



(10) 授权公告号 CN 105063064 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 24

(21) 申请号 201510501034.3

(22) 申请日 2007.07.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105063064 A

(43) 申请公布日 2015.11.18

(30) 优先权数据
60/833,861 2006.07.28 US
60/833,856 2006.07.28 US
60/890,352 2007.02.16 US

(62) 分案原申请数据
200780036389.3 2007.07.30

(73) 专利权人 宾夕法尼亚大学托管会
地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 D·韦纳 严健 D·雷蒂

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240
专利代理师 余刚 陈鹏

(51) Int.Cl.
C12N 15/37 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 98/36772 A1, 1998.08.27
US 2004,0005711 A1, 2004.01.08
审查员 赵鹏

权利要求书1页 说明书51页
序列表46页 附图48页

(54) 发明名称
改进的疫苗及其使用方法

(57) 摘要
公开了改进的抗-HIV免疫原以及编码它们的核酸分子。公开的免疫原包括：具有HIV亚型A包膜蛋白共有序列的免疫原，具有HIV亚型B包膜蛋白共有序列的免疫原，具有HIV亚型C包膜蛋白共有序列的免疫原，具有HIV亚型D包膜蛋白共有序列的免疫原，具有HIV亚型B共有Nef-Rev蛋白共有序列的免疫原，以及具有HIV Gap蛋白亚型A、B、C和D共有序列的免疫原。公开了改进的抗-HPV免疫原以及编码它们的核酸分子；改进的抗-HCV免疫原以及编码它们的核酸分子；改进的hTERT免疫原以及编码它们的核酸分子；以及改进的抗-流感免疫原以及编码它们的核酸分子。还公开了包含活的减毒病原体的药物组合物、重组疫苗以及诱导个体产生抗HIV、HPV、HCV、hTERT和流感的免疫应答的方法。

1. 一种编码至少一种HPV抗原的核苷酸序列,其中编码至少一种HPV抗原的所述核苷酸序列由SEQ ID NO:22所示的序列组成,其中所述核苷酸序列编码含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的氨基酸序列。

2. 一种编码至少一种HPV抗原的核苷酸序列,其中编码至少一种HPV抗原的所述核苷酸序列由编码SEQ ID NO:23的序列组成,其中所述核苷酸序列编码含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的氨基酸序列。

3. 包含权利要求1或2所述的核苷酸序列的质粒。

4. 包含权利要求1或2所述的核苷酸序列的药物组合物。

5. 包含权利要求1或2所述的核苷酸序列的可注射药物组合物。

6. 包含权利要求1或2所述的核苷酸序列的重组疫苗。

7. 如权利要求6所述的重组疫苗,其特征在于,所述重组疫苗是重组牛痘疫苗。

8. 包含权利要求1或2所述的核苷酸序列的活的减毒病原体。

9. 至少一种HPV抗原的氨基酸序列,其中至少一种抗原的所述氨基酸序列由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列或SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

10. 包含权利要求9所述的氨基酸序列的药物组合物。

11. 包含权利要求9所述的氨基酸序列的可注射药物组合物。

12. 包含权利要求9所述的氨基酸序列的重组疫苗。

13. 如权利要求12所述的重组疫苗,其特征在于,所述重组疫苗是重组牛痘疫苗。

14. 包含权利要求9所述的氨基酸序列的活的减毒病原体。

15. 权利要求1或2所述的核苷酸序列、权利要求3所述的质粒、权利要求9所述的氨基酸序列、权利要求4或10所述的药物组合物、权利要求5或11所述的可注射药物组合物、权利要求6-7或12-13中任一项所述的重组疫苗或权利要求8或14所述的活的减毒病原体在制备在个体内诱导针对HPV的免疫应答的药物中的用途。

16. 权利要求1或2所述的核苷酸序列、权利要求3所述的质粒、权利要求9所述的氨基酸序列、权利要求4或10所述的药物组合物、权利要求5或11所述的可注射药物组合物、权利要求6-7或12-13中任一项所述的重组疫苗或权利要求8或14所述的活的减毒病原体在制备治疗或预防HPV感染的药物中的用途。

改进的疫苗及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2007年07月30日的题为“改进的疫苗及其使用方法”的中国专利申请第200780036389.3号的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及改进的HIV、HPV、HCV、流感和癌症疫苗,诱导免疫应答的改进方法,以及对个体进行预防性和/或治疗性免疫以抵抗HIV、HPV、HCV、流感和癌症的改进方法。

发明背景

[0003] HIV基因组由于高突变率和功能补偿而高度可塑。这种高突变率受至少两种机制驱动:病毒逆转录酶(RT)的低保真性导致每轮复制至少产生一个突变,以及抗-逆转录病毒细胞因子APOBEC3G基因和病毒感染性因子Vif附加基因的双重作用。每轮复制中会产生含各种可能的突变和许多双重突变的基因组,从而导致巨大的抗原多样性。因此,已经争论过衍生自单个分离物的候选疫苗可能不能引发充足的交叉反应以抵御各种循环HIV病毒。最近的研究显示,共有免疫原(Gao,F.等2005.Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein(合成的人免疫缺陷病毒1型m群共有包膜糖蛋白的抗原性和免疫原性).J Virol 79:1154-63.;Scriba,T.J.等2005.衍生自亚萨哈拉亚型C人免疫缺陷病毒1型共有序列的功能灭活和免疫原性Tat、Rev和Nef DNA疫苗(Functionally-inactive and immunogenic Tat,Rev and Nef DNA vaccines derived from sub-Saharan subtype C human immunodeficiency virus type 1 consensus sequences).Vaccine 23:1158-69)或祖先免疫原(Doria-Rose,N.A.等2005.人免疫缺陷病毒1型亚型B祖先包膜蛋白在家兔中具有功能并引发类似于循环亚型B包膜所引发抗体的中和抗体(Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtype B Ancestral Envelope Protein Is Functional and Elicits Neutralizing Antibodies in Rabbits Similar to Those Elicited by a Circulating Subtype B Envelope).J.Virol.79:11214-11224;Gao,F.等2004.集中的免疫原作为克服HIV-1多样性的疫苗策略(Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity).Expert Rev.疫苗3:S161-S168;Mullins,J.I.等2004.免疫原序列:第四代AIDS疫苗的设计(Immunogen sequence:the fourth tier of AIDS vaccine design).Expert Rev.疫苗3:S151-S159;Nickle,D.C.等2003.共有和祖先状态HIV疫苗(Consensus and ancestral state HIV vaccines).Science 299:1515-1517)能用于这一方面。然而,这些方法的初步研究显示,这些免疫原诱导的细胞免疫增强相对较低。

[0004] 最近,Derdeyn等分析了八种非洲异性传播对的HIV-1亚型C包膜糖蛋白序列,发现V1、V2和V4长度较短和聚糖较少是从早期递质获得的序列的共有特征(Derdeyn,C.A.等2004.异性传播后的包膜约束中和敏感性HIV-1(Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission).Science 303:2019-2022.)。这些数据提示,模拟这种病毒的抗原可能与早期传播病毒有关。然而未在所有亚型中观察到这

种早期递质结构(Chohan,B.等2005.选择某些遗传亚型传播期间出现的并和影响病毒RNA水平的具有较短V1-V2环序列的1型人免疫缺陷病毒包膜糖基化变体(Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels)J.Virol.79:6528-6531)。然而,在包膜免疫原中掺入较短V环可能有其他益处,如增强可溶性CD4的敏感性(Pickora,C.等2005.鉴定在除去之后能增强可溶性CD4敏感性的猿免疫缺陷病毒糖蛋白核心内的两个N-连接糖基化位点(Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4).J.Virol.79:12575-12583),是应该考虑的。

[0005] 研究显示,HIV-1特异性CTL应答对于控制急性 and 无症状感染期间的病毒载量以及AIDS发生是重要的。然而,还不清楚目前基于包膜的DNA疫苗是否如所需那么有效。已采用一些方法来提高HIV-1免疫原的表达水平,所述方法如密码子优化(Andre,S.等1998.采用优化密码子的合成gp120序列增强接种DNA疫苗引发的免疫应答(Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage).J Virol 72:1497-503;Deml,L.等A.2001.密码子优化对于编码人免疫缺陷病毒1型gag蛋白的DNA候选疫苗的表达和免疫原性的多重功效(Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein).J.Virol.75:10991-11001),RNA优化(Muthumani,K.等2003.新的基因工程HIV-1东非进化支-A gp160质粒构建物在体内诱导强体液免疫应答和细胞介导的免疫应答(Novel engineered HIV-1 East African Clade-A gp160 plasmid construct induces strong humoral and cell-mediated immune responses in vivo).Virology 314:134-46;Schneider,R.,M.等1997.灭活人免疫缺陷病毒1型抑制元件造成Gag和Gag/蛋白酶不依赖于Rev表达和颗粒形成(Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation)J.Virol.71:4892-4903)以及能削弱RNA二级结构的免疫球蛋白前导序列的加入(Yang,J.S.等.2001.诱导新型DNA疫苗对西尼罗病毒纽约分离株(WNV-NY1999)的有效Th1-型免疫应答(Induction of potent Th1-Type immune responses from a novel DNA vaccine for West Nile Virus New York Isolate(WNV-NY1999)).J.Infect Diseases 184:809-816)。

[0006] 人乳头瘤病毒(HPV)具有循环dsDNA基因组(7,000-8,000碱基对)。最多有200种不同基因型。在系统发生上HPV是高度保守的。粘膜HPV可归类为“高风险”或“低风险”。低风险群包括6、11、42型和其他类型。相关疾病包括:生殖器疣;低级宫颈、直肠、外阴、阴道发育异常;和复发性呼吸道乳头状瘤病。高风险群包括16、18、31、33、45、52、58型和其他类型。相关疾病包括:宫颈癌、癌前发育异常的实质病因;直肠、外阴、阴道、扁桃体癌的主要病因;以及其他呼吸消化道癌症的辅因素。每天有800名妇女死于宫颈癌。

[0007] HPV E6和E7蛋白是肿瘤-特异性抗原,是肿瘤发生和维持肿瘤状态所必需的。宫颈癌患者没有E7-特异性免疫应答。E6和E7蛋白与人肿瘤细胞抑制基因产物特异性相互作用,

E6与p53,E7与Rb(视网膜母细胞瘤肿瘤抑制基因)。E6和E7是理想的免疫疗法靶点。

[0008] hTERT是人端粒酶逆转录酶,它在端粒的末端合成TTAGGG标签从而防止因染色体缩短造成的细胞死亡。胚胎细胞和一些生殖谱系细胞通常表达hTERT来调节细胞群的内稳态。然而,癌细胞利用这一调节机制来破坏细胞群的内稳态。例如,超过85%的人类癌细胞过表达hTERT。因此,hTERT是理想的免疫治疗靶点。

[0009] hTERT还能增强免疫治疗以抵抗因HCV或HPV感染而表达hTERT的超增生性细胞。来自高风险HPV类型的E6癌蛋白在人角质形成细胞内激活人端粒酶逆转录酶(hTERT)的转录。肝脏内的发育异常区域和早期肿瘤形成区域也以异常高的水平表达hTERT。因此,通过靶向以异常水平表达hTERT的细胞能增强针对HPV和HCV的免疫疗法。同时采用hTERT和HPV或HCV蛋白或者编码这种蛋白质的核酸的联合免疫疗法是有吸引力的免疫疗法。

[0010] 流感血凝素(HA)在流感病毒粒子表面表达并负责病毒与其宿主细胞的初次接触。HA是熟知的免疫原。甲型流感毒株H1N5(一种禽流感毒株)对人类的威胁尤其巨大,这是由于与病毒的其他毒株相比,它们的HA蛋白如果经天然突变而轻微遗传重配会大大增加对人类细胞的感染性。婴儿和老年人或免疫受损的成年人感染H1N5株病毒通常造成严重的临床后果。因此,HA和流感H1N5毒株的其他流感分子是理想的免疫治疗靶点。

发明内容

[0011] 本发明涉及核酸构建物以及编码的蛋白,从而提供了改进的免疫原性靶,可产生针对该靶点的抗-HIV免疫应答。

[0012] 本发明提供了HIV亚型A包膜蛋白的共有序列,HIV亚型B包膜蛋白的共有序列,HIV亚型C包膜蛋白的共有序列,HIV亚型D包膜蛋白的共有序列,HIV亚型B共有Nef-Rev蛋白的共有序列,以及HIV Gag蛋白亚型A、B、C和D的共有序列。

[0013] 本发明提供了编码这种蛋白质序列的构建物,包含这种蛋白质的疫苗和/或编码这种蛋白质的核酸分子,以及诱导抗-HIV免疫应答的方法。

[0014] 本发明涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:1的片段;与SEQ ID NO:1具有至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:1具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:3的片段;与SEQ ID NO:3具有至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:3具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:5的片段;与SEQ ID NO:5具有至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:5具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:7的片段;与SEQ ID NO:7具有至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:7具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:9的片段;与SEQ ID NO:9具有至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:9具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:11的片段;与SEQ ID NO:11具有至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:11具有至少90%同源性的序列的片段。

[0015] 本发明涉及编码选自下组的蛋白质的核酸分子:SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0016] 本发明涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:编码SEQ ID NO:2的核苷酸序列;编码与SEQ ID NO:2具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:2的核苷酸序列的片段;编码与SEQ ID NO:2具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷

酸序列的片段;编码SEQ ID NO:4的核苷酸序列;编码与SEQ ID NO:4具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:4的核苷酸序列的片段;编码与SEQ ID NO:4具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:6的核苷酸序列;编码与SEQ ID NO:6具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:6的核苷酸序列的片段;编码与SEQ ID NO:6具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列的片段;编码SEQ ID NO:8的核苷酸序列;编码与SEQ ID NO:8具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:8的核苷酸序列的片段;编码与SEQ ID NO:8具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:10的核苷酸序列;编码与SEQ ID NO:10具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:10的核苷酸序列的片段;编码与SEQ ID NO:10具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列的片段;编码SEQ ID NO:12的核苷酸序列;编码与SEQ ID NO:12具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列;编码SEQ ID NO:12的核苷酸序列的片段;编码与SEQ ID NO:12具有至少90%同源性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0017] 本发明还提供了包含这种核酸分子的药物组合物以及它们在诱导个体产生针对HIV的免疫应答的方法中的应用,该方法包括给予个体包含这种核酸分子的组合物。

[0018] 本发明还提供了包含这种核酸分子的重组疫苗以及它们在诱导个体产生针对HIV的免疫应答的方法中的应用,该方法包括给予个体这种重组疫苗。

[0019] 本发明还提供了包含这种核酸分子的活的减毒病原体以及它们在诱导个体产生针对HIV的免疫应答的方法中的应用,该方法包括给予个体这种活的减毒病原体。

[0020] 活的减毒病原体

[0021] 本发明还提供了包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质:SEQ ID NO:2;与SEQ ID NO:2具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:2的片段;与SEQ ID NO:2具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:4;与SEQ ID NO:4具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:4的片段;与SEQ ID NO:4具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:6;与SEQ ID NO:6具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:6的片段;与SEQ ID NO:6具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:8;与SEQ ID NO:8具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:8的片段;与SEQ ID NO:8具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:10;与SEQ ID NO:10具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:10的片段;与SEQ ID NO:10具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:12;与SEQ ID NO:12具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:12的片段;以及与SEQ ID NO:12具有至少90%同源性的序列的片段。

[0022] 本发明还提供了包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质:SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0023] 本发明还提供了包含这种蛋白质的药物组合物以及它们在诱导个体产生针对HIV的免疫应答的方法中的应用,该方法包括给予个体包含这种蛋白质的组合物。

[0024] 本发明还提供了包含这种蛋白质的重组疫苗以及它们在诱导个体产生针对HIV的免疫应答的方法中的应用,该方法包括给予个体这种重组疫苗。

[0025] 本发明还提供了包含这种蛋白质的活的减毒病原体以及它们在诱导个体产生针对HIV的免疫应答的方法中的应用,该方法包括给予个体这种活的减毒病原体。

[0026] 提供了包含HPV基因型16E6-E7共有氨基酸序列的蛋白质以及包含编码这种蛋白

质的核苷酸序列的核酸分子。

[0027] 本发明涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:22;其片段;与SEQ ID NO:22具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0028] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:编码SEQ ID NO:23的核酸序列;编码SEQ ID NO:24的核酸序列;编码SEQ ID NO:25的核酸序列;编码SEQ ID NO:26的核酸序列;和编码SEQ ID NO:27的核酸序列。

[0029] 本发明还涉及包含这种核酸分子的药物组合物以及诱导个体产生针对HPV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种核酸分子的组合物。

[0030] 本发明还涉及包含这种核酸分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对HPV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0031] 本发明还涉及包含这种核酸分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对HPV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0032] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质:SEQ ID NO:23;其片段;与SEQ ID NO:23具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0033] 本发明还涉及包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质:SEQ ID NO:23;SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25;SEQ ID NO:26;和SEQ ID NO:27。

[0034] 本发明还涉及包含这种蛋白质的药物组合物以及诱导个体产生针对HPV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种蛋白质的组合物。

[0035] 本发明还涉及包含这种蛋白质的重组疫苗以及诱导个体产生针对HPV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0036] 本发明还涉及包含这种蛋白质的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对HPV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0037] 提供了包含HPV基因型1a和1b E1-E2共有氨基酸序列的蛋白质以及包含编码这种蛋白质的核苷酸序列的核酸分子。

[0038] 本发明涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:30;其片段;与SEQ ID NO:30具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0039] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:编码SEQ ID NO:31的核酸序列。

[0040] 本发明还涉及包含这种核酸分子的药物组合物以及诱导个体产生针对HCV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种核酸分子的组合物。

[0041] 本发明还涉及包含这种核酸分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对HCV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0042] 本发明还涉及包含这种核酸分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对HCV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0043] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质:SEQ ID NO:31;其片段;与SEQ ID NO:31具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0044] 本发明还涉及包含这种蛋白质的药物组合物以及诱导个体产生针对HCV的免疫应

答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种蛋白质的组合物。

[0045] 本发明还涉及包含这种蛋白质的重组疫苗以及诱导个体产生针对HCV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0046] 本发明还涉及包含这种蛋白质的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对HCV的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0047] 提供了包含hTERT共有氨基酸序列的蛋白质以及包含编码这种蛋白质的核苷酸序列的核酸分子。

[0048] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:34;其片段;与SEQ ID NO:34具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0049] 本发明还涉及包含这种核酸分子的药物组合物以及诱导个体产生针对表达hTERT的超增生性细胞的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种核酸分子的组合物。

[0050] 本发明还涉及包含这种核酸分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对表达hTERT的超增生性细胞的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0051] 本发明还涉及包含这种核酸分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对表达hTERT的超增生性细胞的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0052] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质:SEQ ID NO:35;其片段;与SEQ ID NO:35具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0053] 本发明还涉及包含这种蛋白质的药物组合物以及诱导个体产生针对表达hTERT的超增生性细胞的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种蛋白质的组合物。

[0054] 本发明还涉及包含这种蛋白质的重组疫苗以及诱导个体产生针对表达hTERT的超增生性细胞的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0055] 本发明还涉及包含这种蛋白质的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对表达hTERT的超增生性细胞的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0056] 提供了包含流感H5N1共有HA氨基酸序列、流感H1N1和H5N1共有NA氨基酸序列、流感H1N1和H5N1共有M1氨基酸序列、和流感H5N1共有M2E-NP氨基酸序列的蛋白质,以及包含编码这种蛋白质的核苷酸序列的核酸分子。

[0057] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:36;其片段;与SEQ ID NO:36具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0058] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:38;其片段;与SEQ ID NO:38具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0059] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:40;其片段;与SEQ ID NO:40具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0060] 本发明还涉及包含选自下组的核苷酸序列的核酸分子:SEQ ID NO:42;其片段;与SEQ ID NO:42具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0061] 本发明还涉及包含这种核酸分子的药物组合物以及诱导个体产生针对HPV、HCV和流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种核酸分子的组合物。

[0062] 本发明还涉及包含这种核酸分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对HPV、HCV和流

感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0063] 本发明还涉及包含这种核酸分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对HPV、HCV和流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0064] 本发明还涉及包含这种核酸分子的药物组合物以及诱导个体产生针对HPV、HCV和流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种核酸分子的组合物。

[0065] 本发明还涉及包含这种核酸分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对HPV、HCV和流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0066] 本发明还涉及包含这种核酸分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对HPV、HCV和流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0067] 本发明还涉及包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质分子:SEQ ID NO:37;其片段;与SEQ ID NO:37具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0068] 本发明还涉及包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质分子:SEQ ID NO:39;其片段;与SEQ ID NO:39具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0069] 本发明还涉及包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质分子:SEQ ID NO:41;其片段;与SEQ ID NO:41具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0070] 本发明还涉及包含选自下组的氨基酸序列的蛋白质分子:SEQ ID NO:43;其片段;与SEQ ID NO:43具有至少90%同源性的核苷酸序列;以及它们的片段。

[0071] 本发明还涉及包含这种蛋白质分子的药物组合物以及诱导个体产生针对流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种蛋白质分子的组合物。

[0072] 本发明还涉及包含这种蛋白质分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0073] 本发明还涉及包含这种蛋白质分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

[0074] 本发明还涉及包含这种蛋白质分子的药物组合物以及诱导个体产生针对流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体包含这种蛋白质分子的组合物。

[0075] 本发明还涉及包含这种蛋白质分子的重组疫苗以及诱导个体产生针对流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种重组疫苗。

[0076] 本发明还涉及包含这种蛋白质分子的活的减毒病原体以及诱导个体产生针对流感病毒的免疫应答的方法,该方法包括给予所述个体这种活的减毒病原体。

附图简述

[0077] 图1比较了EY2E1-B和EK2P-B的氨基酸序列。IgE前导序列用下划线表示。框内区域表示可变区。*表示参与CCR5应用的6个重要残基。切割位点用箭头表示。跨膜区用虚线显示。

[0078] 图2显示了两种HIV-1亚型B包膜序列的系统发生关系。系统发生分析涉及42种HIV-1亚型B包膜序列、EY2E1-B、EK2P-B、两种亚型D和两种亚型C序列(外类群)。代表宽样品多样性的亚型B包膜序列来自以下11个国家:阿根廷(1);澳大利亚(6);中国(1);法国(4);德国(1);大不列颠(2);意大利(1);日本(1);荷兰(4);西班牙(1);美国(20)。EY2E1-B和EK2P-B序列用黑框表示。

[0079] 图3显示了包膜免疫原的表达。图A显示了EY2E1-B和EK2P-B基因的Western印迹分析结果。RD细胞用不同质粒转染。48小时后收集细胞裂解液。样品通过Western印迹分析并用HIV-1 gp120单克隆抗体(2G12)探测。加样对照的印迹条带用单克隆抗-肌动蛋白抗体重新探测。图B显示了EY2E1-B和EK2P-B基因的免疫荧光测定结果。表达包膜蛋白的转染的RD细胞显示典型的红色荧光。HIV-1包膜-特异性单克隆抗体F105作为第一抗体来源。

[0080] 图4显示了免疫小鼠血清的总IgG抗体效价。图A显示了亚型B包膜-特异性抗体应答的测量结果。图B显示了亚型A/E包膜-特异性抗体应答的测量结果。图C显示了亚型C包膜-特异性抗体应答的测量结果。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测用DNA构建物pEY2E1-B和pEK2P-B免疫后的体液免疫应答。每只小鼠以两周为间隔肌肉内免疫三次,每次100 μ g DNA。第三次免疫1周后采集各组小鼠(n=3)的血样,用封闭缓冲液稀释等量混合的血清并按照“材料和方法”中的描述进行分析。用pVAX免疫小鼠的混合血清用作对照。测量450nm的吸光度(OD)。各数据点代表每组三只小鼠血清的三次平均OD值以及三次独立试验所得ELISA值的平均值。

[0081] 图5显示了pEY2E1-B在BalB/C小鼠和HLA-A2转基因小鼠中诱导细胞介导的免疫应答。通过ELISpot试验在BalB/C小鼠(图A)和转基因小鼠(图C)中测定用pEY2E1-B和pEK2P-B进行DNA免疫接种后每百万个脾细胞中亚型B共有包膜-特异性IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)的频率。还在BalB/C小鼠(图B)和转基因小鼠(图D)中测定了用pEY2E1-B和pEK2P-B进行DNA免疫接种后每百万个脾细胞中耗尽CD8的、亚型B共有包膜-特异性IFN- γ 斑点形成细胞的频率。脾细胞分离自每只接种过的小鼠(每组三只小鼠)并在体外用重叠共有亚型B包膜肽混合物刺激。基础pVAX免疫的小鼠作为阴性对照。数值为平均值+IFN- γ SFC平均值的标准差。(图E)表征亚型B共有包膜-特异性优势表位。分别从pEY2E1-B和pEK2P-B免疫接种的BalB/C小鼠收集的脾细胞与29种HIV-1亚型B共有包膜肽混合物一起培育24小时。通过上述ELISpot试验测定分泌IFN- γ 的细胞。

[0082] 图6显示pEY2E1-B在BalB/C小鼠和HLA-A2转基因小鼠内诱导的交叉反应性。通过IFN- γ ELISpot试验测定用pEY2E1-B和pEK2P-B免疫接种BalB/C小鼠而诱导的针对四种独立肽混合物的附加T-细胞免疫应答:HIV-1 MN包膜肽(图A)、HIV-1群M(图B)、亚型C共有包膜肽(图C)以及两种亚型C分离包膜肽(图D和E)。还测定了用pEY2E1-B和pEK2P-B免疫接种HLA-A2转基因小鼠而诱导的针对四种独立肽混合物的附加T-细胞免疫应答:HIV-1 MN包膜肽(图F)、HIV-1群M(图G)、亚型C共有包膜肽(图H)和两种亚型C分离包膜肽(图I和J)。基础pVAX免疫的小鼠作为阴性对照。

[0083] 图7显示了pEY2E1-B和pEK2P-B免疫接种的BalB/C小鼠(图A)和HLA-A2转基因小鼠(图B)中的亚型B MN包膜-特异性优势表位的表征。分别从pEY2E1-B和pEK2P-B免疫接种的BalB/C小鼠和转基因小鼠收集的脾细胞与29种HIV-1亚型B MN包膜肽混合物一起培育24小时。通过上述ELISpot试验测定分泌IFN- γ 的细胞。

[0084] 图8为E72E1-B功能域的示意图(约700+氨基酸)。

[0085] 图9为E72E1-B构建物的图谱。

[0086] 图10A和B显示了E72E1-B诱导的强细胞免疫应答。

[0087] 图11A和B显示了E72E1-B诱导的强烈广谱交叉反应性细胞免疫应答。

[0088] 图12图A-D显示了E72E1-B诱导的强烈交叉-进化支细胞免疫应答。

[0089] 图13是为实施例2的研究所设计的免疫原。

[0090] 图14显示了系统发生关系：该系统发生分析包括36种HIV-1亚型C包膜序列、EY3E1-C、EK3P-C、两种亚型B、一种亚型A和一种亚型D序列（外类群）。代表宽样品多样性的亚型C包膜序列来自12个国家。

[0091] 图15A和B显示了pEY3E1-C所引发细胞应答的研究数据。

[0092] 图16显示了pEY3E1-C所引发细胞应答的研究数据。

[0093] 图17A-D显示了同一进化支内pEY3E1-C所引发的交叉反应性细胞应答的研究数据。

[0094] 图18A和B显示了pEY3E1-C所引发的交叉反应性细胞应答的研究数据。图A显示了亚型C（乌拉圭）env-特异性IFN- γ 的ELISpot数据。图B显示了亚型C（南非）env-特异性IFN- γ 的ELISpot数据。

[0095] 图19A-F显示了两种进化支之间pEY3E1-C所引发的交叉反应性细胞应答的研究数据。

[0096] 图20A-X显示了HIV-1 gag共有构建物所引发的免疫应答的研究数据。

[0097] 图21为HPV在生殖道上皮中的生活周期。

[0098] 图22显示了HPV-16基因组的组成图。

[0099] 图23显示了免疫原的设计：*表示对于p53结合和降解重要的缺失或突变； Δ 表示Rb结合位点内的突变。

[0100] 图24显示了遗传构建物p1667，其中包括HPV E6和E7蛋白的编码序列，以及遗传构建物pVAX，其为缺乏HPV插入物的基础质粒并被用作阴性对照。

[0101] 图25A-D显示了DNA免疫原p1667诱导的细胞免疫应答。

[0102] 图26显示了优势免疫表位作图结果。

[0103] 图27显示了利用E6/E7 DNA疫苗研究在C57/BL6小鼠中的保护作用的预防性实验的结果。

[0104] 图28显示了利用E6/E7 DNA疫苗研究在C57/BL6小鼠中的保护作用的肿瘤消退实验的结果。

[0105] 图29显示了检测脾中E7四聚体阳性淋巴细胞的实验数据。

[0106] 图30显示了检测肿瘤中E7四聚体阳性淋巴细胞的实验数据。

[0107] 图31显示了转基因小鼠中DNA疫苗保护研究的数据。

[0108] 图32显示在电穿孔（EP）后IM共注射质粒编码的IL-12能增强对HIV-1共有免疫原的细胞免疫应答。IFN γ ELISpot在（a）首次免疫，（b）第二次免疫，和（c）第三次免疫两周后进行（与另三个进行比较）。对env的反应用黑色柱表示，对gag的反应用白色柱表示，数据表示为叠加的组平均值应答 \pm SEM。

[0109] 图33显示肌肉电穿孔增强了交叉反应性细胞免疫应答。免疫三次后通过IFN γ ELISpot测定pEY2E1-B免疫猕猴体内针对HIV-1群M肽的四种肽混合物的总T-细胞免疫应答。数据表示为叠加的组平均值 \pm SEM。

[0110] 图34显示IM电穿孔和质粒IL-12能增强对HIV-1免疫原的记忆应答。最后一次免疫5个月后进行ELISpot试验以测定用和不用IL-12质粒共免疫的IM和EP免疫组对gag和env的抗原-特异性记忆应答。数据表示为叠加的组平均值 \pm SEM。

[0111] 优选实施方式详述

[0112] 定义

[0113] 文中,术语“严格杂交条件”或“严格条件”指核酸分子将与另一核酸分子杂交但不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性且在不同情况下有所不同。较长序列在较高温度下特异性杂交。通常,严格条件选择在比特定序列在规定的离子强度和pH下的热解链温度(T_m)低约5℃。 T_m 是平衡时有50%的靶序列互补探针与该靶序列杂交的温度(在规定的离子强度、pH和核酸浓度下)。由于靶序列通常是过量的,因此在 T_m 下平衡时有50%的探针被占据。通常,严格条件为pH 7.0-8.3时盐浓度小于约1.0M钠离子,通常约0.01-1.0M钠离子(或其他盐),对于短的探针、引物或寡核苷酸(如10-50个核苷酸)温度至少约30℃,对于较长探针、引物或寡核苷酸温度至少约60℃。也可加入去稳定剂如甲酰胺来实现严格条件。

[0114] 核苷酸和氨基酸的序列同源性可采用FASTA、BLAST和空位BLAST(Altschul等, *Nuc. Acids Res.*, 1997, 25, 3389, 将其全文纳入本文作为参考)和PAUP*4.0b10软件(D.L.Swofford, Sinauer Associates, 马萨诸塞州)测定。计算“相似性百分比”时采用PAUP*4.0b10软件(D.L.Swofford, Sinauer Associates, 马萨诸塞州)。计算共有序列的平均相似性时与系统发生树中的所有序列进行比较(见图2和14)。

[0115] 简言之, BLAST(局部序列比对基本检索工具)算法适用于确定序列相似性(Altschul等, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410, 将其全文纳入本文作为参考)。公众可通过国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得进行BLAST分析的软件。该算法包括首先通过在查询序列中鉴定长度为W的短字符而鉴定高评分序列对(HSP), 所述字符与数据库序列内相同长度的字符比对时匹配或满足一些正值阈值评分T。T表示相邻字符评分阈值(Altschul等, 同上)。这些最初相邻字符选中(hit)作为开始检索的种子以寻找含有它们的HSP。字符选中在两个方向上沿各序列延伸直到累积比对评分增加。当满足以下条件时字符选中在各方向上的延伸终止: 1) 累积比对评分从其最大值降低X; 2) 由于累加了一个或多个负评分残基比对, 累积评分达到0或负值; 或3) 达到任一序列的终点。Blast算法的参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。Blast程序采用的缺省字符长度(W)为11, BLOSUM62评分矩阵(见Henikoff等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 10915-10919, 将其全文纳入本文作为参考)比对(B)为50, 预期值(E)为10, $M=5$, $N=4$, 并对两条链进行比较。BLAST算法(Karlin等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 5873-5787, 将其全文纳入本文作为参考)和空位BLAST对两个序列之间的相似性进行统计分析。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率($P(N)$), 它用来表示两个核苷酸序列之间随机发生匹配的可能性。例如, 如果待测核酸与其他核酸比较时的最小总和概率小于约1, 优选小于约0.1, 更优选小于约0.01, 最优选小于约0.001, 则认为该核酸与另一核酸类似。

[0116] 文中, 术语“遗传构建物”指包含编码蛋白质的核苷酸序列的DNA或RNA分子。编码序列包括操作性连接于调控元件的起始和终止信号, 所述调控元件包括能够指导核酸分子所施用的个体的细胞表达的启动子和聚腺苷化信号。

[0117] 文中, 术语“可表达形式”指含有操作性连接于编码蛋白质的编码序列的必需调控元件的基因构建物, 从而当其存在于个体细胞内时该编码序列将被表达。

[0118] 概述

[0119] 本发明利用多阶段(multi-phase)策略提供改进的疫苗,从而增强免疫原诱导的细胞免疫应答。产生了经过修饰的免疫原的共有序列。还公开了遗传修饰,包括密码子优化, RNA优化, 以及加入高效免疫球蛋白前导序列以提高构建物的免疫原性。已经设计出这种新型免疫原以引发相比对应的密码子优化免疫原更加强烈且范围广的细胞免疫应答。

[0120] 本发明提供了改进的HIV、HPV、HCV、流感和癌症疫苗,方法是在蛋白质以及编码该蛋白质的遗传构建物上提供能使它们极其有效地作为可分别诱导出抗-HIV、抗-HPV、抗-HCV、抗-流感和抗-hTert的免疫应答的免疫原的表位。因此,可提供疫苗以诱导出治疗性或预防性免疫应答。一些实施方式中,递送免疫原的方式是DNA疫苗、重组疫苗、蛋白质亚单位疫苗、包含免疫原的组合物、减毒疫苗或死疫苗。一些实施方式中,所述疫苗包含选自下组的物质的组合:一种或多种DNA疫苗,一种或多种重组疫苗,一种或多种蛋白质亚单位疫苗,一种或多种包含免疫原的组合物,一种或多种减毒疫苗以及一种或多种死疫苗。

[0121] 根据本发明的一些实施方式,本发明所述疫苗被递送到个体以调节个体免疫系统的活性从而增强针对HIV、HPV、HCV、流感或hTERT的免疫应答。当编码蛋白质的核酸分子被个体的细胞摄入后核苷酸序列在细胞内表达从而将蛋白质递送到个体。本发明的某些方面提供了利用核酸分子如质粒递送蛋白质编码序列的方法,其作为重组疫苗的一部分、作为减毒疫苗的一部分、作为分离的蛋白质或载体的蛋白质部分。

[0122] 根据本发明的一些方面,提供了预防性和/或治疗性免疫个体以抵抗HIV、HIV、HPV、HCV、流感和癌症的组合物和方法。

[0123] 本发明涉及递送核酸分子的组合物,所述核酸分子包含操作性连接于调控元件的编码本发明蛋白质的核苷酸序列。本发明的某些方面涉及包含编码本发明蛋白质的核苷酸序列的组合物和重组疫苗;编码本发明蛋白质和/或包含本发明蛋白质的活的减毒病原体;包含本发明蛋白质的死病原体;或包含本发明蛋白质的组合物,如脂质体或亚单位疫苗。本发明还涉及包含该组合物的可注射药物组合物。

[0124] HIV

[0125] 本发明利用多阶段策略提供改进的抗-HIV疫苗从而增强HIV免疫原诱导的细胞免疫应答。产生了修饰的免疫原共有序列。还披露了遗传修饰,包括密码子优化、RNA优化、以及加入高效免疫球蛋白前导序列以提高构建物的免疫原性。已经设计出新型免疫原来引发比相应的密码子优化免疫原更强更广的细胞免疫应答。

[0126] SEQ ID NO:1是亚型A共有包膜DNA序列构建物。SEQ ID NO:1包含HIV疫苗序列的编码序列,所述HIV疫苗序列包含与亚型A包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。SEQ ID NO:2包含HIV疫苗序列构建物的氨基酸序列,其包含与亚型A包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。IgE前导序列为SEQ ID NO:15。SEQ ID NO:16是亚型A共有包膜蛋白序列。

[0127] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:16,其片段,编码SEQ ID NO:16的核酸分子,或其片段。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:2或编码它的核酸分子。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:1。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:15或编码它的核酸序列。

[0128] SEQ ID NO:1的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:1的片段可包含180个或更多核苷酸;在一些实施方式中为270个或更多核苷酸;在一些实施方式中为360个或更多核苷酸;在一些实施方式中为450个或更多核苷酸;在一些实施方式

中为540个或更多核苷酸；在一些实施方式中为630个或更多核苷酸；在一些实施方式中为720个或更多核苷酸；在一些实施方式中为810个或更多核苷酸；在一些实施方式中为900个或更多核苷酸；在一些实施方式中为990个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1080个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1170个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1260个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1350个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1440个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1530个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1620个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1710个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1800个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1890个或更多核苷酸；在一些实施方式中为1980个或更多核苷酸；而在一些实施方式中为2070个或更多核苷酸。在一些实施方式中，SEQ ID NO:1的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中，SEQ ID NO:1的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于180个核苷酸，在一些实施方式中为少于270个核苷酸，在一些实施方式中为少于360个核苷酸，在一些实施方式中为少于450个核苷酸，在一些实施方式中为少于540个核苷酸，在一些实施方式中为少于630个核苷酸，在一些实施方式中为少于720个核苷酸，在一些实施方式中为少于810个核苷酸，在一些实施方式中为少于900个核苷酸，在一些实施方式中为少于990个核苷酸，在一些实施方式中为少于1080个核苷酸，在一些实施方式中为少于1170个核苷酸，在一些实施方式中为少于1260个核苷酸，在一些实施方式中为少于1350个核苷酸，在一些实施方式中为少于1440个核苷酸，在一些实施方式中为少于1530个核苷酸，在一些实施方式中为少于1620个核苷酸，在一些实施方式中为少于1710个核苷酸，在一些实施方式中为少于1800个核苷酸，在一些实施方式中为少于1890个核苷酸，在一些实施方式中为少于1980个核苷酸，在一些实施方式中为少于2070个核苷酸，而在一些实施方式中为少于2070个核苷酸。

[0129] SEQ ID NO:2的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中，SEQ ID NO:2的片段可包含60个或更多氨基酸；在一些实施方式中为90个或更多氨基酸；在一些实施方式中为120个或更多氨基酸；在一些实施方式中为150个或更多氨基酸；在一些实施方式中为180个或更多氨基酸；在一些实施方式中为210个或更多氨基酸；在一些实施方式中为240个或更多氨基酸；在一些实施方式中为270个或更多氨基酸；在一些实施方式中为300个或更多氨基酸；在一些实施方式中为330个或更多氨基酸；在一些实施方式中为360个或更多氨基酸；在一些实施方式中为390个或更多氨基酸；在一些实施方式中为420个或更多氨基酸；在一些实施方式中为450个或更多氨基酸；在一些实施方式中为480个或更多氨基酸；在一些实施方式中为510个或更多氨基酸；在一些实施方式中为540个或更多氨基酸；在一些实施方式中为570个或更多氨基酸；在一些实施方式中为600个或更多氨基酸；在一些实施方式中为630个或更多氨基酸；在一些实施方式中为660个或更多氨基酸。而在一些实施方式中为690个或更多氨基酸。所述片段可包含少于90个氨基酸，在一些实施方式中为少于120个氨基酸，在一些实施方式中为少于150个氨基酸，在一些实施方式中为少于180个氨基酸，在一些实施方式中为少于210个氨基酸，在一些实施方式中为少于240个氨基酸，在一些实施方式中为少于270个氨基酸，在一些实施方式中为少于300个氨基酸，在一些实施方式中为少于330个氨基酸，在一些实施方式中为少于360个氨基酸，在一些实施方式中为少于390个氨基酸，在一些实施方式中为少于420个氨基酸，在一些实施方式中为少于450个氨基酸，在一些实施方式中为少于480个氨基酸，在一些实施方式中为少于540个氨基酸，在一些

实施方式中为少于600个氨基酸,在一些实施方式中为少于660个氨基酸,而在一些实施方式中为少于690个氨基酸。

[0130] SEQ ID NO:3是亚型B共有包膜DNA序列构建物。SEQ ID NO:3包含HIV疫苗序列的编码序列,所述HIV疫苗序列包含与亚型B包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。SEQ ID NO:4包含HIV疫苗序列构建物的氨基酸序列,其包含与亚型B包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。IgE前导序列为SEQ ID NO:15。SEQ ID NO:17是亚型B共有包膜蛋白质序列。

[0131] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:17,其片段,编码SEQ ID NO:17的核酸分子,或其片段。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:4或编码它的核酸分子。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:3。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:15或编码它的核酸序列。

[0132] SEQ ID NO:3的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:3的片段可包含180个或更多核苷酸;在一些实施方式中为270个或更多核苷酸;在一些实施方式中为360个或更多核苷酸;在一些实施方式中为450个或更多核苷酸;在一些实施方式中为540个或更多核苷酸;在一些实施方式中为630个或更多核苷酸;在一些实施方式中为720个或更多核苷酸;在一些实施方式中为810个或更多核苷酸;在一些实施方式中为900个或更多核苷酸;在一些实施方式中为990个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1080个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1170个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1260个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1350个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1440个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1530个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1620个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1710个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1800个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1890个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1980个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2070个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2160个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2250个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2340个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2430个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2520个或更多核苷酸;在一些实施方式中为2620个或更多核苷酸;而在一些实施方式中为2700个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:3的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:3的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于450个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于630个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,在一些实施方式中为少于810个核苷酸,在一些实施方式中为少于900个核苷酸,在一些实施方式中为少于990个核苷酸,在一些实施方式中为少于1080个核苷酸,在一些实施方式中为少于1170个核苷酸,在一些实施方式中为少于1260个核苷酸,在一些实施方式中为少于1350个核苷酸,在一些实施方式中为少于1440个核苷酸,在一些实施方式中为少于1530个核苷酸,在一些实施方式中为少于1620个核苷酸,在一些实施方式中为少于1710个核苷酸,在一些实施方式中为少于1800个核苷酸,在一些实施方式中为少于1890个核苷酸,在一些实施方式中为少于1980个核苷酸,在一些实施方式中为少于2070个核苷酸,在一些实施方式中为少于2160个核苷酸,在一些实施方式中为少于2250个核苷酸,在一些实施方式中为少于2340个核苷酸,在一些实施方式中为少于2430个核苷酸,在一些实施方式中为少于

2520个核苷酸,在一些实施方式中为少于2610个核苷酸,而在一些实施方式中为少于2700个核苷酸。

[0133] SEQ ID NO:4的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:4的片段可包含60个或更多氨基酸;在一些实施方式中为90个或更多氨基酸;在一些实施方式中为120个或更多氨基酸;在一些实施方式中为150个或更多氨基酸;在一些实施方式中为180个或更多氨基酸;在一些实施方式中为210个或更多氨基酸;在一些实施方式中为240个或更多氨基酸;在一些实施方式中为270个或更多氨基酸;在一些实施方式中为300个或更多氨基酸;在一些实施方式中为330个或更多氨基酸;在一些实施方式中为360个或更多氨基酸;在一些实施方式中为390个或更多氨基酸;在一些实施方式中为420个或更多氨基酸;在一些实施方式中为450个或更多氨基酸;在一些实施方式中为480个或更多氨基酸;在一些实施方式中为510个或更多氨基酸;在一些实施方式中为540个或更多氨基酸;在一些实施方式中为570个或更多氨基酸;在一些实施方式中为600个或更多氨基酸;在一些实施方式中为630个或更多氨基酸;在一些实施方式中为660个或更多氨基酸。而在一些实施方式中为690个或更多氨基酸。所述片段可包含少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个氨基酸,在一些实施方式中为少于270个氨基酸,在一些实施方式中为少于300个氨基酸,在一些实施方式中为少于330个氨基酸,在一些实施方式中为少于360个氨基酸,在一些实施方式中为少于390个氨基酸,在一些实施方式中为少于420个氨基酸,在一些实施方式中为少于450个氨基酸,在一些实施方式中为少于480个氨基酸,在一些实施方式中为少于540个氨基酸,在一些实施方式中为少于600个氨基酸,在一些实施方式中为少于660个氨基酸,而在一些实施方式中为少于690个氨基酸。

[0134] SEQ ID NO:5是亚型C共有包膜DNA序列构建物。SEQ ID NO:5包含HIV疫苗序列的编码序列,所述HIV疫苗序列包含与亚型C包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。SEQ ID NO:6包含HIV疫苗序列构建物的氨基酸序列,其包含与亚型C包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。IgE前导序列为SEQ ID NO:15。SEQ ID NO:18是亚型C共有包膜蛋白质序列。

[0135] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:18,其片段,编码SEQ ID NO:18的核酸分子,或其片段。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:6或编码它的核酸分子。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:5。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:15或编码它的核酸序列。

[0136] SEQ ID NO:5的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:5的片段可包含180个或更多核苷酸;在一些实施方式中为270个或更多核苷酸;在一些实施方式中为360个或更多核苷酸;在一些实施方式中为450个或更多核苷酸;在一些实施方式中为540个或更多核苷酸;在一些实施方式中为630个或更多核苷酸;在一些实施方式中为720个或更多核苷酸;在一些实施方式中为810个或更多核苷酸;在一些实施方式中为900个或更多核苷酸;在一些实施方式中为990个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1080个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1170个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1260个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1350个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1440个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1530个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1620个或更多核苷酸。

酸;在一些实施方式中为1710个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1800个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1890个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1980个或更多核苷酸;而在一些实施方式中为2070个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:5的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:5的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于450个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于630个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,在一些实施方式中为少于810个核苷酸,在一些实施方式中为少于900个核苷酸,在一些实施方式中为少于990个核苷酸,在一些实施方式中为少于1080个核苷酸,在一些实施方式中为少于1170个核苷酸,在一些实施方式中为少于1260个核苷酸,在一些实施方式中为少于1350个核苷酸,在一些实施方式中为少于1440个核苷酸,在一些实施方式中为少于1530个核苷酸,在一些实施方式中为少于1620个核苷酸,在一些实施方式中为少于1710个核苷酸,在一些实施方式中为少于1800个核苷酸,在一些实施方式中为少于1890个核苷酸,在一些实施方式中为少于1980个核苷酸,在一些实施方式中为少于1020个核苷酸,而在一些实施方式中为少于2070个核苷酸。

[0137] SEQ ID NO:6的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:6的片段可包含60个或更多氨基酸;在一些实施方式中为90个或更多氨基酸;在一些实施方式中为120个或更多氨基酸;在一些实施方式中为150个或更多氨基酸;在一些实施方式中为180个或更多氨基酸;在一些实施方式中为210个或更多氨基酸;在一些实施方式中为240个或更多氨基酸;在一些实施方式中为270个或更多氨基酸;在一些实施方式中为300个或更多氨基酸;在一些实施方式中为330个或更多氨基酸;在一些实施方式中为360个或更多氨基酸;在一些实施方式中为390个或更多氨基酸;在一些实施方式中为420个或更多氨基酸;在一些实施方式中为450个或更多氨基酸;在一些实施方式中为480个或更多氨基酸;在一些实施方式中为510个或更多氨基酸;在一些实施方式中为540个或更多氨基酸;在一些实施方式中为570个或更多氨基酸;在一些实施方式中为600个或更多氨基酸;在一些实施方式中为630个或更多氨基酸;在一些实施方式中为660个或更多氨基酸。而在一些实施方式中为690个或更多氨基酸。所述片段可包含少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个氨基酸,在一些实施方式中为少于270个氨基酸,在一些实施方式中为少于300个氨基酸,在一些实施方式中为少于330个氨基酸,在一些实施方式中为少于360个氨基酸,在一些实施方式中为少于390个氨基酸,在一些实施方式中为少于420个氨基酸,在一些实施方式中为少于450个氨基酸,在一些实施方式中为少于480个氨基酸,在一些实施方式中为少于540个氨基酸,在一些实施方式中为少于600个氨基酸,在一些实施方式中为少于660个氨基酸,而在一些实施方式中为少于690个氨基酸。

[0138] SEQ ID NO:7是亚型D共有包膜DNA序列构建物。SEQ ID NO:7包含HIV疫苗序列的编码序列,所述HIV疫苗序列包含与亚型D包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。SEQ ID NO:8包含HIV疫苗序列构建物的氨基酸序列,其包含与亚型D包膜蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。IgE前导序列为SEQ ID NO:15。SEQ ID NO:19是亚型D共有包膜蛋白质序列。

[0139] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:19,其片段,编码SEQ ID NO:19的核酸分子,或其片段。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:8或编码它的核酸分子。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:7。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:15或编码它的核酸序列。

[0140] SEQ ID NO:7的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:7的片段可包含180个或更多核苷酸;在一些实施方式中为270个或更多核苷酸;在一些实施方式中为360个或更多核苷酸;在一些实施方式中为450个或更多核苷酸;在一些实施方式中为540个或更多核苷酸;在一些实施方式中为630个或更多核苷酸;在一些实施方式中为720个或更多核苷酸;在一些实施方式中为810个或更多核苷酸;在一些实施方式中为900个或更多核苷酸;在一些实施方式中为990个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1080个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1170个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1260个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1350个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1440个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1530个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1620个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1710个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1800个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1890个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1980个或更多核苷酸;而在一些实施方式中为2070个或更多核苷酸;而在一些实施方式中为2140个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:7的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:7的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于450个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于630个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,在一些实施方式中为少于810个核苷酸,在一些实施方式中为少于900个核苷酸,在一些实施方式中为少于990个核苷酸,在一些实施方式中为少于1080个核苷酸,在一些实施方式中为少于1170个核苷酸,在一些实施方式中为少于1260个核苷酸,在一些实施方式中为少于1350个核苷酸,在一些实施方式中为少于1440个核苷酸,在一些实施方式中为少于1530个核苷酸,在一些实施方式中为少于1620个核苷酸,在一些实施方式中为少于1710个核苷酸,在一些实施方式中为少于1800个核苷酸,在一些实施方式中为少于1890个核苷酸,在一些实施方式中为少于1980个核苷酸,在一些实施方式中为少于1020个核苷酸,在一些实施方式中为少于2070个核苷酸;在一些实施方式中为少于2140个核苷酸。

[0141] SEQ ID NO:8的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:8的片段可包含60个或更多氨基酸;在一些实施方式中为90个或更多氨基酸;在一些实施方式中为120个或更多氨基酸;在一些实施方式中为150个或更多氨基酸;在一些实施方式中为180个或更多氨基酸;在一些实施方式中为210个或更多氨基酸;在一些实施方式中为240个或更多氨基酸;在一些实施方式中为270个或更多氨基酸;在一些实施方式中为300个或更多氨基酸;在一些实施方式中为330个或更多氨基酸;在一些实施方式中为360个或更多氨基酸;在一些实施方式中为390个或更多氨基酸;在一些实施方式中为420个或更多氨基酸;在一些实施方式中为450个或更多氨基酸;在一些实施方式中为480个或更多氨基酸;在一些实施方式中为510个或更多氨基酸;在一些实施方式中为540个或更多氨基酸;在一些实施方式中为570个或更多氨基酸;在一些实施方式中为600个或更多氨基酸;在一些实施

方式中为630个或更多氨基酸；在一些实施方式中为660个或更多氨基酸。而在一些实施方式中为690个或更多氨基酸。所述片段可包含少于90个氨基酸，在一些实施方式中为少于120个氨基酸，在一些实施方式中为少于150个氨基酸，在一些实施方式中为少于180个氨基酸，在一些实施方式中为少于210个氨基酸，在一些实施方式中为少于240个氨基酸，在一些实施方式中为少于270个氨基酸，在一些实施方式中为少于300个氨基酸，在一些实施方式中为少于330个氨基酸，在一些实施方式中为少于360个氨基酸，在一些实施方式中为少于390个氨基酸，在一些实施方式中为少于420个氨基酸，在一些实施方式中为少于450个氨基酸，在一些实施方式中为少于480个氨基酸，在一些实施方式中为少于540个氨基酸，在一些实施方式中为少于600个氨基酸，在一些实施方式中为少于660个氨基酸，而在一些实施方式中为少于690个氨基酸。

[0142] SEQ ID NO:9是亚型B Nef-Rev共有包膜DNA序列构建物。SEQ ID NO:9包含HIV疫苗序列的编码序列，所述HIV疫苗序列包含与亚型B Nef-Rev蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。SEQ ID NO:10包含HIV疫苗序列构建物的氨基酸序列，其包含与亚型B Nef-Rev蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。IgE前导序列为SEQ ID NO:15。SEQ ID NO:20是亚型B Nef-Rev共有蛋白质序列。

[0143] 在一些实施方式中，本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:20，其片段，编码SEQ ID NO:20的核酸分子，或其片段。在一些实施方式中，本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:10或编码它的核酸分子。在一些实施方式中，本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:9。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:15或编码它的核酸序列。

[0144] SEQ ID NO:9的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中，SEQ ID NO:9的片段可包含180个或更多核苷酸；在一些实施方式中为270个或更多核苷酸；在一些实施方式中为360个或更多核苷酸；在一些实施方式中为450个或更多核苷酸；在一些实施方式中为540个或更多核苷酸；在一些实施方式中为630个或更多核苷酸；在一些实施方式中为720个或更多核苷酸；在一些实施方式中为810个或更多核苷酸；在一些实施方式中为900个或更多核苷酸；而在一些实施方式中为990个或更多核苷酸；在一些实施方式中。在一些实施方式中，SEQ ID NO:9的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中，SEQ ID NO:9的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于180个核苷酸，在一些实施方式中为少于270个核苷酸，在一些实施方式中为少于360个核苷酸，在一些实施方式中为少于450个核苷酸，在一些实施方式中为少于540个核苷酸，在一些实施方式中为少于630个核苷酸，在一些实施方式中为少于720个核苷酸，在一些实施方式中为少于810个核苷酸，在一些实施方式中为少于900个核苷酸，而在一些实施方式中为少于990个核苷酸。

[0145] SEQ ID NO:2的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中，SEQ ID NO:2的片段可包含60个或更多氨基酸；在一些实施方式中为90个或更多氨基酸；在一些实施方式中为120个或更多氨基酸；在一些实施方式中为150个或更多氨基酸；在一些实施方式中为180个或更多氨基酸；在一些实施方式中为210个或更多氨基酸；在一些实施方式中为240个或更多氨基酸；在一些实施方式中为270个或更多氨基酸；在一些实施方式中为300个或更多氨基酸；而在一些实施方式中为330个或更多氨基酸。

[0146] SEQ ID NO:11是亚型A、B、C和D的Gag共有DNA序列的DNA序列构建物。SEQ ID NO:11包含HIV疫苗序列的编码序列，所述HIV疫苗序列包含与Gag共有亚型A、B、C和D蛋白的共

有序列相连的IgE前导序列。SEQ ID NO:12包含HIV疫苗序列构建物的氨基酸序列,其包含与Gag亚型A、B、C和D蛋白的共有序列相连的IgE前导序列。IgE前导序列为SEQ ID NO:15。SEQ ID NO:21是Gag亚型A、B、C和D共有蛋白质序列。

[0147] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:21,其片段,编码SEQ ID NO:21的核酸分子,或其片段。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:12或编码它的核酸分子。在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:11。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:15或编码它的核酸序列。

[0148] SEQ ID NO:11的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:11的片段可包含180个或更多核苷酸;在一些实施方式中为270个或更多核苷酸;在一些实施方式中为360个或更多核苷酸;在一些实施方式中为450个或更多核苷酸;在一些实施方式中为540个或更多核苷酸;在一些实施方式中为630个或更多核苷酸;在一些实施方式中为720个或更多核苷酸;在一些实施方式中为810个或更多核苷酸;在一些实施方式中为900个或更多核苷酸;在一些实施方式中为990个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1080个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1170个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1260个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1350个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1440个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1530个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1620个或更多核苷酸;在一些实施方式中为1710个或更多核苷酸;而在一些实施方式中为1800个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:11的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:11的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于450个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于630个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,在一些实施方式中为少于810个核苷酸,在一些实施方式中为少于900个核苷酸,在一些实施方式中为少于990个核苷酸,在一些实施方式中为少于1080个核苷酸,在一些实施方式中为少于1170个核苷酸,在一些实施方式中为少于1260个核苷酸,在一些实施方式中为少于1350个核苷酸,在一些实施方式中为少于1440个核苷酸,在一些实施方式中为少于1530个核苷酸,在一些实施方式中为少于1620个核苷酸,在一些实施方式中为少于1710个核苷酸,而在一些实施方式中为少于1800个核苷酸。

[0149] SEQ ID NO:12的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:12的片段可包含60个或更多氨基酸;在一些实施方式中为90个或更多氨基酸;在一些实施方式中为120个或更多氨基酸;在一些实施方式中为150个或更多氨基酸;在一些实施方式中为180个或更多氨基酸;在一些实施方式中为210个或更多氨基酸;在一些实施方式中为240个或更多氨基酸;在一些实施方式中为270个或更多氨基酸;在一些实施方式中为300个或更多氨基酸;在一些实施方式中为330个或更多氨基酸;在一些实施方式中为360个或更多氨基酸;在一些实施方式中为390个或更多氨基酸;在一些实施方式中为420个或更多氨基酸;在一些实施方式中为450个或更多氨基酸;在一些实施方式中为480个或更多氨基酸;而在一些实施方式中为510个或更多氨基酸。所述片段可包含少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个

氨基酸,在一些实施方式中为少于270个氨基酸,在一些实施方式中为少于300个氨基酸,在一些实施方式中为少于330个氨基酸,在一些实施方式中为少于360个氨基酸,在一些实施方式中为少于390个氨基酸,在一些实施方式中为少于420个氨基酸,在一些实施方式中为少于450个氨基酸,在一些实施方式中为少于480个氨基酸,而在一些实施方式中为少于510个氨基酸。

[0150] HPV

[0151] SEQ ID NO:22包含HPV疫苗序列的编码序列,其包含IgE前导序列,HPV E6共有序列,通过蛋白水解切割序列与HPV E7共有序列相连。HPV E6共有序列包括SEQ ID NO:24中列出的优势免疫表位。HPV E7共有序列包括SEQ ID NO:25中列出的优势免疫表位。HPV E6共有序列为SEQ ID NO:26。HPV E6共有序列为SEQ ID NO:27。IgE前导序列为SEQ ID NO:28。用于连接两个共有序列的蛋白水解切割序列是SEQ ID NO:29。

[0152] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:24和/或SEQ ID NO:25,或编码它们之一或两者的核酸序列。本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:27和/或SEQ ID NO:28,或编码它们之一或两者的核酸序列。本发明的疫苗优选包含通过蛋白水解切割序列如SEQ ID NO:29连接到SEQ ID NO:28的SEQ ID NO:27,或者编码该融合蛋白的核酸序列。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:28或编码它的核酸序列。本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:22所示核酸序列。

[0153] 在一些实施方式中,蛋白质包含SEQ ID NO:23的片段。在一些实施方式中,蛋白质由SEQ ID NO:23的片段构成。在一些实施方式中,核酸包含SEQ ID NO:22的片段。在一些实施方式中,核酸由SEQ ID NO:22的片段构成。

[0154] SEQ ID NO:22的片段可包含30个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含45个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含60个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含75个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含90个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含120个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含150个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含180个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含210个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含240个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含270个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含300个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含360个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含420个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含480个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含540个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:

22的片段可包含600个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含300个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含660个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含720个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含780个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:22的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于60个核苷酸,在一些实施方式中为少于75个核苷酸,在一些实施方式中为少于90个核苷酸,在一些实施方式中为少于120个核苷酸,在一些实施方式中为少于150个核苷酸,在一些实施方式中为少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于210个核苷酸,在一些实施方式中为少于240个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于300个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于420个核苷酸,在一些实施方式中为少于480个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于600个核苷酸,在一些实施方式中为少于660个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,而在一些实施方式中为少于780个核苷酸。

[0155] SEQ ID NO:23的片段可包含15个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含18个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含21个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含24个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含30个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含36个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含42个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含48个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含54个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含60个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含18个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含72个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含90个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含120个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含150个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含180个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含210个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含240个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含260个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施

方式中,SEQ ID NO:23的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于24个氨基酸,在一些实施方式中为少于30个氨基酸,在一些实施方式中为少于36个氨基酸,在一些实施方式中为少于42个氨基酸,在一些实施方式中为少于48个氨基酸,在一些实施方式中为少于54个氨基酸,在一些实施方式中为少于60个氨基酸,在一些实施方式中为少于72个氨基酸,在一些实施方式中为少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个氨基酸,而在一些实施方式中为少于260个氨基酸。

[0156] HCV

[0157] SEQ ID NO:30包含HCV疫苗序列的编码序列,所述HCV疫苗序列包含IgE前导序列,HCV E1共有序列,通过蛋白水解切割序列与HCV E2共有序列相连。HCV E1共有序列为SEQ ID NO:32。HCV E2共有序列为SEQ ID NO:33。

[0158] 在一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:32和/或SEQ ID NO:33,或编码它们之一或两者的核酸序列。本发明的疫苗优选包含通过蛋白水解切割序列如SEQ ID NO:29连接到SEQ ID NO:33的SEQ ID NO:32,或者编码该融合蛋白的核酸序列。本发明的疫苗优选包含IgE前导序列SEQ ID NO:28或编码它的核酸序列。本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:30所示核酸序列。

[0159] 在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:30以及核酸序列或由其核酸序列编码的氨基酸序列,所述序列选自下组:SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35以及它们的任意组合。

[0160] SEQ ID NO:30的片段可包含30个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含45个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含60个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含75个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含120个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含150个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含180个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含210个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含240个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含270个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含300个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含360个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含420个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含480个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含540个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含600个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含660个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含720个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含780个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含840个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含900个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含960个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1020个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1080个

或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1140个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1200个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1260个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1320个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1380个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1440个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1500个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1560个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1620个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1680个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含1740个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于60个核苷酸,在一些实施方式中为少于75个核苷酸,在一些实施方式中为少于90个核苷酸,在一些实施方式中为少于120个核苷酸,在一些实施方式中为少于150个核苷酸,在一些实施方式中为少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于210个核苷酸,在一些实施方式中为少于240个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于300个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于420个核苷酸,在一些实施方式中为少于480个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于600个核苷酸,在一些实施方式中为少于660个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,在一些实施方式中为少于780个核苷酸,在一些实施方式中为少于840个核苷酸,在一些实施方式中为少于900个核苷酸,在一些实施方式中为少于960个核苷酸,在一些实施方式中为少于1020个核苷酸,在一些实施方式中为少于1080个核苷酸,在一些实施方式中为少于1140个核苷酸,在一些实施方式中为少于1200个核苷酸,在一些实施方式中为少于1260个核苷酸,在一些实施方式中为少于1320个核苷酸,在一些实施方式中为少于1380个核苷酸,在一些实施方式中为少于1440个核苷酸,在一些实施方式中为少于1500个核苷酸,在一些实施方式中为少于1560个核苷酸,在一些实施方式中为少于1620个核苷酸,在一些实施方式中为少于1680个核苷酸,而在一些实施方式中为少于1740个核苷酸。

[0161] SEQ ID NO:31的片段可包含15个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含45个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含60个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含75个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含90个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含105个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含120个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含150个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含180个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含210个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含240个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含270个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含300个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含360个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含420个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含480个或更多氨基酸。在

一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含540个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31的片段可包含575个或更多氨基酸。所述片段可包含少于30个氨基酸,在一些实施方式中为少于45个氨基酸,在一些实施方式中为少于60个氨基酸,在一些实施方式中为少于75个氨基酸,在一些实施方式中为少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个氨基酸,在一些实施方式中为少于270个氨基酸,在一些实施方式中为少于300个氨基酸,在一些实施方式中为少于360个氨基酸,在一些实施方式中为少于420个氨基酸,在一些实施方式中为少于480个氨基酸,在一些实施方式中为少于540个氨基酸,而在一些实施方式中为少于575个氨基酸。

[0162] hTERT

[0163] hTERT是人端粒酶逆转录酶,它在端粒酶末端合成TTAGGG标签以防止染色体缩短造成的细胞死亡。通过免疫疗法可靶定hTERT异常高表达的超增生性细胞。最近的研究也支持受HCV和HPV感染的超增生性细胞上hTERT表达异常。因此,通过靶定以异常水平表达hTERT的细胞可以增强HPV和HCV的免疫治疗效果。

[0164] 最近的研究证实,hTERT基因转染的树突细胞中hTERT的表达能够以抗原特异性方式诱导CD8⁺细胞毒T细胞并引发CD4⁺ T细胞。因此,在抗原呈递细胞(APC)内采用hTERT表达以延缓细胞衰老并维持它们呈递所选抗原的能力对于开发新的免疫疗法很有吸引力。

[0165] 根据本发明的一些实施方式,诱导个体产生针对免疫原的免疫应答的方法包括,组合给予所述个体hTERT蛋白及其功能片段或其可表达的编码序列与编码本发明蛋白质的分离核酸分子和/或编码本发明蛋白质的重组疫苗和/或本发明蛋白质的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗。

[0166] 在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:30以及核酸序列或由其核酸序列编码的氨基酸序列,所述序列选自下组:SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35以及它们的任意组合。在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35。SEQ ID NO:34包含编码hTERT的核酸序列。SEQ ID NO:35包含hTERT的氨基酸序列。

[0167] 在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35。联用编码hTERT的核酸序列和/或hTERT蛋白与HPV免疫原的组合能增强细胞介导的针对HPV-感染细胞的免疫应答。

[0168] SEQ ID NO:34的片段可包含30个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含45个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含60个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:1的片段可包含75个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含90个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含120个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含150个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含180个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含210个或更多核苷酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34的片段可包含240个或更

[illegible]

[illegible]

[illegible]

个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1230个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1260个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1290个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1320个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1350个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1380个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1410个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1440个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1470个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含1500个或更多氨基酸,优选包括编码优势免疫表位的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35的片段不包含IgE前导序列的编码序列。所述片段可包含少于24个氨基酸,在一些实施方式中为少于30个氨基酸,在一些实施方式中为少于36个氨基酸,在一些实施方式中为少于42个氨基酸,在一些实施方式中为少于48个氨基酸,在一些实施方式中为少于54个氨基酸,在一些实施方式中为少于60个氨基酸,在一些实施方式中为少于72个氨基酸,在一些实施方式中为少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个氨基酸,在一些实施方式中为少于260个氨基酸,在一些实施方式中为少于290个氨基酸,在一些实施方式中为少于320个氨基酸,在一些实施方式中为少于350个氨基酸,在一些实施方式中为少于380个氨基酸,在一些实施方式中为少于410个氨基酸,在一些实施方式中为少于440个氨基酸,在一些实施方式中为少于470个氨基酸,在一些实施方式中为少于500个氨基酸,在一些实施方式中为少于530个氨基酸,在一些实施方式中为少于560个氨基酸,在一些实施方式中为少于590个氨基酸,在一些实施方式中为少于620个氨基酸,在一些实施方式中为少于650个氨基酸,在一些实施方式中为少于680个氨基酸,在一些实施方式中为少于710个氨基酸,在一些实施方式中为少于740个氨基酸,在一些实施方式中为少于770个氨基酸,在一些实施方式中为少于800个氨基酸,在一些实施方式中为少于830个氨基酸,在一些实施方式中为少于860个氨基酸,在一些实施方式中为少于890个氨基酸,在一些实施方式中为少于920个氨基酸,在一些实施方式中为少于950个氨基酸,在一些实施方式中为少于980个氨基酸,在一些实施方式中为少于1010个氨基酸,在一些实施方式中为少于1040个氨基酸,在一些实施方式中为少于1070个氨基酸,在一些实施方式中为少于1200个氨基酸,在一些实施方式中为少于1230个氨基酸,在一些实施方式中为少于1260个氨基酸,在一些实施方式中为少于1290个氨基酸,在一些实施方式中为少于1320个氨基酸,在一些实施方式中为少于1350个氨基酸,在一些实施方式中为少于1380个氨基酸,在一些实施方式中为少于1410个氨基酸,在一些实施方式中为少于1440个氨基酸,在一些实施方式中为少于1470个氨基酸,而在一些实施方式中为少于1500个氨基酸。

[0170] 流感

[0171] 根据本发明的一些实施方式,诱导个体产生针对免疫原的免疫应答的方法包括,组合给予所述个体流感H5N1毒株血凝素(HA)蛋白及其功能片段或其可表达的编码序列与编码本发明蛋白质的分离核酸分子和/或编码本发明蛋白质的重组疫苗和/或本发明蛋白质的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗。在一些实施方式中,所述流感疫苗组合物和方法包括使用编码各种流感病毒HA蛋白的核酸序列。在一些实施方式中,所述流感疫苗组合物和方法包括使用编码流感病毒株H1N5的HA的核酸序列以及编码选自下组的流感蛋白的核酸序列:SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:42。在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37。SEQ ID NO:36包含编码流感病毒H1N5 HA的核酸序列。SEQ ID NO:37包含流感病毒H1N5 HA的氨基酸序列。在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39。SEQ ID NO:38包含编码流感H1N1和H5N1 NA共有序列的核酸序列。SEQ ID NO:39包含流感H1N1和H5N1 NA共有序列的氨基酸序列。在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:41。SEQ ID NO:40包含编码流感H1N1和H5N1 M1共有序列的核酸序列。SEQ ID NO:41包含流感H1N1和H5N1 M1共有序列的氨基酸序列。在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43。SEQ ID NO:42包含编码流感H5N1 M2E-NP共有序列的核酸序列。SEQ ID NO:43包含流感H5N1 M2E-NP共有序列的氨基酸序列。在本发明的一些实施方式中,本发明的疫苗优选包含SEQ ID NO:36和选自下组的序列:SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43,以及它们的任意组合。流感病毒株H5N1 HA的共有序列包括SEQ ID NO:36中列出的优势免疫表位。由SEQ ID NO:36编码的流感病毒H5N1 HA氨基酸序列是SEQ ID NO:37。流感病毒H1N1/H5N1 NA的共有序列包括SEQ ID NO:38中列出的优势免疫表位。由SEQ ID NO:38编码的流感病毒株H1N1/H5N1 NA氨基酸序列是SEQ ID NO:39。流感病毒株H1N1/H5N1 M1的共有序列包括SEQ ID NO:40中列出的优势免疫表位。由SEQ ID NO:40编码的流感病毒H1N1/H5N1 M1氨基酸序列是SEQ ID NO:41。流感病毒H5N1 M2E-NP的共有序列包括SEQ ID NO:42中列出的优势免疫表位。由SEQ ID NO:42编码的流感病毒H5N1 M2E-NP氨基酸序列是SEQ ID NO:43。本发明的疫苗可包括由上文定义的核酸分子编码的蛋白质产物或蛋白质的任何片段。

[0172] SEQ ID NO:36的片段可包含30个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含45个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含60个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含75个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含90个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含120个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含150个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含180个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含210个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含240个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含270个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含300个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含360个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含420个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含480个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含540个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含600个或更多核苷酸。在

一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含660个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含720个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含780个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含840个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含900个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含960个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1020个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1080个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1140个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1200个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1260个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1320个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1380个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1440个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1500个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1560个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1620个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1680个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含1740个或更多核苷酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36的片段不包含IgE前导序列的编码序列。SEQ ID NO:36的片段可包含少于60个核苷酸,在一些实施方式中为少于75个核苷酸,在一些实施方式中为少于90个核苷酸,在一些实施方式中为少于120个核苷酸,在一些实施方式中为少于150个核苷酸,在一些实施方式中为少于180个核苷酸,在一些实施方式中为少于210个核苷酸,在一些实施方式中为少于240个核苷酸,在一些实施方式中为少于270个核苷酸,在一些实施方式中为少于300个核苷酸,在一些实施方式中为少于360个核苷酸,在一些实施方式中为少于420个核苷酸,在一些实施方式中为少于480个核苷酸,在一些实施方式中为少于540个核苷酸,在一些实施方式中为少于600个核苷酸,在一些实施方式中为少于660个核苷酸,在一些实施方式中为少于720个核苷酸,在一些实施方式中为少于780个核苷酸,在一些实施方式中为少于840个核苷酸,在一些实施方式中为少于900个核苷酸,在一些实施方式中为少于960个核苷酸,在一些实施方式中为少于1020个核苷酸,在一些实施方式中为少于1080个核苷酸,在一些实施方式中为少于1140个核苷酸,在一些实施方式中为少于1200个核苷酸,在一些实施方式中为少于1260个核苷酸,在一些实施方式中为少于1320个核苷酸,在一些实施方式中为少于1380个核苷酸,在一些实施方式中为少于1440个核苷酸,在一些实施方式中为少于1500个核苷酸,在一些实施方式中为少于1560个核苷酸,在一些实施方式中为少于1620个核苷酸,在一些实施方式中为少于1680个核苷酸,而在一些实施方式中为少于1740个核苷酸。

[0173] SEQ ID NO:37的片段可包含15个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含30个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含45个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含60个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含75个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含90个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含105个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含120个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含150个或更多氨基酸。在一些实施方式中,

SEQ ID NO:37的片段可包含180个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含210个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含240个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含270个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含300个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含360个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含420个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含480个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含540个或更多氨基酸。在一些实施方式中,SEQ ID NO:37的片段可包含565个或更多氨基酸。SEQ ID NO:37的片段可包含少于30个氨基酸,在一些实施方式中为少于45个氨基酸,在一些实施方式中为少于60个氨基酸,在一些实施方式中为少于75个氨基酸,在一些实施方式中为少于90个氨基酸,在一些实施方式中为少于120个氨基酸,在一些实施方式中为少于150个氨基酸,在一些实施方式中为少于180个氨基酸,在一些实施方式中为少于210个氨基酸,在一些实施方式中为少于240个氨基酸,在一些实施方式中为少于270个氨基酸,在一些实施方式中为少于300个氨基酸,在一些实施方式中为少于360个氨基酸,在一些实施方式中为少于420个氨基酸,在一些实施方式中为少于480个氨基酸,在一些实施方式中为少于540个氨基酸,而在一些实施方式中为少于565个氨基酸。

[0174] 根据本发明的一些实施方式,诱导个体产生针对免疫原的免疫应答的方法包括,组合给予所述个体流感毒株H1N1和流感毒株H5N1 NA蛋白及其功能片段或其可表达的编码序列与编码本发明蛋白质的分离核酸分子和/或编码本发明蛋白质的重组疫苗和/或本发明蛋白质的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗。

[0175] 根据本发明的一些实施方式,诱导个体产生针对免疫原的免疫应答的方法包括,组合给予所述个体流感毒株H1N1和流感毒株H5N1 M1蛋白及其功能片段或其可表达的编码序列与编码本发明蛋白质的分离核酸分子和/或编码本发明蛋白质的重组疫苗和/或本发明蛋白质的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗。

[0176] 根据本发明的一些实施方式,诱导个体产生针对免疫原的免疫应答的方法包括,组合给予所述个体流感毒株H5N1 M2E-NP蛋白及其功能片段或其可表达的编码序列与编码本发明蛋白质的分离核酸分子和/或编码本发明蛋白质的重组疫苗和/或本发明蛋白质的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗。

[0177] 疫苗

[0178] 本发明提供了蛋白质和编码蛋白质的遗传构建物从而提供了改进的疫苗,所述蛋白质上的表位使它们成为能诱导针对它们的免疫应答的特别有效的免疫原。因此,可提供疫苗以诱导治疗性或预防性免疫应答。一些实施方式中,递送免疫原的方式是DNA疫苗、重组疫苗、蛋白质亚单位疫苗、包含免疫原的组合物、减毒疫苗或死疫苗。一些实施方式中,所述疫苗包含选自下组的组合:一种或多种DNA疫苗,一种或多种重组疫苗,一种或多种蛋白质亚单位疫苗,一种或多种包含免疫原的组合物,一种或多种减毒疫苗和一种或多种死疫苗。

[0179] 根据本发明的一些实施方式,本发明所述疫苗被递送给个体以调节个体免疫系统的活性从而增强免疫应答。当编码蛋白质的核酸分子被个体细胞摄取后核苷酸序列在细胞内表达从而将蛋白质递送到该个体。本发明的某些方面提供了利用核酸分子如质粒递送蛋

白质编码序列的方法,其作为其作为重组疫苗的一部分、作为减毒疫苗的一部分、作为分离的蛋白质或载体的蛋白质部分。

[0180] 根据本发明的一些方面,提供了预防性和/或治疗性免疫个体的组合物和方法。

[0181] DNA疫苗描述于美国专利号5,593,972;5,739,118;5,817,637;5,830,876;5,962,428;5,981,505;5,580,859;5,703,055;5,676,594及其引用的优先权申请,各份专利通过引用纳入本文。除了那些申请中描述的递送方法,递送DNA的其他方法描述于美国专利号4,945,050和5,036,006,它们通过引用纳入本文。

[0182] 本发明涉及利用重组载体来递送编码抗原的外源基因的改进的减毒活疫苗、改进的死疫苗和改进的疫苗、以及亚单位疫苗和糖蛋白疫苗。利用重组载体递送外源抗原的减毒活疫苗、亚单位疫苗和糖蛋白疫苗的例子描述于以下美国专利:4,510,245;4,797,368;4,722,848;4,790,987;4,920,209;5,017,487;5,077,044;5,110,587;5,112,749;5,174,993;5,223,424;5,225,336;5,240,703;5,242,829;5,294,441;5,294,548;5,310,668;5,387,744;5,389,368;5,424,065;5,451,499;5,453,364;5,462,734;5,470,734;5,474,935;5,482,713;5,591,439;5,643,579;5,650,309;5,698,202;5,955,088;6,034,298;6,042,836;6,156,319和6,589,529,它们通过引用纳入本文。

[0183] 当遗传构建物被细胞摄取时它可存留在细胞内作为功能性染色体外分子和/或整合入细胞的染色体DNA。DNA可被引入细胞并在其中作为一个或多个质粒形式的单独遗传物质。或者,可将能整合入染色体的线形DNA引入细胞。当将DNA引入细胞时可加入促进DNA整合入染色体的试剂。DNA分子中还可包含能有效促进整合的DNA序列。或者,可将RNA给予细胞。还考虑提供遗传构建物作为包含着丝点、端粒和复制起点的线形微染色体。基因构建物可作为生活在细胞内的减毒活微生物或重组微生物载体的遗传物质的一部分。基因构建物可作为重组病毒疫苗的基因组的一部分,所述疫苗的遗传物质整合入细胞的染色体或保留在染色体外。遗传构建物包含核酸分子基因表达所必需的调控元件。所述元件包括:启动子、起始密码子、终止密码子和聚腺苷化信号。此外,靶蛋白或免疫调节蛋白的编码序列的基因表达通常需要增强子。这些元件必须可操作地连接于编码所需蛋白质的序列,且调控元件在给予它们的个体内必须可操作。

[0184] 起始密码子和终止密码子通常被认为是编码所需蛋白质的核苷酸序列的一部分。然而,这些元件在给予基因构建物的个体内必须有功能。起始和终止密码子必须和编码序列在同一框内。

[0185] 采用的启动子和聚腺苷化信号在个体细胞内必须有功能。

[0186] 用于实施本发明,尤其用于制造人用遗传疫苗的启动子的例子包括但不限于:猿病毒40(SV40)启动子,小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子,人免疫缺陷病毒(MV)如BIV长末端重复(LTR)启动子,莫洛尼病毒、ALV、巨细胞病毒(CMV)如CMV立即早期启动子,EB病毒(EBV),劳斯肉瘤病毒(RSV)以及来自人基因如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和人金属硫蛋白的启动子。

[0187] 用于实施本发明,尤其用于制造人用遗传疫苗的聚腺苷化信号的例子包括但不限于SV40聚腺苷化信号和LTR聚腺苷化信号。具体地说,使用的是称为SV40聚腺苷化信号的pCEP4质粒的SV40聚腺苷化信号(加州圣地亚哥英杰公司(Invitrogen, San Diego CA))。

[0188] 除了DNA表达所需的调控元件,DNA分子中也可包含其他元件。这种其他元件包括

增强子。增强子可选自下组,但不限于此:人肌动蛋白,人肌球蛋白,人血红蛋白,人肌肉肌酸,以及病毒增强子如来自CMV、RSV和EBV的增强子。

[0189] 可给遗传构建物提供哺乳动物复制起点以维持构建物在染色体外并在细胞内制造多个构建物的拷贝。英杰公司(圣地亚哥,CA)的质粒pVAX1、pCEP4和pREP4含有EB病毒复制起点和核抗原EBNA-1编码区,其产生高拷贝附加型复制(high copy episomal replication)且没有整合。

[0190] 在一些涉及免疫应用的优选实施方式中,递送的是核酸分子,包括编码本发明蛋白质的核苷酸序列,此外,还包括进一步增强针对这种靶蛋白的免疫应答的蛋白质的基因。这种基因的例子是编码下述其他细胞因子和淋巴因子的基因: α -干扰素, γ -干扰素,血小板衍生生长因子(PDGF), $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$,GM-CSF,表皮生长因子(EGF),IL-1,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-10,IL-12,IL-18,MHC,CD80,CD86和IL-15,包括删除了信号序列并任选包含IgE信号肽的IL-15。可能有用的其他基因包括以下因子的编码基因:MCP-1,MIP-1 α ,MIP-1 β ,IL-8,RANTES,L-选择蛋白,P-选择蛋白,E-选择蛋白,CD34,GlyCAM-1,MadCAM-1,LFA-1,VLA-1,Mac-1,p150.95,PECAM,ICAM-1,ICAM-2,ICAM-3,CD2,LFA-3,M-CSF,G-CSF,IL-4,突变形式的IL-18,CD40,CD40L,血管生长因子,IL-7,神经生长因子,血管内皮生长因子,Fas,TNF受体,Flt,Apo-1,p55,WSL-1,DR3,TRAMP,Apo-3,AIR,LARD,NGRF,DR4,DR5,KILLER,TRAIL-R2,TRICK2,DR6,胱冬酶ICE,Fos,c-jun,Sp-1,Ap-1,Ap-2,p38,p65Rel,MyD88,IRAK,TRAF6,I κ B,灭活的NIK,SAP K,SAP-1,JNK,干扰素反应基因,NF κ B,Bax,TRAIL,TRAILrec,TRAILrecDRC5,TRAIL-R3,TRAIL-R4,RANK,RANK LIGAND,Ox40,Ox40LIGAND,NKG2D,MICA,MICB,NKG2A,NKG2B,NKG2C,NKG2E,NKG2F,TAP1,TAP2以及它们的功能片段。

[0191] 如果在任何情况下都不希望细胞接受遗传构建物则可加入其他元件作为破坏细胞的靶点。遗传构建物中可包含可表达形式的疱疹胸苷激酶(tk)基因。可在个体内引入药物刚昔洛韦(gancyclovir),该药物将选择性杀死任何产生tk的细胞,从而提供选择性破坏具有遗传构建物的细胞的方法。

[0192] 为使蛋白质产生最大化,可选择最适合在给予构建物的细胞内进行基因表达的调控序列。此外,可选择在细胞内最有效转录的密码子。本领域一般技术人员能够制造在细胞内有功能的DNA构建物。

[0193] 一些实施方式中,可提供其中的本文所述蛋白质编码序列与IgE信号肽相连的基因构建物。一些实施方式中,本文所述蛋白质连接于IgE信号肽。

[0194] 在使用蛋白质的一些实施方式中,例如,本领域一般技术人员能够利用熟知的技术制造和分离本发明的蛋白质。在使用蛋白质的一些实施方式中,例如,本领域一般技术人员能够利用熟知的技术将编码本发明蛋白质的DNA分子插入市售的熟知表达系统使用的表达载体。例如,市售质粒pSE420(英杰公司,圣地亚哥,加州)可用来在大肠杆菌内制造蛋白质。市售质粒pYES2(英杰公司,圣地亚哥,加州)可用于,例如,在酿酒酵母(*S.cerevisiae*)中进行制造。市售MAXBACTM完全杆状病毒表达系统(英杰公司,圣地亚哥,加州)可用于,例如,在昆虫细胞内进行制造。市售质粒pcDNA 1或pcDNA3(英杰公司,圣地亚哥,加州)可用于,例如,在哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞内进行制造。本领域一般技术人员可利用这些市售表达载体和表达系统或者其他载体和系统通过常规技术和容易获得的原料来制造蛋白质。(参见例如,Sambrook等,Molecular Cloning a Laboratory Manual(分子克隆实

验室手册),第二版,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press)(1989)通过引用将其纳入本文。)因此,可在真核和原核系统内制备所需蛋白质,从而得到众多经过加工的蛋白质形式。

[0195] 本领域一般技术人员可采用其他市售表达载体和系统或者采用熟知方法以及市售原料制造载体。含有必需的控制序列,如启动子和聚腺苷化信号并优选含有的增强子的表达系统容易得到并且现有技术中已知可用于各种宿主。参见例如,Sambrook等,分子克隆实验室手册,第二版,冷泉港出版社(1989)。遗传构建物包括操作性连接于在被构建物转染的细胞系内有功能的启动子的蛋白质编码序列。组成型启动子的例子包括来自巨细胞病毒或SV40的启动子。诱导型启动子的例子包括小鼠乳房白血病毒或金属硫蛋白启动子。本领域一般技术人员能够从市售原料方便地制造用于用编码本发明蛋白质的DNA转染细胞的遗传构建物。包含编码蛋白质的DNA的表达载体可用于转化相容宿主,然后在外源DNA能够表达的条件下进行培育和维持。

[0196] 从培养物中回收制得的蛋白质,可如本领域技术人员认为合适和已知的那样,通过裂解细胞或从培养基中回收。本领域一般技术人员可采用熟知的技术分离用这种表达系统制造的蛋白质。如上所述的用特异性结合特定蛋白质的抗体从天然来源纯化蛋白质的方法也可应用于纯化通过重组DNA法制造的蛋白质。

[0197] 除了通过重组技术制造蛋白质,自动肽合成仪也可用于制造分离的、基本纯的蛋白质。这种技术是本领域一般技术人员熟知的,并且如果衍生物中具有DNA编码蛋白质产物中没有的取代则是有用的。

[0198] 核酸分子可采用任何一种熟知技术来递送,其中包括DNA注射(也称为DNA接种)、重组载体如重组腺病毒、重组腺伴随病毒和重组牛痘。

[0199] 给药途径包括,但不限于,肌内、鼻内、腹膜内、真皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服途径,以及局部、透皮、通过吸入或栓剂或递送到粘膜组织,如通过灌洗递送到阴道、直肠、尿道、颊和舌下组织。优选的给药途径包括肌内、腹膜内、真皮内和皮下注射。施用遗传构建物的方法包括,但不限于,传统注射、无针注射装置、或“微粒轰击基因枪”。

[0200] 一些实施方式中,在将核酸分子递送到细胞的同时给予多核苷酸功能增强子或遗传疫苗易化剂(facilitator agent)。多核苷酸功能增强子描述于美国序列号5,593,972,5,962,428和1994/1/26提交的国际申请序列号PCT/US94/00899,它们通过引用纳入本文。遗传疫苗易化剂描述于1994/4/1提交的美国序列号021,579,通过引用将其纳入本文。与核酸分子联合给予的共试剂(co-agent)可作为与核酸分子的混合物给予或者可在的同时、之前或之后单独给予。此外,所述试剂可作为转染剂和/或复制剂和/或炎性剂并且可与GVF共同给予的其他试剂包括生长因子、细胞因子和淋巴因子如 α -干扰素, γ -干扰素,GM-CSF,血小板衍生生长因子(PDGF),TNF,表皮生长因子(EGF),IL-1,IL-2,IL-4,IL-6,IL-10,IL-12和IL-15以及成纤维细胞生长因子,表面活性剂如免疫刺激复合物(ISCOMS)、弗氏不完全佐剂、LPS类似物包括单磷脂酰脂质A(WL),胞壁酰肽,醌类似物和囊泡如鲨烯,透明质酸也可与遗传构建物联合给予。一些实施方式中,免疫调节蛋白质可用作GVF。一些实施方式中,将核酸分子和PLG同时提供以增强递送/摄取。

[0201] 本发明所述药物组合物包含约1纳克至约2000微克DNA。在一些优选实施方式中,本发明所述药物组合物包含约5纳克至约1000微克DNA。在一些优选实施方式中,所述药物

组合物含有约10纳克至约800微克DNA。在一些优选实施方式中,所述药物组合物含有约0.1-500微克DNA。在一些优选实施方式中,所述药物组合物含有约1-350微克DNA。在一些优选实施方式中,所述药物组合物含有约25-250微克DNA。在一些优选实施方式中,所述药物组合物含有约100-200微克DNA。

[0202] 本发明所述药物组合物按照用于给药的模式配制。当药物组合物是可注射的药物组合物时,它们是无菌、无热原和无颗粒的。优选采用等渗配方。通常,等渗添加剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇和乳糖。一些情况下,等渗溶液如磷酸缓冲盐水是优选的。稳定剂包括明胶和白蛋白。一些实施方式中,在制剂中加入了血管收缩剂。

[0203] 根据本发明的一些实施方式,提供了诱导免疫应答的方法。所述疫苗可以是基于蛋白质的活的减毒疫苗,细胞疫苗,重组疫苗或者核酸或DNA疫苗。一些实施方式中,诱导个体产生抵抗免疫原的免疫应答(包括诱导粘膜免疫应答)的方法包括组合给予个体CTACK蛋白、TECK蛋白、MEC蛋白质以及它们的功能片段或者它们的可表达的编码序列中的一种或多种与编码本发明蛋白质的分离核酸分子和/或编码本发明蛋白质的重组疫苗和/或本发明蛋白质的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗。CTACK蛋白、TECK蛋白、MEC蛋白质以及它们的功能片段中的一种或多种可在施用编码免疫原的分离核酸分子和/或编码免疫原的重组疫苗和/或包含免疫原的亚单位疫苗和/或活的减毒疫苗和/或死疫苗之前、同时或之后施用。一些实施方式中,编码一种或多种选自下组的蛋白质的分离核酸分子被施用于个体:CTACK、TECK、MEC以及它们的功能片段。

实施例

[0204] 实施例1

[0205] 材料和方法

[0206] HIV-1亚型B包膜序列。为产生HIV-1亚型B共有包膜序列,从GenBank中选出42种从11个国家收集的亚型B包膜基因序列以避免抽样偏差。各序列对应于不同的患者。所有序列都以非重组状态使用。

[0207] 多重比对。应用于系统发生研究的比对过程包括采用Clustal X(版本1.81)(Thompson,J.D.等1997,The ClustalX windows interface:flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools(ClustalX窗口界面:定性分析工具辅助的多系列比对的弹性策略).Nucleic Acids Research 25:4876-4882)。成对比对参数的设置遵照动态“慢-精确(slow-accurate)”程序,采用10作为空位开放罚分,0.1作为空位延伸罚分。多重比对参数包括空位延伸罚分为0.2。

[0208] HIV-1亚型B包膜共有序列的构建。HIV-1亚型B包膜共有核苷酸序列是在进行多重比对和较小最终手动调节后获得的。用推出的氨基酸序列来指导比对空位的引入从而将它们插入密码子之间。通过翻译共有核苷酸序列获得共有氨基酸序列。

[0209] 系统发生树。采用程序PAUP*4.0b10(Swofford,D.L.1999.PAUP*4.0:采用简约原则的系统发生分析(*以及其他方法),版本4.0b2a.马萨诸塞州森德兰SA公司(Sinauer Associates,Inc.,Sunderland,Mass.))利用相邻相接(NJ)法建立氨基酸的系统发生树。亚型D的两个额外序列(K03454和AAA44873)和亚型C的两个序列(AAD12103和AAD12112)用作寻根(rooting)的外类群(Kuiken,C.,B.T.Korber和R.W.Shafer.2003.HIV sequence

databases (HIV序列数据库) .AIDS Rev.5:52-61)。

[0210] HIV-1亚型B包膜共有序列的修饰。在获得HIV-1亚型B共有包膜序列后进行一些修饰:将超变的V1和V2区缩短,V3环设计成可供CCR5利用,除去C端的胞质尾区域,在N端加入前导序列和上游Kozak序列,用GeneOptimizer™ (基因艺术公司(GENEART),德国)进行密码子优化和RNA优化。

[0211] 包膜免疫原。编码修饰的HIV-1亚型B早期递质共有包膜糖蛋白(EY2E1-B)的基因由基因艺术公司合成和进行序列检验。合成的EY2E1-B用BamHI和NotI消化,克隆入巨细胞病毒立即早期启动子控制下的表达载体pVAX (英杰公司),该构建物被命名为pEY2E1-B。

[0212] 基本亚型B免疫原(EK2P-B)从人偏好密码子产生,基本亚型B分离物6101gp140包膜基因由M.Sidhm (惠氏(Wyeth))惠赠。基本上,通过除去天然前导序列和胞质尾使优化的6101包膜基因突变。然后设计正向和反向特异性引物来引入IgE-前导序列和Kozak序列: Env-F:5'-GTCGCTCCGCTAGCTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACC-3' (SEQ ID NO:13) Env-R: 5'-GGTCGGATCCTTACTCCACCACTCTCCTTTTGCC-3' (SEQ ID NO:14)。将纯化的PCR产物克隆入pVAX质粒载体,其也用EcoRI和XbaI线性化。该构建物命名为pEK2P-B。

[0213] 体内表达和EY2E1-B与单克隆抗体的反应性。在60mm平皿中使用FuGENE 6转染试剂(罗氏(Roche),德国)分别用3 μ g pEY2E1-B和pEK2P-B质粒转染人横纹肌肉瘤(RD)细胞(2x 10⁶)。转染48小时后细胞用1x PBS洗涤三次并用150 μ l裂解缓冲液(细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology))裂解。总蛋白质裂解物(50 μ g)用SDS-PAGE凝胶分级,转移到PVDF膜(爱默生公司(Amersham))。用包膜-特异性单克隆抗体2G12(美国马里兰州洛可维尔NARRRP公司(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program,Rockville, MD,USA))和单克隆抗-肌动蛋白抗体(西格玛奥尔德里奇公司(Sigma-Aldrich))进行免疫印迹分析并采用ECL™ Western印迹分析系统(爱默生公司)用HRP-偶联的羊抗人IgG(西格玛奥尔德里奇公司)显像。肌动蛋白用作Western印迹的加样对照。

[0214] 为检测EY2E1-B与单克隆抗体的反应性,转染得到的总蛋白质裂解物(100 μ g)用5 μ g包括2G12、4G10和ID6在内的包膜-特异性单克隆抗体(美国马里兰州洛可维尔NARRRP公司)免疫沉淀。相同量的空载体pVAX转染细胞的总蛋白质裂解物用作阴性对照。免疫沉淀的蛋白质用SDS-PAGE凝胶分级并按上述通过Western印迹检测。

[0215] 间接免疫荧光试验。进行间接免疫荧光试验以证实EY2E1-B和EK2P-B基因的表达。将人横纹肌肉瘤(RD)细胞铺于有隔室的组织培养载玻片(BD生物科技公司(BD Biosciences)),密度为在含10%FBS(吉比可公司(GIBCO))的完全DMEM培养基中于第二天达到60-70%汇合,并使其贴壁过夜。第二天用pEY2E1-B、pEK2P-B和对照质粒pVAX(1 μ g/孔)转染细胞,转染采用FuGENE6转染试剂(罗氏)按照制造商的说明进行。转染48小时后,细胞用冷的1xPBS洗涤两次并用甲醇在载玻片上固定15分钟。除去载玻片上的残余溶剂,将细胞与抗-小鼠HIV-1 env单克隆F105(美国马里兰州洛可维尔NARRRP公司)一起培育90分钟。载玻片然后用TRITC-偶联的第二抗体(西格玛奥尔德里奇公司)培育45分钟。在第二抗体溶液中加入4',6-二氨基-2-苯基吡啶盐酸盐(西格玛奥尔德里奇公司)复染细胞核以显示预定视野中看到的所有细胞的细胞核。载玻片用含有抗衰减剂(分子探针公司(Molecular Probes))的固定培养基固定。图像利用荧光显微术的Phase 3 Pro程序(MC公司(Media Cybernetics))进行分析。

[0216] 包膜-特异性抗体的测定。在免疫小鼠和对照小鼠中通过ELISA (酶联免疫吸附试验) 测定包膜特异性IgG抗体。Nunc-Immuno™平板 (纽约罗彻斯特NNI公司 (Nalge Nunc International, Rochester, NY)) 分别用1μg/ml进化支B重组HIV-1 IIIB糖蛋白可溶性gp160 (免疫诊断公司 (Immuno Diagnostics), 马萨诸塞州)、进化支A/E基本包膜蛋白HIV-1 93TH975 gp120和进化支C基本包膜蛋白HIV-1 96ZM651 gp120 (美国马里兰州洛可维尔NARRRP公司) 包被, 然后室温培育过夜。将平板洗涤之后用3% BSA的PBST溶液 (1x PBS+0.05%吐温-20) 在37℃封闭1小时。然后再次洗涤平板并用3% BSA的PBST溶液稀释的小鼠特异性血清在4℃培育过夜, 然后用1/10,000稀释的HRP-偶联的羊抗-小鼠IgG (宾西法尼亚州西格鲁弗杰克逊免疫研究公司) Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)) 在37℃培育1小时。反应用底物TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) (西格玛奥尔德里奇公司) 显色。在每孔加入100μl 2.5M硫酸终止反应并在450nm OD下在EL808平板阅读器 (生物技术仪器公司 (Biotech Instrument Inc.)) 上阅读平板。

[0217] 小鼠的免疫。雌性4-6周龄BALB/c小鼠购自缅因州巴港的杰克逊实验室 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)。转基因B6.Cg-Tg (HLA-A/H2-D) 2Enge/J小鼠繁殖对购自杰克逊实验室并在我们的实验室内由Michelle Kutzler博士饲养。这些转基因小鼠表达种间杂交I类MHC基因, AAD, 其含有人HLA-A2.1基因的α-1和α-2区和小鼠H-2Dd基因的α-3跨膜区和胞质区, 并受人HLA-A2.1启动子指导。小鼠α-3区的表达增强了该系统的免疫应答。与未修饰的HLA-A2.1相比, 嵌合的HLA-A2.1/H2-Dd MHC I类分子介导小鼠T细胞的有效正选择以提供能够识别HLA-A2.1 I类分子呈递的肽的更加完全的T细胞组分。就HLA-A2.1 I类分子而言, 呈递并被小鼠T细胞识别的肽表位与HLA-A2.1+人上呈递的那些表位相同。雌性4-6周龄转基因小鼠用于下述进一步的研究。按照国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 和宾西法尼亚大学护理和应用委员会 (University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee) (IACUC) 的指导方针进行动物护理。各小鼠以两周为间隔肌内免疫三次, 每次100μg DNA。每组3只小鼠, 对照组接种pVAX DNA。第三次免疫接种1周后杀死小鼠并在无菌条件下取出脾脏。收集脾细胞并重悬于RBC裂解缓冲液以除去红细胞。裂解之后将同一组的脾细胞汇集在一起并重悬于含10% FBS的RPMI 1640培养基。对细胞计数并准备进行分析。

[0218] IFN-γELISpot试验。采用高-蛋白质结合IP 96孔Multiscreen™平板 (美国马萨诸塞州贝德福德Millipore公司)。平板在4℃用稀释于1XPBS的小鼠IFN-γ的mAb (明尼苏达州明尼阿波利斯R&D系统公司 (R&D Systems, Minneapolis, MN)) 包被过夜。平板用PBS洗涤三次, 然后室温下用添加了1% BSA和5% 蔗糖的1XPBS封闭2小时。在加样孔中一式三份加入小鼠脾细胞, 每孔 2×10^5 个细胞, 重悬于完全培养基 (添加了10% FBS和抗生素的RPMI 1640)。从NARRRP公司获得六组肽, 每个肽含15个氨基酸残基, 其中有11个氨基酸重叠, 代表了HIV-1亚型B、亚型C、M组以及HIV-1 MN (亚型B分离物)、HIV-1 C.UY.01.TRA3011和C.ZA.01.J54Ma (两种亚型C分离物) 包膜完整蛋白质序列的所有蛋白质共有序列。每组env肽作为特异性刺激IFN-γ释放的抗原以2μg/ml/肽的浓度集中到4个库。5g/ml的伴刀豆球蛋白A (Concavalin A) (西格玛奥尔德里奇公司, 圣路易斯, 密苏里州) 以及完全培养基分别用作阳性和阴性对照。平板在37℃、5% CO₂气氛培养箱内孵育24小时, 然后洗涤四次。然后加入生物素化的抗-小鼠IFN-γ检测抗体并将平板在4℃培育过夜。洗涤平板, 然后按照制造商

的说明(ELISPOT蓝色模块(ELISPOT Blue Color Module),R&D系统公司,明尼阿波利斯,明尼苏达州)显色。将平板空气干燥并用ELISPOT自动阅读系统(俄亥俄州克利夫兰CTL分析仪器公司(CTL Analyzers,Cleveland,OH))和ImmunoSpot®软件对斑点计数。斑点形成细胞(SFC)的平均数目调节为 1×10^6 脾细胞以供数据展示。ELISpot试验通过三次独立试验重复三次。

[0219] CD8⁺ T-细胞耗尽研究。按照制造商的说明,用CD8抗体包被的免疫磁珠(纽约州成功湖戴纳生物科技有限公司(Dynal Biotech Inc.,Lake Success,NY))耗尽脾细胞中的CD8淋巴细胞。耗尽CD8⁺ T-细胞后按照上述进行IFN- γ ELISpot试验。

[0220] 表位绘图研究。为绘制反应性表位图谱,将两组肽集中到29个库,每个库分别有14-15各肽,其中每个肽含15个氨基酸残基,有11个氨基酸重叠,代表了HIV-1共有亚型B和HIV-1 MN所有包膜蛋白,并按照上述进行IFN- γ ELISpot试验。29组种不同的集中刺激物用于有助于表位绘图的矩阵试验(matrix assay)。

[0221] 统计学分析。采用斯氏成对t检验比较用pEY2E1-B和pEK2P-B免疫的小鼠之间的细胞免疫应答。在该研究中, $p < 0.05$ 被认为在统计学上显著的。

[0222] 结果

[0223] 新的基于亚型B早期递质共有序列的包膜基因的构建和设计。HIV-1亚型B的共有序列产生自从GenBank获得的42种亚型B序列。如图1中所总结的,产生共有序列之后进行了一些修饰。简言之,为制造模拟粘膜传递病毒的HIV-1包膜的CCR5-趋向形式,根据早期递质分离物的序列设计出了V3环内的6个重要氨基酸。此外,V1环内的10个氨基酸和V2环内的1个氨基酸也被从共有序列中删除。在起始密码子上游的框内融合入高度有效的前导序列以助于表达。保持跨膜区完整以易于表面表达并保持切割位点完整以获得正确的折叠以及宿主蛋白酶对包膜蛋白的切割。除去胞质尾以防止包膜再循环以及促进更加稳定且更高的表面表达(Berlitz-Torrent,C.等1999.人和猿逆转录病毒跨膜蛋白的胞质区与网格蛋白连接复合体的相互作用能调节包膜糖蛋白在细胞内和细胞表面的表达(Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins).J.Virol.73:1350-1359; Bultmann,A.等.2001.人免疫缺陷病毒1型包膜糖蛋白胞质尾内的抑制细胞表面表达的两个序列的鉴定(Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression).J.Virol.75:5263-5276)。此外,为以较高水平表达,该基因采用的密码子符合智人基因的密码子偏好(Andre,S.等B.1998.采用使用优化密码子的合成gp120序列的DNA疫苗能引发增强的免疫应答(Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage).J.Virol.72:1497-503;Deml,L.等2001.密码子优化对编码人免疫缺陷病毒1型gag蛋白的候选DNA疫苗的表达和免疫原性的多重影响(Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein).J.Virol.75:10991-11001)。此外,还进行了RNA优化(Schneider,R.等.1997.人免疫缺陷病毒1型抑制元

件的失活导致Gag和Gag/蛋白酶不依赖于Rev表达和颗粒形成(Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation). J.Virol.71:4892-4903):避免GC含量非常高(>80%)或非常低(<30%)的区域以及顺式作用序列基序,如内部TATA盒、chi位点和核糖体进入位点。构建了合成的工程改造EY2E1-B基因,其长度为2734。将EY2E1-B基因亚克隆入pVAX的BamHI和NotI位点供进一步研究。

[0224] 系统发生分析。为评估随机取样的包膜亚型B序列与EY2E1-B序列的距离分布,进行了系统发生分析。如图2所示,观察到EY2E1-B序列与所有取样序列都相对靠近。与基本分离物EK2P-B序列相比,EY2E1-B序列具有相当的相似性评分分布(表1)。EY2E1-B的平均相似性百分比评分为85.7%,EK2P-B为79.4%。

[0225] 表1

[0226]		平均相似性百分比评分	相似性百分比评分范围
	EY2E1-B	85.7	92.1-79.6
	EK2P-B	79.4	86.3-73.9

[0227] 表1。潜在候选包膜疫苗与亚型B包膜序列的排列对比的相似性百分比评分平均值和范围。

[0228] EY2E1-B的体内表达和抗原测定。为检测pEY2E1-B和pEK2P-B的体内表达,按照材料和方法部分所述用这些质粒转染RD细胞。转染后提取细胞裂解物的总蛋白并用材料和方法部分提到的包膜-特异性单克隆抗体2G12进行免疫印迹以检测pEY2E1-B的表达。Western印迹结果表明,这两种构建物表达包膜蛋白(图3A)。检出的包膜蛋白约120KD。表2显示了pEY2E1-B和pEK2P-B的比较。

[0229] 表2

[0230]		共有/基本	早期递质	密码子优化	RNA优化	IgELS	胞质尾
	EY2E1-B	共有	是	是	是	是	否
	EK2P-B	基本	否	是	是	是	否

[0231] 为测定抗原表位,用三种不同gp120-特异性抗体2G12、4G10和ID6免疫沉淀来自RD细胞裂解物的表达的包膜蛋白。免疫沉淀之后进行Western印迹以检测免疫沉淀的蛋白质。我们的结果显示,合成的免疫原能够结合抗体2G12和ID6,但不结合4G10。由于抗体2G12中和许多基本分离物并与构象和依赖于碳水化合物的gp120表位反应,且抗体ID6结合gp120和gp160并直接针对gp120的前204个氨基酸,我们的结果提示,合成的工程改造免疫原EY2E1-B有可能折叠成相对天然的构象并保存一些天然抗原表位。此外,由于抗体4G10是识别LAI gp160(一种T细胞系适应株)的HIV-1LAI/BRU V3单克隆抗体,我们的数据提示,这种合成包膜不利用共同受体CXCR4。

[0232] 为进一步证实表达和测定抗原表位,采用转染的RD细胞进行了间接免疫荧光试验。在荧光显微镜下观察到pEY2E1-B和pEK2P-B转染细胞内有高特异性表达。该试验采用与不连续的或构象gp120表位反应的HIV-1 env单克隆F105。如图3B所示,表达Env蛋白的转染细胞显示出典型的罗丹明荧光,再次提示合成蛋白被表达并具有相对天然的构象。作为对照,在pVAX转染的RD细胞内未检测到这种表达。

[0233] 体液应答的诱导。为检测合成的免疫原能否引发高效价包膜-特异性抗体反应,收

集pVAX、pEY2E1-B和pEK2P-B免疫的Ba1B/C小鼠的血清并进行ELISA。如图4所示,我们观察到与pEK2P-B免疫小鼠相比,从pEY2E1-B免疫小鼠收集的血清具有相对较高水平的进化支B包膜-特异性抗体应答。相反,仅用载体免疫的小鼠未产生特异性抗体应答。然而,在注射pEY2E1-B和pEK2P-B的小鼠中未观察到针对进化支A/E和进化支C蛋白质的任何可检测抗体应答(图4B和4C),表明尽管基于合成共有序列的免疫原具有相对天然的构象并保存了天然抗原表位,但它可能不能诱导较宽的进化支间抗体免疫应答。

[0234] 通过ELISpot检测强且宽的细胞免疫应答。Ba1B/C小鼠用pEY2E1-B和pEK2P-B免疫并进行ELISpot分析以测定响应来自HIV-1共有亚型B蛋白质的四种肽库的抗原特异性IFN- γ 分泌细胞的数目(图5A)。通过每百万细胞中斑点形成单位(SFU)的数目测得的pEY2E1-B免疫小鼠的反应幅度在27.5和520之间。相比,pEK2P-B接种小鼠的脾细胞显示出的幅度仅为2-237.5($p<0.05$)。所有四种肽库在pEY2E1-B免疫小鼠中的SFU数/百万脾细胞的加和频率为1976.25+260,而pEK2P-B免疫小鼠的SFU数/百万细胞为519+45。pVAX载体免疫小鼠的细胞被用作阴性对照,共有包膜B肽集合仅显示有60+5SFU/百万脾细胞($p<0.05$)。我们在三项独立研究中观察到类似的结果。因此,pEY2E1-B构建物在驱动细胞介导的免疫应答方面的功效最多达到4倍。我们还检测了CD8+淋巴细胞是否负责在pEY2E1-B免疫的Ba1B/C小鼠中检测到的IFN- γ 分泌。如图5B所述,耗尽CD8+后SFU数/百万细胞降至127.5+11,表明通过耗尽CD8+ T-细胞的ELISpot观察到的IFN- γ 生成细胞的频率降低了约90%。pEY2E1-B诱导的IFN- γ 生成主要由CD8+ T-细胞介导。

[0235] 此外,为建立人T细胞对HLA-A2呈递抗原的免疫应答模型以及鉴定那些抗原,我们用转基因HLA-A2.1/H2-Dd小鼠进行了与上述相同的ELISpot试验。如图5C所示,所有四种肽库在pEY2E1-B免疫转基因小鼠中的SFU/百万脾细胞加和频率为2362+257,而pEK2P-B免疫转基因小鼠的SFU数/百万细胞仅为493+57。这些结果表明,pEY2E1-B构建物在驱动转基因小鼠细胞介导的免疫应答方面的功效最多达到4倍。耗尽CD8后得到的ELISpot数据提示,pEY2E1-B诱导的IFN- γ 生成主要由CD8+ T-细胞介导(图5D)。

[0236] 此外,我们感兴趣的是进一步详细了解在ELISpot试验中观察到的细胞免疫应答。因此,针对跨越共有亚型B包膜蛋白的肽文库进行另一组ELISpot试验。该绘图研究采用完整的一组15聚肽,其中有11个氨基酸重叠,包含亚型B共有包膜蛋白。该研究表明,合成包膜未诱导出明显的优势表位。然而,对pEY2E1-B-免疫Ba1B/C小鼠所衍生出的脾细胞进行IFN- γ ELISpot分析显示,有29个库中有18个显示出斑点超过50,而pEK2P-B免疫Ba1B/C小鼠仅有6个库(图5E)。这些结果表明,EY2E1-B免疫原诱导的细胞免疫应答的宽度(breadth)和幅度(magnitude)明显增加。

[0237] pEY2E1-B诱导的强交叉反应性细胞免疫应答。为测定EY2E1-B免疫原是否能诱导宽的和交叉反应性细胞免疫应答,用HIV-1群M、共有亚型C、HIV-1MN(亚型B分离物)、HIV-1C.UY.01.TRA3011和C.ZA.01.J54Ma(两种亚型C分离物)包膜肽对Ba1B/C和HLA-A2转基因小鼠进行IFN- γ ELISpot。这些试验可进一步测定5A、C和E中观察到的结果是否仅与肽靶相关或者实际上是由于免疫宽度的增加。如图6A所示,pEY2E1-B免疫Ba1B/C小鼠中HIV-1 MN包膜肽四种集合的SFU数/百万脾细胞总和为1855+215.8,该值约为pEK2P-B免疫Ba1B/C小鼠的两倍(SFU/百万脾细胞为700+168.2),表明在亚型B内pEY2E1-B比pEK2P-B有更强的交叉反应性。pEY2E1-B免疫Ba1B/C小鼠中,对HIV群M(图6B)和亚型C(图6C)共有包膜肽四种库

刺激起反应的IFN- γ 斑点数目分别为1150+191.3和715+116.1。而pEK2P-B免疫Ba1B/C小鼠中针对群M和亚型C肽的斑点数目为635+152.3和345+82.3,这些数据表明,在Ba1B/C小鼠内,pEY2E1-B引发的进化支交叉免疫应答比pEK2P-B诱导的免疫应答强约45%。

[0238] 重要的是,我们在转基因小鼠内观察到由pEY2E1-B诱导的更强的交叉反应性细胞免疫应答(图6F-J)。pEY2E1-B免疫转基因小鼠中针对四种HIV-1 MN包膜肽库的SFU数/百万脾细胞总和为1087+153,该值是pEK2P-B免疫HLA-A2小鼠的约三倍(SFU/百万脾细胞为316+63)(图6F),表明在转基因小鼠中pEY2E1-B也能引发比亚型B内的pEK2P-B更强的交叉反应性。pEY2E1-B免疫转基因小鼠中,对用四种HIV群M(图6G)和亚型C(图6H)共有包膜肽库刺激起反应的IFN- γ 斑点数目分别为2116+216和893+154。而pEK2P-B免疫转基因小鼠中针对群M和亚型C肽的斑点数目为473+50和266+55,这些数据表明,在转基因小鼠内,pEY2E1-B引发的进化支交叉免疫应答比pEK2P-B诱导的免疫应答强约3-4倍。此外,可作为严格对照以评价其他肽组得到的宽度和交叉反应性的两种亚型C分离物肽组被用来进一步测定交叉进化支C免疫应答。尽管pEY2E1-B和pEK2P-B在Ba1B/C小鼠内引发的针对这两种亚型C分离物组的交叉反应性没有太大差异(图6D和E),但pEY2E1-B诱导的针对这两种亚型C分离物组的交叉进化支反应性比pEK2P-B约强三倍(图6I和J)。在pEY2E1-B免疫转基因小鼠中,针对C.ZA.01.J54Ma和C.UY.01.TRA3011肽的斑点数为1080+206和890+150,而在pEK2P-B免疫转基因小鼠中仅为305+38和310+62。

[0239] 最后,我们通过详细了解在Ba1B/C和HLA-A2转基因小鼠中观察到的针对HIV-1 MN的细胞免疫应答测定了EY2E1-B免疫原诱导的针对亚型特异性靶的交叉反应性细胞免疫应答的宽度是否也有增加。对跨越亚型B MN包膜蛋白的肽文库进行表位绘图试验。结果提示,合成包膜在两种小鼠品系中均未诱导显著的优势表位。然而,对pEY2E1-B-免疫Ba1B/C小鼠衍生出的脾细胞进行IFN- γ ELISpot分析显示,29个库中有14个显示出斑点超过50,而pEK2P-B免疫Ba1B/C小鼠仅有9个库(图7A)。类似地,在转基因小鼠内,pEY2E1-B免疫转基因小鼠中,29个库中有18个库显示出斑点超过50,而pEY2P-B免疫转基因小鼠仅有6个库(图7B)。这些数据表明,在Ba1B/C和HLA-A2转基因小鼠中,EY2E1-B免疫原诱导的交叉反应性细胞免疫应答的宽度和幅度明显增加。

[0240] 讨论

[0241] 世界范围内HIV-1DNA疫苗研究的指导原则是HIV-特异性T-细胞应答一定程度上有助于保护免于感染或控制感染后复制。DNA疫苗可影响病毒复制,尽管它们的免疫诱导功能通常不如减毒的活病毒载体(Almond,N.等.1995.用减毒的猿免疫缺陷病毒免疫猕猴以抵抗病毒感染细胞的攻击(Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells).Lancet 345:1342-1344;Berman,P.W.等1996.用MN-rgp120免疫黑猩猩以抵御人免疫缺陷病毒1型基本分离物的异源感染(Protection of MN-rgp120-immunized chimpanzees from heterologous infection with a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1).J Infect Dis173:52-9;Boyer,J.等1997.用DNA疫苗保护黑猩猩抵御高剂量异源HIV-1攻击(Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1challenge by DNA vaccination).Nat Med 3:526-532;Daniel,M.C.等1992.nef基因缺失的活的减毒SIV疫苗的保护作用(Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a

deletion in the nef gene). *Science* 258:1938-1941)。因此以提高细胞免疫应答宽度和幅度为目的的方法是重要的。本发明提供了一种采用免疫原若干特征的新型抗原,所述特征已作为单独研究在文献中报道过,但之前从未将其与一种疫苗模态组合。为证实这一观点,开发了基于合成的工程改造共有序列的包膜免疫原,并与优化的基本序列免疫原比较诱导了细胞介导的免疫应答的能力。表达数据显示,这种工程改造的新包膜基因可在哺乳动物细胞系内有效表达,尽管这两种免疫原的表达水平非常类似(图3A)。我们在免疫原性研究中观察到,这种功能性免疫原诱导的细胞免疫应答与基本包膜疫苗相比显示多样性和幅度提高。从BalB/C和HLA-A2转基因小鼠获得的表位绘图数据都证实,这种多样性和幅度的提升在这些单元型之间得以维持。为进一步证实该发现,我们还开发了基于共有序列的亚型C包膜免疫原并将其与基本亚型C免疫原进行比较,基于合成的共有序列的亚型C包膜免疫原相比基本亚型C免疫原再次显示细胞免疫应答多样性和幅度提高(未公布数据)。

[0242] 从疫苗设计策略观点来看,候选疫苗与感染或竞争病毒之间的序列同源性可能是需要着重考虑的。尽可能降低疫苗株与对应循环病毒之间的序列不相似性程度的有效方法是产生作为这些病毒“核心”的人工序列。设计这种序列的一种方法是使用衍生自在比对的每个位置都最常见的氨基酸的共有序列。在该研究中,我们开发了一种基于共有序列的亚型B包膜疫苗并认为该合成免疫原将具有较高交叉反应性。我们的结果的确显示pEY2E1-B疫苗诱导的细胞免疫应答存在多样性。Balb/c和转基因小鼠的肽绘图结果也都显示,EY2E1-B免疫原使免疫应答变宽。此外,交叉反应性细胞免疫应答研究结果显示,pEY2E1-B能引发明显较强且较宽的交叉反应性细胞免疫应答。因此,人工共有包膜免疫原含有比任何天然单个分离物中的表位更加保守的表位并能诱导较宽的进化支间CTL反应。

[0243] 理论上共有序列具有优点和缺点。由于共有序列是基于同期分离物生成的,因此与任何给定的天然病毒分离物相比它在遗传上可能更接近目前的循环病毒株。然而,由于通常对慢性感染期间取样的病毒而不是急性感染期间取样的病毒进行全局测序,开发对于大多数曾经避开部分的表位的共有疫苗应答可能是一种缺点。为尽可能减少这一缺点,一种有用的疫苗设计方法可能会考虑早期递质序列。由于HIV-1包膜基因超变区是通过快速插入和删除而非点突变产生的,因此包膜蛋白是最难人工构建的HIV蛋白之一。超变区长度的差异使得难以从这些区域产生共有序列。最近,Gao等(Gao,F.,E等.2005.合成的人免疫缺陷病毒1型群M共有包膜糖蛋白的抗原性和免疫原性(Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein). *J Virol* 79:1154-63)产生了群M共有包膜序列,然而,来自CRF08_BC重组株相应区域的非共有序列被用于这些可变区。研究已经证实,编码具有较短V1、V2和V4区的包膜糖蛋白的亚型C病毒传递到受者的频率明显高于预期的偶然频率。早期感染得到的亚型A包膜序列也具有明显较短的V1和V2环序列和较少的潜在的N-连接的糖基化位点(Chohan,B.,D.等2005.选择某些遗传亚型传递期间出现的并和影响病毒RNA水平的具有较短V1-V2环序列的人免疫缺陷病毒1型包膜糖基化变体(Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels). *J.Virol.*79:6528-6531)。相反,最近传递的亚型B变体不具有较短的V1和V2环。然而,要注意亚型B感染病例主要是同性传递或药物

注射的结果,这可能是重要的。此外,研究提示,具有紧凑V1、V2区的可能的功能后果是提高CD4结合区接触,从而增强对中和的易感性(Edwards,T.G.等2001.人免疫缺陷病毒1型包膜蛋白中CD4独立性、中和作用敏感性以及接触CD4-诱导表位之间的关系(Relationships between CD4independence,neutralization sensitivity,and exposure of a CD4-induced epitope in a Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope protein).J.Virol.75:5230-5239;Kolchinsky,P.等2001.不依赖于CD4的人免疫缺陷病毒变体的中和作用敏感性提高(Increased neutralization sensitivity of CD4-independent Human Immunodeficiency Virus variants).J.Virol.75:2041-2050;Pickora,C.等2005.鉴定在除去之后能增强可溶性CD4敏感性的猿免疫缺陷病毒糖蛋白核心内的N-连接糖基化位点(Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4).J.Virol.79:12575-12583;Puffer,B.A.等.2002.猿免疫缺陷病毒Envs的CD4独立性与巨噬细胞向性、中和作用敏感性和减毒的病原性相关(CD4 independent of Simian Immunodeficiency Virus Envs is associated with macrophage tropism,neutralization sensitivity,and attenuated pathogenicity).J.Virol.76:2595-2605)。当制造亚型B共有序列时我们截短了V1和V2区。

[0244] HIV-1感染的早期阶段受非-合胞体-诱导(NSI)病毒控制,该病毒缓慢复制并使用CCR5作为它们的主要共同受体。合胞体-诱导(SI)病毒在CD4细胞衰退加速和感染的进行性临床进程前出现在约50%的受感染个体中,其使用CXCR4作为主要共同受体。已证实所有亚型都存在HIV变体对共同受体的差异应用。亚型C病毒似乎不同于大多数其他亚型,因为常有报道称亚型C中使用CXCR4的HIV变体较少。因此,CCR5的利用应成为疫苗设计中一个非常关键的考虑因素。之前的报道显示,gp120的V3区在共同受体利用中扮演重要角色。V3环内的6个残基已被鉴定为CCR5相互作用的关键残基:精氨酸307,赖氨酸314,异亮氨酸316,精氨酸322,苯丙氨酸324和丙氨酸337。然而,基于亚型C早期递质的序列,第322位的残基应是谷氨酰胺而非精氨酸。总之,之前的研究显示CCR5利用重要残基和早期递质序列,基于此,我们设计出了能驱动理论上以CCR5利用为目标的免疫应答的亚型B共有包膜免疫原。

[0245] 为最大化潜在交叉反应性,已经产生了HIV-1群M共有包膜序列。然而,与循环病毒相比,亚型-特异性包膜共有疫苗可能至少在细胞免疫应答水平上损害了疫苗抗原的整体序列相似性。研究已经显示在亚型B和C包膜蛋白的不同区域内鉴定到的高选择率。其原因可能是对亚型B和C包膜蛋白不同区域的不同免疫压力。因此,使用亚型-特异性包膜疫苗可能是有利的,这是由于对疫苗和循环病毒的免疫应答将共享抗原性区域。需要进行更多实验来比较群M和亚型-特异性包膜疫苗以进一步阐明这一观点。

[0246] 有关使用共有序列的另一个重要内容是,其序列可能与任何天然病毒中未发现的组合多态性有关,从而可能导致不正确的蛋白质构象。之前的研究显示,群M共有免疫原可折叠成天然构象,保留包膜抗原表位并引发弱中和抗体反应。基于合成蛋白质能够结合抗体2G12、ID6和F105的事实,我们认为pEY2E1-B可能在一定程度上具有天然结构构象。重要的是,我们的数据也证实,EY2E1-B免疫原可诱导高效价的亚型B包膜-特异性抗体,表明这种合成免疫原也可保留更多II类表位。该领域需要进行更多研究。

[0247] 随着新HIV-1疫苗方法的产生,用临床前模型预测这些疫苗在人类中的功效的需

求也不断增加。在我们的研究中,采用HLA-A2转基因小鼠来研究这种合成免疫原引发的细胞免疫应答。研究显示,这种转基因品系是涉及最佳刺激人CD8+溶细胞T细胞的感染性疾病疫苗的设计和检测的重要临床前模型。该模型的结果表明,EY2E1-B比EK2P-B能引发更宽、更强的细胞免疫应答,提示这种新的疫苗能更有效的诱导HLA-A2-限制性细胞应答。正在计划在非人灵长类中进一步研究这种免疫原中。

[0248] 总之,我们的结果提示,EY2E1-B可作为免疫原,它能作为DNA疫苗盒同时提高CTL应答的幅度和宽度。更全面的说,这种构建物可用于其他平台,从而在非DNA载体方案中诱导更强且更宽的抗HIV毒株的细胞免疫应答。

[0249] 实施例2能增强引发的细胞免疫应答的多样性和宽度的新型工程改造HIV-1进化支C包膜DNA疫苗的开发

[0250] 强HIV-1特异性CTL应答的一个重要作用是管理急性和无症状感染期间的病毒载量。然而,进来对共有免疫原的研究无法显著证实改进的细胞免疫应答。这里,我们测试了用于改进的细胞免疫应答的基于新型工程改造进化支C共有序列的包膜免疫原。这种新型疫苗(pEY3E1-C)产生自HIV-1进化支C共有包膜序列。进行的一些修饰包括缩短基于早期递质序列的高变V1和V2区,保留供CCR5使用的V3环,除去C末端的胞质尾区域以防止包膜再循环,以及保留切割位点和TMD以供正确折叠。同时在N末端加入IgE前导序列。这种共有DNA疫苗也经过RNA优化和密码子优化。通过ELISpot和表位绘图试验研究BalB/C小鼠的细胞免疫应答。当作为DNA疫苗研究时,与pEK3P-C(衍生自进化支C env的基本分离物)相比,我们的构建物(pEY3E1-C)能更加有效地驱动细胞免疫应答。当用共有进化支C肽刺激时pEY3E1-C引发的细胞免疫应答幅度大于pEK3P-C。此外,当用同样来自于进化支C的其他两组基本分离物肽刺激时,共有免疫原引发细胞免疫应答幅度增加。除了幅度增加,在对两组基本分离物肽的反应中,pEY3E1-C能够在29个库中诱导至少15个强反应性肽库(具有超过50个斑点/百万脾细胞),而pEK3P-C仅在29个库中诱导3个和9个有强反应性的库(根据它们的唯一性和作为评价宽度的严格对照的能力进行选择)也支持CTL反应宽度增加。此外,当用进化支B肽刺激时pEY3E1-C引发较强的交叉进化支细胞免疫应答。共有免疫原pEY3E1-C作为DNA疫苗盒能同时增强的CTL反应的幅度和宽度,提示共有免疫原作为HIV疫苗混合物中一种组分的潜能值得进一步检验。

[0251] 由于现有毒株的宽遗传多样性、快速突变和重组,产生有效疫苗的难度非常大。衍生自单个分离物的候选DNA疫苗不能保护抵御各种HIV-1循环毒株所需的交叉反应性。此外,已经报道表达HIV-1包膜糖蛋白的DNA疫苗免疫原性不是非常强。

[0252] 我们已经采用多阶段策略来提高DNA疫苗引发的CTL反应的效力以便尽可能提供针对病毒循环毒株的保护。

[0253] 最近的研究已显示,共有免疫原能克服HIV-1病毒快速进化产生的多样性障碍。

[0254] Derdeyn等发现,V1-V4区较短是早期传递亚型C病毒的特征,我们的构建物设计成具有这一特征,这可能有助于产生早期传递病毒导致的免疫应答。

[0255] 此外,我们的DNA疫苗的表达水平通过密码子优化、RNA优化以及免疫球蛋白前导序列的加入得到增强。

[0256] 已显示HIV-1特异性CTL反应对于控制急性和无症状感染期间的病毒载量以及AIDS的发展是重要的,因此下面的数据关注的是我们的新型免疫原引发的CTL反应。

[0257] 图13描绘了免疫原设计,其用于开发能增强引发的细胞免疫应答的多样性和宽度的新型工程改造HIV-1进化支C包膜DNA疫苗。

[0258] 图14显示了系统发生关系:该系统发生分析中包括36种HIV-1亚型C包膜序列、EY3E1-C、EK3P-C、两种亚型B、一种亚型A和一种亚型D序列(外类群。代表宽样品多样性的亚型C包膜序列来自12个国家。

[0259] 表3显示了可能的包膜候选疫苗与亚型C包膜序列比对之间相似性百分比评分的平均值和范围。

[0260] 表3

[0261]

	%相似性评分平均值	%相似性评分范围
pEY3E1-C	85.3	82.7-93.1
pEK3P-C	87.4	83.6-90.2

[0262] 三组Balb/C小鼠用100 μ g DNA免疫三次,每次免疫接种间隔两周。在第7周收获脾脏进行细胞研究。

[0263] 如图15A和B所示,pEY3E1-C引发强烈的细胞应答。

[0264] 图16显示了pEY3E1-C引发的强且宽的细胞应答。当用29种共有C env肽库刺激时:pEY3E1-C免疫的小鼠引发超过50点/百万脾细胞的库有23个;pEK3P-C免疫的小鼠引发超过50点/百万脾细胞的库有2个。

[0265] 图17A-D显示了pEY3E1-C在相同进化支内引发的强交叉反应性细胞应答。

[0266] 图18A和B显示了pEY3E1-C引发的强且宽的交叉反应性细胞应答。图A显示了亚型C(乌拉圭)env-特异性IFN- γ ELISpot的数据。当用29种进化支C(乌拉圭)env肽库刺激时:pEY3E1-C免疫的小鼠引发超过50点/百万脾细胞的库有12个;pEK3P-C免疫的小鼠引发超过50点/百万脾细胞的库有3个。图B显示了亚型C(南非)env-特异性IFN- γ ELISpot的数据。当用29种进化支C(南非)env肽库刺激时:pEY3E1-C免疫的小鼠引发超过50点/百万脾细胞的库有13个;pEK3P-C免疫的小鼠引发超过50点/百万脾细胞的库有5个。

[0267] 图19图A-f显示pEY3E1-C在进化支之间引发的强交叉反应性细胞应答。

[0268] EOC免疫原诱导的细胞免疫应答的宽度和幅度都显著增加。较宽的交叉进化支反应性是这种免疫原的额外好处。

[0269] 实施例3:编码E6/E7融合蛋白的新型工程改造HPV-16DNA疫苗的效力

[0270] 已经设计出了作为多蛋白表达的免疫原,其中的E6和E7序列被蛋白水解切割位点分隔。该多蛋白还与IgE前导序列一起表达。多蛋白设计包括E6序列内的缺失或突变,这对于p53结合和降解以及E7蛋白上Rb结合位点内的突变是重要的。图23提供了免疫原设计的示意图。

[0271] 编码多蛋白的编码序列被插入载体pVAX以制造质粒p1667。图24显示了pVax和p1667的图谱。

[0272] TC1肿瘤细胞用HPV-16E7永生化并用c-Ha-ras癌基因转化。这些细胞表达低水平E7并且是极具致癌性。

[0273] 在小鼠的免疫原性研究中,每组3只C57BL6小鼠被给予100 μ g DNA/每只小鼠。各组包括:1)对照,给予pVAX-对照载体,和2)测试,给予p1667。在第0、14和28天免疫小鼠。在第35天杀死小鼠并进行ELISPOT(关注CMI)。

[0274] DNA免疫原p1667诱导的细胞免疫应答数据显示于图25。HPV16共有E6和E7肽(37-聚体和15-聚体,有9个氨基酸重叠)被用于两个库:库1为18肽;库2为19肽。图A和C显示总脾细胞的数据。图B和D显示了CD8缺失样品的数据。

[0275] 图26显示了优势免疫表位绘图结果。标出了两个序列。

[0276] 在小鼠的预防性实验中,每组5只C57BL6小鼠被给予100 μ g DNA/每只小鼠。各组包括:1)原初(注射PBS),2)对照,给予pVAX-对照载体,和3)测试,给予p1667。在第0、14和28天免疫小鼠。在第35天用TC-1细胞攻击小鼠并在这之后测量肿瘤大小。结果显示于图27。还显示了共给予IL-15构建物的一组的数据。

[0277] 在小鼠的肿瘤消退实验中,每组5只C57BL6小鼠被给予100 μ g DNA/每只小鼠。各组包括:1)原初(注射PBS),2)对照,给予pVAX-对照载体,和3)测试,给予p1667。在第0天用5x10⁴ TC-1细胞攻击小鼠。在第3、10和17天给予小鼠DNA疫苗。从第8天开始测量肿瘤。结果显示于图28。还显示了共给予IL-15构建物的一组的数据。

[0278] 测定了脾脏中E7四聚体阳性淋巴细胞的水平。图29显示的数据为E7四聚体阳性淋巴细胞的百分比。DNA疫苗p1667诱导E7-特异性CD8⁺ T细胞活化,其为脾内的CD62L^{lo}。

[0279] 测定了肿瘤中E7四聚体阳性淋巴细胞的水平。图30显示的数据为E7四聚体阳性淋巴细胞的百分比。DNA疫苗p1667诱导E7-特异性CD8⁺ T细胞活化,其为肿瘤内的CD62L^{lo}。

[0280] 在转基因小鼠中研究E6/E7DNA疫苗保护作用。将原初、pVAX、p1667、p1667+IL-15和E7/HisB之间进行比较。数据显示于图31。p1667和p1667+IL-15完全保护。

[0281] 这里展示的数据支持以下结论。p1667构建物诱导强细胞免疫应答,这种免疫应答能够诱导介导升高的IFN- γ 反应的E7-特异性CD8⁺淋巴细胞。我们同时鉴定了优势HPV-16表位和新的亚优势(sub-dominant) HPV-16表位,在给予DNA构建物之后产生了针对上述表位的抗原-特异性CTL。p1667构建物在C57/BL6和转基因小鼠中都能够预防肿瘤生长以及造成肿瘤消退。DNA疫苗p1667显示极有可能是靶向显微HPV-相关癌症的新型治疗方法。

[0282] 实施例4

[0283] 可采用例如电穿孔技术进行肌内注射或真皮内注射将编码HIV Env共有序列的核酸序列与编码各种其他HIV蛋白如Gag、Pol、Gag/Pol、Nef、Vif和Vpr的核酸序列作为DNA疫苗组合给予。多价(multivalent/polyvalent)HIV疫苗构建物可提供增强的免疫应答且特别有用。一些实施方式中,额外提供了IL-12编码序列。通过引用纳入本文的美国专利申请公布号20070106062披露了HIV Vif DNA疫苗。通过引用纳入本文的美国专利申请公布号20040106100披露了包含HIV辅助蛋白质的HIV疫苗,同时披露了这种蛋白质的序列,它可用于制备其他的疫苗构建物。通过引用纳入本文的美国专利6,468,982、5,817,637和5,593,972披露了包含HIV gag、HIV pol和HIV gag/pol构建物的DNA疫苗。电穿孔描述于美国专利7,245,963,其通过引用纳入本文。通过引用纳入本文的PCT申请PCT/US97/19502披露了IL-12构建物。通过引用纳入本文的美国申请公布号20070041941披露了编码IL-15的构建物。

[0284] 实施例5

[0285] 两组猕猴用含或不含质粒IL-12的优化质粒gag和env构建物IM免疫三次。对另外两组采取相同的免疫方法,但采用或不采用体内电穿孔递送质粒。

[0286] 每次免疫后通过IFN γ ELISpot测定细胞应答并在5个月后测定记忆应答。研究过程中通过重组p24和gp160 ELISA评价体液反应。抗原-特异性T细胞的增殖能力通过CFSE染色

确定。进行胞内细胞因子染色以进一步表征诱导出的T-细胞应答的功能特性。

[0287] 质粒IL-12增强了对我们的优化构建物的细胞应答。然而,与用质粒IL-12进行IM免疫相比,使用电穿孔增强质粒的递送能够同时提高细胞应答和体液应答。从各种参数测得,对于基础应答和记忆应答而言,质粒IL-12和电穿孔组合都得到了最佳免疫应答。

[0288] 在存在或不存在质粒IL-12作为DNA佐剂时在猕猴中比较了优化的编码HIV gag和env的DNA构建物。在定量ELISpot模式中IL-12能够使T细胞应答实质性提高5倍,从而导致实质性更好的记忆T细胞应答。然而,EP递送的DNA在产生T细胞应答和记忆效应时更加有效,比IL-12 IM DNA佐剂疫苗高两倍。在EP+IL-12佐剂的组合分支 (arm) 中观察到最佳反应。该分支中的记忆应答比单独的IM DNA高10倍,比单独的EP几乎高两倍。我们还通过CFSE观察到,与单独EP相比,EP+IL-12分支中的免疫扩增好4倍。存在多功能T细胞还提示,DNA+细胞因子+EP分支是最有效的。

[0289] 材料和方法

[0290] 动物:

[0291] 按照美国实验动物护理委员会 (American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care) 的标准,由BIOQUAL有限公司 (洛可维尔 (Rockville), 马里兰州) 饲养猕猴 (*Macaca mulatta*)。任何实验之前让动物适应隔离检疫至少30天。

[0292] 免疫:

[0293] 在第0、4和11周用1.0mg pGag4Y和pEY2E1-B免疫5只猕猴。在各免疫时间点将DNA递送到两个注射部位,每个部位在各四头肌内。3只猕猴在IM注射后进行电穿孔。另一组5只猕猴在第0、4和8周用1.0mg pGag4Y、pEY2E1-B和WLV104免疫。5只动物中,2只动物接受IM注射免疫,3只动物在IM注射后进行电穿孔。所有电穿孔过程采用恒流Celectra™装置 (VGX制药有限公司的VGX免疫治疗分公司 (VGX Immune Therapeutics Division of VGX Pharmaceuticals), 伍德兰 (The Woodlands), 得克萨斯州) 进行。电穿孔条件为0.5安培,3次脉冲,52毫秒脉冲长度,两次脉冲之间间隔1秒。将该软件控制装置设计成先测量组织抵抗力然后立即进行质粒递送和产生恒流方波脉冲,从而消除了肌肉组织外递送和潜在质粒流失的风险。

[0294] 采血:

[0295] 在研究期间每两周采集一次动物血样。将10mL血液收集到EDTA管。通过标准菲可哈帕克 (Ficoll-hypaque) 离心分离PBMC,然后将其重悬于完全培养基 (RPMI 1640+2mM/L L-谷氨酰胺,添加10%热灭活胎牛血清胎牛血清、100IU/mL青霉素,100μg/mL链霉素和55μM/Lβ-巯基乙醇)。RBC用ACK裂解缓冲液 (凯氏生物科技公司 (Cambrex Bio Science), 东卢瑟福 (East Rutherford), 新泽西州 (NJ)) 裂解。

[0296] 质粒和质粒产物:

[0297] Gag4Y所含表达盒编码HIV进化支A、B、C和D的gag蛋白的共有序列,具有以下一些修饰:添加kozak序列,取代的IgE前导序列,对密码子和RNA进行优化以在哺乳动物细胞内表达 (SEQ ID NO:11公开了HIV Gag共有序列)。将Gag4Y基因亚克隆入表达载体pVax供进一步研究。pEY-2E1-B所含表达盒编码HIV进化支B的包膜的共有序列 (SEQ ID NO:3公开了HIV Env共有序列)。WLV104M是编码猕猴IL-12基因的质粒。质粒由艾德弗隆公司 (Aldevron) (法戈 (Fargo), 北达科他州) 制造,并由VGX免疫治疗公司 (伍德兰, 得克萨斯州) 用无菌水重配

以便与低分子量0.1%聚-L-谷氨酸钠一起注射。

[0298] 冷冻保存的PBMC的CFSE

[0299] 冷冻保存的PBMC在37℃水浴中快速解冻并用完全培养基洗涤。细胞在37℃培养箱内温育过夜并在第二天获得细胞计数。将细胞沉淀并重悬于PBS配制的1ml CFDA SE (分子探针公司, 尤金 (Eugene), 俄勒冈州) (1:2000稀释)。细胞在37℃下温育10分钟。细胞用完全培养基洗涤并重悬至 1×10^6 细胞/100ul的浓度, 将细胞接种于含100ul 2μg/ml重组HIV-1 p24或gp120 (免疫诊断公司 (ImmunoDiagnostics), 沃本 (Woburn), 马萨诸塞州) +肽库的96孔圆底平板内。5μg/ml伴刀豆球蛋白A (阳性) 和完全培养基 (阴性) 用作对照。将培养物培育5天。细胞先用Vivid染料紫罗兰 (一种活/死细胞标记物) 在冰上染色15分钟。细胞用PBS洗涤一次。然后细胞用抗-人CD3-PE (克隆SP34-2) (BD药厂 (BD Pharmingen)) 和抗-人CD4-PerCP (克隆L200)、抗-人CD8-APC (SK1) 在4℃染色1小时。细胞然后用PBS洗涤两次并用1%低聚甲醛固定。数据使用LSRII流式细胞仪 (LSRII flow cytometer) (BD生物科技公司, 富兰克林湖 (Franklin Lakes), 新泽西州) 收集。流式细胞术数据采用FlowJo软件 (树星公司 (TreeStar), 阿什兰 (Ashland), 俄勒冈州) 分析, 在CD3⁺淋巴细胞上进行门控。每份样品收集3-5万个CD3⁺淋巴细胞。

[0300] 酶联免疫吸附试验 (ELISA) :

[0301] 96孔平板用100ng/孔的重组HIV-1IIIIB p24 or gp120 (免疫诊断公司) 包被过夜以分别检测HIV gag和env反应。包被有100ng/孔牛血清白蛋白的平板作为阴性对照。平板用3% BSA-PBST在37℃封闭1小时。平板然后用4倍连续稀释血清在37℃培育1小时。然后在平板中加入1:10,000稀释的羊抗猴IgG辣根过氧化物酶偶联的抗体 (MP生物学公司 (MP Biomedicals), 奥罗拉 (Aurora), 俄亥俄州) 并在37℃培育1小时。用四甲基联苯胺 (R&D系统公司, 明尼阿波利斯, 明尼苏达州) 使平板显色, 用2N H₂SO₄终止反应。然后测量光密度 (OD)。

[0302] IgG终点效价定义为导致OD值为BSA孔平均OD值两倍以上的血清稀释度的倒数。

[0303] 酶联免疫斑点试验 (ELISpot)

[0304] 测定抗原特异性反应时将含有肽的孔的斑点数减去阴性对照孔的斑点数。显示的结果是三重孔的平均值 (斑点/百万脾细胞)。

[0305] 胞内细胞因子染色

[0306] 抗体试剂

[0307] 从BD生物科技公司 (圣何塞 (San Jose), 加州) 获得直接偶联的抗体: IL-2 (PE)、CD3 (Pacific Blue)、IFN-γ (PE-Cy7)、以及TNF-α (Alexa Fluor 700)、CD8 (APC) 和CD4 (PerCP)。

[0308] 细胞刺激和染色

[0309] 将PBMC重悬于完全RPMI至 1×10^6 细胞/100ul, 然后接种于含100ul作1:200稀释的刺激肽的96孔平板。每个试验包括未刺激的阳性对照 (葡萄球菌肠毒素B, 1μg/mL; 西格玛奥尔德里奇公司)。细胞在37℃温育5小时。温育之后将细胞洗涤 (PBS) 并用表面抗体染色。将细胞洗涤并用Cytofix/Cytoperm试剂盒 (BDPM公司 (BD Pharmingen), 圣地亚哥, 加州) 按照说明书固定。固定之后细胞用透化缓冲液 (perm buffer) 洗涤两次并用抗胞内标记物抗体染色。染色后将细胞洗涤、固定 (含1%低聚甲醛的PBS) 并储存于4℃直到分析。

[0310] 流式细胞术

[0311] 用改进的LSR II流式细胞仪(BD免疫细胞计数系统公司(BD Immunocytometry Systems),圣何塞,加州)分析细胞。从每个样品收集到50000个CD3⁺事件。采用FlowJo版本8.4.1(树星公司,圣卡洛斯(San Carlos),加州)进行数据分析。初级门控采用前向散射面积(forward scatter area)(FSC-A)与高度(FSC-H)的曲线以除去双峰。通过FSC-A与SSC曲线对事件进行淋巴细胞门控。之后,依次根据IFN- γ 对CD3⁺、CD8⁺和CD4⁺事件进行门控以解释下调。鉴定CD8⁺ T细胞之后使用提供最佳分离的组合对各个单独功能进行门控。在各个功能的门控都形成之后,我们采用Boolean门控平台产生可能组合的全部阵列,即测试3种功能时有8种反应模式。进行背景校正之后报道数据。各反应的阈值为10次事件或0.05%。

[0312] 统计学分析

[0313] 数据采用Prism Graphpad软件分析并表示为平均值 \pm SEM。

[0314] 结果

[0315] ELISpot分析

[0316] 每次免疫之后通过IFN γ ELISpot评价对细胞免疫应答的诱导作用。单次免疫之后(图1),仅通过IM注射接受质粒DNA的组显示出弱细胞应答(74 ± 29 SFU/ 10^6 PBMC)。用猕猴IL-12质粒共免疫得到较高应答(136 ± 51.4 SFU/ 10^6 PBMC)。电穿孔(EP)组的平均应答是IM组的6倍以上(482 ± 181 SFU/ 10^6 PBMC)。IL-12共免疫与EP组合进一步使IFN γ -生成细胞的数目加倍(1030 ± 494 SFU/ 10^6 PBMC)。

[0317] 两次免疫后(图1),IM和IM+IL-12组的ELISpot计数增加不多(分别为 104 ± 67.9 SFU/ 10^6 PBMC和 223 ± 76.6 SFU/ 10^6 PBMC)。EP组的反应几乎是前次免疫的4倍(1924 ± 417 SFU/ 10^6 PBMC),而EP+IL-12组的IFN γ -生成细胞的数目相比单用EP再次加倍(2819 ± 872 SFU/ 10^6 PBMC)。

[0318] 第三次免疫之后(图1),EP组中抗原特异性细胞的数目高出IM组一个对数级(分别为 5300 ± 3781 和 370 ± 110 SFU/ 10^6 PBMC)。IM+IL-12组的细胞应答也急剧升高,其ELISpot计数几乎比前次免疫高一个对数级(2042 ± 311 SFU/ 10^6 PBMC)。对于另外两种免疫方法,EP+IL-12组是所有免疫组中最强的一组(7228 ± 2227 SFU/ 10^6 PBMC)。

[0319] 交叉反应性包膜反应的诱导

[0320] 成功的HIV疫苗需要能诱导交叉反应性免疫应答,在这点上,如果EP+IL-12能提高对各种肽文库的交叉反应性的幅度则是令人感兴趣。我们采用共有群M的肽文库比较env抗原诱导的交叉反应性CTL反应。在所有组内观察到交叉反应性。然而结果显示,在亚型B ELISpot分析中观察到了相同的幅度差异(图2)。免疫3次之后,IM组对群M包膜肽的反应最弱($222 \pm \text{SEM}$ SFU/ 10^6 PBMC)。加入IL-12使反应加倍($540 \pm \text{SEM}$ SFU/ 10^6 PBMC)。EP诱导了较高的群M包膜反应($830 \pm \text{SEM}$ SFU/ 10^6 PBMC),IL-12共注射进一步增强了这种反应($1238 \pm \text{SEM}$ SFU/ 10^6 PBMC)。

[0321] 1. 记忆T细胞应答

[0322] 一个重要的结果是用DNA平台能够促进记忆应答的产生。我们在最后一次DNA免疫5个月之后进行了ELISpot分析(图3)。在IM组内,加入质粒IL-12导致记忆细胞增加近10倍(751 ± 11.1 和 78.6 ± 16.9 SFU/ 10^6 PBMC)。显然,IL-12对于这种重要的T细胞表型有积极影响。EP组中也有实质数目的抗原-特异性IFN γ 生成细胞,但IL-12佐剂+EP导致了最强的记忆应答(分别为 1231 ± 523.5 和 3795 ± 1336 SFU/ 10^6 PBMC),这种应答反应显示组合技术能驱动

非常强的T细胞记忆应答。

[0323] 对DNA疫苗的体液免疫应答

[0324] IM DNA疫苗技术的缺点在于它不能在非人灵长类和人临床研究中诱导明确的抗体应答。我们通过ELISA模式评价了各组诱导针对重组p24和gp160抗原的HIV-1gag和env特异性抗体效价的能力。对这两种抗原,IM和IM+IL-12组未显示显著的抗体效价(<1:50终点效价)。电穿孔组显示出明显较高的能够结合重组p24的gag抗体效价。尽管EP和EP+IL-12组在第12周都有类似的终点效价(分别为22,400和12,800),但EP+IL-12组产生更加有效的抗体反应。该反应在所述免疫方案中出现得较早且最快升至最高水平。env抗体应答也反映了我们用gag抗原观察到的结果,尽管其终点效价较低。

[0325] $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞增殖

[0326] 在观察到实质性ELISpot反应之后我们接下来检测了细胞免疫力的其他参数。我们检测了不同免疫组之间gag特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞在肽刺激后体外增殖的能力。对在最后一次免疫两周后收集的冷冻保存样品进行刺激并通过CFSE试验分析。平均 $CD4^+$ 反应增加类似于ELISpot试验中观察到的。通过比较, $CD8$ 增殖诱导幅度惊人得多。我们观察到IL-12使 $CD8^+$ T细胞增殖高于单独的IM,而EP则显著更高。EP+IL-12组中体外刺激后能够增殖的 $CD8^+$ 细胞百分比最高(分别为 $2.51 \pm SEM\%$ 和 $4.88 \pm SEM\%$)。在EP+IL-12分支中观察到明显的 $CD8$ T细胞增殖条带,证明了这种组合免疫的强增殖潜能。

[0327] 多功能 $CD8^+$ T细胞反应

[0328] 尽管我们明确观察到EP和IL-12共免疫后诱导出了强 $IFN\gamma$ 效应物反应,我们希望进一步表征抗原特异性 $CD8^+$ T细胞应答在不同分支中的功能。最后一次免疫3个月后获得的样品用gag肽刺激并为胞内产生 $IFN\gamma$ 、 $TNF\alpha$ 和IL-2细胞因子而作染色。所有组中,仅IM+IL-12组的一个动物和EP组的一个动物具有可检测的 $IFN\gamma$ 反应。然而,EP+IL-12免疫组三只动物中的两只具有产生gag-特异性 $IFN\gamma$ 的 $CD8^+$ T细胞。IM+IL-12反应细胞具有一小部分多功能细胞(对所有三种细胞因子都被染色)以及已经丧失产生IL-2能力的群体。EP反应细胞的多功能反应略高,其中包括四种不同群体。在第二EP+IL-12动物中观察到最令人吃惊的反应。超过2%的其 $CD8^+$ T细胞能够产生所有三种细胞因子,且2%能够同时产生 $IFN\gamma$ 和 $TNF\alpha$ 。显然,每组中动物数较少并需要其他灵长类研究来证实这些结果,但总的来说观察到的趋势是清楚和令人鼓舞的。

[0329] 讨论

[0330] IL-12作为DNA疫苗佐剂使ELISpot反应比单独的质粒提高数倍。此外还明显增强了增殖。EP组显示平均反应高于单独IM组或IM+IL-12分支,其显示出的组合ELISpot反应是IM+IL-12组的三倍。在EP+IL-12分支中观察到最佳ELISpot反应,其为IM+IL-12分支的4倍、单独IM的19倍。

[0331] 在每次免疫之后通过 $IFN\gamma$ ELISpot测定抗原-特异性反应的幅度。单次免疫后EP和EP+IL-12组中所有动物不仅有可检测的反应,而且它们的平均值高于三次免疫后IM组的值。两次免疫后,EP和EP+IL-12组的 $IFN\gamma$ 反应与采用病毒载体的研究中曾报道的反应相当。最后一次免疫5个月在IM+IL-12组和EP组中都观察到实质性记忆应答。

[0332] 用或不用IL-12的IM免疫不产生显著量的抗体。如之前所报道,电穿孔能够增强体液免疫应答。电穿孔组的所有动物发生血清转化。尽管EP和EP+IL-12组在三次免疫后有类

似的终点效价,但EP+IL-12组的抗体诱导动力学略快。

[0333] EP和质粒IL-12看来能增强CD8⁺ T细胞的增殖能力。该数据支持ELISpot试验中观察到的记忆扩增效应,该试验中,抗原特异性T细胞的扩增可能是由于EP+IL-12分支的增殖潜能增强所致。

090463F1

序列表

<110> 宾夕法尼亚州立大学托管会(The Trustees of the University of Pennsylvania)
D.B. 韦纳(Weiner, David B.)
严健(Yan, Jian)

<120> 改进的疫苗及其使用方法

<130> 090463F1

<150> US 60/833861

<151> 2006-07-28

<150> US 60/890352

<151> 2007-02-16

<150> US 60/833586

<151> 2006-07-28

<160> 43

<170> PatentIn版本3.4

<210> 1

<211> 2142

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型A共有包膜DNA序列构建物

<400> 1

```

ggatccatgg actggacctg gattctgttc ctggtggccg ccgccaccag agtgcacagc   60
agagtgatgg gcatccagcg gaattgccag cacctgtgga gatggggcac catgatcctg   120
ggcatgatca tcattctgtc tgccgccgag aacctgtggg tgaccgtgta ctacggcgtg   180
cctgtgtgga aggacgccga gaccacctg ttctgcgcca gcgacgcaa ggcctacgat   240
accgaagtgc acaatgtgtg ggccaccac gcctgcgtgc ctaccgatec caacccccag   300
gagatcaacc tggagaacgt gaccaggag ttcaacatgt ggaagaacaa catggtggag   360
cagatgcaca ccgacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccttg cgtgaagctg   420
acccctctgt gcgtgacct gaactgcagc aacgtgaacg tgaccaccaa catcatgaag   480
ggcgagatca agaactgcag cttcaacatg accaccgagc tgcgggacaa gaagcagaaa   540
gtgtacagcc tgttctacaa gctggacgtg gtgcagatca acaagagcaa cagcagcagc   600
cagtaccggc tgatcaactg caacaccagc gccatcaccc aggcctgcc caaagtgagc   660
ttcagagcca tccccatcca ctactgcgc cctgcgggt tcgccatcct gaagtgcaag   720
gacaaggagt ttaacggcac cggccccctgc aagaatgtga gcaccgtgca gtgcaccac   780
ggcatcaagc ccgtggtgtc caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggaa   840
gtgatgatcc ggagcgagaa catcaccaac aacgccaaga acatcatcgt gcagctgacc   900
aagcccgtga agatcaattg caccgggcc aacaacaaca cccggaagag catcagaatc   960
ggccctggcc aggccttcta cgccaccggc gacatcatcg gcgatatcag gcaggccac   1020
tgcaatgtga gccggaccga gtggaacgag accctgcaga aagtggccaa gcagctgcgg   1080
aagtacttca acaacaagac catcatcttc accaacagca gcggcggcag actgagaatc   1140
accaccaca gettcaattg tggcggcgag ttcttctact gcaatacctc cggcctgttc   1200

```

[0001]

```

aacagcacct ggaacggcaa cggcaccaag aagaagaaca gcaccgagag caacgacacc 1260
atcacctgc cctgccgat caagcagatc atcaatatgt ggcagagggt gggccaggcc 1320
atgtacgcc ctcccatcca gggcgtgac agatgcgaga gcaacatcac cggcctgtg 1380
ctgaccagag atggcggcga caacaacagc aagaacgaga cttcagacc tggcggcgga 1440
gacatgaggg acaactggcg gagcgagctg tacaagtaca aagtggtgaa gatcgagccc 1500
ctgggcgtgg cccccacaa ggccaagaga agagtggagg agcgggagaa gagagctgtg 1560
ggcatcgccg cgtgttctt gggcttctt ggagccgccg gaagcaccat gggagccgcc 1620
agcatcacc tgaccgtgca ggccagacag ctgctgagcg gcattgtgca gcagcagagc 1680
aacctgctga gagccatcga ggccagcag cacctgctga agctgacagt gtggggcatc 1740
aaacagctgc aggcccgct gctggccgtg gagagatacc tgaaggacca gcagctgctg 1800
ggcatctggg gctgcagcgg caagctgac tgcaccacca acgtgccctg gaatagcagc 1860
tggagcaaca agaccagag cgagatctgg gacaacatga cctggctgca gtgggacaag 1920
gagatcagca actacaccga tatcatctac aacctgatc aggagagcca gaaccagcag 1980
gagaagaacg agcaggatct gctggccctg gacaagtggg ccaacctgtg gaactggttc 2040
gacatcagca actggctgtg gtacatcaag atcttcatca tgattgtggg cggcctgac 2100
ggcctgagaa tcgtgttcgc cgtgctgtct gtgtgactcg ag 2142

```

<210> 2

<211> 709

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型A共有包膜蛋白序列构建物

[0002]

<400> 2

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1          5          10          15
His Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg
          20          25          30
Trp Gly Thr Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Ala Ala Glu
          35          40          45
Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Asp Ala
          50          55          60
Glu Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
65          70          75          80
Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
          85          90          95
Pro Gln Glu Ile Asn Leu Glu Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Met Trp
          100          105          110
Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Thr Asp Ile Ile Ser Leu Trp
          115          120          125
Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
          130          135          140
Leu Asn Cys Ser Asn Val Asn Val Thr Thr Asn Ile Met Lys Gly Glu
145          150          155          160
Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys
          165          170          175
Gln Lys Val Tyr Ser Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Gln Ile Asn
          180          185          190
Lys Ser Asn Ser Ser Ser Gln Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser
          195          200          205

```

[0003]

Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile		
210	215	220
His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys		
225	230	235 240
Glu Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys		
245	250	255
Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly		
260	265	270
Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Met Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn		
275	280	285
Asn Ala Lys Asn Ile Ile Val Gln Leu Thr Lys Pro Val Lys Ile Asn		
290	295	300
Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro		
305	310	315 320
Gly Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln		
325	330	335
Ala His Cys Asn Val Ser Arg Thr Glu Trp Asn Glu Thr Leu Gln Lys		
340	345	350
Val Ala Lys Gln Leu Arg Lys Tyr Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe		
355	360	365
Thr Asn Ser Ser Gly Gly Arg Leu Arg Ile Thr Thr His Ser Phe Asn		
370	375	380
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser		
385	390	395 400
Thr Trp Asn Gly Asn Gly Thr Lys Lys Lys Asn Ser Thr Glu Ser Asn		
405	410	415
Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp		
420	425	430
Gln Arg Val Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gln Gly Val Ile		
435	440	445
Arg Cys Glu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly		
450	455	460
Asp Asn Asn Ser Lys Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met		
465	470	475 480
Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile		
485	490	495
Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu		
500	505	510
Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu		
515	520	525
Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val		
530	535	540
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu		
545	550	555 560
Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Lys Leu Thr Val Trp		
565	570	575
Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu		
580	585	590
Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile		
595	600	605
Cys Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln		
610	615	620

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

<210> 3
 <211> 2734
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亚型B共有包膜DNA序列构建物

[0004] <400> 3
 ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgttcctgg tggccgccgc caccagagtg 60
 cacagcagag tgaaggcat ccggaagaac taccagcacc tgtggagatg gggcaccatg 120
 ctgctgggca tgtgatgat ctgttctgcc gccgagaagc tgtgggtgac cgtgtactac 180
 ggcgtgcctg tgtggaagga ggcaccacc accctgttct gcgccagcga cgccaaggcc 240
 tacgataccg aagtgcacaa tgtgtgggcc acccagcct gcgtgcctac cgateccaac 300
 cctcaggaag tgggtgctga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacaacatg 360
 gtggagcaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgcgtg 420
 aagctgaccc ctctgtgctg gacctgaac tgcaccgacc tgagcggcga gaagatggag 480
 aaggcgaga tcaagaactg cagcttcaac atcaccacct ccatccggga caaagtgcag 540
 aaggagtacg cctgtttcta caagctggac gtggtgccca tcgacaacga caacaccagc 600
 taccggctga tcagctgcaa caccagcgtg atcaccagc cctgccccaa agtgagcttc 660
 gagcccatcc ccatccacta ctgcgccct gccggttcg ccatcctgaa gtgcaacgac 720
 aagaagtcca acggcaccgg ccctgcacc aatgtgagca ccgtgcagtg caccacggc 780
 atcagaccg tgggtgccac ccagctgtg ctgaacggca gcctggccga ggaagaagt 840
 gtgatccgga gcgagaattt caccaacaac gccaaagca tcatcgtgca gctgaacgag 900
 agcgtggaga tcaactgcac ccggcccaac aacaataccc ggaagagcat ccacatcggc 960
 cctggccagg ccttctacac caccggcgag atcatcgcg atatcaggca ggcccactgc 1020
 aatatcagcc gggccaagtg gaacaacacc ctgaagcaga tcgtgaagaa gctgcgggag 1080
 cagttcggca acaagacat cgtgttcaac cagagcagcg gcggcagacc tagaatcgtg 1140
 atgcacagct tcaactgtgg cggcgagttc ttctactgca acacaacca gctgttcaac 1200
 agcacctgga acgtgaacgg gacctggaac aacaacaccg agggcaacga caccatcacc 1260
 ctgccctgcc ggatcaagca gatcatcaat atgtggcagg aggtgggcaa ggccatgtac 1320
 gccctccca tcagaggcca gatccggtgc agcagcaata tcaccggcct gctgctgacc 1380
 agagatggcg gcaacaataa caccaacgag accgagatct ttagacctgg cggcggagac 1440
 atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat cgagcccctg 1500
 ggcgtggccc ccaccaaggc caagagaaga gtggtgcagc gggagaagag agctgtgggc 1560
 atcggcgcca tgtttctggg ctttctggga gccgccgaa gcaccatggg agccgccagc 1620
 atgacctga ccgtgcagc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca gcagaacaac 1680
 ctgctgagag ccacgcagc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg gggcatcaag 1740
 cagctgcagg cccgcgtgct ggccgtggag agatacctga aggaccagca gctgctggga 1800

```

atctggggct gcagcggcaa gctgatctgc accaccaccg tgccctggaa cgccagctgg 1860
agcaacaaga gcctggacga gatctgggac aacatgacct ggatggagtg ggagcgggag 1920
atcgacaact acaccagcct gatctacacc ctgactgagg agagccagaa ccagcaggag 1980
aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa ctggttcgac 2040
atcaccaact ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtgggagg cctgatcggc 2100
ctgagaatcg tgttcgcgt gctgagcatc taccctacg acgtgccga ttacgcctga 2160
gaattcgtaa gtaagtgtca tatgggagag ctgactaga ctggacagcc aatgacgggt 2220
aagagagtga catttctcac taacctaga caggagggcc gtcaaagta ctgcctaate 2280
caatgacggg taatagtgc aagaaatgta tcaactcaac ctaagacagg cgcagcctcc 2340
gagggatgtg tcttttggtt ttataatta aaaagggtga catgtccgga gccgtgctgc 2400
ccggatgatg tcttggcctc tgtttgctac cggatcgcg gttaacgtcg acccgggct 2460
cgaggaagt aagtgtcata tgggagagct cgactagact ggacagccaa tgacgggtaa 2520
gagagtgaaca tttctacta acctagaca ggaggccgt caaagctact gcctaateca 2580
atgacgggta atagtgacaa gaaatgtatc actccaacct aagacaggcg cagcctccga 2640
gggatgtgtc tttgttttt tataattaaa aagggtgaca tgtccggagc cgtgctgccc 2700
ggatgatgtc ttggcctctg tttgctgcgg ccgc 2734

```

<210> 4

<211> 715

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型B共有包膜蛋白序列构建物

[0005]

<400> 4

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1          5          10          15
His Ser Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg
          20          25          30
Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu
          35          40          45
Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
          50          55          60
Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
65          70          75          80
Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
          85          90          95
Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
          100          105          110
Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
          115          120          125
Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
          130          135          140
Leu Asn Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile
145          150          155          160
Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln
          165          170          175
Lys Glu Tyr Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn
          180          185          190
Asp Asn Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr
          195          200          205

```

[0006]

```

Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys
210                215                220
Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys Phe Asn
225                230                235                240
Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly
                245                250                255
Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala
                260                265                270
Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Thr Asn Asn Ala Lys
                275                280                285
Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg
290                295                300
Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Gln Ala
305                310                315                320
Phe Tyr Thr Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys
                325                330                335
Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Val Lys
                340                345                350
Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser
                355                360                365
Ser Gly Gly Arg Pro Arg Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly
                370                375                380
Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn
385                390                395                400
Val Asn Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr
                405                410                415
Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
                420                425                430
Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
                435                440                445
Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Thr
                450                455                460
Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn
465                470                475                480
Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
                485                490                495
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys
                500                505                510
Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala
                515                520                525
Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg
                530                535                540
Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala
545                550                555                560
Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys
                565                570                575
Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
                580                585                590
Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr
                595                600                605
Thr Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile
                610                615                620

```

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

<210> 5

<211> 2140

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型C共有包膜DNA序列构建物

<400> 5

[0007]

ggatccgccca ccatggattg gacctggatt ctgttcctgg tggccgccgc cacaagagtg 60
 cacagcagag tgcggggcat cctgagaaat tgccagcagt ggtggatctg gggcattctg 120
 gggttctgga tgcgatgat ctgcaacgtg atgggcaacc tgtgggtgac cgtgtactac 180
 ggctgacctg tgtggaagga ggccaagacc accctgttct gtgccagcga tgccaaggcc 240
 tacgagaccg aggtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gtgtgccac cgatcccaac 300
 cctcaggaga tggctctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg 360
 gtggaccaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgcgtg 420
 aagctgaccc ctctgtgctg gacctgaac tgccggaaca acgtgaacaa caacaacacc 480
 atgaaggagg agatcaagaa ctgcagcttc aacatcacca ccgagctgcg ggacaagaag 540
 cagaaggtgt acgccctgtt ctaccggctg gacatcgtgc cctgaacga gaagaacaac 600
 agcaacgact accggtgat caactgcaac accagcgcca tcaccagggc ctgtcccaag 660
 gtgtccctcg accccatccc catccactat tgtccccctg ccggtacgc catcctgaag 720
 tgcaacaaca agaccttcaa cggcaccggc cctgcaata atgtgagcac cgtgcagtgt 780
 acccacggca tcaagcctgt ggtgtccacc cagctgctgc tgaatggcag cctggccgag 840
 gaggagatta tcattccggag cgagaacctg accaacaacg ccaagaccat cattgtgcac 900
 ctgaatgaga gcgtggagat cgtgtgtacc cggcccaaca acaatacccg gaagagcatc 960
 agaatcggcc ctggccagac cttttacgcc accggcgaca tcacggcgga tatcaggcag 1020
 gcccactgca atatcagcga ggagaagtgg aacaagaccc tgcagcgggt gtccgagaag 1080
 ctgaaggagc acttcccaaa taagaccatc aagttcgccc ctacgagcgg cggcagactg 1140
 gagatcacca cccacagctt caactgcagg ggcgagttct tctactgcaa taccagcaag 1200
 ctgttcaaca gcacctacat gccaacagc accaacaata ccaacaccac catcacccctg 1260
 ccctgccgga tcaagcagat catcaatatg tggcaggaag tgggcagagc catgtacgcc 1320
 cctcccatcg agggcaacat cacctgcaag tccaacatca ccggcctgct gctgacaaga 1380
 gatggcggca agaacgacac caatgacacc gagaccttca gacctggcgg cggagacatg 1440
 agggacaact ggcggagcga gctgtacaag tacaaggtgg tggagatcaa gcctctgggc 1500
 gtggccccta ccaaggccaa gaggagagtg gtggagaggg agaagagagc cgtgggcac 1560
 ggcgccgtgt ttctgggctt tctgggagcc gccggatcta caatgggagc cgccagcatc 1620
 aactgaccg tgcaggccag acagctgctg agcggcatcg tgcagcagca gagcaatctg 1680
 ctgagagcca tcgaggccca gcagcacatg ctgcagctga cagtgtgggg catcaagcag 1740
 ctgcagacca gagtgtctggc catcgagcgc tacctgaagg atcagcagct gctgggcac 1800


```

tggggctgta gcggaagct gatctgtacc accgccgtgc cttggaatag cagctggagc 1860
aacaagagcc aggaggacat ctgggacaac atgacctgga tgcagtggga ccgggagatc 1920
agcaactaca ccgacaccat ctacaggctg ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag 1980
aacgagaagg acctgctggc cctggacagc tggaagaacc tgtggaactg gttcgacatc 2040
accaactggc tgtgtacat caagatcttc atcatgattg tggcggcct gatcggcctg 2100
agaatcatct tcgccgtgct gagcatctga tagcggcgcg 2140

```

<210> 6

<211> 705

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型C共有包膜蛋白序列构建物

<400> 6

[0008]

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1           5           10          15
His Ser Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile
          20          25          30
Trp Gly Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly
          35          40          45
Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
          50          55          60
Lys Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Glu Thr Glu
65          70          75          80
Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
          85          90          95
Pro Gln Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
          100         105         110
Lys Asn Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
          115         120         125
Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
          130         135         140
Leu Asn Cys Arg Asn Asn Val Asn Asn Asn Asn Thr Met Lys Glu Glu
145         150         155         160
Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys
          165         170         175
Gln Lys Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Asn
          180         185         190
Glu Lys Asn Asn Ser Asn Asp Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser
          195         200         205
Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Asp Pro Ile Pro Ile
          210         215         220
His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys
225         230         235         240
Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
          245         250         255
Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
          260         265         270
Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn
          275         280         285

```

[0009]

```

Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val His Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Val
290                295                300
Cys Thr Arg Pro Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro
305                310                315                320
Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
325                330                335
Ala His Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg
340                345                350
Val Ser Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe
355                360                365
Ala Pro Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn
370                375                380
Cys Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser
385                390                395                400
Thr Tyr Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu
405                410                415
Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg
420                425                430
Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn
435                440                445
Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn
450                455                460
Asp Thr Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp
465                470                475                480
Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly
485                490                495
Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg
500                505                510
Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
515                520                525
Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
530                535                540
Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
545                550                555                560
Glu Ala Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln
565                570                575
Leu Gln Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
580                585                590
Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala
595                600                605
Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Glu Asp Ile Trp
610                615                620
Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser Asn Tyr Thr
625                630                635                640
Asp Thr Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
645                650                655
Asn Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn
660                665                670
Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met
675                680                685
Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Ile Phe Ala Val Leu Ser
690                695                700

```

Ile

705

<210> 7

<211> 2089

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型D共有包膜DNA序列构建物

<400> 7

[0010]

```

gggcatcaag cggaattacc agcacctgtg gaagtggggc accatgctgc tgggcatgct 60
gatgacctgc agcgtggccg agaacctgtg ggtgaccgtg tactacggcg tgcctgtgtg 120
gaaggaagcc accaccaccc tgttctgcgc cagcgatgcc aagagctaca agaccgagge 180
ccacaatatc tgggccaccc acgcctgcgt gcctaccgat cccaaccctc aggagatcga 240
gctggagaac gtgaccgaga acttcaacat gtggaagaac aacatggtgg agcagatgca 300
cgaggacatc atcagcctgt gggaccagag cctgaagcct tgcgtgaagc tgaccctctt 360
gtgcgtgacc ctgaactgca cgcacggcat gaggaacgac accaacgata ccaacgtgac 420
catggaggag ggcgagatga agaactgcag cttcaacatc accaccgaag tgcgggacaa 480
gaagaagcag gtgcacgccc tgttctacaa gctggacgtg gtgcccacg acgacaacaa 540
caccaacaac agcaactacc ggctgatcaa ctgcaacacc agcggcatca cccaggcctg 600
ccccaaagtg accttcgagc ccatcccat cactactgc gccctgccg gcttcgcat 660
cctgaagtgc aaggataaga agttcaacgg caccggccc tgcaagaatg tgagcaccgt 720
gcagtgcacc cagggcatca gaccgtggt gtccaccag ctgctgtga acggcagcct 780
ggccgaggag gagatcatca tccggagcga gaacctgacc aacaacgcca agatcatcat 840
tgtgcagctg aacgagagcg tgaccatcaa ttgcaccgg cctacaaca ataccggaa 900
gcgcateccc atcgccctgg gccaggcct ctacaccacc agaggcatca tcggcgacat 960
cagacaggcc cactgcaata tcagcggagc cgagtggaat aagaccctgc agcaggtggc 1020
caagaagctg ggcgacctgc tgaacaagac caccatcatc ttcaagccta gcagcggcgg 1080
cagacctaga atcaccaccc acagcttcaa ttgtggcggc gagtcttctt actgcaatac 1140
cagccggctg ttcaacagca cctggagcaa gaacagcacc agcaactcca ccaaggagaa 1200
caacaccatc accctgccct gccgatcaa gcagatcatc aatatgtggc agggagtggg 1260
caaggccatg tacccccctc ccatcgaggg cctgatcaag tgcagcagca acatcaccgg 1320
cctgctgctg accagagatg gcggagccaa caactccac aacgagacct tcagacctgg 1380
cggcggagac atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat 1440
cgagcccctg ggcgtggccc ccaccagagc caagagaaga gtgtgtgagc gggagaagag 1500
agccatcgga ctgggcgcca tgttcctggg cttcctggga gccgccgga gcaccatggg 1560
agccgccagc ctgacctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca 1620
gcagaacaac ctgctgagag ccattgaggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg 1680
gggcattaag cagctgcagg ccaggattct ggccgtggag cgctacctga aggatcagca 1740
gctgctggga atctggggct gcagcggcaa gcacatctgc accaccaccg tgccttggaa 1800
tagcagctgg agcaacaaga gcctggacga gatctggaac aacatgacct ggatggagtg 1860
ggagagggag atcgacaact acaccggcct gatctacagc ctgatcgagg agagccagac 1920
ccagcaggag aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa 1980
ctggttcagc atcaccacgt ggctgtggta catcaagatc ttcacatga ttgtggcgcg 2040
cctgatcggc ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcctg tgactcgag 2089

```

<210> 8

<211> 714

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型D共有包膜蛋白序列构建物

<400> 8

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1      5      10      15
His Ser Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys
      20      25      30
Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu
      35      40      45
Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
      50      55      60
Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
65      70      75      80
Ala His Asn Ile Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
      85      90      95
Pro Gln Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
      100     105     110
Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
      115     120     125
Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
      130     135     140
Leu Asn Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val
145     150     155     160
Thr Met Glu Glu Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr
      165     170     175
Glu Val Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu
      180     185     190
Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn Asn Thr Asn Asn Ser Asn Tyr Arg
      195     200     205
Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val
      210     215     220
Thr Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala
225     230     235     240
Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys
      245     250     255
Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser
      260     265     270
Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile
      275     280     285
Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu
      290     295     300
Asn Glu Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg
305     310     315     320
Lys Arg Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly
      325     330     335
Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu
      340     345     350
Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gln Val Ala Lys Lys Leu Gly Asp Leu Leu
      355     360     365
Asn Lys Thr Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Ser Gly Gly Arg Pro Arg

```

[0011]

```

370          375          380
Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn
385          390          395          400
Thr Ser Arg Leu Phe Asn Ser Thr Trp Ser Lys Asn Ser Thr Ser Asn
          405          410          415
Ser Thr Lys Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln
          420          425          430
Ile Ile Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro
          435          440          445
Ile Glu Gly Leu Ile Lys Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu
          450          455          460
Thr Arg Asp Gly Gly Ala Asn Asn Ser His Asn Glu Thr Phe Arg Pro
465          470          475          480
Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr
          485          490          495
Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys
          500          505          510
Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Ile Gly Leu Gly Ala Met
          515          520          525
Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
          530          535          540
Leu Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
545          550          555          560
Gln Gln Asn Asn Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
          565          570          575
[0012] Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
          580          585          590
Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
          595          600          605
Ser Gly Lys His Ile Cys Thr Thr Thr Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp
          610          615          620
Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
625          630          635          640
Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Ser Leu Ile
          645          650          655
Glu Glu Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
          660          665          670
Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Ser Ile Thr Gln Trp
          675          680          685
Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly
          690          695          700
Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
705          710

```

<210> 9

<211> 1049

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型B共有Nef-Rev DNA序列构建物

<400> 9
 ggatccgcca ccatggactg gacctggatt ctgttctctg tggccgctgc caccagagtg 60
 cacagcagca agagaagcgt ggtgggttgg cctacagtgc gggagaggat gagaagagcc 120
 gagcctgccg ccgatggagt gggcgccgtg tctagagatc tggagaagca cggcgccatc 180
 accagcagca ataccgccgc caacaatgcc gactgcgcct ggctggagge ccaggaggag 240
 gaggaagtgg gcttccctgt gagagcccag gtggccctga gagccatgac ctacaaggcc 300
 gccgtggatc tgagccactt cctgaaggag aaggcgccgc tggagggcct gatctacagc 360
 cagaagcggc aggacatcct ggatctgtgg gtgtaccaca cccagggcta cttcccgac 420
 tggcagaatt acacccttgg ccttggcatc agataccctc tgaccttcgg ctggtgcttc 480
 aagctgggtgc ctgtggagcc tgagaaagtg gaggaggcca acgagggcga gaacaattct 540
 gccgcccacc ctatgagcct gcacggcatg gacgatccg agagggaagt gctggtgtgg 600
 aagttcgaca gcaggtctgc cttccaccac atggccagag agctgcaccc cgagtactac 660
 aaggactgcc ggggcaggaa gagaagaagc gccggcagaa gcggcgacag cgacaggag 720
 ctgtgaaaaa cagtgcggct gatcaagttc ctgtaccaga gcaaccctcc tcccagcccc 780
 gagggcacca gacaggcccc gagaaccgg aggaggcggg ggagagagag gcagcgccag 840
 atcagaagca tcagcgagtg gattctgagc acctacctgg gcagaccgc cgagcccgtg 900
 cccctgcagc tgccccccct ggagagactg accctggact gcaacgagga ctgcggcacc 960
 agcggcaccc agggagtggg cagccccag atcctggtgg agagccctgc cgtgctggag 1020
 agcggcacca aggagtgatg agcggccgc 1049

<210> 10
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0013] <220>
 <223> 亚型B共有Nef-Rev蛋白序列构建物

<400> 10
 Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15
 His Ser Ser Lys Arg Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg
 20 25 30
 Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg
 35 40 45
 Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn
 50 55 60
 Asn Ala Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Phe Pro Val Arg Ala Gln Val Ala Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Ala
 85 90 95
 Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly
 100 105 110
 Leu Ile Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr
 115 120 125
 His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro
 130 135 140
 Gly Ile Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro
 145 150 155 160
 Val Glu Pro Glu Lys Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu Asn Asn Ser
 165 170 175
 Ala Ala His Pro Met Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu

Val	Leu	Val	Trp	Lys	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Phe	His	His	Met	Ala
180			185			190									
Arg	Glu	Leu	His	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asp	Cys	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	
195			200			205									
Arg	Ser	Ala	Gly	Arg	Ser	Gly	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr
210			215			220									
Val	Arg	Leu	Ile	Lys	Phe	Leu	Tyr	Gln	Ser	Asn	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro
225			230			235			240						
Glu	Gly	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Asn	Arg	Arg	Arg	Arg	Trp	Arg	Glu
245			250			255									
Arg	Gln	Arg	Gln	Ile	Arg	Ser	Ile	Ser	Glu	Trp	Ile	Leu	Ser	Thr	Tyr
260			265			270									
Leu	Gly	Arg	Pro	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Pro	Leu	Glu
275			280			285									
Arg	Leu	Thr	Leu	Asp	Cys	Asn	Glu	Asp	Cys	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Gln
290			295			300									
Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Gln	Ile	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Ala	Val	Leu	Glu
305			310			315			320						
Ser	Gly	Thr	Lys	Glu											
325			330			335									
340															

<210> 11

<211> 1863

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型A、B、C和D构建物的Gag共有DNA序列

<400> 11

ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgtttctgg tcgccgccgc cacaagagtg	60
cacagcggcg ccagagccag cgtgctgtcc ggcggcaagc tggacgcctg ggagaagatc	120
agactgaggc ctggcggcaa gaagaagtac cggctgaagc acctgtgtg ggccagcaga	180
gagctggaga gattcgccct gaatcctggc ctgctggaga ccagcgaggg ctgtaagcag	240
atcatcggcc agctgcagcc cgccctgcag accggcagcg aggagctgag aagcctgtac	300
aacaccgtgg ccaccctgta ctgctgcac gagaagatcg aggtgaagga caccaaggag	360
gccttgaca agatcgagga ggagcagaac aagagcaagc agaaggccca gcaggccgcc	420
gccgacaccg gcaacagcag ccagggtgcc cagaactacc ccatcgtgca gaatctgcag	480
ggccagatgg tgcaccaggc catcagcccc agaaccctga atgcctgggt gaaggatgatc	540
gaggagaagg ccttcagccc tgaggatgatc cctatggtca gcgccctgag cgaggcgccc	600
acacctcagg acctgaacac catgctgaac acagtggggg gccaccaggc cgccatgcag	660
atgctgaagg ataccatcaa cgaggaggcc gccgagtggg acagactgca ccccgatcac	720
gccggacctta tcgccctgg ccagatgaga gagcccagag gcagcgacat cgccggcacc	780
acctccacc tgcaagagca gatcggtgg atgaccagca accccccat cctgtgggc	840
gacatctaca agcgggtgat catcctgggc ctgaacaaga ttgtgaggat gtacagcccc	900
gtgtccatcc tggatatcag gcagggcccc aaggagccct tcagagacta cgtggaccgg	960
ttcttcaaga cctgagagc cgagcaggcc agccaggacg tgaagaactg gatgaccgag	1020
acctgctgg tgcagaacgc caacccgac tgtaagacca tectgagagc cctgggcct	1080
ggcgccacc tggaggagat gatgaccgcc tgcaggagg tggcgggacc cggccacaag	1140
gccagagtgc tggccgagc catgagccag gccaccaaca gcaacatcat gatgcagcgg	1200
ggcaacttca gaggccccag gaggatcgtg aagtgttca actgtggcaa ggagggccac	1260

```

atcgccagaa actgtagggc cccaggaag aagggtgct ggaagtgtgg caaagagggg 1320
caccagatga aggactgtac cgagcggcag gccaatttcc tggggaagat ctggcccagc 1380
cacaagggca gacccggcaa ttctctgcag agcagacctg agcccaccgc ccctcccgcc 1440
gagagcttcg gcttcggcga ggagatcacc ccagcccca agcaggagcc caaggacaga 1500
gagctgtacc ctctggccag cctgaagagc ctgttcggca acgataccct gagccagtac 1560
ccctacgacg tgcccgatta cgctgagaa ttcgtaagta agtgtcatat gggagagctc 1620
gactagactg gacagccaat gacgggtaag agagtgcacat ttctactaa cctaagacag 1680
gagggccgtc aaagctactg cctaatacaa tgacgggtaa tagtgacaag aaatgtatca 1740
ctccaacctt agacaggcgc agcctccgag ggatgtgtct ttgtttttt ataattaaaa 1800
agggtgacat gtccggagcc gtgtgccccg gatgatgtct tggcctctgt ttgtcgcgcg 1860
cgc 1863

```

<210> 12

<211> 524

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型A、B、C和D构建物的Gag共有蛋白序列

<400> 12

[0015]

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1           5           10           15
His Ser Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala
          20           25           30
Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu
          35           40           45
Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn
          50           55           60
Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln
65           70           75           80
Leu Gln Pro Ala Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr
          85           90           95
Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Lys Ile Glu Val Lys
          100          105          110
Asp Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser
          115          120          125
Lys Gln Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln
          130          135          140
Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val
145          150          155          160
His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile
          165          170          175
Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
          180          185          190
Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val
          195          200          205
Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu
          210          215          220
Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile
225          230          235          240
Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr

```


245 250 255
 Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro
 260 265 270
 Ile Pro Val Gly Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
 275 280 285
 Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln
 290 295 300
 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr
 305 310 315 320
 Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu
 325 330 335
 Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg
 340 345 350
 Ala Leu Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln
 355 360 365
 Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met
 370 375 380
 Ser Gln Ala Thr Asn Ser Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
 385 390 395 400
 Gly Pro Arg Arg Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
 405 410 415
 Ile Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
 420 425 430
 Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 435 440 445
 [0016] Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
 450 455 460
 Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly
 465 470 475 480
 Phe Gly Glu Glu Ile Thr Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg
 485 490 495
 Glu Leu Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro
 500 505 510
 Leu Ser Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 515 520

<210> 13

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgE引物序列1

<400> 13

gtcgctccgc tagcttgtgg gtcacagtct attatgggggt acc

43

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgE引物序列2

<400> 14

ggtcggatcc ttactccacc actctccttt ttgcc

35

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgE前导序列

<400> 15

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His

<210> 16

<211> 692

<212> PRT

<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 亚型A共有包膜蛋白序列

<400> 16

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

[0018]

Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Gln	Tyr	Arg	Leu	Ile	Asn	Cys	Asn	Thr	Ser	Ala	
180					185					190						
Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	His	
195					200					205						
Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Lys	Asp	Lys	Glu	
210					215					220						
Phe	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	Thr	
225					230					235					240	
His	Gly	Ile	Lys	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	
245					250					255						
Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Met	Ile	Arg	Ser	Glu	Asn	Ile	Thr	Asn	Asn	
260					265					270						
Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Thr	Lys	Pro	Val	Lys	Ile	Asn	Cys	
275					280					285						
Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Pro	Gly	
290					295					300						
Gln	Ala	Phe	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln	Ala	
305					310					315					320	
His	Cys	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Trp	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Lys	Val	
325					330					335						
Ala	Lys	Gln	Leu	Arg	Lys	Tyr	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe	Thr	
340					345					350						
Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Arg	Ile	Thr	Thr	His	Ser	Phe	Asn	Cys	
355					360					365						
Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr	
370					375					380						
Trp	Asn	Gly	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Glu	Ser	Asn	Asp	
385					390					395					400	
Thr	Ile	Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	
405					410					415						
Arg	Val	Gly	Gln	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Gln	Gly	Val	Ile	Arg	
420					425					430						
Cys	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Asp	
435					440					445						
Asn	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Arg	
450					455					460						
Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	Val	Lys	Ile	Glu	
465					470					475					480	
Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Lys	Arg	Arg	Val	Val	Glu	Arg	
485					490					495						
Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Val	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	
500					505					510						
Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	
515					520					525						
Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Ser	Asn	Leu	Leu	
530					535					540						
Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	
545					550					555					560	
Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Lys	
565					570					575						
Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys	
580					585					590						

Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Ser
 595 600 605
 Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile Ser
 610 615 620
 Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 625 630 635 640
 Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala Asn
 645 650 655
 Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
 660 665 670
 Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala
 675 680 685
 Val Leu Ser Val
 690

<210> 17

<211> 697

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型B共有包膜蛋白序列

<400> 17

[0019]

Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly
 1 5 10 15
 Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Lys Leu
 20 25 30
 Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr
 35 40 45
 Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His
 50 55 60
 Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
 85 90 95
 Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln
 100 105 110
 Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
 115 120 125
 Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn
 130 135 140
 Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln Lys Glu
 145 150 155 160
 Tyr Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn Asp Asn
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala
 180 185 190
 Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro
 195 200 205
 Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr
 210 215 220

[0020]

```

Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg
225                230                235                240
Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu
                245                250                255
Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Thr Asn Asn Ala Lys Thr Ile
                260                265                270
Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn
                275                280                285
Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr
                290                295                300
Thr Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile
305                310                315                320
Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Val Lys Lys Leu
                325                330                335
Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser Ser Gly
                340                345                350
Gly Arg Pro Arg Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe
                355                360                365
Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Asn
                370                375                380
Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr Leu Pro
385                390                395                400
Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
                405                410                415
Met Tyr Ala Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile
                420                425                430
Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Thr Asn Glu
                435                440                445
Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg
                450                455                460
Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val
465                470                475                480
Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala
                485                490                495
Val Gly Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser
                500                505                510
Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
                515                520                525
Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu
                530                535                540
Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu
545                550                555                560
Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
                565                570                575
Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Thr Val
                580                585                590
Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asp
                595                600                605
Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Ser
                610                615                620
Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
625                630                635                640

```

Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
645 650 655
Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile
660 665 670
Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile
675 680 685
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
690 695

<210> 18

<211> 687

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型C共有包膜蛋白序列

<400> 18

Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile Trp Gly
1 5 10 15
Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly Asn Leu
20 25 30
Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Lys Thr
35 40 45
Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Glu Thr Glu Val His
50 55 60
Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln
65 70 75 80
Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
85 90 95
Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln
100 105 110
Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
115 120 125
Cys Arg Asn Asn Val Asn Asn Asn Asn Thr Met Lys Glu Glu Ile Lys
130 135 140
Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys Gln Lys
145 150 155 160
Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Asn Glu Lys
165 170 175
Asn Asn Ser Asn Asp Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile
180 185 190
Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr
195 200 205
Cys Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe
210 215 220
Asn Gly Thr Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His
225 230 235 240
Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu
245 250 255
Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala
260 265 270

[0021]

[0022]

```

Lys Thr Ile Ile Val His Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Val Cys Thr
  275                      280                      285
Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln
  290                      295                      300
Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His
  305                      310                      315                      320
Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg Val Ser
                      325                      330                      335
Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro
                      340                      345                      350
Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg
                      355                      360                      365
Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser Thr Tyr
  370                      375                      380
Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu Pro Cys
  385                      390                      395                      400
Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met
                      405                      410                      415
Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr
                      420                      425                      430
Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn Asp Thr
  435                      440                      445
Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser
  450                      455                      460
Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly Val Ala
  465                      470                      475                      480
Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Val
                      485                      490                      495
Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr
                      500                      505                      510
Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu
  515                      520                      525
Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala
  530                      535                      540
Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
  545                      550                      555                      560
Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
                      565                      570                      575
Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro
                      580                      585                      590
Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Glu Asp Ile Trp Asp Asn
  595                      600                      605
Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser Asn Tyr Thr Asp Thr
  610                      615                      620
Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
  625                      630                      635                      640
Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn Trp Phe
                      645                      650                      655
Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val
                      660                      665                      670
Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Ile Phe Ala Val Leu Ser Ile
  675                      680                      685

```

<210> 19
 <211> 696
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亚型D共有包膜蛋白序列

<400> 19
 Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys Trp Gly
 1 5 10 15
 Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu Asn Leu
 20 25 30
 Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr
 35 40 45
 Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ser Tyr Lys Thr Glu Ala His
 50 55 60
 Asn Ile Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
 85 90 95
 Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln
 100 105 110
 Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
 115 120 125
 [0023] Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val Thr Met
 130 135 140
 Glu Glu Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Val
 145 150 155 160
 Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val
 165 170 175
 Val Pro Ile Asp Asp Asn Asn Thr Asn Asn Ser Asn Tyr Arg Leu Ile
 180 185 190
 Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe
 195 200 205
 Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu
 210 215 220
 Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln
 245 250 255
 Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser
 260 265 270
 Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu
 275 280 285
 Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg Lys Arg
 290 295 300
 Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly Ile Ile
 305 310 315 320
 Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu Trp Asn
 325 330 335

	Lys	Thr	Leu	Gln	Gln	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Lys	
				340					345					350			
	Thr	Thr	Ile	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Arg	Ile	Thr	
		355					360						365				
	Thr	His	Ser	Phe	Asn	Cys	Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Ser	
		370				375						380					
	Arg	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr	Trp	Ser	Lys	Asn	Ser	Thr	Ser	Asn	Ser	Thr	
	385					390					395					400	
	Lys	Glu	Asn	Asn	Thr	Ile	Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	
				405						410				415			
	Asn	Met	Trp	Gln	Gly	Val	Gly	Lys	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Glu	
			420						425				430				
	Gly	Leu	Ile	Lys	Cys	Ser	Ser	Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	
		435					440					445					
	Asp	Gly	Gly	Ala	Asn	Asn	Ser	His	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	
		450				455					460						
	Gly	Asp	Met	Arg	Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	
	465					470					475					480	
	Val	Lys	Ile	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala	Lys	Arg	Arg	
				485					490					495			
	Val	Val	Glu	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Phe	Leu	
			500						505				510				
	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Leu	Thr	
		515					520					525					
[0024]	Leu	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	
		530				535					540						
	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	
	545					550					555					560	
	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	
				565					570				575				
	Arg	Tyr	Leu	Lys	Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Gly	
			580						585				590				
	Lys	His	Ile	Cys	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	Trp	Asn	Ser	Ser	Trp	Ser	Asn	
		595					600						605				
	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Trp	Asn	Asn	Met	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Glu	
		610					615					620					
	Arg	Glu	Ile	Asp	Asn	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	
	625					630					635					640	
	Ser	Gln	Thr	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Asp	
				645					650				655				
	Lys	Trp	Ala	Ser	Leu	Trp	Asn	Trp	Phe	Ser	Ile	Thr	Gln	Trp	Leu	Trp	
			660						665				670				
	Tyr	Ile	Lys	Ile	Phe	Ile	Met	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Leu	Arg	
		675					680					685					
	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Ser	Leu									
		690					695										
<210>	20																
<211>	323																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																

<220>

<223> 亚型B共有Nef-Rev蛋白序列

<400> 20

Ser Lys Arg Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg Met Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg Asp Leu
 20 25 30
 Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn Asn Ala
 35 40 45
 Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro
 50 55 60
 Val Arg Ala Gln Val Ala Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile
 85 90 95
 Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr
 100 105 110
 Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Ile
 115 120 125
 Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro Val Glu
 130 135 140
 Pro Glu Lys Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu Asn Asn Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 His Pro Met Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu Val Leu
 165 170 175
 Val Trp Lys Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Met Ala Arg Glu
 180 185 190
 Leu His Pro Glu Tyr Tyr Lys Asp Cys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 195 200 205
 Ala Gly Arg Ser Gly Asp Ser Asp Glu Glu Leu Leu Lys Thr Val Arg
 210 215 220
 Leu Ile Lys Phe Leu Tyr Gln Ser Asn Pro Pro Pro Ser Pro Glu Gly
 225 230 235 240
 Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln
 245 250 255
 Arg Gln Ile Arg Ser Ile Ser Glu Trp Ile Leu Ser Thr Tyr Leu Gly
 260 265 270
 Arg Pro Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu
 275 280 285
 Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln Gly Val
 290 295 300
 Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Ala Val Leu Glu Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Lys Glu

[0025]

<210> 21

<211> 506

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚型A、B、C和D的Gag共有蛋白序列

<400> 21

Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp Glu
 1 5 10 15
 Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His
 20 25 30
 Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly
 35 40 45
 Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln Leu Gln
 50 55 60
 Pro Ala Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Lys Ile Glu Val Lys Asp Thr
 85 90 95
 Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Gln
 100 105 110
 Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln Val Ser
 115 120 125
 Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln
 130 135 140
 Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu Glu
 145 150 155 160
 Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu
 165 170 175
 Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly
 180 185 190
 His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu Glu Ala
 195 200 205
 Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro
 210 215 220
 Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser
 225 230 235 240
 Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro Ile Pro
 245 250 255
 Val Gly Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile
 260 265 270
 Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro
 275 280 285
 Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr Leu Arg
 290 295 300
 Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu
 305 310 315 320
 Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg Ala Leu
 325 330 335
 Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val
 340 345 350
 Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln
 355 360 365
 Ala Thr Asn Ser Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Gly Pro
 370 375 380

[0026]

Arg Arg Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala
 385 390 395 400
 Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys
 405 410 415
 Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu
 420 425 430
 Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln
 435 440 445
 Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly Phe Gly
 450 455 460
 Glu Glu Ile Thr Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg Glu Leu
 465 470 475 480
 Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Leu Ser
 485 490 495
 Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 500 505

<210> 22

<211> 818

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV基因型16 E6-E7 DNA序列

[0027]

<400> 22

gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttctctgg tggccgccgc cacacgggtg 60
 cacagcttcc aggaccccca ggagagcggc agaaagctgc ctcagctgtg taccgagctg 120
 cagaccacca tccacgacat catcctggag tgtgtgtact gtaagcagca gctgctgagg 180
 agagaggtgt acgaccggga cctgtgtatc gtgtacaggg acggcaatcc ctacgccgtg 240
 tgtgacaagt gcctgaagtt ctacagcaag atcagcgagt accggcacta ctgctacagc 300
 ctgtacggca ccacctgga gcagcagtac aacaagcccc tgtgtgacct gctgatccgg 360
 tgtatcaact gccagaagcc cctgcagaga cacctggaca agaagcagcg gttccacaac 420
 atcaggggca gatggaccgg cagatgtatg agctgctgcc ggagcagcag aaccagaagg 480
 gagaccacgc tgagaggccg gaagagaaga agccacggcg atacccccac cctgcacgag 540
 tacatgctgg acctgcagcc tgagaccacc gatctgtacg gctacggcca gctgaatgac 600
 agcagcgagg aggaggatga gatcgacggc cctgccggcc aggccgagcc cgacagagcc 660
 cactacaaca tegtacatt ttgtgtgaag tgtgacagca ccctgagact gtgcgtgcag 720
 agcacccacg tggacatcag aacctggag gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 780
 tgtcccatct gctccagaa accctgatga ggggccgc 818

<210> 23

<211> 264

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV基因型16 E6-E7蛋白序列

<400> 23

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

[0028]

His Ser Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu
 20 25 30
 Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 35 40 45
 Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu
 50 55 60
 Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys
 65 70 75 80
 Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp
 100 105 110
 Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu
 115 120 125
 Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg
 130 135 140
 Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150 155 160
 Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
 165 170 175
 Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
 180 185 190
 Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
 195 200 205
 Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
 210 215 220
 Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
 225 230 235 240
 Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
 245 250 255
 Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 260

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HPV E6免疫优势表位

<400> 24
 Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HPV E7免疫优势表位

<400> 25

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
 1 5 10 15

<210> 26

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV E6共有序列

<400> 26

Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys
 20 25 30
 Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu Cys Ile
 35 40 45
 Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
 50 55 60
 Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
 85 90 95
 [0029] Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu Asp Lys
 100 105 110
 Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 115 120 125
 Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 130 135 140

<210> 27

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV E7共有序列

<400> 27

His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro
 1 5 10 15
 Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu
 20 25 30
 Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg
 35 40 45
 Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu
 50 55 60
 Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp
 65 70 75 80

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
 85 90 95
 Pro

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgE前导序列

<400> 28
 Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0030]

<220>
 <223> 蛋白水解切割序列

<400> 29
 Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 1 5

<210> 30
 <211> 1766
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCV基因型1a和1b共有E1-E2 DNA序列

<400> 30
 gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttcctgg tggccgctgc aacacgggtg 60
 cacagctacc aagtgaggaa tagcagcggc ctgtaccacg tgaccaacga ctgctccaac 120
 agcagcatcg tgtacgaggc cgccgacatg atcatgcaca cccccggctg tgtgccctgt 180
 gtgagagagg gcaacagctc cagatgctgg gtggccctga cccctaccgt ggccgcccaga 240
 gatggcagcc tgcccaccac caccctgagg agacacgtgg acctgcttgt gggcagcgcc 300
 accctgtgta gcgcatgta tgtgggcat ctgtgtggca gcgtgtttct tgtgggccag 360
 ctgttcacct tcagccccag aaggcactgg accgtgcagg actgttaactg ctccatctac 420
 cccggccaca tcaccggcca cagaatggcc tgggacatga tgatgaactg gagccctacc 480
 accgacctgg tgggtgccca gctgctgaga atccctcagg ccatcgtgga catggtggcc 540
 ggagcccact ggggcgtgct ggccggcatc gcctacttca gcatggtggg caactgggcc 600
 aaggtgctcg tgggtgctgt gctgttcgcc ggcgtggacg gcagaggcag gaagagaagg 660

```

agcgagaccc acgtgaccgg cggcaccgcc ggcagaacca cagccggcct tgtgggcctg 720
ttcacccctg gcgccaagca gaacatccag ctgatcaaca ccaacggcag ctggcacatc 780
aacagcaccg cctgaactg taacgacagc ctgaacaccg gctggctggc cggcctgttc 840
taccagcaca agttcaacag cagcggctgc cccgagagaa tggccagctg tagacccctg 900
gatgagttcg ccagggtcg gggcccatc acctacgcca atggcagcgg cctgaccag 960
agaccctact gctggcaacta cggcccccaga cctgtggca tcgtgccgc caagagcgtg 1020
tgtggccccg tgtactgctt cacccttagc cccgtggtt tgggcaccac cgacagaagc 1080
ggagccccca cctacagctg gggcgagaac gagaccgacg tgctggtgct gaacaacacc 1140
agaccccccc tgggcaattg gttcggctgt acctggatga acagcaccgg cttcaccaaa 1200
gtgtgtggcg cccctccctg tgtgatcggc ggagtgggca acaacaccct gacctgcccc 1260
accgactgct tcagaaagca ccccgaggcc acctactcca gatgtggcag cggaccttgg 1320
ctgacccccg gatgtatggt ggactacccc tacaggctgt ggcactaccc ctgtaccctg 1380
aacttcacca tcttcaaagt gaggatgtat gtggggggcg tggagcacag actggaggcc 1440
gcctgtaatt ggaccagggg cgagagatgt gacctggagg accgggatag aagcgagctg 1500
tcccctctgc tegtgtccac caccgagtgg caggtgctgc cttgtagctt caccacctg 1560
cccgccctga gcaccggcct gatccactg caccagaaca tcgtggacgt gcagtacctg 1620
tacggagtgg gctctagcat cgtgtcctgg gccatcaagt gggagtacgt ggtgctgctg 1680
ttctgtctgc tggccgacgc cagagtgtgt agctgcctgt ggatgatgct gctgatcagc 1740
caggccgagg cctgatgagc ggccgc 1766

```

<210> 31
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0031] <220>
 <223> HCV基因型1a和1b共有E1-E2蛋白序列

```

<400> 31
Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1          5          10          15
His Ser Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn
          20          25          30
Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met
          35          40          45
His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg
          50          55          60
Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg Asp Gly Ser Leu
65          70          75          80
Pro Thr Thr Thr Leu Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala
          85          90          95
Thr Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe
          100          105          110
Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val
          115          120          125
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
          130          135          140
Met Ala Trp Asp Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
145          150          155          160
Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala
          165          170          175
Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val

```


85

<210> 32
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCV E1共有序列

<400> 32
 Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
 1 5 10 15
 Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
 20 25 30
 Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp
 35 40 45
 Val Ala Leu Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg Asp Gly Ser Leu Pro Thr
 50 55 60
 Thr Thr Leu Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
 85 90 95
 Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val Gln Asp
 100 105 110
 Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
 115 120 125
 Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser
 130 135 140
 Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala Gly Ala
 145 150 155 160
 His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn
 165 170 175
 Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly
 180 185 190

[0033]

<210> 33
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCV E2共有序列

<400> 33
 Glu Thr His Val Thr Gly Gly Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn
 20 25 30
 Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
 35 40 45
 Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp

65 70 75 80
 Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly
 85 90 95
 Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
 100 105 110
 Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
 115 120 125
 Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr
 130 135 140
 Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Val Leu Asn Asn Thr Arg
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
 165 170 175
 Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly
 180 185 190
 Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
 195 200 205
 Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
 210 215 220
 Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
 245 250 255
 Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
 260 265 270
 Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
 [0034] 275 280 285
 Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
 290 295 300
 Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
 325 330 335
 Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
 355 360

<210> 34

<211> 3512

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 34

ggtaccgaat tcgccacat ggactggacc tggatcctgt tcttggtggc cgctgccaca 60
 agagtgcaca gccccagggc cccaggtgc agagccgtgc ggagcctgct gcggagccac 120
 taccgggagg tgctgcccct ggccaccttc gtgcggaggc tgggccctca ggggtggcgg 180
 ctggtgcaga gaggcgacce tgccgccttc agagccctgg tggcccagtg cctggtgtgc 240
 gtgccctggg acgccagacc tcccctgcc gccctagct tccggcaggt gtcctgctg 300
 aaagaactgg tggcccggt gctgcagcgg ctgtgcgaga gggcgccaa gaactgtctg 360
 gccttcggct tcgccctgct ggacggcgcc agaggcgcc ctcccgagge cttaccacc 420
 tccgtgagaa gctacctgcc caacaccgtg accgacgcc tgagaggcag cgcgcttgg 480

[0035]	ggcctgctgc	tgcgcagagt	gggcgacgac	gtgctggtgc	acctgctggc	cagatgcgcc	540
	ctgttcgtgc	tggtcgcccc	cagctgcgcc	taccaggtgt	gcggcccacc	cctgtaccag	600
	ctgggagccg	ccaccaggc	cagacccccct	cctcacgcct	ccggccccag	gcggagactg	660
	ggctgcgagc	gggcctggaa	ccacagcgtg	cgggaggccg	gcgtgccccct	gggcctgccca	720
	gcccctggcg	ccagaagaag	gggcggcagc	gccagcagaa	gcctgccccct	gcccgaagcgg	780
	cccagacgcg	gagccgcccc	tgagcccag	agaacccccg	tgggccaggg	ctcttgggcc	840
	caccttggcc	ggaccagagg	ccccagcgac	cggggcttct	gcgtggtgtc	ccccgccaga	900
	cccggcgagg	aagccacctc	cctggaaggc	gccctgagcg	gcaccaggca	cagccacccc	960
	agcgtgggcc	gccagcacca	cgccggaccc	cccagcacct	ccaggccccc	caggccctgg	1020
	gacaccccct	gccccctgt	gtacgcccag	accaagcact	tcctgtacag	cagcggcgac	1080
	aaagagcagc	tgcggcccag	cttcctgctg	tccagcctga	ggccctccct	gaccggcgct	1140
	aggcgcttg	tggagaccat	ctttctgggc	agccggccct	ggatgcccgg	cacccccagg	1200
	cggctgccc	ggctgccc	gcgtacttg	cagatgagc	ctctgttct	ggaactgctg	1260
	ggcaaccacg	cccagtgc	ctacggcgtg	ctgctgaaaa	cccactgccc	cctgagagcc	1320
	gccgtgacct	cagccgccc	agtgtgcgc	agagagaagc	ctcagggcag	cgtggccgct	1380
	cccaggaag	aggacaccga	ccccagacgc	ctggtgcagc	tgtgcggca	gcacagcagc	1440
	ccttgccagg	tgtacggctt	cgtgcgggcc	tgctgagaa	ggctggtgcc	ccctggcctg	1500
	tggggcagca	ggcacaacga	gcggcggttt	ctgcggaaca	ccaagaagtt	catcagcctg	1560
	gggaagcacg	ccaagctgtc	cctgcaggaa	ctgacctgga	agatgagcgt	gcggggctgc	1620
	gcctggctga	gaagatcccc	tgccgtgggc	tgctgcctg	ccgcccagca	ccgctgcgg	1680
	gaggaaatcc	tggccaagtt	cctgcactgg	ctgatgagcg	tgtacgtggt	ggagctgctg	1740
	agatccttct	tctacgtgac	cgagaccacc	tccagaaga	actacctgtt	cttctaccgg	1800
	aagagcgtgt	ggagcaagct	gcagagcatc	ggcatccggc	agcacctgaa	gcgggtgcag	1860
	ctgagagagc	tgtccgaggc	cgaagtgagg	cagcacccgg	aggccagacc	tgccctgctg	1920
	accagccggc	tgcggttcat	ccccaaagccc	gacggcctgc	ggcccatcgt	gaacatggac	1980
	tacgtggtgg	gcgccaggac	cttcggcgcc	gagaagccgg	ccgagccgct	gacctcgagg	2040
	gtgaaggccc	tgttcagcgt	gtgaactac	gagcgggcca	ggcgccagg	cctgctgggc	2100
	gccagcgtgc	tggccctgga	cgacatccac	cggccctggc	ggaccttcgt	gctgagagtg	2160
	cgggcccagg	acccccctcc	cgagctgtac	tctgtgaagg	tggacgtgac	aggcgccctac	2220
	gacaccatcc	cccaggaccg	gctgaccgag	gtgatcgcca	gcacatcaa	gccccagaa	2280
	acctactgcg	tgcggagata	cgccgtggtg	cagaaggccg	cccacggcca	cgtgcggaag	2340
	gccttcaaga	gccacgtgag	cacctgacc	gacctgcagc	cctacatgcg	gcagttcgtg	2400
	gcccacctgc	aggaaaccag	ccccctgcgg	gatgccgtgg	tgatcgagca	gagcagcagc	2460
	ctgaacgagg	ccagcagcgg	cctgttcgac	gtgttctga	gattcatgtg	ccaccacgcc	2520
	gtgcggatcc	ggggcaagag	ctacgtgcag	tgccagggca	tcccacaggg	cagcatcctg	2580
	tccacctgc	tgtgtccct	gtgctacggc	gacatggaaa	acaagctgtt	cgccggcatc	2640
	aggcgggacg	gactgctgct	gagactggtg	gacgacttcc	tgtggtgac	ccccacctg	2700
	accacgcca	agacctttct	gcggacctg	gtgcgcggcg	tgcccagagta	cggtgcgtg	2760
	gtgaacctga	gaaagaccgt	ggtgaacttc	cccgtggagg	acgaggccct	gggcggcaca	2820
	gccttcgtgc	agatgcctgc	ccatggactg	tcccttgggt	gcgggctgct	gctggacacc	2880
	cggacctg	aagtgcagag	cgactacagc	agctacgcc	ggaccagcat	ccgggcctcc	2940
	ctgaccttca	acaggggctt	caaggccggc	aggaacatgc	ggcggaagct	gtttggcgtg	3000
	ctgcggctga	agtgccacag	cctgtttctg	tacctgcagg	tgaacagcct	gcagaccgtg	3060
	tgcaccaaca	tctacaagat	cctgctgctg	caggcctacc	ggttccacgc	ctgcgtgctg	3120
	cagctgcctt	ttaccagca	ggtgtggaag	aacctacct	tcttctgcg	ggtgatcagc	3180
	gacaccgcca	gcctgtgcta	cagcatcctg	aaggccaaga	acgccggcat	gagcctgggc	3240
	gccaagggag	ccgcccagcc	tctgcccagc	gaggccgtgc	agtggctgtg	ccaccaggcc	3300
	tttctgctga	agctgaccgg	gcaccgggtg	acctacgtgc	ccctgctggg	cagcctgcgg	3360
	accgcccaga	cccagctgtc	ccggaagctg	cctggcaacca	ccctgacagc	cctggaagcc	3420
	gccgccaacc	ccgcctgcc	ctccgacttc	aagaccatcc	tggactaccc	ctacgacgtg	3480
	cccgactacg	cctgatgagc	ggccgcgagc	tc			3512

<210> 35
 <211> 1158
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

 <400> 35
 Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15
 His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg
 20 25 30
 Ser His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu
 35 40 45
 Gly Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe
 50 55 60
 Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg
 65 70 75 80
 Pro Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu
 85 90 95
 Leu Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn
 100 105 110
 Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro
 115 120 125
 Pro Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val
 130 135 140
 Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg
 145 150 155 160
 Val Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe
 165 170 175
 Val Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu
 180 185 190
 Tyr Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser
 195 200 205
 Gly Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val
 210 215 220
 Arg Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg
 225 230 235 240
 Arg Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg
 245 250 255
 Arg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser
 260 265 270
 Trp Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys
 275 280 285
 Val Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly
 290 295 300
 Ala Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His
 305 310 315 320
 His Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr
 325 330 335
 Pro Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser
 340 345 350
 Gly Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg
 355 360 365

[0036]

[0037]

```

Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly
  370                      375                      380
Ser Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro
 385                      390                      395                      400
Gln Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn
                      405                      410                      415
His Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu
                      420                      425                      430
Arg Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro
                      435                      440                      445
Gln Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg
                      450                      455                      460
Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly
 465                      470                      475                      480
Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly
                      485                      490                      495
Ser Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile
                      500                      505                      510
Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys
                      515                      520                      525
Met Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly
                      530                      535                      540
Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys
 545                      550                      555                      560
Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser
                      565                      570                      575
Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Tyr Leu Phe Phe
                      580                      585                      590
Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln
                      595                      600                      605
His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg
                      610                      615                      620
Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 625                      630                      635                      640
Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val
                      645                      650                      655
Val Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr
                      660                      665                      670
Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg
                      675                      680                      685
Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
                      690                      695                      700
Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro
 705                      710                      715                      720
Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr
                      725                      730                      735
Ile Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
                      740                      745                      750
Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala
                      755                      760                      765
His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr
                      770                      775                      780

```

[0038]

```

Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr
785              790              795              800
Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn
              805              810              815
Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His
              820              825              830
His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile
              835              840              845
Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly
              850              855              860
Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu
865              870              875              880
Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His
              885              890              895
Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly
              900              905              910
Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp
              915              920              925
Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu
              930              935              940
Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln
945              950              955              960
Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr
              965              970              975
Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe
              980              985              990
Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Tyr Leu Gln Val
              995              1000              1005
Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu
              1010              1015              1020
Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe
              1025              1030              1035
His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile
              1040              1045              1050
Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn
              1055              1060              1065
Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro
              1070              1075              1080
Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys
              1085              1090              1095
Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
              1100              1105              1110
Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr
              1115              1120              1125
Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp
              1130              1135              1140
Phe Lys Thr Ile Leu Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
              1145              1150              1155

```

<210> 36
 <211> 1707
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 流感H5N1 HA共有序列

<400> 36

atggaaga tcgtgctgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc 60
atcggtacc acgccaacaa cagcaccgag caggtggaca ccatcatgga aaaaaacgtg 120
accgtgacc acgcccagga catcctggaa aagaccaca acggcaagct gtgcgacctg 180
gacggcgtga agcccctgat cctgcgggac tgcagcgtgg ccggtggct gctgggcaac 240
cccattgtcg acgagttcat caacgtgcc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac 300
cccgtgaacg acctgtgcta ccccgccgac ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg 360
ctgtcccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggtccagc 420
cacaggcca gcctggcgt gagcagcgc tggccatacc agggcaagtc cagcttcttc 480
cggaacgtgg tgtggtgat caagaagaac agcacctacc ccaccatcaa gcggagctac 540
aacaacacca accaggaaga tctgtggtc ctgtggggca tccaccacc caacgacgcc 600
gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
ctgaaccagc ggctggtgcc ccggtcgcc acccggtcca aggtgaacgg ccagagcggc 720
cggtggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgat ccataactt cgagagcaac 780
ggcaacttca tgcggccga gtacgcctac aagatcgtga agaaggcgga cagcaccatc 840
atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc 900
atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc caccctga ccatcggcga gtgccccaa 960
tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggc accggcctgc ggaacagccc ccagcgggag 1020
cggcgggccc cggccgggg cctgttcggc gccatcgcc gctcatcga ggcggctgg 1080
caggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcagg cagcggctac 1140
gccggcaga aagagagcac ccagaaggcc atcgacggc tcaccaacaa ggtgaacagc 1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggc gggagttcaa caacctggaa 1260
cggcggatcg agaacctgaa caagaaatg gaagatggct tctggacgt gtggacctac 1320
aacgccgagc tgcgtggtg gatggaaaac gagcggaccc tggacttcca cgacagcaac 1380
gtgaagaacc tgtacgaaa agtgcggctg cagctcgccc acaacgcaa agagctgggc 1440
aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac 1500
ggcactacg actaccccca gtacagcag gagcccggc tgaagcggga ggaaatcagc 1560
ggcgtgaaac tggaaagcat cggcatctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620
agcagcctgg ccttgccat catggtggc ggccctgagc tgtggatgtg cagcaacggc 1680
agcctgcagt gccggtctg catctag 1707

[0039]

<210> 37

<211> 568

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 流感H5N1 HA共有序列

<400> 37

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30
Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45
Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys

50	55	60
Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn		
65	70	75
Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val		80
	85	90
Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn		95
	100	105
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu		110
	115	120
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser		125
	130	135
Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe		140
	145	150
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile		155
	160	165
Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp		170
	175	180
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln		185
	190	195
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg		200
	205	210
Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly		215
	220	225
Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn		230
	235	240
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile		245
	250	255
Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly		260
	265	270
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser		275
	280	285
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys		290
	295	300
Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser		305
	310	315
Pro Gln Arg Glu Arg Arg Ala Ala Ala Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile		320
	325	330
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr		335
	340	345
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys		350
	355	360
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser		365
	370	375
Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe		380
	385	390
Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp		395
	400	405
Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met		410
	415	420
Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu		425
	430	435
Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly		440
	445	450
	455	460

[0040]

```

465          470          475          480
Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
          485          490          495
Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
          500          505          510
Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
          515          520          525
Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
          530          535          540
Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545          550          555          560
Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
          565

```

<210> 38

<211> 1466

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 流感H1N1和H5N1 NA共有序列

<400> 38

[0041]

```

ggtaccgaat tgcaccat ggactggacc tggatcctgt tectggtggc cgctgccacc 60
cgggtgcaca gcatgaaccc caaccagaag atcatcacca tcggcagcat ctgcatggtg 120
atcggcacg tgagcctgat gctgcagatc ggcaacatga tcagcatctg ggtgtccacc 180
agcatccaga ccggcaacca gcaccaggcc gagcccatca gcaacaccaa cttctgacc 240
gagaaggccg tggccagcgt gaccctggcc ggcaacagca gcctgtgcc catcagcggc 300
tgggccgtgt acagcaagga caacagcatc cggatcgga gcaaggcgga cgtgttcgtg 360
atccgggagc ccttcacag ctgcagccac ctggaatgcc ggaccttctt cctgaccag 420
ggggccctgc tgaacgacaa gcacagcaac ggacccgtga aggacagaag cccctaccgg 480
accctgatga gctgccccgt gggcgaggcc cccagcccct acaacagccg gttcgagagc 540
gtggcctggt ccgccagcgc ctgccacgac ggacccagct ggctgacct cggcacagc 600
ggccctgaca acggcgccgt ggccgtgctg aagtacaacg gcatcatcac cgacaccatc 660
aagagctggc ggaacaacat cctgcggacc caggaaagcg agtgcgctg cgtgaacggc 720
agctgcttca cctgatgac cgacggcccc agcaacggcc aggccagcta caagatctt 780
aagatgaaa agggcaaggt ggtgaagagc gtggagctgg acgccccaa ctaccactac 840
gaggaatgca gctgctaccc cgacgccggc gagatcacct gcgtgtgcc ggacaactgg 900
cacggcagca accggccctg ggtgtccttc aaccagaacc tggaatacca gatcggtac 960
atctgcagcg gcgtgttcgg cgacaacccc aggcccaacg atggcaccgg cagctgcggc 1020
cctgtgagcg ccaacggcgc ctacggcgtg aaggccttca gcttcaagta cggcaacggc 1080
gtgtggatcg gccggaccaa gagaccaac agcagatccg gcttcgagat gatctgggac 1140
cccaacggct ggaccgagac cgacagcagc ttcagcgtga agcaggacat cgtggccatc 1200
accgactggt ccgctacag cggcagcttc gtgcagcacc ccgagctgac cggcctggac 1260
tgcacccggc cctgcttttg ggtggagctg atcagaggca ggcccaaaga gagcaccatc 1320
tggaaccagc gcagcagcat cagcttttgc ggcgtgaaca gcgacaccgt gagctggtcc 1380
tgccccgacg gcgccgagct gcccttcacc atcgacaagt acccctacga cgtgccccgac 1440
tacgcctgat gagcgccgc gagctc 1466

```

<210> 39

<211> 476

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 流感H1N1和H5N1 NA共有序列

<400> 39

[0042] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15
His Ser Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys
20 25 30
Met Val Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile
35 40 45
Ser Ile Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala
50 55 60
Glu Pro Ile Ser Asn Thr Asn Phe Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser
65 70 75 80
Val Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala
85 90 95
Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val
100 105 110
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg
115 120 125
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
130 135 140
Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro
145 150 155 160
Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala
165 170 175
Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly
180 185 190
Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly
195 200 205
Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr
210 215 220
Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met
225 230 235 240
Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met
245 250 255
Glu Lys Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr
260 265 270
His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys
275 280 285
Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe
290 295 300
Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe
305 310 315 320
Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val
325 330 335
Ser Ala Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly
340 345 350
Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly
355 360 365

Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp Ser Ser
 370 375 380
 Phe Ser Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile
 405 410 415
 Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser
 420 425 430
 Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser
 435 440 445
 Asp Thr Val Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr
 450 455 460
 Ile Asp Lys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 465 470 475

<210> 40

<211> 875

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 流感H1N1和H5N1 M1共有序列

<400> 40

[0043]

ggtaccggat cegccacat ggactggacc tggattctgt tectgggtggc cgctgccacc 60
 cgggtgcaca gcatgagcct gctgaccgag gtggagacct acgtgctgtc catcateccc 120
 agcggccctc tgaaggccga gatcgcccag cggctggaag atgtgttcgc cggcaagaac 180
 accgacctgg aagccctgat ggaatggctg aaaaccggc ccatcctgag cccctgacc 240
 aaggcatcc tgggttcgt gttcacctg accgtgcca gcgagcggg cctgcagcgg 300
 cggagattcg tgcagaacgc cctgaacggc aacggcgacc ccaacaacat ggaccggggc 360
 gtgaagctgt acaagaagct gaagcgggag atcaccttc acggcgccaa agaggtggcc 420
 ctgagctaca gcacaggcgc cctggccagc tgcattggcc tgatctacaa ccggatgggc 480
 accgtgacca ccgaggtggc cttcggcctg gtgtgcgcca cctgcgagca gatcgccgac 540
 agccagcaca gatccaccg gcagatggc accaccacca acccctgat ccggcacgag 600
 aaccgatgg tctggcctc caccaccgc aaggccatgg aacagatggc cggcagcagc 660
 gagcaggccg ccgaagccat ggaagtggc agccaggcca ggcagatggt gcaggccatg 720
 cggaccatcg gcaccaccc cagcagcagc gccggactgc gggacgacct gctggaaaac 780
 ctgcaggcct accagaaacg gatgggcgtg cagatgcagc ggttcaagta cccctacgac 840
 gtgcccgaact acgcctgatg agcggccgcg agctc 875

<210> 41

<211> 279

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 流感H1N1和H5N1 M1共有序列

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15
 His Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile

	20	25	30
	Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp		
	35	40	45
	Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu		
	50	55	60
	Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe		
	65	70	75
	Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg		
	85	90	95
	Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp		
	100	105	110
	Arg Ala Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His		
	115	120	125
	Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser		
	130	135	140
	Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val		
	145	150	155
	Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln		
	165	170	175
	His Arg Ser His Arg Gln Met Ala Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg		
	180	185	190
	His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu		
	195	200	205
	Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala		
	210	215	220
[0044]	Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His		
	225	230	235
	Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln		
	245	250	255
	Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys Tyr Pro		
	260	265	270
	Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala		
	275		
<210>	42		
<211>	1700		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	流感H5N1 M2E-NP共有序列		
<400>	42		
	ggtaccgaat tcgccaccat ggactggacc tggatcctgt tcttggtcgc tgccgccacc	60	
	agggtgcaca gcagcctgct gaccgaggig gagaccccca cccggaacga gtggggctgc	120	
	cgggtgcagcg acagcagcga ccggggcagg aagcggagaa gcgccagcca gggcaccaag	180	
	cggagctacg agcagatgga aacaggcggc gagcggcaga acgccaccga gatccgggcc	240	
	agcgtgggca gaatggtcgg cggcatcggc cgttctaca tccagatgtg caccgagctg	300	
	aagctgtccg actacgaggg ccggctgata cagaacagca tcaccatcga gcggatggtg	360	
	ctgtccgcct tcgacgagcg gcggaacaga tacctggaag agcaccaccag cgccggcaag	420	
	gacccaaga aaaccggcgg accatctac cggcggaggg acggcaagtg ggtgcgggag	480	
	ctgatcctgt acgacaaaga ggaaatccgg cggatctggc ggcaggccaa caacggcgag	540	

```

gacgccacag cgggctgac ccacctgatg atctggcaca gcaacctgaa cgacgccacc 600
taccagcggg caagggtctt ggtccggacc ggcatggacc cccggatgtg cagcctgatg 660
cagggcagca cactgcccag aagaagcggg gccgctggcg cagccgtgaa gggcgtgggc 720
accatggtga tggaactgat ccgatgatac aagcggggca tcaacgaccg gaatttttg 780
agggcgagga acggcaggcg gaccggatc gcctacgagc ggatgtgcaa catcctgaag 840
ggcaagttec agacagccgc ccagcgggccc atgatggacc aggtccggga gagccggaac 900
cccggcaacg ccgagatcga ggacctgatc ttcttgccca gaagcgccct gatcctgcgg 960
ggcagcgtgg cccacaagag ctgcctgccc gccctgcgtg acggactggc cgtggccagc 1020
ggctacgact tcgagcggga gggctacagc ctggtcggca tcgacccctt ccggtgctg 1080
cagaactccc aggtgttcag cctgatccgg cccaacgaga accccgccc aagtcccg 1140
ctggtctgga tggcctgcca cagcgccgc ttcgaggatc tgagagttag cagcttcac 1200
cggggcacca gattggtgcc cagggccag ctgtccacca gggcggtgca gatgccagc 1260
aacgagaaca tggaagccat ggacagcaac accctggaac tgcggagccg gtactgggc 1320
atccggacca gaagcggcgg caacaccaac cagcagcggg ccagcggcgg acagatcagc 1380
gtgcagccca cttctccgt gcagcggaac ctgcccttcg agagggccac catcatggcc 1440
gccttcaccg gcaacaccga gggccggacc agcgacatgc ggaccgagat catcaggatg 1500
atggaagcgg ccaggcccga ggacgtgagc ttccagggca gggcggtgtt cgagctgtcc 1560
gatgagaagg ccaccaaccc catcgtgccc agcttcgaca tgaacaacga gggcagctac 1620
ttcttcggcg acaacgcga ggaatacgac aactaccctc acgacgtgcc cgactacgcc 1680
tgatgagcgg ccgcgagctc

```

<210> 43

<211> 554

<212> PRT

<213> 人工序列

[0045]

<220>

<223> 流感H5N1 M2E-NP共有序列

<400> 43

```

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

```

[0046]

Thr	Ala	Gly	Leu	Thr	His	Leu	Met	Ile	Trp	His	Ser	Asn	Leu	Asn	Asp
180						185						190			
Ala	Thr	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg	Ala	Leu	Val	Arg	Thr	Gly	Met	Asp	Pro
195						200						205			
Arg	Met	Cys	Ser	Leu	Met	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Arg	Arg	Ser	Gly
210						215						220			
Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Gly	Val	Gly	Thr	Met	Val	Met	Glu	Leu
225						230						235			
Ile	Arg	Met	Ile	Lys	Arg	Gly	Ile	Asn	Asp	Arg	Asn	Phe	Trp	Arg	Gly
245						250						255			
Glu	Asn	Gly	Arg	Arg	Thr	Arg	Ile	Ala	Tyr	Glu	Arg	Met	Cys	Asn	Ile
260						265						270			
Leu	Lys	Gly	Lys	Phe	Gln	Thr	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Met	Met	Asp	Gln
275						280						285			
Val	Arg	Glu	Ser	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	Ala	Glu	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile
290						295						300			
Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Leu	Arg	Gly	Ser	Val	Ala	His	Lys
305						310						315			
Ser	Cys	Leu	Pro	Ala	Cys	Val	Tyr	Gly	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Tyr
325						330						335			
Asp	Phe	Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Val	Gly	Ile	Asp	Pro	Phe	Arg
340						345						350			
Leu	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Val	Phe	Ser	Leu	Ile	Arg	Pro	Asn	Glu	Asn
355						360						365			
Pro	Ala	His	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Trp	Met	Ala	Cys	His	Ser	Ala	Ala
370						375						380			
Phe	Glu	Asp	Leu	Arg	Val	Ser	Ser	Phe	Ile	Arg	Gly	Thr	Arg	Val	Val
385						390						395			
Pro	Arg	Gly	Gln	Leu	Ser	Thr	Arg	Gly	Val	Gln	Ile	Ala	Ser	Asn	Glu
405						410						415			
Asn	Met	Glu	Ala	Met	Asp	Ser	Asn	Thr	Leu	Glu	Leu	Arg	Ser	Arg	Tyr
420						425						430			
Trp	Ala	Ile	Arg	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asn	Gln	Gln	Arg	Ala
435						440						445			
Ser	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Val	Gln	Pro	Thr	Phe	Ser	Val	Gln	Arg	Asn
450						455						460			
Leu	Pro	Phe	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Met	Ala	Ala	Phe	Thr	Gly	Asn	Thr
465						470						475			
Glu	Gly	Arg	Thr	Ser	Asp	Met	Arg	Thr	Glu	Ile	Ile	Arg	Met	Met	Glu
485						490						495			
Ser	Ala	Arg	Pro	Glu	Asp	Val	Ser	Phe	Gln	Gly	Arg	Gly	Val	Phe	Glu
500						505						510			
Leu	Ser	Asp	Glu	Lys	Ala	Thr	Asn	Pro	Ile	Val	Pro	Ser	Phe	Asp	Met
515						520						525			
Asn	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr	Phe	Phe	Gly	Asp	Asn	Ala	Glu	Glu	Tyr	Asp
530						535						540			
Asn	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala						
545						550									

```

1 MDWTWILFLVAAATRVHSRKVSGIRKNYQHLWRWGTIMLLGMLMICSAAEKLNVTIVYGVFVWKEATITLFCASDAKAYDTEVHNWATHAC EY2E1-B
1 MDWTWILFLVAAATRVHS-----E-EKLNVTIVYGVFVWKEATITLFCASDAKAHHAHAHNWATHAC EK2P-B

91 VPTDPNPQEVVLENVTENFMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLVVTLNCT-----DLSGEKMEKGEIKND3FN EY2E1-B
63 VPTDPNPQEVILENVTEKYNMKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLVVTLNCTNATYTNSSDKNSTSNSSLEDSGKGDMM-3SFD EK2P-B

167 ITTSIRDKVQKEYALEFYKLDVVPIDNDNTSYRLISQNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNLKKFNGTGPCTNVSTVQCTHG EY2E1-B
152 VTTSIDKKKKTEVAIFDKLDVWNIQNG--RYTLLNCTSVITQACPKMSFEPIPIHYCTPAGVAILKCNNDKFNKGCTNVSTIQCTHG EK2P-B

257 IRPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENFTNNAKTIIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKSIHIGPGQAFYTTGEIIGDIRQAHCHISRAKWN EY2E1-B
240 IKPVVSTQLLNGSLAEGGEVIRSENLTNDNAKTIIVQLKEPVEINCTRPNNNTRKSIHMGPGAFTARGEVIGDIRQAHCHISRGWWD EK2P-B

346 TLKQIVKKLREQFGNKTIVFNQSSGGRPRIVMHSFNGGGEFFYCNTIQLFNSTWNVNGTWNNTIEG---NDTITLPCRIKQIINMWQEVG EY2E1-B
330 TLKQIAKKLREQF-NKTIISLNQSSGGDLIIVMHTFNGGGEFFYCNTIQLFNSTWNEIDTWNNTAGSNMNETITLPCRIKQIINFWQEVG EK2P-B

433 KAMYAPPPIRQIRCSNITGLLLTRDGGNNMTNETEIFRPGGGMDRDNRRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKARRVVQREKRAVGIGAMFL EY2E1-B
419 KAMYAPPISGPINCLSNITGLLLTRDGGDNN-NTIETFRPGGGMDRDNRRSELYKYKVVRIEPLGIAPTAKARRVVQREKRAVGIGAMFL EK2P-B

523 GFLGAAGSTMGAAASMTLTVOARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLLGINGCSGKLCITTTVPW EY2E1-B
508 GFLGAAGSTMGAAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARVLAMERYLKDQQLLGINGCSGKLCITTTVPW EK2P-B

613 NASWSNKSLEIWDNMTWMEWEREIONYTSLIYTLIEESQSQEKEQEELLELDKWSLWNVFDITNWLWYIKIFIMIVGGLIGLRIVFA EY2E1-B
598 NASWSNKSLEDKIWNMTWMEWDREIONYTKLIYTLIEASQIQEKEQEELLELDKWSLWNVFDISKWLWYIGVETIIVIGGLVGLKIVFA EK2P-B

703 VLSIYPYDVPDYA EY2E1-B
688 VLSIVNRVRQVTRV EK2P-B
****

```

图1

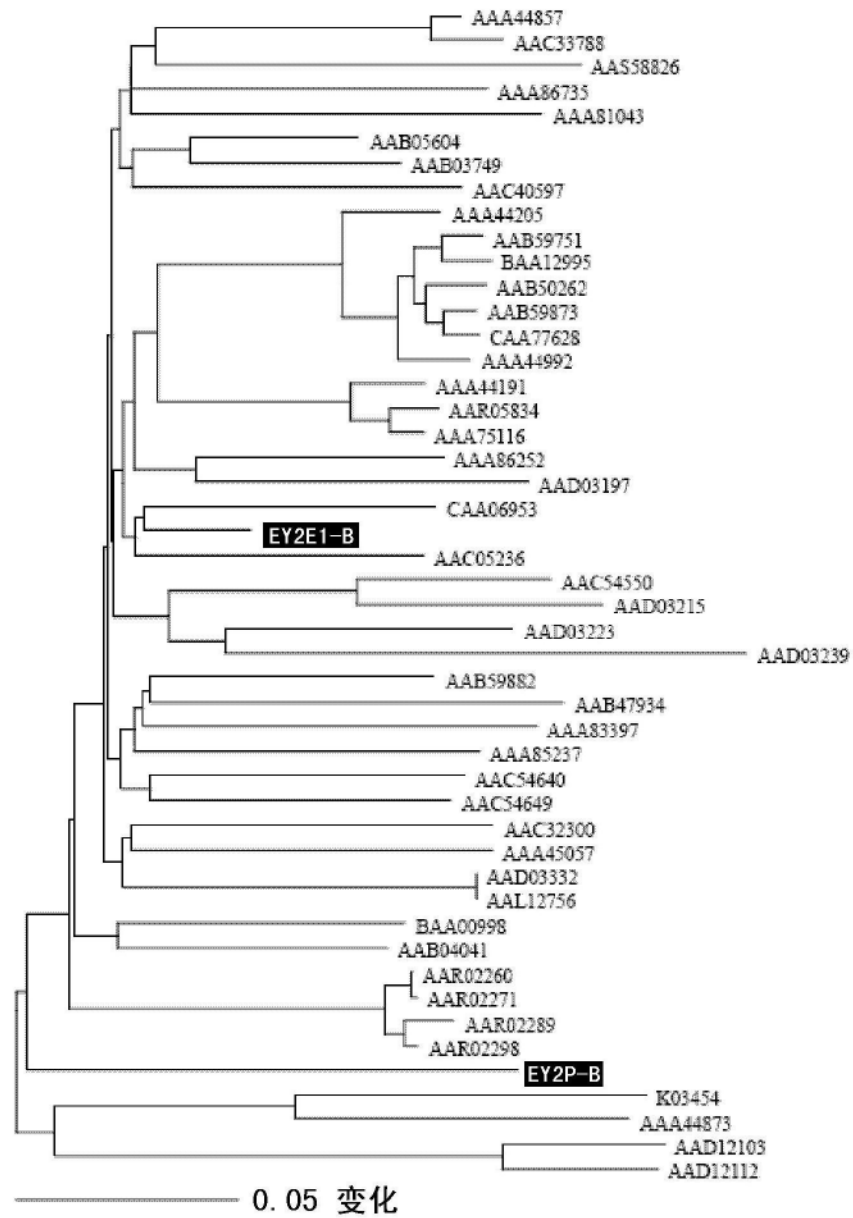


图2

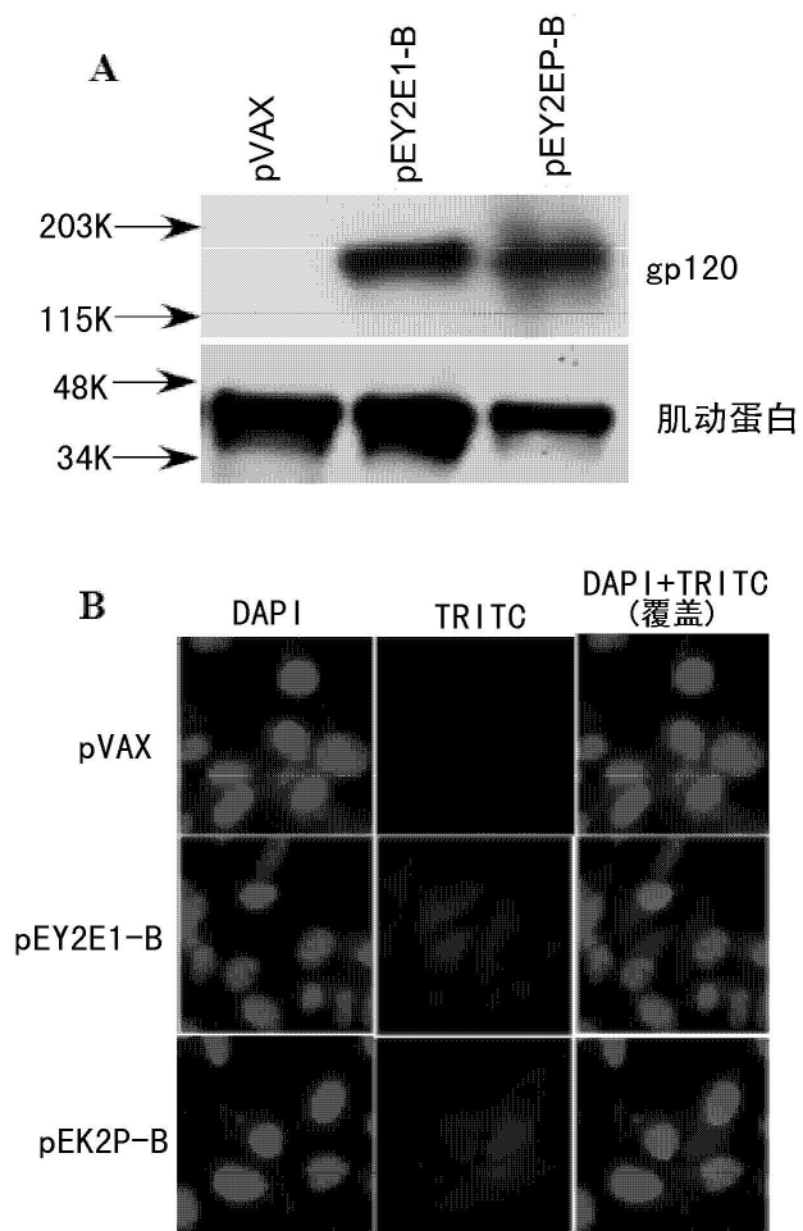


图3

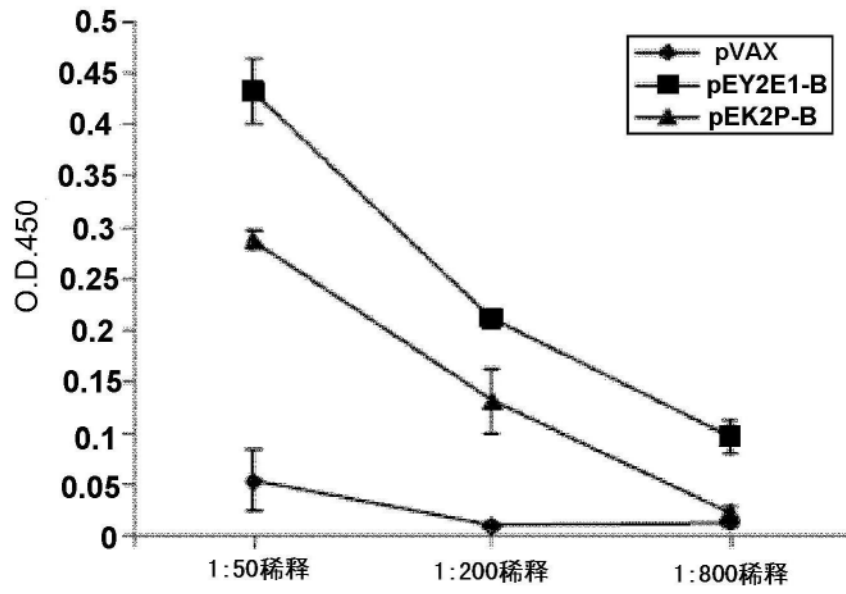


图4A

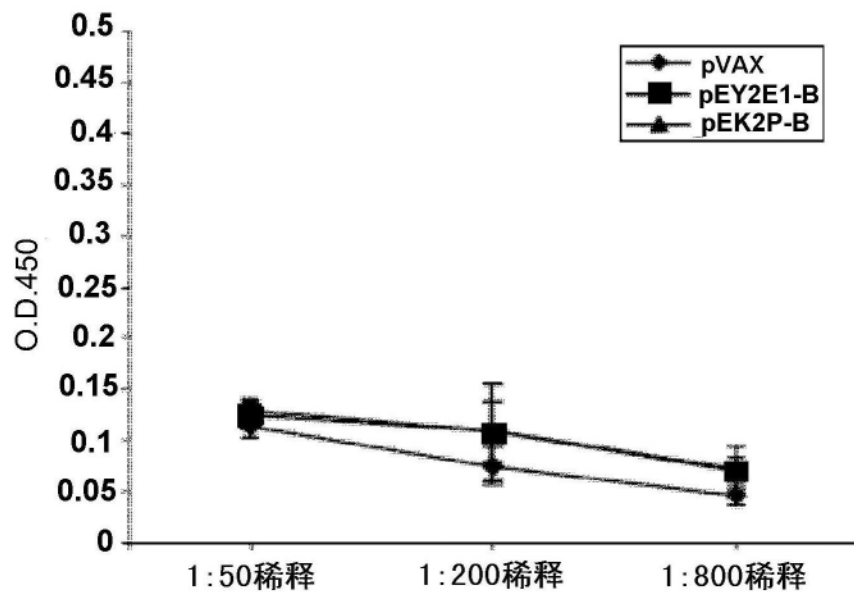


图4B

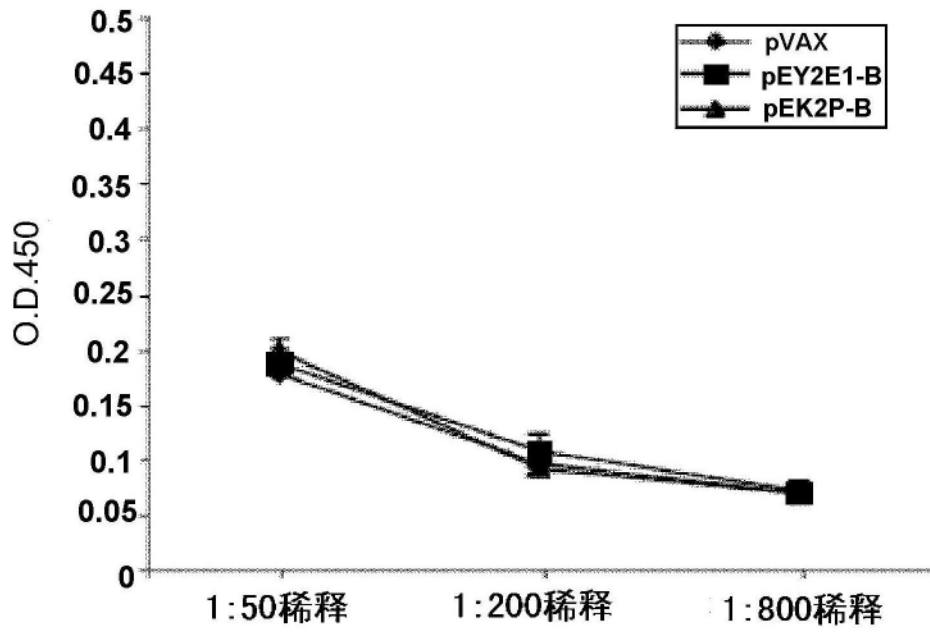


图4C

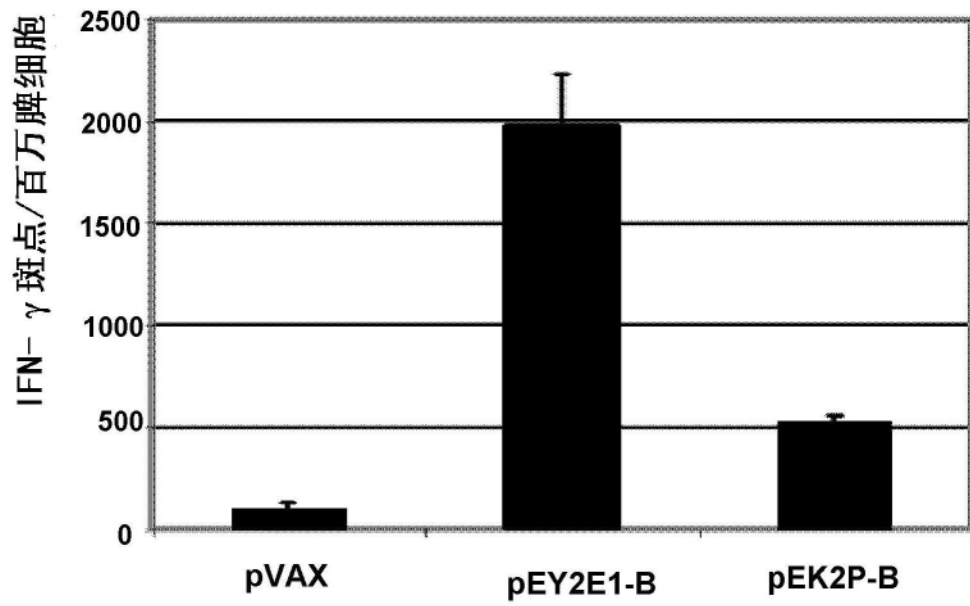


图5A

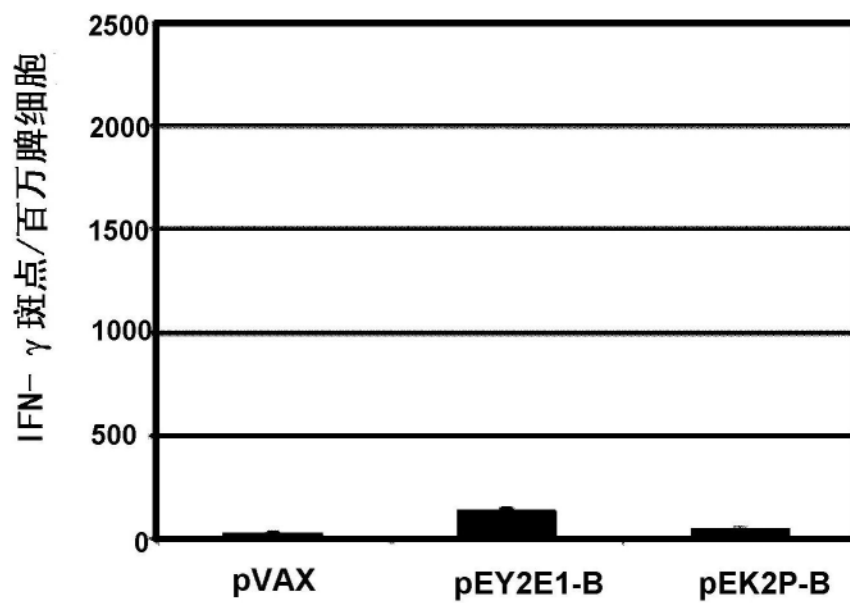


图5B

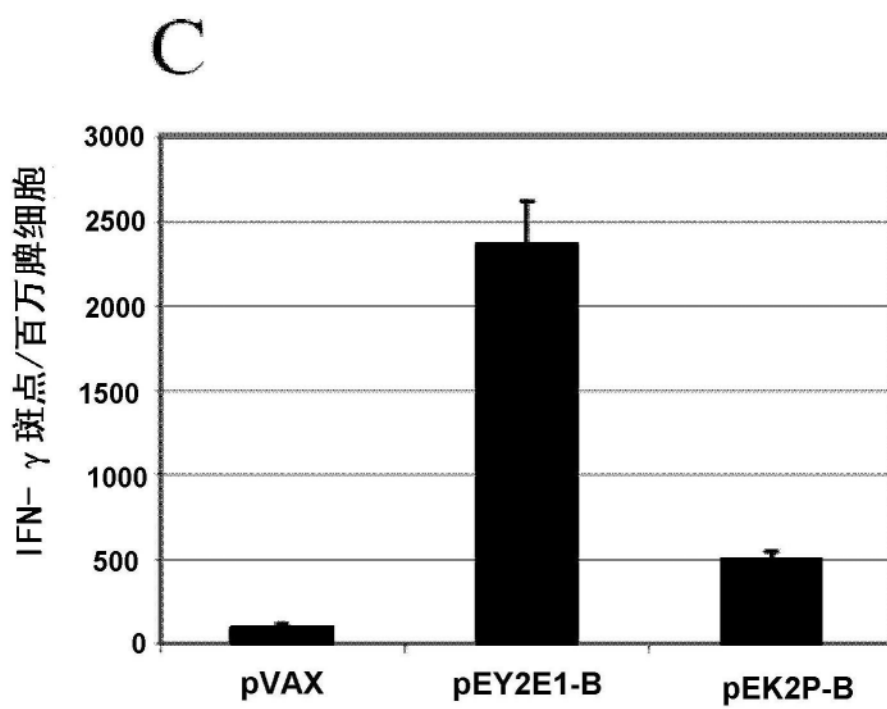


图5C

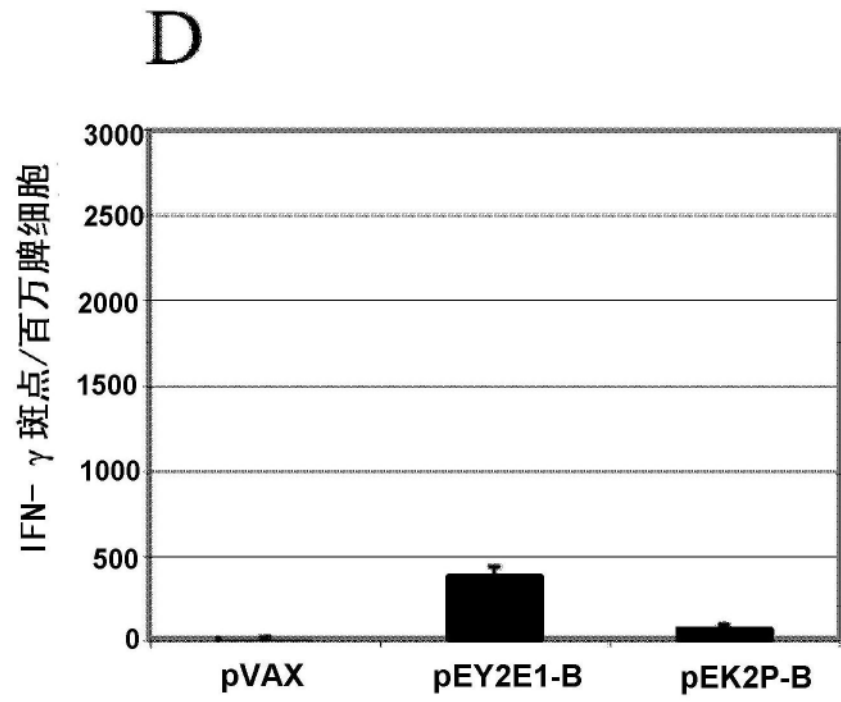


图5D

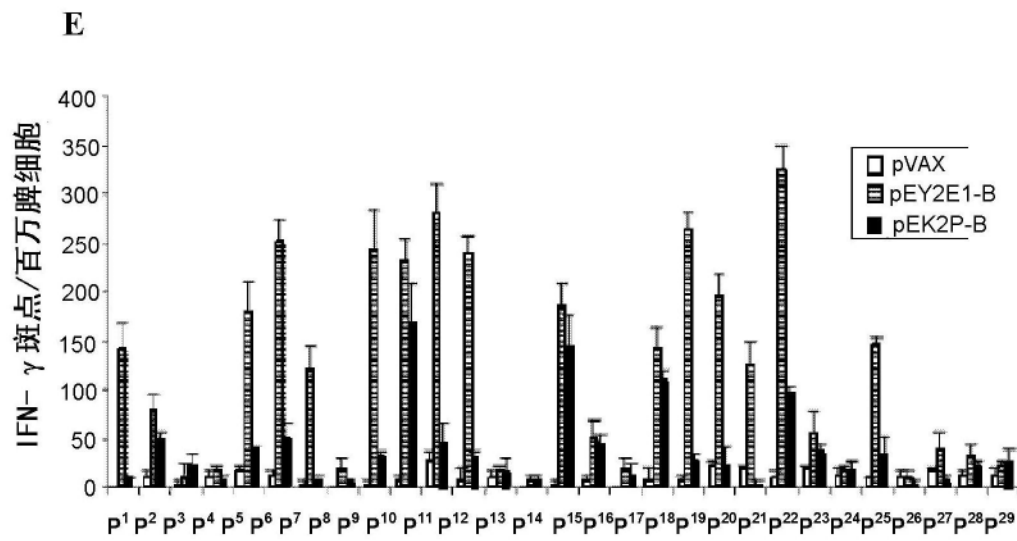


图5E

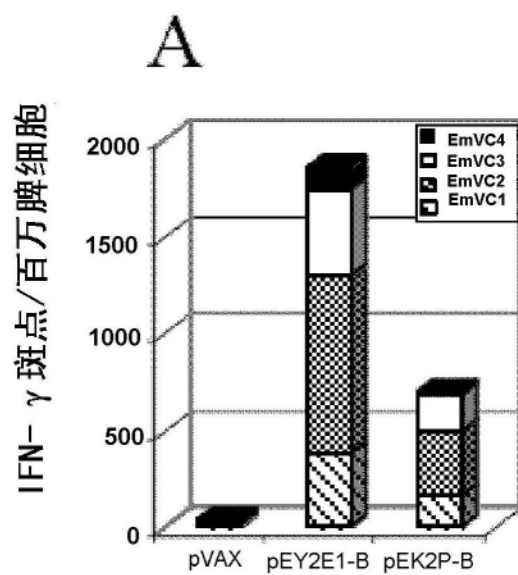


图6A

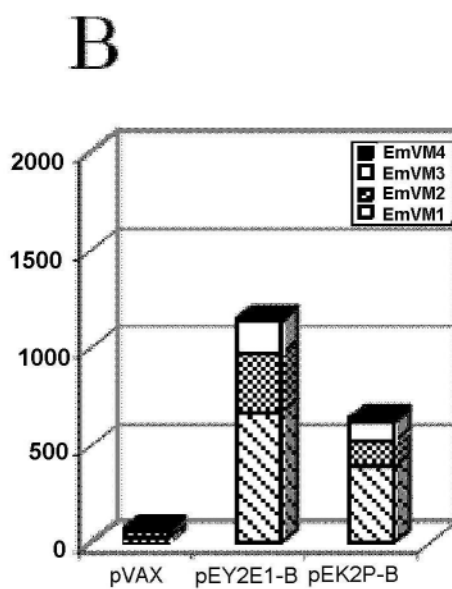


图6B

C

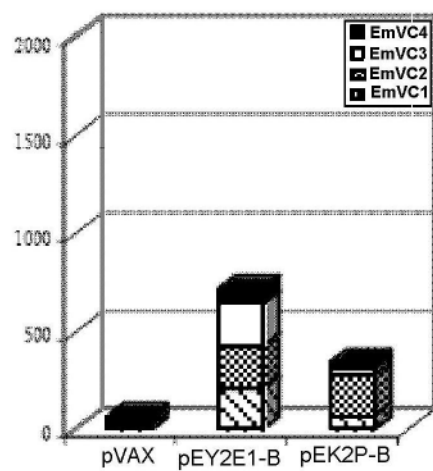


图6C

D

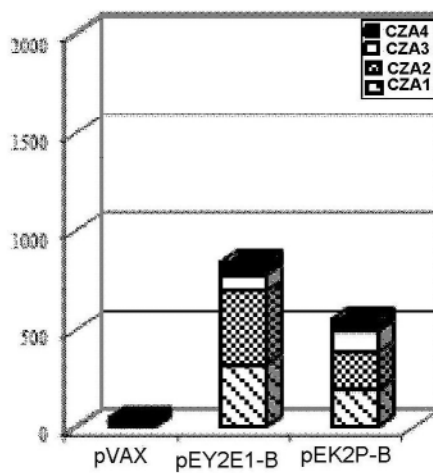


图6D

E

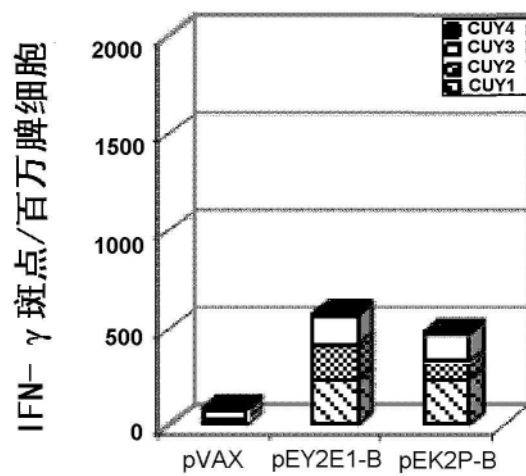


图6E

F

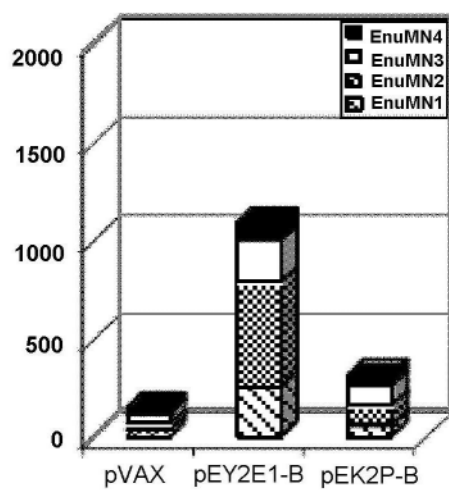


图6F

G

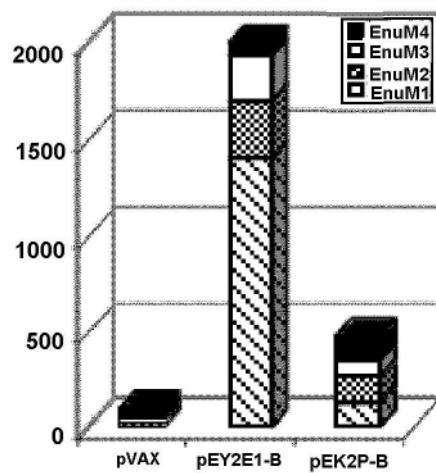


图6G

H

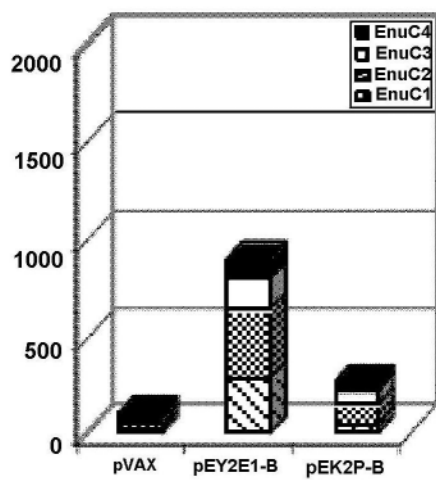


图6H

I

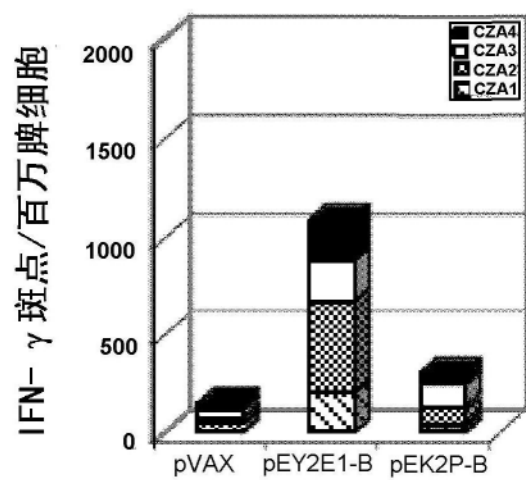


图6I

J

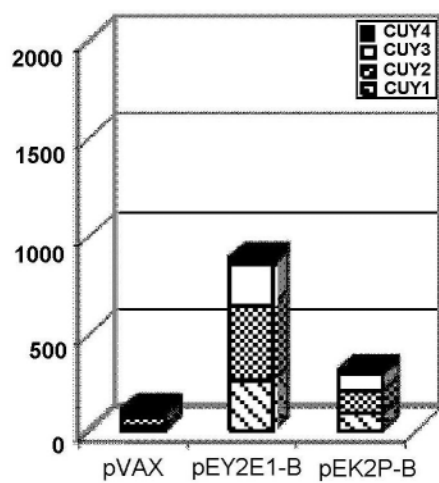


图6J

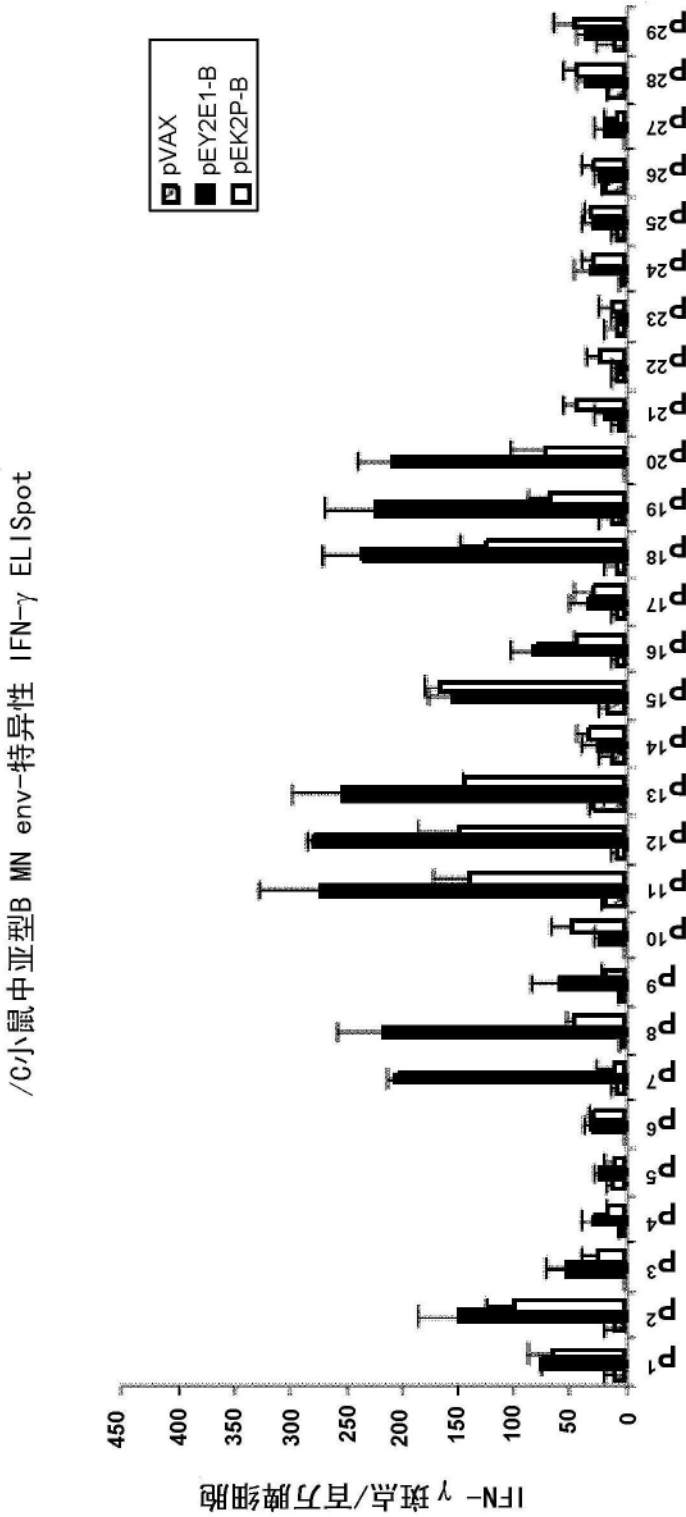


图7A

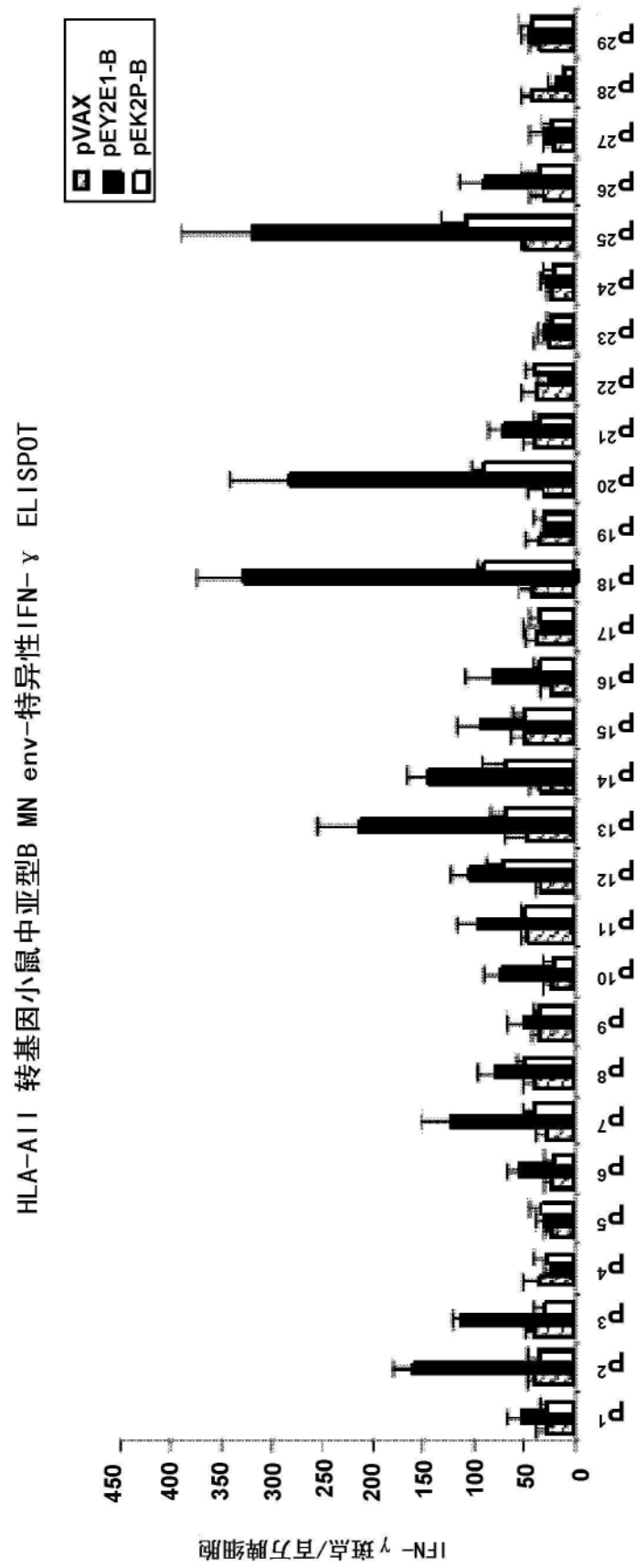


图7B

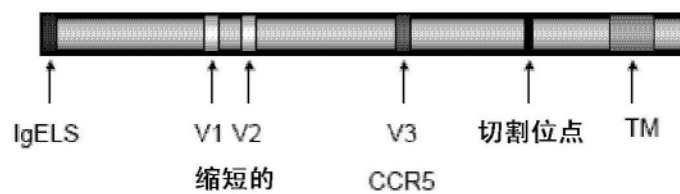


图8

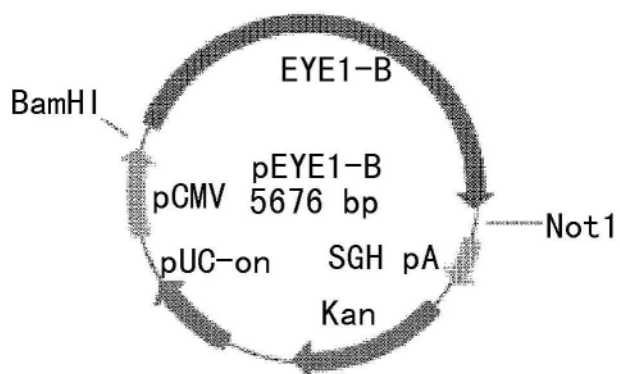


图9

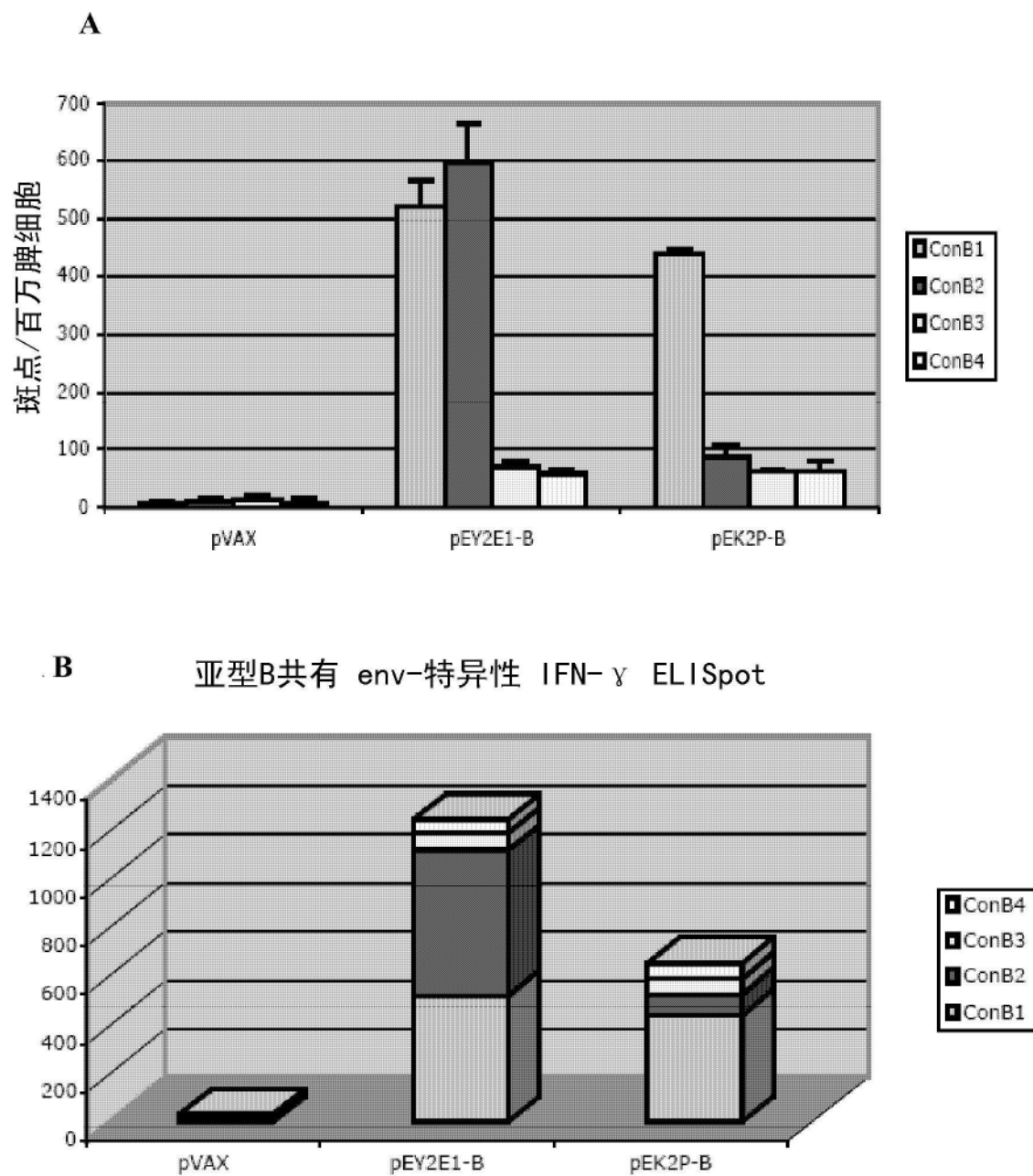
亚型B共有 env-特异性 IFN- γ ELISpot

图10

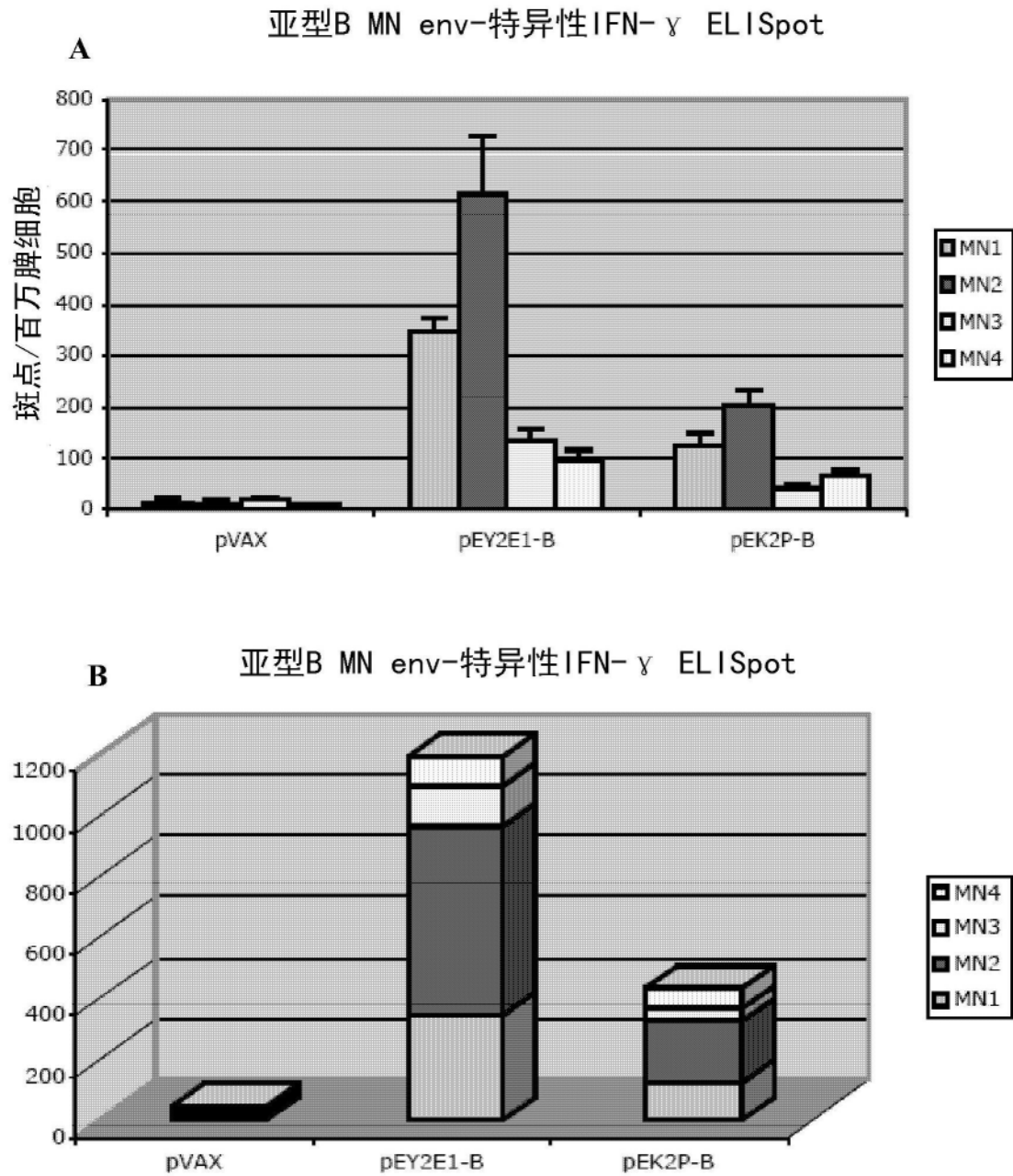


图11

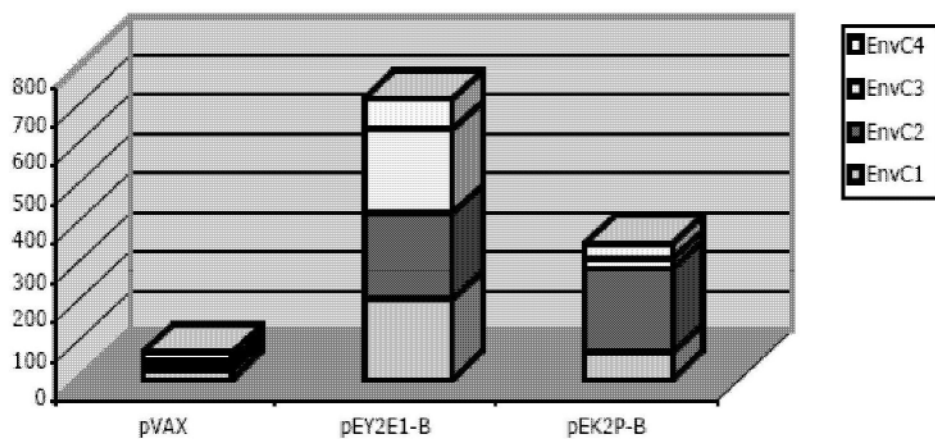
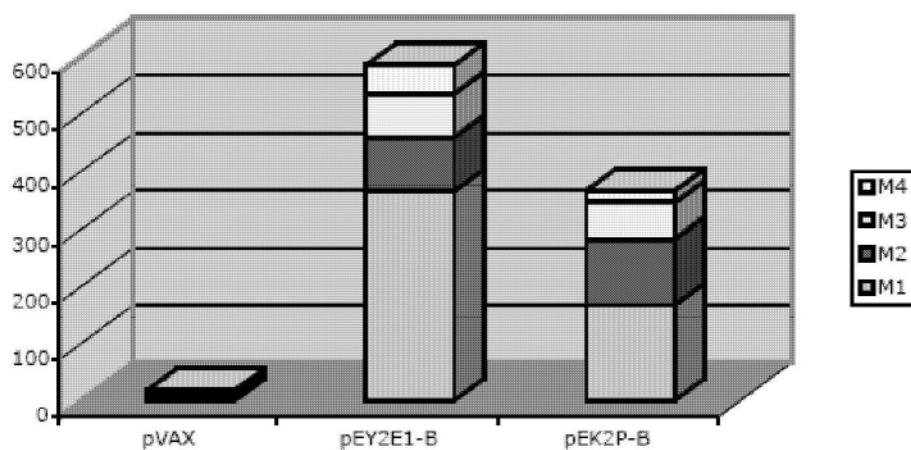
A亚型C共有env-特异性IFN- γ ELISpot**B**M群env-特异性IFN- γ ELISpot

图12

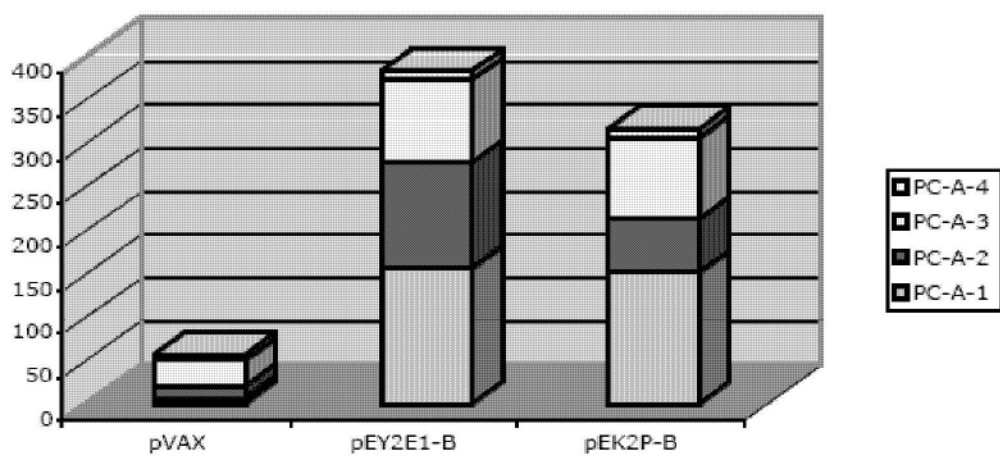
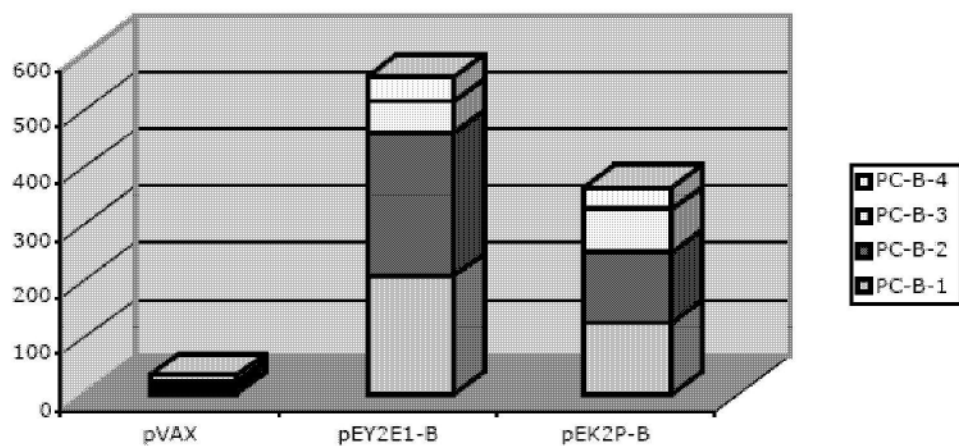
C亚型C C1. C. UY. 01. TRA3011 env-特异性IFN- γ ELISpot**D**亚型C C. ZA. 01. J54Ma env-特异性IFN- γ ELISpot

图12

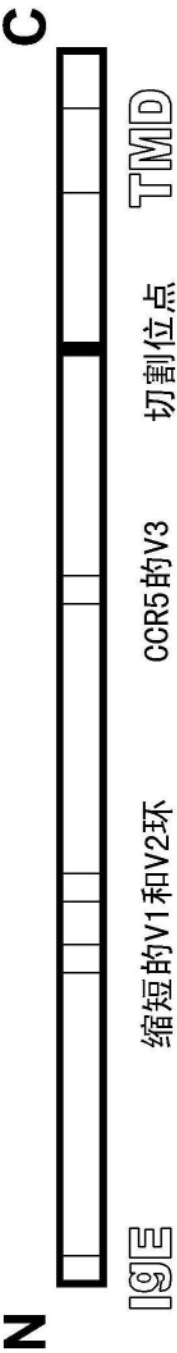


图13

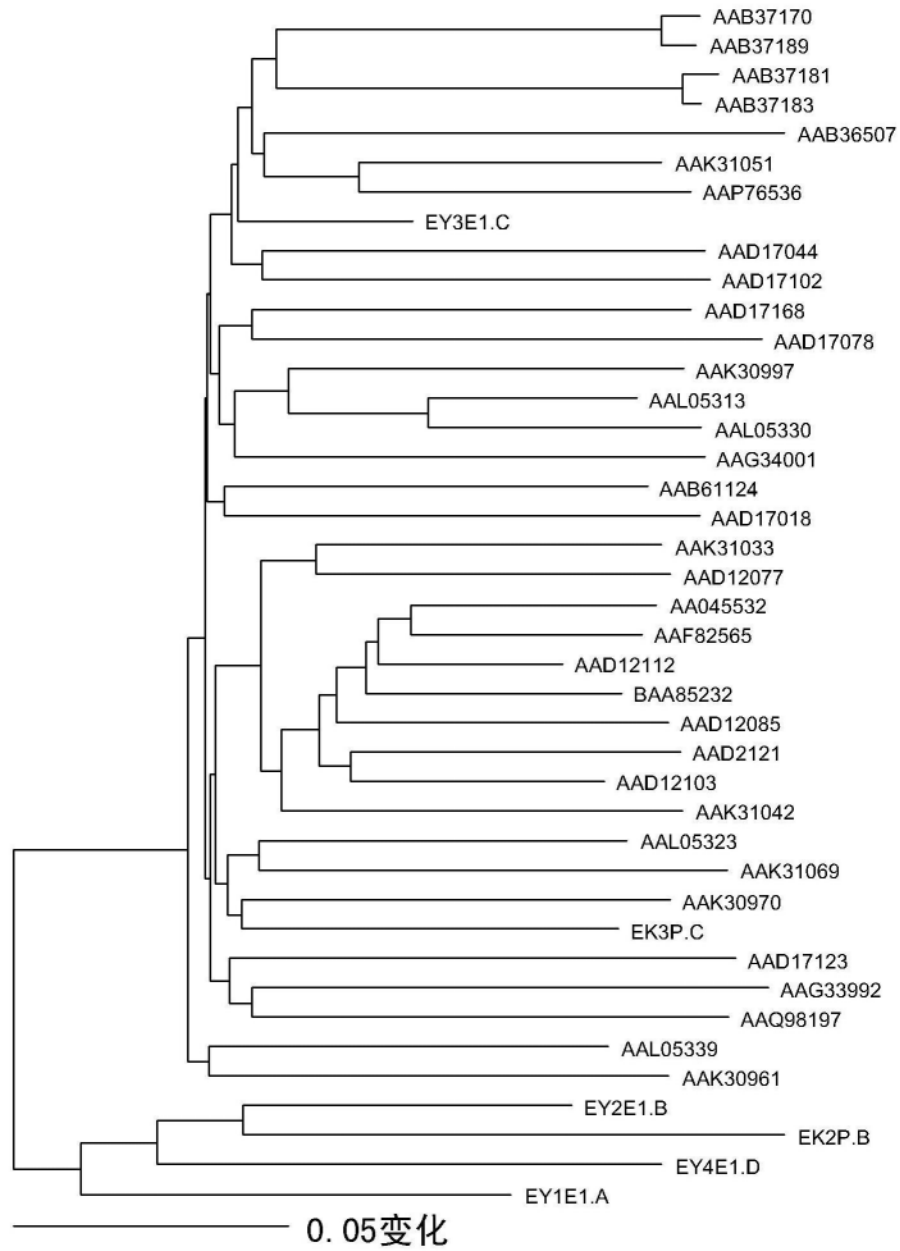


图14

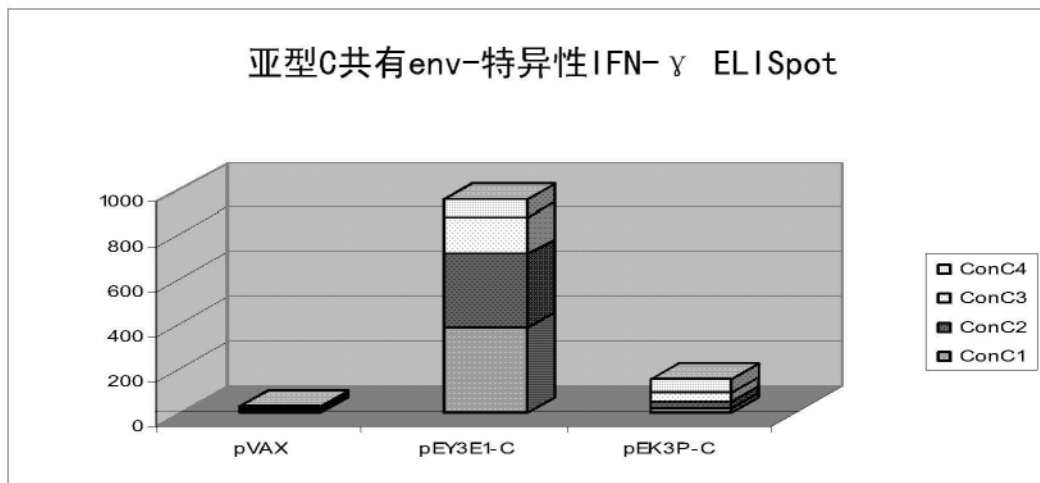
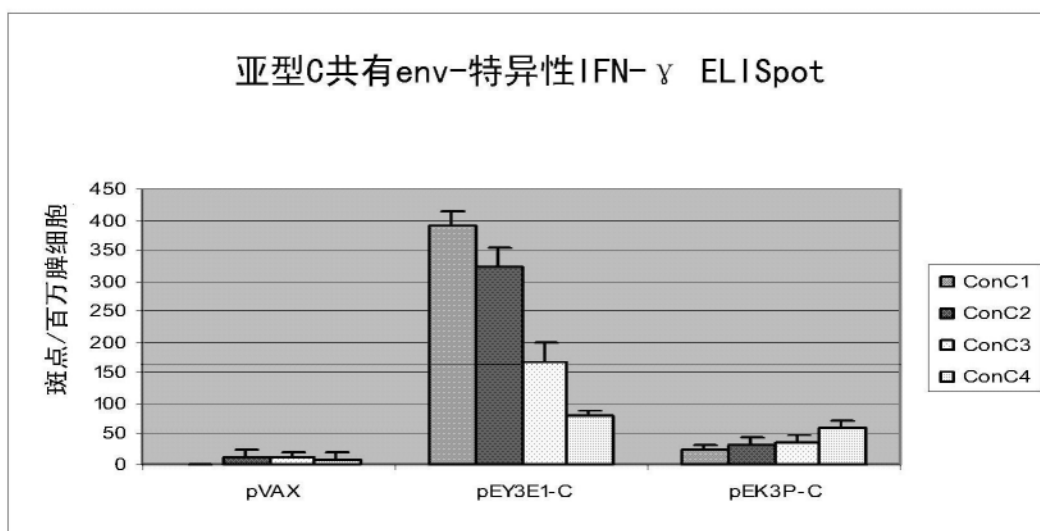
A**B**

图15

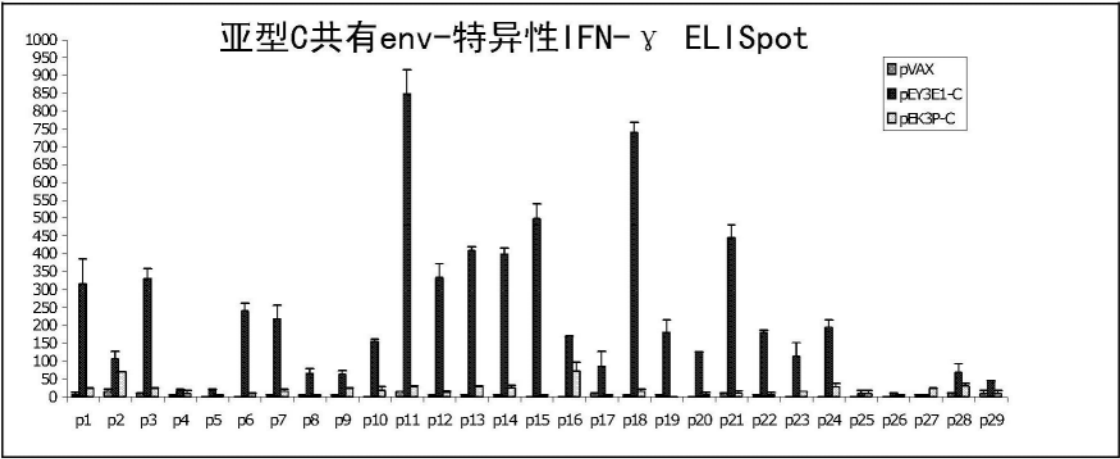


图16

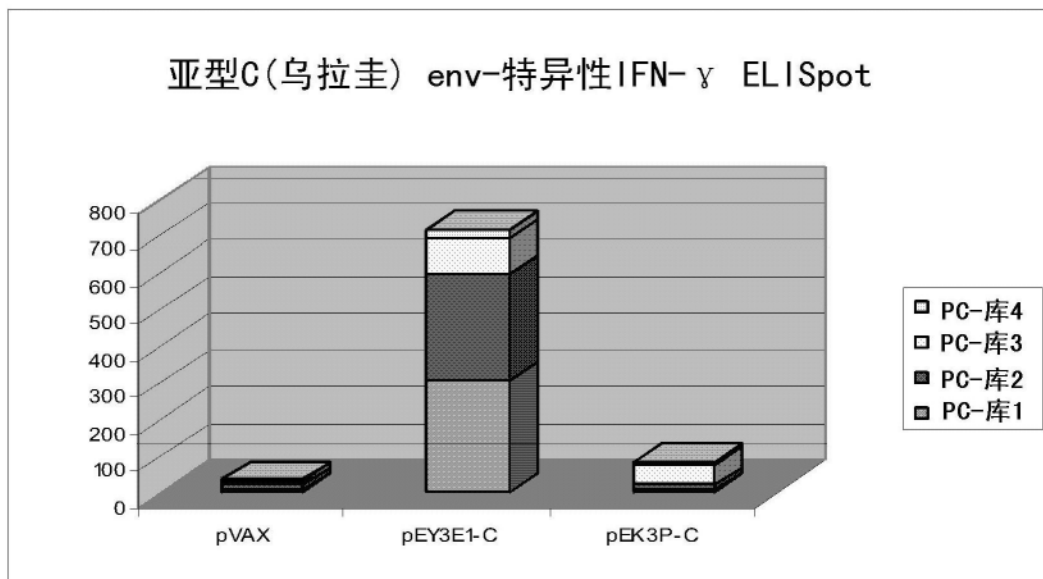
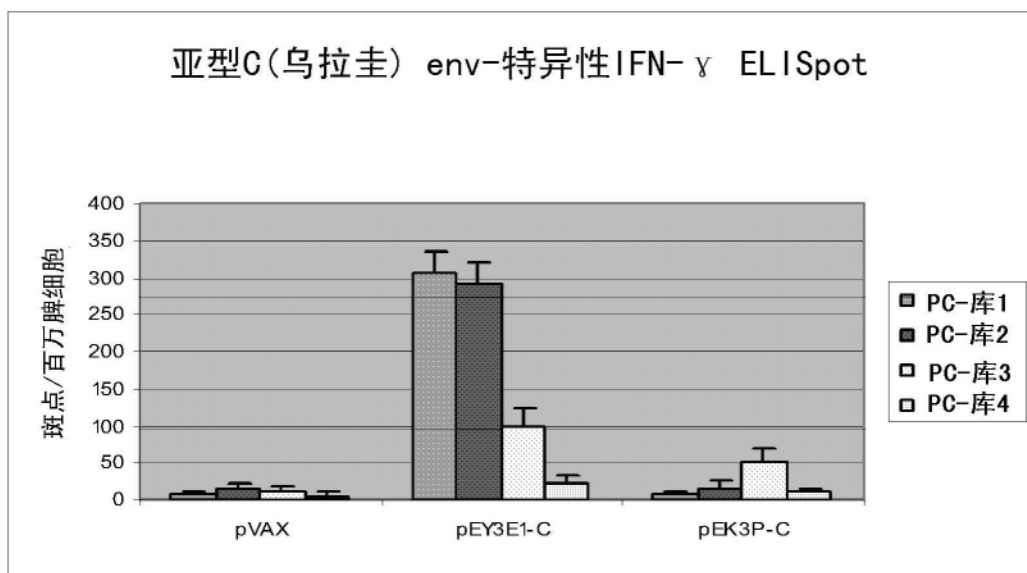
A**B**

图17

C

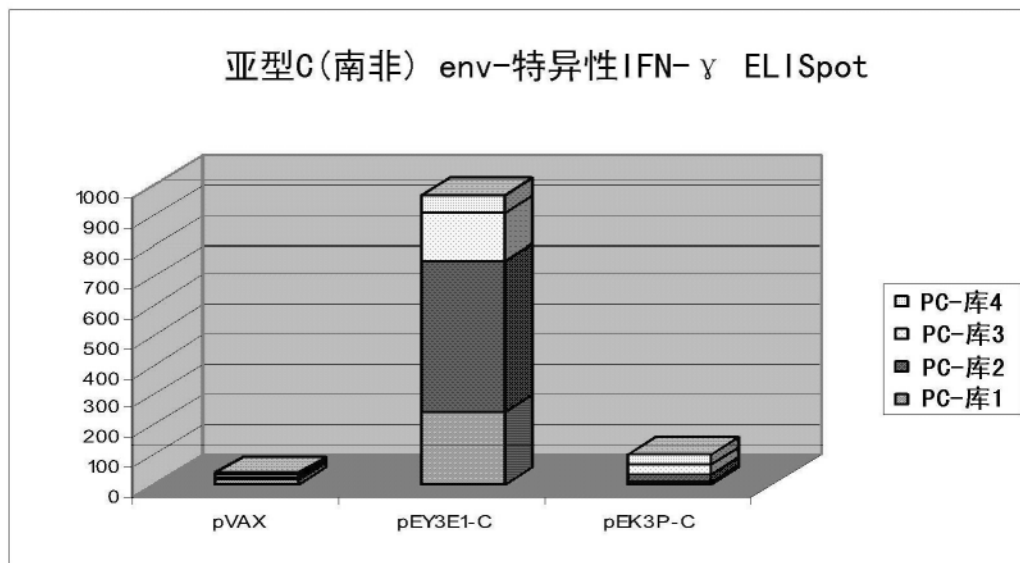


图17C

D

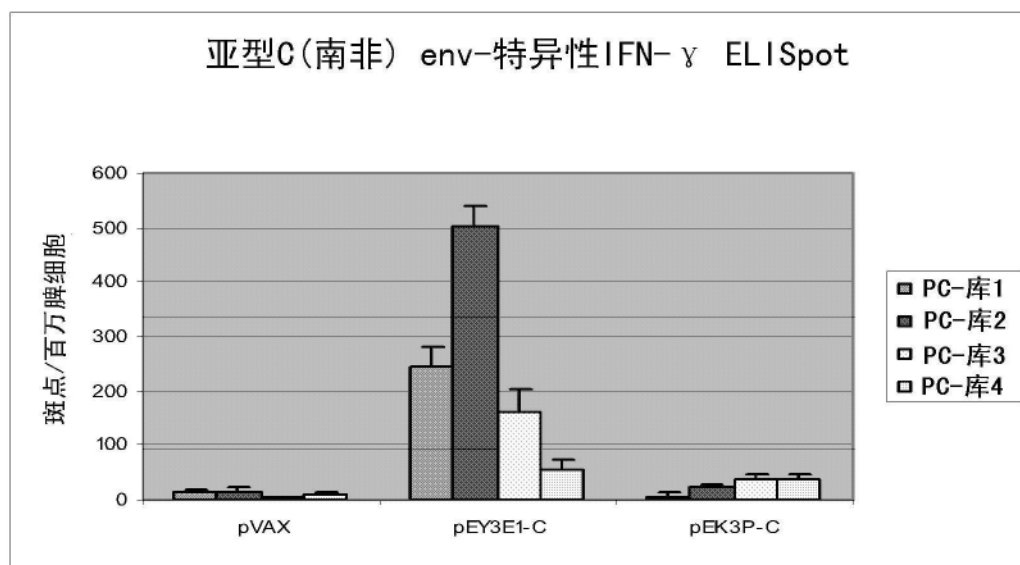


图17D

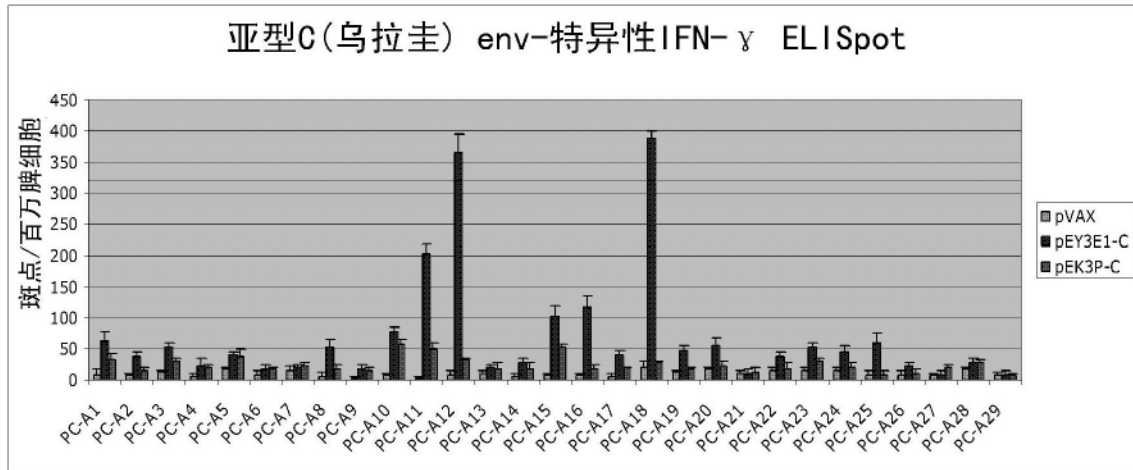
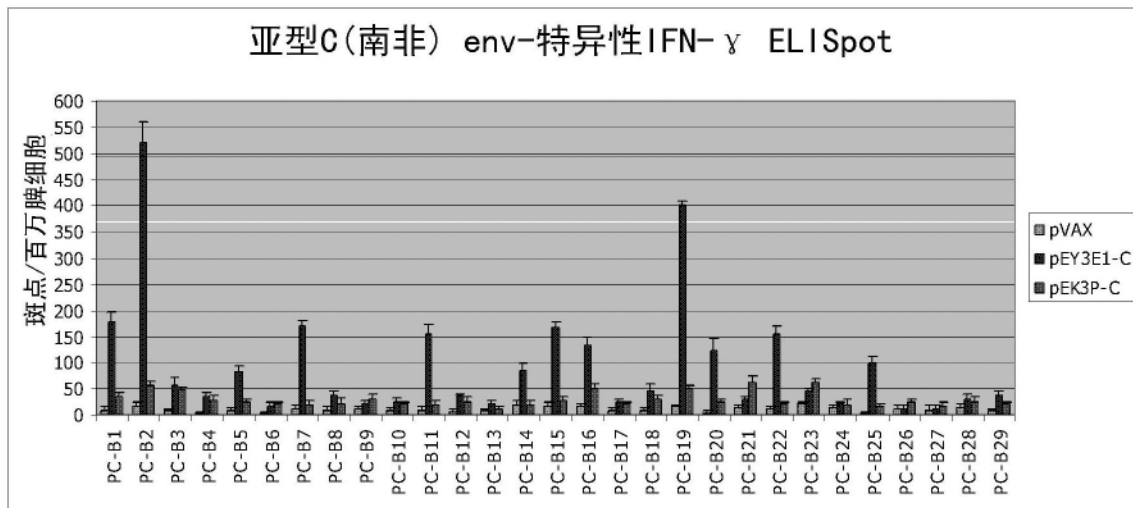
A**B**

图18

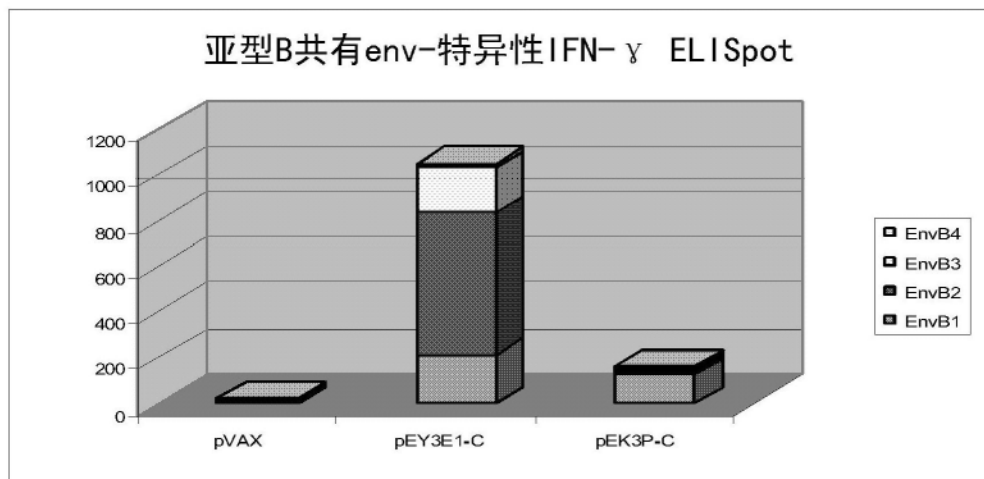
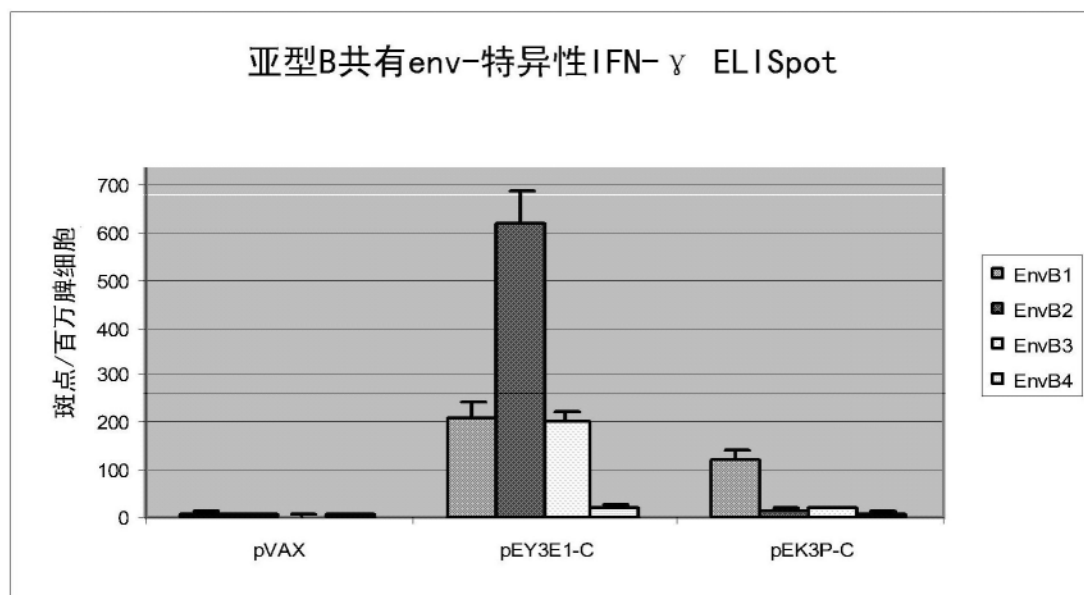
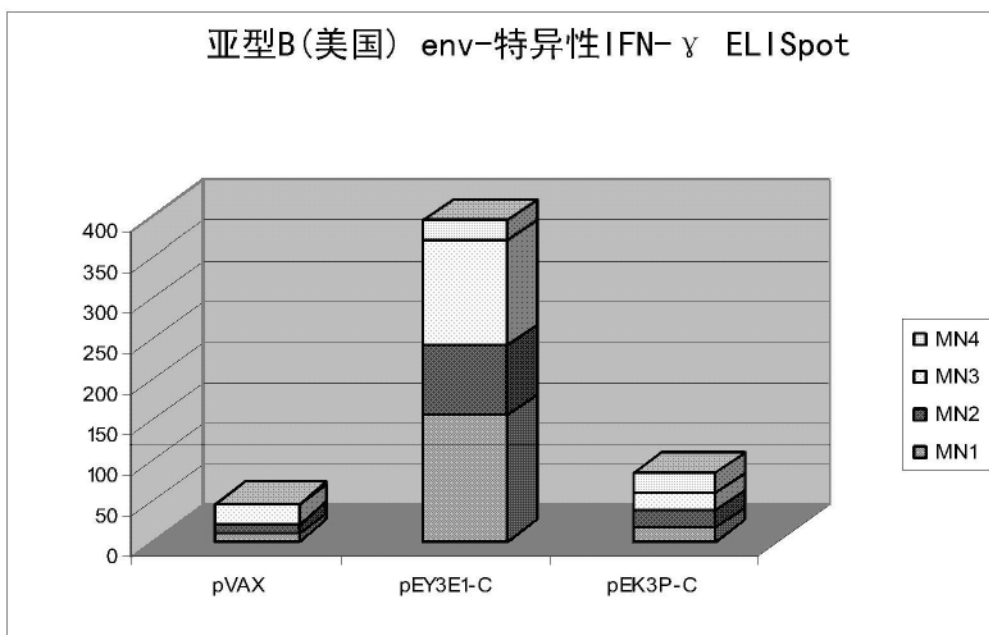
A**B**

图19

C



D

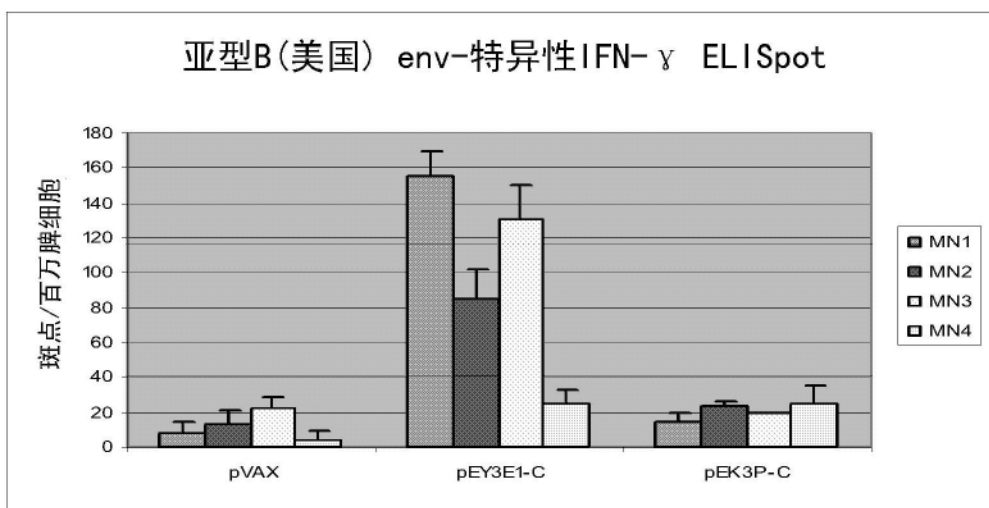


图19

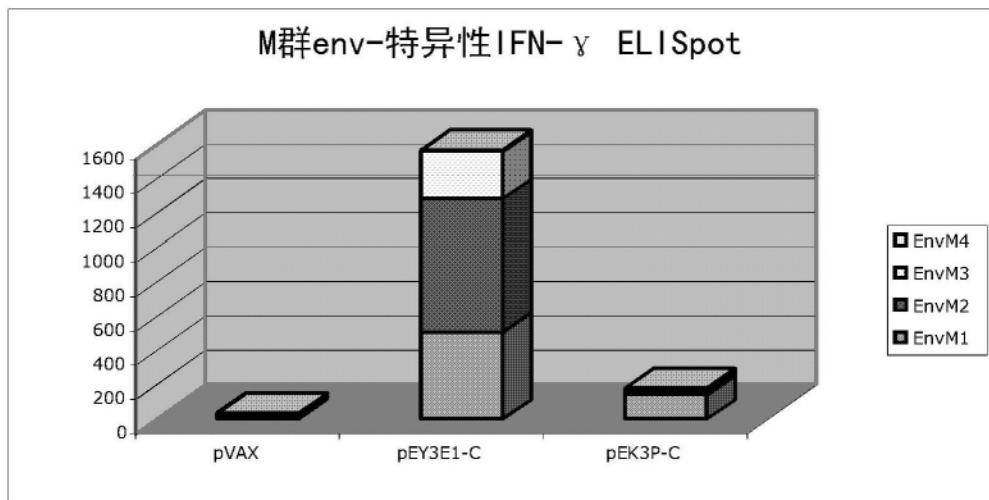
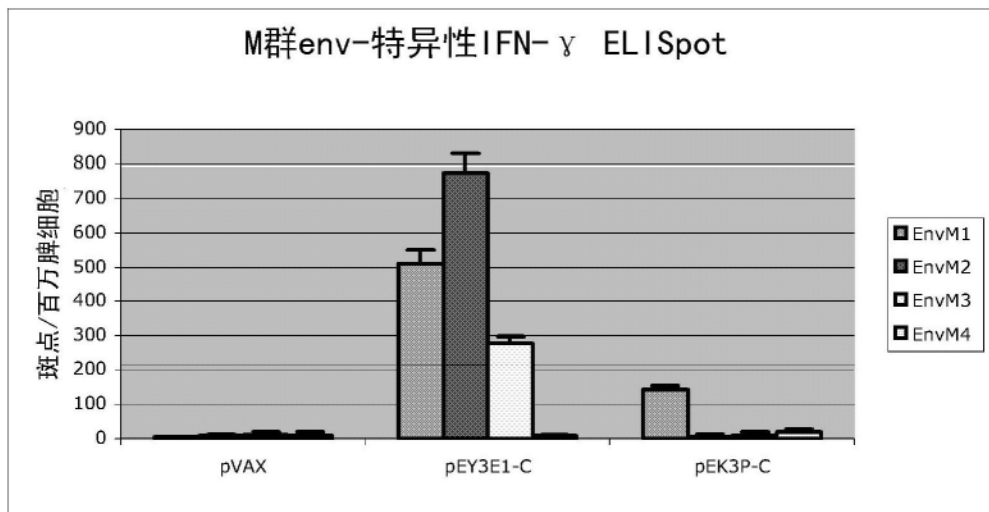
E**F**

图19

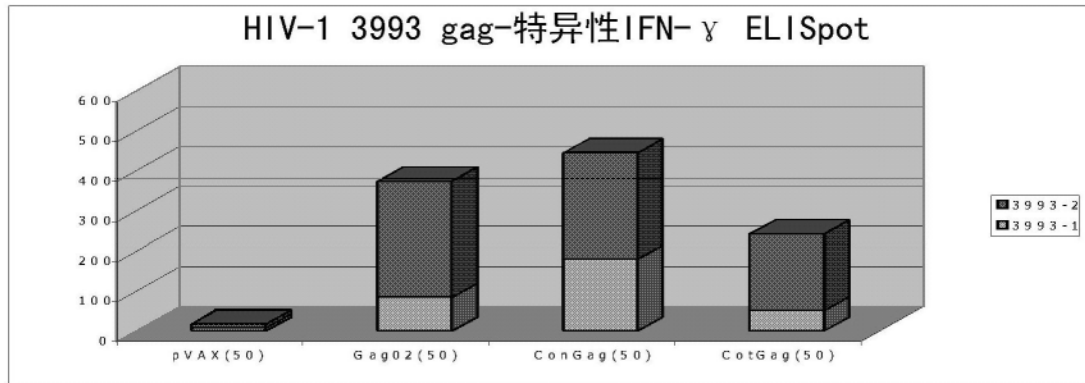
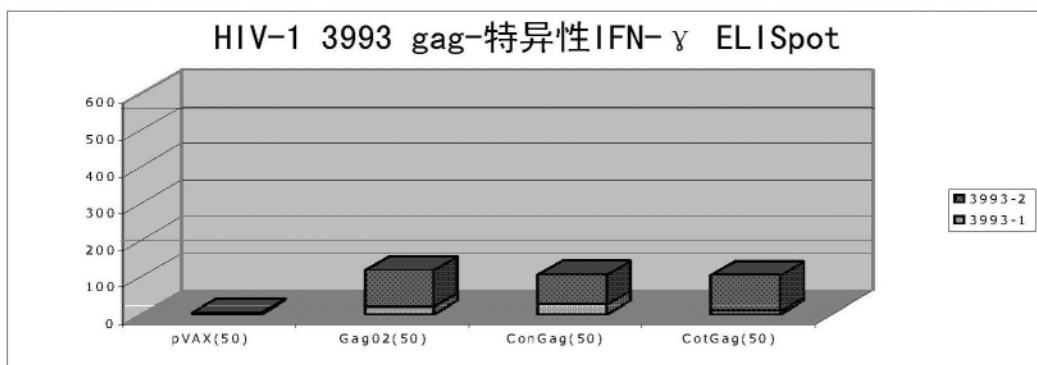
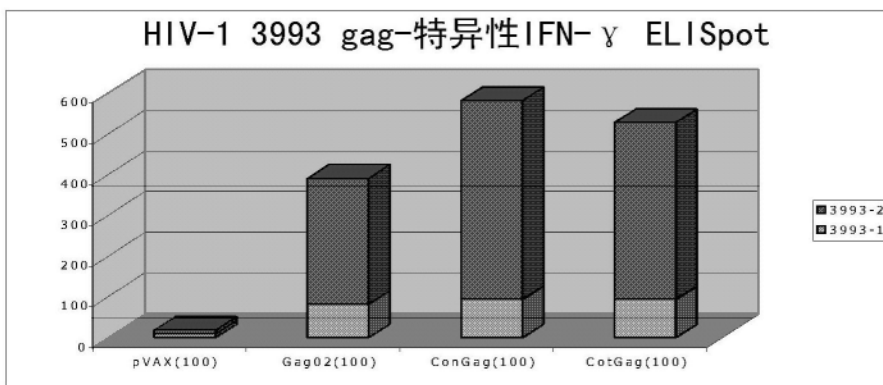
A**B****C**

图20

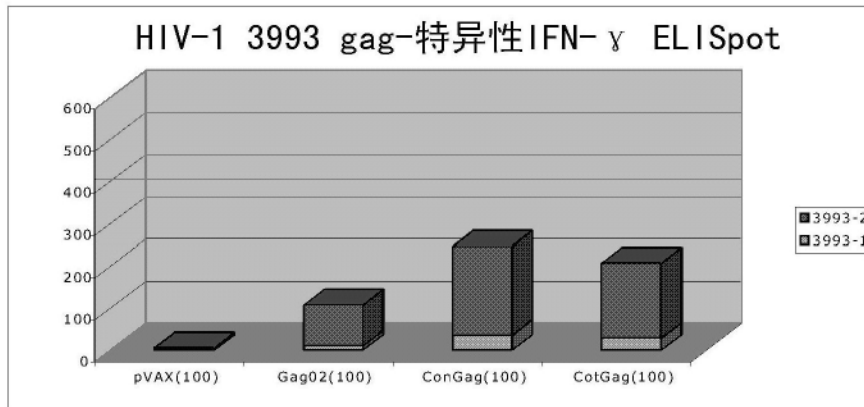
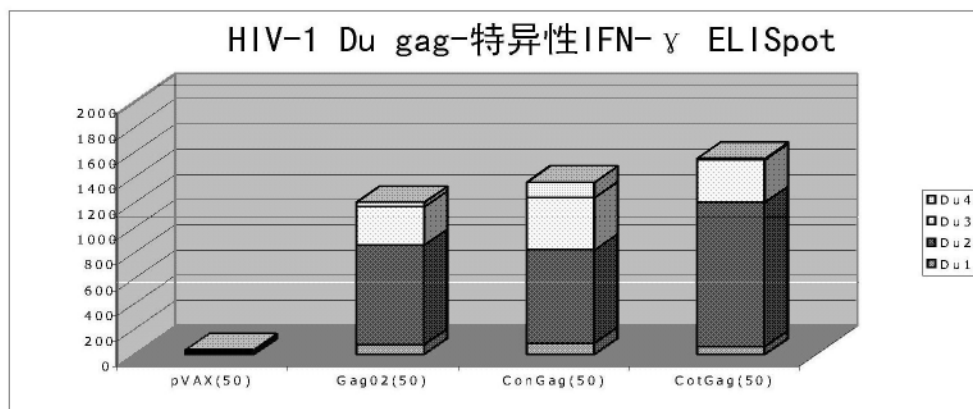
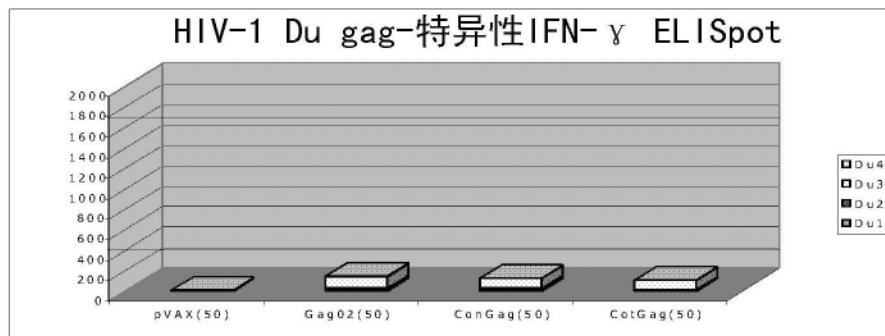
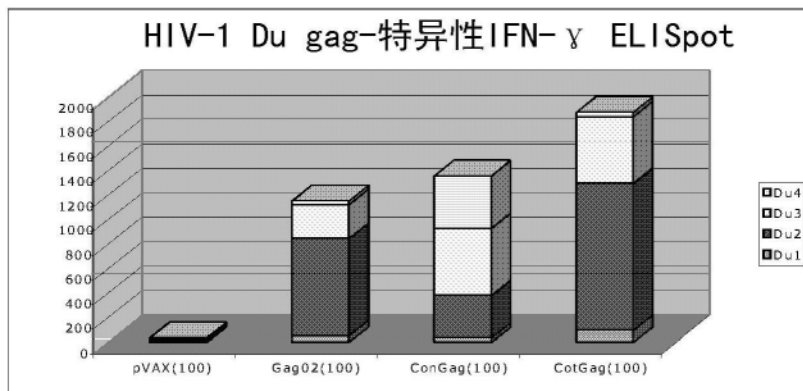
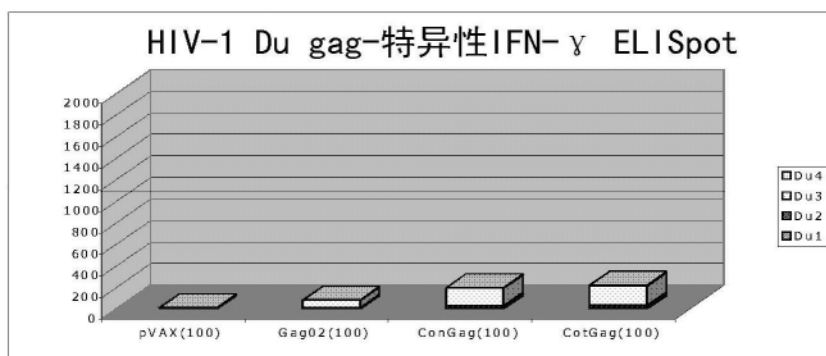
D**E****F**

图20

G



H



I

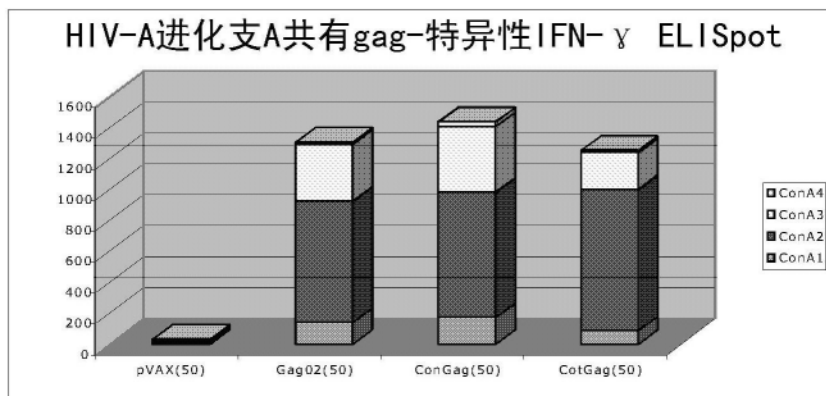


图20

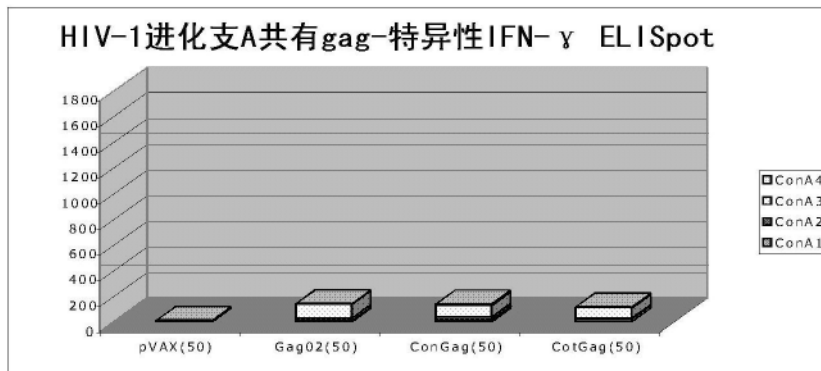
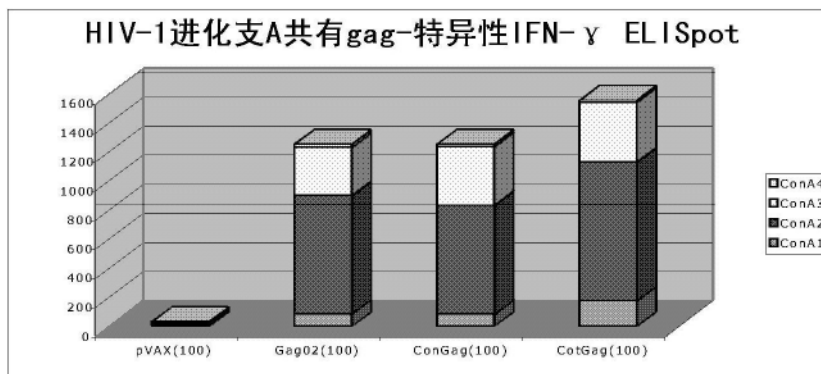
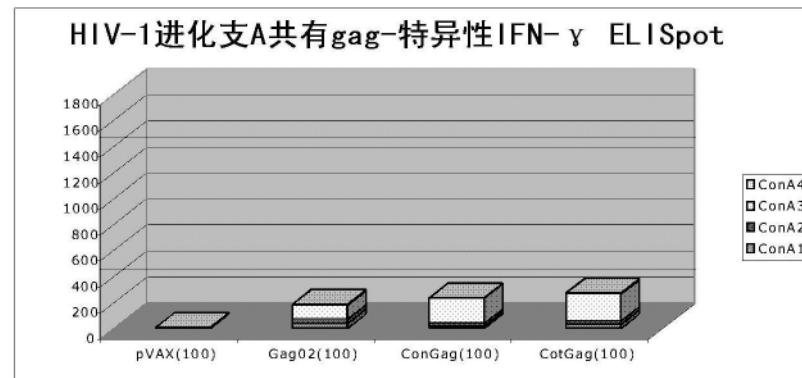
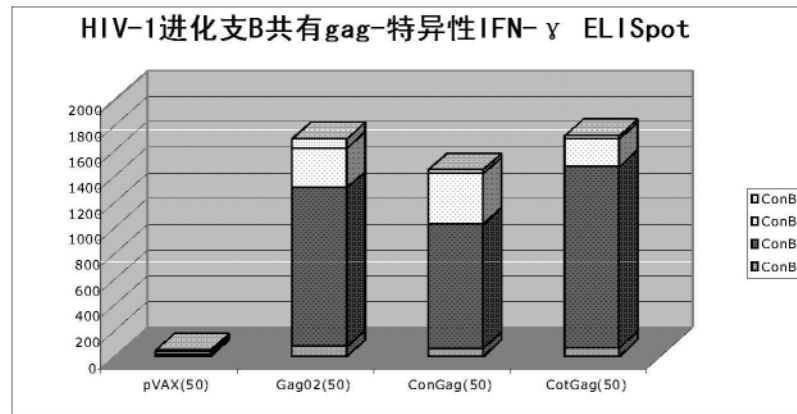
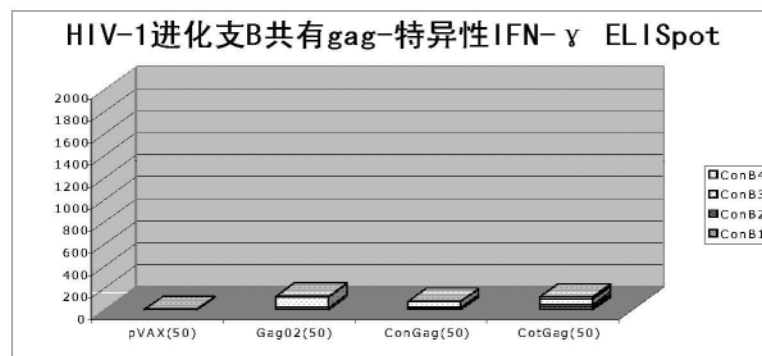
J**K****L**

图20

M



N



O

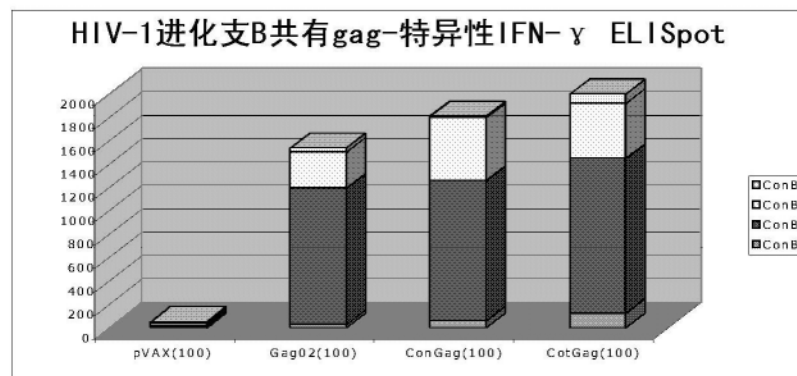
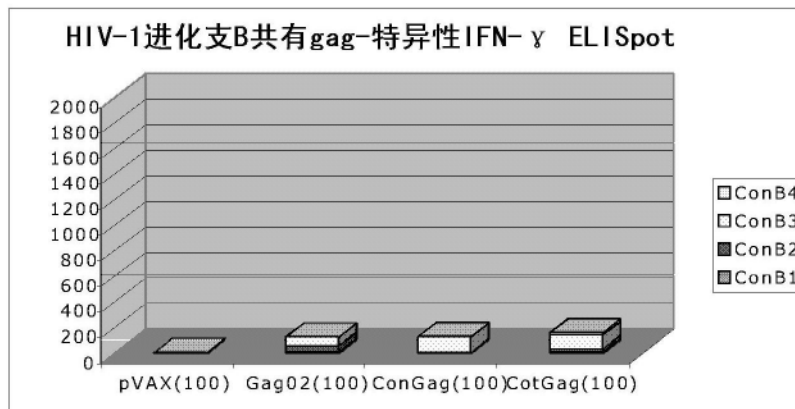
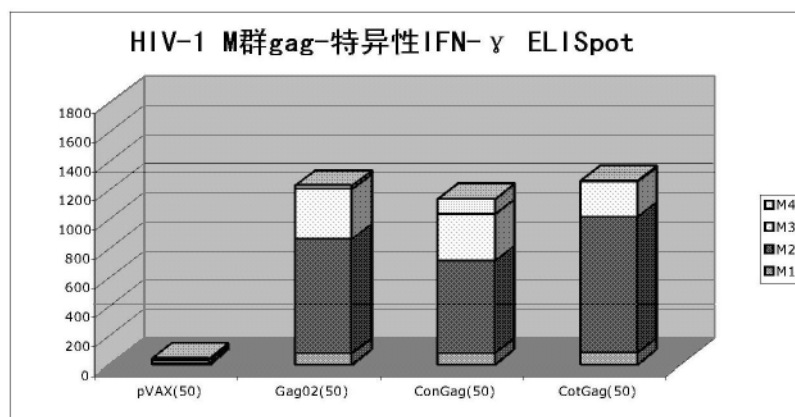


图20

P



Q



R

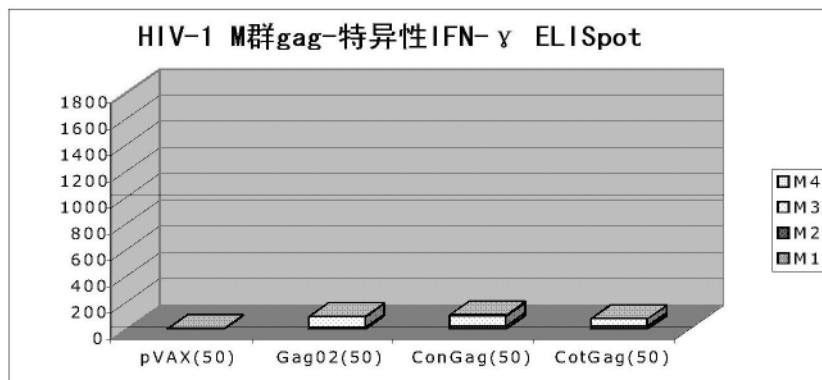
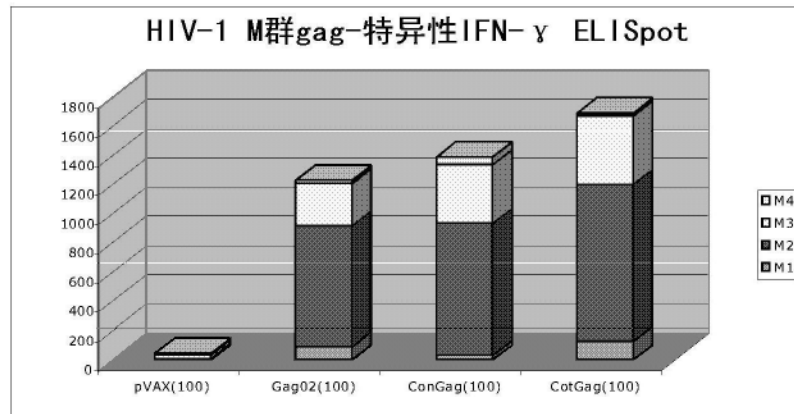
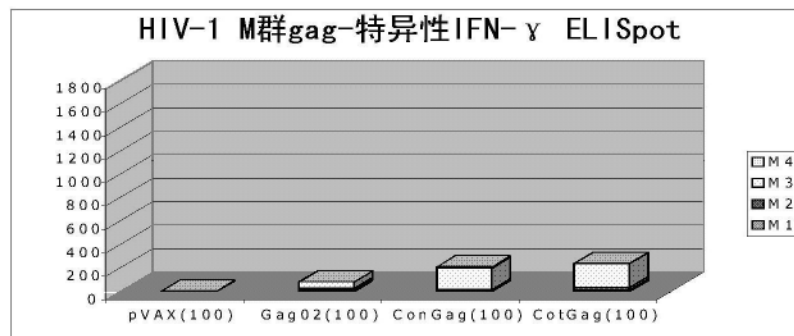


图20

S



T



U

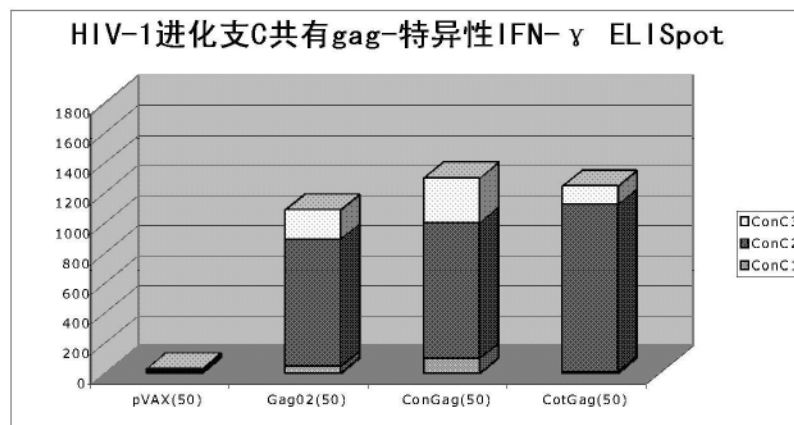
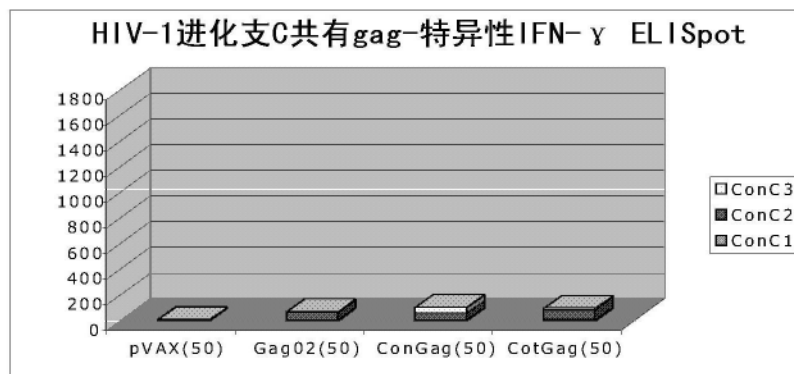
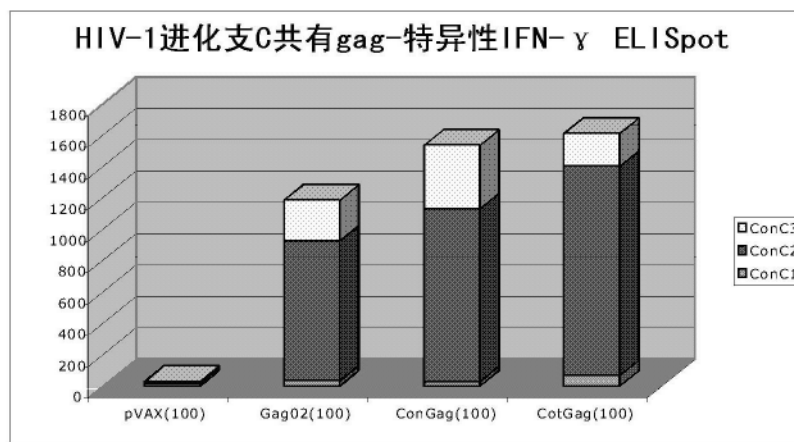


图20

V



W



X

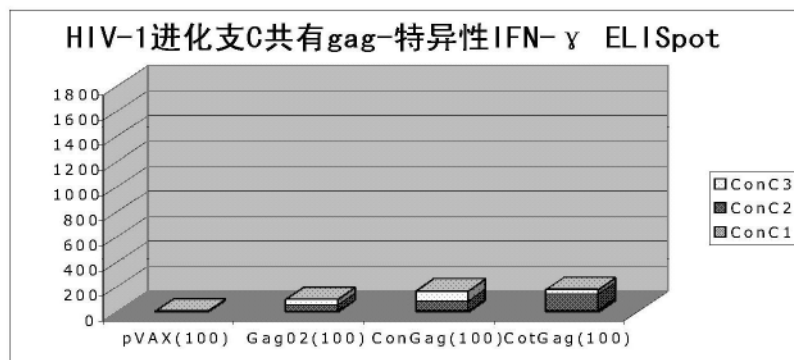


图20

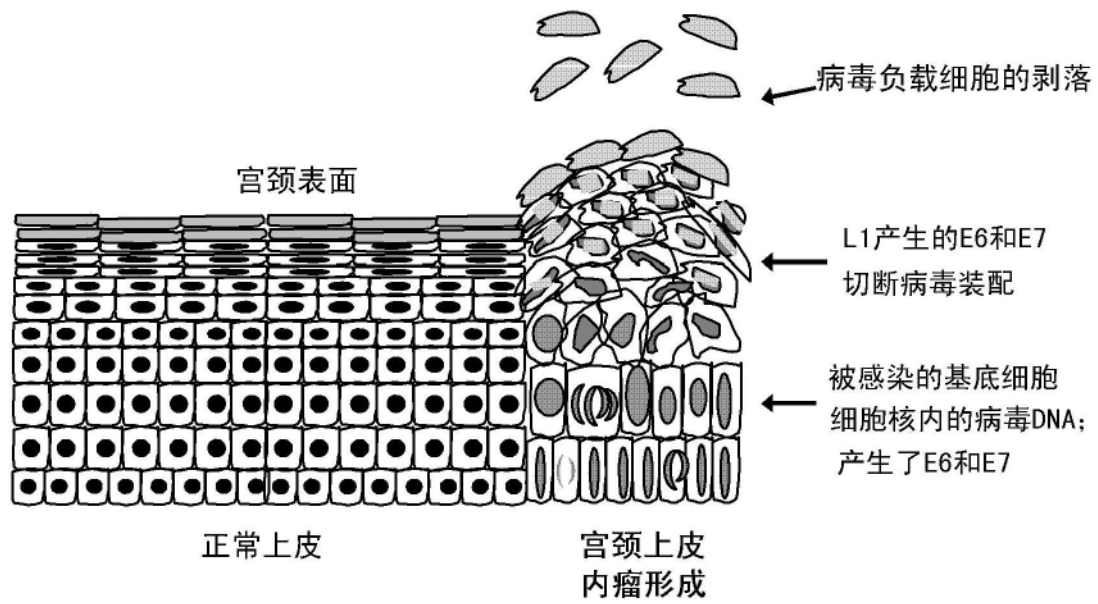


图21

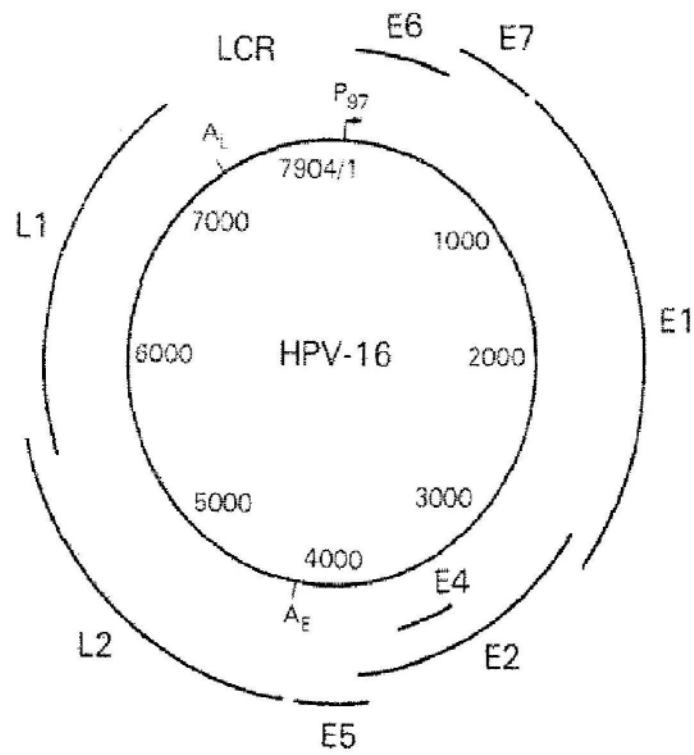


图22

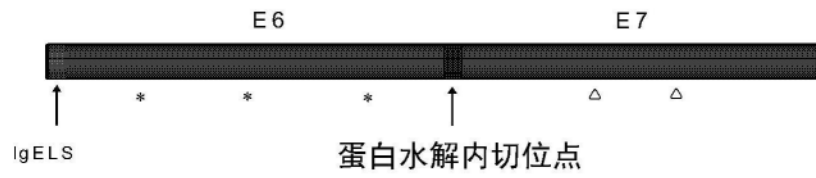


图23

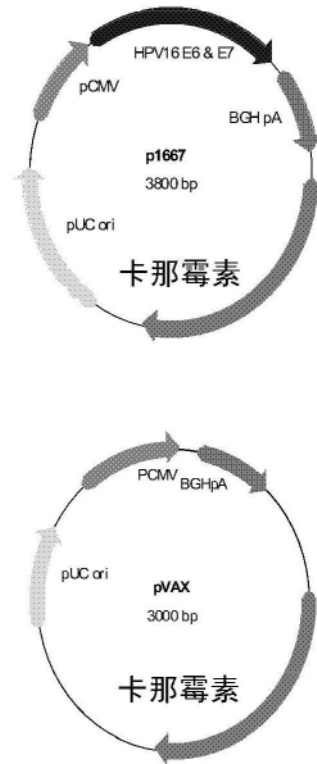


图24

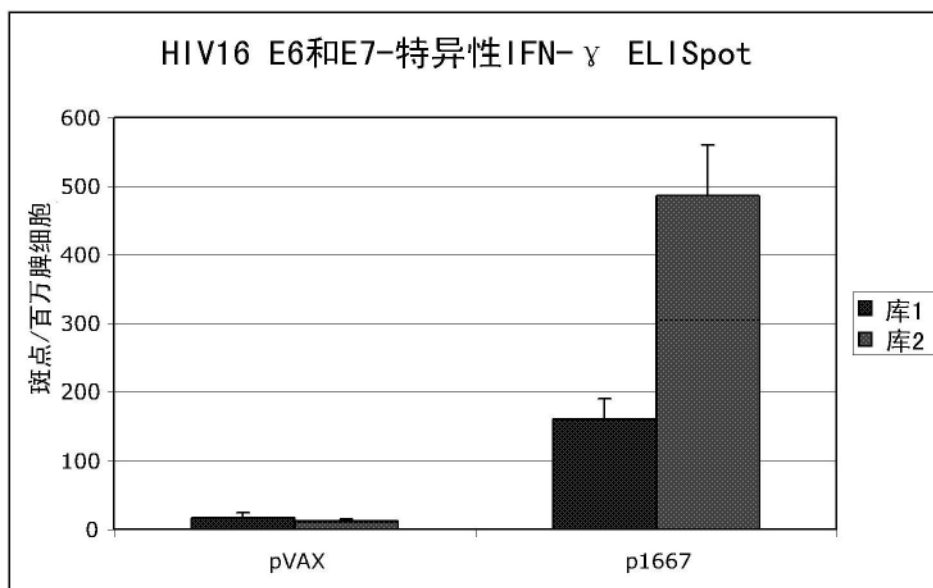
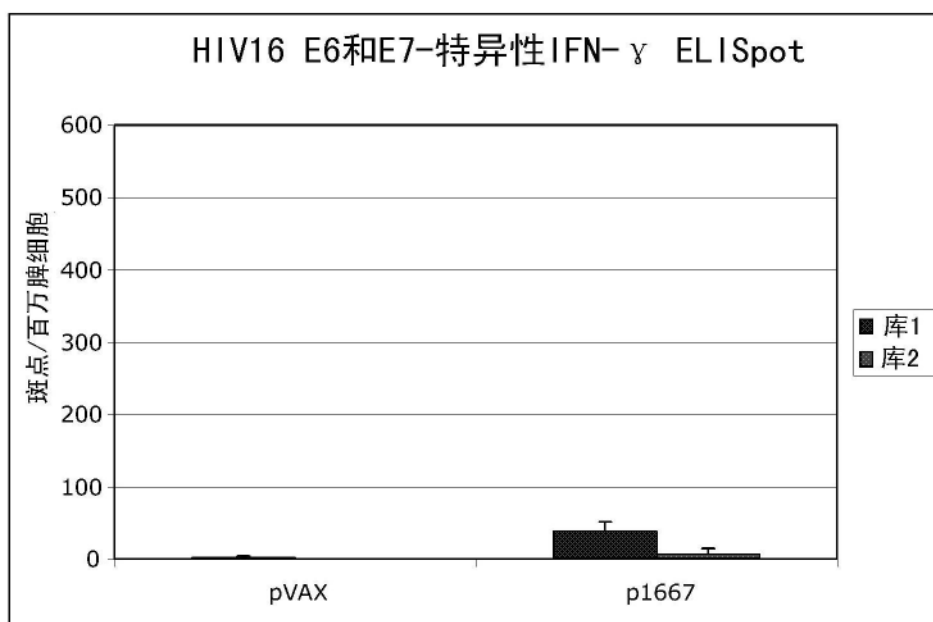
A**B**

图25

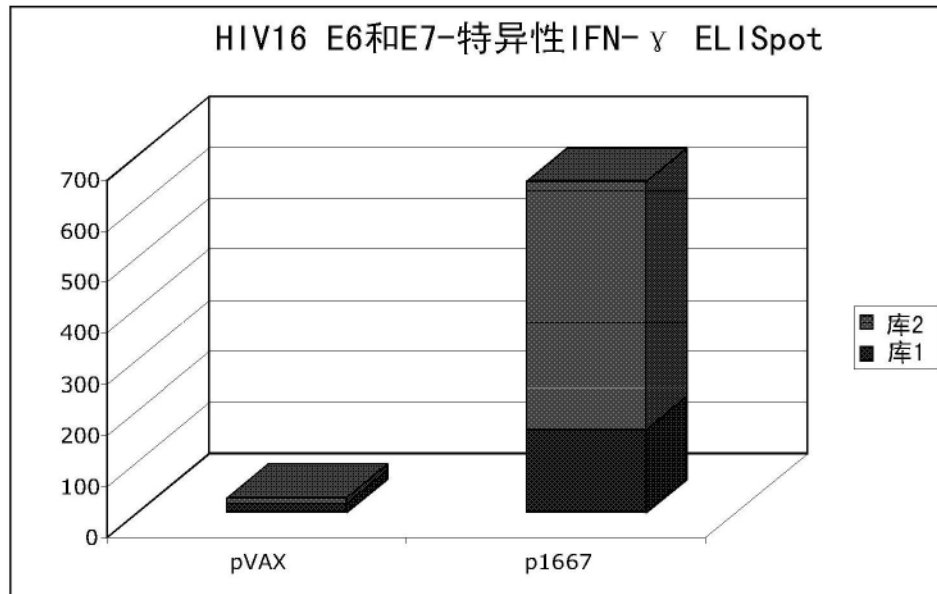
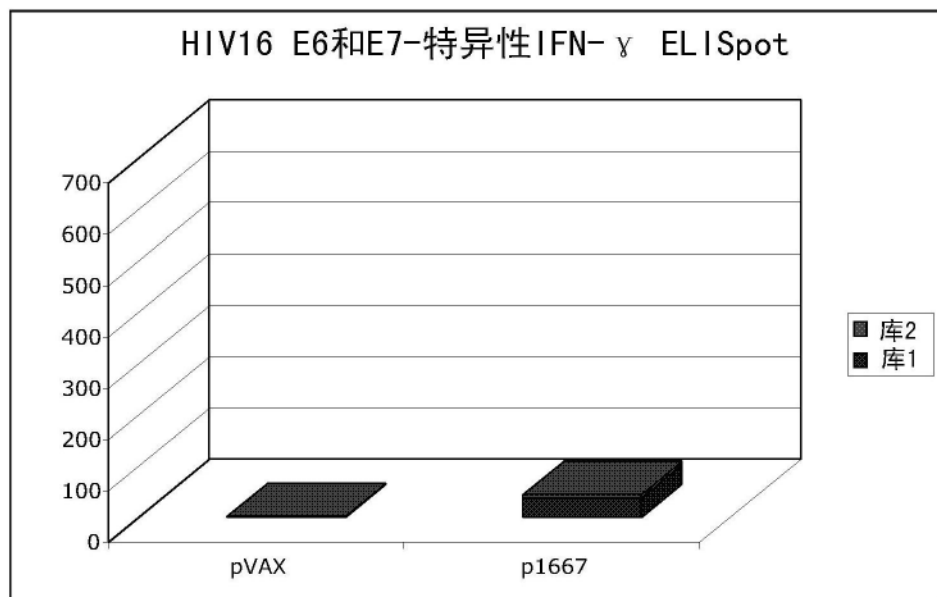
C**D**

图25

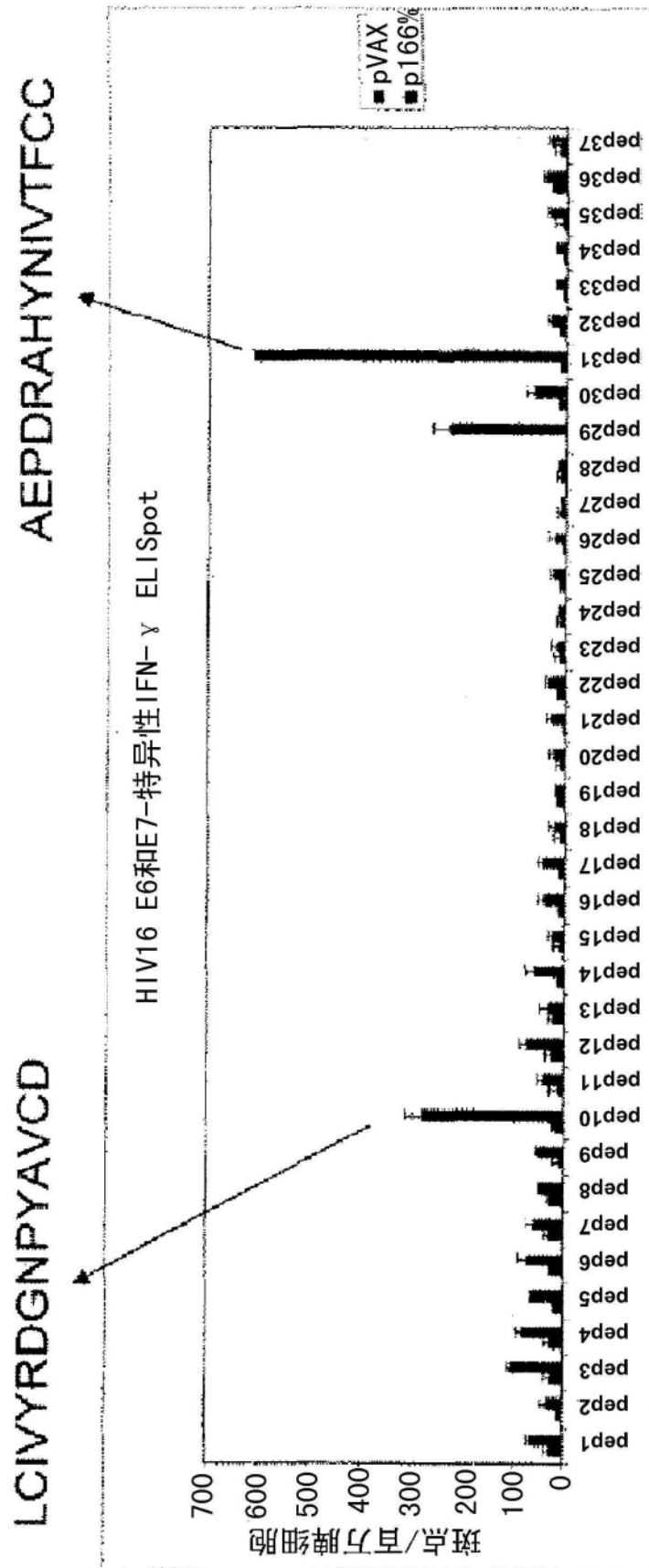


图26

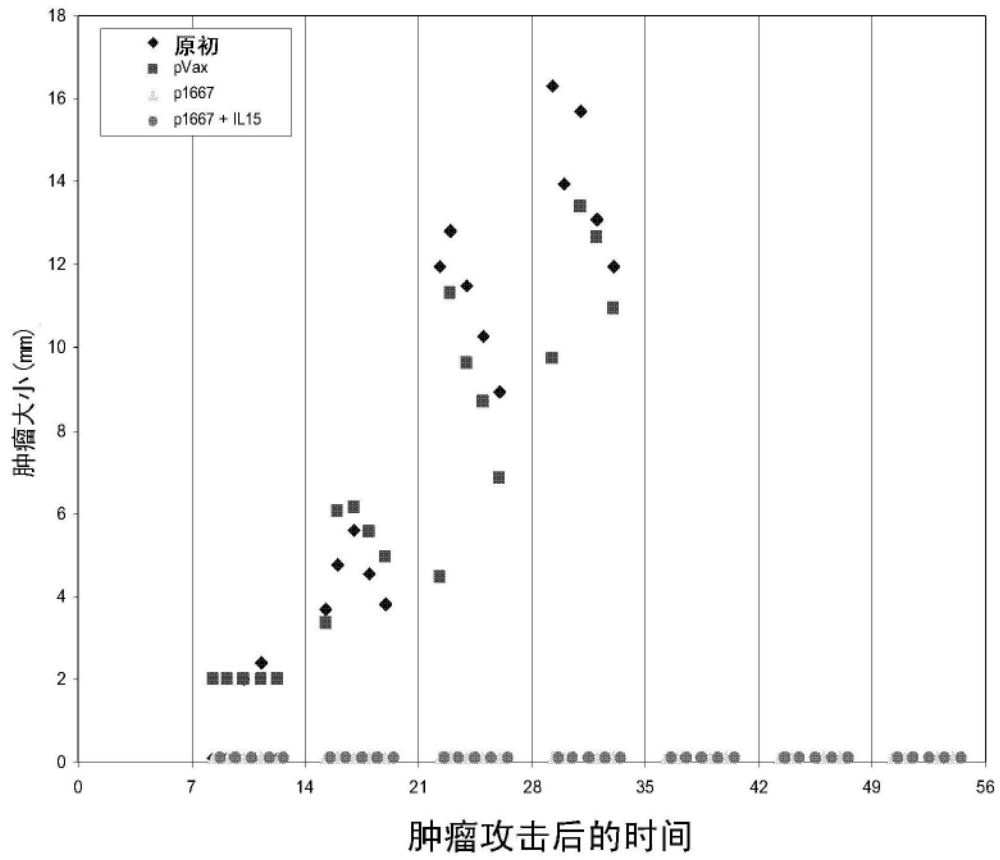


图27

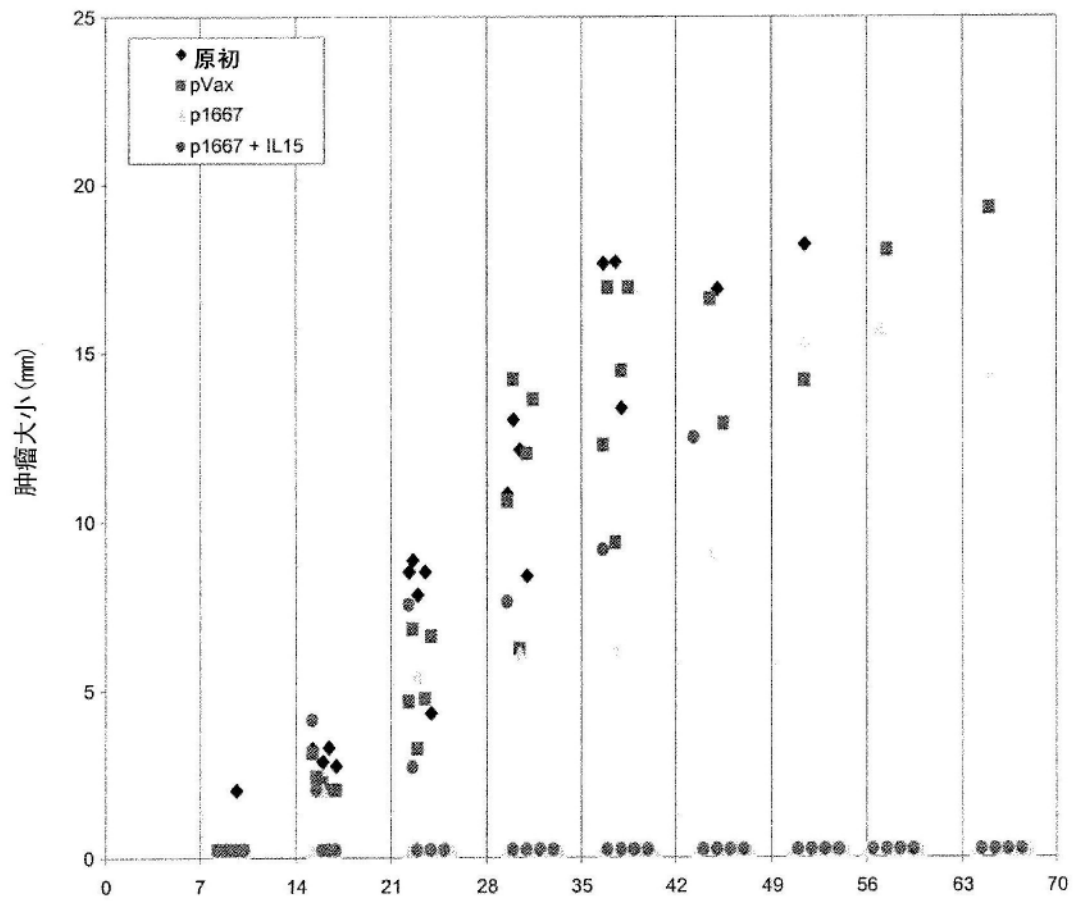


图28

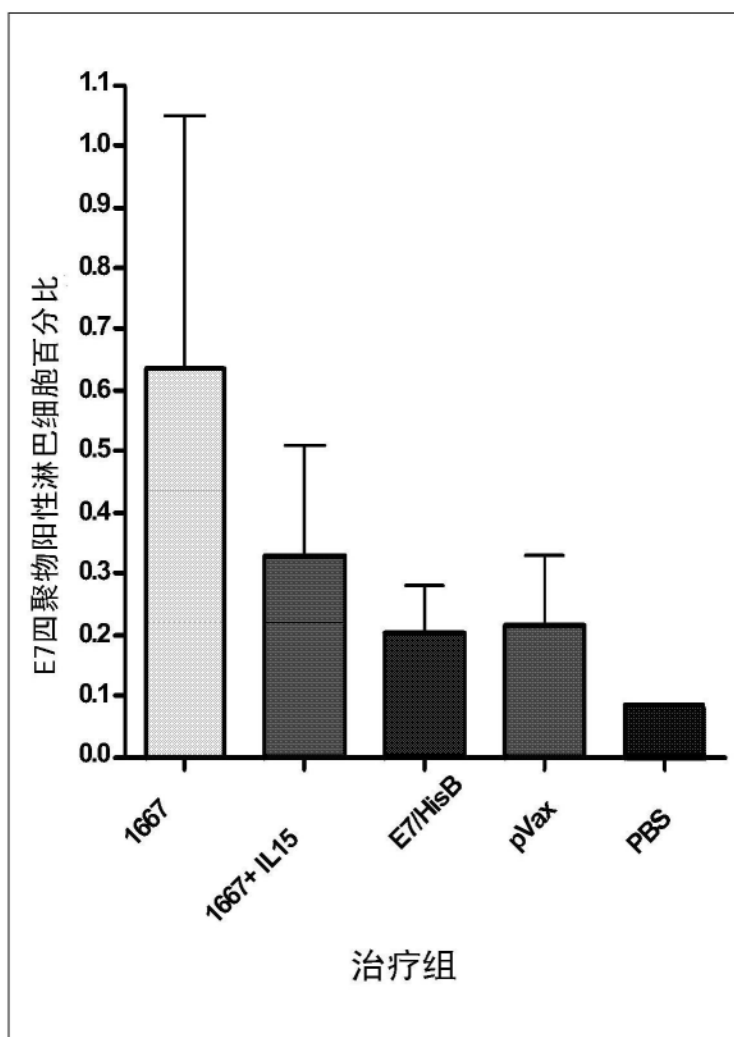


图29

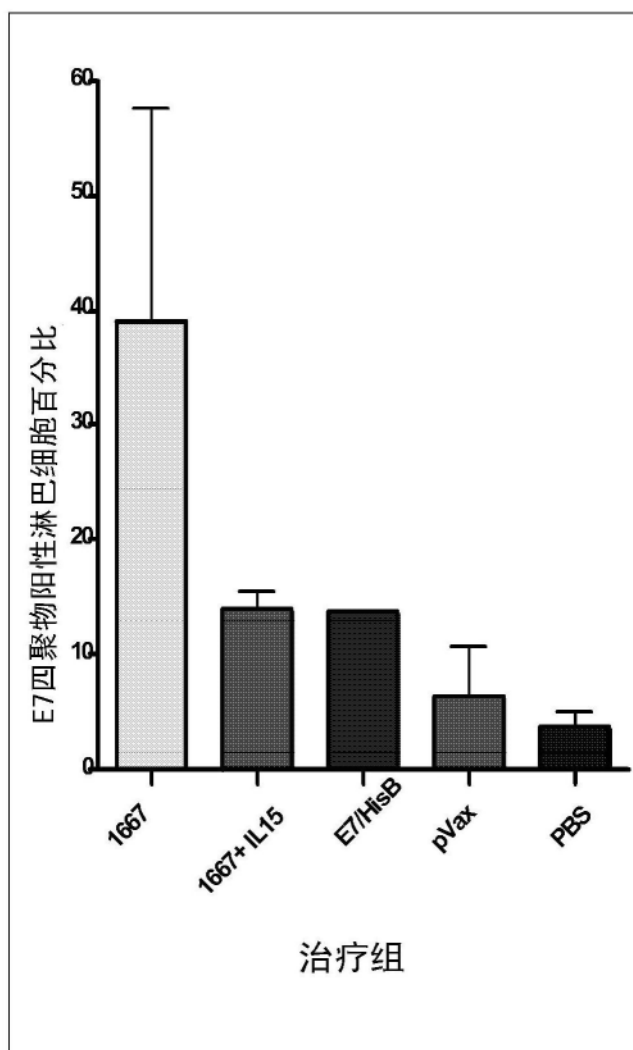


图30

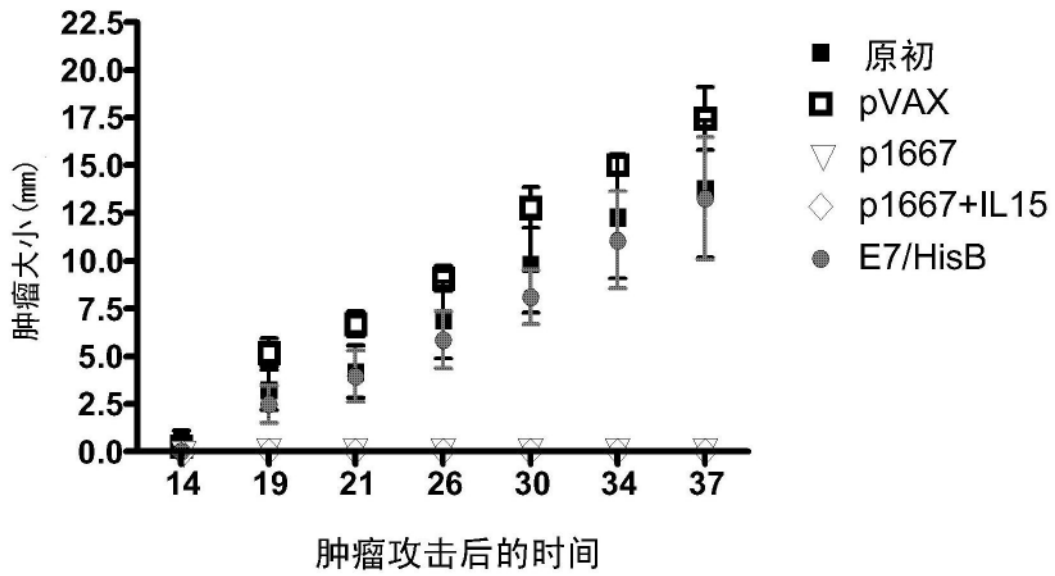


图31

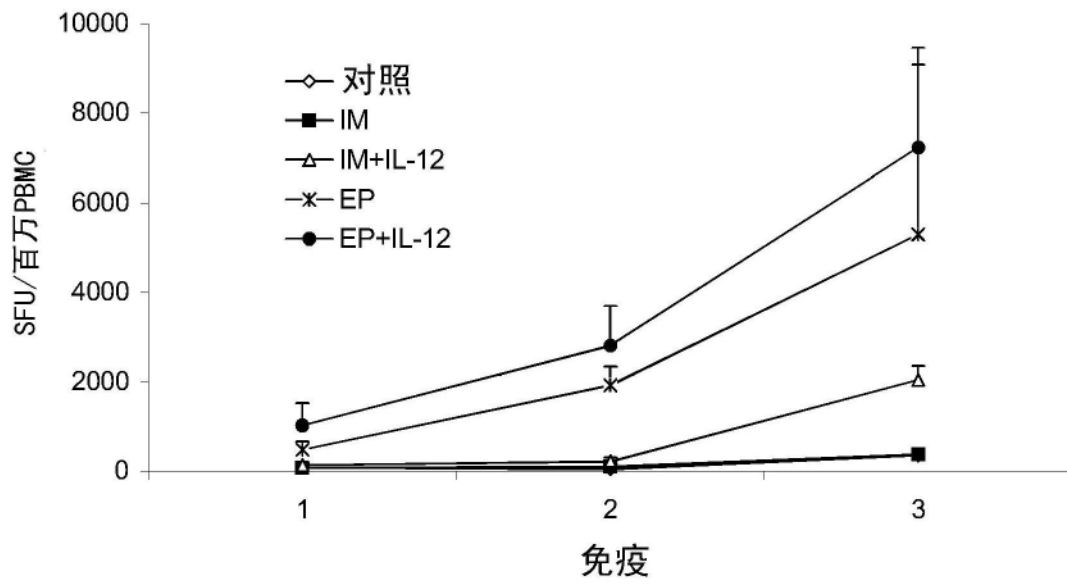


图32

群M

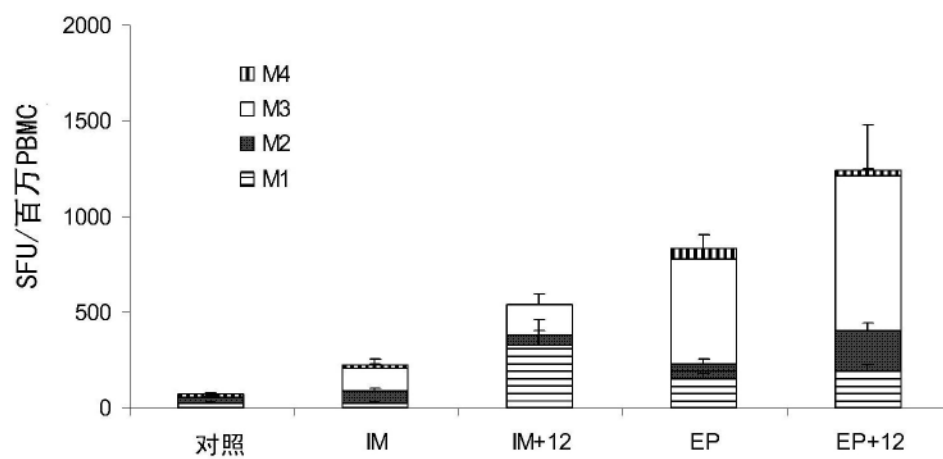


图33

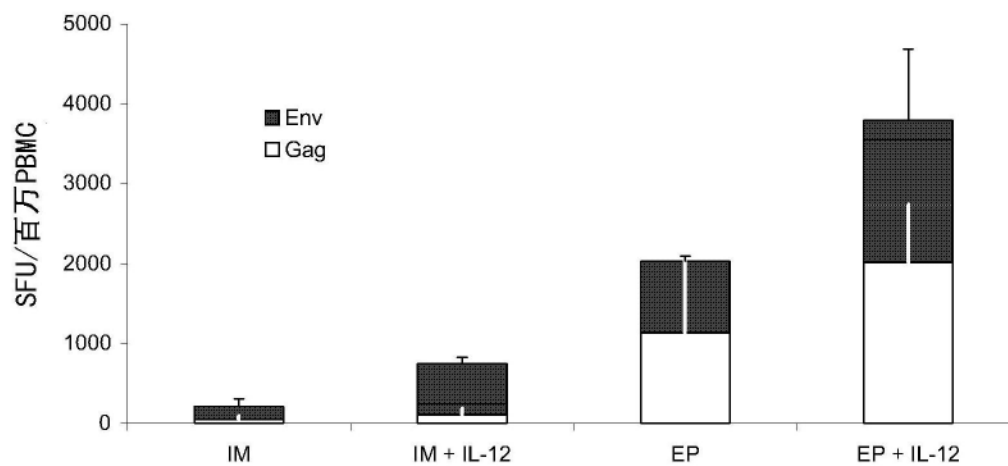


图34