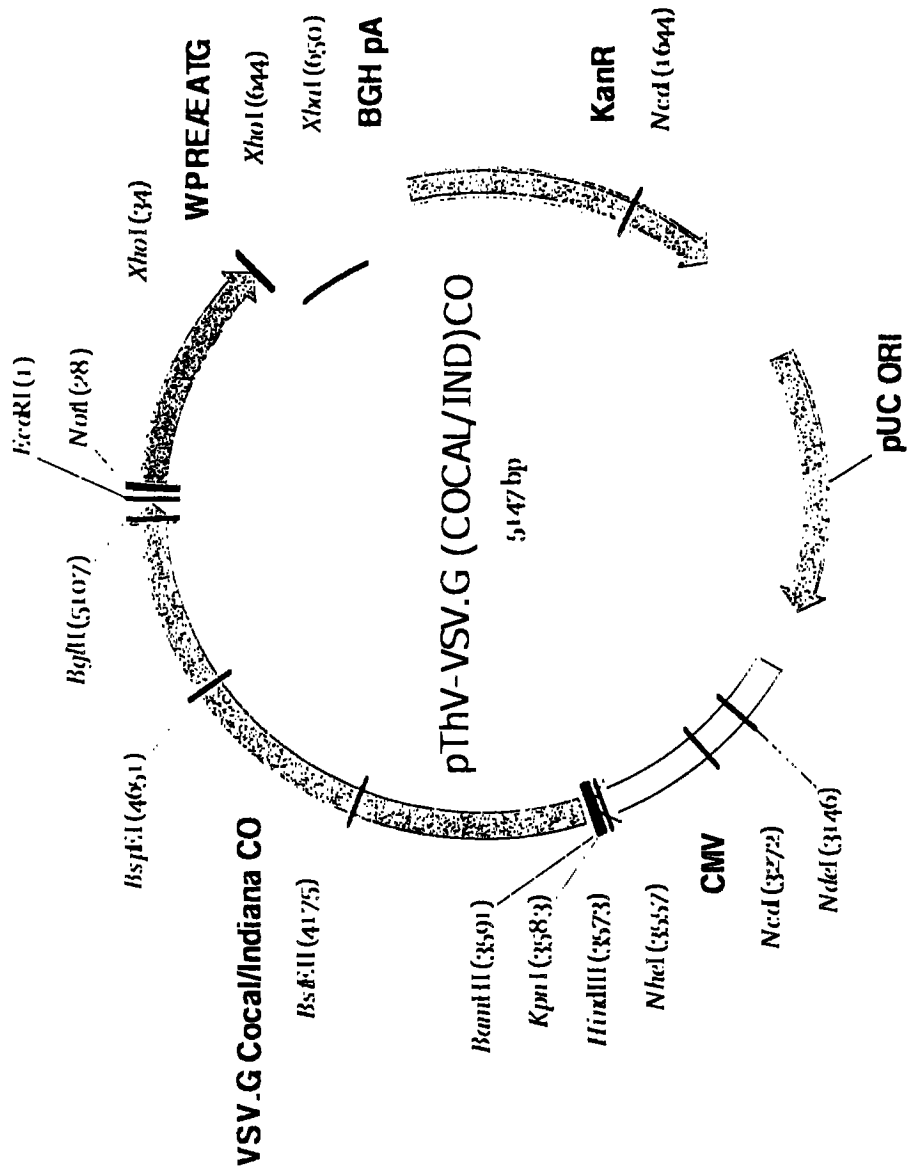


图 15C

A.

1601 M T D T V I G K F Q I V F P D O N E L E W T P V V G D S R H C
 ATC ACCGATACG TXX"TGKXAA GTTCAGATC GTKFTCCCG ACCAGAAACA G"TKGAANKG ACCCCCTCCG TXXXKACACG CXXKXATKX
 TAC TXX"TAFTX" ACCGACCCGT CANGXHTAG CACAAGXXX TXXHTTXXT CGACCTTACC TXXXKXAC ACCXKXHTC GXXKX"TAACG

P O S S E M Q F D G S R S Q T I L T G K A P V G I T P S K S D G F I
 1701 C"TCAGTCA CXXGATGCA GTTCACCG AGCAGAACCC AGACATCTT GACCCGAAK G"CCCTCCXG GCATCACAC CAGCAAGACG GACXKX"TKA
 GAGTTCAGCT CXT"TTACT CAAGTTCXG TXXHTXG TXXKXAGCA C"TXCCCTTC CXXXKXAC CXTAGTTCXG GTCTT"TCG C"TKCCGAACT

C H A A K W V T T C D F R W Y G P K Y I T H S I H H L R P T T S D
 1801 TCTKCCAGC CXC"ANGTKX GTGACCACT GXCAT"TCG GTKXTACCG CXC"AGTACA T"ACCCACAG CATTCACAC C"TKXKXCCA CXC"TCGCA
 AGACXKXCG GXXHT"ACC CACT"TKXGA CXC"TAAGX CACT"TKXCG GXXHTATCT AGTXXKXHT GTAGTTCXG GACXCCXHT GHTXGAGCT

C E T A L O R Y K D G S L I N L G F P P E S C G Y A T V T D S E A
 1901 C"TKCCAGCA GXX"TKACG GXTAC"AKGA CXXKXCTXG ATCAACTXG CXT"TCCTTC CAGACG"TKX GXT"ACCCA CXXHTACACA CAGKXAGCT
 GACX"HTCT CXXGAC"TCG C"ATHTCTT CXC"AC"TKX TACT"TKXG CXXKXKXAG CXT"TKXG CXC"ATXKXHT GXCAC"TKXHT C"TKX"TKXG

M L V Q V T P H H V G V D D Y R G H W I D P L F P G G E C S T N F C
 4001 ATX"TKXTC AGT"TKACG CXC"AC"TKX GXXHTXAGC ACTAC"XG GXT"AC"XG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG
 TACGAC"ACC TCCAC"TKXG CXT"TKXG CXC"AC"TKX TACT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG

D T V H N S S V W I P K S Q K T D I C A Q S F K N I K M T A S Y P
 4101 CXC"ATACCT G"AC"AC"ACG AGC"TKXGA T"TKCCAGAG CXC"AGACG GACAT"TKXG CXC"AC"TKX CXC"AC"TKX CXC"AC"TKX
 CXC"TKXG CXT"TKXG TXXKXACCT AAGXHT"TKX GXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG CXT"TKXG

S E G A L V S D R F A F H S A Y H P N M P G S T V C I M D F C E Q
 4201 CAGCAGAGA GXX"TKXHT CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG
 CXT"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG

K G L R F T N G E W M G L N V E Q S I R E K K I S A I F P N C V A G
 4301 AAGXKXTC GXT"TKXCAA CXC"TKXG ATXKX"TKA CXT"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG
 T"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG

T E I R A T L E S E G A R T L T W E T Q K M L D Y S L C O N T W D
 4401 CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG
 CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG CXC"TKXG

图 16A

· K V S R K E P L S P L D L S Y L S P R A P G K G M A Y T V I N G T
 4501 CAAGGTGTCC CGGAAGAGC CTCGTGTCCTCC CTTGGACCTG AGCTACCTCA GCCCTAGAGC CCTTGGCAAG GCCATGGCCT ACACCGTGT ACACGGCACC
 GTTCCACAGG GCCTTTCCTCG GAGACAGGGG GGACCTGGAC TCGAATGGACT CGGATACCCTC CCGTACCCTGGA TGTGGCACTA GTTCCCGTGG
 L H S A H A K Y I R T W I D Y G E M K E I K G G R G E Y S K A P E L
 4601 CTGCACAGC CCCACGCCAA GTATATCCGG ACCTGGATCG ACTACGGCA GATGAAGAG ATCAAGGGCG GCAGGGGCA GTACAGCAAG GCCCTGAGC
 GACGTGTCGC GGTGCGGTTC CATATAGGCC TGGACCTAGC TGAATGCCGT CTACTTCTC TAGTTCCTC TAGTTCCTC TAGTTCCTC TAGTTCCTC CGGGACTCG
 · L W S Q W F D F G P F K I G P N G L I, H T G K T F K F P L Y L I G
 4701 TGCTGTGGAG CCAGTGGTTC GACTTCGGCC CTTCAAGAT CGGCCCAAC GGCTGCTGC ACACCGCAA GACCTTCAAG TTCCCTCTGT ATCTGATCGG
 ACGACACTC GGTACCAAG CTGAAGCCCG GGAAGTCTA GCCGGGTG CCGGACGACG TGTGGCCGT CTGGAAGTTC AAGGGAGACA TAGACTAGCC
 · A G I I D E D L H E L D E A A P I D H P Q M P D A K S V L P E D, E
 4801 AGCCGGCATC ATCGACGAGG ACCTGCACGA GCTGGACGAA GCCGCCCTA TCGACCAACC CCAGATGCC GACGCCAAGA GCGTCTGCC CGAGGACGAG
 TCGGCCGTAG TAGTGTCTC TGGACGTCT CGACCTGCTT CGGCGGGAT AGCTGGTGG GGTCTACGG GTGGGTCTT CGCAGGACGG GCCTCTCTC
 E I F G D T G V S K N P I E L I Q G W F S N W R
 4901 GAAATCTTCT TCGCGCACAC CGGCGTGCAGC AAGAACCACA TCGAGCTGAT CCAGGGCTGG TTCAGCAACT GCGCGTGG
 CTTTGAAGA AGCCGCTGTG GCCGCCTCG TTCTTGGGT AGCTCCACTA GGTCCCGACC AAGTCTGTGA CCGCCCTGCTC GATCGEAGC TAAATATCT
 5001
 5101

图 16B

B.

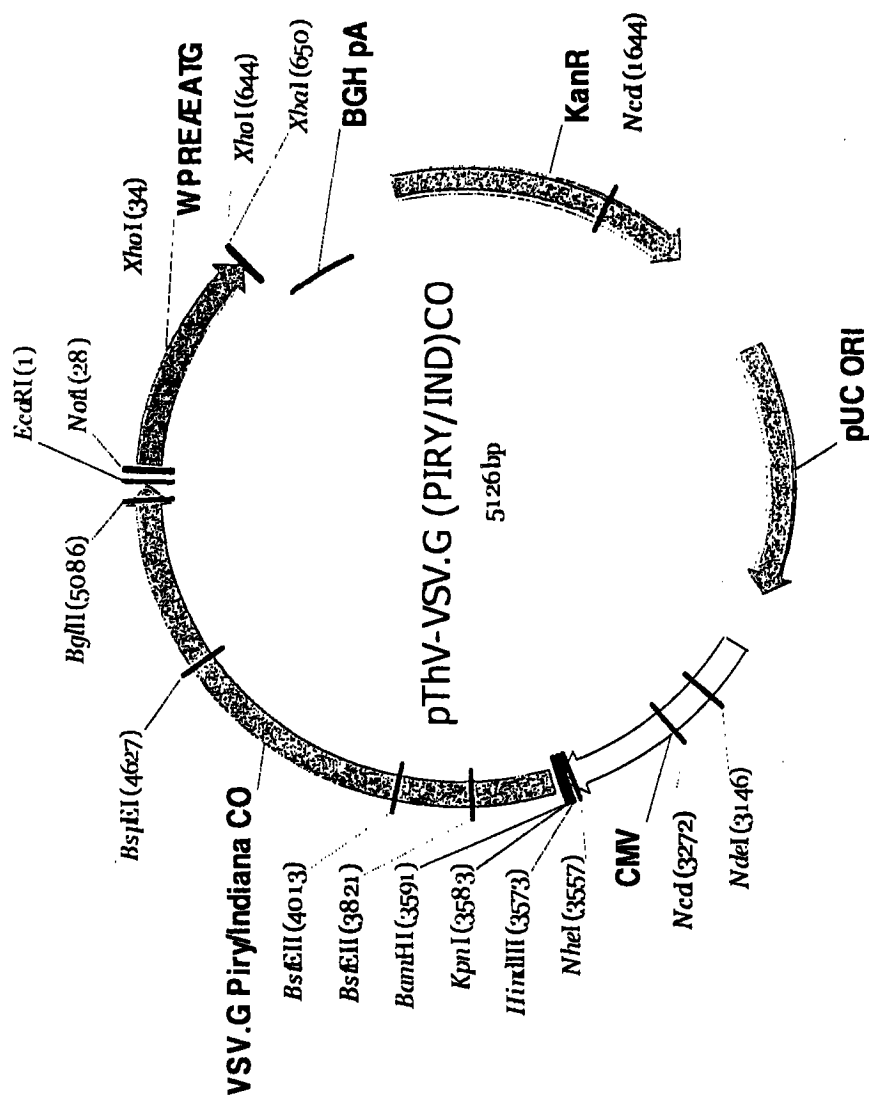


图 16C

A.

3601 M T S V L F M V G V L L G A F G S T H C S I Q I V F P S E T K
 ATG ACATCCGTCG TGTTTATGGT GGGGTCCTG CTCGGAGCCTT TCGGATCTAC CCATGCGAGC ATCCAGATCG TGTTCCTCCAG CGACACAAG
 TAC TGTAGGCACC ACAAAATACCA CCCGCAAGC GAGCCTCGAA AGCCATGATG GGTGACGTCG TAGTCTAGC ACAAGGGGTC GCTCTGTTTC

3701 L V W K P V L K G T R Y C P Q S A E L N L E P D L K T M A F D S K V
 CTGGTGTGA AGCCCGTCTT GAAGGGCACC CGGTACTGCC CCCAGAGCC CGAGCTGAAC CTGGAACCCG ACCTGAAAC CATGGCCTTC GACAGCAAGG
 GACCACACCT TCGGGCACGA CTTCCTCCGTTG GCCATCAGCG GGTCTCCGG GCTCGACTTG GACCTTGGCC TGGACTTGTG GTACCAGGAG CTGTCTGTTCC

3801 P I G I T P S N S D G Y L C H A A K W V T T C D F R W Y G P K Y I
 TGCCCATGG CATCACCCCC AGCAACAGC AGCGTACTCT GTGCCACGCC GCCAAGTGGG TGACCACCTG CGACTTCCCG TGGTACGGCC CCAAGTACAT
 ACGGGTAGCC GTAGTGGGG TCGTGTGTCG TCCGATGGA CACGGTGGC CGGTTCACCC ACTGGTGGAC CCTGAAGGCC ACCATGCCCG GGTTCATGTA

3901 T H S V H S L R P T V S D C K A A V E A Y N A G T L M Y P G F P P
 CACCCACAGC GTGCACAGCC TCGGGCCAC CGTGAGCGAC TCCAAGGCC CCGTGGAGC TTACAACGCT GGCACCTGA TGTACCCCGG CTTCCTCCCC
 GTGGGTGTCG CACGTGTCCG ACGCCGGTGT GCACCTGCTG ACGTTCGGC GGCACCTTCG AATGTTGGCA CCGTGGGACT ACATGGGGCC GAAGGGGGG

4001 E S C G Y A S I T D S E F Y V M L V T P H P V G V D D Y R G H W V D
 GAGAGTGG GCTACGCCAG CATCACCGC AGCGAGTCTT ACGTGTGCTT GGTGACCCCC CACCCGTTGG GAGTGGACGA CTACCGGGG CACJGGTGG
 CTCTCGACCC CGATGGGGTC GTAGTGGCTG TCGTCAAGA TGCACTACGA CCACTGGGGG GTGGGGCACC CTCACCTGCT GATGGCCCGG GTGACCCACC

4101 P L F P T S E C N S N F C E T V H N A T M W I P K D L K T H D V C
 ACCCTCTGTT CCCACCTCC GAGTCCAA GCACTTCTG CGAGACAGTG CACAACGCCA CCACTGTGGAT TCCCAAGGAT CTGAAAACCC ACGACTGTG
 TGGGAGACAA GGGGTGGAGG CTCACCTTGT CGTGAAGAC GCTCTGTGAC GTGTGGCGGT GGTACACCTA AGGTTTCCCTA GACTTTTGGG TGTGACAC

4201 S Q D F Q T I R V S V M Y P Q T K P T K G A D L T L K S K F H A H
 CAGCCAGGAC TTCCAGACCA TCAGAGTGAG CGTGA'GTAC CCTCAGACCA AGCCACCAA GGCAGCTGAC CTGACACTGA AGAGCAAGTT CCACGCCAC
 GTCCGTCTTG AAGCTCTGGT AGTCTCACTC GCACAPACATG GGAGTCTGGT TCGGTTGGIT CCTCCGACTG GACTGTGACT TCTGCTTCAA GCTGCGGGTG

M K G D R V C K M K F C N K N G L R L G N G E W I E V G D E V M L D
 4301 ATGAAGGCG ACAGAGTGT CAAGATGAAG TTCTGCAACA AGAACGGCTT CGGGTGGG AACGGGAGT GGATCGAAGT GGGCAGCAG GTGATCTG
 TACTTCCCG TGTCTCACAC GTTCTACTTC AAGAGTGTGT TCTGTCCGGA CGCCGACCCG TTGCCCCTCA CCTAGCTTCA CCCGCTGCTC CACTACGACC

N S K L L S L F P D C L V G S V V K S T L L S E G V Q T A L W E F
 4401 ACMAACAGCAA GCTGCTGTCC CTGTTCCTCC ACTGCC'GGT GGGCAGCGTG GTGAAGAGCA CCCGTCTGTC CGAGGGCGTG CAGCCCGCC TGTGGGAGC
 TGTGTGCTGT CGACCACAGG GACAAGGGC TGACGGACCA CCCGTCCGAC CACTTCTCGT GGGACGACAG GCTCCCGCAC GTCTGGCGG ACACCTCTG

图 17A

. D R L L D Y S L C Q N T W E K I D R K E P L S A V D L S Y L A P R
 4501 AGACCGCTG CTGGACTACA GCTGTGTC GAACACCTGG GAGNAGATCC ACCGGAAGA GCCCTGAGC GCCGTGACC TGAGCTACCT' GGCCCTTAGA
 TCTTGGCCGAC GACCTGATGT CGGACACGGT CTTGTGGACC CTCTTCTAGC TGGCCCTTCT' CCGGGACTCG CGGCAGCTGG ACTCCATGGA CCGGGGATCT

 S P G K G M A Y I V A N G S L M S A P A R Y I R V W I D S P I L K E
 4601 AGCCCGGCA AGGCATGGC CTACATCTGT GCCAACGGCA GCCTGATGAG CGCCCTGCC CGGTACATCA GAGTGTGGAT CGACAGCCC ATCTTGAAG
 TCGGGCCGT TCCCTTACC GATGTAGCAC CGGTGCCGT CGGACTACTC CCGGGACGG GCCATGTAGT CTCACACCTA GCTGTCCGGG TAGGACTTTC

 . I K G K K E S A S G I D T V L W E Q W L P F N G M E L G P N G L I
 4701 AGATCAAGG CAGAAAGAG AGCCCCAGG GCATCGACAC CGTCTCTGG GAGCAGTGG CCGCTTCAA CGGCATGGAA CTGGGCCCA ACGGCCTGAT
 TCTAGTTCCT CTTCTTCTC TCGCGCTCCG CGTAGCTGT GCACGACAC CTTCTCACCG ACGGAGCTT GCCGTACCTT GACCCGGGT TCCCGGACTA

 . K T K S G Y K F P L Y L L G M G I V D Q D L Q E L S S V N P V D H
 4801 CAAGACCAAG AGCGCTACA AGTTCCCTCT GTACCCTGCT GGCATGGCA TCGTGGACCA GGACTTCCAG GAACCTGACA CGTCAACCC CGTGGACCA
 GTTCTGGTTC TCGCCGATGT TCAAGGGGA CATGGACGAC CCGTACCCGT AGCACCCTGT CTTGGACCTT CCGAGTTGGG GCACCTGGTG

 P H V P I A Q A F V S E G E V F F G D T G V S K N P I E L I S G W
 4901 CCCCAGTGC CTATCGCCCA GGCCTTCTGT AGCGAGGCG AGGAAGTGT CTTGGCGAC ACCGGGTGA GCAAGACCC CATCGAGCTG ATCAGCGGT
 GGGTGCACG GATAGCGGT CCGGAAGCAC TCGCTCCCG TCCTTACAAA GAAGCCCTG TCGCCGACT CGTTCITGGG GTAGCTGCAC TAGTCCCGA

 . F S D W K
 5001 GGTTCAGCA CTGGAAA
 CCAAGTGGCT GACCTTTC

 5101

图 17B

B.

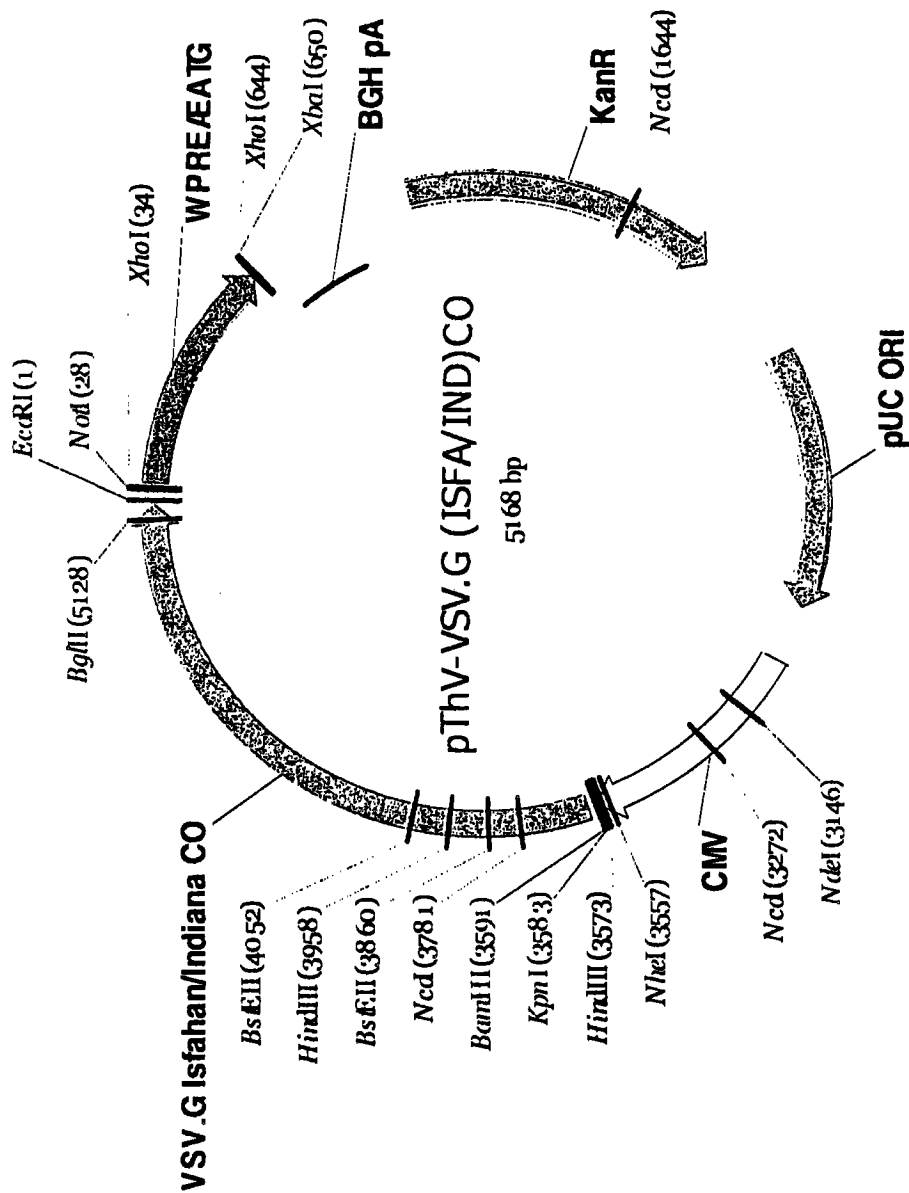


图 17C

A.

3601 M S I I S Y I A F L L L I D S T L G I P I F V P S G Q N I S W
 ATG AGCATCATCA GCTATATCGC CTTTCTGCTG CTGATCGACA GCACCTGGG CATCCCATC TTCTGTCCCA GCGCCAGAA CATCAGCTGG
 TAC TCGTAGTAGT CGATATAGCG GAAAGACCAC GACTAGCTGT CGTGGGACC GTAGGGTAG AAGCACCGET CGCCGGTCTT GTAGTCCGACC

3701 Q P V I O P F D Y Q C P I H G N L P N T M G L S A T K L T I K S P S
 TCCAGCCGTGA TCCAGCCCTT CGACTACCAG TCCCCCATCC ACCGCAACT GCCCAACACC ATGGGCTGA GCGCCACCAA GCTCACCATC AAGAGCCCA
 GTCCGGCACT AGGTCCGGAA GCTGATGGT ACGGGTAGG TGCCGTGGA CCGGTGTTGG TACCCGACT CCGGTGTTT CGACTGGTAG TTTCTCGGGT

3801 V F S T D K V S G W I C H A A E W K T T C D Y R W Y G P Q Y I T H
 CCGTGTTCAG CACCACAAG GTTCCGGCT GGATCTGCCA CGCCGCCGAG TGGAAAACCA CCTGCCACTA CCGTGTGTAC GCGCCCATC ACATCACCCA
 CCGACAAGTC GTGGCTGTTT CACAGCCGA CCTAGACGGT GCGCCGGCTC ACCTTTGGT GGACGCTGAT GCGCCACCATG CCGGGGTCA TGTAGTGGT

3901 S I H P I S P T I D E C K R I I S R I A S G T D E D L C F P P Q S
 CAGCATCCAC CCGATCAGCC CCACCATCGA CGAGTGCAG CGATCATCA GCCGATCGC CAGCGCACCC GACGAGGACC TCGGCTTCCC ACCCCAGAC
 GTCGTAGTGG GGTAGTCCG GGTGTAGCT CCTCACGTTT GCCTAGTAGT CCGCTAGCG GTCCGCTGG CTGCTCCTGG ACCCGAAGGG TGGGCTCTCG

4001 C G W A S V T T V S N T N Y K V P H S V H L E P Y G G H W I D H D
 TCGGGTGG CCAGCTGAC CACCGTACG AACCCAACT ACAAGTGGT GCCCCACAGC GTGCACCTGG AACCTTAGG CCGCCACTGG ATCGACCACG
 ACCCGACCC GTCCGCACTG GTCCGACTCG TGTGTTGA TCTTCCACCA CCGGTGTTCG CAGCTGACC TTTGGATGCC CCGGTGACC TAGCTGGTGG

4101 F N G G E C R E K V C E M K G N H S I W I T D E T V O H E C E K H
 ACTTCAGCG CCGGAGTGC CCGGAGAAG TGTGGAGAT GAAGGCCAAC CACAGCATCT GCATCACCGA CGAGACAGTG CAGCAGAGT GCGAGAAGCA
 TGAAGTTGCC GCCCTCAG GCCCTTTTC ACACGCTGTA CTTCCCGTTG GTGTGTTAGA CCTAGTGGCT GCTCTGTAC GTGTGTGTCG CCGTCTTCTGT

4201 I E E V E G I M Y G N A P R G D A I Y I N N F I I D K H H R V Y R
 CATCGAGAA GTGGAGGCA TCATGTACGG CAACGCCCC AGGGGGAGG CCACTTACAT CAACACTTC ATCATGACA AGCACCACCG GTGTACCCGG
 GTAGCTCTT CACCTCCCTT AGTACATGCC GTTGGGGGG TCCCCGCTG CCTAGATGTA GTTGTGTAAG TAGTAGTGT TCGTGGTGGC CCACAATGGCC

4301 F G G S C R M K F C N K D G I K F T R G D W V E K T A G T L T N I Y
 TTTGGGGCT CTTGCCGGAT GAAGTCTTGC AACAGGACC GCATCACTT CACCAGAGC GACTGGGTGG AGAARACCG CCGCACCCCTG ACCACATCT
 AAGCCGCCA GGACGGCCTA CTTCAAGACG TGTTCCTGC CBTAGITCAA GTGTGTTGTAAG TAGTAGTGT TCGTGGTGGC CCACAATGGCC

4401 E N I P E C A D G T L V S G H R P G L D L I D T V F N L E N V V E
 ACGAGACAT CCGCGAGTGC CCGGAGGCA CACTGTGTC CCGCCACAGA CCGCCCTGG ACCTATCGA CACCTGCTC AACCTGGAAA ACGTGTGGA
 TGTCTTGTGA CCGGCTCAG CCGCTGCCGT GTGACCACAG GCCGGTGTCT GCGCCGACC TGGACTAGCT GTGGCACAAG TTGGACCTTT TGCACCACCT

图 18A

. Y T L C E G T K R K I N K Q E K L T S V D L S Y L A P R I G G F G
 4501 GATACCCCTG TGGAGGGCA CCAAGCGGAA GATCAACAG CAGBARAGC TGACCAGCGT CGACTGAGC TACCTGGCCC CCAGGATCGG CGGCTTGGGC
 CATGTGGGAC ACCCTCCCCTT GGTTCGCCCTT CTAGTTGTTC GTCCFTTTCG ACTGTGCGCA GCTGGACTCG ATGGACCCGG GGTCCTAGCC GCCGAAGCCC

 S V F R V R N G T L E R G S T T Y I R I E V E G P V V D S L N G I D
 4601 ACCCTGTTCC CGTGGGAA TGGGACCCCTG GAAAGAGGAA GCACAACATA CATTCCGATC GAAGTGGAG GCCCCGTGGT GGACAGCCTG AACGGATCG
 TCGCACAAAG CGCAGGCCCTT ACCCTGGGAC CTTTCNCCCTT CGTGTTCCTAT GTAGCCTAG CTTACACCTTC CGGGCACCA CCTGTCCGAC TTGCCCTAGC

 . P R T N A S R V F W D D W E L D G N I Y Q G F N G V Y K G K D G K
 4701 ACCCCCGGAC CAAGCCAGC CGGCTGTCT GGGAGGACTG GGAGCTGGAC GGCACATCT ACCAGGGCTT CAATGGCGTG TACAGGGCA AGGATGGCAA
 TGGGGCCCTG CTTCCGGTCC GCCCACAA GA CCTGCTGAC CCTCGACTG CCGTTGTAGA TGGTCCCGAA GTTACCCGAC ATGTTCCCTT TCCTACCTGT

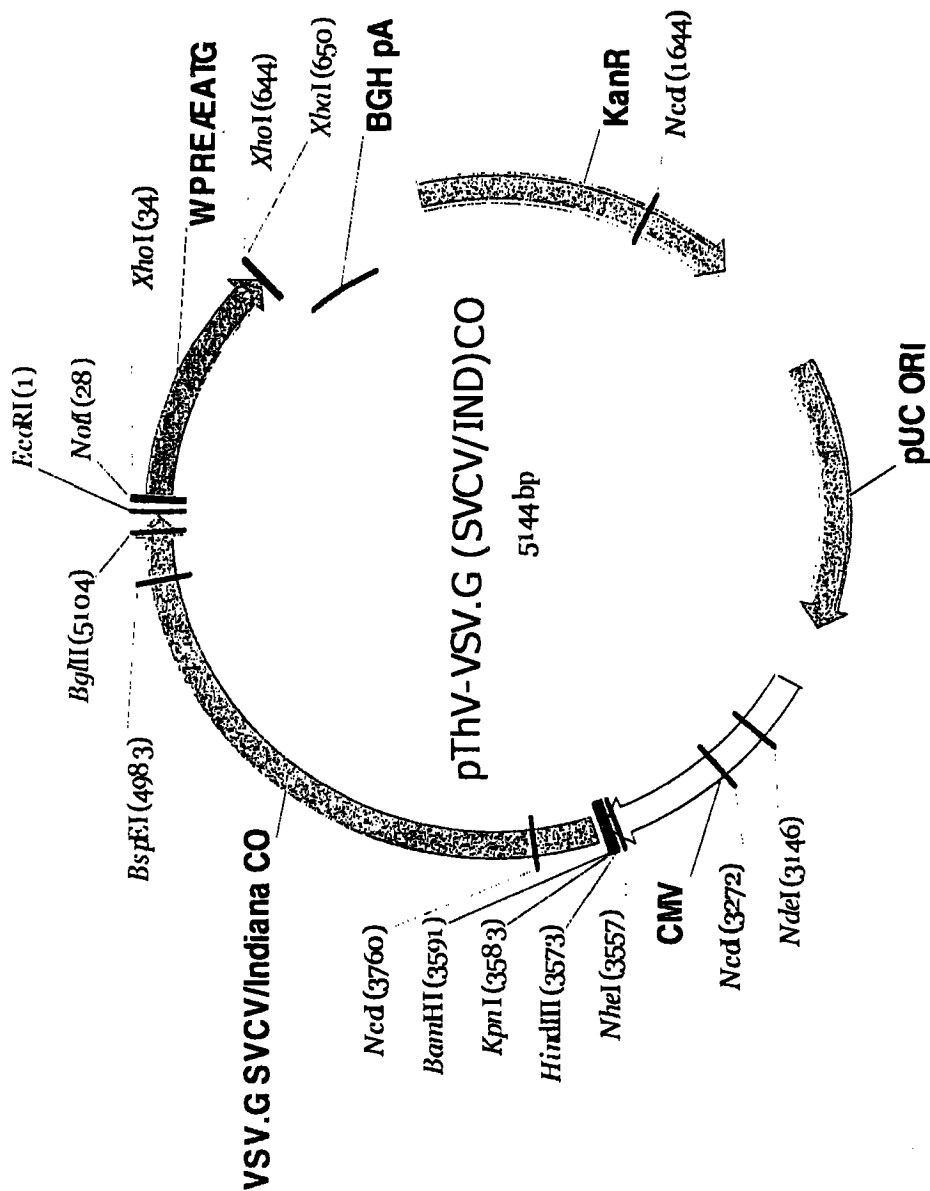
 . I H I P L N M I E S G I I D D E L Q H A F Q A D I I P H P H Y D D
 4801 GATCCACATC CCCCTGAACA TGATCGAGAG CGGCATCATC GACGACGAGC TGCAGCACCC CTTCCAGGCC GACATCATCC CCCACCCCA CTACCGAGC
 CTAGGTGTAG GGGACTTGT ACTAGCTCTC CCCGTAGTAG CTGCTGCTCG ACCTGCTGCG GAAGTCCCG CTGTACTAGG GGGTGGGGT GATGCTCTG

 D E I R E D D I F F D N T G E N G N P V D A V V E W V S G W G
 4901 GACGATCC GGGAGGACGA CATCTCTTC GACAACCCG GCGAGAACC GACCCCGTG GACCCCGTGG TGGAAVGGGT GTCCGGATGG GGCCTGCTG
 CTGCTCTAGG CCCTCTGCT GTAGAAGAAG CTGTGTGGC CGCCTCTGCC GTTGGGGCAC CTCCGGCACC ACCTTACCCA CAGGCCCTACC CCCCTCTCT

 5001

 5101

图 18B



B.

图 18C

A.

3601 M L S Y L I F A L A V S P I L G K I E I V F P Q H T T G D W K
 ATG CTGTGATATC TGAATCTTTC CCTGGCTGTG AGCCCAATCC TCGGAAGAT CGAAATCCTG TTCCACAAAC ACACCACAGG GGACTGGAAG
 TAC GACAGTATAC ACTAGAAACG GCACCCGACAC TCGGCTTAGG AGCCCTTCTA GCTTATAGCAC AAGGCTGTG TGTGGTCTCC CCTGACCTTC

 3701 R V P H E Y N Y C P T S A D K N S H G T Q T G I P V E L T M P K G L
 CCGTCCCGC ACGATACAA CTAATGCCCG ACCTCAGCG ACAAGATAG CCACGGCAGC CAGACCCGCA TCCCTGTGGA GCTGACCATG CCCAAGGGG
 GCGCACGGG TGCATCATGTT GATGACGGG TGGATCGGC TGTCTTATC GGTCCCGTGC GTCAGCCGCT AGGACACCT CGACTGCTAC GGTTCCTCCG

 3801 T T H Q V E G F M C H S A L W M T T C D F R W Y G P K Y I T H S I
 TCACAACCA CCAATCGAA CGCTTCATGT GCCACAGCG TCCTCGGATG ACAACCTGG ATTTTCCTG CTATCGCCCC AAGTACATCA CGCACAGCAT
 AGTGTCCGT GGTTCAGCTT CCCAAGTACA CCGTGTCCG AGACACCTAC TGTGGACGC TAAAGCGAC CATACCCGGG TTCAITGAGT GCGTGTCTGTA

 3901 H N E E P T D Y Q C L E A I K S Y K D G V S F N P G F P P Q S C G
 CCACAATGAG GAACCAACCG ACTACCAATG CCTCGAAGCC ATCAAGTCA ACAAGGATG GGTGAGCTTC AACCCCGGCT TCCCGCCCA ATCATGTGGC
 GGTGTACTC CTGGTGGC TGATGGTAC GAGCTTCCG TAGTTCAGTA TGTCTCTACC CCACCTGAAG TTGGGGCCGA AGGGCGGGCT TAGTACACCG

 4001 Y G T V T D A E A H I V T V T P H S V K V D E Y T G E W I D P H F I
 TACGGCACCG TGACCGACGC CGAGGCCAC ATCGTACCG TGACACCCCA CTCAGTCAAG GTGGACGAT ACACAGGCGA ATGGATCGAC CCCACATCA
 ATGCCGTGGC ACTGGCTGG GCTCCGGGIG TAGCACTGGC ACTGTGGGT GAGTCACTTC CACCTGCTCA TGTGTCCGCT TACCTAGCTG GGGGTGAAGT

 4101 G G R C K G Q I C E T V H N S T K W F T S S D G E S V C S Q L F T
 TCGGGGCG CTGTAAGGC CAATCTGG AGACCGTCA CAACAGCAC AAGTGTGTTA CGTCAACAGA CCGCGAAGC GTGTGCAGC AACGTCTTAC
 AGCCCGCGC GACATCCCG GTTATAGCCG TCTGGCAGGT GTTGTCTGCG TACACCAAT GCAGTACTCT GCCGCTTTCG CACACGTCGG TTGACAAATG

 4201 L V G G I F S D S E E I T S M G L P E T G I R S N Y F P Y I S T
 GCTCGTGGC GGCATCTCT TTAGCGACAG CGAGGATC ACCAGATGG GCCTCCCGGA GACAGGATC CGCAGCACT ACTTCCGTA CATCAGCAC
 CGAGCACCG CCGTAGAGA AATCGCTGTC CTTCCCTAG TGGTCTTACC CCGAGGCGCT CTGTCTTAC GCGTCTGTA TGAAGGCAT GTAGTCTGTTG

 4301 E G I C K M P F C R K Q G Y K L K N D L W F Q I M D P D L D K T V R
 GAGGATCT GTAGATGCC TTTTTCGCG AAGCAGGAT ATAGCTGAA GAATGACCTG TGGTCCAGA TCAATGACCC GCACCTGGAC AAGACCCTCC
 CTCCCTTACA CATCTACCG AAAAACGGG TTGCTCCCTA TATTCGACTT CTTACTGGAC ACCAAGTCT AGTACCTGG CCTGGACCTG TCTCTGGCAGG

 4401 D L P H I K D C D L S S I I T P G E H A T D I S L I S D V E R I
 CCGATCTGCC CCACATCAAG GACTGTGATC TGTCAACAAG CATCATCACC CCCGGAGAAC ACCCCAGGA CATCAGCTTC ATCAGCGATG TGGAGCGCAT
 CCGTACACCG GGTGTAGTTC CTGACACTAG ACACACTAG GTAGTAGTGG GGGCCTCTTG TCGGCTCTT GAGTCTGGAG TAGTCTGGTAC ACCTCCGCTA

图 19A

B.

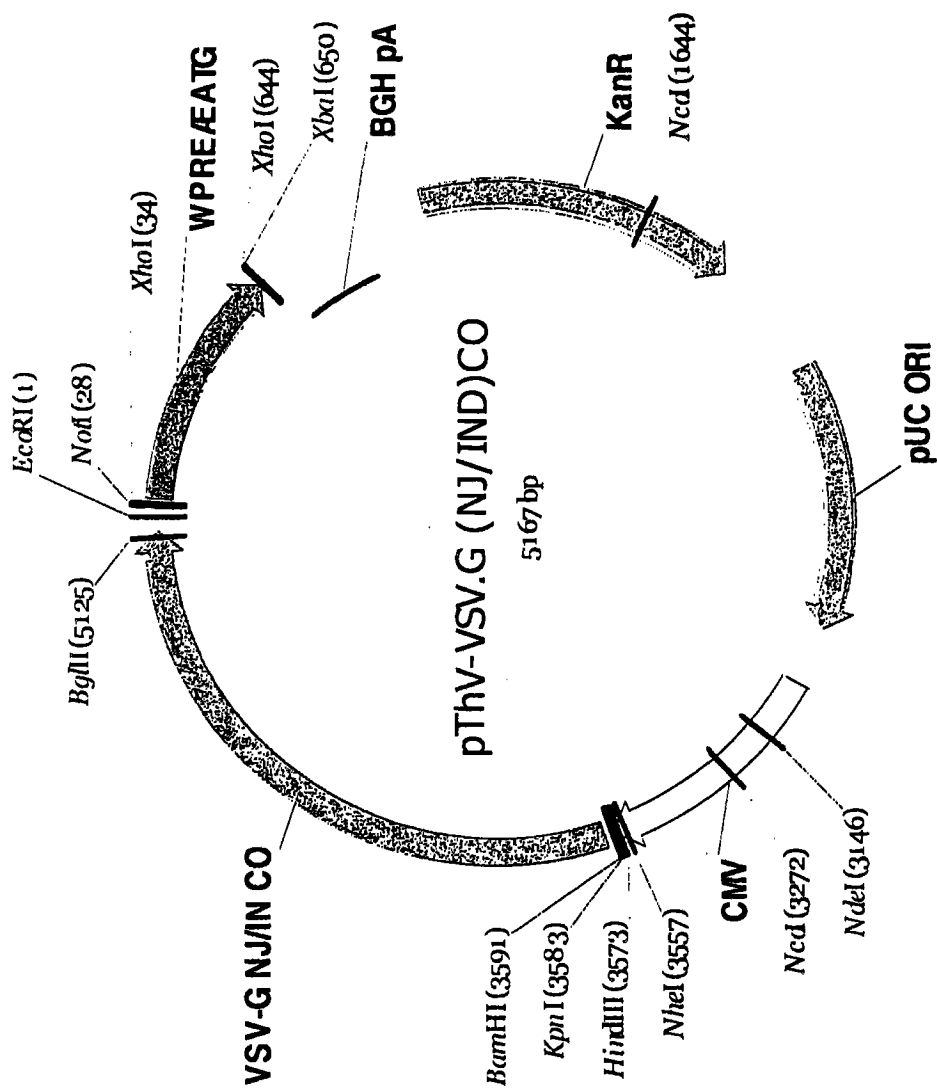


图 19C

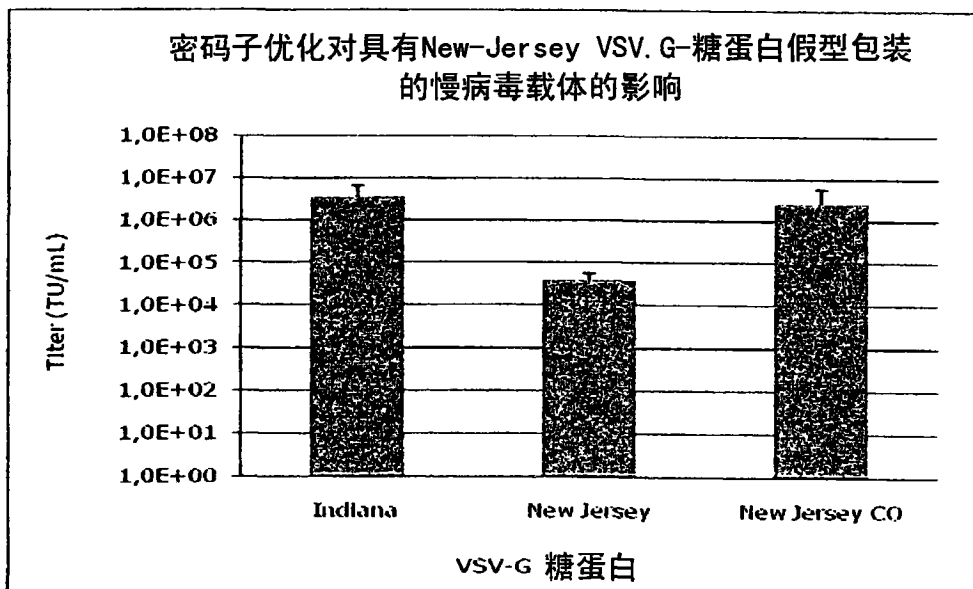
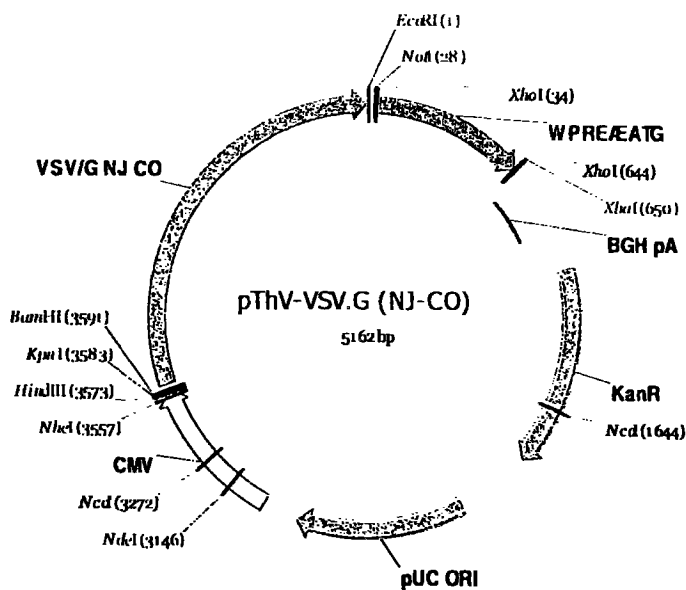


图 20

A.

MASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKXKYLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQGTGSEELRSL
YNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTNHSSQVSONYPIVQNLQGMVHQAI SPRTLN
AWVKVVEEKAFSPEVIMFSALESGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPGQM
REPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKT
LRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVNSATIMM
QRGNFRNRQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRP
EPTAPPEESFRFGEEETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGND

B.

KKSVTVLVDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNP
D IVIYQYMDLIVGSDLEIGQRTEILKEPVHGVY

C.

VGFPVRPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFG
WCFKLVPVDPEKEVLVWKFDSRLAFHHMARELHPEYYapvkqtlndllklagdesnpgp

D.

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKXKYLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQGTGSEEL
RSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTGHSSQVSONYPIVQNIQGMVHQAI SPR
TLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALESGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAP
GQMPREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVNSAT
IMMQRGNFRNRQRKIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQ
SRPEPTAPPFLQSRPEPTAPPEESFRSGVETTTTPSQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ

E.

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
AAGAAAAATATAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTG
TTAGAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATCTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAATTT
AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT
TTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC
AGCCAGGTGAGCCAAAATTACCCATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGA
ACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATT
TCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATG
TTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCATTGACCA
GGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATG
ACAAATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGA
ATGTATAGCCCTACCAGCATCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTTC
TATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTACAGGAGGTAAAAAATGGATGACAGAAACCTTGTGGTCCAAAAT
GCCAACCCAGATGTGAAGACTATTTTAAAAGCATGGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGT
CAGGGAGTGGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGATTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACC
ATAATGATGCAAAGAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGATTGTTAAGTGTTCATTTGTTGGCAAAGAAGGGCAC
ATAGCCAGAAATTCAGGGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGAT
TGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAG
AGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTC
AGGTCTGGGGTAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCC
CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCAACAATA

图 21



图 22

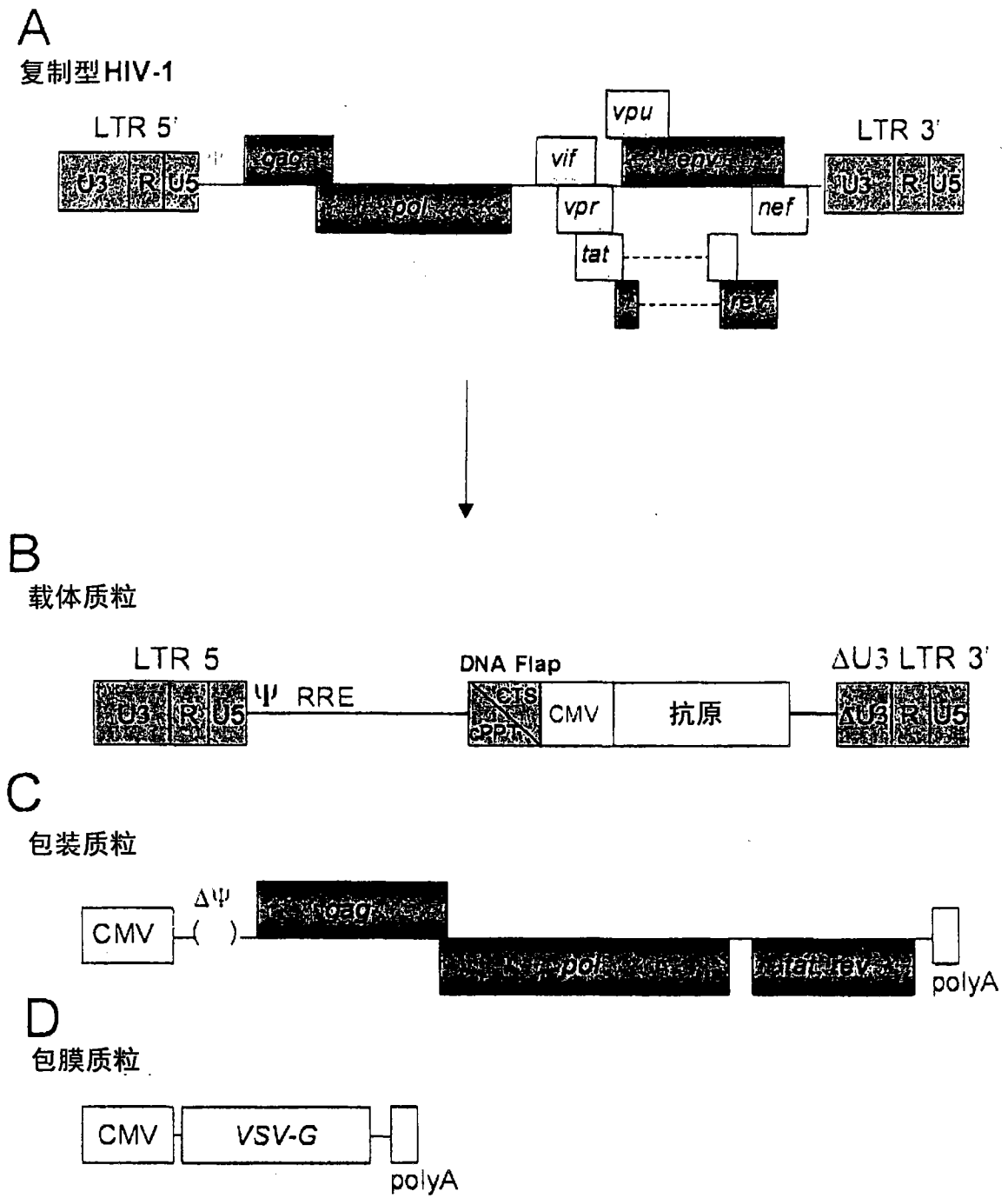


图 23

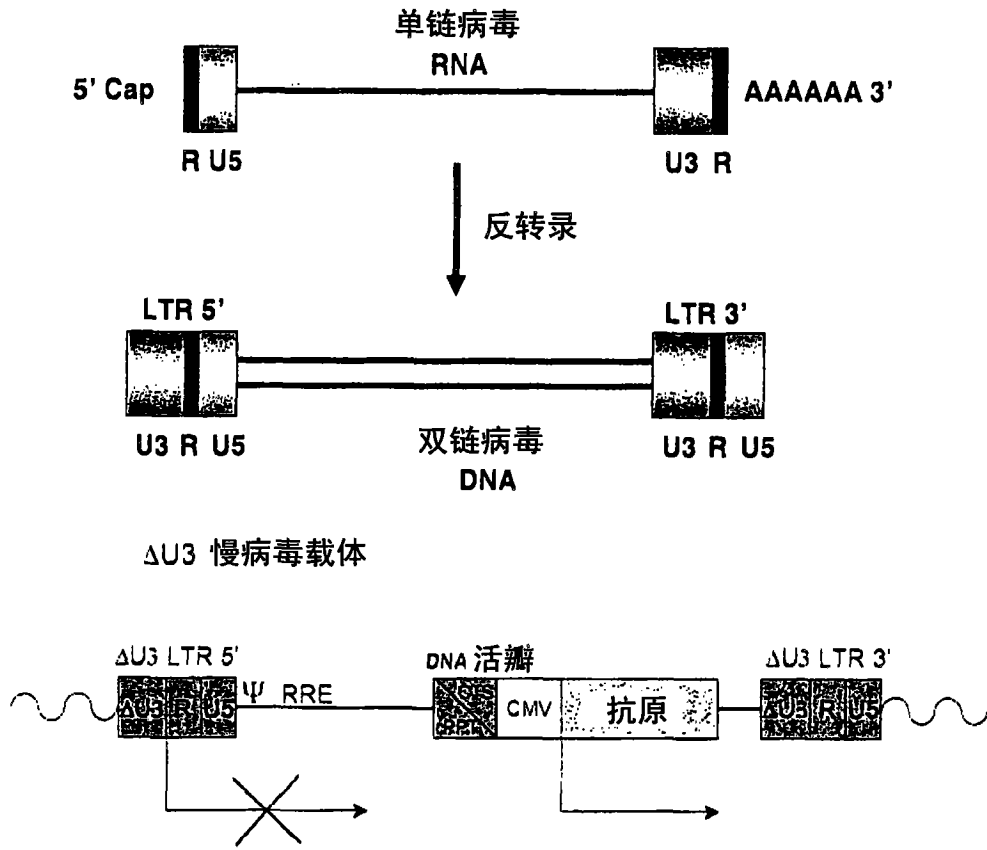
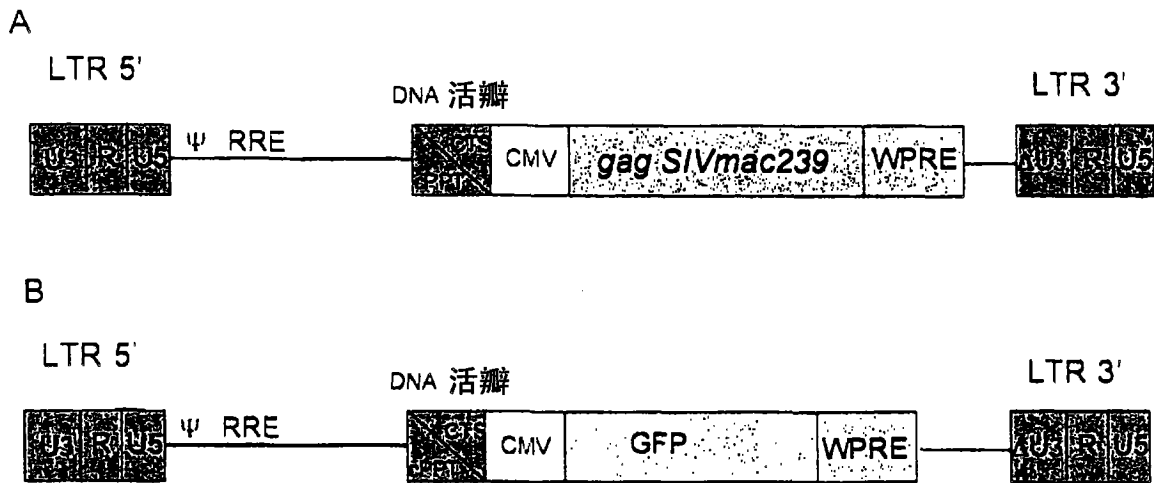
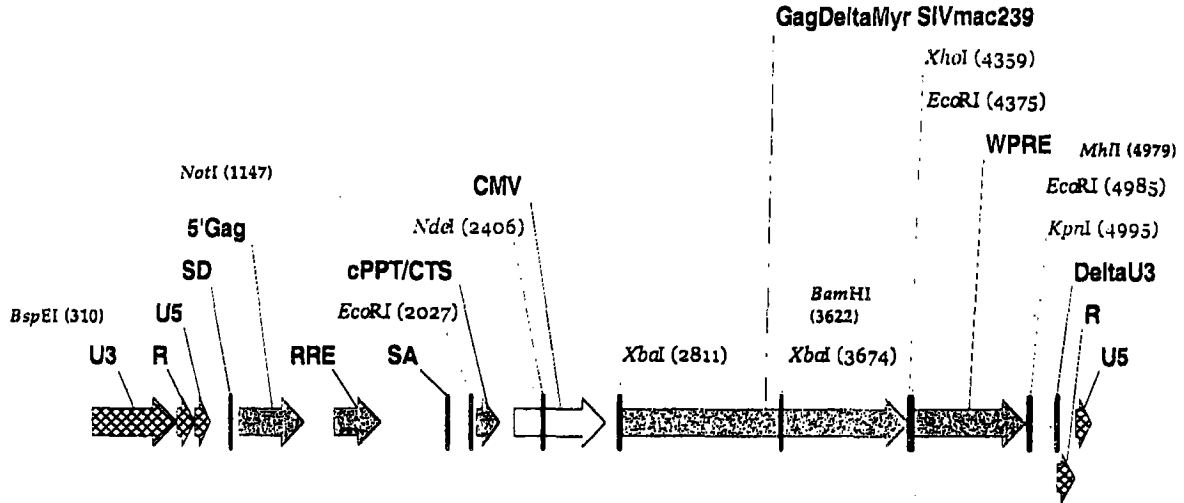


图 24



C1.



pTRIPDeltaU3-CMV.SIVGag.WPRE

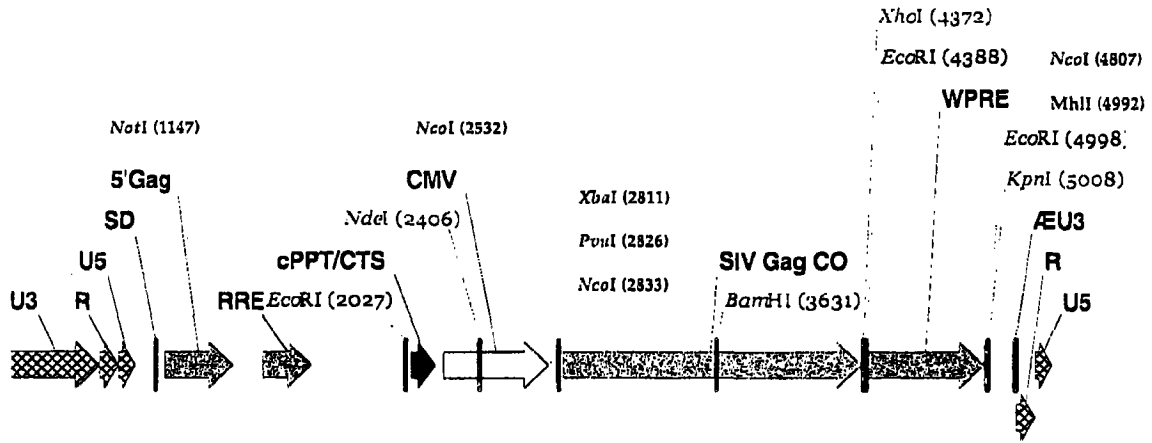
5322 bp

C2.

tggaaaggcctaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggc
 tacttccctgattagcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgaccttggatgggtg
 ctacaagctagtagcaggtgagccagagaagttagaagaagccaacaaggagagaacaccagcttgt
 tacaacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgtagagtggagggtttgacagc
 cgcctagcatttcatcacggtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgag
 cttgctacaagggacttccgctgggggacttccagggaggcgtggcctgggcccgggactggggagt
 gcgagccctcagatcctgcatataagcagctgcttttgctgtactgggtctctctggttagaccag
 atctgagcctgggagctctctgggtaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcttg
 agtgcttcaagtagtggtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt
 agtcagtggtgaaaatctctagcagtgggcggccgaacagggacttgaaagcgaagggaaccagagg
 agctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagagggcgagggggcggcgactgg
 agtacgcaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagattaa
 ggggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcgggttaaggccagggggaaagaaaaataaat
 taaaacatatagtagtggaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaaca
 tcagaaggctgtagacaataactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttag
 atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
 aagcttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgat
 cttcagacctggaggaggagatagagggacaattgggagaagtgaattatataaaataaaagtagtaa
 aattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagca
 gtgggaataggagctttgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatggggcgcagcgtcaat
 gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggatagtgagcagcagacaatttgctgaggg
 ctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatc
 ctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcat
 ttgcaccactgctgtgccttggaaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaaatcaca
 cgacctggatggagtgaggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
 tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttggtgaa
 ttggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag
 gtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcg

ttccagaccacctcccaacccccgaggggacccgacaggccccaaggaatagaagaagaaggtggaga
 gagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattcacaaatggc
 agtattcatccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtag
 acataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgg
 gtttattacagggacagcagagatccactttggggcgataagcttgggagttccgcggttacataactt
 acggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt
 tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccc
 acttggcagtagatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgg
 cccgctggcattatgcccagtagatgaccttatgggactttcctacttggcagtagatctacgtatt
 agtcatcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtagatcaatgggctggatagcgggttgact
 cacggggattttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgg
 gactttccaaaatgtcgtaaacaactccgccccattgacgcaaatgggctggtagggctgtacgggtggga
 ggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccaatccacgctgttttg
 acctccatagaagacaccgactctagaggatctgccaccatgggtgagaaactccgtcttgtcagggaa
 gaaagcagatgaattagaaaaaattaggctacgacccaacggaaagaaaaagtagatgttgaagcatg
 tagtatgggcagcaaatgaattagatagatttggattagcagaaagcctgttgggagaacaaagaagga
 tgtcaaaaaatactttcgggtcttagctccattagtgccaacaggctcagaaaatttaaaaagccttta
 taatactgtctgcgtcatctgggtgattcacgcagaagagaaagtgaaacacactgaggaagcaaac
 agatagtgacagagacacctagtggtggaacaggaacaacagaaactatgccaaaaacaagtagacca
 acagcaccatctagcggcagaggaggaaattaccagtagacaacaaataggtggtaactatgtccacct
 gccattaagccccgagaacattaaatgcctgggtaaaatttgatagaggaaaagaaatttggagcagaag
 tagtgccaggatttcaggcactgtcagaagggtgcacccccctatgacattaatcagatgttaaattgt
 gtgggagaccatcaagcggctatgacagattatcagagatattataaacgaggaggctgcagattggga
 cttgcagcaccacaaccagctccacaacaaggacaacttagggagccgtcaggatcagatattgcag
 gaacaactagttcagtagatgaacaaatccagtggtatgtacagacaacagaacccccataccagtaggc
 aacatttacaggagatggatccaactgggggttgcaaaaatgtgtcagaatgtataaccaacaacaat
 tctagatgtaaaaacaagggccaaaagagccatttcagagctatgttagacaggttctacaaaagttaa
 gagcagaacagacagatgcagcagtaagaattggatgactcaaacactgctgattcaaaatgctaac
 ccagattgcaagctagtgtgaaggggctgggtgtgaatcccaccctagaagaaatgctgacggcttg
 tcaaggagtaggggggcccgggacagaaggctagattaatggcagaagcctgaaagaggccctcgcac
 cagtgccaatcccttttgcagcagcccaacagaggggacccaagaaagccaattaagtgttggaaattgt
 gggaaagaggggacactctgcaaggcaatgcagagcccccaagaagacagggatgctggaaatgtggaaa
 aatggaccatgttatggccaaatgccagacagacagggcgggttttttaggccttgggtccatggggaa
 agaagccccgcaatttccccatggctcaagtgcacaggggctgatgccaactgctccccagaggac
 ccagctgtggatctgctaaagaactacatgcagttgggcaagcagcagagagaaaagcagagagaaaag
 cagagagaagccttacaaggaggtgacagaggatttgcctgcacctcaattctctcttggaggagacc
 agtagctcgagctcaagcttcgaattcccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattg
 actgggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatca
 tgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaaatcctgggtgctgtctctttatg
 aggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccact
 ggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggactttcgcttccccctccctattgccac
 ggcggaactcatcgccgcctgccttggccgctgctggacaggggctcggctgttgggactgacaatt
 ccgtgggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttggcacctggattctg
 cggggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgggctgct
 gccggctctgcccctcttccgcgtcttcgcttcgcccctcagacgagtcggatctccctttggggccg
 cctccccgcgtcgacgcgtgaattcgggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtatagatctt
 agccactttttaaagaaaaggggggactggaagggtcaattcactcccacgaagacaagatcgctcg
 agagatgctgcatataagcagctgctttttgcttgtagctgggtctctctggttagaccagatctgagc
 ctgggagctctctggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgcttc
 aagttagtggtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtg
 tggaaaaatctctagcagt

D1.



pTRIPDeltaU3-CMV-SIVGag CO-WPRE

5335 bp

D2.

tggagggttaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggc
 tacttccttgattagcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgaccttggatgggtg
 ctacaagctagtaccagttgagccagagaagttagaagaagccaacaaaggagagaacaccagcttgt
 tacaacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggagggttgacagc
 cgcctagcatttcacacgggtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgag
 ctgtctacaaggactttccgctgggggactttccagggaggcgtggcctgggaggactggggagtg
 gcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgctgtactgggtctctctgggttagaccag
 atctgagcctgggagctctctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctg
 agtgcttcaagtagtggtgcccgtctgttggtgactctggtaactagagatccctcagaccctttt
 agtcagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaacagggacttgaaagcgaaggaaaccagagg
 agctctctcgacgcaggactcggccttgctgaagcgcgcacggcaagagggcagggggcggcactgggtg
 agtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagattaa
 gcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaatcgggttaaggccagggggaaagaaaaaataaaat
 taaaacatatagtagtggaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaca
 tcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttag
 atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
 aagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgat
 cttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaagtagtaa
 aattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagca
 gtgggaataggagctttggttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcccagcgtcaat
 gacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctgggtatagtgagcagcagacaatttgctgaggg
 ctattgagggcgaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatc
 ctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcat
 ttgcaccactgctgtgccttgggaatgctagttggagtaataaaatctctggaacagatttggaaatcaca
 cgacctggatggagtgaggacagagaaattaaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
 tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaa
 ttggtttaacatacaaatggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag
 gtttaagaatagtttttgcctgactttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcg

ttccagaccacctcccaacccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggaga
 gagagacagagacagatccattcgattagtgaaacggatctcgacggatcgccgaattcaciaaatggc
 agtattcatccacaatttttaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtag
 acataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaaaattacaaaaattcaaaattttcgg
 gtttattacagggacagcagagatccactttggggcgataagcttgggagttccgcggtacataactt
 acggtaaatggccccgctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgt
 tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatattacggtaaaactgcc
 acttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgg
 cccgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatt
 agtcatcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggctggatagcggtttgact
 cacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgg
 gactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggctggtagcgtgtacgggtggga
 ggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccgtcagatcgccctggagacgccatccacgctgtttt
 acctccatagaagacaccgactctagaggatctcgatcggccaccatgggctgagcgaacagcgtgct
 gagcggcaagaaggccgacgagctggagaagatccgctgcccccaacggcaagaagaagtacatgc
 tgaagcacgtgggtgtgggcccgtaacgagctggaccggttcggcctggccgagagcctgctgggaa
 aaggagggctgccagaagatcctgagcgtgctggccccctctggtgcccaccggcagcagaaacctgaa
 gagcctgtacaacaccgctgtgctgatctggtgcatccacgcccaggagaaggtgaagcacaccgagg
 aggccaagcagatcgtgcagcggccacctggtggtggagaccggcaccaccgagaccatgcccaagacc
 agcaggccccaccgccccctagcagcggcagagggcgggaactaccccgtgcagcagatcggcggcaacta
 cgtgcacctgccccctgagccccaggacctgaacgcctgggtgaagctgatcagggagaagaagttcg
 gcgctgaggtgggtgccccgcttccaggccctgagcagggctgcacccccctacgacatcaaccagatg
 ctgaactgogtgggcgaccaccaggcccgcatgcagatcatccgcgacatcatcaacgaggaagccgc
 cgactgggacctgcagcaccaccagcctgccccccagcagggccagctgcgcgagcccagcggctccg
 acatcgccggcaccaccagcagcgtcgcagcagatccagtggtatgaccgcccagcagaacccccatc
 cccgtgggcaacatctaccgcccgtggatccagctgggcccctgcagaagtgcgtgcgcatgtacaacc
 caccaacatcctggagctgaagcagggcccccaaggagcccttccagagctacgtggaccgcttctaca
 agagcctgagggccgagcagaccgatgccgcccgtgaagaactggatgacccagaccctgctgatccag
 aacgccaacccccgactgcaagctgggtgctgaagggcctgggctgaacccccaccctggaggagatgct
 gaccgctgccagggcgtgggaggacctggccagaaggccaggctgatggccgaagccctgaaggagg
 ccttggccccctgtgcccattccccttcgcccgtgcccagcagaggggcccctcgcaagcccataagtg
 tggaaactgcccgaaggagggccacagcggcaggcagtgccgcgctccccgcaggcagggctgctggaa
 gtgtgggaagatggaccacgtgatggccaagtgcccccgaccgcccaggccggcttcttgggcccggcc
 cctgggggaagaagccccgcaacttccctatggcgcaggtgcaccaggccctcatgcctaccgccccct
 cccgaggacctgcccgtggacctgctgaagaactacatgcagctgggcaagcagcagcgcgagaagca
 ggcgagagccgcgagaagccctacaaggaggtgaccgaggacctgctgcacctgaacagcctgttcg
 gcgagaccagtaatgaactcgagctcaagcttcgaattcccgataatcaacctctggattacaaaat
 ttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtctgcttaa
 tgctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaaatcctgggtg
 ctgtctctttatgaggagtgtggtggccgctgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgtttgctga
 cgcaacccccactgggtggggcattggccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccc
 tccctattggccacggcggaaactcatcgccgctgcccctgcccgctgctggacaggggctcggctgttg
 ggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgccctgtgttg
 cacctggattctgcgcccggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccct
 cccgcccctgctgcccggctctgcccctcttccgctcttcgcccctcagacgagtcggatc
 tccctttgggcccctccccgctgcagcgcgtgaattcggtacctttaagaccaatgacttacaaggc
 agctgtagatcttagccactttttaaagaaaagggggactgggaagggtcaattcactcccaacgaa
 gacaagatcgtcgagagatgctgcatataagcagctgcttttggctgtactgggtctctctggttag
 accagatctgagcctgggagctctctggcctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttg
 ccttgagtgtctcaagtagtggtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacc
 ctttttagtcagtggtgaaaatctctagcagt

图 25

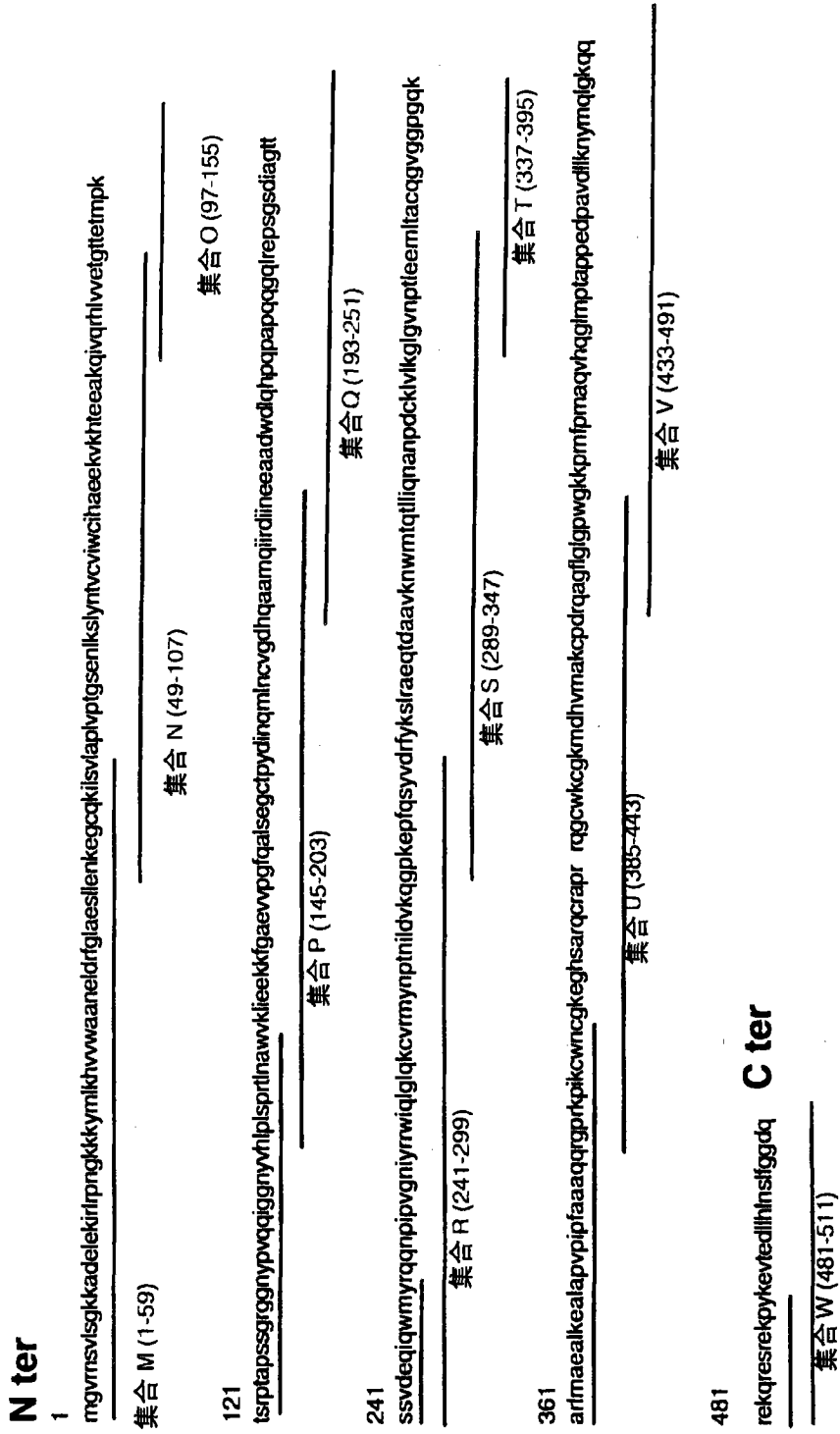


图 26

A.

PCR	Oligos	序列 5' → 3'
USR 正向引物	M667	GGCTAACTAGGGAACCCACTG
USR 反向引物	AASM	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA
USR 3' 末端供体探针	LTR FL	CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FL
USR 5' 末端供体探针	LTR LC	LC-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC
CD3 正向引物	CD3在5'	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3 反向引物	CD3在3'	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
CD3 3' 末端供体探针	CD3 FL	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FL
CD3 5' 末端供体探针	CD3 LC	LC-CTAGTGATGGGCTCTCCCTTGAGCCCTTC

循环的步骤和数目		温度	持续时间
1 个循环	1: 变性	95°C	3 min
	2: 变性	95°C	5 sec
40 个循环	3: 退火	57°C	10 sec
	4: 延长	72°C	8 sec

B.

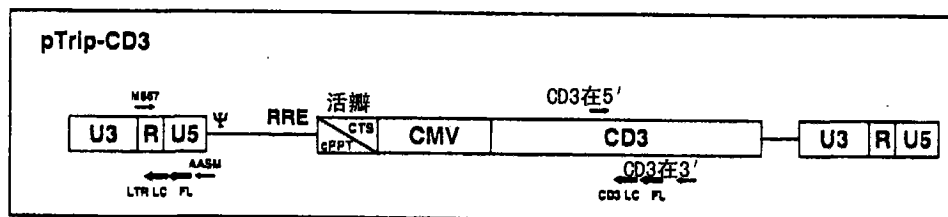


图 27

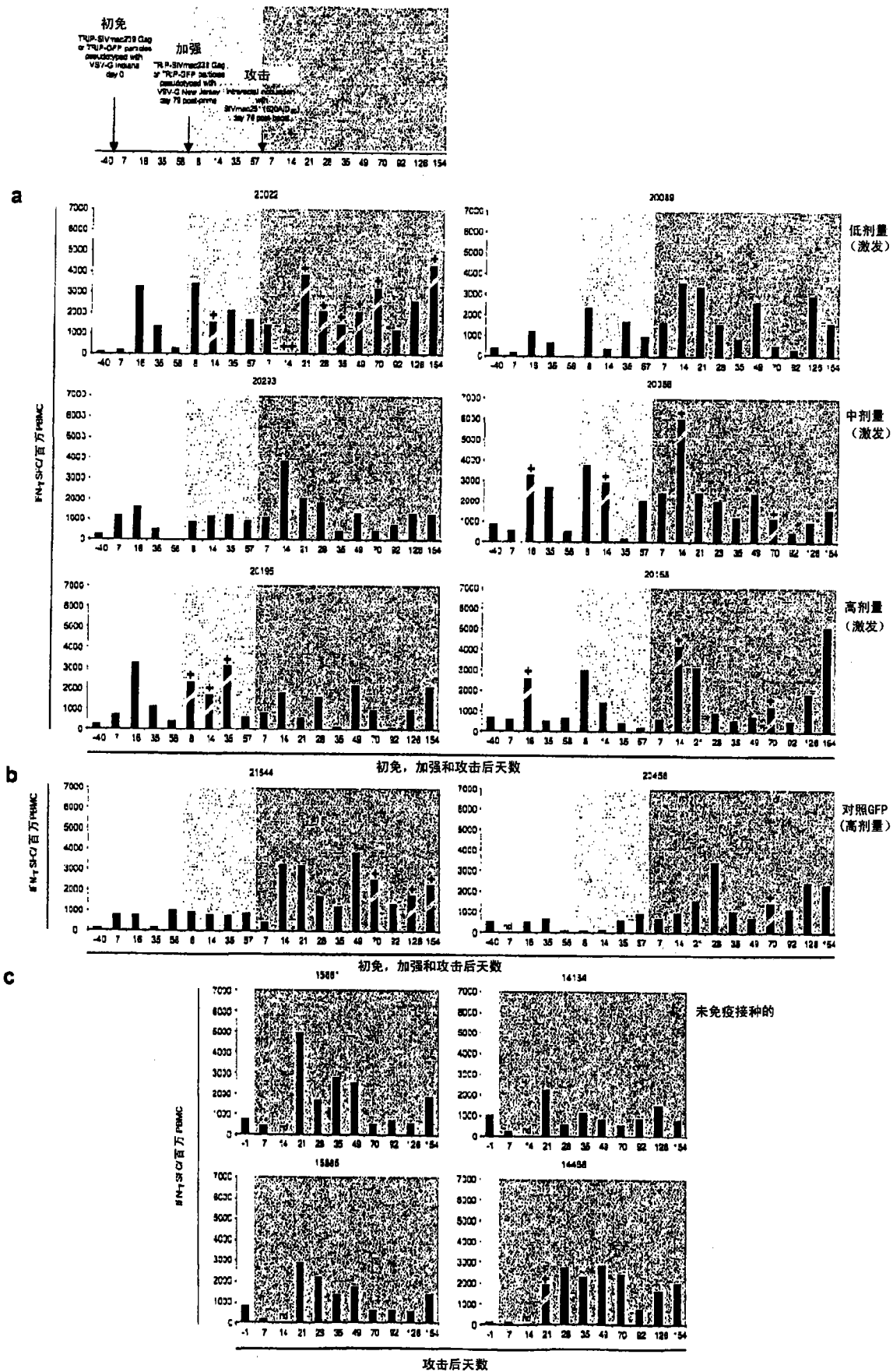


图 28(1)

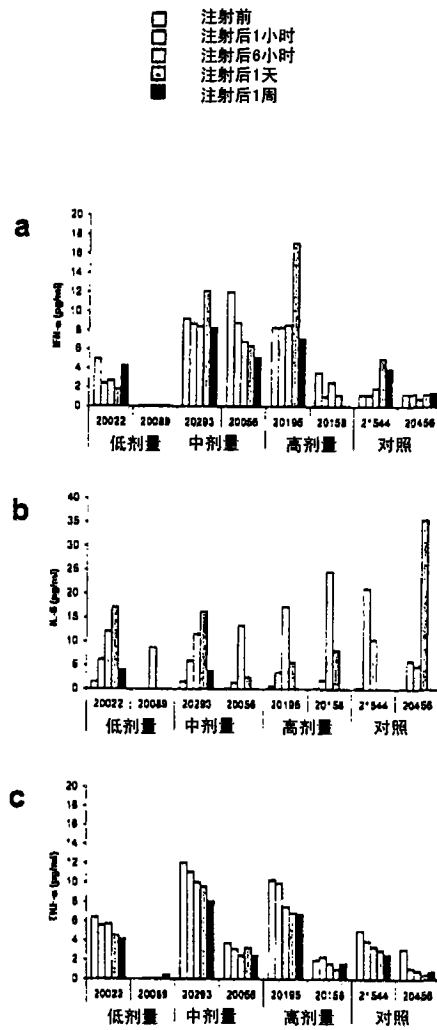


图 28(2)

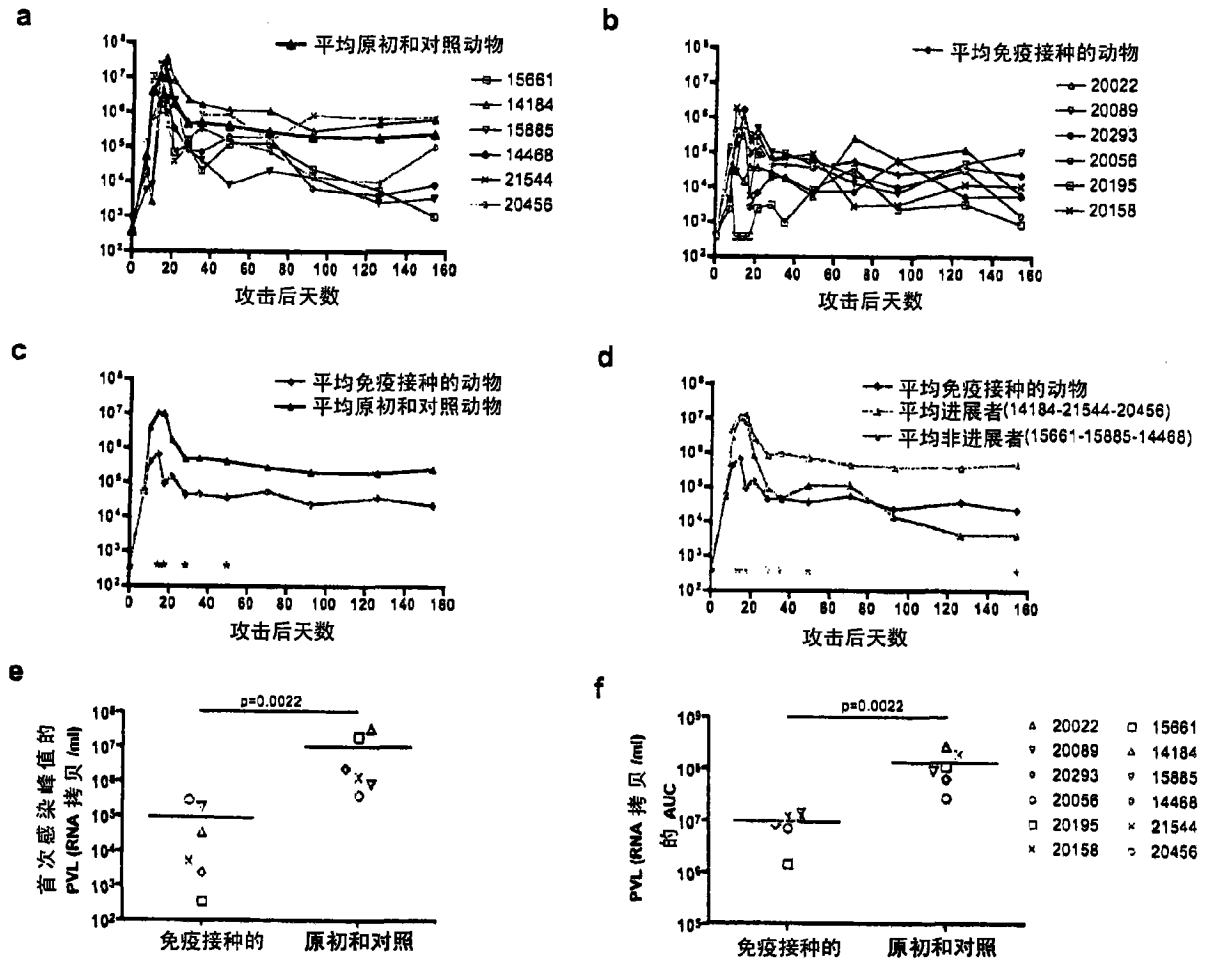


图 29(1)

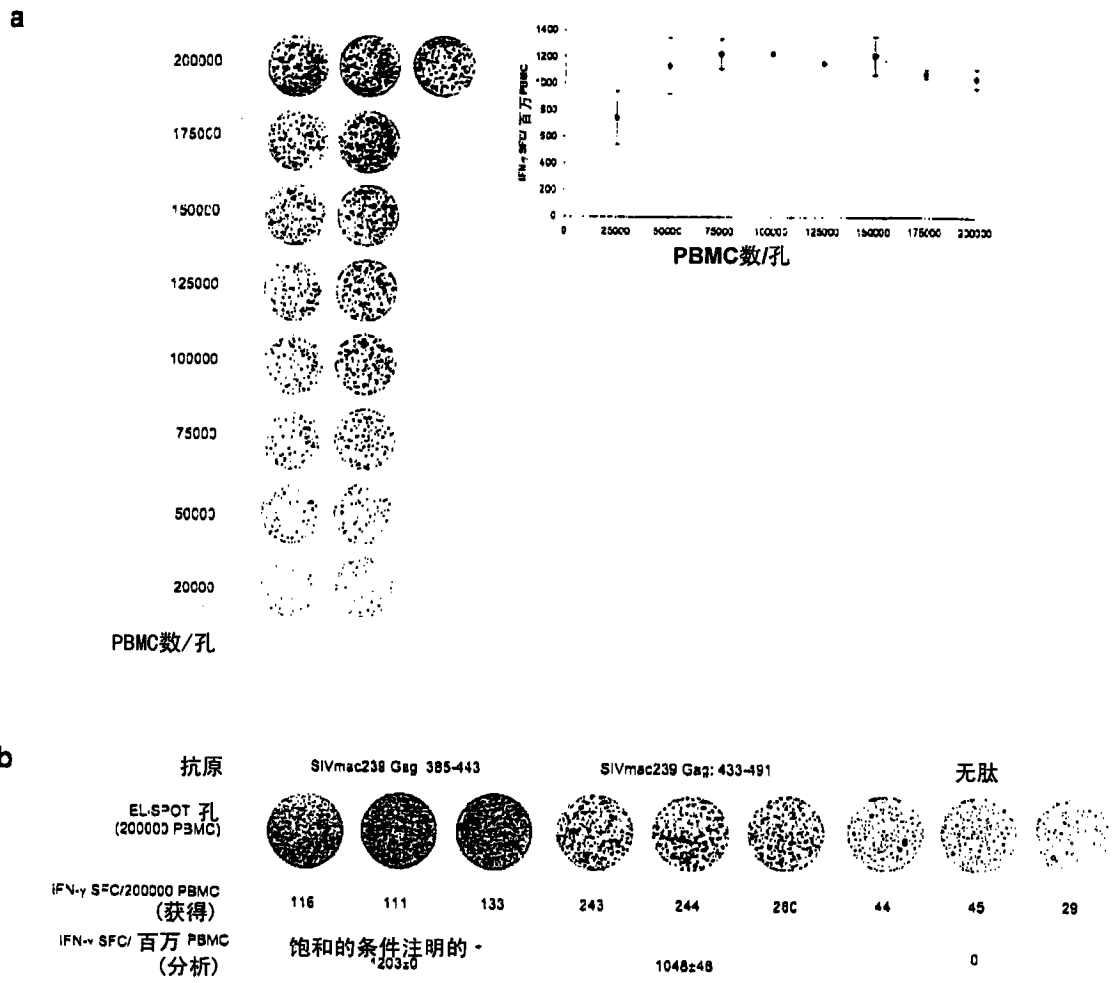


图 29(2)

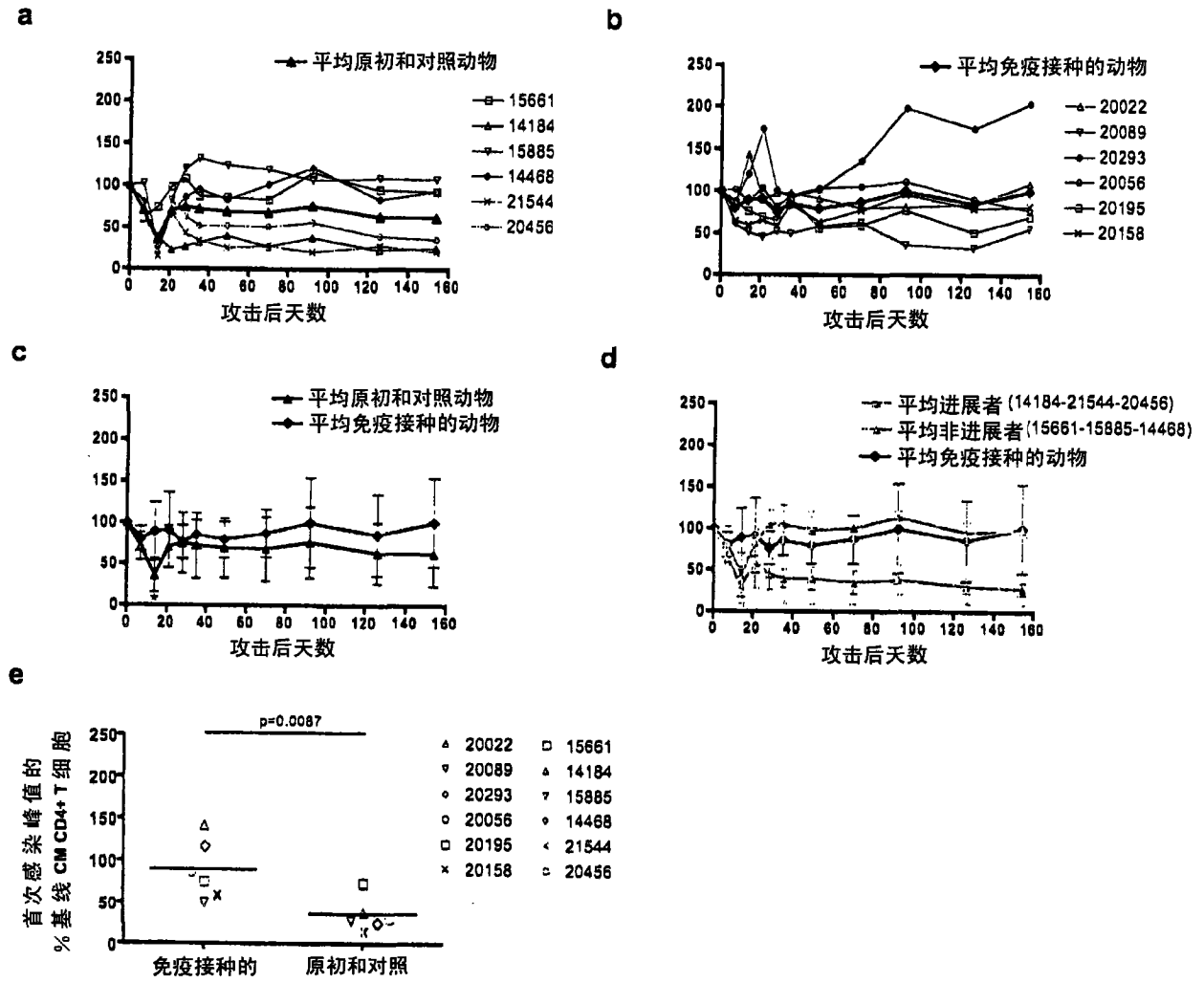


图 30(1)

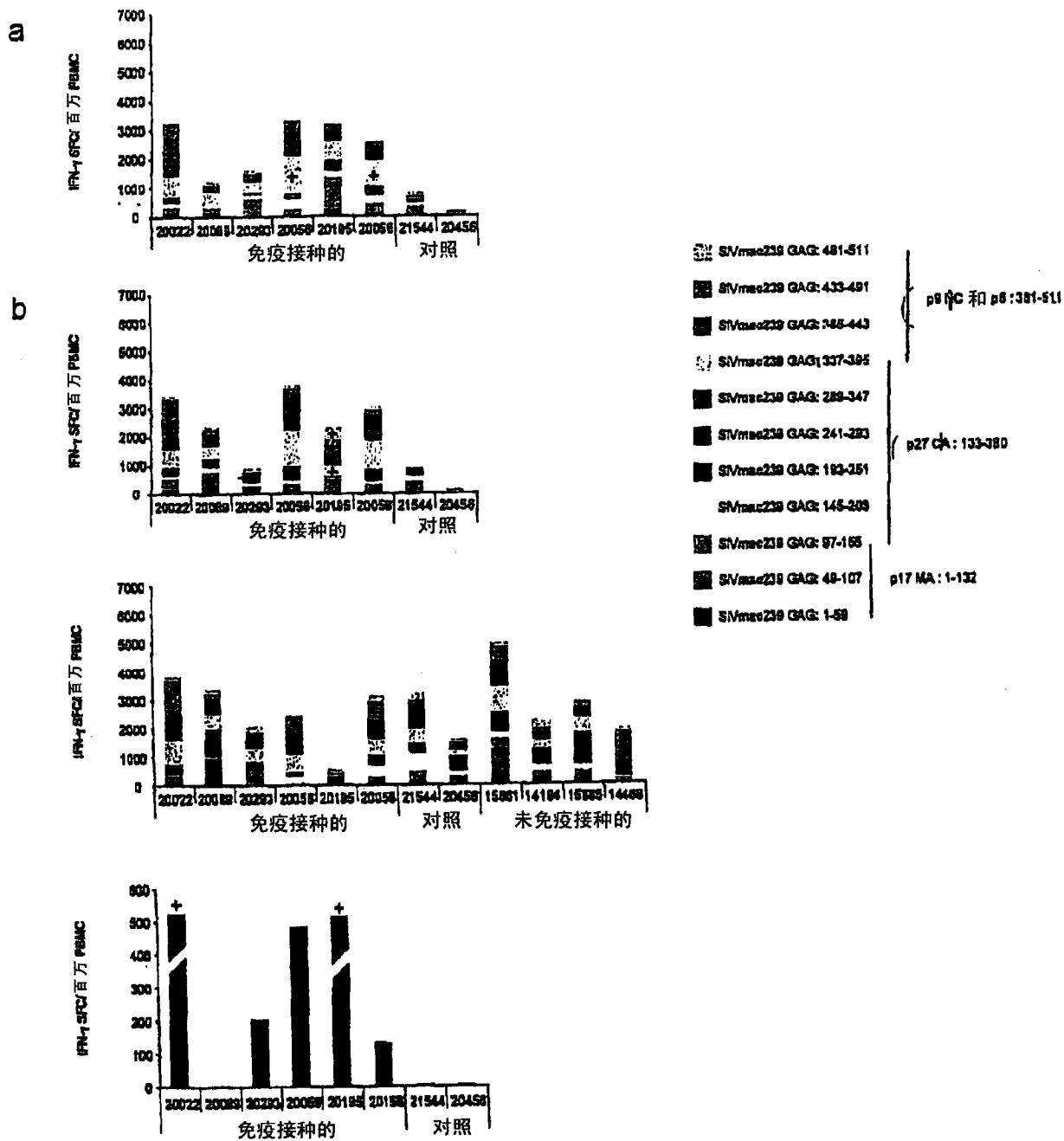


图 30(2)

免疫接种的动物	原初和对照动物
▲ 20022	□ 15661
▼ 20089	△ 14184
○ 20293	▽ 15885
◇ 20056	◆ 14468
□ 20195	⋮ 21544
× 20158	◊ 20456

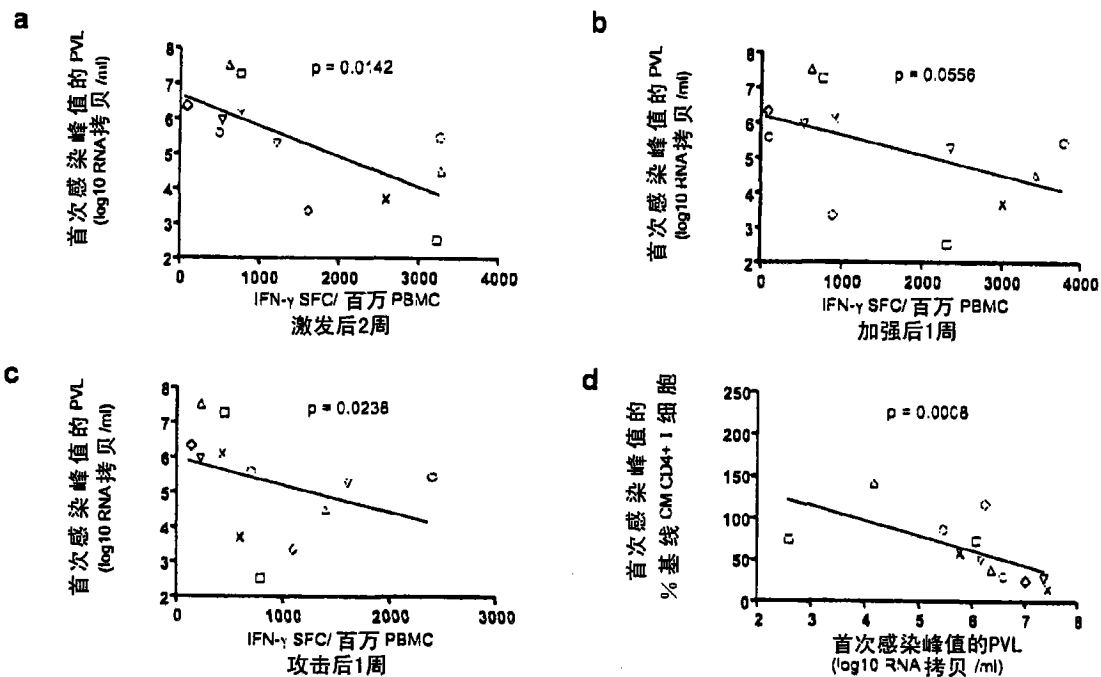


图 31(1)

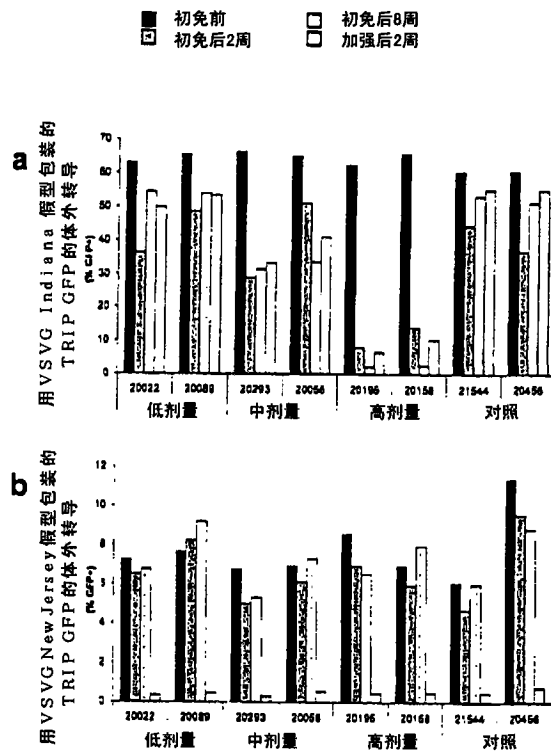


图 31(2)

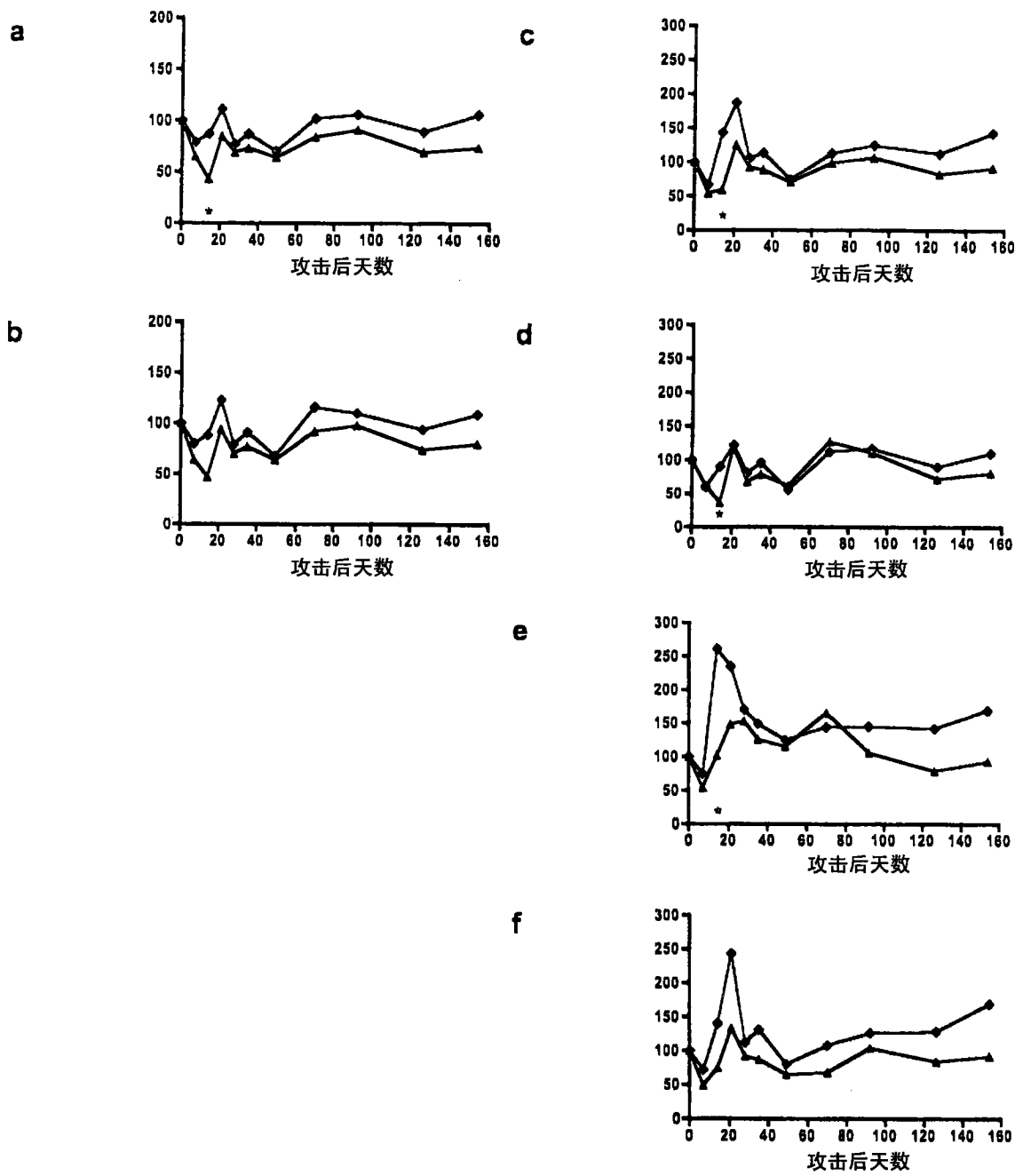


图 32

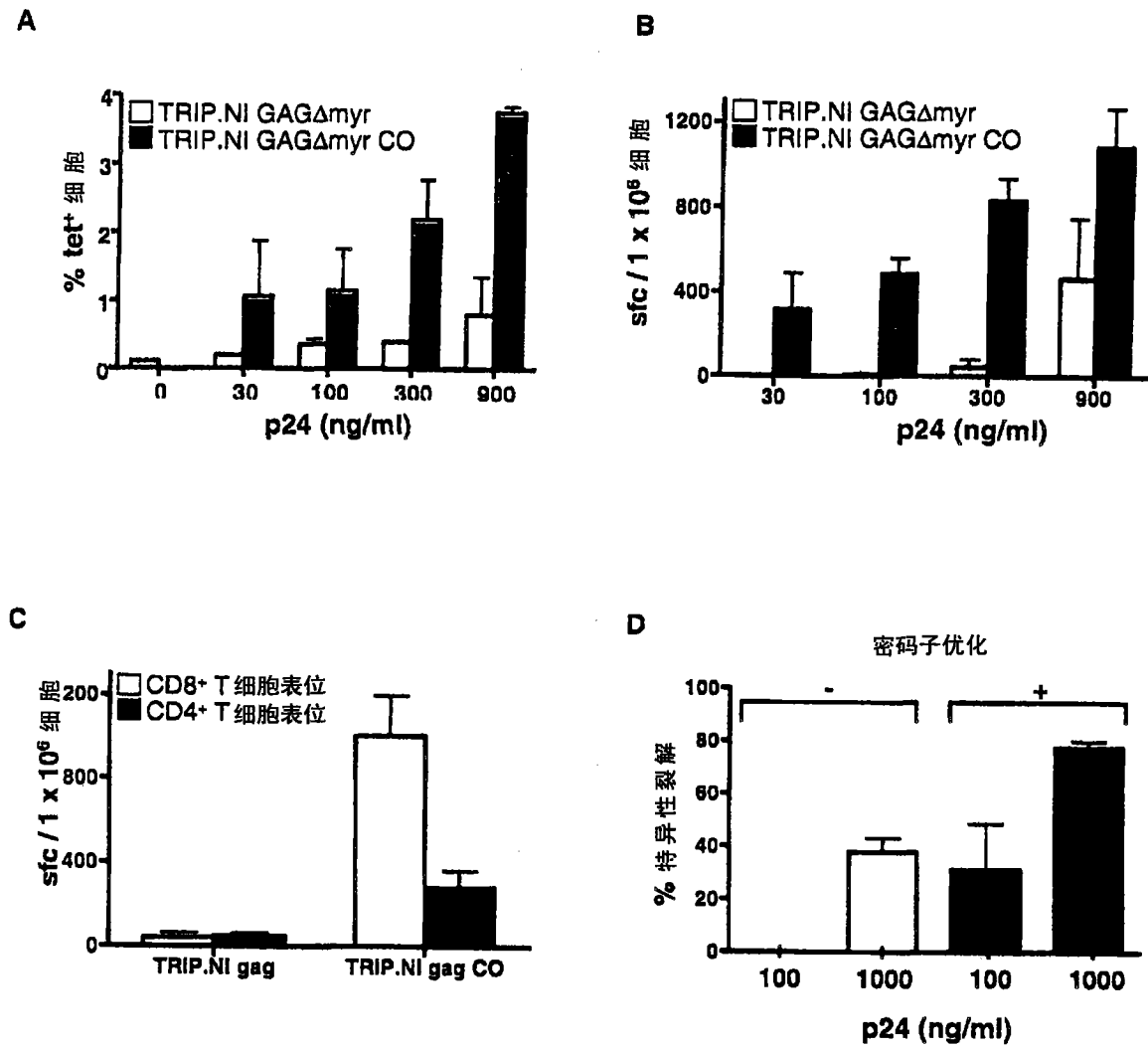


图 33

非整合型慢病毒载体诱导的记忆T细胞应答

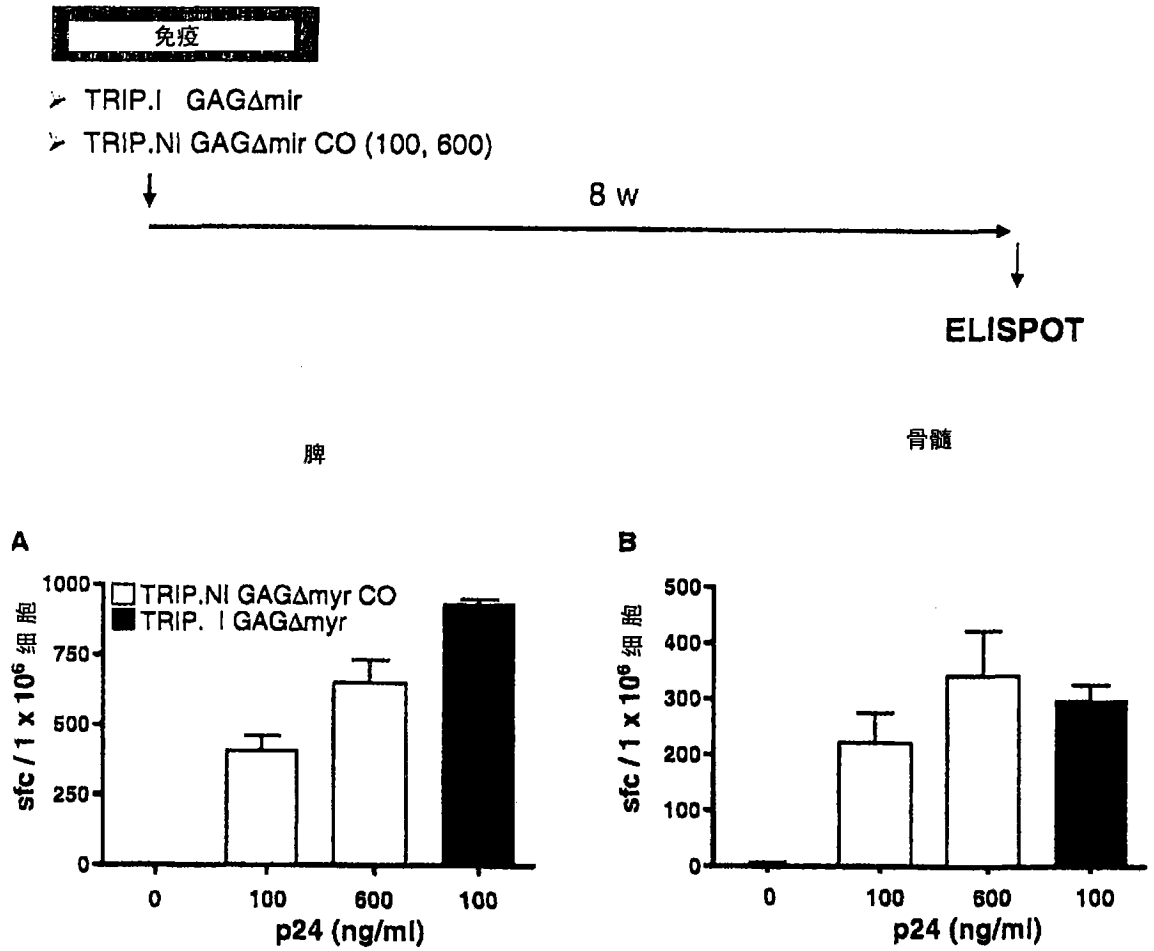


图 34

用来自非交叉反应型VSV血清型的糖蛋白G假型包装的
基于 TRIP.NI GAG Δ myr CO 颗粒的初免-加强策略

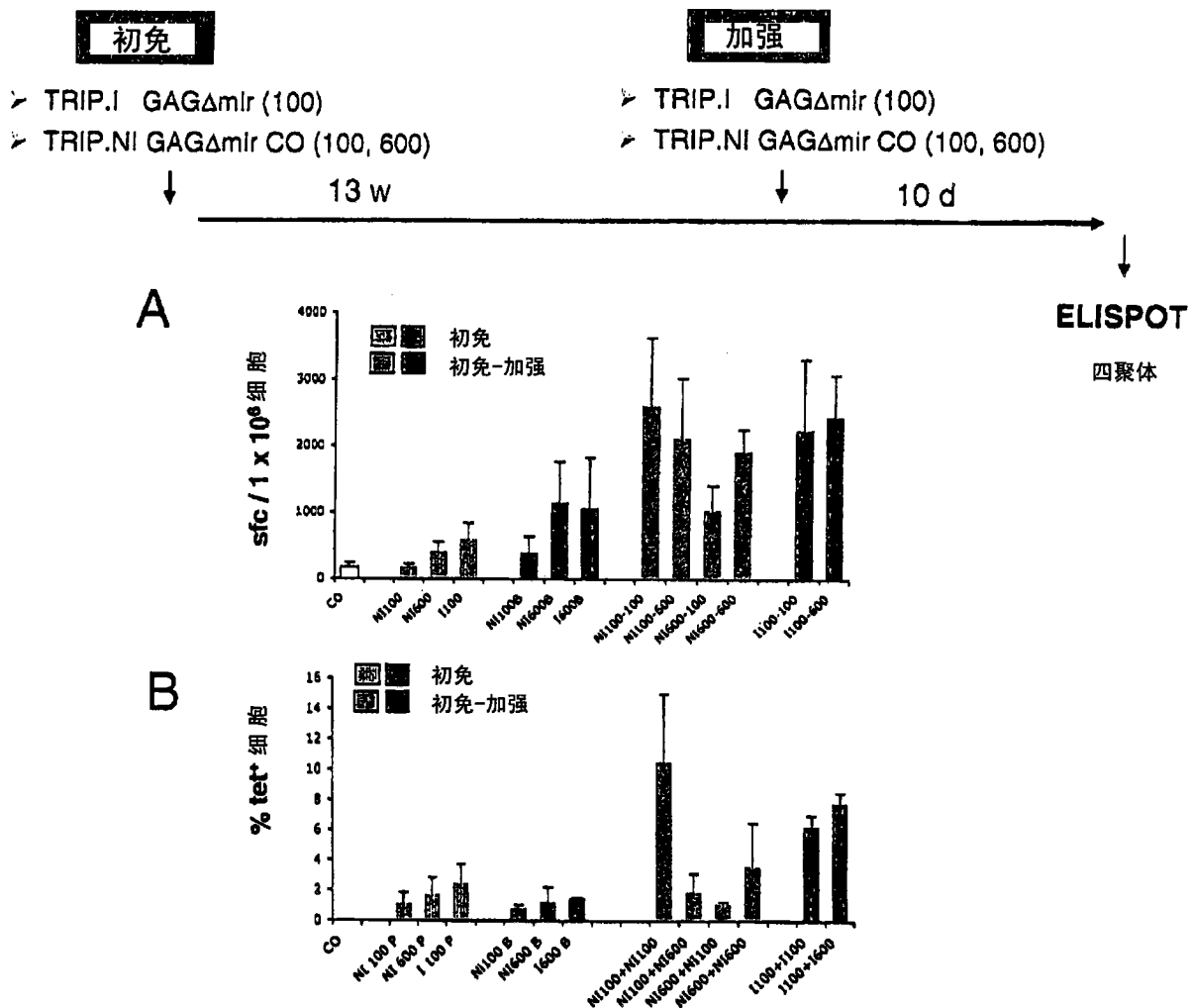


图 35

经由 i. d. , i. p. 或 s. c. 途径单次给予慢病毒载体后的 CTL 反应的诱导

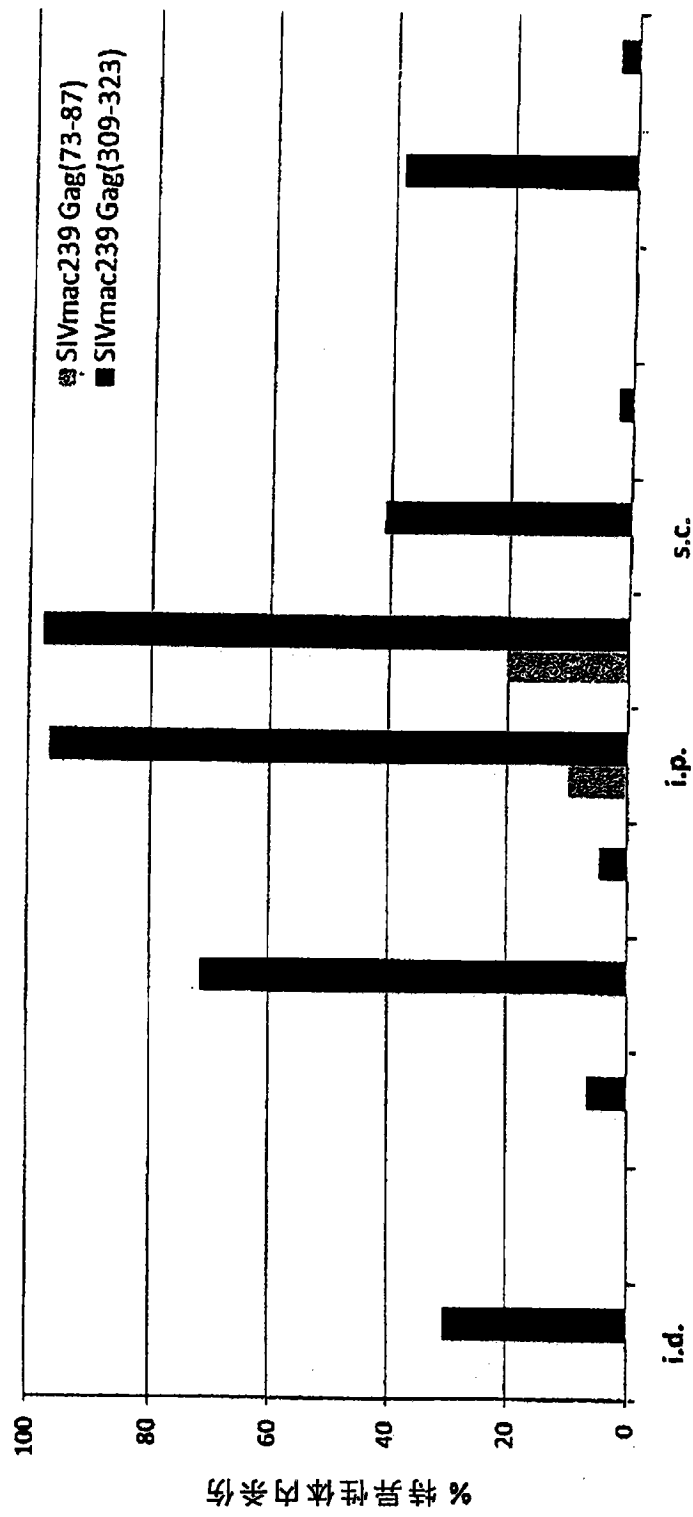


图 36

经由t. c. i., i. d. 或 i. p. 途径单次给予慢病毒载体后的CTL反应的诱导

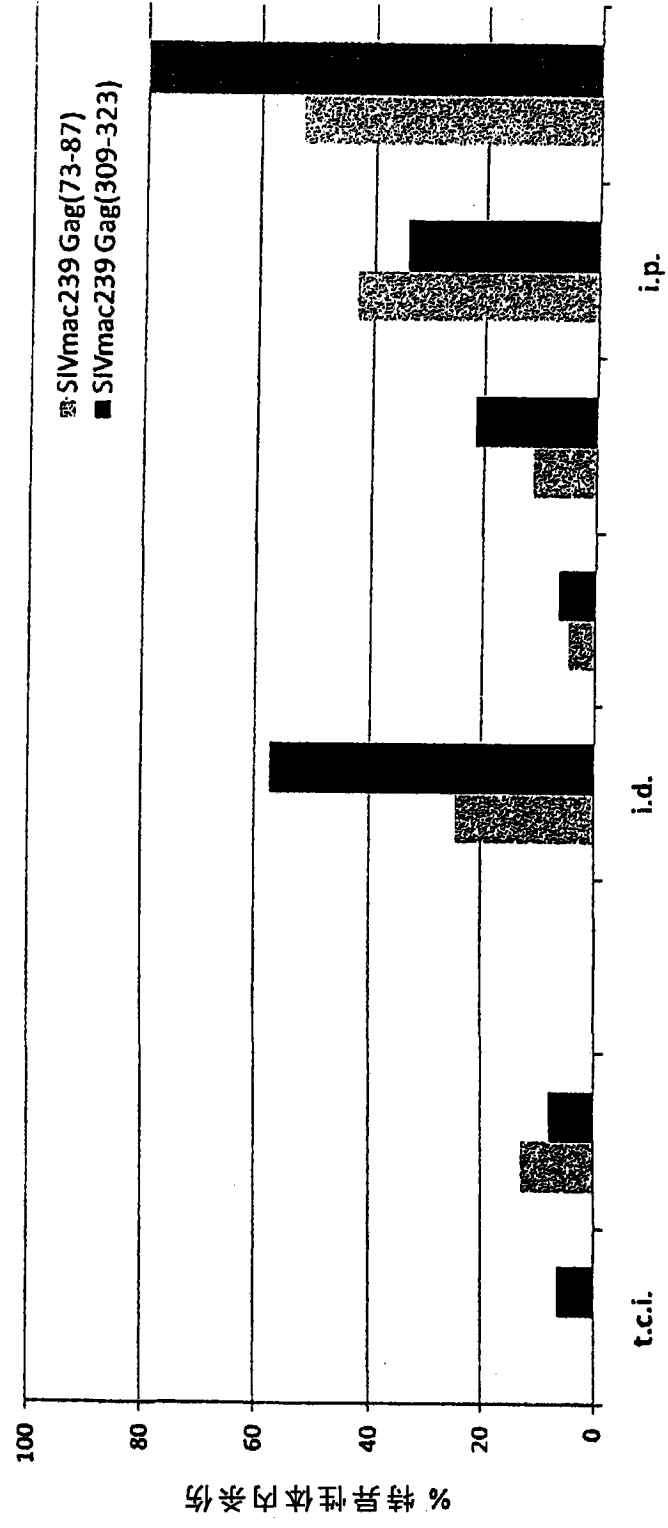


图 37

经由 i.m., i.p. 或 s.c. 途径单次给予慢病毒载体后的 CTL 反应的诱导

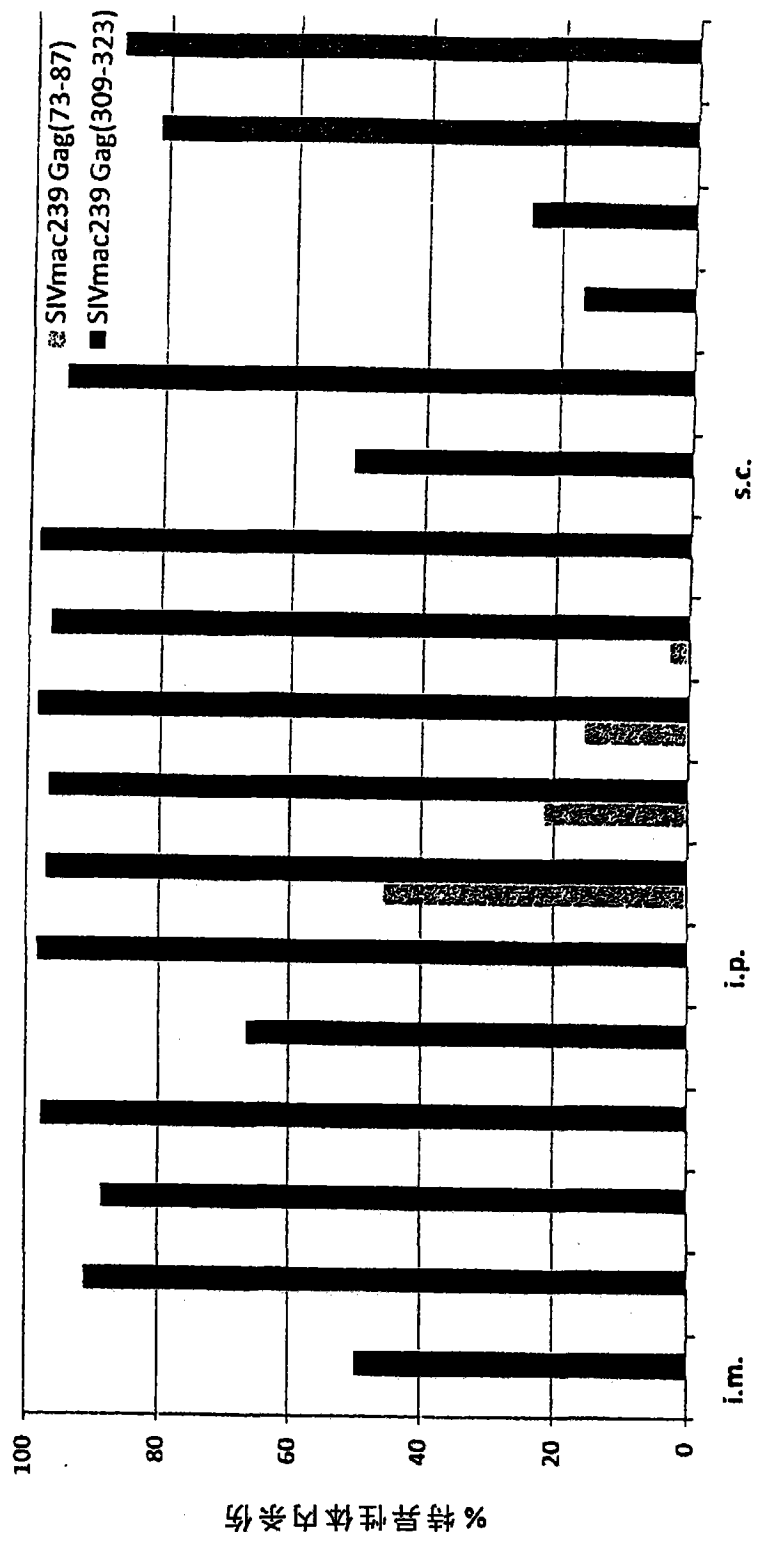


图 38

经由 i. p. 相对于 i. m. 途径单次给予慢病毒载体后的干扰 γ 分泌细胞

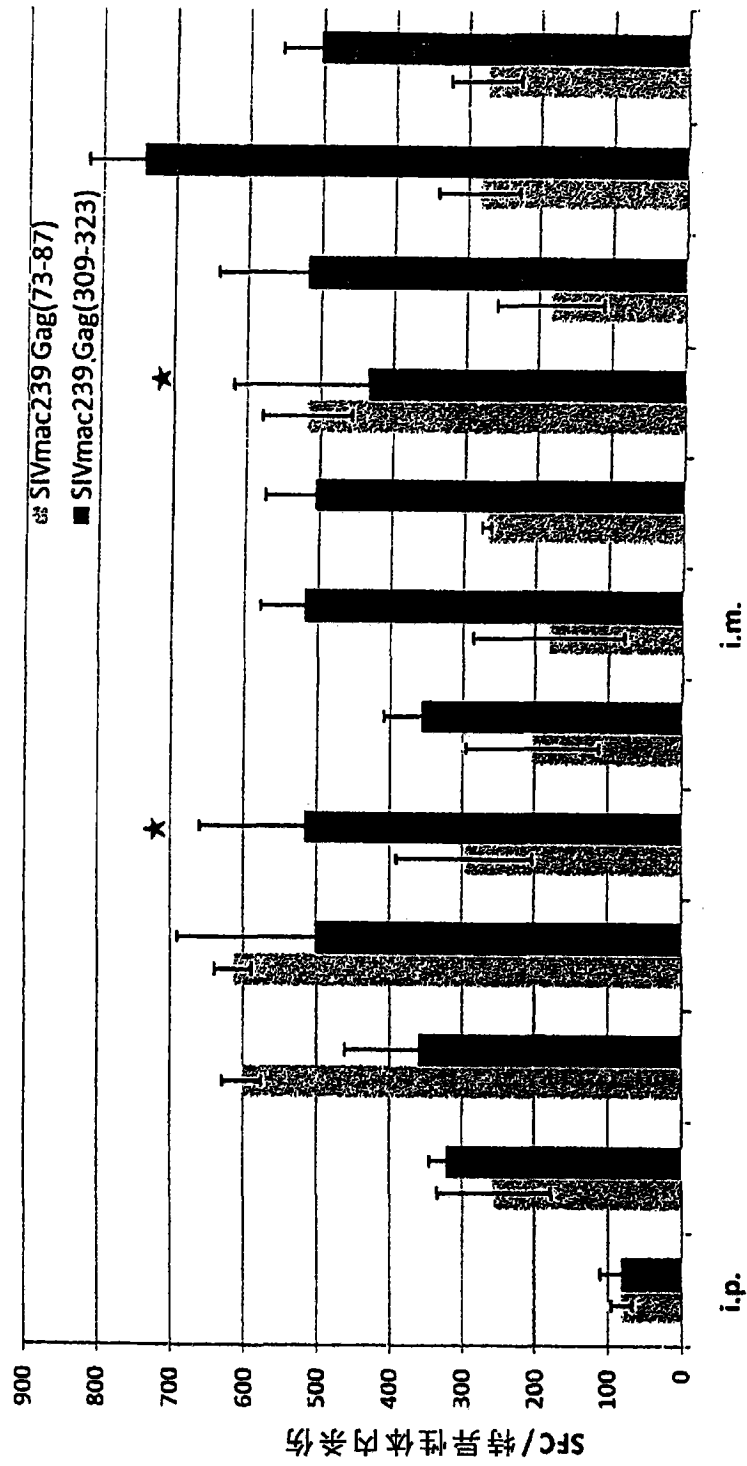


图 39

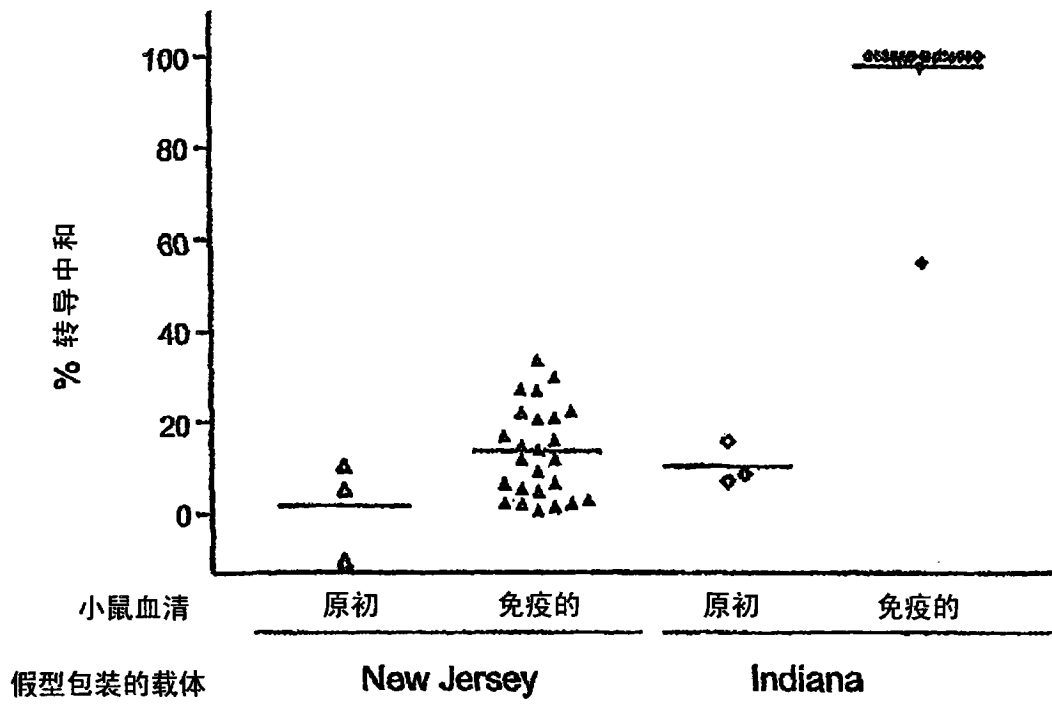


图 40

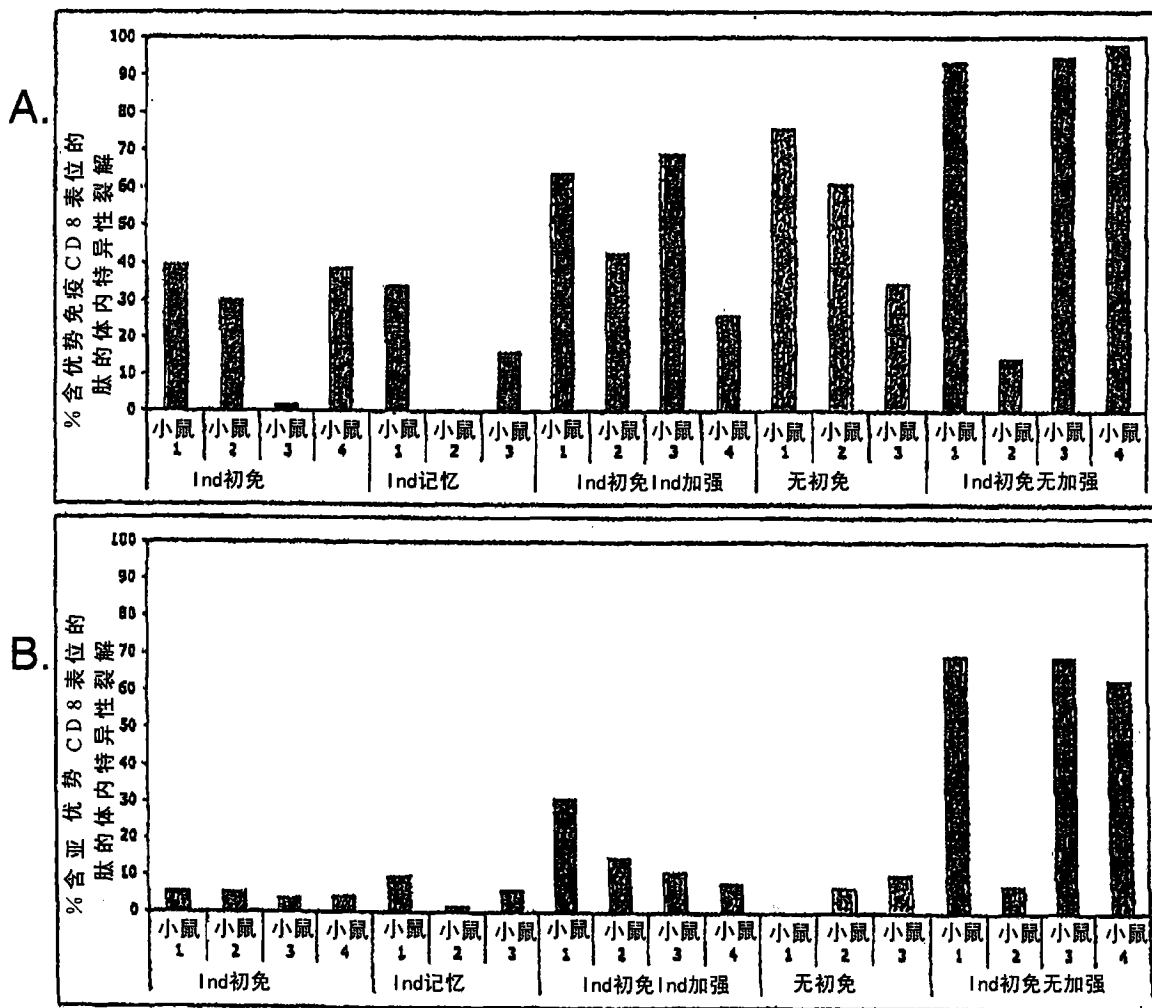


图 41

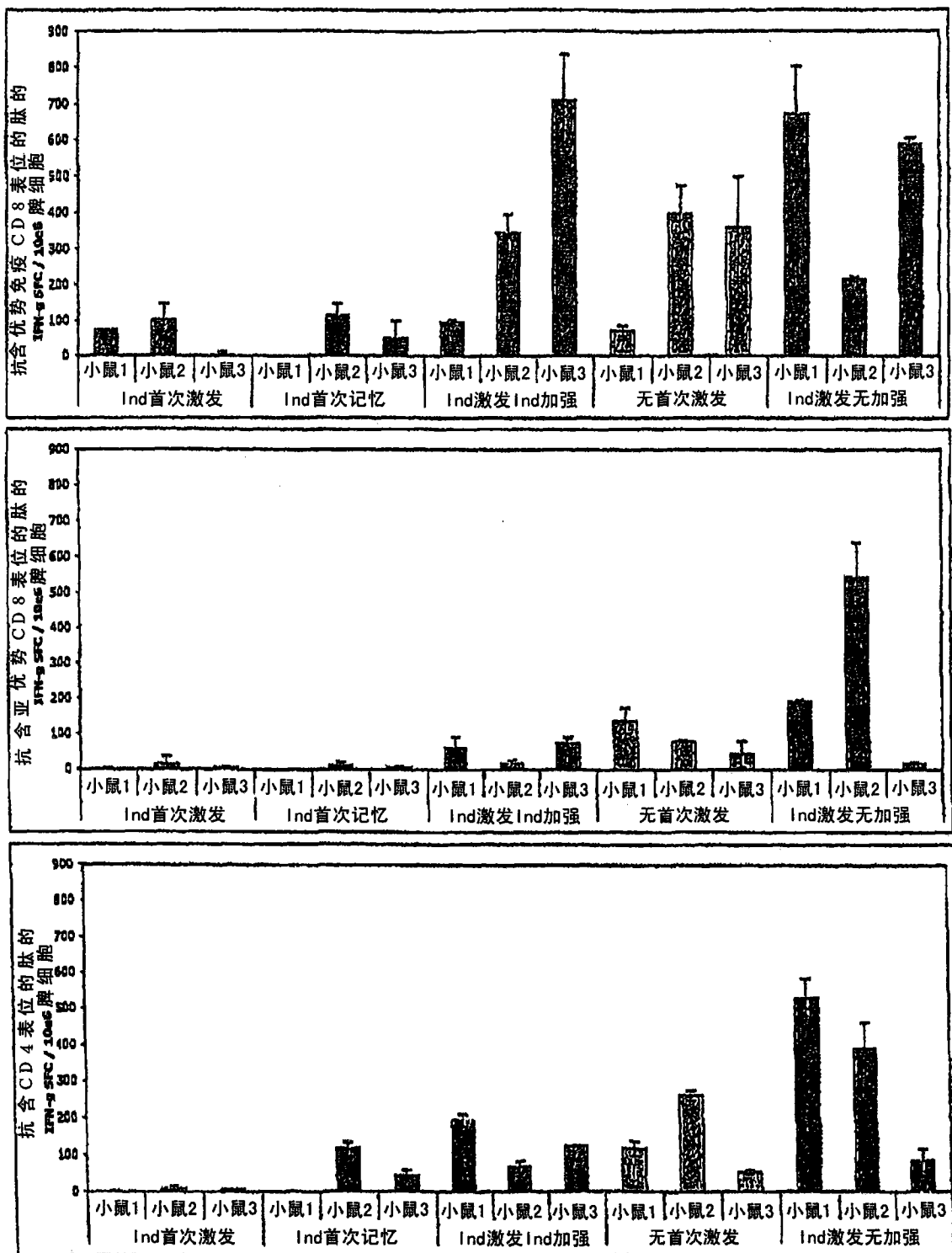


图 42

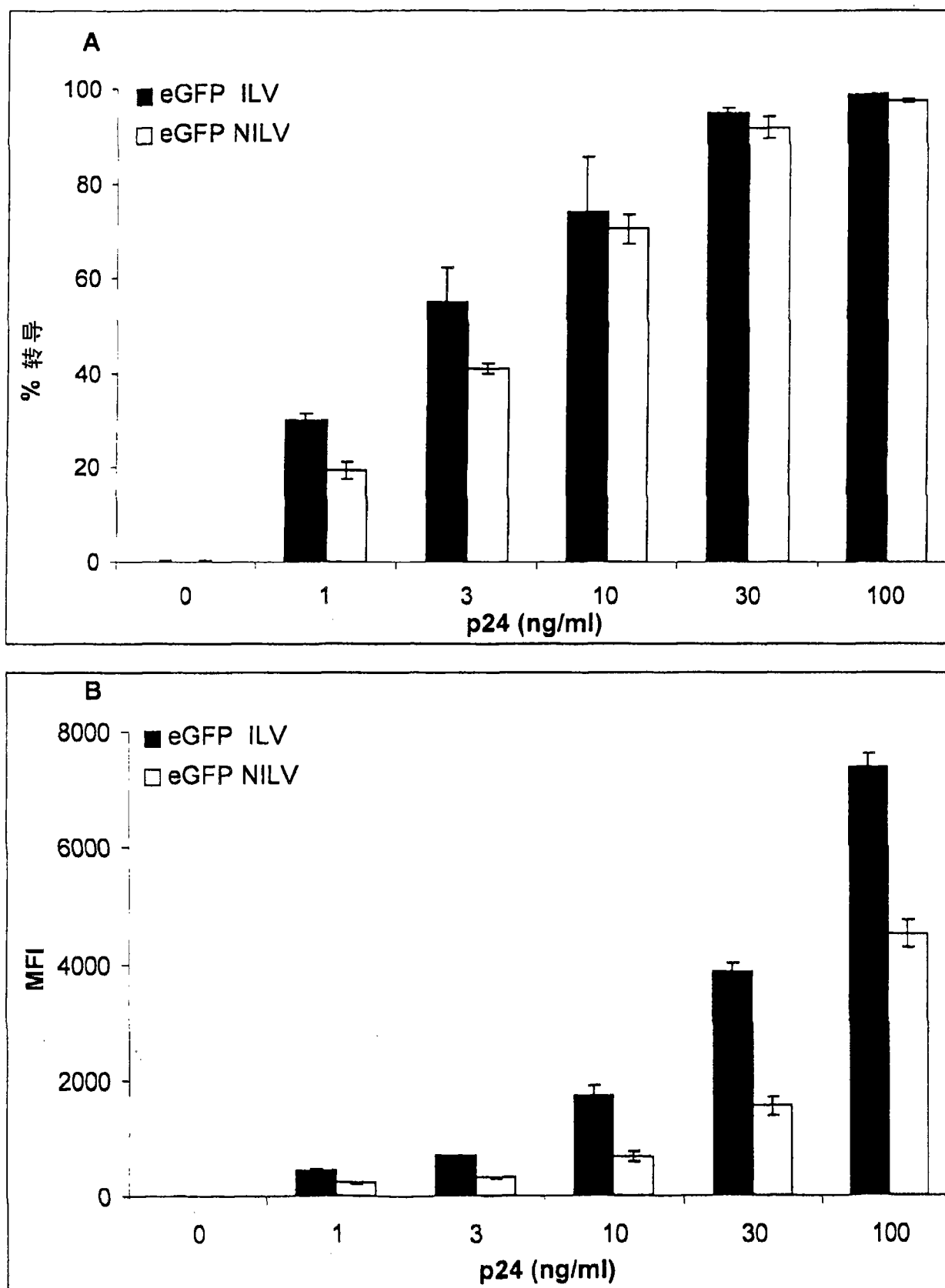


图 43

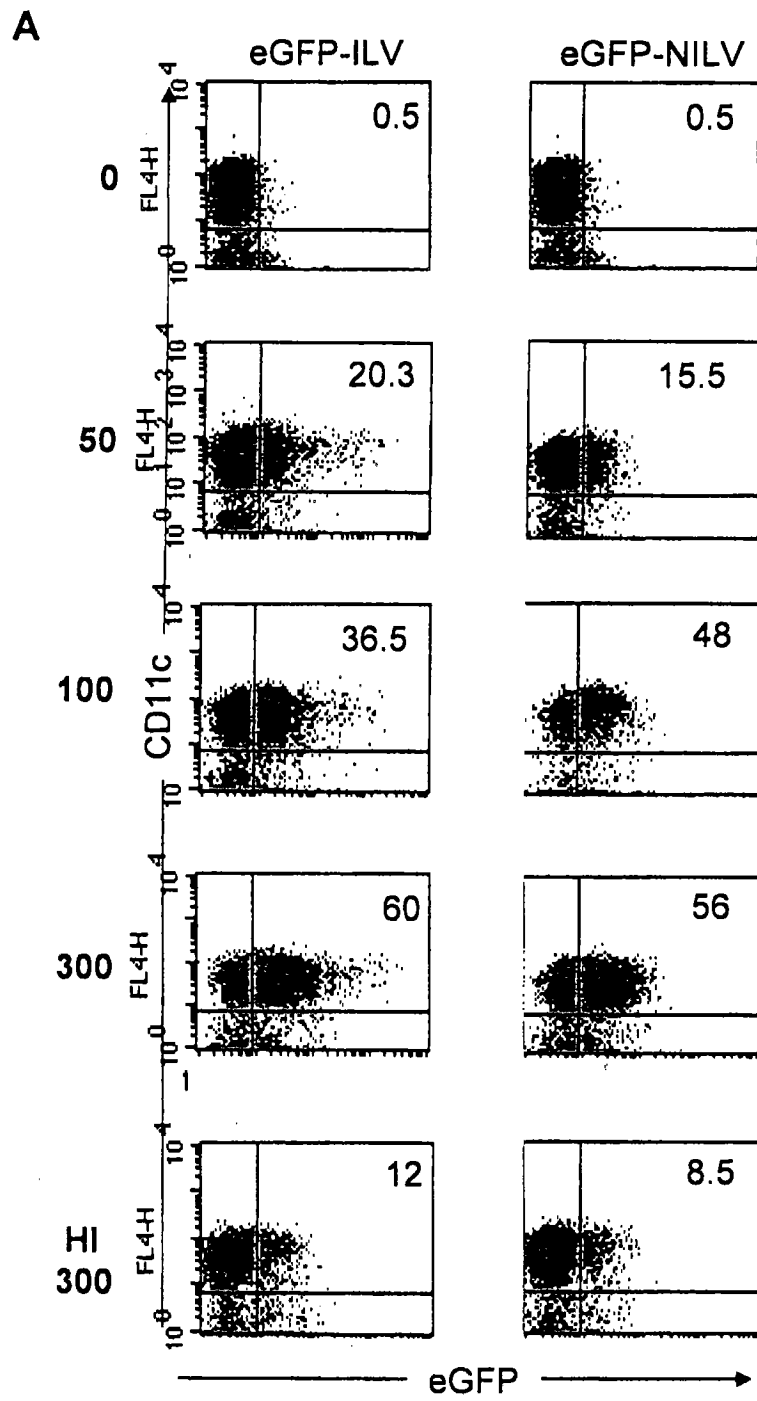


图 44A

B

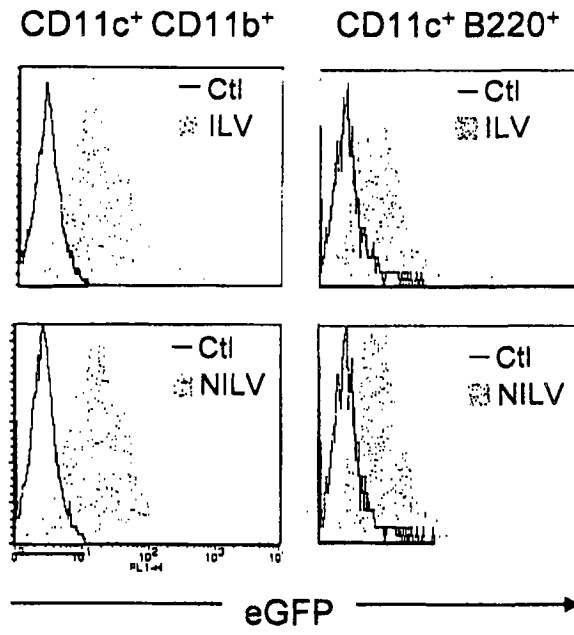


图 44B

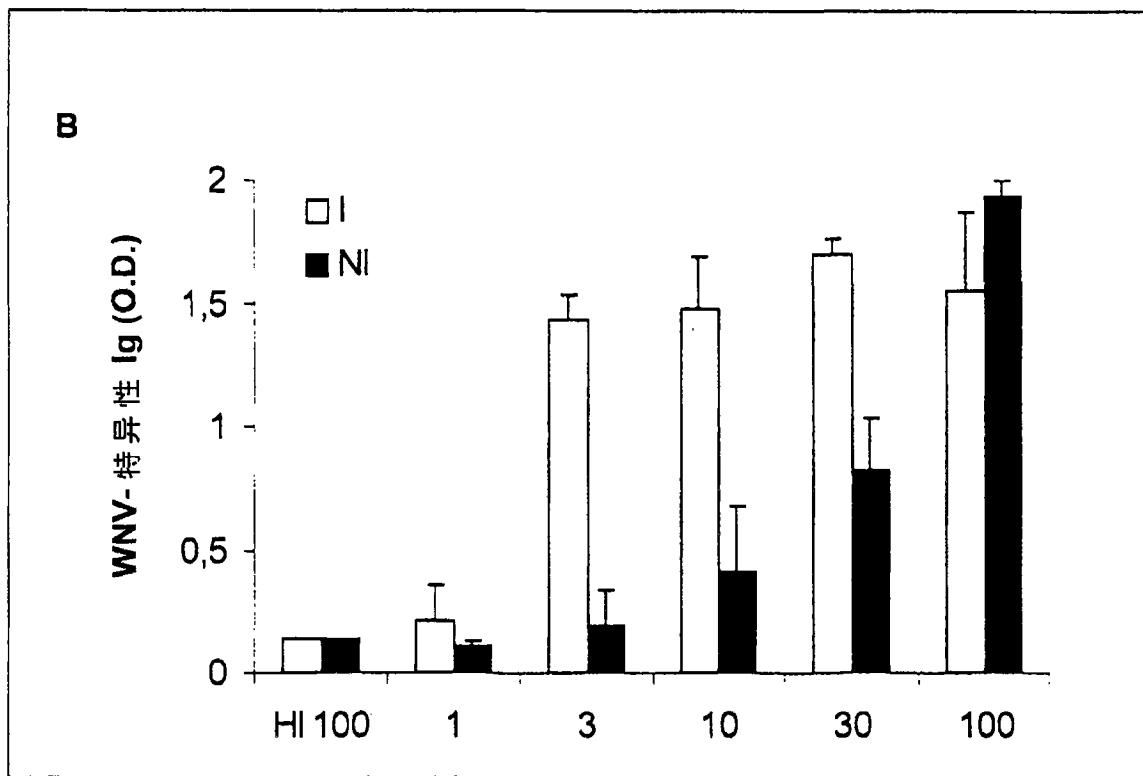
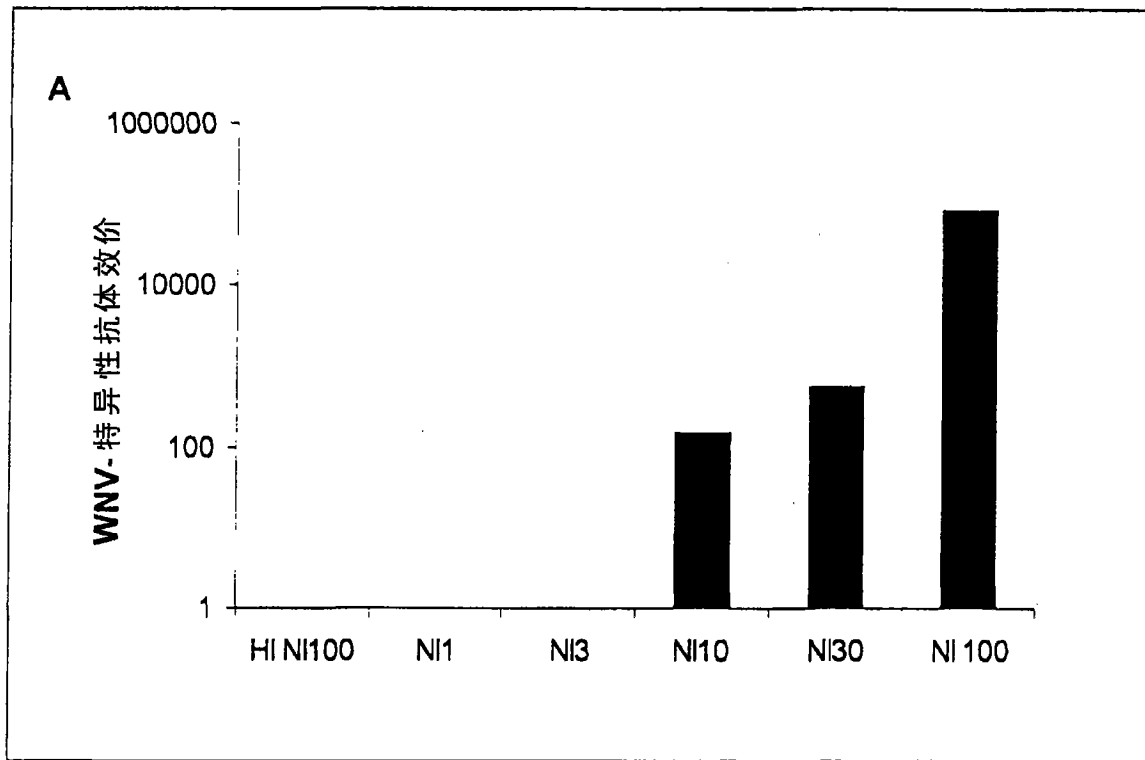


图 45

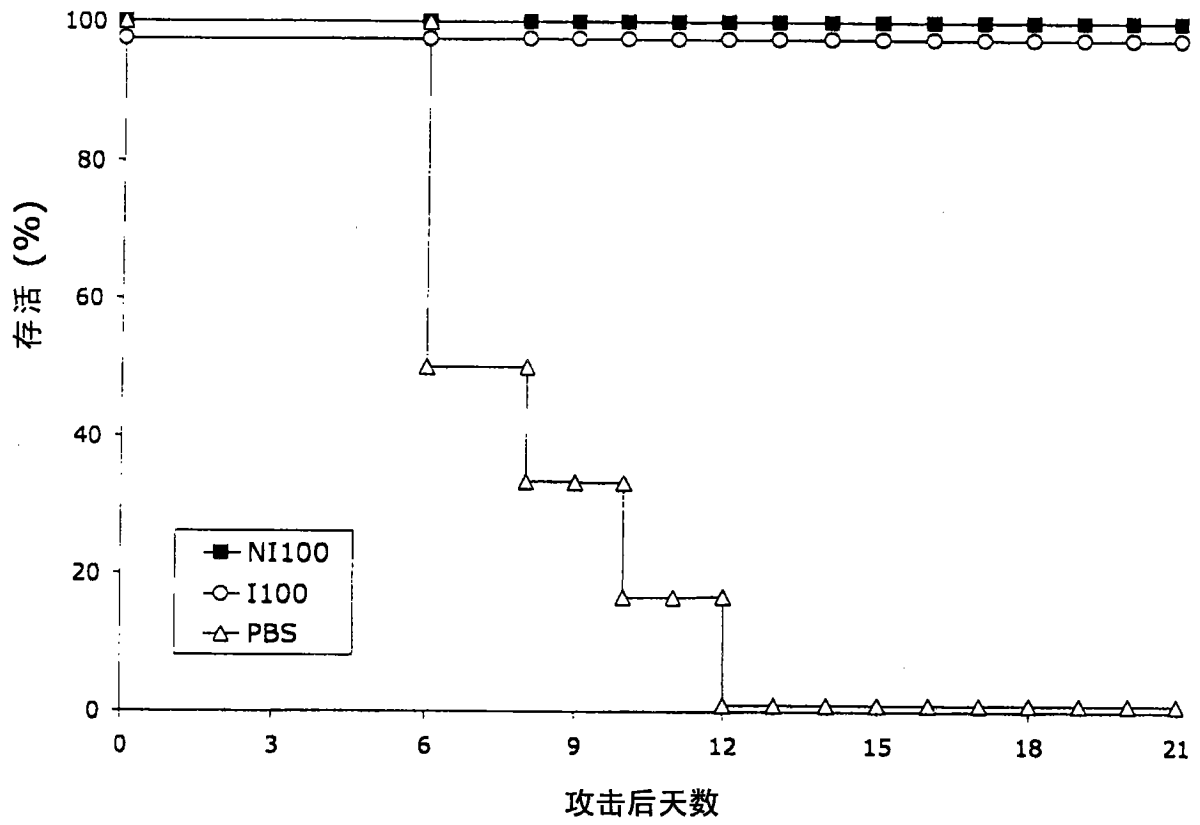


图 46

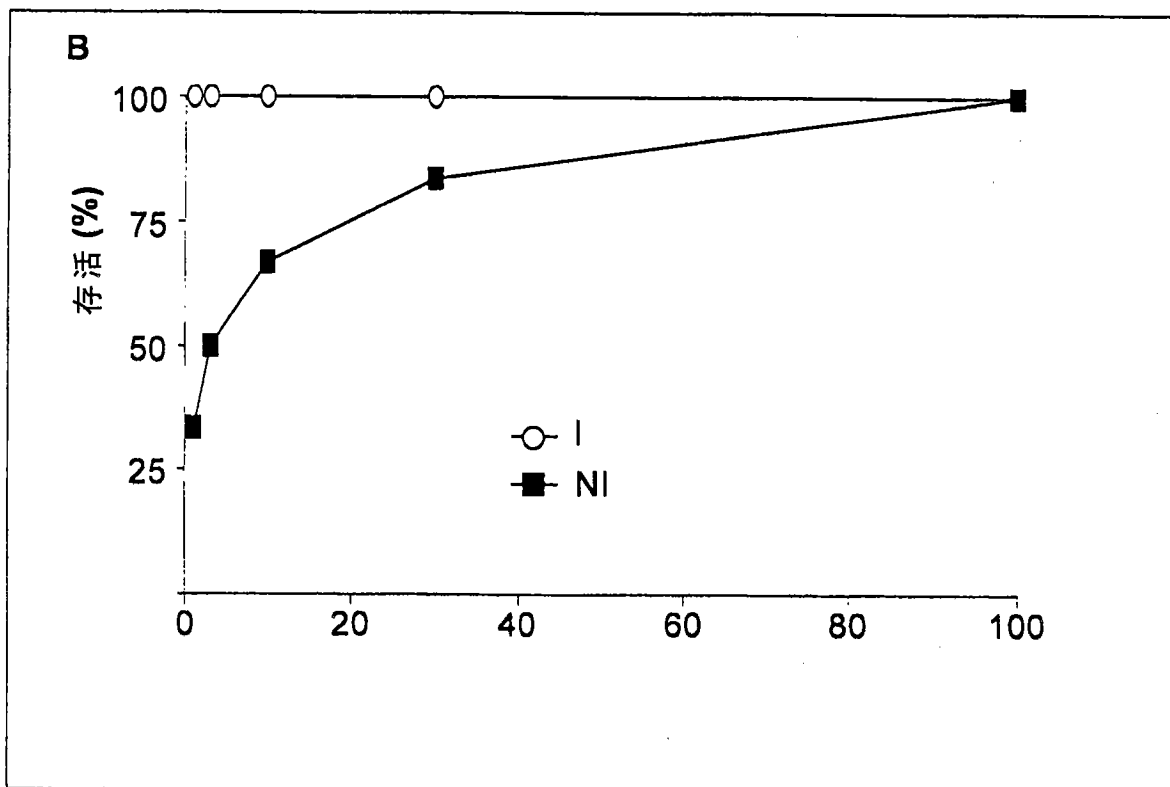
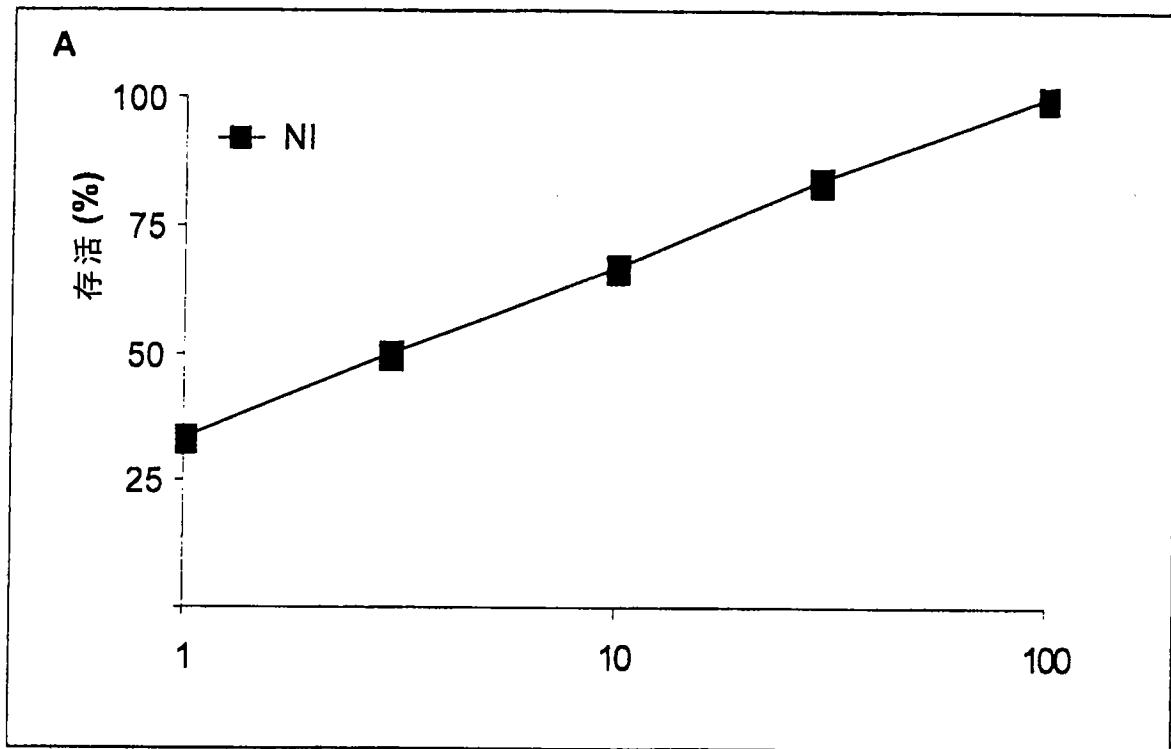


图 47

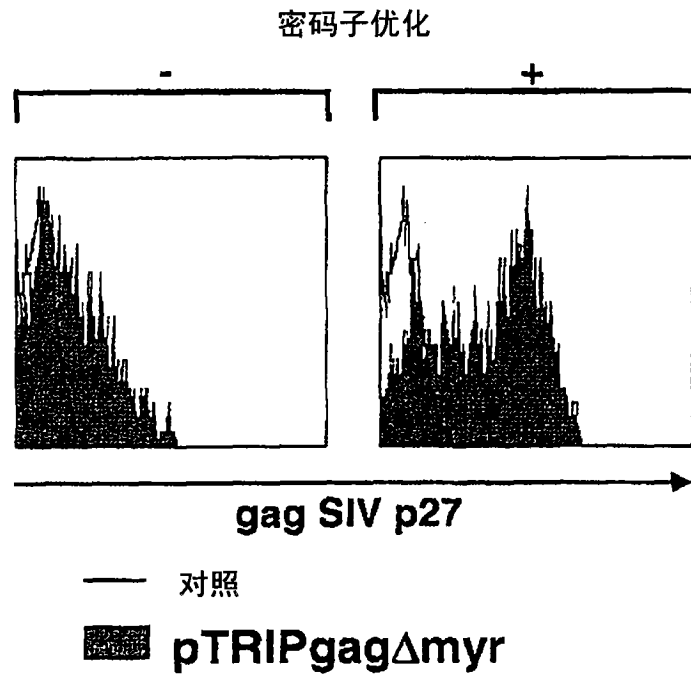


图 48

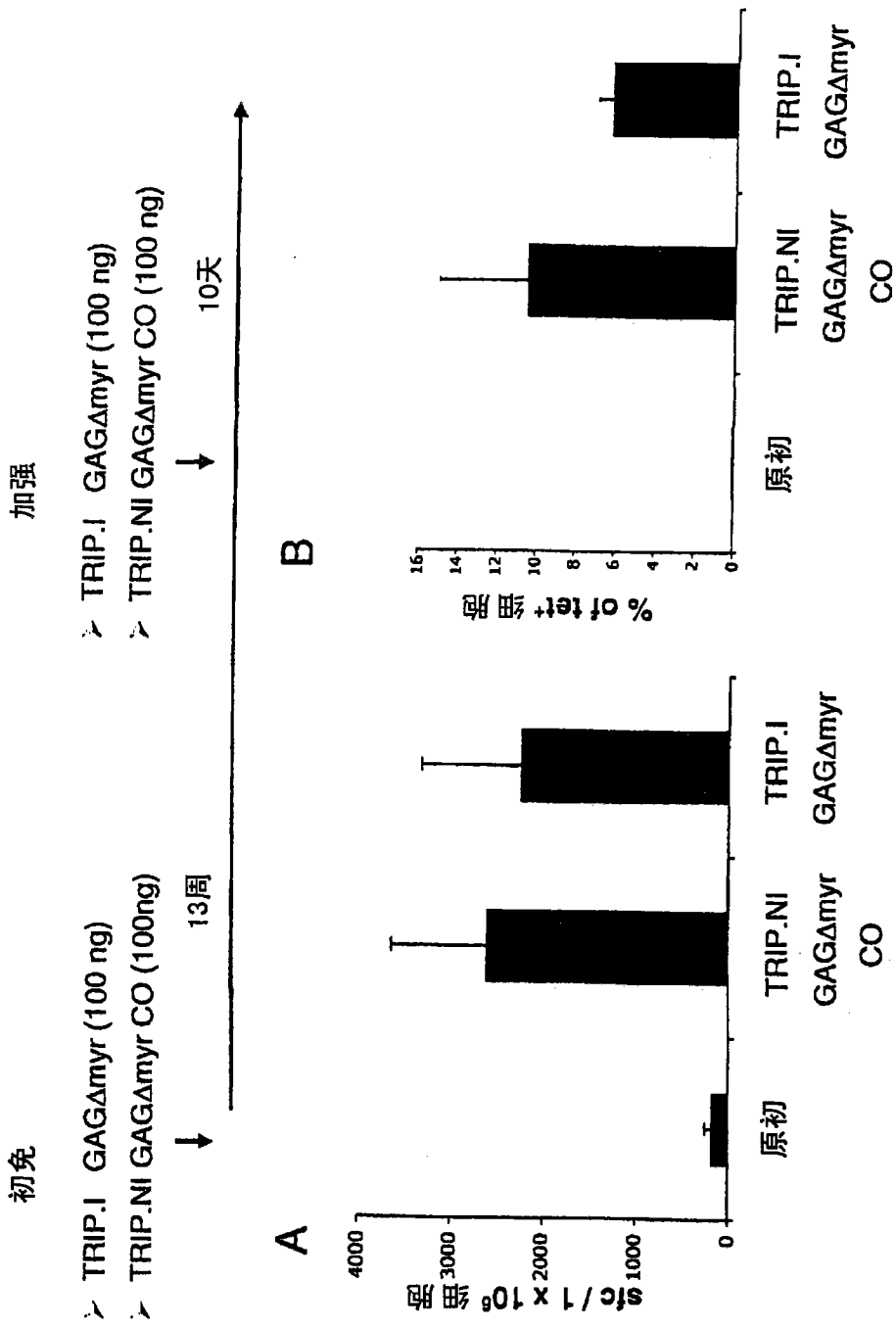


图 49

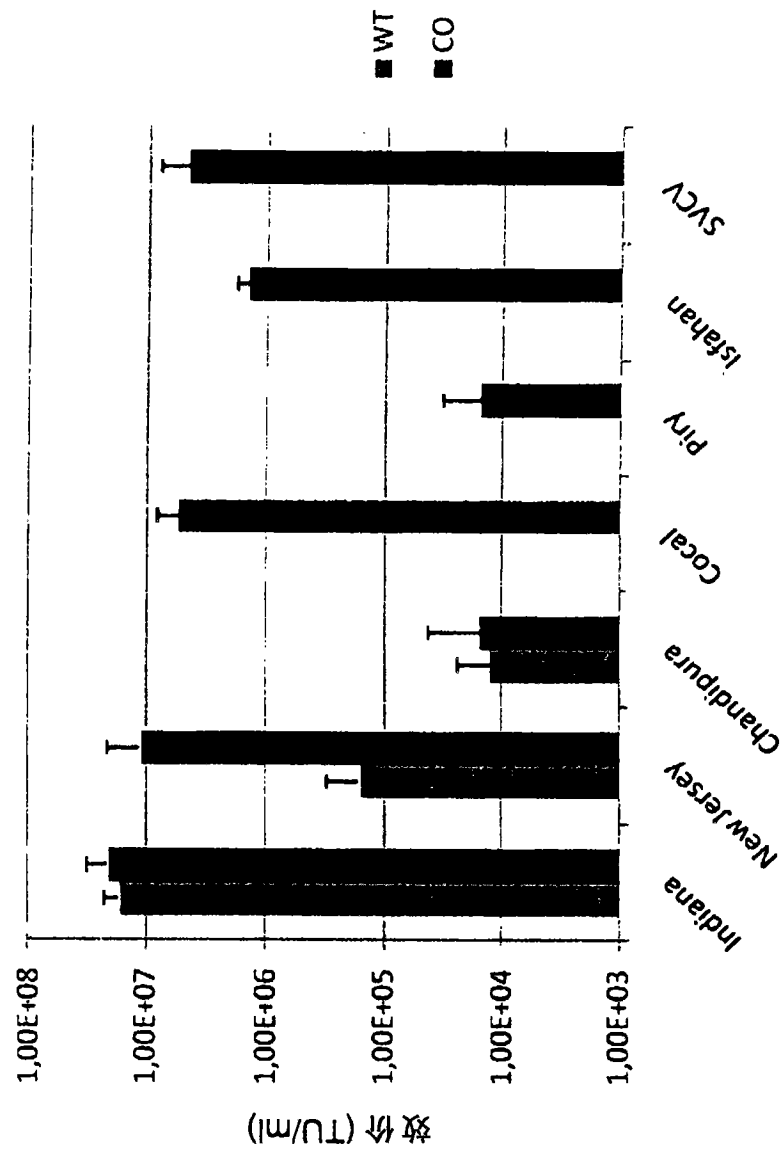


图 50

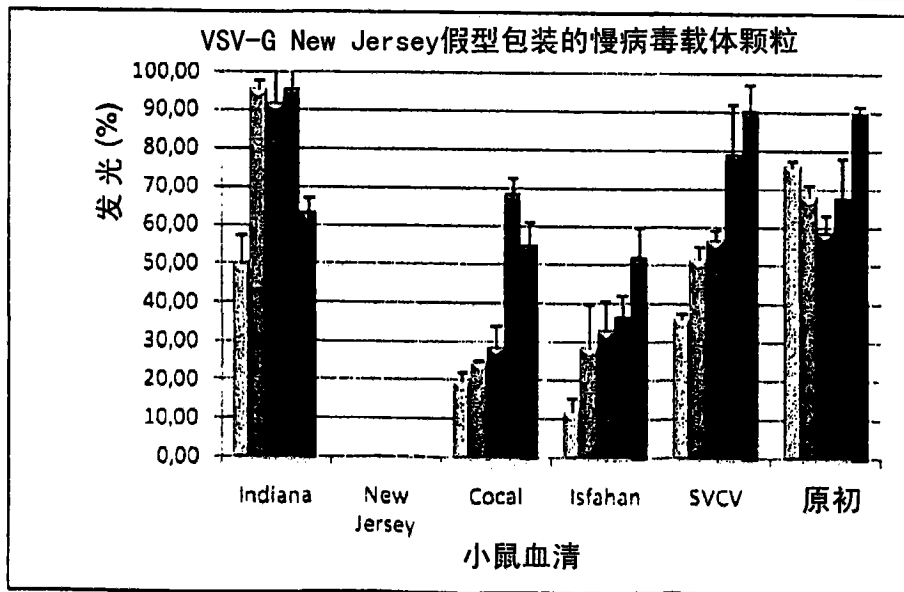
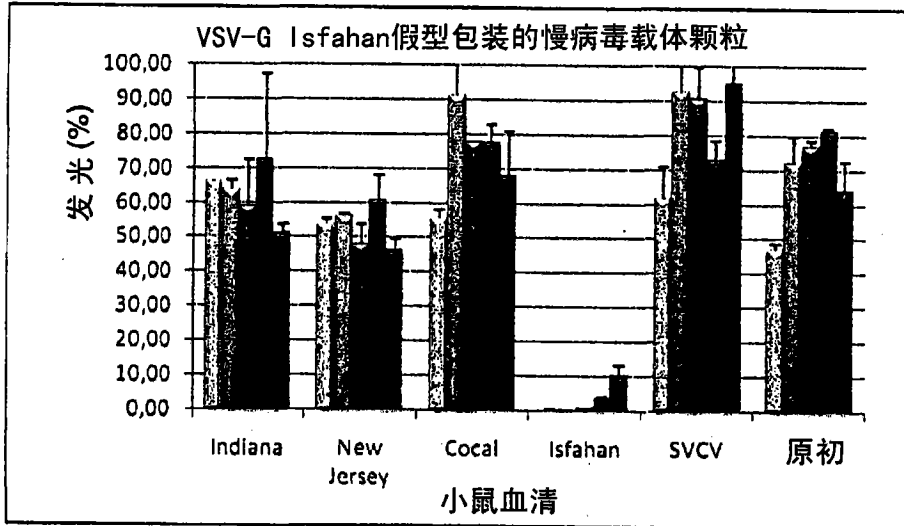
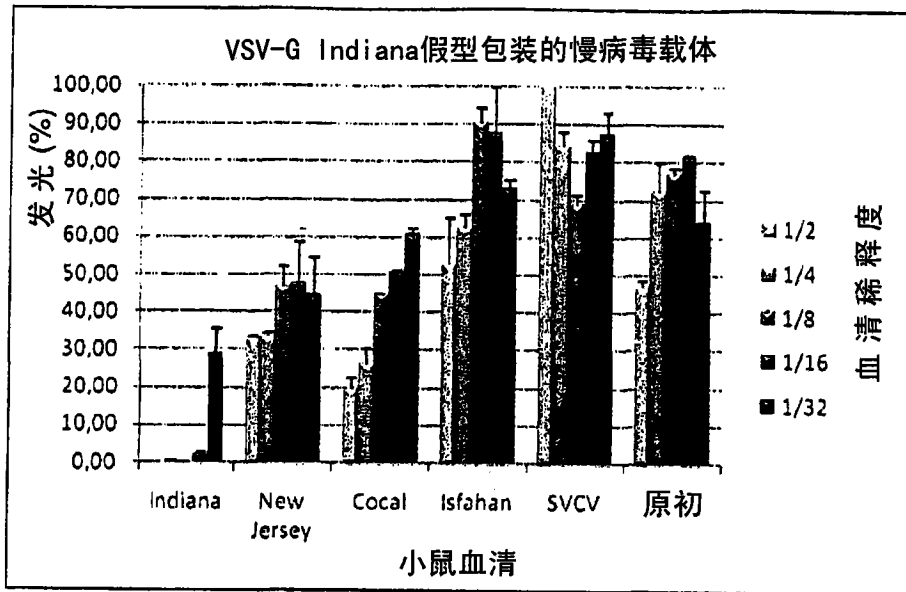


图 51A

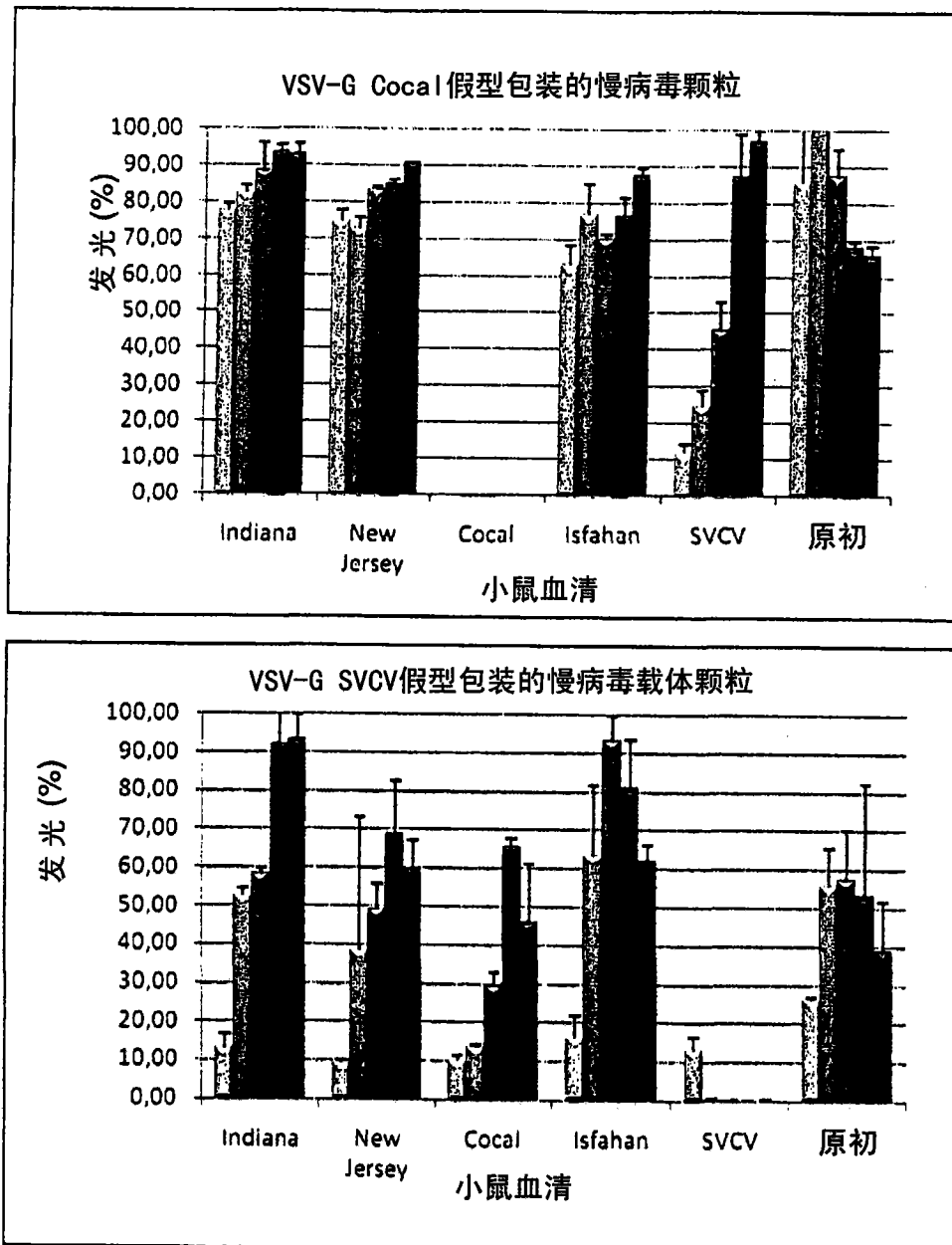


图 51B

		载体颗粒				
		Indiana	New Jersey	Isfahan	SVCV	Cocal
小鼠血清	Indiana	++	-	-	-	-
	New jersey	-	++	-	-	-
	Isfahan	-	-	++	-	-
	SVCV	-	-	-	++	+/-
	Cocal	+	-	-	-	++

++: 中和超过90%
 +: 中和超过70%-90%
 +/-: 中和超过50%-70%

图 52

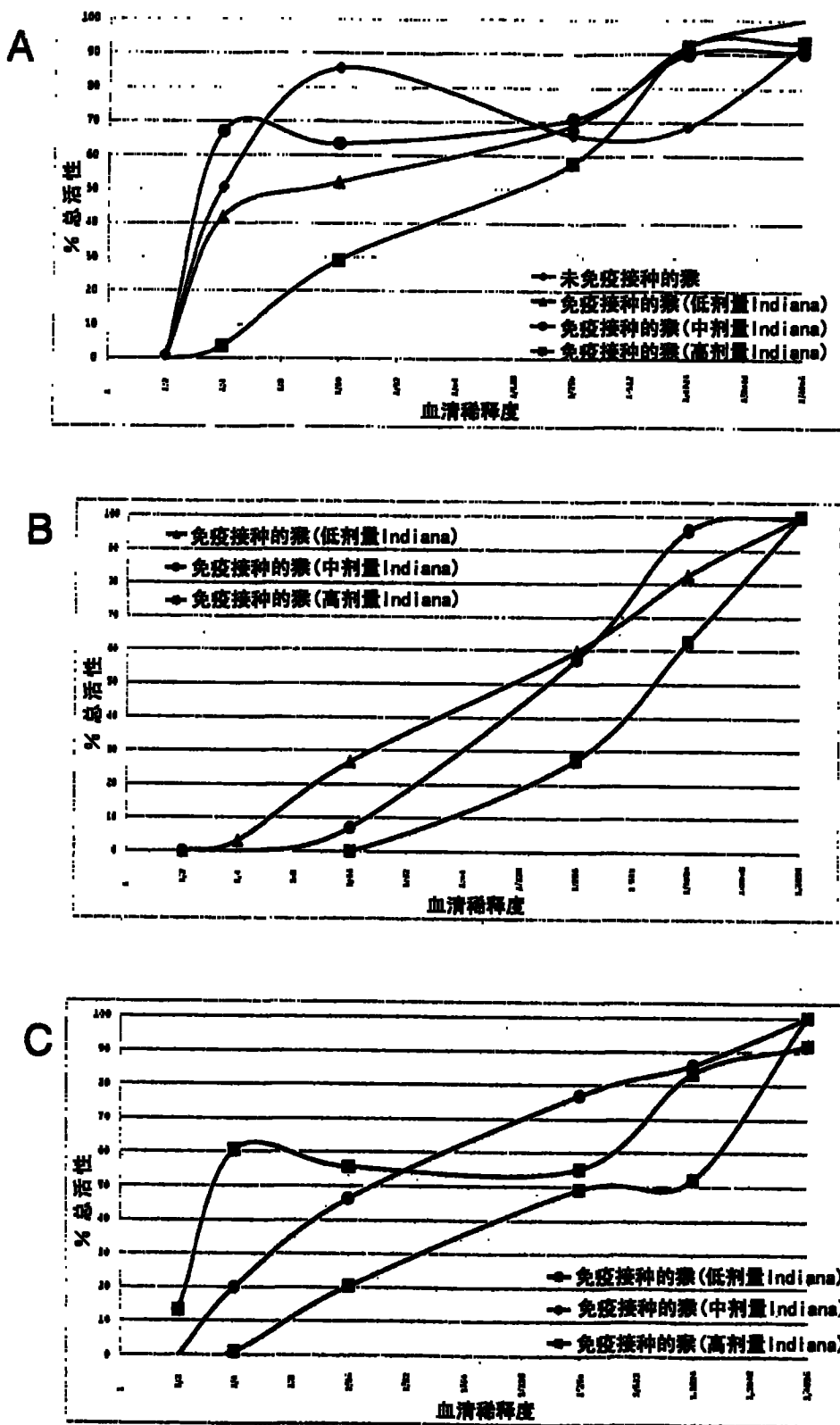


图 53

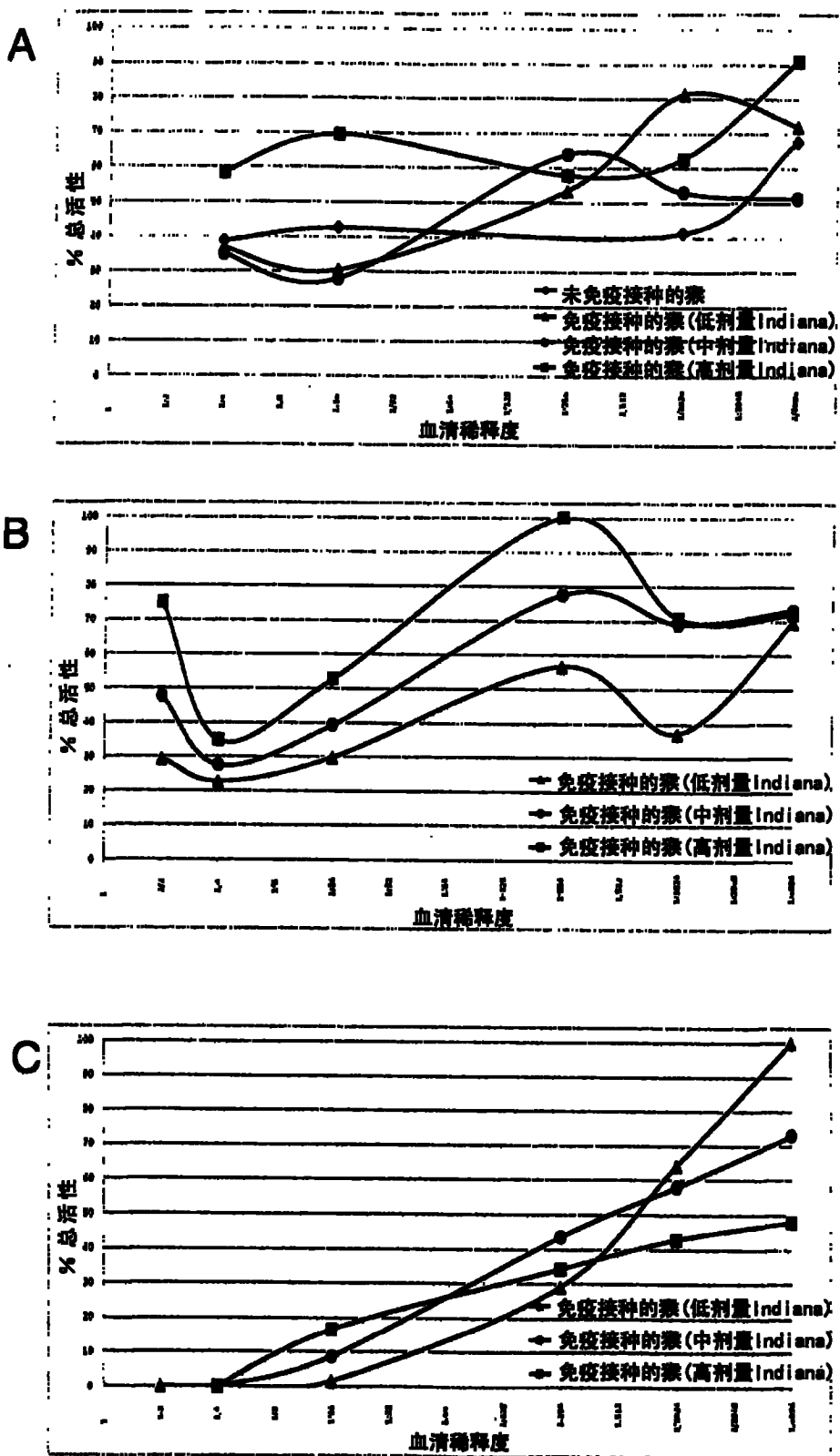


图 54

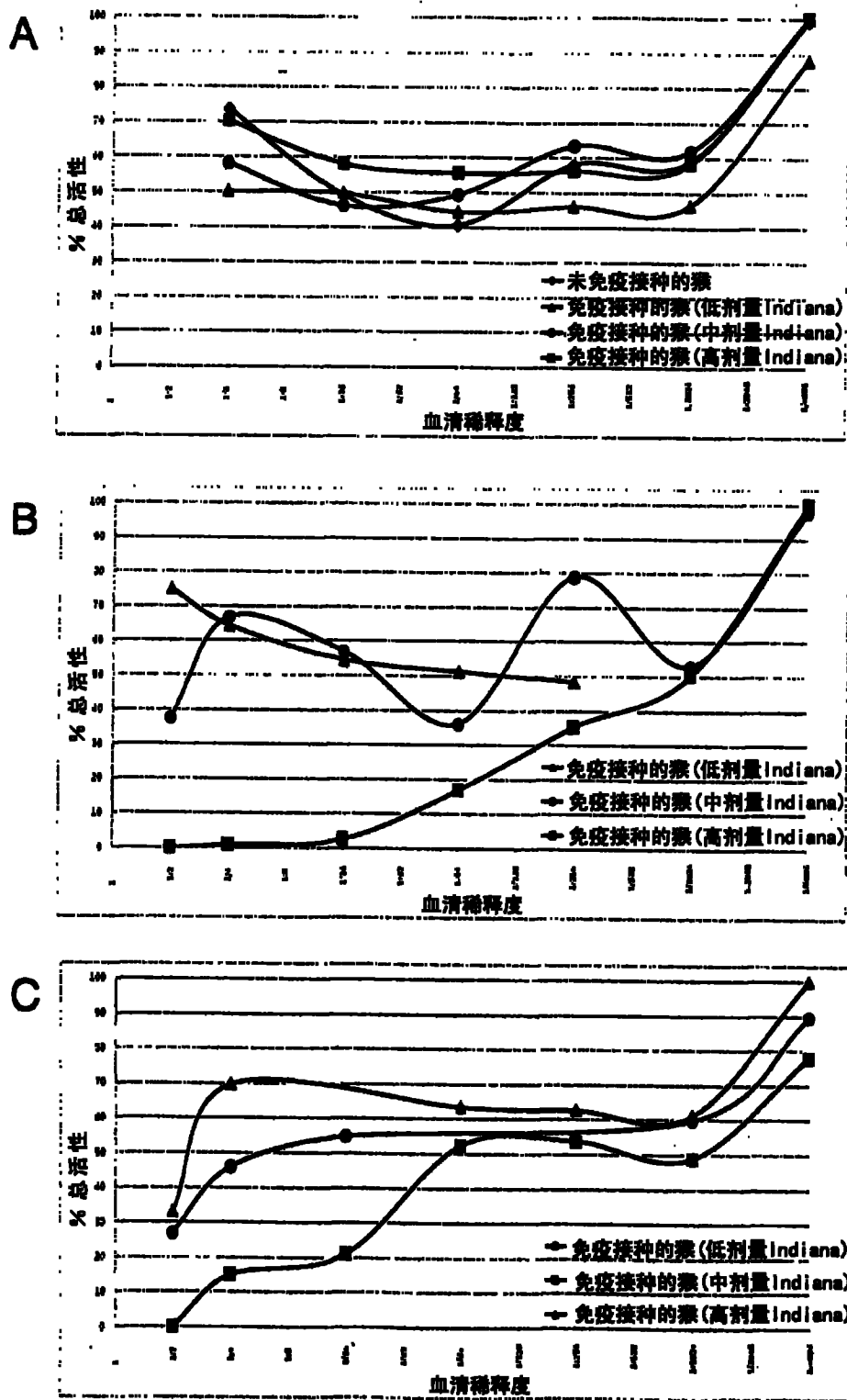


图 55

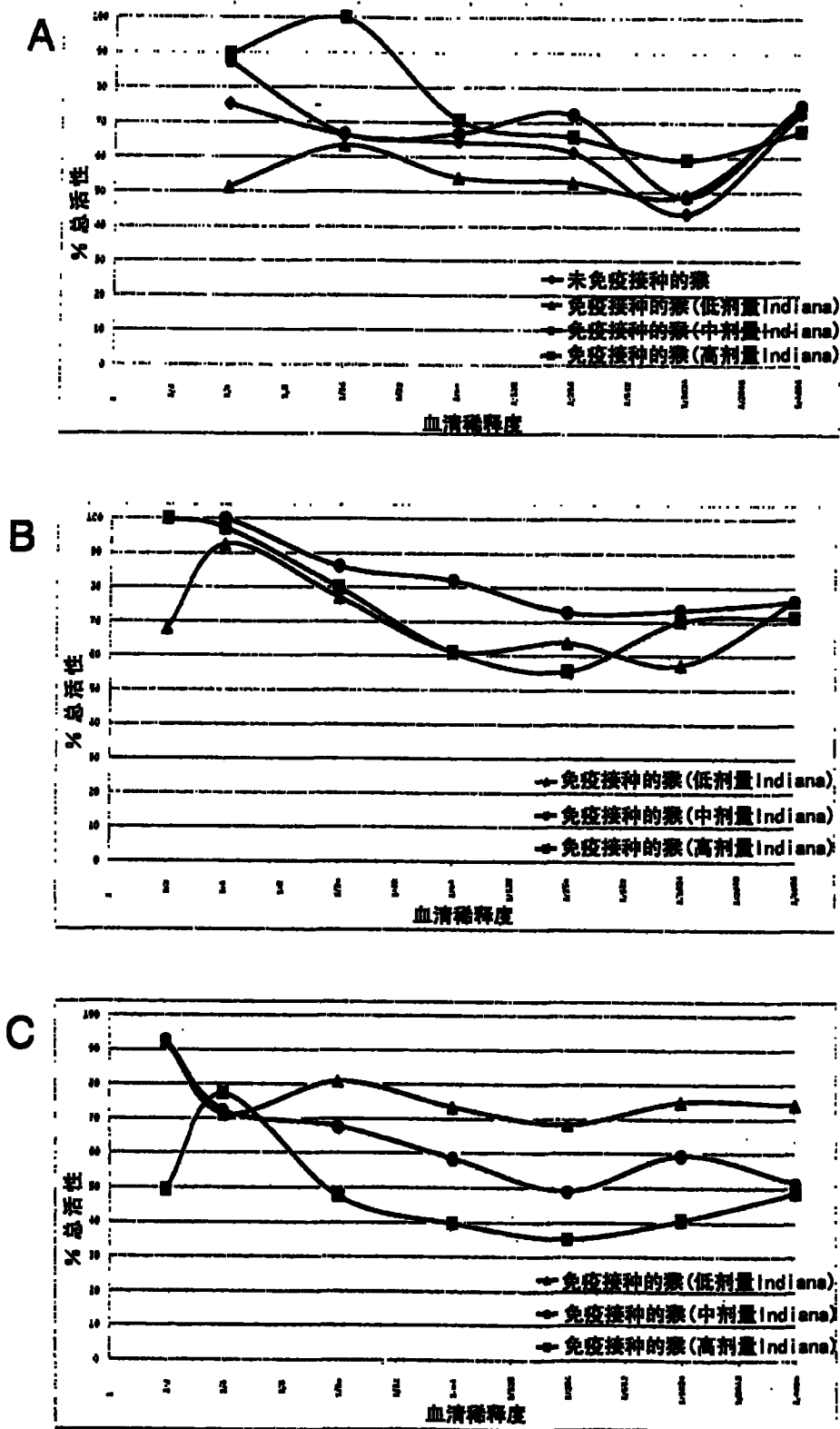


图 56

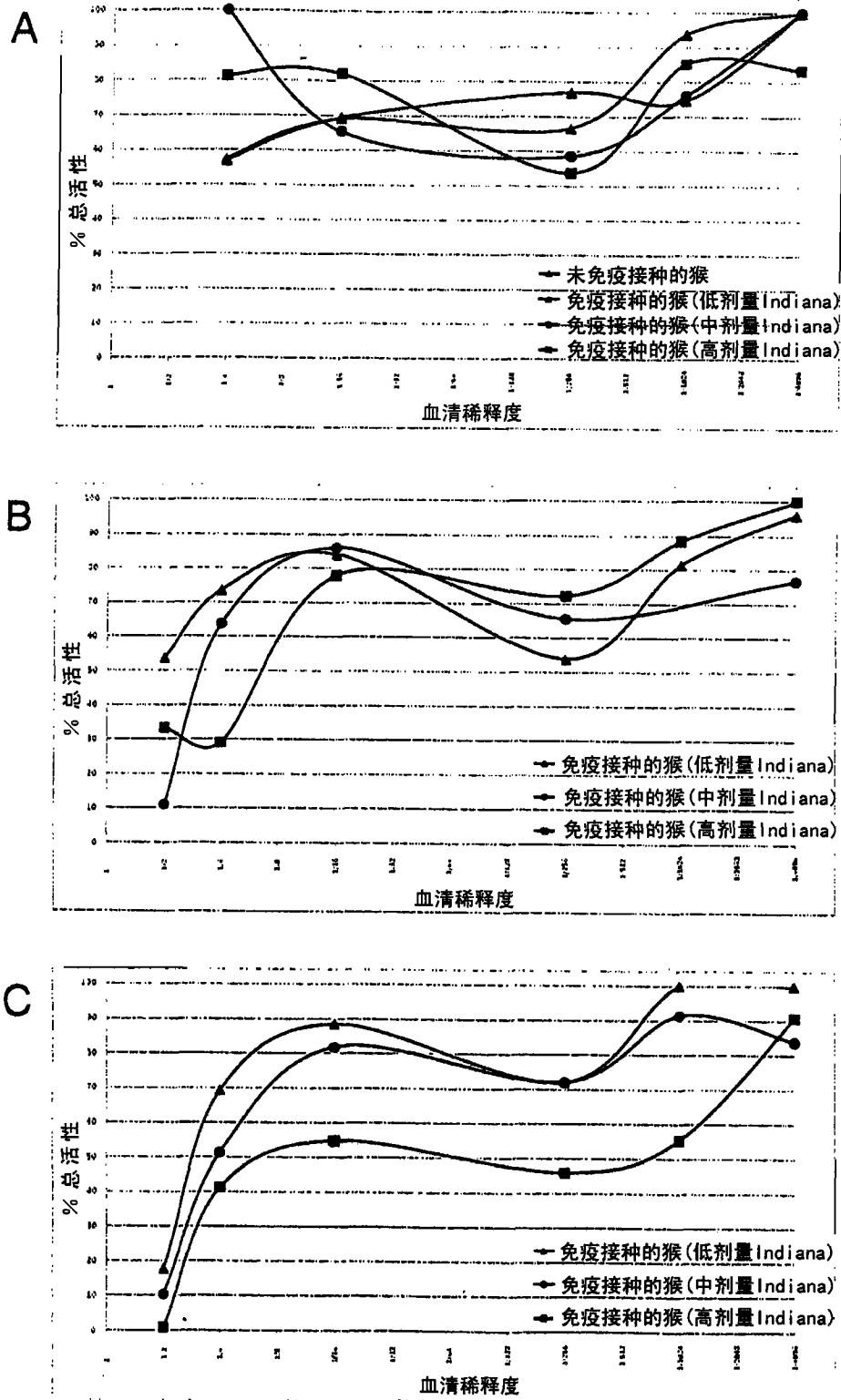


图 57

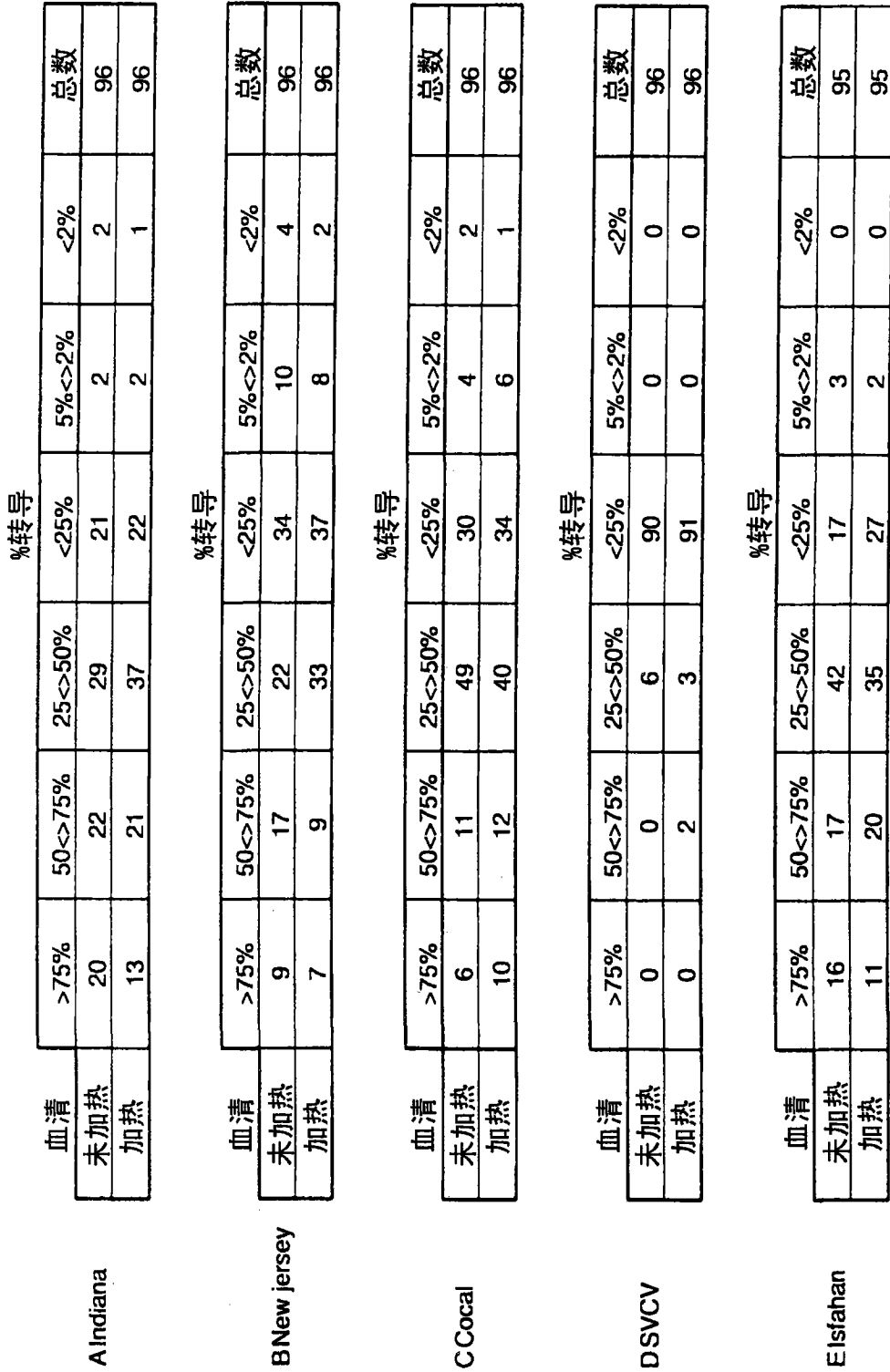
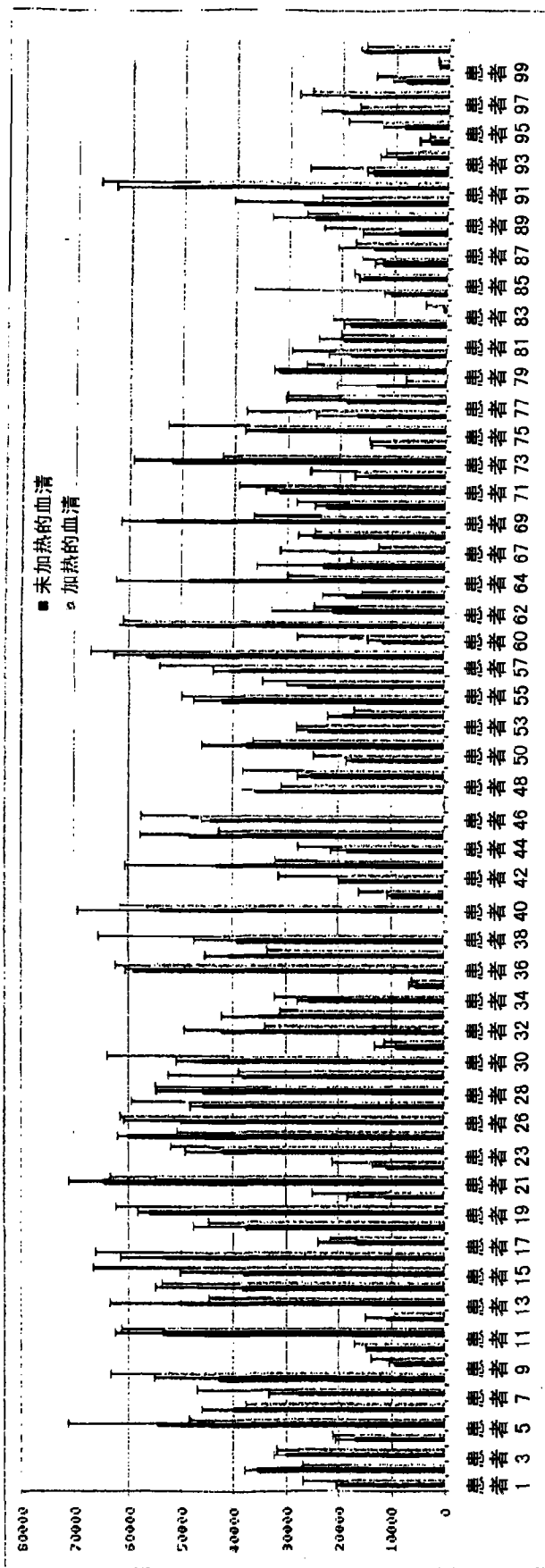
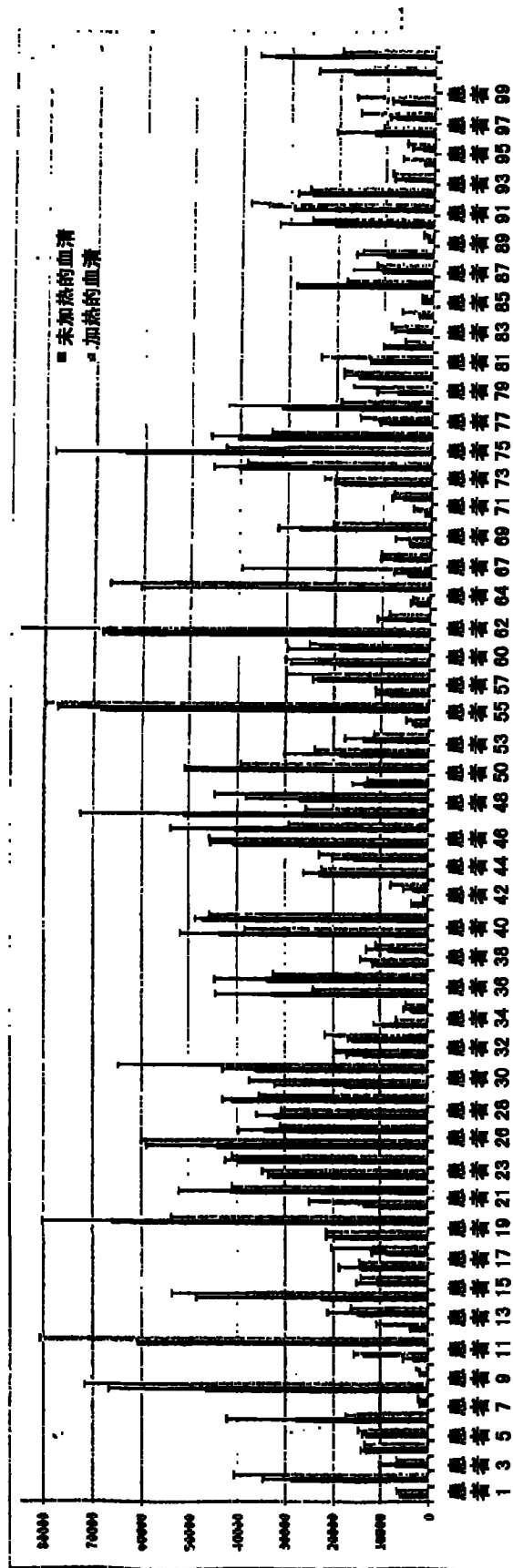


图 58



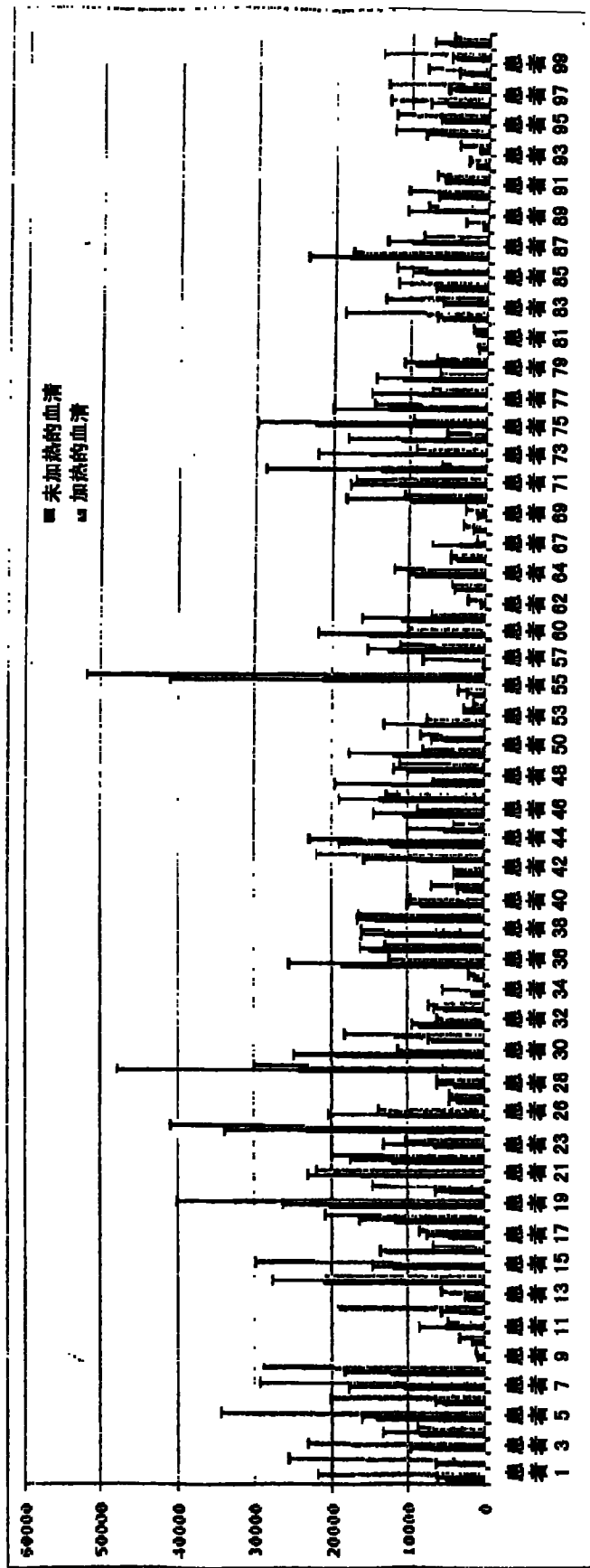
A

图 59A



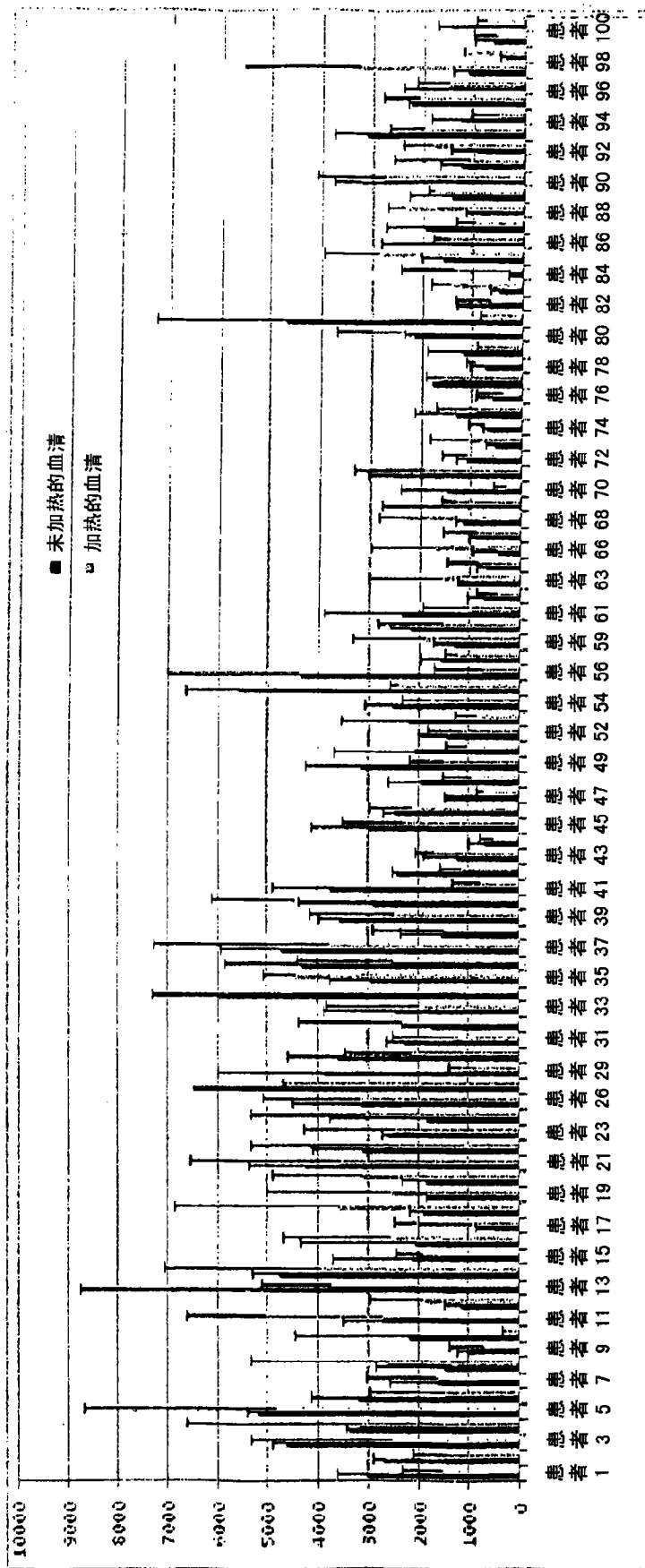
B

图 59B



C

图 59C



D

图 59D

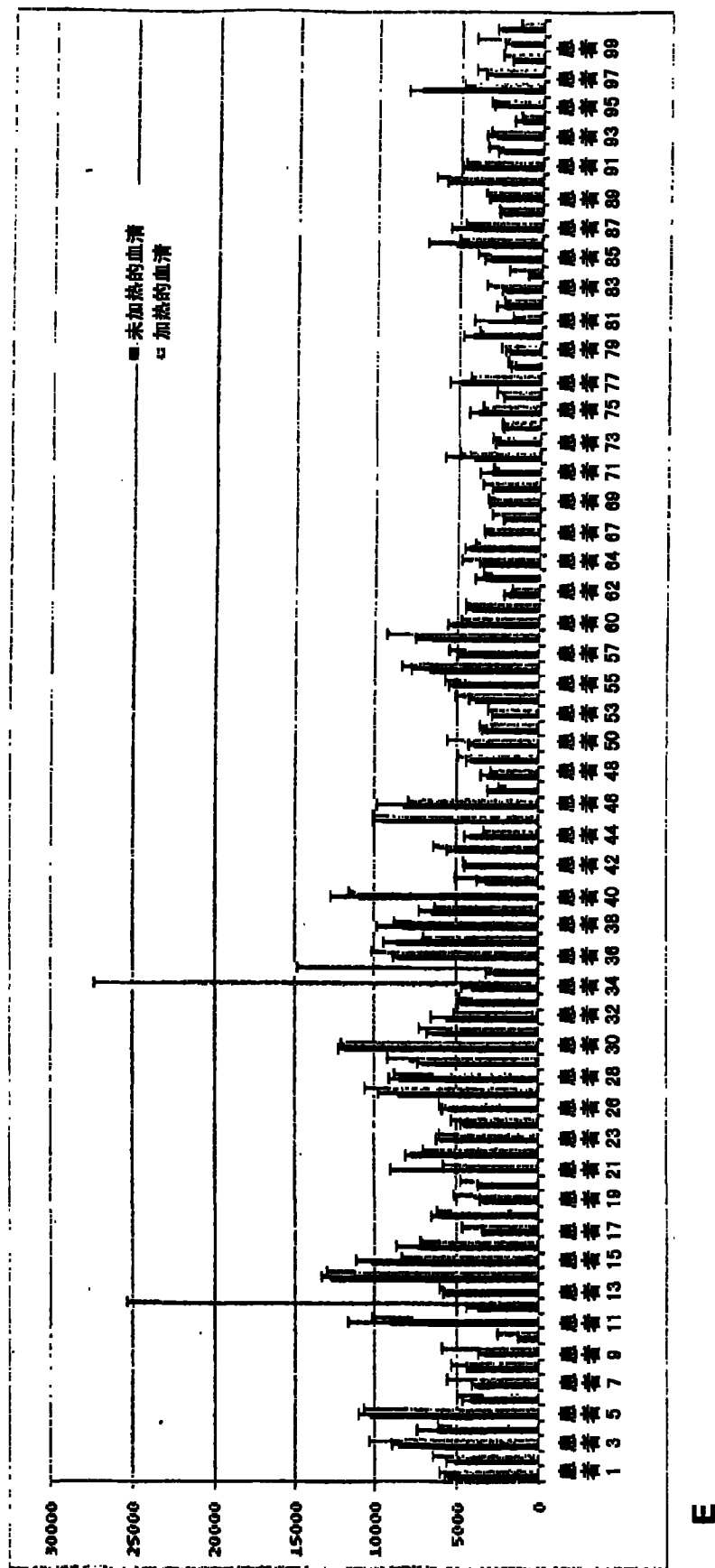
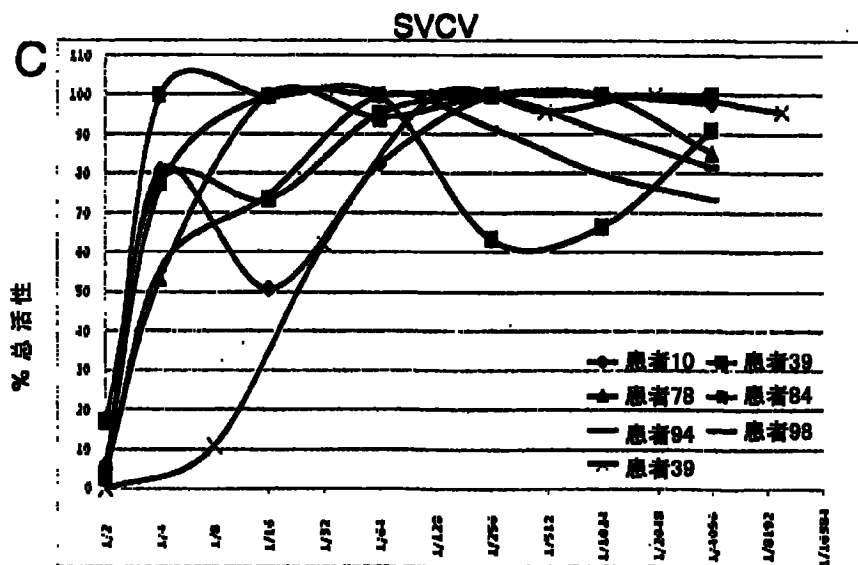
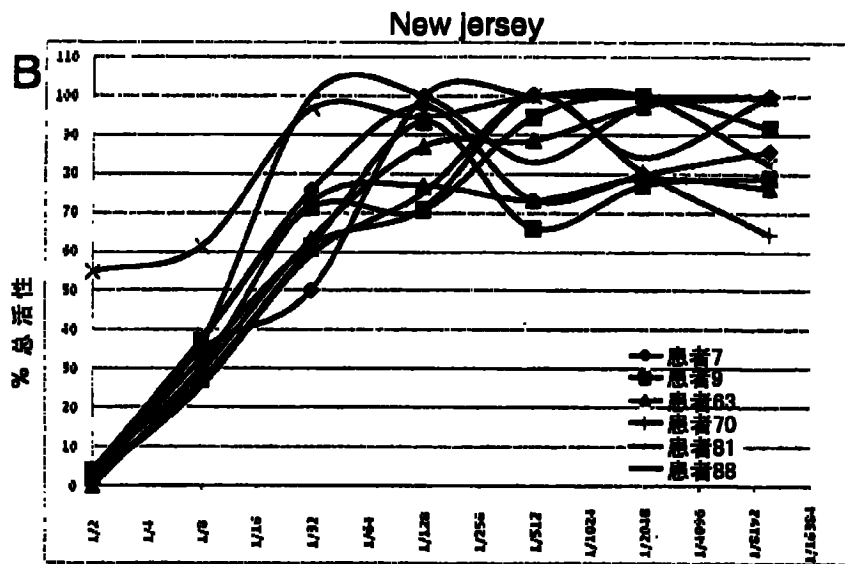
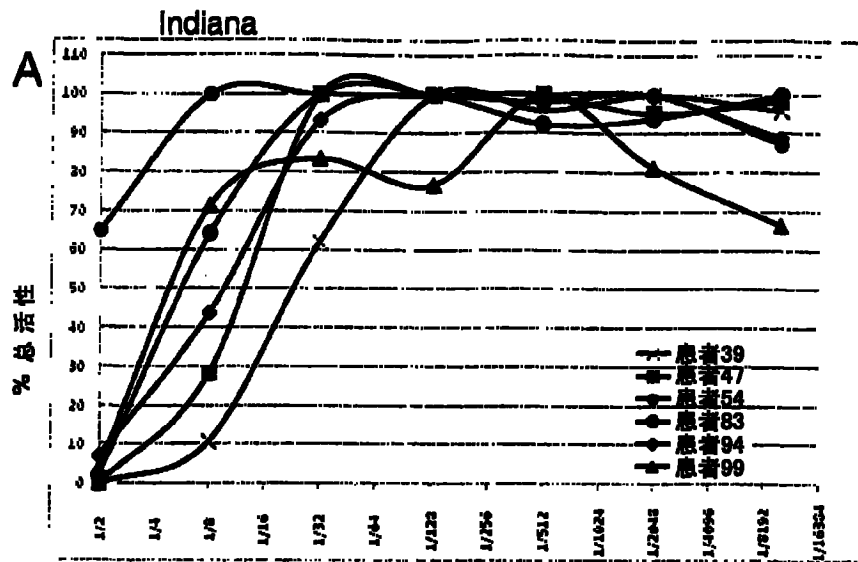


图 59E



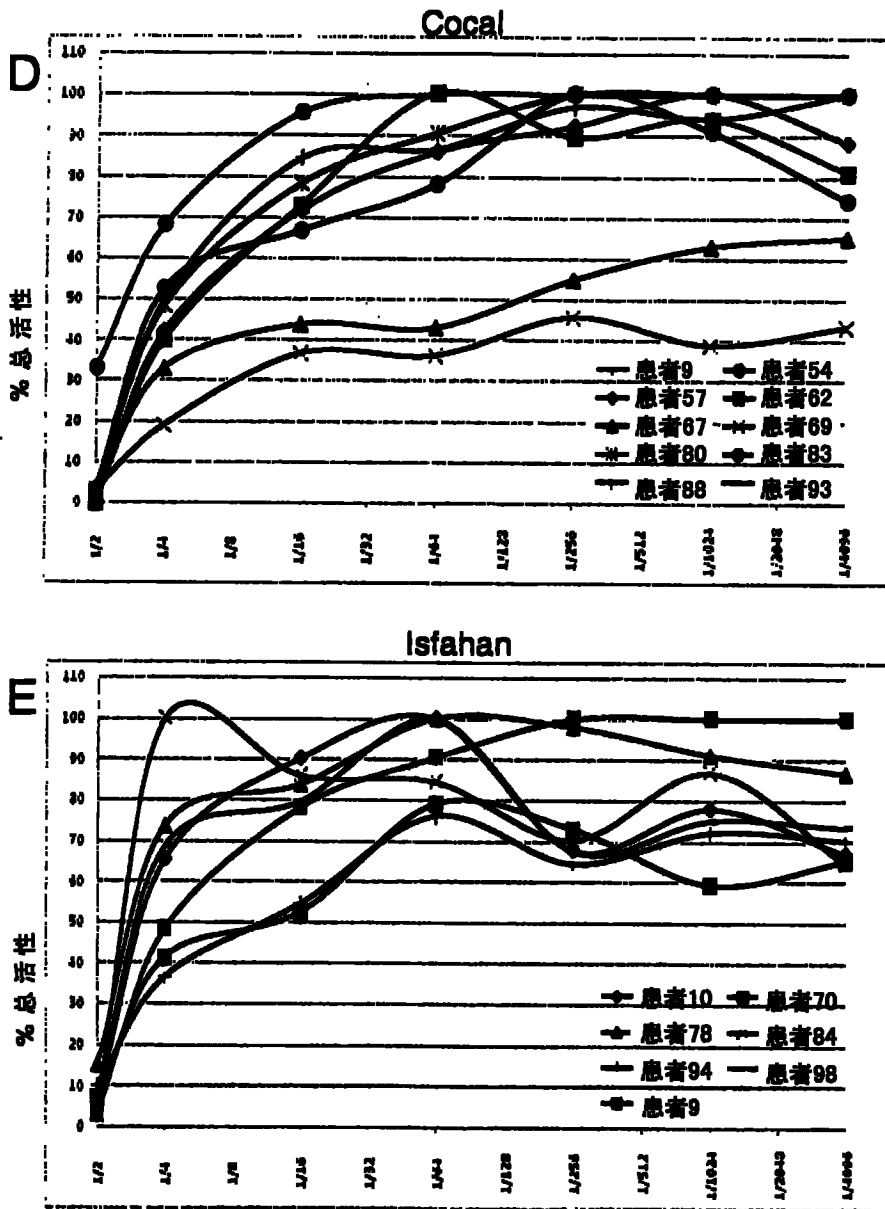


图 60

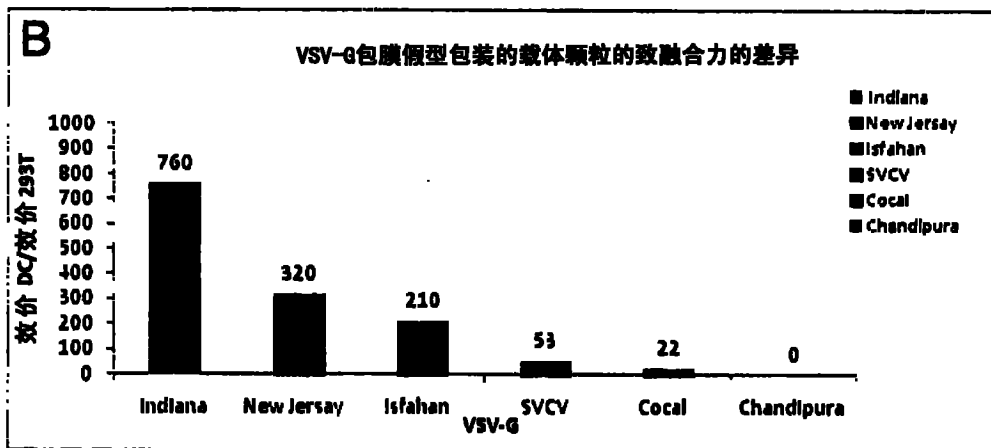
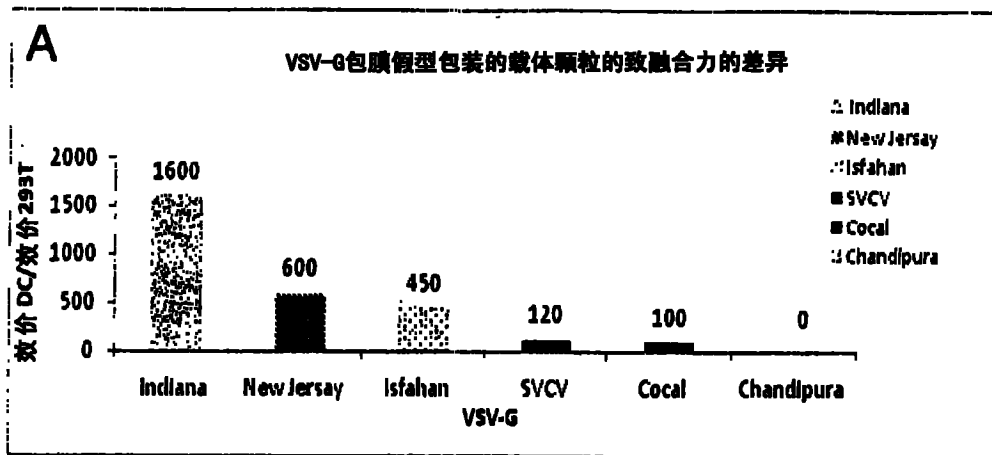


图 61