



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I575070 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：101124905

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 11 日

(51)Int. Cl. : *C12N9/12 (2006.01)* *C07K19/00 (2006.01)*
C12N15/62 (2006.01) *C12N15/86 (2006.01)*
A61P31/20 (2006.01) *A61P37/04 (2006.01)*
C12R1/93 (2006.01)

(30)優先權：2011/07/12 歐洲專利局 11305909.1
 2012/04/18 歐洲專利局 12305450.4

(71)申請人：傳斯堅公司 (法國) TRANSGENE S.A. (FR)
 法國

(72)發明人：馬汀 皮瑞尼 MARTIN, PERRINE (FR)；希爾維斯崔 那莎利 SILVESTRE,
 NATHALIE (FR)；瑪錢德 珍 貝普提斯特 MARCHAND, JEAN-BAPTISTE (FR)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

CN 1786189A

WO 2011/015656A2

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：11 共 178 頁

(54)名稱

HBV 聚合酶突變體

HBV POLYMERASE MUTANTS

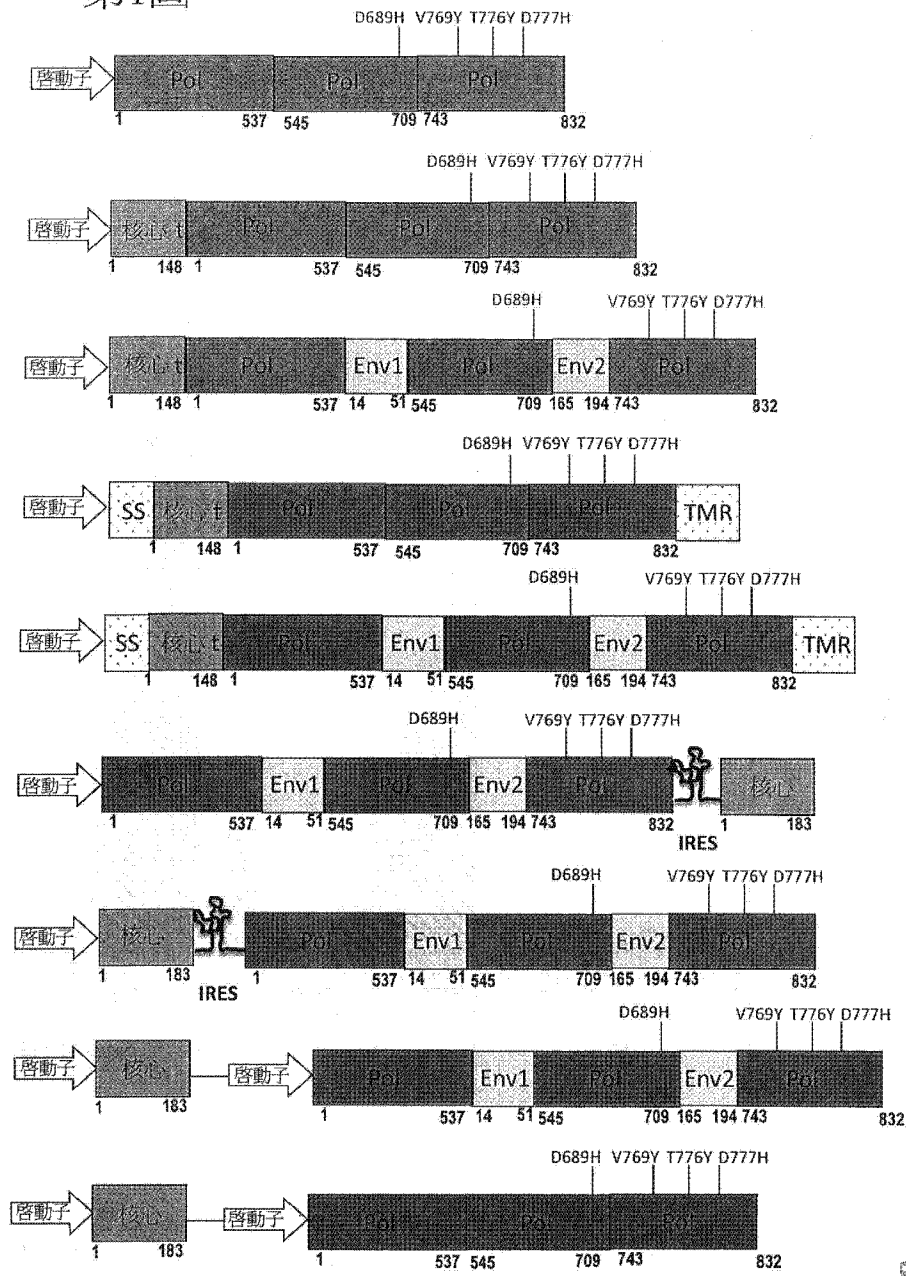
(57)摘要

本發明係有關於聚合酶 HBV 突變體多肽，其包含在功能上破壞聚合酶活性之一突變型聚合酶域；及有關於包含該聚合酶突變體多肽之融合蛋白。本發明亦有關於一核酸分子及用於表現該聚合酶突變體多肽之一表現載體，以及目標在於提供對抗 HBV 感染的保護性或治療性效用之可用於引發對抗 HBV 的免疫反應之一組成物。

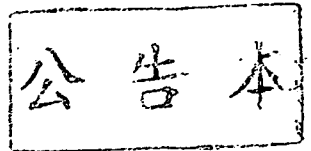
The present invention relates to polymerase HBV mutant polypeptides comprising a mutated polymerase domain which is functionally disrupted for polymerase activity and fusion proteins comprising such polymerase mutant polypeptide. The present invention also relates to a nucleic acid molecule and an expression vector for expressing said polymerase mutant polypeptide as well as a composition which can be used for eliciting an immune response to HBV with the goal of providing a protective or therapeutic effect against HBV infection.

指定代表圖：

第1圖



發明專利說明書



(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101124905

※申請日：101. 7. 11

※IPC 分類：

C12N 9/12 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

HBV聚合酶突變體

HBV POLYMERASE MUTANTS

二、中文發明摘要：

本發明係有關於聚合酶HBV突變體多肽，其包含在功能上破壞聚合酶活性之一突變型聚合酶域；及有關於包含該聚合酶突變體多肽之融合蛋白。本發明亦有關於一核酸分子及用於表現該聚合酶突變體多肽之一表現載體，以及目標在於提供對抗HBV感染的保護性或治療性效用之可用於引發對抗HBV的免疫反應之一組成物。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to polymerase HBV mutant polypeptides comprising a mutated polymerase domain which is functionally disrupted for polymerase activity and fusion proteins comprising such polymerase mutant polypeptide. The present invention also relates to a nucleic acid molecule and an expression vector for expressing said polymerase mutant polypeptide as well as a composition which can be used for eliciting an immune response to HBV with the goal of providing a protective or therapeutic effect against HBV infection.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係有關於聚合酶HBV突變體多肽，其包含在功能上破壞聚合酶活性之一突變型聚合酶域；及有關於包含該聚合酶突變體多肽之融合蛋白。本發明亦有關於一核酸分子及用於表現該聚合酶突變體多肽之一表現載體，以及目標在於提供對抗HBV感染的保護性或治療性效用之可用於引發對抗HBV的免疫反應之一組成物。本發明在免疫療法領域具有非常特殊的益處，及尤其是用於治療感染HBV的病患，特別是該等慢性感染者。

【先前技術】

發明背景

B型肝炎是重要的公共衛生問題，全球超過350萬人慢性感染B型肝炎，其中20至40%具有發生慢性肝臟疾病、硬化及肝細胞癌之風險。儘管已研發出有效的預防疫苗，B型肝炎病毒(HBV)感染在許多國家依然猖獗，甚至在已開發國家亦然，估計全世界每年有450萬個新感染病例。全程預防接種的接種率在亞洲為25%而在歐洲為75%至90%，這與世界衛生組織落實普遍接種疫苗之建議有所落差。目前B型肝炎是死亡原因第十名(每年約一百萬人死亡)，及HBV相關肝癌係最常見癌症的第五名。HBV感染在地理上的分布不均勻，在西方國家的發生率係低於1%，而在東南歐國家、非洲大部分地區及赤道附近的南美洲的發生率係10%

以上。

B型肝炎病毒係嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)的成員，及主要感染肝臟及在肝細胞中複製。感染性顆粒係所謂42至45奈米的“鄧氏(Dane)顆粒”，其係由一外部脂蛋白套膜與一內部核殼所組成；外部脂蛋白套膜具有三種不同的表面蛋白(HB)，而內部核殼的主要結構性蛋白為核心蛋白(HBcAg)。在核殼內則存在單套HBV基因體，該HBV基因體係與病毒的聚合酶蛋白(P)連接。除了42至45奈米的病毒粒子以外，感染HBV的病患血液中含有20奈米的球體，其係由HBsAg及從受感染細胞釋出之宿主所衍生的脂質所組成。該等球體的數量係病毒粒子的 10^4 至 10^6 倍。

當病毒粒子經由目前未知的受體進入肝細胞後，核殼將HBV的基因體DNA輸送至細胞核，鬆散環狀DNA在該處轉化為共價閉合的環狀DNA(cccDNA)。cccDNA係作用為四種病毒RNA轉錄作用之模板，該等RNA被輸出至細胞質及作為HBV蛋白轉譯作用之mRNA。最長的(前基因體)RNA亦作用為HBV複製作用的模板，該複製作用發生在細胞質中的核殼內。然後將部分的HBV DNA與含有聚合酶的殼體送回細胞核中，其等在該處釋出新產生的鬆散環狀DNA，而形成附加的cccDNA。因cccDNA的半衰期比肝細胞長，HBV的持續存在係歸因於cccDNA。其他殼體以出芽方式進入內質網而帶有套膜，及在通過高基氏(Golgi)體後被分泌出。

HBV基因體的結構性與功能性組織之研究已超過30

年。HBV基因體係具有約3,200個核苷酸之一鬆散環狀的部分雙股DNA，及其係由一全長式負股與一較短的正股所組成。其含有4個重疊的開放讀碼框(ORF)，即C、S、P及X。C開放讀碼框係編碼核心蛋白(或稱作HBcAg)，其係構成核殼之長度為183個胺基酸的蛋白；及編碼在病毒複製期間在病患血清中所發現之稱作HBeAg的第二蛋白，其含有一前核心N端延伸作用與一部份的HBcAg。核心蛋白的C端之鹼性非常高及含有經預測與核酸結合之4個富含精胺酸域，以及含有眾多的磷酸化位址。S開放讀碼框係編碼具有相同C端的三種表面蛋白，但其等的N端因存在三種同一讀框的ATG起始密碼子而不相同，該等ATG起始密碼子將S開放讀碼框分成三區，即分別為S(226個胺基酸)、前S2(55個胺基酸)及前S1(108個胺基酸)。大型表面抗原蛋白(L)係在第一ATG起始密碼子的轉譯起始作用後所產生，及包含389個胺基酸殘基(前S1-前S2-S)。中型表面抗原蛋白(M)係由第二起始ATG開始的S區與前S2區轉譯作用所產生，而具有226個胺基酸的小型表面抗原蛋白(S及亦稱作HBsAg)係由第三起始ATG密碼子起始的S區轉譯作用所產生。HBV表面蛋白係醣蛋白，其具有由N-醣苷鍵所連接的醣側鏈(聚醣)。P開放讀碼框係編碼病毒的聚合酶，及X開放讀碼框所編碼的一種蛋白係稱作X蛋白及被認為是一種轉錄活化子。

依據HBV基因型，病毒聚合酶的長度約為832至845個胺基酸殘基，及其係由與核心基因的3'端及所有表面蛋白基因重疊之一個長型開放讀碼框("P")所編碼。病毒的聚合

酶係一種由四個域所組成的多功能性蛋白，其中包括分別為端蛋白域、聚合酶域及RNase H域之三個功能域，該等功能域催化HBV複製作用中的主要步驟(導引作用、DNA合成作用及RNA模板之移除)；以及存在於端蛋白域與聚合酶域之間之一個非必要的間隔域(例如參見Radziwill等人於1990年期刊“J. Virol.”第64期第613頁乙文；Bartenschlager等人於1990年期刊“J. Virol.”第64期第5324頁乙文)。已針對造成酵素活性的催化位址進行特性分析。在這方面，已顯示形成保留性YMDD基序(motif)之4個殘基(對應於長度為832個殘基的聚合酶之編號為第538至541個殘基)係DNA依賴型與RNA依賴型DNA聚合酶的活性所必需，而RNase H活性係基於一DEDD基序，該DEDD基序係涉及四個非相鄰的胺基酸殘基，分別為位置689的天門冬胺酸(D)、位置718的麩胺酸(E)、位置737的天門冬胺酸(D)及位置777的門冬胺酸(D)，以及涉及包括位置769的纈胺酸(V)及位置776的蘇胺酸(T)在內之其他一些胺基酸殘基。在技藝中曾述及廢除RT聚合酶與RNase H活性之不同突變作用(Chang等人於1990年期刊“J. Virol.”第64期第5553頁乙文；Bartenschlager等人於1990年於期刊“J. Virol.”第64期第5324頁乙文；Radziwill等人於1990年於期刊“J. Virol.”第64期第613頁乙文及Chen等人於1996年期刊“J. Virol.”第70期第6151頁乙文)。數個研究團隊已在不同宿主系統中成功表現HBV聚合酶蛋白，但據報導該表現作用對於表現細胞具有毒性，及需要使用誘導性啟動子(Choi等人於2002年期刊“Antiviral

Res.”第55期第279頁乙文；Karimi等人於2002年“J. Virol.”第76期第8609頁乙文)。

一些臨床前與臨床研究強調CD4+與CD8+ T細胞免疫反應對於有效的抗病毒反應之重要性。在從B型肝炎自然康復的病患中確實觀察到具有由在末梢血液中即可檢測到的T輔助細胞(TH)與細胞毒性T(CTL)淋巴球所媒介之多重特異性與持續性反應。抗HBe與抗HBs抗體之出現顯示感染的有利結果。具HBsAg特異性之抗體係中和、媒介保護性免疫性，及在臨床康復後可終生持續存在。

然而，慢性HBV感染只有在罕見情況下係由免疫系統消退。絕大多數的慢性感染病患顯示弱與暫時性的CD4與CD8 T細胞免疫反應，該等反應在抗原上係受限的，而無法有效清除病毒感染。即使已在HBV慢性感染病患中觀察到涉及不同抑制性分子諸如PD-1、CTLA4等的向上調節作用，目前仍未完全清楚在慢性B型肝炎中之細胞免疫反應的作用性功能改變之原因。因此，需要可引發有效的T細胞反應之免疫調節策略。

習用的慢性B型肝炎治療包括聚乙二醇化干擾素 α (IFNa) 與核苷/核苷酸類似物(NUC) 諸如拉米夫定(lamivudine)，以及最近的恩替卡韋(entecavir)、替比夫定(telbivudine)、阿德福韋(adefovir)及替諾福韋(tenofovir)。IFNa係抑制病毒複製作用之一種強效的抗病毒分子，然而其在25至30%的病患中造成嚴重的副作用。NUC係作用為HBV聚合酶的競爭型抑制劑，其目的在於抑制前基因體

RNA逆轉錄成為負DNA股及然後成為雙股的病毒DNA。其等限制新病毒粒子之形成，但無法有效消滅藏在受感染肝細胞的細胞核中之超螺旋cccDNA，該超螺旋cccDNA則成為新子代病毒之來源。這可以解釋為何NUC的功效是暫時性，及在治療停止後立即發生病毒反彈，使得病患需要終身接受治療。此外，由於出現抗藥性HBV突變體(如一些研究報導經拉米夫定(lamivudine)治療1年後超過24%出現抗藥性HBV突變體及治療4年後約66%出現抗藥性HBV突變體，雖然較新的NUC顯示較少出現抗藥性HBV突變體)，其長期功效亦屬有限。現在已分離出對於抗病毒劑的敏感性降低之一些HBV品系，及其基因體定序揭露在聚合酶域中的取代突變作用高點，包括在YMDD基序中(US2008-0233557; Zoulim與Locarnini於2009年期刊“Gastroenterology”第137期第1593頁乙文)。

除了抗病毒療法之外，目前致力於研發輔助療法，其目的係提高宿主的免疫反應，特別是該等由細胞毒性T與輔助T淋巴球所媒介者。數種令人鼓舞的疫苗策略係側重於HBV表面蛋白S、前S1及/或前S2(Zanetti等人於2008年期刊“Vaccine”第26期第6266頁乙文；Mancini-Bourguine等人於2006年期刊“Vaccine”第24期第4482頁乙文)，以及側重於目標在於同時標定多個HBV抗原之多價免疫治療方法。例如，用編碼多個套膜、核心及聚合酶抗原決定位之一種多抗原決定位DNA疫苗進行的免疫作用，顯示在臨床前小鼠模式中引發CTL與 T_H 反應(Depla等人於2008年期刊“J.

Virol.”第82期第435頁乙文)。一種以編碼HBsAg、HBcAg及HBV聚合酶的DNA質體混合物為基礎之方法(WO2005/056051；WO2008/020656)，在慢性B型肝炎的基因轉殖小鼠模式中顯示特異性抗HBV的細胞型與體液型反應(Chae Young Kim等人於2008年期刊“Exp. Mol. Medicine”第40期第669頁乙文)。在南韓HBV帶原者中係與拉米夫定(lamivudine)治療併用而進行第I期臨床試驗(Yang等人於2006年期刊“Gene Ther.”第13期第1110頁乙文)。近期所研究的另一方法係涉及使用編碼HBc與HBV聚合酶以及Hbs免疫反應域的組合之一治療用載體疫苗(WO2011/01565)。用Ad-載體疫苗免疫接種的小鼠顯示對抗所表現的所有HBV抗原之T細胞反應，特別是對抗聚合酶。

由於HBV感染的慢性與持續性性質、其高發生率、HBV的持續傳播及相關疾病的顯著發病率，可能有人預期在以後多年HBV仍持續成為全球嚴重的健康威脅。因此，企需研發用於提升預防與治療HBV感染或HBV相關疾病或疾患之更有效方法。尤其，仍需要方法來調解T細胞所媒介之對抗標的HBV抗原及特別是對抗核心之免疫性及潛在的低毒性。該等方法特別適於治療慢性感染HBV之個體。

藉由提供如申請專利範圍中所界定之實施例，而解決該技術問題。

本發明之其他與進一步方面、特性及優點，將在有關本發明的目前較佳實施例之下列說明中顯而易見。該等實施例係就揭露內容之目的而提供。

【發明內容】

發明概要

就一方面而言，本發明係有關於一種突變體聚合酶多肽，其包含一天然HBV聚合酶中的至少500個胺基酸殘基，其中該突變體聚合酶多肽所包含之一聚合酶域係具有在功能上破壞該聚合酶活性之一內部刪除作用，及其中該內部刪除作用係至少包括天然存在於一天然聚合酶的聚合酶域之YMDD基序。

本發明亦有關於編碼該突變體聚合酶多肽之一核酸分子、包含該核酸分子之一載體或包含或編碼該突變體聚合酶多肽之一組成物。

本發明亦有關於該突變體聚合酶多肽、核酸分子、載體或組成物及較佳與附加的多肽(如與一或多種HBV多肽)組合用於治療、預防或抑制HBV感染或改善與HBV感染相關聯的一病況之目的之用途。

本發明的另一方面係包括在需要的一個體中治療、預防或抑制HBV感染或改善與HBV感染相關聯的一病況之一種方法，其包括提供或投予該突變體聚合酶多肽、核酸分子、載體或組成物，及最終與附加的多肽(如與一或多種HBV多肽)及/或與標準照護組合。

本發明的又一方面係有關於在需要的一個體中引發免疫反應之一種方法，其包括提供或投予該突變體聚合酶多肽、核酸分子、載體或組成物，及最終與附加的多肽(如與一或多種HBV多肽)及/或與標準照護組合，其目的係在該個

體中引發或刺激一免疫反應或用於治療HBV感染或改善與HBV感染相關聯的一病況或症狀。

本發明的再一方面提供一部件套組，其包含多個容器與說明書，其等係依據本文中所述之組成物與方法而對於一個體提供或投予該突變體聚合酶多肽、核酸分子、載體或組成物及最終與附加的多肽(如與一或多種HBV多肽)組合。

【實施方式】

發明之詳細說明

本發明提供一突變體聚合酶多肽，其所包含的一突變聚合酶域係具有在功能上破壞該聚合酶活性之一內部刪除作用，該內部刪除作用係至少包括天然存在於一天然HBV聚合酶的聚合酶域之YMDD基序。該突變體聚合酶多肽或其編碼載體可用於治療或預防HBV感染或與HBV感染相關聯的一病況之組成物與方法中，及最終與其他HBV多肽及/或與標準照護組合。由於相關酵素活性之破壞，本發明得以設想在各種載體系統中表現與生產該突變體聚合酶多肽。本發明係特別適合人類使用，及可用於增強標準療法療法(如SOC)。在動物模式中，用編碼該突變體聚合酶多肽及融合HBc與Hbs免疫反應域的一載體所進行之免疫接種作用，引發HBV特異性T細胞反應，及意外地觀察到同時對抗HBc與聚合酶之強的免疫性。

在下列部分中，提供有關本文所用一些術語的含義之更詳細說明。

定義

如在整個申請案中所用之“一(a)”與“一(an)”等詞，係在其等表示所指稱化合物或步驟的“至少一者”、“至少第一者”、“一或多種”或“多個”之涵義上使用，除非上下文中另有所指。

凡用於本文中之“及/或”一詞，係包括“及”、“或”以及“由該詞所連接的元素之全部或其他任何組合”之含義。

如本文中所用之“約”或“約略”一詞，係指位於一給定數值或範圍之10%內，較佳8%內，及更佳5%內。

“胺基酸”、“殘基”及“胺基酸殘基”等詞係同義詞，及涵蓋天然胺基酸以及胺基酸類似物(如非天然、合成及經改質的胺基酸，及包括D或L光學異構物)。

“多肽”、“肽”及“蛋白”等詞係指胺基酸殘基的聚合物，其至少包括經由肽鍵鍵結的9個或更多個胺基酸。該聚合物可為直鏈型、分支型或環狀，及可包含天然存在的胺基酸及/或胺基酸類似物，及其間可中斷而存在非胺基酸。就通用的表示方式而言，若該胺基酸聚合物所具有的胺基酸殘基超過50個，則較佳稱作多肽或蛋白；若其長度為50個胺基酸以下，則稱作“肽”。

當用於界定產物、組成物與方法時，如本文中所用之“包含”(及包含(comprising)的任何形式諸如“包含(comprise)”與“包含(comprises)”)、“具有”(及具有(having)的任何形式諸如“具有(have)”及“具有(has)”)、“包括”(及包括(including)的任何形式諸如“包括(includes)”及“包括

(include))”或“含有”(及含有(containing)的任何形式諸如“含有(contains)”及“含有(contain))”等詞，係開放式及不排除其他未列舉的元素或方法步驟。因此，多肽係“包含”一胺基酸序列，當該胺基酸序列可能是多肽的最終胺基酸序列的一部分時。該多肽可能具有高達數百個附加的胺基酸殘基。“實質上由...所組成”係指將具任何實質意義的其他組分或步驟排除在外。因此，實質上由所列舉的組分所組成之一組成物將不排除微量污染物與藥學上可接受的載劑。當胺基酸序列終究只存在一些附加的胺基酸殘基時，則多肽係“實質上由該胺基酸序列所組成”。“由...所組成”係指所排除者不只是其他組分的微量元素或步驟。例如，當多肽不含有所列舉之胺基酸序列以外的任何胺基酸時，則多肽係“由該胺基酸序列所組成”。

如本文中所用之“HBV”與“B型肝炎病毒”係以可互換方式使用，及係指嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)的任何成員(如參見美國賓州費城的利平科特·威廉斯及威爾金斯(Lippincott Williams & Wilkins)公司出版及由Knipe DM等人編輯之“費氏病毒學(Fields Virology)”第四版或後續版本之Ganem與Schneider所著“嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)”(2001年)第2923-2969頁的“病毒與其等的複製作用”乙文)。各種HBV多肽的胺基酸序列及其編碼核苷酸序列可參見專門資料庫(如上述所提及者)及文獻(如參見美國紐約學術出版社(Academic Press)出版及由B. Fields等人編輯之“動物病毒遺傳學(Animal Virus Genetics)”乙書第57-70頁

之 Valenzuela 等人所著“B 型肝炎病毒基因體的核苷酸序列及主要病毒基因之鑑定”(1980 年)乙文；及 Vaudin 等人於 1988 年期刊“J. Gen. Virol.”第 69 期第 1383 頁乙文)。

如本文中所用之“HBV 聚合酶”一詞，係指保有天然 HBV 聚合酶蛋白所包含的胺基酸殘基中之至少 500 個之一多肽。理想地，該等至少 500 個胺基酸殘基係分佈於天然 HBV 聚合酶中所正常存在的三個功能域，及較佳分佈在四個域。該詞涵蓋自天然 HBV 來源諸如上述針對“HBV”一詞所引述者以及經改質的聚合酶(亦即突變體聚合酶多肽)及其片段中可發現、分離、獲得之任何 HBV 品系、分離株或基因型之天然(亦即天然存在的)聚合酶多肽。為了說明之用，藉由參照一種長度為 832 個胺基酸的聚合酶，將本文所述 HBV 聚合酶的胺基酸殘基編號，而基序酪胺酸甲硫胺酸天門冬胺酸天門冬胺酸(YMDD)中的殘基酪胺酸係第 538 號殘基。將胺基酸殘基編號修改而適用在其他聚合酶(如長度為 843 或 845 個胺基酸者)，係在嫺熟技藝者的能力所及範圍內。

當針對任何胺基酸序列(如肽、多肽、蛋白等)或核苷酸序列(如基因、核酸分子、聚核苷酸等)使用如本文中所用之“天然”或“天然存在”一詞時，係指可從一天然來源發現、分離、獲得之一胺基酸序列或一核苷酸序列，該天然來源係有別於人為在實驗室所人工改質或突變者(亦即突變體)。該等天然來源包括從感染或曾暴露於 HBV 的一生物體所收集之生物試樣(如血液、血漿、血清、精液、唾液、組

織切片、活組織檢驗檢體等)；所培養的細胞(諸如HepG2.2.15、HuH6-C15(Sureau等人於1986年期刊“Cell”第47期第37頁乙文；Sells等人於1987年期刊“Proc. Natl. Acad. Sci.”第84(4)期第1005頁乙文)、HuH7.TA61或HuH7.TA62(Sun等人於2006年期刊“J Hepatol.”第45(5)期第636頁乙文)；組織培養；以及重組材料。重組材料包括但不限於HBV分離株(如可自寄存機構取得者)、HBV基因體、基因體RNA或cDNA庫、含有HBV基因體或其片段之載體或已知包括該等元素之任何習知載體)。

為了說明之用，“天然HBV聚合酶”係指由技藝中所述之任何天然存在的HBV基因型、品系或分離株的ORFP所編碼之HBV聚合酶(如依基因型而定之具有832至845個胺基酸的多肽)或其片段。“天然”一詞亦涵蓋代表一特定基因型之HBV聚合酶多肽/肽，及因而包含對應於一共有或近乎共有序列之一胺基酸序列，該共有或近乎共有序列通常在一特定基因型的各種HBV聚合酶之序列比對後確定。

如本文中所用之“突變體”一詞，係指展現相對於天然對應體的一或多種突變作用之一多肽。為說明之用，一“突變體聚合酶多肽”係指源自一天然聚合酶及如本文所述經人工突變或在實驗室藉由人為改變後之一聚合酶多肽。可設想任何突變作用，包括一或多個核苷酸/胺基酸殘基的取代作用、插入作用及/或刪除作用；非天然的排列(如與外來多肽/肽融合)以及該等可能性的任何組合。當可設想數種突變作用時，其等可涉及相鄰殘基及/或非相鄰殘基。突變

作用可藉由嫺熟技藝者所知的一些方式產生，諸如定點誘突變作用(如使用法國雷祖里(Les Ullis)之安瑪西亞(Amersham)公司的Sculptor™試管內誘突變系統)、PCR誘突變作用、DNA重排技術及藉由化學合成技術(如產生一合成核酸分子)。依據較佳實施例，本發明所設想的突變作用涵蓋一或多個胺基酸殘基(相鄰與否)的刪除作用及/或取代作用，該等胺基酸殘基係直接或間接涉及天然HBV聚合酶所展現的至少一種酵素活性，而該突變作用之目的係破壞該至少一種酵素活性，諸如聚合酶活性及/或RNaseH活性。在本發明的上下文中，所產生的突變體聚合酶多肽在在非突變部分全面保有與對應的天然HBV聚合酶之高度一致性(如至少80%)。

如本文中所用針對一指定酵素活性之“破壞(disrupt)”一詞或任何衍生用詞諸如“破壞(disrupting)”係指廢除”(全無殘餘活性)或“顯著降低”(殘餘活性係低於天然聚合酶所展現活性的20%)。

“一致性”一詞係指在二種多肽或核苷酸序列之間之胺基酸相對於胺基酸或核苷酸相對於核苷酸之確切對應。二種序列之間的一致性百分比係該等序列所共享的相同位置之數目，同時將為求最佳比對所需納入的缺口數目及各缺口的長度納入考量。在技藝中可取得各種電腦程式與數學演算法，來測定胺基酸序列之間的一致性百分比，諸如例如可在NCBI取得之基本局部比對搜尋工具(Blast)程式或“蛋白序列與結構圖集(Atlas of Protein Sequence and

Structure)”中之ALIGN(Dayhoffed於1981年附刊第3期第482-489頁)。亦可在專門資料庫中，取得用於測定核苷酸序列之間的同源性之程式(如基因資料庫(Genbank)、威斯康辛序列分析套組(Wisconsin Sequence Analysis Package)、BESTFIT、FASTA及GAP程式)。為說明之用，如本文中所用之“至少80%的序列一致性”係指80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

如本文中所用之“分離”一詞，係指將一蛋白、多肽、肽、聚核苷酸、質體載體、病毒載體或宿主細胞從其天然環境移開(亦即與其天然相關聯的至少一組分分離)。

HBV序列

適用於本文所述實施例中之一些HBV序列，係包括該領域的研究者即可取得的該等序列，該等序列包括但不限於基因資料庫(Genbank)與PubMed中所述的HBV序列。為說明之用，詳盡的種系發生分析將B型肝炎病毒分類成8個主要基因型(A至H)，其等雖然展現高度的序列保留性，但顯現不同的地理分佈與臨床結果。針對HBsAg相關血清學(參見 Mamum-AlMahtab 等人於2008年期刊“Hepatobiliary Pancrease Dis Int”第5期第457頁乙文之回顧評論；Schaeffer於2007年期刊“World Gastroenterol.”第7期第14頁乙文)，亦將不同的HBV分類成9個不同亞型(*ayw1*、*ayw2*、*ayw3*、*ayw4*、*ayr*、*adw2*、*adw4*、*adrq+andadqr-*)。各基因型與血清型涵蓋不同的HBV品系與分離株。一分離株係對應於從

一特定的HBV來源(如一病患試樣或其他生物性HBV傳染窩)所分離之一特定病毒，而一品系係涵蓋就基因體序列而言彼此非常相近之各種分離株。

基因型A的例示性HBV係包括但不限於分離株HB-JI444AF及品系HB-JI444A(登錄號AP007263)。基因型B的例示性HBV係包括但不限於殖株pJDW233(登錄號D00329)、分離株HBV/14611(登錄號AF121243)、HBV-B1(基因資料庫登錄號AF282917.1)、HBV品系Whutj-37(基因資料庫登錄號AY2933309.1)、中國HBV品系GDH1(基因資料庫登錄號AY766463.1)及HBV分離株57-1亞型adw(基因資料庫登錄號AY518556.1)。基因型C的例示性HBV係包括但不限於分離株AH-1-ON980424(登錄號AB113879)、品系HCC-3-TT(登錄號AB113877)、HBV分離株SWT3.3(基因資料庫登錄號EU916241.1)、HBV分離株H85(基因資料庫登錄號AY306136.1)、HBV品系C1248(基因資料庫登錄號DQ975272.1)、HBV分離株CHN-H155(基因資料庫登錄號DQ478901.1)及HBV分離株GZ28-1(基因資料庫登錄號EF688062)。基因型D的例示性HBV包括但不限於分離株KAMCHATKA27(登錄號AB188243)、ALTAY136(登錄號AB188245)及Y07587(基因資料庫登錄號Y07587及Stoll-Becker等人於1997年期刊“J. Virol.”第71期第5399頁乙文)以及登錄號AB267090項下所述之HBV分離株。基因型E的例示性HBV係包括但不限於分離株HB-JI411F及品系HB-JI411(登錄號AP007262)。基因型F的例示性HBV係包括

但不限於分離株 HBV-BL597(登錄號 AB214516)與 HBV-BL592(登錄號 AB166850)。基因型 G 的例示性 HBV 係包括但不限於分離株 HB-JI444GF 及品系 HB-JI444G(登錄號 AP007264)。基因型 H 的例示性 HBV 係包括但不限於分離株 HBVST0404(登錄號 AB298362)與分離株 HB-JI260F 及品系 HB-JI260(登錄號 AP007261)。

本發明之意圖係不侷限於該等例示性 HBV 序列。誠然，如本發明使用之 HBV 多肽/肽中的任一或所有者之核苷酸與胺基酸序列，可因不同的 HBV 分離株與基因型而有所差異，而這天然的基因差異係涵蓋於本發明的範圍內。此外，用於本發明中之 HBV 多肽/肽可代表一特定基因型，及因而包含對應於一共有或近似共有序列之胺基酸序列。

此外，各 HBV 多肽/肽可獨立地源自目前所辨識出之任何 HBV 基因型、品系或分離株，諸如上文針對“HBV”一詞所述之任一者。該構型可因而提供對抗較廣範圍的 HBV 基因型之保護作用，或藉由使用一區域或一特定病患族群所特有的 HBV 基因型而適用於該特定的地理區域。就這方面而言，基因型 A 與 C 係在美國最普遍，基因型 A 與 D 係在西歐國家及基因型 D 在地中海盆地最普遍，而基因型 B 與 C 係在中國最常見。來自印度的有限資料顯示基因型 A 與 D 係在印度最普遍。依據待治療的族群及/或地理區域選擇適當的 HBV 基因型、血清型、品系及/或分離株，係在嫻熟技藝者的能力所及範圍。

如一較佳實施例，用於本發明中之 HBV 多肽/肽係源自

一種基因型D病毒，其中尤以HBV分離株Y07587為首選。

突變體HBV聚合酶

本發明的突變體聚合酶多肽係包含一突變型聚合酶域，其所具有的一內部刪除作用係在功能上破壞該聚合酶活性及至少包括天然存在於一天然聚合酶的聚合酶域之YMDD基序。可使用技藝中所眾所周知之分析法(如Radziwill等人於1990年期刊“J Virol.”第64期第613頁乙文中所述的內生性聚合酶分析法)，評估所產生的突變體聚合酶多肽所展現之聚合酶活性破壞作用。

在序列辨識編號：1中提供涵蓋基因型B、C與D之天然HBV聚合酶的聚合酶域之一通用胺基酸序列，其中在位置7的殘基Xaa為蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)；在位置13的殘基Xaa為天冬醯胺酸(N)、精胺酸(R)或組胺酸(H)；在位置16的殘基Xaa為異白胺酸(I)或蘇胺酸(T)；在位置38的殘基Xaa為蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)；在位置53的殘基Xaa為絲胺酸(S)或天冬醯胺酸(N)；在位置54的殘基Xaa為蘇胺酸(T)或酪胺酸(Y)；在位置55的殘基Xaa為組胺酸(H)或精胺酸(R)；在位置91的殘基Xaa為異白胺酸(I)或白胺酸(L)；在位置109的殘基Xaa為脯胺酸(P)或絲胺酸(S)；在位置118的殘基Xaa為蘇胺酸(T)或天冬醯胺酸(N)；在位置121的殘基Xaa為天冬醯胺酸(N)或異白胺酸(I)；在位置122的殘基Xaa為異白胺酸(I)或苯丙胺酸(F)；在位置124的殘基Xaa為酪胺酸(Y)或天冬醯胺酸(N)；在位置127的殘基Xaa為甘胺酸(G)或精胺酸(R)；在位置131的殘基Xaa為天門冬胺酸(D)或天冬醯胺酸(N)；

在位置134的殘基Xaa為天門冬胺酸(D)或天冬醯胺酸(N)；
 在位置145的殘基Xaa為白胺酸(L)或甲硫胺酸(M)；在位置
 149的殘基Xaa為離胺酸(K)或麩醯胺(Q)；在位置151的殘基
 Xaa為苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)；在位置221的殘基Xaa為苯
 丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)；在位置222的殘基Xaa為蘇胺酸(T)
 或丙胺酸(A)；在位置223的殘基Xaa為絲胺酸(S)或丙胺酸
 (A)；在位置224的殘基Xaa為異白胺酸(I)或纈胺酸(V)；在
 位置238的殘基Xaa為天冬醯胺酸(N)或組胺酸(H)；在位置
 248的殘基Xaa為天冬醯胺酸(N)或組胺酸(H)；在位置256的
 殘基Xaa為絲胺酸(S)或半胱胺酸(C)；在位置257的殘基Xaa
 為色胺酸(W)或酪胺酸(Y)；在位置259的殘基Xaa為蘇胺酸
 (T)或絲胺酸(S)；在位置263的殘基Xaa為麩胺酸(E)或天門
 冬胺酸(D)；在位置266的殘基Xaa為纈胺酸(V)或異白胺酸
 (I)；在位置267的殘基Xaa為白胺酸(L)或麩醯胺(Q)；在位
 置271的殘基Xaa為麩醯胺(Q)、甲硫胺酸(M)或麩胺酸(E)；
 在位置317的殘基Xaa為絲胺酸(S)或丙胺酸(A)；及在位置
 332的殘基Xaa為半胱胺酸(T)或絲胺酸(S)。

如本發明，本發明的突變體聚合酶多肽中所包含之突
 變型聚合酶域，係至少缺少存在於序列辨識編號：1之該通
 用聚合酶域的位置203至位置206之YMDD基序。

本發明亦涵蓋至少包括該YMDD基序之任何具有至少
 4個胺基酸殘基及至多30個胺基酸殘基的其他內部刪除作
 用。

如本發明之一代表性突變體聚合酶多肽所包含之一突

變型聚合酶域，係包含序列辨識編號：1中所示之胺基酸序列但至少缺少位置203的酪胺酸殘基、位置204的甲硫胺酸殘基、位置205的天門冬胺酸殘基及位置206的天門冬胺酸殘基。

進一步就YMDD基序而言，內部刪除作用較佳亦涵蓋存在於一天然HBV聚合酶域的YMDD基序C端之所有或部分的鄰近VVL基序(對應於序列辨識編號：1之位置207至209的殘基及對應於具有832個胺基酸的一天然聚合酶之位置542至544的殘基)。該VVL基序確實可有助於形成“鄰接”抗原決定位(如同直線合成的新抗原決定位)，其具有使得對抗一或多個HBV聚合酶相關型抗原決定位之宿主免疫反應降低或沉默之風險。

本發明的突變體聚合酶多肽較佳包含一突變型聚合酶域，其具有序列辨識編號：1中所示的胺基酸序列，但至少缺少位置203的酪胺酸殘基、位置204的甲硫胺酸殘基、位置205的天門冬胺酸殘基、位置206的天門冬胺酸殘基、位置207的纈胺酸殘基、位置208的纈胺酸殘基及位置209的白胺酸殘基。

本發明的突變體聚合酶多肽更佳包含一聚合酶域，其包含一胺基酸序列、任擇地實質上由一胺基酸序列所組成或任擇地由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列與序列辨識編號：2中所示的胺基酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性係較佳至少90%，該一致性係更佳至少95%，及該一致性甚至更佳為100%。該突變

型聚合酶域甚至更佳包含序列辨識編號：2中所示的胺基酸序列。

本發明的突變體聚合酶多肽亦任擇地或組合地包含一突變型RNaseH域，該突變型RNaseH域包含一或多個胺基酸殘基的突變作用而在功能上破壞一天然HBV聚合酶正常所展現的RNaseH活性。

如上文所論及，已在C端部分內，尤其是長度為832個胺基酸的一天然HBV聚合酶之位置680至C端(長度為845個胺基酸的一天然HBV聚合酶之位置693至C端)，定位涉及RNase H活性的功能域，及本發明涵蓋該域中與破壞RNase H活性相關聯的任何突變作用(亦即最終導致低於天然RNase H活性的20%之微弱殘餘活性)。可使用技藝中所眾所周知之分析法(如Radziwill等人於1990年期刊“J Virol.”第64期第613頁乙文或Lee等人於1997年期刊“Biochem. Bioph. Res. Commun.”第233(2)期第401頁乙文中所述之試管內RNase H活性分析法或DNA-RNA串聯分子分析)，評估由突變體聚合酶多肽所展現之RNase H活性破壞作用。

在序列辨識編號：3中提供涵蓋基因型B、C與D的天然HBV聚合酶之RNase H域之一通用胺基酸序列，其中在位置2的殘基Xaa為絲胺酸(S)或脯胺酸(P)；在位置19的殘基Xaa為丙胺酸(A)或纈胺酸(V)；在位置20的殘基Xaa為異白胺酸(I)或甲硫胺酸(M)；在位置30的殘基Xaa為纈胺酸(V)或白胺酸(L)；在位置31的殘基Xaa為丙胺酸(A)或絲胺酸(S)；在位置53的殘基Xaa為離胺酸(K)或天冬醯胺酸(N)；在位置54的

殘基Xaa為白胺酸(L)或異白胺酸(I)；在位置55的殘基Xaa為白胺酸(L)或異白胺酸(I)；在位置97的殘基Xaa為丙胺酸(A)或蘇胺酸(T)；在位置108的殘基Xaa為酪胺酸(Y)或絲胺酸(S)；在位置115的殘基Xaa為脯胺酸(P)或白胺酸(L)；在位置116的殘基Xaa為苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)；在位置128的殘基Xaa為纈胺酸(V)或天門冬胺酸(D)。

本發明之突變體聚合酶多肽的RNaseH域中所包含的一或多種突變作用，係有利地選自由下列所組成之群組：

- 具有至少8個胺基酸及至多60個胺基酸之刪除作用，其至少包括序列辨識編號：3之自位置39的麩胺酸(E)殘基左右延伸至位置46的丙胺酸(A)殘基左右之部分(刪除ELLAACFA)；

- 用天門冬胺酸以外的一胺基酸殘基，取代序列辨識編號：3之位置10的天門冬胺酸(D)殘基；

- 用纈胺酸以外的一胺基酸殘基，取代序列辨識編號：3之位置90的纈胺酸(V)殘基；

- 用蘇胺酸或丙胺酸以外的一胺基酸殘基，取代序列辨識編號：3之位置97的蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)殘基；

- 用天門冬胺酸以外的一胺基酸殘基，取代序列辨識編號：3之位置98的天門冬胺酸(D)殘基；及

- 其任何組合。

代表性的適當組合實例係包括但不限於(a)在位置10、90、97及98的胺基酸殘基取代作用；(b)包括GLLAACFA基序在內的8至60個胺基酸殘基之刪除作用及在任何所引述

位置的胺基酸殘基取代作用；或(c)所列出的所有突變作用之組合。

適宜地，在序列辨識編號：3的位置10、90、97或98之被取代的殘基，係個別地被一個組胺酸(H)殘基或被一個酪胺酸(Y)殘基置換，其中尤以經一個組胺酸(H)殘基取代的序列辨識編號：3之位置10的殘基(D689H)、經一個酪胺酸(Y)殘基取代的序列辨識編號：3之位置90的殘基(V769Y)、經一個酪胺酸(Y)殘基取代的序列辨識編號：3之位置97的殘基(T776Y或A776Y)及/或經一個組胺酸(H)殘基取代的序列辨識編號：3之位置98的殘基(D777H)為首選。

適宜地，突變型RNase H域中所包含的刪除作用，係包括自序列辨識編號：3之位置39的麩胺酸殘基(E)左右延伸至位置57的蘇胺酸(T)殘基左右之至少19個胺基酸殘基的一部分，較佳包括自序列辨識編號：3之位置39的麩胺酸殘基(E)左右延伸至位置63的白胺酸(L)殘基左右之具有至少25個胺基酸之一部分，及更佳包括自序列辨識編號：3之位置31的殘基Xaa(A或S)左右延伸至位置63的白胺酸(L)殘基左右之至少33個胺基酸的一部分。

本發明的突變體聚合酶多肽較佳包含一突變型RNase H域，其包含序列辨識編號：3中所示的胺基酸序列，但是(a)缺少自位置31的殘基Xaa(X)延伸至位置63的白胺酸(L)殘基左右之33個胺基酸殘基的一部分，及包含(b)用一個組胺酸(H)殘基取代位置10的天門冬胺酸(D)殘基之取代作用(D689H)；(c)用一個酪胺酸(Y)殘基取代位置90的纈胺酸(V)

殘基之取代作用(V769Y)；(d)用一個酪胺酸(Y)殘基取代位置97的殘基之取代作用(T/A776Y)及(e)用一個組胺酸(H)殘基取代位置98的天門冬胺酸(D)殘基之取代作用(D777H)。

本發明的突變體聚合酶多肽更佳包含一突變型RNase H域，其包含一胺基酸序列、任擇地實質上由一胺基酸序列所組成或任擇地由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列與序列辨識編號：4中所示的胺基酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性係較佳至少90%，該一致性係更佳至少95%，及該一致性甚至更佳為100%。

在一個甚至更佳的實施例中，本發明的突變體聚合酶多肽係包含一胺基酸序列、任擇地實質上由一胺基酸序列所組成或任擇地由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列與序列辨識編號：5中所示的胺基酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性係較佳至少90%，該一致性係更佳至少95%，及該一致性甚至更佳為100%。又甚至更佳者係包含序列辨識編號：5中所示的胺基酸序列之突變體聚合酶多肽。

在本發明的上下文中，本發明的突變體聚合酶多肽可包含附加的突變作用。然而，較佳避免可能損及免疫原活性的改質作用，特別在富含B、CTL及/或T_H抗原決定位之部分。

例示性的附加改質作用包括N端截斷作用。其中以正常存在於一天然HBV聚合酶或序列辨識編號：5的N端之至少

20個胺基酸殘基及至多100個胺基酸殘基的截斷作用特別適當，其中尤以自序列辨識編號：5之位置1(甲硫胺酸起始子)或2延伸至位置47左右的截斷作用為首選。該改質作用係特別攸關與一天然HBV核心多肽組合使用之突變體聚合酶多肽，因為N端截斷作用有助於減少或刪除該二種多肽之間的重疊部分。然而，如下文所述，亦可藉由組合使用一種C端截斷型HBV核心多肽及一種非截斷型突變體聚合酶多肽，而同樣達成。

所產生的突變體聚合酶多肽理想地保有免疫原性質，尤其是刺激細胞所媒介的免疫反應之能力，其範圍係與天然聚合酶相同或任擇地較高。

與其他多肽之組合/融合

在另一實施例中，本發明的突變體聚合酶多肽可與一或多種附加的多肽或肽組合使用。

“組合”一詞及其變體諸如“組合使用”係指在同一宿主生物體中投予二或多種實體，其中一者係本發明的一標的。通常，該至少二種實體可藉由不同途徑及按照不同時間排程投予。適宜的組合係包括但不限於本文所述之突變體聚合酶多肽(或編碼該突變體聚合酶多肽之一載體)與抗病毒藥物(SOC)及/或與附加的多肽或編碼該附加多肽之載體之組合。該組合之形式可為(a)一混合物(如二或多種多肽或載體之混合物)；(b)二或多種實體之間之融合；或(c)經由特定的表現作用設計(如雙順反子或獨立表現作用)。例如，該二或多種實體可使用不同的調控元素(如不同的啟動子

與終止序列)，而獨立地在同一載體中表現。該獨立表現作用之設計係特別適用於來自質體或麻疹載體之表現作用。任擇地，該二或多種實體可在相同啟動子與終止序列之控制下，以雙順反子方式表現，但需要使用允許來自相同mRNA之二或多種順反子轉譯作用之附加的調控元素諸如IRES(即內部核糖體進入位址)。在技藝中有眾多的IRES可供選擇，諸如該等源自小兒麻痺病毒、C型肝炎病毒及腦心肌炎(EMCV)病毒者(如參見WO95/24485)。雙順反子設計係特別適用於來自選殖能力較為有限的載體諸如腺病毒載體之表現作用。

如本文中所用之“融合體”或“融合蛋白”一詞，係指在單一多肽鏈中具有二或多種多肽/肽之組合。較佳經由基因方式進行融合，亦即藉由在同一讀框融合編碼該等多肽/肽之各者的核苷酸序列。“在同一讀框融合”係指所融合的編碼序列之表現作用產生單一蛋白，而在所融合的多肽/肽中之各者之間並無任何轉譯終結子。可直接融合(亦即二者之間並無任何附加的胺基酸殘基)，或經由一連接子融合(如由重複的胺基酸殘基諸如甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺酸、丙胺酸及/或脯胺酸所組成之長度為3至30個胺基酸之肽)。

與本發明的突變體聚合酶多肽組合使用之附加的多肽或肽，係較佳由HBV基因體所編碼之一多肽或肽，諸如任何天然的HBV多肽、經改質的衍生物及/或其片段。該HBV多肽或肽之代表性實例係包括但不限於HBc(核心)、HBs、

X蛋白及其任何免疫原性片段。

如本發明之上文所述，用於本發明之任何附加的HBV多肽或肽所源自之HBV基因型、品系或分離株，可與本發明的突變體聚合酶多肽所源自之HBV基因型、品系或分離株不同或相同。較佳，該附加的HBV多肽係源自基因型D HBV，及尤其源自Y07587分離株。

本文所述之突變體聚合酶多肽與該附加的多肽之一融合蛋白係一較佳的組合形式。較佳為直接融合，而在所融合的實體之間並無任何連接子。

與核心之組合

如本文中所用之“核心多肽”一詞，係指保有天然HBV核心(HBc)蛋白中所包含的至少100個胺基酸殘基之一種多肽。該詞涵蓋可從一天然的HBV來源發現、分離、獲得之任何HBV品系、分離株或基因型之天然(亦即天然存在)的核心多肽，諸如上述針對“HBV”一詞所引述者以及經改質的核心及其片段。

用於本發明中之HBV核心多肽可源自一HBV病毒，其所具有的基因型可與該突變體聚合酶多肽所源自者相同或不同。其等較佳均源自一種基因型D病毒，及尤其源自Y07587分離株。可藉由嫺熟技藝者所知的一些方式，諸如藉由編碼序列的化學合成作用(如產生一合成核酸分子)或藉由重組方式(如對應核苷酸序列的定點誘突變作用、PCR誘突變作用、DNA重排技術)，產生核心多肽及其等的編碼序列。

可設想任何改質作用，前提在於當所產生的核心與本文所述之突變體聚合酶多肽組合或融合時保有顯著的免疫原活性，其範圍係較佳與天然核心對應體相同或較高。

適宜的改質作用包括截斷一天然核心多肽的C端或其C端部分內所正常存在的至少10個胺基酸殘基及至多41個胺基酸殘基，及尤以自第143、144、145、146、147、148個殘基或第149個殘基延伸至天然核心多肽的C端(第183個殘基)之截斷作用為首選。其他適宜的改質作用包括一或多個胺基酸殘基之內部刪除作用，特別在外露表面區，諸如預期形成一外環之第80個殘基附近的區域(Argos等人於1988年期刊“EMBO J.”第7期第819頁乙文；Borisova等人於1993年期刊“J. Virol.”第67期第3696頁乙文；Schodel等人於1992年期刊“J. Virol.”第66期第106頁乙文；Yon等人於1992年期刊“J. Gen Virol.”第73期第2569頁乙文；及Pumpens等人於1995年期刊“Intervirology”第38期第63頁乙文)。

在一個較佳實施例中，該組合係一融合形式。因此，本發明係有關於包含本文所述之突變體聚合酶多肽與一融合夥伴之一融合蛋白。該融合夥伴較佳為一HBV核心多肽，其中尤以在C端截斷及特別在第148個殘基截斷之一核心多肽為首選。

HBV核心多肽較佳係在本文所述之突變體聚合酶多肽N端的同一讀框融合，而產生從一起始子甲硫胺酸開始之一融合蛋白、不具有任何終止密碼子之核心多肽(經改質或天然者)、突變體聚合酶多肽(不具有任何甲硫胺酸起始子)及

一終止密碼子。

較佳的融合蛋白係包含一胺基酸序列、任擇地實質上由一胺基酸序列所組成或任擇地由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列與序列辨識編號：6中所示的胺基酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性係較佳至少90%，該一致性係更佳至少95%，及該一致性甚至更佳為100%。本發明的融合蛋白更佳包含序列辨識編號：6中所示的胺基酸序列。

與免疫原性HbsAg域之組合

任擇地或與先前實施例(與核心多肽之組合)結合，本發明的突變體聚合酶多肽可與一HbsAg或其免疫原性片段/域組合使用。

如本文中所用之“免疫原域”一詞，係指具有約15個至約100個胺基酸殘基及較佳至少20個至多60個相鄰胺基酸之一多肽，其包括正常存在於一天然HBsAg蛋白中之至少一個B及/或T細胞抗原決定位，該抗原決定位係對於T輔助細胞(T_H)細胞及/或對於細胞毒性T(CTL)細胞具有特異性。此外，該抗原決定位可侷限於各種MHC第I類及/或第II類抗原(如A2、A24、DR、DP等)。本發明中所用的一或多種HBsAg免疫反應域較佳不包括HBV前S1與前S2多肽的任何部分。

一或多種免疫原域中之各者可獨立地源自相同或不同的HBV病毒，其與本文所述之突變體聚合酶多肽(及最終該核心多肽)所源自的HBV病毒可相同或不同。一或多種免疫反應域係較佳源自一種基因型D HBV，及尤其源自Y07587

分離株。

可用於本發明中之例示性免疫反應域係如技藝中所述(如WO93/03764; WO94/19011; Desombere等人於2000年期刊“Clin. Exp. Immunol.”第122期第390頁乙文; Loirat等人於2000年期刊“J. Immunol.”第165期第4748頁乙文; Schirmbeck等人於2002年期刊“J. Immunol.”第168期第6253頁乙文; Depla等人於2008年期刊“J. Virol.”第82期第435頁乙文及WO2011/015656)。特佳的免疫反應域包括WO2011/015656中所述的env1與env2域。“Env1”係對應於天然HBsAg之自位置14左右至位置51左右的部分，而env2係對應於HBsAg之自位置165左右至位置194左右的部分。

在一個較佳實施例中，該組合係一融合形式，及本發明係有關於包含本文所述的突變體聚合酶多肽與一或多個HBsAg免疫原域之一融合蛋白，或有關於進一步包含一或多個HBsAg免疫原域之上文所界定的融合蛋白(其至少包括本文所述的突變體聚合酶多肽與一Hbc多肽)。該一或多個免疫反應域可位於融合蛋白的N端、C端及/或內部，如位於該突變體聚合酶多肽內(例如代替該突變型聚合酶中所缺少之部分及/或RNaseH域)或位於核心與該突變體聚合酶多肽之間。嫻熟技藝者在其能力所及範圍內可據此界定對於媒介轉譯作用的調控元素(如在融合蛋白N端與C端的起始子甲硫胺酸與終止密碼子)之需求及其等位置。

令人特別感興趣的融合蛋白係包含本文中所述的突變體聚合酶多肽、核心多肽及二個HBsAg免疫反應域，其中

尤以在其N端包含一核心多肽(如具有183個殘基的天然型或具有148個殘基及具有一個起始子甲硫胺酸之截斷型)及與突變體聚合酶多肽(不具有起始子甲硫胺酸)融合之一融合體為首選，該突變體聚合酶多肽包含經融合而代替突變型聚合酶域中之內部缺失(如env1)及/或代替突變型RNase H域中之缺失(如env2)之一或二個HbsAg免疫反應域。

就該實施例之一較佳方面而言，本發明的融合蛋白係包含一胺基酸序列、任擇地實質上由一胺基酸序列所組成或任擇地由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列與序列辨識編號：7至9中所示的任何胺基酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性係較佳至少90%，該一致性係更佳至少95%，及該一致性甚至更佳為100%。一特佳實施例係有關於一種融合蛋白，其包含序列辨識編號：8中所示的胺基酸序列。

在本發明的上下文中，本發明的突變體聚合酶多肽或本發明的融合蛋白可進一步包含附加的結構特性。

在一實施例中，其可包含附加化合物(如肽或多肽)，其目的係在於提高宿主生物體中的免疫生成性。文獻中所述之可增強免疫生成性的化合物係包括但不限於鈣網蛋白(Cheng等人於2001年期刊“J. Clin. Invest.”第108期第669頁乙文)、結核分枝桿菌熱休克蛋白 70(HSP70)(Chen等人於2000年期刊“Cancer Res.”第60期第1035頁乙文)、泛素(Rodriguez等人於1997年期刊“J. Virol.”第71期第8497頁乙文)、細菌毒素諸如綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒

素 A 的轉運域(ETA(dIII))(Hung 等人於 2001 年期刊“Cancer Res.”第 61 期第 3698 頁乙文)以及 T 輔助細胞抗原決定位諸如 Pan-Dr 肽(Sidney 等人於 1994 年期刊“Immunity”第 1 期第 751 頁乙文)、pstS1 GCG 抗原決定位(Vordermeier 等人於 1992 年期刊“Eur. J. Immunol.”第 22 期第 2631 頁乙文)、破傷風類毒素肽 P2TT(Panina-Bordignon 等人於 1989 年期刊“Eur. J. Immunol.”第 19 期第 2237 頁乙文)及 P30TT(Demotz 等人於 1993 年期刊“Eur. J. Immunol.”第 23 期第 425 頁乙文)、流行性感冒抗原決定位(Lamb 等人於 1982 年期刊“Nature”第 300 期第 66 頁乙文)及血凝集素抗原決定位(Rothbard 等人於 1989 年期刊“Int. Immunol.”第 1 期第 479 頁乙文)。

其他適宜的結構特性係該等有利於本發明的突變體聚合酶多肽或融合蛋白之合成作用、操作處理、安定性及可溶性者(如目的在於改變潛在的限制酶切位址、潛在的醣化作用位址及/或膜錨定者而得以改善對於細胞膜之呈現者)。

藉由使用技藝中眾所周知的適當序列諸如訊號肽及/或跨膜肽，使得免疫反應引導突變體聚合酶多肽或本文所述之位於細胞表面的融合蛋白的合成作用，可能是有利的。簡而言之，訊號肽一般位於膜所有或所分泌之多肽的 N 端，及起始其等的通過進入內質網(ER)之作用。其等通常包含 15 至 35 個實質疏水性胺基酸，該等胺基酸然後由位於內質網的特定內肽酶移除而產生成熟的多肽。跨膜肽的性質亦為高度疏水性，及其作用係將多肽錨定在細胞膜內。可用於本發明景況中的跨膜肽及/或訊號肽之選擇廣泛。其

等可從任何膜錨定型及/或分泌型多肽(如細胞或病毒多肽)獲得，諸如免疫球蛋白、組織纖維蛋白溶酶原活化劑、胰島素、狂犬病糖蛋白、HIV病毒套膜糖蛋白或麻疹病毒F蛋白，或可合成獲得。

在一實施例中，本發明的突變體聚合酶多肽或融合蛋白係與插入在用於起始轉譯作用之密碼子的N端下游之一訊號肽在同一讀框融合。在另一實施例中，本發明的突變體聚合酶多肽或融合蛋白係與一訊號肽(如插入在其N-端)及與一跨膜肽(如插入在C端及例如緊接著終止密碼子之上游)在同一讀框融合。在本發明的景況中所用之訊號肽與跨膜肽較佳源自狂犬病糖蛋白(如參見WO99/03885或WO2008/138649)。較佳實施例係有關於一HBV聚合酶突變體多肽及一融合蛋白，其包含一胺基酸序列、任擇地實質上由一胺基酸序列所組成或任擇地由一胺基酸序列所組成，該胺基酸序列與序列辨識編號：10、序列辨識編號：11或序列辨識編號：12中所示的胺基酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性尤其至少為90%，該一致性較佳至少為95%，及該一致性甚至更佳為100%。

核酸分子

在另一方面，本發明提供編碼本文中所述的突變體聚合酶多肽與融合蛋白之分離的核酸分子。

在本發明的上下文中，“核酸”、“核酸分子”、“聚核苷酸”及“核苷酸序列”等詞係以可互換方式使用，及用於界定

由聚去氧核糖核苷酸(DNA)(如cDNA、基因體DNA、質體、載體、病毒基因體、分離的DNA、探針、引子及其任一混合物)或聚核糖核苷酸(RNA)(如mRNA、反義RNA)或混合的聚核糖-聚去氧核糖核苷酸所組成之任何長度的聚合物。其等涵蓋單股或雙股、直鏈或環狀、天然或合成的聚核苷酸。此外，聚核苷酸可包含非天然存在的核苷酸，及其間可中斷而存在非核苷酸組分。

可使用技藝中可取得的序列資料及在本文中所提供的序列資訊，從任何來源產生本發明的核酸分子。例如，可獨立地從含有HBV的細胞、cDNA與基因體庫、病毒基因體或已知包括病毒基因體之習知技藝中的任何載體，分離出編碼HBV聚合酶及若需要的核心多肽與HBsAg免疫反應域之DNA序列，然後藉由習用的分子生物學或PCR技術而適宜地連接在一起。任擇地，亦可藉由自動化製程中的化學合成作用，產生本發明的核酸分子(如從重疊的合成寡核苷酸或合成基因組裝而成)。可藉由嫺熟技藝者所知的一些方式，諸如化學合成作用、定點誘突變作用、PCR誘突變作用、DNA重排技術等，產生改質作用。

令人特別感興趣者係選自由下列所組成之群組之任一核酸分子：

- 編碼一突變體聚合酶多肽之一核酸分子，該突變體聚合酶多肽所包含之一聚合酶域係具有序列辨識編號：1或2中所示的胺基酸序列；

- 編碼一突變體聚合酶多肽之一核酸分子，該突變體聚

合酶多肽所包含之一RNaseH域係具有序列辨識編號：3或4中所示的胺基酸序列；

- 編碼一突變體聚合酶多肽之一核酸分子，該突變體聚合酶多肽所包含之一胺基酸序列與序列辨識編號：5中所示的胺基酸序列之一致性係至少80%(如80%、85%、90%、95%、97%、100%)；或

- 編碼一融合蛋白之一核酸分子，該融合蛋白所包含之一胺基酸序列與序列辨識編號：6至12中任一者所示的胺基酸序列之一致性係至少80%(如80%、85%、90%、95%、97%、100%)。

本發明不侷限於該等例示性核苷酸序列，及涵蓋其目的在於改善本發明中所用核酸分子的選殖作用、表現作用、安定性之任何改質作用(如引入適當的限制酶切位址簡併作用及/或用於將一指定宿主細胞中的轉譯作用最佳化之核苷酸序列最佳化作用及/或抑制可能使核酸分子或其轉錄本不安定之潛在負面元素)。當可設想數種改質作用時，其等可涉及相鄰殘基及/或非相鄰殘基。本發明所設想的改質作用涵蓋不改變所編碼的多肽與融合蛋白之胺基酸序列之沉默性改質作用，以及經轉譯成為所編碼的多肽與融合蛋白之改質作用。

在一實施例中，本發明的核酸分子可在全長核苷酸序列或其部分簡併，從而減少在本發明的景況中或在宿主細胞中所用的核酸分子之間之序列同源性。將展現高度的核苷酸序列一致性之核酸序列部分簡併確實是可取的，及嫻

熟技藝者可藉由序列比對而辨識出該等部分。例如若一載體帶有編碼如本文中所述的一突變體聚合酶多肽之一核酸分子及編碼藉由HBV基因體中的重疊序列所編碼之另一HBV多肽之一核酸分子，將重疊部分中的一或二種核酸分子簡併可能是有利的，從而避免生產過程期間的同源重組問題。

可將本發明的核酸分子任擇地或組合地最佳化，以在一特定的宿主細胞或生物體中提供高水平的表現作用。當可用於編碼一特定胺基酸之密碼子不只一個時，確實觀察到生物體的密碼子使用模式係高度非隨機，及不同宿主之間之密碼子使用模式係明顯不同。因本發明所涵蓋的核苷酸序列係大部分來自病毒來源(HBV)，其等的密碼子使用模式可能不適合在諸如細菌、低等或高等真核生物細胞的宿主細胞中有效表現。通常，可用在所感興趣的宿主細胞/生物體中編碼同一胺基酸之較常使用的一或多個密碼子，來置換對應於在所感興趣的宿主細胞/生物體中不常使用的一密碼子之一或多個“天然”(如HBV)密碼子，而進行密碼子最佳化作用。沒有必要置換所有對應於不常使用的密碼子之天然密碼子，因為即使在部分置換之情況下，亦可增加表現作用。此外，可偏離而不嚴格遵循最佳化密碼子使用，使得以在所產生的核酸分子中引入限制酶切位址。

此外，可經由核苷酸序列的附加改質作用，該等改質作用之目的在於阻止罕見、非最佳的密碼子之群聚及/或對於預期負向影響表現水平的負向序列元素(如富含AT或富

含GC的序列延伸；不穩定的正向或反向重複序列；RNA二級結構；及/或內部隱藏式調控元素諸如內部TATA盒、chi位址、核糖體進入位址及/或剪接供體/受體位址)中之至少一部分進行抑制或改質，而增進宿主細胞或生物體中的表現作用。

本發明的一個特佳實施例係有關於一核酸分子，其包含一核苷酸序列、任擇地實質上由一核苷酸序列所組成或任擇地由一核苷酸序列所組成，該核苷酸序列與序列辨識編號：13至17中任一者所示的核苷酸序列之一致性係至少80%，該一致性有利地至少為85%，該一致性係較佳至少90%，該一致性係更佳至少95%，及該一致性甚至更佳為100%。

本發明的另一實施例係有關於本發明的核酸分子片段，如限制核酸內切酶與PCR所產生的片段。該等片段可作為探針、引子或片段，而用於編碼所編碼的免疫原性多肽之一免疫原性部分。

載體

在另一方面，本發明提供包含本發明的一核酸分子之載體。

如本文中所用之“載體”一詞，係指較佳為一核酸分子或一病毒顆粒之一載劑，及其含有容許一或多種核酸分子在一宿主細胞或生物體內輸送、增殖及/或表現所需之元素。該詞涵蓋供維護用之載體(選殖載體)或供在各種宿主細胞或生物體中表現之載體(表現載體)，染色體外載體(如多

套組質體)或嵌入性載體(如經設計嵌入至宿主細胞的基因體中及當宿主細胞複製時產生附加的核酸分子套組)以及轉運載體(如同時在原核生物及/或真核生物宿主中運作)及轉移載體(如用於轉移一病毒基因體中的核酸分子)。就本發明之目的而言，該等載體可來自天然存在的基因來源，可為合成或人工型，或為天然與人工基因元素之一些組合。

在本發明的上下文中，應廣義地將“載體”一詞理解為包括質體與病毒載體。如本文中所用之“質體載體”係指一種可複製的DNA構建體。通常質體載體含有篩選標記基因，而容許在一對應的篩選用藥物存在下，將帶有該質體載體的宿主細胞篩選出或棄選。技藝中已知多種正向與負向篩選標記基因。舉例而言，可使用一種抗生素抗性基因作為一正向篩選標記基因，而容許在對應的抗生素存在下篩選出一宿主細胞。

如本文中所用之“病毒載體”一詞，係指包括病毒基因體的至少一元素之核酸載體，及可將其包裝在一病毒顆粒中或包裝成一病毒顆粒。“病毒”、“病毒粒子”、“病毒顆粒”及“病毒載體顆粒”等詞係以可互換方式使用，及係指當該核酸載體依據容許產生感染性病毒顆粒的適宜條件而轉導成為一適當的細胞或細胞株時所形成之病毒顆粒。在本發明的上下文中，應廣義地將“病毒載體”一詞理解為包括核酸載體(如DNA病毒載體)以及其所產生的病毒顆粒。“感染性”一詞係指一病毒載體感染及進入一宿主細胞或生物體中之能力。病毒載體可具有複製能力或複製選擇性(如經工

程化而在特定宿主細胞中具有更佳或選擇性的複製作用)；或可在基因方面失效，從而成為複製作用缺陷型或複製作用受損型。

在本發明的上下文中，載體適當地包括但不限於供在原核生物宿主細胞諸如細菌(如大腸桿菌(*E. coli*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)或李斯特菌屬(*Listeria*))中表現之噬菌體、質體或黏接質體載體；供在酵母菌(如啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母菌(*Saccharomyces pombe*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*))中表現之載體；供在昆蟲細胞系統(如Sf 9細胞)中表現之桿狀病毒載體；供在植物細胞系統(如Ti質體、花椰菜嵌紋病毒CaMV、菸草嵌紋病毒TMV)中表現之病毒與質體載體；以及供在高等真核生物細胞或生物體中表現之病毒與質體載體。

通常可商購取得該等載體(如自英杰(Invitrogen)公司、史崔塔基因(Stratagene)公司、阿默舍姆生物科技(Amersham Biosciences)公司、普洛麥格(Promega)公司等)；或可自諸如美國菌種保存中心(ATCC及位於美國馬里蘭州羅克維爾(Rockville))的寄存機構取得；或有眾多出版文獻述及其等的序列、組成及生產方法，使得專業人員可加以應用。

適宜質體載體的代表性實例包括但不限於pREP4、pCEP4 (英杰(Invitrogen)公司)、pCI (普洛麥格(Promega)公司)、pVAX(英杰(Invitrogen)公司)及pgWiz(基因療法系統(Gene therapy System)有限公司)。

適宜的病毒載體之代表性實例係由多種不同的病毒(逆轉錄病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒(AAV)、痘病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、泡沫病毒、 α 病毒、濾泡性口炎病毒等)產生。如上文所述，“病毒載體”一詞涵蓋載體DNA、基因體DNA以及其所產生的病毒顆粒。

本發明亦涵蓋與脂質或聚合物複合而形成顆粒結構之載體(如質體DNA)，諸如脂質體、脂複合體或奈米粒子。

在一實施例中，本發明的載體係一腺病毒載體。其可自多種人類或動物腺病毒(如犬、羊、類人猿等)衍生。可使用任何血清型。理想地，腺病毒載體係複製作用缺陷型及源自人類Ad，尤其是源自具罕見血清型之人類Ad，或源自黑猩猩Ad。人類腺病毒的代表性實例包括亞屬C之Ad2 Ad5與Ad6；亞屬B之Ad11、Ad34與Ad35；及亞屬D之Ad19、Ad24、Ad48及Ad49。黑猩猩Ad的代表性實例包括但不限於AdCh3(Peruzzi等人於2009年期刊“Vaccine”第27期第1293頁乙文)、AdCh63(Dudareva等人於2009年期刊“Vaccine”第27期第3501頁乙文)及技藝中所述之任一者(例如參見WO03/000283；WO03/046124；WO2005/071093；WO2009/073103；WO2009/073104；WO2009/105084；WO2009/136977及WO2010/086189)。

可如技藝中所述獲得複製作用缺陷型腺病毒載體，如藉由刪除病毒複製作用所不可或缺之腺病毒基因體的至少一區或其部分，其中尤以刪除包含E1編碼序列(如參照基因庫登錄號M 73260及Chroboczek等人於1992年期刊“Virol.”

第186期第280頁乙文所揭露之第5型人類腺病毒序列之自位置459左右延伸至3510)的E1區之刪除作用為首選。本發明亦涵蓋在腺病毒基因體內具有附加的刪除作用/改質作用之載體(如WO94/28152中所述之非必要的E3區或其他必要的E2、E4區之全部或部分；Lusky等人於1998年期刊“J. Virol”第72期第2022頁乙文)。

可將本發明的核酸分子插入腺病毒基因體的任何位置，及可位於相對於所探討區域的天然轉錄方向之同義或反義定向。較佳將本發明的核酸分子插入而置換腺病毒的E1區，及置於CMV啟動子之控制之下。

適用於本發明的景況中之其他病毒載體，係可自任何痘病毒科成員獲得的痘病毒載體，其中尤以源自金絲雀痘、禽痘或牛痘病毒之痘病毒載體為首選，及以後者為較佳。適宜的牛痘病毒包括但不限於哥本哈根(Copenhagen)株(Goebel等人於1990年期刊“Virol.”第179期第247頁乙文；Johnson等人於1993年期刊“Virol.”第196期第381頁乙文)、惠氏(Wyeth)株及尤其經改質的安卡拉(Ankara)(MVA)株(Antoine等人於1998年期刊“Virol.”第244期第365頁乙文)。用於建構重組型痘病毒的通用條件，係技藝中所眾所周知。較佳將本發明的核酸分子插入痘病毒基因體內的非必要基因座。胸腺嘧啶激酶基因係特別適合供哥本哈根(Copenhagen)牛痘載體之插入，及缺失II或III係特別適合供MVA載體之插入。較佳將本發明的核酸分子插入MVA載體的缺失III，及置於牛痘7.5K或pH5R啟動子之控制之下。

適用於本發明的景況中之其他病毒載體，係可從副黏液病毒科獲得的麻疹病毒屬，其中尤以麻疹病毒為首選。在技藝中可取得各種減毒株(Brandler等人於2008年期刊“CIMID”第31期第271頁乙文；Singh等人於1999年期刊“J. Virol.”第73(6)期第4823頁乙文)，諸如但不限於埃德蒙斯頓(Edmonston)A與B株(Griffin等人於2001年期刊“Field's in Virology”第1401-1441頁乙文)、施瓦茨(Schwartz)株(Schwarz A於1962年期刊“Am J Dis Child”第103期第216頁乙文)、S-191或C-47株(Zhang等人於2009年期刊“J Med Virol”第81(8)期第1477頁乙文)。其中以P與M基因之間的插入作用特別適當。

如本發明，本發明之載體中所包含的核酸分子係適合在一種宿主細胞或生物體中表現之一形式，其係指該核酸分子係置於適當的調控序列之控制下。如本文中所用之“調控元素”一詞，係指容許、有助於或調節一核酸分子在一指定宿主細胞或生物體中的表現作用之任一元素，該表現作用包括該核酸或其衍生物(亦即mRNA)的增殖作用、複製作用、轉錄作用、剪接作用、轉譯作用、安定化作用及/或輸送作用。

嫻熟技藝者將理解調控序列之選擇可依載體本身、宿主細胞、所欲的表現水平等因子而定。其中尤以啟動子特別重要。在本發明的上下文中，其可在多種的宿主細胞類型或針對特定宿主細胞(如具肝臟特異性的調控序列)中持續引導核酸分子的表現作用，或回應特定事件或外源性因

子(如溫度、營養素添加劑、荷爾蒙等)或依據病毒週期的階段(如晚期或早期)而進行調節。亦可使用在生產步驟期間回應特定事件或外源性因子而受到抑制之啟動子，以將載體生產作用最佳化及避開所表現多肽的潛在毒性。

適合在哺乳類動物細胞中持續表現之啟動子係包括但不限於細胞巨大病毒(CMV)迅早期啟動子(Boshart等人於1985年期刊“Cell”第41期第521頁乙文)、RSV啟動子、腺病毒主要晚期啟動子、磷甘油激酶(PGK)啟動子(Adra等人於1987年期刊“Gene”第60期第65頁乙文)、單純疱疹病毒(HSV)-1的胸腺嘧啶激酶(TK)啟動子及T7聚合酶啟動子。牛痘病毒啟動子係特別適用於痘病毒載體中的表現作用。其代表性實例包括但不限於牛痘7.5K、H5R、11K7.5 (Erbs等人於2008年期刊“Cancer Gene Ther.”第15期第18頁乙文)、TK、p28、p11及K1L啟動子，以及合成啟動子諸如Chakrabarti等人(於1997年期刊“Biotechniques”第23期第1094頁乙文)、Hammond等人(於1997年期刊“J. Virological Methods”第66期第135頁乙文)及Kumar與Boyle(於1990年期刊“Virology”第179期第151頁乙文)中所述，以及早期/晚期嵌合啟動子。適用於麻疹所媒介的表現作用之啟動子，係包括但不限於引導麻疹轉錄單位的表現作用之任何啟動子(Brandler與Tangy於2008年期刊“CIMID”第31期第271頁乙文)。具肝臟特異性的啟動子係包括但不限於下列各者之啟動子：HMG33 CoA還原酶(Luskey於1987年期刊“Mol. Cell. Biol”第7期第1881頁乙文)；第1型固醇調控元素(SRE-1；

Smith等人於1990年期刊“J. Biol. Chem.”第265期第2306頁乙文)；白蛋白(Pinkert等人於1987年期刊“Genes Dev.”第1期第268頁乙文)；磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)(Eisenberger等人於1992年期刊“Mol. Cell Biol.”第12期第1396頁乙文)； α -1抗胰蛋白酶(Ciliberto等人於1985年期刊“Cell”第41期第531頁乙文)；人類轉鐵蛋白(Mendelzon等人於1990年期刊“Nucleia Acids Res.”第18期第5717頁乙文)；及FIX基因(第5,814,716號美國專利)。

嫻熟技藝者將理解，控制本發明的核酸分子表現作用之調控元素可進一步包含供轉錄至宿主細胞或生物體中的適當起始、調節及/或終止作用(如多腺嘌呤轉錄作用終止序列)、mRNA輸送作用(如細胞核定位訊號序列)、操作處理(如剪接訊號)與安定性(如內含子與非編碼的5'與3'序列)、轉譯作用(如起始子甲硫胺酸、三連體引導序列、IRES核糖體結合位址、夏因-達爾加諾(Shine-Dalgarno)序列等)及純化步驟(如一標籤)所用之附加元素。

本發明的特佳實施例係有關於選自由下列所組成之群組之載體(或病毒顆粒)：

- 缺陷型Ad載體，其包含插入而代替E1區及置於一啟動子諸如CMV啟動子控制下之一核酸分子，及其所編碼的一突變體聚合酶多肽係包含如序列辨識編號：5中所示的一胺基酸序列，或其所編碼的一融合蛋白係包含如序列辨識編號：6或序列辨識編號：8中所示的一胺基酸序列；

- 缺陷型Ad載體，其包含插入而代替E1區及置於一啟

動子諸如CMV啟動子控制下之一核酸分子，及包含序列辨識編號：13、序列辨識編號：14或序列辨識編號：15中所示的核苷酸序列；

- 複製作用缺陷型Ad載體及特別是缺陷型AdCh3，其包含插入而代替E1區及置於一啟動子諸如CMV啟動子控制下之一核酸分子，及包含序列辨識編號：16或序列辨識編號：17中所示的核苷酸序列；

- MVA載體，其包含置於一牛痘啟動子諸如7.5K或pH5R啟動子控制下之一核酸分子，及其所編碼的一突變體聚合酶多肽係包含序列辨識編號：5或序列辨識編號：10中所示的胺基酸序列，或其所編碼的一融合蛋白係包含序列辨識編號：6、序列辨識編號：8或序列辨識編號：12中所示的胺基酸序列；及

- MVA載體，其包含置於一牛痘啟動子諸如7.5K或pH5R啟動子控制下之一核酸分子，及其包含序列辨識編號：13、序列辨識編號：14或序列辨識編號：15中所示的核苷酸序列。該核酸分子較佳插入在MVA基因體的缺失III中。

若需要，本發明的載體可進一步包含一或多種轉殖基因，如待與本發明的核酸分子在一種宿主細胞或生物體中表現之所感興趣的一基因，其目的在於改善對於一種HBV感染或由HBV感染所造成或與其相關聯的任何疾病或病況之治療性或保護性活性。適宜的轉殖基因包括但不限於免疫調節劑諸如細胞介素及源自可能合併感染的生物體(如

HIV、結核分枝桿菌等)之其他任何抗原。若使用一轉殖基因，其可由本發明的載體表現或由組合使用的一獨立載體表現，該獨立載體可與本發明的載體相同或不同。例如，可設想組合使用表現本發明的突變體聚合酶多肽或融合蛋白之一種腺病毒及表現免疫調節劑之一種腺病毒。

如一較佳實施例，本發明的載體係感染性病毒顆粒之形式。通常藉由一方法產生該等病毒顆粒，及其步驟包括(a)將本發明的病毒載體導入一適宜的細胞株中，(b)在適宜條件下培養該細胞株，從而容許產生該感染性病毒顆粒，(c)從該細胞株的培養物中回收所產生的病毒顆粒，及(d)選擇性地純化所回收的該病毒顆粒。

當病毒載體係缺陷型時，該等顆粒通常在一互補細胞株中產生，或經由使用提供反式非功能性病毒基因之一輔助病毒而產生。例如，用於互補該刪除E1型腺病毒載體之適宜細胞株，係包括293細胞(Graham等人於1997年期刊“J. Gen. Virol.”第36期第59-72頁乙文)以及HER-96與PER-C6細胞(如Fallaux等人於1998年期刊“Human Gene Ther.”第9期第1909-1917頁乙文；WO97/00326)或該等細胞株的任何衍生物。但是在本發明的景況中亦可使用技藝中所述之其他細胞株，特別是用於產生供人類使用的產物之任何細胞株，諸如非洲綠猴腎細胞、希拉(HeLa)細胞及特別適用於增殖痘病毒載體之禽類細胞。適宜的禽類細胞包括但不限於從受精雞蛋獲得的雞胚胎所製備之初代培養型雞胚胎纖維母細胞(CEF)及鴨細胞株(如WO03/076601、WO2009/

004016、WO2010/130756及US2011-008872中所述)。

可從培養上清液及/或在溶胞作用後從細胞回收感染性病毒顆粒。其等可依據標準技術(層析法；例如WO96/27677、WO98/00524、WO98/22588、WO98/26048、WO00/40702、EP1016700及WO00/50573中所述之氯化銫梯度中的超速離心法)，而進一步純化。

本發明亦涵蓋經改質而容許優先標定一特定宿主細胞之載體或病毒顆粒。標靶載體的特徵在於其等表面所存在的一配位體能識別暴露於細胞表面的一組分及與其結合，該組分諸如具細胞特異性之標記(如感染HBV的一細胞)、具組織特異性之標記(如具肝臟特異性之標記)以及病毒(如HBV)抗原。適宜的配位體實例係包括導向一HBV抗原域之抗體或其片段。可藉由將該配位體插入該病毒表面所存在的一多肽(如腺病毒纖毛、五聯體、pIX或牛痘p14基因產物)中，而進行標定作用。

宿主細胞

在另一方面，本發明亦有關於包含本發明的核酸分子或載體(或病毒顆粒)之宿主細胞。

如本文中所用之“宿主細胞”一詞應從廣義上理解，其在有關組織、器官或所分離的細胞之組成方面並無任何限制。該等細胞可為一獨特類型的細胞或為不同類型細胞之群組，諸如所培養的細胞株、初代細胞及增生細胞。在本發明的上下文中，“宿主細胞”一詞包括原核生物細胞；低等真核生物細胞諸如酵母菌；及其他真核生物細胞諸如昆

蟲細胞、植物及哺乳類動物(如人類或非人類)細胞；以及可產生本發明的載體之細胞(如293、HER96、PERC.6細胞、非洲綠猴腎細胞、希拉(HeLa)、CEF、鴨細胞株等)。該詞包括可成為或業已成為本文所述載體的接受體之細胞以及該等細胞的子代。可在習用的發酵生物反應器、燒瓶及培養皿中培養宿主細胞。可在適合一特定宿主細胞的溫度、pH值及氧含量進行培養。在此不詳述已知用於生產本發明中所用的多肽與載體之各種原核生物與真核生物宿主細胞及方法。

如本發明的一特定實施例，可進一步將宿主細胞包埋。細胞包埋技術係技藝中所知。

本發明的另一方面係一種用於重組生產本發明的突變體聚合酶多肽或融合蛋白之方法，其使用本發明的載體(或感染性病毒顆粒)及/或宿主細胞。該方法通常包括(a)將一載體導入一適宜的宿主細胞中，而產生經轉染或感染的一宿主細胞；(b)在適合宿主細胞生長的條件下，在試管中培養經轉染或感染的該宿主細胞；(c)回收細胞培養物；及(d)選擇性地純化來自所回收的細胞及/或培養上清液之突變體聚合酶多肽或融合蛋白。

預期嫺熟技藝者知悉技藝中可在適當的宿主細胞(諸如上述者)中用於表現突變體聚合酶多肽或融合蛋白之多種表現系統及用於將一載體導入一宿主細胞之方法。該等方法包括但不限於顯微注射作用、磷酸鈣所媒介的轉染作用、DEAE-聚葡萄糖所媒介的轉染作用、電穿孔作用、脂

質體感染作用/脂質體融合作用、基因槍、轉導作用、病毒感染作用以及經由各種方式直接投予至宿主生物體中。本發明的載體可與轉染試劑組合使用，以促進導入至宿主細胞中之作用，轉染試劑諸如多價陽離子聚合物(如幾丁聚醣、聚甲基丙烯酸鹽、PEI等)及陽離子型脂質(如 DC-Chol/DOPE、現今可自普洛麥格(Promega)公司取得之轉染坦(transfectam)脂質感染素(lipofectin))。

可在習用的發酵生物反應器、燒瓶及培養皿中培養宿主細胞。可在適合一特定宿主細胞的溫度、pH值及氧含量進行培養。然後可藉由眾所周知的純化方法純化突變體聚合酶多肽或融合蛋白，該等方法包括硫酸銨沉澱作用、酸萃取作用、凝膠電泳；過濾作用及層析法(如逆相、尺寸排阻、離子交換、親和性、疏水性交互作用、氫氧磷灰石、高效能液相層析法等)。所採用的條件與技術係依諸如淨電荷、分子量、疏水性、親水性之因子而定，及其等係嫻熟技藝者所顯而易見。此外，純化程度將依預期用途而定。

組成物

在另一方面，本發明提供一組成物，其至少包括本文所述之突變體聚合酶多肽或融合蛋白、核酸分子、載體(如感染性病毒顆粒)或宿主細胞(在此亦稱作“活性劑”)或其任何組合(如本文中所述的不同多肽或載體/病毒顆粒之組合或不同基因型之組合)。該組成物較佳係一種藥學組成物，其除了一治療有效量的活性劑之外，還進一步包含一種藥學上可接受的載劑。

如本文中所用之“藥學上可接受的載劑”係意欲包括可與宿主生物體及尤其人類的投藥作用相容之任何與所有載劑、溶劑、稀釋劑、賦形劑、佐劑、分散介質、塗料、抗細菌劑與抗真菌劑及延遲吸收劑之類。

如本文中所用之“治療有效量”係足以紓緩一般與HBV感染相關的一或多種症狀或由HBV感染所造成或與其相關聯的任何疾病或病況之一劑量。當考量預防性用途時，該詞係指足以預防或延遲HBV感染發生之一劑量。“治療性”組成物係經設計與投藥至已感染HBV之一宿主生物體，其目標係減少或改善由該HBV感染所造成或與其相關聯之至少一疾病或病況，其實際上與本文中所述之一或多種習用的治療方式組合(如用核苷、核苷酸類似物及/或IFN式療法治療)。例如，用於引發免疫反應之一治療有效量，可為引發免疫系統活化作用(如產生一種抗HBV反應)所需的量。

“宿主生物體”一詞一般係指一脊椎動物，特別是哺乳類動物物種之一員，及特別是需要本發明的任何產物與方法或本發明的任何產物與方法可能對其有益之家畜、農場動物、競賽用動物及包括人類在內的靈長類動物，諸如經診斷已感染HBV或具有感染風險之生物體，該生物體因而容易罹患HBV感染所造成或與HBV感染相關聯之一疾病或病況或具有罹患風險者。在較佳實施例中，該宿主生物體係慢性感染HBV病毒或任擇地合併感染HBV病毒與另一種病毒(如人類免疫不全症病毒(HIV))之一人類病患。該感染性HBV可所源自的基因型、品系或分離株可與與本發明所

用的突變體聚合酶多肽或其他任何HBV多肽/肽(如基因型D)所源自者相同，或其可源自不同的基因型(如基因型B或C)。本案發明者最近研究一種基因型D式疫苗組成物之交叉反應潛力(參見第13/423,193號美國申請案)。一項經由電腦模擬的龐大研究指出，基因型B、C及D之HBV聚合酶、核心及Env蛋白的胺基酸序列在總蛋白水平方面具高度保留性，而其等在T細胞抗原決定位的水平方面亦然。在適宜的動物模式中之活體內免疫作用證實引發交叉反應性T細胞反應之能力，而該交叉反應性T細胞反應係辨識基因型B與C抗原決定位。即使該研究僅限於HLA-A2抗原決定位，其證明了一種以基因型D抗原為基礎的疫苗組成物所引發的T細胞反應可具有與其他HBV基因型交叉反應性之概念。

本發明的組成物係經適當地緩衝，以使得適合在生理或弱鹼性pH值(如約pH 7至約pH 9)供人類使用。適宜的緩衝劑包括但不限於磷酸鹽緩衝劑(如PBS)、碳酸氫鹽緩衝劑及/或Tris緩衝液。

本發明的組成物可進一步包含適用於人類或動物之一稀釋劑。其較佳為等張、低張或弱高張及具有相對低的離子強度。代表性實例包括無菌水、生理食鹽水(如氯化鈉)、林格氏(Ringer)液、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、漢克氏(Hank)液及其他含水的生理平衡鹽溶液(例如參見平科特·威廉斯及威爾金斯(Lippincott Williams & Wilkins)公司出版及由A. Gennaro所編輯之“雷明頓：藥劑學之科學與應用(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)”乙書最

新版本)。

在本發明的組成物中所包括之藥學上可接受的載劑，亦必須能在製造及在冷凍(如 -70°C 、 -20°C)、冷藏(如 4°C)或環境溫度長期儲存(亦即至少一個月及同時優先考慮至少一年)之條件下保留其安定性。就這方面而言，特別適用於本發明的組成物之調配物包括(a)1M蔗糖、150 mM氯化鈉、1 mM氯化鎂、54毫克/公升的妥文(Tween) 80、pH 8.5的10 mM Tris(特別當活性劑係一腺病毒載體時)，(b)10毫克/毫升的甘露糖醇、1毫克/毫升的HSA、pH 7.2的20 mM Tris及150 mM氯化鈉及(c)生理食鹽水。

可使用藥學上可接受的附加賦形劑來提供所欲的藥學或藥效動力學性質，例如包括改變或維持該調配物的pH值、滲透性、黏度、透明度、顏色、無菌性、安定性、溶解速率；改變或維持釋出作用或吸收進入人類或動物生物體內之作用；促進輸送通過血液障壁或滲透進入一特定器官(如肝臟)。

此外，本發明的組成物可包含適合以全身或黏膜方式施用於人類之一或多種佐劑。該佐劑較佳可刺激對於本發明的組成物之免疫性，特別是一種T細胞所媒介的免疫性如經由諸如TLR-7、TLR-8及TLR-9之類鐸受體(TLR)。適用佐劑的代表性實例包括但不限於明礬、礦物油乳劑諸如弗氏(Freund)完全與不完全佐劑(IFA)、脂多醣或其衍生物(美國紐約普列南(Plenum Press)出版公司於1986年出版之Ribi等人所著“細菌內毒素之免疫學與免疫藥理學(Immunology

and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins)”乙書第407-419頁)、皂素諸如QS21(Sumino等人於1998年期刊“J.Virol.”第72期第4931頁乙文;WO 98/ 56415)、咪唑-喹啉化合物諸如咪喹莫特(Imiquimod)(Suader於2000年期刊“J. Am Acad Dermatol.”第43期第S6頁乙文)、S-27609(Smorlesi於2005年期刊“Gene Ther.”第12期第1324頁乙文)及諸如WO2007/147529中所述的相關化合物、胞嘧啶磷酸鹽鳥核苷寡去氧核苷酸類諸如CpG (Chu等人於1997年期刊“J. Exp. Med.”第186期第1623頁乙文;Tritel於2003年期刊“J. Immunol.”第171期第2358頁乙文)及陽離子肽諸如IC-31(Kritsch等人於2005年期刊“J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci ”第822期第263頁乙文)。

本發明的組成物係適用於多種投藥模式。

如本文中所用之“投藥”一詞(及投藥一詞的任何形式諸如“投予”),係指將一治療劑諸如本文所述之突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體輸送至一宿主細胞或生物體中。技藝中有一些方法與方式可供使用,諸如直接投藥至一宿主生物體。

直接投藥作用可藉由全身、局部或黏膜途徑進行。全身投藥作用包括例如皮下、皮內、肌內、靜脈內(如注射至送往肝臟的一靜脈諸如肝門靜脈中)、腹膜內、腫瘤內、血管內、動脈內注射作用(如藉由肝動脈輸注作用)以及皮下接種。注射作用可用習用的針筒及針頭或技藝中可取得的任何其他適當裝置(如電穿孔作用)進行。任擇地,本發明的組

成物可經由一黏膜途徑投予，諸如口服/消化道、鼻內、氣管內、肺內、陰道內或直腸內途徑。可使用適當的配藥器，經由液滴型、噴劑型或乾粉型組成物的霧化或氣霧化作用，進行呼吸道的投藥作用。局部投藥作用亦可使用經皮方式(如貼劑之類)進行。

在本發明的上下文中，該組成物較佳係配製供肌內、皮下、皮內投藥或皮下接種之用。

本發明的組成物可為各種形式，如固態、液態或凍結形式。可藉由一種涉及真空乾燥與冷凍乾燥之方法，獲得固態(如乾粉型或冷凍乾燥型)組成物。就黏膜投藥作用物而言，可將該等組成物配製成為供口服投藥的腸溶膠囊劑與顆粒劑、供直腸或陰道投藥的栓劑，及最終與適用於增加黏膜孔徑的吸收增進劑組合使用。該等吸收增進劑通常為結構與黏膜的磷脂域類似之物質，諸如去氧膽酸鈉、甘胺膽酸鈉、二甲基- β -環糊精、月桂基-1-溶血磷脂醯膽鹼)。

可按各種參數修改適當劑量，尤其投藥模式；所用組成物；宿主生物體的年齡、健康狀況及重量；症狀的性質與範圍；並行的治療類型；治療頻率；及/或對於預防或治療之需求。由執業醫生根據相關情況，而例行地進行供測定適當治療劑量所需之進一步精細計算。

就一般準則而言，一種包含載體的組成物之適宜劑量係自約 10^5 至約 10^{13} vp(病毒顆粒)、iu(感染單位)或pfu(溶菌斑形成單位)不等，依所用的載體與定量技術而定。可用於評估一試樣中的vp、iu及pfu數量之技術，係技藝中所習用

者。例如，通常藉由測量A260吸光度或HPLC而測定腺病毒顆粒(vp)之數值，藉由定量DBP免疫螢光法測定iu效價，及在允許性細胞的感染作用後藉由計數溶菌斑數目而測定pfu。依據FDA準則，vp/iu比例較佳低於100。較佳劑量係含有約 10^5 至約 10^{12} vp，其中以劑量約 5×10^8 、約 10^9 、約 5×10^9 、約 10^{10} 、約 5×10^{10} vp或約 10^{11} vp之本發明的腺病毒載體為首選。就牛痘(MVA)式組成物而言，劑量較佳約為 5×10^5 至約 10^9 pfu，其中以約 5×10^6 、約 10^7 、約 5×10^7 、約 10^8 或約 5×10^8 pfu之劑量為首選。以載體質體為基礎之一組成物的投予劑量可介於10微克與20毫克之間，有利地介於100微克與2毫克之間。一蛋白組成物所投予的一或多種劑量係介於10奈克與20毫克之間，尤其以每公斤體重約0.1微克至約2毫克的免疫原性多肽之劑量為首選。投藥作用可能以單一劑量進行，或在一定的時間間隔後重複投予一或數次的劑量進行。

在另一特定實施例中，本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，可與附加的多肽或肽或編碼該等附加的多肽或肽之載體組合使用。該附加的多肽或肽較佳為一種HBV抗原，尤其以本文所述的Hbc多肽及/或一或多種HBs免疫反應域為首選。該HBV多肽或肽可由一載體表現，尤其選自由質體DNA、腺病毒型(如Ad5、AdCh3、AdCh63等)、痘病毒型(如牛痘諸如MVA)及麻疹載體所組成之群組之一載體。因此本發明亦有關於一組成物，其包含編碼本發明的一突變體聚合酶多

肽或一融合蛋白之一載體及編碼至少一種附加的多肽/肽諸如本文中所述的HBV核心及/或HBs免疫原域之一載體之混合物。

本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物可用於治療多種疾病與病理性病況之方法中，特別是HBV感染所造成或與其相關聯之該等疾病與病理性病況。因此，本發明亦涵蓋本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物依據本文所述之方式用於治療或預防HBV感染、HBV相關疾病與病理性病況之用途，及特別是慢性HBV感染。本發明亦關於在需要的一生物體中之一種治療方法，其包括依據本文所述之方式，以足以治療或預防HBV感染(如尤其是慢性HBV感染)或紓緩與HBV相關聯的疾病與病理性病況之一或多種相關症狀之一量，對於該生物體投予該等活性劑中之至少一者之至少一次的投藥作用。在一個特定的實施例中，可依據本文所述之方式使用本發明的活性劑與方法，來破除HBV慢性個體所經常經歷之HBV特異性的免疫耐受性。

如本文中所用之“治療”一詞(及治療一詞的任何形式諸如“治療作用”)，係指預防(如對於具有HBV感染風險的一個體之預防作用)及/或治療(如用於經診斷確定感染HBV的一個體中)。其特別適用於治療HBV慢性感染及/或感染HBV的病患中之包括硬化與肝癌在內的肝臟損傷。治療作用需要依外用或內服方式對於一宿主細胞或生物體投予一治療

劑，諸如本文所述之突變體聚合酶多肽，及最終與其他HBV多肽或與標準照護(SOC)(如使用核苷或核苷酸類似物之治療作用)組合。

通常，當依據本文所述之方式投藥至一宿主生物體時，本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物對於所治療的宿主生物體提供之治療效益係優於基線狀態或優於若未進行治療時的預期狀態。可藉由醫師或其他技術嫺熟的醫護人員典型所用之任何相關的臨床測量，證明該治療效益，例如包括在經治療的生物體之血液、血漿或血清中所定量的HBV病毒負荷量之降低；及/或肝臟酵素活性水平之降低(如丙胺酸轉胺酶(ALT)及/或天門冬胺酸鹽轉胺酶(AST))；及/或疾病維持穩定之狀態(未惡化)(如通常與HBV感染相關聯的病況諸如肝臟發炎/脂肪變性/纖維變性之維持穩定或減少)；及/或血清標記諸如HBeAg或HBsAg的水平降低(如HBe或HBs血清轉化作用)；及/或改善經治療的生物體對於習用療法之反應；及/或延長存活時間，其係相較於若未接受治療之預期存活時間而言。

在本發明的景況中，治療效益可能是暫時性(在停止投藥後維持一或數個月)或為持續性(維持長達數個月或數年)。因一個體與另一個體的臨床狀態之自然歷程可能差異甚大，故不需要觀察所治療的每個生物體之治療效益，僅需觀察在顯著數量的生物體中之治療效益(如可藉由技藝中所知的任何統計檢定，而測定二個組別之間之統計上顯

著的差異，諸如塔基(Tukey)參數檢定、克魯斯卡爾-瓦利斯(Kruskall-Wallis)檢定、依據曼-懷特尼(Mann-Whitney)之U檢定、學生t-檢定、威爾克森(Wilcoxon)檢定等)。

該等測量可在本文中所述的投藥作用前(基線)及在治療期間的不同時間點進行，及在治療作用停止後進行至少12個星期。就一般準則而言，可使用一種定量PCR分析法或技藝中可接受的其他任何方法(如羅氏(Roche)公司的Ampli Prep/科巴斯(Cobas)泰克曼(taqman)分析法第2.0版、亞培(Abbott)公司的即時B型肝炎病毒性能分析法)，測定病毒負荷量。在較佳實施例中，相較於在基線所測得的病毒負荷量或相較於對照組(未經治療的個體)，本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物之投藥作用造成病毒負荷量之至少 $1 \log_{10}$ 、較佳至少 $1.5 \log_{10}$ 及更佳至少 $2 \log_{10}$ 之不論是暫時性或持續性之降低。相較於基線或相較於對照組，本文中所述的活性劑之投藥作用可造成ALT及/或AST數值至少暫時回復至正常。可在醫學實驗室及醫院中進行肝臟酵素活性水平之例行性評估。任擇地，相較於在基線所測得的血清標記水平或相較於對照組(未經治療的個體)，本文中所述的活性劑之投藥作用造成血清標記HBe及/或HBs之至少 $1 \log_{10}$ 、較佳至少 $1.5 \log_{10}$ 及更佳至少 $2 \log_{10}$ 之至少暫時性的降低。可在醫學實驗室及醫院中進行HBV血清標記水平之例行性評估，及有多種市售的套組(如亞培實驗室(Abbott Laboratories)公司、奧根泰尼克(Organon Teknika)公司研發出的免疫分析

法)可供使用。

本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物之使用或投藥作用，較佳係在所治療的生物體中用於引發或刺激一免疫反應。因此，本發明亦涵蓋在一宿主生物體中投予本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物時，用於引發或刺激對抗HBV的一免疫反應之一種方法。

所引發或所刺激的免疫反應可為特異性(亦即針對HBV抗原決定位/抗原)及/或非特異性(先天性)、體液型及/或細胞型。在本發明的上下文中，該免疫反應較佳係針對一HBV多肽/抗原決定位之CD4+或CD8+所媒介或二者所媒介的一種T細胞反應。

可使用技藝中之多種直接或間接的標準分析法，在試管內或活體內評估本文中所述的活性劑引發一免疫反應之能力。測試與驗證亦示於所附的實例部分。

可用於評估免疫反應的起始與活化作用之技術的一般說明，例如參見Coligan等人(美國國家衛生研究院(National Institute of Health)出版及由約翰威利父子(John Wiley & Sons)出版公司編輯之1992年與1994年或後續版本之“免疫學實驗操作手冊(Current Protocols in Immunology)”乙書)。可藉由抗體結合作用及/或結合作用中之競爭而測定刺激一體液反應之能力(例如參見冷泉港(Cold Spring Harbor Press)出版公司於1989年出版及由Harlow所著之“抗體(Antibodies)”乙書)。

可藉由例如測量NK/NKT-細胞(如代表性及活化水平)以及IFN相關細胞介素及/或生產趨化激素的級聯反應、TLR及其他先天免疫性標記的活化作用 (Scott-Algara 等人於2010年期刊“PLOS One”第5(1)期第e8761頁乙文；Zhou等人於2006年期刊“Blood”第107期第2461-2469頁乙文；Chan於2008年期刊“Eur. J. Immunol.”第38期第2964-2968頁乙文)，而評估非特異性免疫性。

例如可藉由使用例行性生物分析法(如藉由酶聯免疫斑點法(Elispot)、藉由多參數流動式細胞測量術或ICS、藉由使用多套式技術或ELISA的細胞介素廓型分析所進行之T細胞特徵分析及/或量化作用)，而量化由活化型T細胞及包括該等從CD4+與CD8+ T細胞所衍生者所產生的細胞介素；藉由測定T細胞的增生能力(如藉由 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶嵌入法之T細胞增生作用分析法)；藉由分析對於敏化個體中之抗原特異性T淋巴球的細胞毒性能力；或藉由適當動物模式之免疫作用，而評估細胞免疫性。

亦可在動物模式中進一步驗證本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物之免疫生成能力，可對於該動物模式投予一適當的感染劑或腫瘤引發劑(如表現HBV基因產物之牛痘病毒或單核球增多性李斯特菌(*Listeria Monocytogenes*)細菌)，或注射編碼全長HBV基因體之DNA(諸如Huan等人於2010年期刊“Proc. Natl. Acad. Sci.”第107期第9340頁乙文中所述)，來測定該感染性或腫瘤引發劑的中和作用及最終對相關聯症狀

之部分抗性，而反映對於抗HBV免疫反應之誘發作用或增強作用。例示性動物模式包括但不限於實例中所述之HLA-A2.1基因轉殖小鼠，及諸如Chisari等人(於1996年期刊“Curr. Top. Microbiol. Immunol.”第206期第149頁乙文)及Halverscheid等人(於2008年期刊“J. Med. Virol.”第80期第583頁乙文)所述之HBV基因轉殖小鼠。

該用途或方法包括投予一治療有效量的該種或該等活性劑之一或多次投藥作用(1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次等)，該等投藥作用係彼此間隔一段適當的時間，及藉由相同的投藥途徑或藉由不同的投藥途徑而在相同的位址或在不同的位址進行。在本發明的景況中，特佳為肌內與皮下途徑。彼此相隔約一星期之三次皮下投藥作用係特別適合MVA式組成物與載體；而一或二次肌內或皮下投藥作用係特別適合Ad式組成物與載體，及其等可彼此相隔約1個月或更久。在首次系列投藥作用之二或數個月後，可使用相同活性劑進行一或多次的後續投藥作用，從而召回抗HBV免疫反應。

若需要，本發明的方法或用途可與一或多種習用的治療方法(如放射線、化學療法及/或手術)組合進行。本發明的方法或用途較佳與可供治療或預防HBV感染、與HBV相關聯的疾病與病理性病況所用之一或多種藥物併用。其等的投藥作用可在本發明的活性劑之投藥作用之前、同時或之後。適宜藥物的代表性實例包括但不限於聚合酶抑制劑、RNase H抑制劑、核苷類似物、核苷酸類似物、TLR促

效劑、IFN、N-醯化作用抑制劑、siRNA、反義寡核苷酸、抗HBV抗體、免疫調節劑、治療用疫苗及通常用於治療與HBV相關聯的肝癌之抗腫瘤劑(如阿德力黴素、與碘油或sorasnib併用之阿德力黴素)。此外，活性劑亦可與其他治療用疫苗組合使用，諸如特別適用於引發抗HBV體液反應之合成肽、重組型抗原、VLP、編碼HBV蛋白(核心、前S1、PreS2、S及/或聚合酶)之載體。如本發明之特別適宜的方法或用途係與標準照護併用，及特別是使用細胞介素(如IFN α 、聚乙二醇化IFN α 2a或2b諸如珮格西施(Pegasys)(羅氏(Roche)公司)、派樂能(Pegintron)(先靈葆雅(Schering Plough)公司)或因治隆(IntronA)(先靈葆雅(Schering Plough)公司))之治療作用，及/或使用核苷酸或核苷類似物(NUC)諸如拉米夫定(lamivudine)、恩替卡韋(entecavir)、替比夫定(telbivudine)、阿德福韋(adefovir)、二吡呋酯(dipivoxil)或替諾福韋(tenofovir)之治療作用。使用NUC之療法僅部分有效(在治療1年後僅在3至5%的個體中觀察到感染消退)及需要長期療法(可能是終身)。預期本發明的活性劑與方法得以在免疫方面補強NUC對於病毒複製作用之效用，因而改善該等治療作用(如減少達到一治療效益所需的NUC劑量或NUC的治療時間)或增加感染消退的百分比(使其高於5%)。

在一特定實施例中，本發明的方法或用途可依據初打-加打方式進行，其包括依序投予一或多種初打組成物與一或多種加打組成物。通常，該初打與加打組成物使用不同的載體，該等載體包含或編碼至少一個共同的抗原域。此

外，該初打與加打組成物可藉由相同的投藥途徑或藉由不同的投藥途徑而投藥在相同位址或不同位址。例如，以多肽為基礎的組成物可藉由黏膜途徑投予，而以載體為基礎的組成物則較佳藉由注射作用投予，如MVA載體採用皮下注射，DNA質體採用肌內注射，及腺病毒載體採用皮下或肌內注射。

在一實施例中，用MVA載體進行初打作用及用Ad載體進行加打作用，其中以編碼本文中所述的一突變體聚合酶蛋白或一融合蛋白之MVA及/或Ad載體為首選，如編碼序列辨識編號：8中所示的融合蛋白者。對於生物體投予MVA載體一或多次，接著投予腺病毒載體一或多次，其中以間隔自三天至三個月不等之MVA載體的至少三次皮下投藥作用及接著進行腺病毒載體的一次肌內或皮下加打作用(如在MVA初打後之約1個月至1年)為首選。

在另一實施例中，用質體DNA載體進行初打作用及用MVA載體進行加打作用，其中以編碼本文中所述的一突變體聚合酶蛋白或一融合蛋白之質體及/或MVA載體為首選，如編碼序列辨識編號：8中所示的融合蛋白者)。對於生物體投予DNA載體一或多次，接著投予MVA載體一或多次，其中以間隔自二個星期至三個月不等之DNA載體的至少三次肌內投藥作用及MVA載體的至少一次皮下加打作用(如在DNA初打後之約1個月至1年)為首選。DNA載體較佳經由電穿孔作用投予。

本發明亦有關於用於治療HBV感染或與HBV相關聯的

疾病或病理性病況之一種部件套組，其中該套組包含選自由本發明的突變體聚合酶多肽、融合蛋白、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物所組成之群組之多種活性劑，及用於將多種活性劑投藥至需要的一生物體之說明書。更佳，該生物體係慢性感染HBV的一病患。

上文所引述的所有專利案的揭露內容、發表文獻及資料庫項目係在此完整地逐一併入本案以為參考資料，如同各專利案、發表文獻及資料庫項目係逐一與個別地顯示併入本案以為參考資料。

圖式之說明

第1圖係說明本發明所述之突變體聚合酶多肽、融合蛋白及抗原組合物。

第2圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用質體pTG18188(核心-Pol-Env1-Pol-Env2-Pol)、pTG18194(核心-Pol)或pTG13135(空白)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點法(Elispot) IFN γ 分析。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各條狀係代表由質體中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或2.3等)顯示，及亦呈現各組用相同質體免疫接種的所有小鼠之平均值(條狀在圖上係示為“平均值”)。就個別小鼠與平均值而言，將針對所試驗的不同肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率累積。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上

說明所示的一特定HBV肽之反應。

第3A-F圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用質體pTG18188(核心-P-E1-P-E2-P或核心-Pol-Env1-Pol-Env2-Pol)、pTG18194(核心-Pol)或pTG13135(空白)進行免疫作用後所進行之ICS分析法。結果係以針對各HBV HLA-A2肽(第3A圖)或涵蓋HBV核心的肽池(第3B與3C圖)、聚合酶(第3D與3E圖)及env(第3F圖)抗原之產生IFNg(單獨或組合TNFa)的CD8(第3A、3B、3D及3F圖)或CD4(第3C與3E圖)T細胞之百分比呈現。各條狀係代表由質體中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或2.3等)顯示，及亦呈現各組用相同質體免疫接種的所有小鼠之平均值(條狀在圖上係示為“平均值”)。就個別小鼠與平均值而言，將對於所試驗的不同肽具有特異性之CD8或CD4 T細胞的比率累積。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上說明所示的一特定HBV肽之反應。

第4圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用腺病毒AdTG18201(核心-Pol-Env Ad)、AdTG18202(核心-Pol Ad)、AdTG18203(Pol Ad)及AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後之酶聯免疫斑點法(Elispot) IFNg分析。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估之涵蓋所感興趣的抗原之各肽池之產生特異性IFNg的細胞比率。各條狀係代表由質體中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或2.3等)顯示，及亦呈現各組用相同質體免疫

接種的所有小鼠之平均值(條狀在圖上係示為“平均值”)。就個別小鼠與平均值而言，將針對所試驗的不同肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率累積。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上說明所示的一特定HBV肽之反應。

第5圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或針對一種不相關肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各條狀係代表由AdTG18201接種的個別小鼠(由其參考編號3.1至3.8所示)，及亦呈現用AdTG18201免疫接種的所有該等小鼠之中位數(條狀在圖上係示為«中位數»)。就個別小鼠與中位數而言，將針對不同的HBV HLA-A2抗原決定位之產生特異性IFN γ 的細胞比率累積，在一種不相關肽存在下所觀察到之產生特異性IFN γ 的細胞比率係由另一條狀代表(就各小鼠在圖上示為«不相關»)。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上說明所示的一特定HBV肽之反應。

第6圖係說明在HLA-A2小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)或AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後所進行之ICS分析法。結果係針對稱作PP8與PC1及分別涵蓋一部分的HBV聚合酶(第725至835個胺基酸)與一部分的HBV核心蛋白(第1至100個胺基酸)之二種所選擇的肽池，以單獨產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8 T細胞的百分比呈現。

各條狀係代表由腺病毒中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或3.2等)顯示，及亦呈現各組用相同腺病毒免疫接種的所有小鼠之中位數(條狀在圖上係示為“中位數”)。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表由圖上說明所示之所檢測的CD8 T細胞產生之細胞介素。

第7圖係說明在HLA-A2小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)或AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後所進行之活體內CTL分析法。結果係以活體內特異性溶胞作用的百分比呈現，亦即對於所試驗的HBV HLA-A2抗原決定位具有特異性之溶胞作用。各正方形或三角形符號係代表個別小鼠，及亦呈現各組用相同腺病毒免疫接種的所有小鼠之平均值(由圖上的粗條狀符號所示)。

第8圖係說明在HBV基因轉殖小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)或AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後所進行之ICS分析法。結果係以同時產生IFNg與TNFa的CD8 T細胞之百分比呈現，IFNg與TNFa係對於來自HBV聚合酶(稱作VSA與N13F的二種肽之混合物)或來自HBV套膜(稱作F13L之一肽)的抗原決定位具有特異性及同時存在於經接種疫苗的小鼠之脾臟與肝臟中。各條狀係代表由腺病毒中的一者或另一者進行接種之個別小鼠及係由其參考編號(1.1或3.2等)顯示，及亦呈現各組用相同腺病毒免疫接種的所有小鼠之中位數(條狀在圖上係示為“中位數”)。圖上的虛線係對應於實驗的切點，亦即在其以上所觀察到的CD8 T細胞百分比係視為陽性免疫反應之閾值。

第9圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用自 10^5 iu至 10^9 iu之不同劑量的AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或一種不相關肽或在僅有培養基存在下之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各實心或虛線條狀係代表由AdTG18201接種的個別小鼠，及亦呈現經一特定劑量的AdTG18201免疫接種之所有小鼠的平均值(格子型條狀)。不同劑量係由圖上說明所示的不同顏色或符號所示。虛線條代表如材料與方法之說明中所界定之切點數值，在其以上所觀察到的T細胞反應係視為陽性。

第10圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用AdTG18202(核心-PolAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法，依據不同的注射排程，小鼠係經由一次注射作用(正方形)而進行免疫接種，或領受各間隔一個星期的三次注射作用(三角形)或領受各間隔一個星期的六次注射作用(圓形)。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或腺病毒載體或一種不相關肽或在僅有培養基存在下之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各符號(正方形、三角形或圓形)係代表經AdTG18202接種的個別小鼠，及採用所試驗的排程中之一者及經AdTG18202免疫接種的所有小鼠之平均值係由粗

的實線代表。虛線係代表如材料與方法之說明中所界定之切點數值，在其以上所觀察到的T細胞反應係視為陽性。

第11圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用AdTG18202 (核心-PolAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點 (Elispot) IFN γ 分析法，依據不同的注射排程，小鼠的免疫接種作用係在監測T細胞反應之二個星期前進行一次(第1組係如正方形所示)，或在監測T細胞反應之20個星期前進行一次(第2組係如三角形所示)，或各間隔二個月進行二次(第3組係如圓形所示)，或各間隔四個月進行二次(第4組係如交叉符號所示)或各間隔二個月進行三次(第5組係如菱形所示)。就第2組以外的所有組別而言，在最後一次注射作用之二個星期後監測T細胞反應。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或一種不相關肽或在僅有培養基存在下之產生特異性IFN γ 的細胞之比率。各符號(正方形、三角形、圓形、交叉符號、菱形)係代表由AdTG18202接種的個別小鼠，及採用所試驗的排程中之一者及經AdTG18202免疫接種的所有小鼠之平均值係如粗的實線所示。虛線係代表如材料與方法之說明中所界定之切點數值，在其以上所觀察到的T細胞反應係視為陽性。

實例

1.材料與方法

依據Maniatis等人(冷泉港實驗室(Cold Spring Harbor

Laboratory Press) 出版公司出版之“實驗室手冊(Laboratory Manual)”乙書1989年版或後續版本)所詳述之通用基因工程與分子選殖技術，或當使用市售套組時則依據製造商的建議，進行如下所述之建構作用(參見第1圖)。PCR擴增技術係嫺熟技藝者所知(例如參見學術出版社(Academic Press)於1990年出版及由Innis, Gelfand, Sninsky及White所著之“PCR操作程序-方法與應用指南(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)”乙書)。在增補100微克/毫升的抗生素之瓊脂上或液態培養基中之大腸桿菌(*E. coli*) C600(史崔塔基因(Stratagene)公司)，複製帶有安比西林(ampicillin)抗性基因的重組型質體。

如Erbs等人(於2008年期刊“Cancer Gene Ther.”第15期第18頁乙文)先前所述，藉由一轉運質體與MVA基因體之間之同源重組，產生MVA載體建構作用。“基本型”轉運質體含有一個重選殖位址、一個由缺失III的側臨序列所環繞之牛痘病毒(VV)啟動子以及在p11K7.5牛痘啟動子控制下之大腸桿菌(*E. coli*)黃嘌呤-鳥糞嘌呤磷酸核糖基-轉移酶(GPT)篩選基因(Falkner與Moss於1988年乙文)。簡而言之，用未插入任何轉殖基因的基因體MVA(空型MVA)感染CEF細胞，然後藉由氯化鈣沉澱作用及用帶有所感興趣的基因之轉運質體轉染而植入VV啟動子的下游。空型MVA與該轉運質體之間發生同源重組作用，及藉由多個黴酚酸篩選步驟而分離出重組型病毒。藉由PCR控制重組型MVA病毒，在CEF中擴增，及在CEF上藉由溶菌斑分析法而分析病毒庫

存的效價。

就腺病毒載體的建構作用而言，首先藉由將所感興趣的核酸分子插入“基本型”轉運質體pTG13135中，而建構腺病毒轉運質體。通常將該核酸分子插入pTG13135的NheI與NotI限制酶切位址，pTG13135含有由腺病毒序列(分別為第1至454個腺病毒核苷酸及第3513至5781個核苷酸)所環繞之一個CMV所驅動的表現組合體，而容許藉由同源重組作用進一步產生載體基因體(Charrier等人於1996年期刊“J. Virol.”第70期第4805頁乙文)。然後藉由藉由*Bst*1107I與*Pac*I剪切的重組型轉運載體及藉由*Cla*I剪切作用而直線化的pTG15375(編碼完整的腺病毒基因體)之間的同源重組作用，而獲得腺病毒載體。所產生的腺病毒載體係已刪除E3(第27867至30743個核苷酸)與E1(第455至3512個核苷酸)，及E1區係由表現組合體所置換，該表現組合體從5'至3'含有CMV迅早期增強子/啟動子、一種嵌合型人類 β -球蛋白/IgG內含子(如可自普洛麥格(Promega)公司取得的pCI載體中所存在者)、所感興趣的核酸分子及SV40晚期多腺苷酸化訊號。然後藉由將經*Pac*I直線化的病毒基因體轉染至E1互補細胞株中，而獲得腺病毒顆粒。如先前所述(Erbs等人於2000年期刊“Cancer Res.”第60期第3813頁乙文)進行病毒的增殖作用、純化作用及效價分析。

1.1. 載體建構作用與生產作用

下文中所說明的載體業已經工程化而表現突變體聚合酶多肽，該突變體聚合酶多肽最終與核心多肽及/或套膜蛋

白的免疫反應域融合。所有HBV序列係源自HBV株Y07587，該序列係述於國際資料庫(基因資料庫Y07587)及其他發表文獻中。其係具血清型ayw之一種基因型D病毒。

下列實例係說明如序列辨識編號：6中所示之一種截斷型核心多肽(第1至148個胺基酸)與一種突變型聚合酶多肽(示為Pol*)之融合作用，該突變型聚合酶多肽係包含二個內部刪除作用(自位置538至544及自位置710至742)及四個胺基酸取代作用(分別為D689H、V769Y、V776Y及D777H)，以及如序列辨識編號：8中所示之一個較長的融合體，其進一步包含插入而代替所刪除的pol區之二個免疫原性Env域(Env1與Env2係分別自HBs蛋白的第14個胺基酸延伸至第51個胺基酸及自第165個胺基酸延伸至第194個胺基酸)。

1.1.1. 表現截斷型核心-Pol*-Env1-Env2(或核心-Pol-Env1-Pol-Env2-Pol)融合體之質體與腺病毒載體的建構作用與生產作用

一種編碼該截斷型核心-Pol*-Env1-Env2融合蛋白(胺基酸序列係示於序列辨識編號：8中)之合成基因(序列辨識編號：15中所述的3024個核苷酸)係由基因技藝(GENEART)公司(德國雷根斯堡(Regensburg))合成。將合成片段插入提供pTG18188之pTG13135轉運質體的*NheI*與*NotI*限制酶切位址中。然後藉由經*Bst1107I*與*PacI*剪切的pTG18188及經*ClaI*剪切作用而直線化的pTG15375之間的同源重組作用，而獲得一腺病毒載體。所產生的腺病毒載體pTG18201之E3與E1已被刪除，及E1區係被表現組合體置換，該表現組合

體含有合成序列及其係編碼由CMV啟動子所驅動的該截斷型核心-Pol*-Env1-Env2。藉由將經*PacI*直線化的病毒基因體轉染至E1互補細胞株中，而獲得腺病毒顆粒(AdTG 18201)。

1.1.2.表現截斷型核心-Pol*之質體與腺病毒載體的建構作用與生產作用

一種編碼一截斷型核心-Pol*融合蛋白之合成基因(序列辨識編號：14中所述的2820個核苷酸)係由基因技藝(GENEART)公司(德國雷根斯堡(Regensburg))合成。將合成片段插入提供pTG18194之pTG13135轉運質體的*NheI*與*NotI*限制酶切位址中。然後藉由經*Bst1107I*與*PacI*剪切的pTG18194及經*ClaI*剪切作用而直線化的pTG15375之間的同源重組作用，而獲得一腺病毒載體。所產生的腺病毒載體pTG18202之E3與E1已被刪除，及E1區係被表現組合體置換，該表現組合體含有合成序列及其係編碼由CMV啟動子所驅動的該截斷型核心-Pol*。藉由將經*PacI*直線化的病毒基因體轉染至E1互補細胞株中，而獲得腺病毒顆粒(AdTG 18202)。

1.1.3.表現Pol*之質體與腺病毒載體的建構作用與生產作用

一種編碼Pol突變體多肽的合成基因(序列辨識編號：13中所述的2379個核苷酸)係由基因技藝(GENEART)公司(德國雷根斯堡(Regensburg))合成。將合成片段插入提供pTG18195之pTG13135轉運質體的*NheI*與*NotI*限制酶切位址中。然後藉由經*Bst1107I*與*PacI*剪切的pTG18195及經*ClaI*

剪切作用而直線化的pTG15375之間的同源重組作用，而獲得一腺病毒載體。所產生的腺病毒載體pTG18203之E3與E1已被刪除，及E1區係被表現組合體置換，該表現組合體含有合成序列及其係編碼由CMV啟動子所驅動的Pol*。藉由將經*PacI*直線化的病毒基因體轉染至E1互補細胞株中，而獲得腺病毒顆粒(AdTG18203)。

1.2. 小鼠模式中之免疫生成性評估作用

藉由酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法及在HLA基因轉殖型小鼠的免疫作用之後之細胞內細胞介素染色作用(ICS)，而在活體內評估抗原的免疫原性。

1.2.1. 小鼠模式

研究中所用的HLA-A2.1基因轉殖小鼠係如Pascolo等人所述(於1997年期刊“J. Exp. Med.”第185期第2043頁乙文)。該等小鼠的H-2D^b與鼠類 β 2-微球蛋白基因已被剔除，及表現一種基因轉殖型單鏈組織相容性第I類分子(HHD分子)，其中人類 β 2m的C端係與一嵌合重鏈(HLAA* 0201 α 1- α 2、H-2D^b α 3跨膜域與細胞質內域)的N端共價連接。7至10個星期大的小鼠(雄性與雌性)進行免疫接種。小鼠的平均重量約為25至30克。

研究中所用的HBV基因轉殖小鼠係如Halverscheid等人所述(於2008年期刊“J. Med. Virol.”第80期第583-590頁乙文)及承蒙Reinhold Schirmbeck提供。該等小鼠具有C57Bl/6J遺傳背景及經基因轉殖HBV基因體(1.4套的HBV基因體及在位置1438具有一突變作用(自T突變為C)而避免

小型HBsAg蛋白的表現作用及抑制HBV感染性顆粒的形成作用)。10至16個星期大的小鼠(雄性與雌性)進行免疫接種。小鼠的平均重量約為25至30克。

1.2.2. 免疫作用之操作程序

1.2.2.1 DNA免疫作用之操作程序

進行DNA免疫作用之操作程序，以評估由第1.1例說明的質體所編碼之不同融合蛋的免疫原性。免疫作用所用的DNA係在無內毒素條件下產生。小鼠係在間隔15天情況下進行免疫接種二次，每次注射100微克的各試驗質體，及該注射作用係經由肌內途徑注射至脛前肌。在第一次DNA注射作用之前，進行一次心臟毒素注射作用，以利於DNA免疫生成性。在最後一次DNA注射之15天後，評估細胞免疫反應。

1.2.2.2 腺病毒免疫作用之操作程序

進行腺病毒免疫作用之操作程序，以比較如第1.1例中所述產生之Ad載體所編碼的不同融合蛋白之免疫原性。經由尾根部的皮下途徑，小鼠係以編碼不同融合蛋白的腺病毒(108國際單位/小鼠/注射作用)進行免疫接種一次。在最後一次腺病毒注射之15天後，評估細胞免疫反應。

亦用AdTG18201評估不同的腺病毒劑量。藉由尾根部的皮下途徑，用 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 或 10^9 iu的AdTG18201免疫接種小鼠一次。

亦用AdTG18202測試不同的免疫作用排程，及小鼠按不同的時間間隔注射一次、二次、三次或六次。各注射作

用係經由尾根部的皮下途徑投予108國際單位/小鼠。將間隔一個星期的一次、三次或六次之注射作用並列進行比較。亦將在所引發的T細胞反應之監測時點之二個星期前或20個星期前所進行的一次注射作用、間隔2個月或4個月所進行的二次注射作用及間隔2個月所進行的三次注射作用並列進行比較。

1.2.3 肽

用於試管內細胞刺激作用之肽係如HLA-A2限制性抗原決定位所述或所預測之具有9至10個胺基酸的短肽，或為涵蓋所感興趣的所有抗原之肽庫所包括之具有15個胺基酸的長肽。

對應於核心蛋白、Pol蛋白或Env域的HLA-A2限制性抗原決定位所述或所預測之短肽，係由歐洲基因科技(Eurogentec)公司(比利時)合成及以10 mM濃度溶於100% DMSO(西克瑪(Sigma)公司之D2650)中。

涵蓋完整核心、Pol及套膜域之肽庫係由普羅免疫(ProImmune)公司合成(英國牛津)。核心、Pol及Env庫係由重疊11個胺基酸之十五肽所組成。各粗製的肽係以50毫克/毫升的濃度溶於100% DMSO(西克瑪(Sigma)公司之D2650)。就各庫而言，將肽匯集而使得各肽的濃度為2毫克/毫升：

- HBV核心蛋白係由具有21種與22種肽的二池所涵蓋(第1池(PC1)：涵蓋第1至100個核心殘基之22種肽；第2池(PC2)：涵蓋第89至183個核心殘基之21種肽)；

- HBV Pol蛋白係由具有24種肽的八池所涵蓋(第1池(PP1)：涵蓋第45至151個胺基酸之24種肽；第2池(PP2)：涵蓋第141至251個胺基酸之24種肽(因為不溶於100% DMSO或DMSO +pH 9的100 mM Tris而將第205至219個胺基酸之肽排除；因為不溶於100% DMSO，而將第221至235個胺基酸之肽溶於DMSO+pH 9的100 mM Tris)；第3池(PP3)：涵蓋第241至347個胺基酸之24種肽；第4池(PP4)：涵蓋第337至447個胺基酸之24種肽(因為不溶於100% DMSO或DMSO+pH 9的100 mM Tris而將第373至387個胺基酸之肽排除)；第5池(PP5)：涵蓋第437至543個胺基酸之24種肽；第6池(PP6)：涵蓋第533至639個胺基酸之24種肽；第7池(PP7)：涵蓋第629至735個胺基酸之24種肽；第8池(PP8)：涵蓋第725至835個胺基酸之24種肽)；

- Env域係由具有9種與10種肽的二池所涵蓋(第1池(PE1)：涵蓋第9至59個HBs殘基之10種肽；第2池(PE2)：涵蓋第157至194個HBs殘基之9種肽)。

就在具有C57BL/6J遺傳背景的HBV基因轉殖型小鼠中所進行之實驗而言，在試管內細胞刺激作用中使用文獻中所述或在先前實驗中所辨識出可與小鼠的C57Bl/6J遺傳背景反應之HBV肽。其等係短肽(就聚合酶而言為VSAAFYHLPL；序列辨識編號：24)或長肽(就聚合酶而言為稱作N13F之NLNVSIPWTHKVGNF(序列辨識編號：25)及就套膜蛋白而言為稱作F13L之FLWEWASARFSWLSL(序列辨識編號：26))。其等係由歐洲基因科技(Eurogentec)公司(比利時)

合成或由普羅免疫(ProImmune)公司(英國牛津)合成。各肽係以10 mM的濃度溶於100% DMSO(西克瑪(Sigma)公司之D2650)。在ICS分析期間(即使當以2種肽的混合物形式進行試驗時)，其等係以10 μ M的濃度使用。

1.2.4. IFN γ 酶聯免疫斑點(Elispot)分析

收集來自經免疫接種小鼠的脾細胞，及將紅血球細胞溶解(西克瑪(Sigma)公司之R7757)。在經一種抗小鼠IFN γ 單株抗體(必帝生物科學(BD Biosciences)公司之551216; 10微克/毫升)塗佈之多重篩選(Multiscreen)培養皿(密里博(Millipore)公司之MSHAS4510)中，每孔 2×10^5 個的細胞係在MEM培養基(吉柏柯(Gibco)公司之22571)中以三重複進行培養40小時，在該MEM培養基中增補10% FCS(JRH公司之12003-100M)、80單位/毫升的盤尼西林/80微克/毫升的鏈黴素(PAN公司之P06-07-100)、2 mM L-麩醯胺(吉柏柯(Gibco)公司之25030)、1x非必需胺基酸(吉柏柯(Gibco)公司之11140)、10 mM的4-羥乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)(吉柏柯(Gibco)公司之15630)、1 mM丙酮酸鈉(吉柏柯(Gibco)公司之31350)及50 μ M的 β -巰乙醇(吉柏柯(Gibco)公司之31350)及在10單位/毫升的重組型鼠類IL2(派普泰克(Peprotech)公司之212-12)之存在下，僅具有重組型鼠類IL2者係作為負對照組，或者具有：

- 存在於由序列辨識編號：18至23中所述的質體(FLP、ILC係用於核心，VLQ、FLG及GLS係用於Env及SLY係用於Pol))所編碼的HBV抗原中之10 μ M的一種所選擇的

HLA-A2限制性肽或一種不相關肽；

- 由多種肽組成之一池，各肽的最終濃度為5微克/毫升
- 使用5微克/毫升的伴刀豆球蛋白A(西克瑪(Sigma)公司之C5275)作為正對照組。

藉由如先前所述(Himoudi等人於2002年期刊“J. Virol.”第76期第12735頁乙文)之具細胞介素特異性的酵素連結免疫斑點(Elispot)分析法，將產生IFN γ 的T細胞定量。將含有HBV肽的實驗孔中檢測所得的斑點數目減去負對照組孔中的斑點數目(對應於產生IFN γ 的T細胞)。結果係以三重複孔所獲得的平均數值顯示。藉由計算對應於針對 10^6 個細胞所報導之閾值數值，該閾值數值係僅培養基之情況下所觀察到的斑點平均數值+2標準偏差，而測定所觀察的反應之陽性實驗閾值(或切點)。與CTL酶聯免疫斑點法(Elispot)讀數器連接之技術切點亦界定為50個點/ 10^6 個細胞(在該數值以上時之讀數器CV(變異係數)係系統性地低於20%)。將技術切點及針對各實驗計算所得的實驗閾值之間的最高數值納入考量，而界定各實驗的切點數值。藉由使用曼-懷特尼(Mann-Whitney)檢定，而進行酶聯免疫斑點(Elispot)反應之統計分析。將等於或小於0.05的p值視為顯著。

1.2.5.細胞內細胞介素染色(ICS)分析

在來自各組的各動物之脾細胞上進行ICS。用溶胞緩衝液(西克瑪(Sigma)公司之R7757)進行紅血球細胞的溶胞作用之後，平底式96孔平皿中之每孔 2×10^6 個細胞係在完全型 α MEM培養基(吉柏柯(Gibco)BRL公司之22571)中培養，該

培養作用係在10單位/毫升的鼠類重組型IL-2(派普泰克(Peprotech)公司之212-12)存在下進行，而僅存在鼠類重組型IL-2者係作為負對照組，或亦具有10 μ M的特異性HBV肽或具有由多種肽所組成的一池及各肽的最終濃度為5微克/毫升，或具有10 μ M的一種不相關肽。立即以1微升/毫升的最終濃度添加高爾基抑制劑(GolgiPlug)(必帝生物科學(BD Biosciences)公司之555029)達5小時。然後在V型底式96孔平皿中採集細胞，及用1%的FCS-PBS清洗。在50微升的1% FCS-PBS，中使用對抗CD3(倉鼠MAb抗CD3e-PE及稀釋1/200)、CD8(大鼠MAb抗CD8a-APC及稀釋1/600)及CD4(大鼠MAb抗CD4-PerCP及稀釋1/600)的單株抗體(分別為皆來自必帝生物科學公司之553063、553035及553052)，在室溫進行染色15分鐘。在清洗之後，用細胞固定劑(Cytofix)/細胞破膜劑(Cytoperm)將細胞固定及使細胞膜通透化，及用破膜/清洗緩衝液溶液(必帝生物科學公司之554714)清洗。然後在室溫添加抗小鼠IFN γ -PE抗體(必帝生物科學公司之554412557724)與抗小鼠TNF α -Alexa488抗體(必帝生物科學公司之557719)或抗小鼠IFN γ -PE抗體(必帝生物科學公司之554412557724)達15分鐘，及用破膜/清洗緩衝液清洗之後，將細胞再懸浮於1%的FCS-PBS中，及藉由流動式細胞測量術，使用FacsCalibur(必帝(Becton Dickinson)公司)進行分析。將CD3e $^{+}$ 、CD8a $^{+}$ 細胞或CD3e $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 細胞圈選，以測定IFN γ +CD8 $^{+}$ 或IFN γ +CD4 $^{+}$ T或TNF α +CD8 $^{+}$ 或TNF α +CD4 $^{+}$ T或IFN γ +TNF α +CD8 $^{+}$ 或IFN γ +TNF α +CD4 $^{+}$ T細胞族

群之百分比。在僅存在培養基的情況下所獲得的百分比係視為背景值。

就在HBV基因轉殖型小鼠所進行的實驗而言，亦在各組的各動物之肝臟細胞上進行ICS。將小鼠安樂死之後，藉由肝門靜脈及使用冷的PBS在原位灌注肝臟，直至該器官變得蒼白為止。摘取肝臟，置於PBS+FCS的2%溶液中，切成小塊，輕壓通過一個70微米的細胞過濾器，然後懸浮於冷的PBS+2% FCS溶液中。在離心後，再次用冷的PBS+2% FCS溶液清洗細胞。在新回合的離心作用後，將含有細胞的沉澱物再懸浮於10毫升的珀可(Percoll)溶液中，在室溫及700g離心12分鐘，及再次用PBS+2% FCS溶液清洗。然後如先前針對脾細胞所述者，將紅血球細胞溶解，及進行先前有關脾細胞的段落中所述之所有後續步驟。值得注意的是就肝臟而言，當所收集的T淋巴球數量有限時，每孔的細胞數目有所變化：所獲得的所有細胞係以在所有孔中分派等量細胞之方式培養。

1.2.6活體內CTL分析法

如Fournillier等人(於2007年期刊“Vaccine”第25期第7339-53頁乙文)所述，在HLA-A2基因轉殖型小鼠中進行活體內CTL分析法。由同系小鼠的脾臟獲得脾細胞懸浮液，及在紅血球細胞的溶胞作用後，調整至 20×10^6 個細胞/毫升。一半的細胞係與最終濃度為 $10 \mu\text{M}$ 之所感興趣的HBV肽(SLY、FLP或ILC)在 37°C 培養1小時，及讓一半的細胞未進行致敏化。然後在未致敏的細胞中添加 $10 \mu\text{M}$ 的5(6)-二乙

酸羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)(分子探針(Molecular Probes)公司之C1157)(高CFSE)達10分鐘，及在經HBV肽致敏的細胞中添加 $1\mu\text{M}$ 的CFSE(低CFSE)達10分鐘。在用PBS清洗之後，將所有族群混合，及在麻醉後的小鼠之眼後竇注射總數為 20×10^6 個細胞，及小鼠先前已藉由AdTG18201或AdTG15149進行免疫接種(二個星期以前)。因此，低CFSE族群代表理應被疫苗接種作用所引發的細胞毒性T細胞溶解之特異性標的，及高CFSE族群係容許分析法正規化之一內部參考。在24小時後，藉由流動式細胞儀分析來自領受小鼠的脾細胞，以檢測經CFSE標記的細胞。就各動物而言，計算經肽致敏的標的與未致敏標的之間的比例($R = \text{低CFSE細胞的數目} / \text{高CFSE細胞的數目}$)。藉由下列公式測定各動物的特異性溶胞作用百分比：溶胞作用 $\% = (1 - R_{\text{小鼠}} / R_{\text{參考}}) \times 100$ ，其中 $R_{\text{參考}}$ 係在注射經CFSE標記的標的之相同懸浮液的2隻空白HLA-A2小鼠所獲得之平均 R 。若特異性溶胞作用百分比係高於10%，則將反應視為陽性。

1.3 藉由電子顯微法之AdTG18201試管內分析

在懸浮液中及在培養基體積減少的條件下，以不同MOI(25至100)的AdTG18201感染A549細胞(人類肺腺癌上皮細胞株)，然後在採集進行分析之前，培養16小時、24小時或48小時。在該等不同的時間點採集細胞，然後使用在0.2M二甲胂酸鈉緩衝液中稀釋的2%戊二醛進行固定。然後將細胞乾燥，包含在樹脂塊中，然後切成超薄的切片。所獲得的網格然後使用乙酸氧鈾與檸檬酸鉛染色，及藉由電

子顯微法觀察。

2.結果

2.1. DNA 質體pTG18188與pTG18194所表現的HBV融合蛋白之免疫原性

在HLA-A2基因轉殖型小鼠中評估DNA質體所表現的HBV融合蛋白之免疫原性。在肌內注射pTG18188(t核心-Pol*-Env1-Env2)或pTG18194(t核心-Pol*)或作為負對照組的pTG13135(空白質體)二次之後，使用存在於聚合酶、核心或套膜域及/或涵蓋所感興趣的HBV抗原之重疊肽池中之已知的HLA-A2抗原決定位，藉由酶聯免疫斑點法(Elispot) IFN γ 與ICS(IFN γ /TNF α)評估特異性T細胞反應。

2.1.1.藉由酶聯免疫斑點(Elispot)分析法評估產生HBV特異性IFN γ 之細胞

如第2圖所示，以編碼HBV融合蛋白“t核心-Pol*”的質體pTG18194所進行之免疫作用，引發產生IFN γ 的細胞，該細胞對於位於HBV聚合酶內(位置816-824)的HLA-A2限制性SLY抗原決定位(序列辨識編號：23)具有特異性。以質體pTG18194進行的免疫作用亦引發高比率之產生IFN γ 的細胞，該細胞對於2個核心HLA-A2限制性抗原決定位FLP(位於HBV核心蛋白內的位置18至27之序列辨識編號：18)與ILC(位於HBV核心蛋白內的位置99至108之序列辨識編號：19)具有特異性。在8隻接種疫苗的小鼠中之4隻觀察到陽性反應。

如第2圖所示，編碼HBV融合蛋白“核心-Pol*-Env1-

Env2”之質體pTG18188亦引發產生IFN γ 的細胞，其對於pol HLA-A2抗原決定位SLY與對於2個核心HLA-A2限制性抗原決定位FLP與ILC具有特異性。在8隻接種疫苗的小鼠中之4隻觀察到陽性反應。此外，亦在一隻接種疫苗的小鼠中檢測出對於HLA-A2 GLS抗原決定位(位於Env2內之HBsAg的位置185至194之序列辨識編號：22)具有特異性之產生IFN γ 的細胞，雖然比率較弱。

2.1.2. 藉由細胞內染色分析法評估所引發之具HBV特異性及產生IFN γ 的T CD8 $^{+}$ 與CD4 $^{+}$ 細胞

2.1.2.1. 對於HLA-A2限制性抗原決定位具有特異性之CD8 T細胞反應

藉由ICS分析法評估僅產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 的CD8T細胞之百分比，IFN γ 與TNF α 係標定包括在聚合酶(SLY)、核心(FLP與ILC)及套膜域(VLQ、FLG與GLS)中之HLA-A2限制性抗原決定位。結果係以對於該等抗原決定位具有特異性及產生IFN γ 的CD8 $^{+}$ T細胞(單獨產生IFN γ 的細胞或同時產生IFN γ 與TNF α 的細胞之總和)之百分比示於第3A圖。用pTG18194(表現t核心-Pol*)免疫接種之8隻動物中的4隻具有產生IFN γ 的CD8 $^{+}$ T細胞，其對於分別位於核心與Pol抗原中之FLP、ILC及SLY HLA-A2限制性抗原決定位具有特異性。同樣地，用pTG18188(表現t核心-Pol*-Env1-Env2)免疫接種之8隻動物中的4隻亦具有產生IFN γ 的T CD8 $^{+}$ T細胞，其對於FLP、ILC及SLY抗原決定位具有特異性。此外，如已在酶聯免疫斑點(ELISPOT)分析中所觀察

到者，用質體pTG18188免疫接種之8隻小鼠中的1隻，展現藉由產生IFN γ 的CD8 $^{+}$ T細胞所媒介之針對位於Env2域內的GLS HLA-A2限制性抗原決定位之特異性反應。如所預期，以pTG13135進行的免疫作用並未引發任何特異性反應。

2.1.2.2 CD8與CD4 T細胞對於涵蓋核心蛋白、聚合酶蛋白及Env域的肽池之特異性反應

對於涵蓋核心蛋白的肽池之特異性反應

藉由ICS分析法，評估回應涵蓋核心蛋白(PC)的肽池之可單獨產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8與CD4T細胞的百分比。結果係以對於該等肽池具有特異性及產生IFN γ 之CD8 $^{+}$ 或CD4 $^{+}$ T細胞(單獨產生IFN γ 的細胞或同時產生IFN γ 與TNF α 的細胞之總和)之百分比表示。

如第3B圖所示，檢測針對涵蓋核心蛋白的二種肽池(PC1與PC2)之產生IFN γ 的CD8 $^{+}$ T細胞之陽性百分比，而CD8 $^{+}$ T細胞的反應係主要集中在核心池1的肽上。就該二肽池(1與2)而言，在藉由pTG18194或pTG18188接種的小鼠中所觀察到之反應性CD8 $^{+}$ T細胞的百分比，係與在負對照組(pTG13135)接種的小鼠中所觀察到之百分比顯著不同(曼-懷特尼(Mann Whitney)檢定之 $p < 0.05$)

如第3C圖所示，在用pTG18194或pTG18188接種的二組小鼠中，亦針對涵蓋核心蛋白的一肽池即核心池2檢測產生IFN γ 的CD4 $^{+}$ T細胞之陽性百分比。就核心池2而言，在藉由pTG18188接種的小鼠中所觀察到之反應性CD4 $^{+}$ T細胞

的百分比，係與在負對照組(pTG13135)接種的小鼠中所觀察到之百分比顯著不同(曼-懷特尼(Mann Whitney)檢定之 $p<0.05$)。

對於涵蓋聚合酶蛋白的肽池之特異性反應

藉由ICS分析法，評估回應涵蓋聚合酶蛋白的肽池之可單獨產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8與CD4 T細胞的百分比。結果係以對於該等肽池具有特異性及產生IFN γ 之CD8+或CD4+ T細胞(單獨產生IFN γ 的細胞或同時產生IFN γ 與TNF α 的細胞之總和)之百分比表示。

如第3D圖所示，主要針對一肽池即PP8檢測產生IFN γ 的CD8+ T細胞之陽性百分比。專門就PP8而言，在藉由pTG18194或pTG18188接種的小鼠中所觀察到之反應性CD8+T細胞的百分比，係與在負對照組(pTG13135)接種的小鼠中所觀察到之百分比顯著不同(曼-懷特尼(Mann Whitney)檢定之 $p<0.05$)。值得注意的是，在用pTG18188接種的小鼠組別中之1隻小鼠亦展現針對池4、池5與池6產生IFN γ 的CD8+ T細胞之陽性百分比。

如第3E圖所示，在用pTG18194或pTG18188接種的二組小鼠中，針對涵蓋Pol蛋白的四種肽池即Pol池1、Pol池4、Pol池5及Pol池6檢測出產生IFN γ 的CD4+ T細胞之弱陽性百分比，在各組的8隻試驗小鼠中，至少3隻展現反應。

對於涵蓋套膜域的肽池之特異性反應

藉由ICS分析法，評估回應涵蓋套膜域即Env1與Env2的肽池之可單獨產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8

與CD4 T細胞的百分比。在該實驗期間，未檢測出特異性CD4+ T細胞反應。CD8+ T細胞反應之結果係以對於該等肽池具有特異性及產生IFNg(單獨產生IFNg的細胞或同時產生IFNg與TNFa的細胞之總和)之CD8+ T細胞的百分比示於第3F圖。更詳細地，針對一肽池即Env2池，在用pTG18188接種的一小鼠中檢測出產生IFNg的CD8+ T細胞之弱陽性百分比。

2.2. 由腺病毒AdTG18201、AdTG18202及AdTG18203所表現的HBV融合蛋白之免疫原性

2.2.1. 藉由使用重疊肽池的酶聯免疫斑點法(Elispot) IFNg評估具HBV特異性之產生IFNg的T細胞

在用AdTG18201或AdTG18202或AdTG18203或AdTG15149(使用作為負對照組之空白腺病毒)接種的HLA-A2基因轉殖小鼠中，評估由人類腺病毒5表現之HBV Pol突變體與融合蛋白的免疫原性。藉由酶聯免疫斑點法(Elispot) IFNg，使用涵蓋所感興趣的HBV抗原、核心(PC1-2)、聚合酶(PP1-8)及Env(PE1-2)域之重疊肽池，評估在一次皮下注射腺病毒後所引發的特異性T細胞反應。

如第4圖所示，僅編碼HBV突變體聚合酶多肽的AdTG18203本身，即可引發對於聚合酶肽池4、5、6及8具特異性之產生IFNg的細胞。所有經免疫接種的小鼠皆展現特異性T細胞反應，高比率之產生特異性IFNg的細胞係主要針對聚合酶肽池4與8。

如第4圖所示，編碼HBV融合蛋白“t核心-Pol*”之AdTG

18202引發對於肽池PP2、PP3、PP4、PP5及PP8具有特異性之產生IFNg的細胞，該聚合酶特異性反應係主要集中針對PP2、PP3及PP8。用AdTG18202進行的免疫作用亦引發高比率之產生IFNg的細胞，該細胞對於2種核心肽池即PC1與PC2具有特異性，及較高比率的T細胞係標定PC1。在5隻經接種疫苗的小鼠中之全部5隻皆觀察到標定聚合酶與核心抗原之陽性反應。

如第4圖所示，亦發現編碼HBV融合蛋白“核心-Pol*-Env1-Env2”之AdTG18201具有免疫原性。更詳細地，在所有經接種疫苗的小鼠中引發對於聚合酶肽池PP2、PP3及PP8具有特異性之產生IFNg的細胞，以及針對PP4與PP5的斑點較弱及回應型小鼠的比率較低。在所有經接種疫苗的小鼠(5隻/5隻)中，用AdTG18201進行的免疫作用亦引發高比率之產生IFNg的細胞，該細胞對於二種核心肽池即PC1與PC2具有特異性。用AdTG18201進行的免疫接種作用亦引發針對Env域的特異性T細胞反應，即使該等反應係微弱與零星的，5隻小鼠中的1隻展現標定PE1之反應，及5隻小鼠中的2隻展現標定PE2之反應。

2.2.2.在用AdTG18201進行的免疫作用後使用HLA-A2肽及藉由酶聯免疫斑點法(Elispot) IFNg評估具HBV特異性之產生IFNg的T細胞

在HLA-A2基因轉殖型小鼠中，評估由AdTG18201所表現的一種HBV融合蛋白之免疫原性。動物係藉由一次皮下注射AdTG18201或AdTG15149(使用作為負對照組之空白

腺病毒)而進行動物免疫接種。使用包含在聚合酶(SLY)、核心(FLP與ILC)及套膜(VLQ與GLS)中之HLA-A2限制性抗原決定位，藉由酶聯免疫斑點法(Elispot) IFN γ 評估特異性T細胞反應。

如第5圖所示，發現編碼HBV融合蛋白«核心-Pol*-Env1-Env2»之AdTG18201具有免疫原性。更詳細地，在所有經AdTG18201接種疫苗的小鼠中，引發對於聚合酶HLA-A2抗原決定位、SLY具特異性之產生IFN γ 的細胞。同時，AdTG18201亦引發對於核心蛋白的2種HLA-A2抗原決定位即FLP與ILC具有特異性之產生IFN γ 的細胞，及其比率更高。用AdTG18201進行的免疫作用亦引發針對Env域的特異性T細胞反應，雖然回應型小鼠的比率與數目較低，8隻試驗小鼠中的2隻展現針對VLQ之陽性T細胞反應，及8隻試驗小鼠中的5隻展現針對GLSP肽之陽性T細胞反應。

2.2.3.在用AdTG18201進行之HLA-A2小鼠的免疫作用後藉由細胞內染色分析法及使用所選擇的肽池評估具HBV特異性之產生IFN γ 及/或TNF α CD8+T細胞

藉由ICS分析法，評估可單獨產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8+ T細胞的百分比，其係回應涵蓋一部分的聚合酶蛋白(PP8即第725至835個胺基酸)與一部分的HBV核心蛋白(PC1即第1至100個胺基酸)之所選擇的肽池。結果係以對於該等肽池具有特異性及單獨產生IFN γ 及組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8+ T細胞的百分比表示。

如第6圖所示，AdTG18201特別能引發單獨產生IFN γ

及組合產生IFN γ 與TNF α 之高百分比的CD8+T細胞，及IFN γ 與TNF α 辨識PP8與PC1池中的肽。所有經接種疫苗的小鼠皆展現高百分比之單獨產生型(僅IFN γ)及同時產生型(IFN γ 與TNF α)的特異性CD8+T細胞。

值得注意的是在另一小鼠模式即C57Bl6小鼠中進行類似實驗，而展現AdTG18201的免疫原性之類似結果(未顯示)。

2.2.4.在經AdTG18201進行免疫作用的HLA-A2小鼠中使用活體內CTL分析法評估引發活體內功能性CD8+ T細胞之作用

在HLA-A2小鼠中，在用AdTG18201或AdTG15149(作為負對照組)進行免疫作用後，藉由活體內細胞溶解(或CTL)分析法及使用已顯示被所引發之產生IFN γ 的CD8+T細胞標定之HLA-A2抗原決定位中之三者(SLY、FLP及ILC)，評估AdTG18201引發展現細胞溶解活性的活體內功能性CD8T細胞之能力。

如第7圖所示，AdTG18201可引發高百分比之對抗聚合酶抗原決定位SLY的活體內特異性溶胞作用，在所有經免疫接種的小鼠中皆檢測出特異性溶胞作用，及該百分比係自42%至75%(第7a圖)。亦顯示AdTG18201可引發對抗所試驗之二種核心蛋白的HLA-A2抗原決定位即FLP(第7a圖)與ILC(第7b圖)之高百分比的活體內特異性溶胞作用，及該等百分比係分別自32%至69%及自3%至64%。可檢測到對抗env抗原決定位之反應，但其水平低。

該等數據清楚地表明AdTG18201引發活體內功能性

CD8+ T細胞之能力，該活體內功能性CD8+ T細胞展現細胞溶解活性及同時標定HBV聚合酶與HBV核心蛋白。

2.2.5. 在經AdTG18201進行免疫作用的HBV基因轉殖小鼠中使用ICS分析法評估引發功能性CD8+ T細胞之作用

在HBV基因轉殖型小鼠中，評估AdTG18201在耐受型小鼠模式中引發功能性T細胞之能力。事實上，該等小鼠係經HBV基因體基因轉殖，及因此對於HBV抗原具有耐受性，這在一定程度上係模擬HBV慢性病患所經歷的耐受性。HBV基因轉殖小鼠係藉由一次皮下注射AdTG18201 (108 iu)或作為負對照組的AdTG15149而進行免疫接種。藉由ICS(檢測同時產生IFN γ 與TNF α 的CD8+ T細胞)，監測在經接種疫苗的小鼠脾臟與肝臟中所引發的T細胞。在該特異性模式中，使用經確認在C57Bl/6J小鼠中具有反應性之肽：由聚合酶的VSA與N13F肽及套膜的F13L肽所組成之一池，來篩選所引發的T細胞反應。

如第8圖所示，在經AdTG18201接種的小鼠之脾臟與肝臟中檢測出同時產生IFN γ 與TNF α 之功能性CD8+T細胞；在該二器官中，5隻試驗小鼠中之4隻展現具有聚合酶特異性之產生IFN γ /TNF α 的功能性CD8+ T細胞，及5隻試驗小鼠中之2隻展現具有套膜特異性之產生IFN γ /TNF α 的功能性CD8+ T細胞。如所預期，在用空白AdTG15149接種的小鼠中或當刺激作用使用一種不相關肽時，未檢測出反應。

總之，該等數據顯示病毒載體AdTG18201在一個HBV耐受型模式中引發同時產生IFN γ 與TNF α 的功能性CD8+T

細胞之能力，病毒載體AdTG18201係表現一融合蛋白及該融合蛋白含有一RNaseH缺陷型與YMDD刪除型pol突變體、env域及核心。

2.3 AdTG18201或AdTG18202的不同劑量與免疫作用排程之評估

2.3.1. 腺病毒劑量之評估

在HLA-A2基因轉殖小鼠中，按不同劑量評估由AdTG18201所表現的HBV融合蛋白之免疫原性。藉由一次皮下注射劑量為 10^5 iu或 10^6 iu或 10^7 iu或 10^8 iu或 10^9 iu的AdTG18201或 10^9 iu的AdTG15149(使用作為負對照組之空白腺病毒)，而進行動物的免疫接種作用。使用包含在聚合酶(SLY)、核心(FLP與ILC)及套膜(VLQ與GLS)中之HLA-A2限制性抗原決定位，藉由酶聯免疫斑點法(Elispot) IFN γ 評估特異性T細胞反應。

如第9圖所示，當注射劑量為 10^7 iu、 10^8 iu及 10^9 iu時，發現編碼HBV融合蛋白「核心-Pol*-Env1-Env2」之AdTG18201具免疫原性。更詳細地，在 10^5 與 10^6 iu的劑量，未檢測出對於所試驗之核心、聚合酶或Env域的HLA-A2抗原決定位具有特異性之產生IFN γ 的細胞。在 10^7 iu、 10^8 iu及 10^9 iu的劑量，檢測出標定所試驗之二種核心抗原決定位及所試驗之Pol的抗原決定位之產生IFN γ 的特異性細胞。在三種抗原決定位(SLY、FLP及ILC)觀察到劑量效應。就Env域的二種抗原決定位(VLQ與GLS)而言，劑量為 10^7 與 10^8 iu時之產生IFN γ 的細胞比率較低，而劑量為 10^9 iu時之比率明顯增加。

2.3.2. 時間間隔短的多次免疫作用排程之評估作用

依據不同的免疫作用排程，在HLA-A2基因轉殖小鼠中評估由AdTG18202所表現的HBV融合蛋白之免疫原性。投予AdTG18202一次或三次(在三個星期期間每星期進行注射一次)或六次(在六個星期期間每星期進行注射一次)，及在最後一次注射作用之二個星期後，藉由酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法及使用HLA-A2限制性抗原決定位即SLY(Pol)及FLP與ILC(核心)，評估所引發的免疫T細胞反應。使用作為負對照組的空白腺病毒，對於一些小鼠進行免疫接種六次(未顯示)。

如第10圖所示，不論所試驗的排程為何，發現編碼融合蛋白“核心-Pol*”之AdTG18202具免疫原性。更詳細地，在單獨存在培養基及不相關肽之情況下，未檢測出特異性T細胞反應；而在所試驗的三種HBV抗原決定位即SLY、FLP及ILC存在下，檢測出高比率及比率相近之產生IFN γ 的細胞。在間隔一個星期注射一次、三次或六次的小鼠組別之間，所檢測出產生IFN γ 的T細胞之比率似乎可相比，而在IFN γ 生產水平，並未出現由於短期內過多次的免疫作用所造成之T細胞衰竭現象。當小鼠注射六次時之腺病毒特異性T細胞反應，係高於注射一次或三次者。如所預期，在空白腺病毒的免疫作用後，未觀察到具HBV特異性之T細胞反應。

2.3.3. 時間間隔長的多次免疫作用排程之評估作用

依據不同的免疫作用排程，在HLA-A2基因轉殖小鼠中評估由AdTG18202所表現的HBV融合蛋白之免疫原性。投

予AdTG18202一次(在監測T細胞反應之二個星期前(第1組)或20個星期前(第2組))或二次(間隔二個月(第3組)或間隔四個月(第4組)進行二次注射作用及在最後一次免疫作用之二個星期後監測T細胞反應)或三次(間隔二個月(第5組)及在最後一次注射作用之二個星期後監測T細胞反應)。藉由酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法及使用HLA-A2限制性抗原決定位即SLY(Pol)及FLP與ILC(核心)，監測所引發的T細胞。一些小鼠係以作為負對照組的空白腺病毒進行免疫接種一次，或各間隔二個月進行三次(未顯示)。

如第11圖所示，不論所試驗的排程為何，發現編碼融合蛋白“核心-Pol*”之AdTG18202具免疫原性；而在單獨存在培養基及不相關肽之情況下，在用AdTG18202進行的免疫作用後，未檢測出特異性T細胞反應。更詳細地，在第2組中所觀察到的特異性T細胞反應，即使低於第1組中在一次免疫作用的二個星期後所觀察到者，第2組仍顯示在一次AdTG18202注射作用後所引發的T細胞反應係在該注射作用之20個星期後仍然存在。在第3與4組中所觀察到的T細胞反應顯示，在首次免疫作用之二個月或四個月後所進行之第二次免疫作用可召回具有HBV抗原決定位特異性之T細胞反應，其至少位於第1組中所觀察到的初次免疫反應之水平，就SLY抗原決定位而言甚至略高。在各間隔二個月進行三次免疫接種的小鼠(第5組)中觀察到類似現象，經由第二次與第三次注射作用召回所引發的T細胞反應及其水平與第1組所觀察到者類似。如所預期，在空白腺病毒的免疫

作用後，未觀察到具HBV特異性之T細胞反應。

2.4 電子顯微鏡觀察

在試管內，藉由MOI 25、50 或 100的AdTG18201感染A549細胞，及在感染16小時、24小時或48小時後收集細胞。然後處理所收集的細胞，及藉由電子顯微法進行觀察。

在經AdTG18201感染的細胞之細胞核與細胞質中觀察到一些類病毒顆粒(VLP)，在經空白腺病毒感染的細胞中則未觀察到該等結構。該等VLP主要位於細胞核內。在一些細胞中同時觀察到蛋白聚集體與VLP。

【圖式簡單說明】

第1圖係說明本發明所述之突變體聚合酶多肽、融合蛋白及抗原組合物。

第2圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用質體pTG18188(核心-Pol-Env1-Pol-Env2-Pol)、pTG18194(核心-Pol)或pTG13135(空白)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點法(Elispot) IFN γ 分析。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各條狀係代表由質體中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或2.3等)顯示，及亦呈現各組用相同質體免疫接種的所有小鼠之平均值(條狀在圖上係示為“平均值”)。就個別小鼠與平均值而言，將針對所試驗的不同肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率累積。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上

說明所示的一特定HBV肽之反應。

第3A-F圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用質體pTG18188(核心-P-E1-P-E2-P或核心-Pol-Env1-Pol-Env2-Pol)、pTG18194(核心-Pol)或pTG13135(空白)進行免疫作用後所進行之ICS分析法。結果係以針對各HBV HLA-A2肽(第3A圖)或涵蓋HBV核心的肽池(第3B與3C圖)、聚合酶(第3D與3E圖)及env(第3F圖)抗原之產生IFNg(單獨或組合TNFa)的CD8(第3A、3B、3D及3F圖)或CD4(第3C與3E圖)T細胞之百分比呈現。各條狀係代表由質體中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或2.3等)顯示，及亦呈現各組用相同質體免疫接種的所有小鼠之平均值(條狀在圖上係示為“平均值”)。就個別小鼠與平均值而言，將對於所試驗的不同肽具有特異性之CD8或CD4 T細胞的比率累積。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上說明所示的一特定HBV肽之反應。

第4圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用腺病毒AdTG18201(核心-Pol-Env Ad)、AdTG18202(核心-Pol Ad)、AdTG18203(Pol Ad)及AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後之酶聯免疫斑點法(Elispot) IFNg分析。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估之涵蓋所感興趣的抗原之各肽池之產生特異性IFNg的細胞比率。各條狀係代表由質體中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或2.3等)顯示，及亦呈現各組用相同質體免疫

接種的所有小鼠之平均值(條狀在圖上係示為“平均值”)。就個別小鼠與平均值而言，將針對所試驗的不同肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率累積。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上說明所示的一特定HBV肽之反應。

第5圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或針對一種不相關肽之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各條狀係代表由AdTG18201接種的個別小鼠(由其參考編號3.1至3.8所示)，及亦呈現用AdTG18201免疫接種的所有該等小鼠之中位數(條狀在圖上係示為«中位數»)。就個別小鼠與中位數而言，將針對不同的HBV HLA-A2抗原決定位之產生特異性IFN γ 的細胞比率累積，在一種不相關肽存在下所觀察到之產生特異性IFN γ 的細胞比率係由另一條狀代表(就各小鼠在圖上示為«不相關»)。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表對抗圖上說明所示的一特定HBV肽之反應。

第6圖係說明在HLA-A2小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)或AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後所進行之ICS分析法。結果係針對稱作PP8與PC1及分別涵蓋一部分的HBV聚合酶(第725至835個胺基酸)與一部分的HBV核心蛋白(第1至100個胺基酸)之二種所選擇的肽池，以單獨產生IFN γ 或組合產生IFN γ 與TNF α 之CD8 T細胞的百分比呈現。

各條狀係代表由腺病毒中的一者或另一者進行接種之個別小鼠，及係由其參考編號(1.1或3.2等)顯示，及亦呈現各組用相同腺病毒免疫接種的所有小鼠之中位數(條狀在圖上係示為“中位數”)。各條狀都附有不同的符號，各符號係代表由圖上說明所示之所檢測的CD8 T細胞產生之細胞介素。

第7圖係說明在HLA-A2小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)或AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後所進行之活體內CTL分析法。結果係以活體內特異性溶胞作用的百分比呈現，亦即對於所試驗的HBV HLA-A2抗原決定位具有特異性之溶胞作用。各正方形或三角形符號係代表個別小鼠，及亦呈現各組用相同腺病毒免疫接種的所有小鼠之平均值(由圖上的粗條狀符號所示)。

第8圖係說明在HBV基因轉殖小鼠用AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)或AdTG15149(空白Ad)進行免疫作用之後所進行之ICS分析法。結果係以同時產生IFN γ 與TNF α 的CD8 T細胞之百分比呈現，IFN γ 與TNF α 係對於來自HBV聚合酶(稱作VSA與N13F的二種肽之混合物)或來自HBV套膜(稱作F13L之一肽)的抗原決定位具有特異性及同時存在於經接種疫苗的小鼠之脾臟與肝臟中。各條狀係代表由腺病毒中的一者或另一者進行接種之個別小鼠及係由其參考編號(1.1或3.2等)顯示，及亦呈現各組用相同腺病毒免疫接種的所有小鼠之中位數(條狀在圖上係示為“中位數”)。圖上的虛線係對應於實驗的切點，亦即在其以上所觀察到的CD8 T細胞百分比係視為陽性免疫反應之閾值。

第9圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用自 10^5 iu至 10^9 iu之不同劑量的AdTG18201(核心-Pol-EnvAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或一種不相關肽或在僅有培養基存在下之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各實心或虛線條狀係代表由AdTG18201接種的個別小鼠，及亦呈現經一特定劑量的AdTG18201免疫接種之所有小鼠的平均值(格子型條狀)。不同劑量係由圖上說明所示的不同顏色或符號所示。虛線條代表如材料與方法之說明中所界定之切點數值，在其以上所觀察到的T細胞反應係視為陽性。

第10圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用AdTG18202(核心-PolAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點(Elispot) IFN γ 分析法，依據不同的注射排程，小鼠係經由一次注射作用(正方形)而進行免疫接種，或領受各間隔一個星期的三次注射作用(三角形)或領受各間隔一個星期的六次注射作用(圓形)。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或腺病毒載體或一種不相關肽或在僅有培養基存在下之產生特異性IFN γ 的細胞比率。各符號(正方形、三角形或圓形)係代表經AdTG18202接種的個別小鼠，及採用所試驗的排程中之一者及經AdTG18202免疫接種的所有小鼠之平均值係由粗

的實線代表。虛線係代表如材料與方法之說明中所界定之切點數值，在其以上所觀察到的T細胞反應係視為陽性。

第11圖係說明在HLA-A2基因轉殖小鼠用AdTG18202 (核心-PolAd)進行免疫作用之後所進行之酶聯免疫斑點 (Elispot) IFN γ 分析法，依據不同的注射排程，小鼠的免疫接種作用係在監測T細胞反應之二個星期前進行一次(第1組係如正方形所示)，或在監測T細胞反應之20個星期前進行一次(第2組係如三角形所示)，或各間隔二個月進行二次(第3組係如圓形所示)，或各間隔四個月進行二次(第4組係如交叉符號所示)或各間隔二個月進行三次(第5組係如菱形所示)。就第2組以外的所有組別而言，在最後一次注射作用之二個星期後監測T細胞反應。結果係以 10^6 個細胞中的斑點數目呈現，其係在經免疫接種小鼠的 10^6 個脾臟細胞之實驗中，對應於針對所評估的各HBV HLA-A2抗原決定位或一種不相關肽或在僅有培養基存在下之產生特異性IFN γ 的細胞之比率。各符號(正方形、三角形、圓形、交叉符號、菱形)係代表由AdTG18202接種的個別小鼠，及採用所試驗的排程中之一者及經AdTG18202免疫接種的所有小鼠之平均值係如粗的實線所示。虛線係代表如材料與方法之說明中所界定之切點數值，在其以上所觀察到的T細胞反應係視為陽性。

【主要元件符號說明】

(無)

序列表

- <110> 傳斯堅(Transgene SA)公司
- <120> HBV 聚合酶突變體
- <130> 361194D31275
- <150> EP11305909.1
- <151> 2011-07-12
- <150> EP12305450.4
- <151> 2012-04-18
- <160> 26
- <170> 專利申請軟體 3.3 版
- <210> 1
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> B 型肝炎病毒
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (7)..(7)
- <223> Xaa(7)可為蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (13)..(13)
- <223> Xaa(13)可為天冬醯胺酸(N)、精胺酸(R)或組胺酸(H)
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (16)..(16)
- <223> Xaa(16)可為異白胺酸(I)或蘇胺酸(T)
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (38)..(38)
- <223> Xaa(38)可為蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (53)..(53)
- <223> Xaa(53)可為絲胺酸(S)或天冬醯胺酸(N)
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (54)..(54)
- <223> Xaa(54)可為蘇胺酸(T)或酪胺酸(Y)
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (55)..(55)
- <223> Xaa(55)可為組胺酸(H)或精胺酸(R)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa(91)可為異白胺酸(I)或白胺酸(L)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (109)..(109)
 <223> Xaa(109)可為脯胺酸(P)或絲胺酸(S)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (118)..(118)
 <223> Xaa(118)可為蘇胺酸(T)或天冬醯胺酸(N)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (121)..(121)
 <223> Xaa(121)可為天冬醯胺酸(N)或異白胺酸(I)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (122)..(122)
 <223> Xaa(122)可為異白胺酸(I)或苯丙胺酸(F)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (124)..(124)
 <223> Xaa(124)可為酪胺酸(Y)或天冬醯胺酸(N)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (127)..(127)
 <223> Xaa(127)可為甘胺酸(G)或精胺酸(R)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (131)..(131)
 <223> Xaa(131)可為天門冬胺酸(D)或天冬醯胺酸(N)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (134)..(134)
 <223> Xaa(134)可為天門冬胺酸(D)或天冬醯胺酸(N)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (145)..(145)
 <223> Xaa(145)可為白胺酸(L)或甲硫胺酸(M)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (149)..(149)
 <223> Xaa(149)可為離胺酸(K)或麩醯胺(Q)

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (151)..(151)
 <223> Xaa(151)可為苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)

- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (221)..(221)
 <223> Xaa(221)可為苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (222)..(222)
 <223> Xaa(222)可為蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (223)..(223)
 <223> Xaa(223)可為絲胺酸(S)或丙胺酸(A)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (224)..(224)
 <223> Xaa(224)可為異白胺酸(I)或纈胺酸(V)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (238)..(238)
 <223> Xaa(238)可為天冬醯胺酸(N)或組胺酸(H)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (248)..(248)
 <223> Xaa(248)可為天冬醯胺酸(N)或組胺酸(H)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (256)..(256)
 <223> Xaa(256)可為絲胺酸(S)或半胱胺酸(C)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (257)..(257)
 <223> Xaa(257)可為色胺酸(W)或酪胺酸(Y)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (259)..(259)
 <223> Xaa(259)可為蘇胺酸(T)或絲胺酸(S)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (263)..(263)
 <223> Xaa(263)可為麩胺酸(E)或天門冬胺酸(D)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (266)..(266)
 <223> Xaa(266)可為纈胺酸(V)或異白胺酸(I)
- <220>
 <221> 其他特徵
 <222> (267)..(267)

<223> Xaa(267)可為白胺酸(L)或麩醯胺(Q)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (271)..(271)
<223> Xaa(271)可為麩醯胺(Q)、甲硫胺酸(M)或麩胺酸(E)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (317)..(317)
<223> Xaa(317)可為絲胺酸(S)或丙胺酸(A)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (317)..(317)
<223> Xaa(317)可為絲胺酸(S)或丙胺酸(A)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (332)..(332)
<223> Xaa(332)可為半胱胺酸(C)或絲胺酸(S)

<400> 1

Glu Asp Trp Gly Pro Cys Xaa Glu His Gly Glu His Xaa Ile Arg Xaa
1 5 10 15

Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys
20 25 30

Asn Pro His Asn Thr Xaa Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln
35 40 45

Phe Ser Arg Gly Xaa Xaa Xaa Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro
50 55 60

Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu
65 70 75 80

Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Xaa Pro Leu His Pro Ala
85 90 95

Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Xaa Arg Tyr Val
100 105 110

Ala Arg Leu Ser Ser Xaa Ser Arg Xaa Xaa Asn Xaa Gln His Xaa Thr
115 120 125

Met Gln Xaa Leu His Xaa Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu
130 135 140

Xaa Leu Leu Tyr Xaa Thr Xaa Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His

.

	145				150					155						160
	Pro	Ile	Ile	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Ile	Pro	Met	Gly	Val	Gly	Leu	Ser
					165					170					175	
	Pro	Phe	Leu	Leu	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Ala	Ile	Cys	Ser	Val	Val	Arg
				180					185					190		
	Arg	Ala	Phe	Pro	His	Cys	Leu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Met	Asp	Asp	Val	Val
			195					200					205			
	Leu	Gly	Ala	Lys	Ser	Val	Gln	His	Leu	Glu	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		210					215					220				
●	Thr	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ile	His	Leu	Asn	Pro	Xaa	Lys	Thr
	225					230					235					240
,	Lys	Arg	Trp	Gly	Tyr	Ser	Leu	Xaa	Phe	Met	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Xaa
					245					250					255	
•	Xaa	Gly	Xaa	Leu	Pro	Gln	Xaa	His	Ile	Xaa	Xaa	Lys	Ile	Lys	Xaa	Cys
				260					265					270		
	Phe	Arg	Lys	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Pro	Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Cys	Gln
			275					280					285			
	Arg	Ile	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Pro	Phe	Thr	Gln	Cys	Gly
		290					295					300				
●	Tyr	Pro	Ala	Leu	Met	Pro	Leu	Tyr	Ala	Cys	Ile	Gln	Xaa	Lys	Gln	Ala
	305					310					315					320
	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Xaa	Lys	Gln	Tyr	Leu
					325					330					335	
	Asn	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Arg	Gln								
				340												
	<210>	2														
	<211>	337														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	突變型 Y07587 聚合酶域(刪除 YMDDVVL)														

<400> 2

Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile
1 5 10 15

Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys
20 25 30

Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln
35 40 45

Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro
50 55 60

Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu
65 70 75 80

Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala
85 90 95

Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val
100 105 110

Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr
115 120 125

Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His
145 150 155 160

Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser
165 170 175

Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg
180 185 190

Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Gly Ala Lys Ser Val Gln
195 200 205

His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu
210 215 220

Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu

225 230 235 240

His Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp
245 250 255

His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn
260 265 270

Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly
275 280 285

Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu
290 295 300

Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr
305 310 315 320

Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg
325 330 335

Gln

<210> 3
<211> 153
<212> PRT
<213> B型肝炎病毒

<220>
<221> 其他特徵
<222> (2)..(2)
<223> Xaa(2)可為絲胺酸(S)或脯胺酸(P)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (19)..(19)
<223> Xaa(19)可為丙胺酸(A)或纈胺酸(V)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (20)..(20)
<223> Xaa(20)可為異白胺酸(I)或甲硫胺酸(M)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (30)..(30)
<223> Xaa(30)可為纈胺酸(V)或白胺酸(L)

<220>
<221> 其他特徵

<222> (31)..(31)
<223> Xaa(31)可為丙胺酸(A)或絲胺酸(S)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (53)..(53)
<223> Xaa(53)可為離胺酸(K)或天冬醯胺酸(N)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (54)..(54)
<223> Xaa(54)可為白胺酸(L)或異白胺酸(I)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (55)..(55)
<223> Xaa(55)可為白胺酸(L)或異白胺酸(I)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (97)..(97)
<223> Xaa(97)可為丙胺酸(A)或蘇胺酸(T)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (108)..(108)
<223> Xaa(108)可為酪胺酸(Y)或絲胺酸(S)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (115)..(115)
<223> Xaa(115)可為脯胺酸(P)或白胺酸(L)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (116)..(116)
<223> Xaa(116)可為苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)

<220>
<221> 其他特徵
<222> (128)..(128)
<223> Xaa(128)可為纈胺酸(V)或天門冬胺酸(D)

<400> 3

Arg Xaa Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asp Ala Thr Pro Thr Gly Trp
1 5 10 15

Gly Leu Xaa Xaa Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Xaa Xaa Pro
20 25 30

Leu Pro Ile His Thr Ala Glu Leu Ala Ala Cys Phe Ala Arg Ser
35 40 45

Arg Ser Gly Ala Xaa Xaa Xaa Gly Thr Asp Asn Ser Val Val Leu Ser
50 55 60

Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp
65 70 75 80

Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro
85 90 95

Xaa Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Xaa Arg Pro Leu Leu
100 105 110

Arg Leu Xaa Xaa Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Xaa
115 120 125

Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser
130 135 140

Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
145 150

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變型 Y07587 RNaseH 域(刪除 710-742;取代
D689H V769Y V776Y D777H)

<400> 4

Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala His Ala Thr Pro Thr Gly Trp
1 5 10 15

Gly Leu Val Met Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Ser Arg
20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile
35 40 45

Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu Asn Pro Tyr
50 55 60

His Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg
65 70 75 80

Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro
100 105 110

Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
115 120

<210> 5
<211> 792
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有突變型聚合酶域與 RNaseH 域之 Y07587 聚合酶

<400> 5

Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg Leu Leu Leu Leu Asp Asp
1 5 10 15

Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly
20 25 30

Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val
35 40 45

Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro
65 70 75 80

Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val
85 90 95

Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro
100 105 110

Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly
115 120 125

Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr
130 135 140

Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
145 150 155 160

Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu
165 170 175

Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln Ser Ser Gly
180 185 190

Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys His Arg
195 200 205

Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg
210 215 220

Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Ile His Pro Thr Ala
225 230 235 240

Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Asn
245 250 255

Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val Arg Lys
260 265 270

Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly
275 280 285

His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln
290 295 300

Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser
305 310 315 320

Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu
325 330 335

Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro
340 345 350

Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn
355 360 365

Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe
370 375 380

Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn
385 390 395 400

Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser
405 410 415

Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala
420 425 430

Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala
435 440 445

Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr Met
450 455 460

Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu
465 470 475 480

Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro
485 490 495

Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro
500 505 510

Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg
515 520 525

Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Gly Ala Lys Ser Val Gln His
530 535 540

Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly
545 550 555 560

Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu His
565 570 575

Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp His
580 585 590

Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg
595 600 605

Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe
610 615 620

Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr
625 630 635 640

Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys
645 650 655

Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln
660 665 670

Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala His Ala Thr Pro Thr Gly Trp
675 680 685

Gly Leu Val Met Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Ser Arg
690 695 700

Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile
705 710 715 720

Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu Asn Pro Tyr
725 730 735

His Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg
740 745 750

Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser
755 760 765

Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro
770 775 780

Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
785 790

<210> 6
<211> 939
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 一種截斷型 HBc(1-148)與突變型 Y07587 聚合酶之間之融合體

<400> 6

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg Leu Leu Leu
145 150 155 160

Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala
165 170 175

Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn
180 185 190

Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly
195 200 205

Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro
210 215 220

Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu
225 230 235 240

Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu
245 250 255

Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu
260 265 270

Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr
275 280 285

Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu
290 295 300

Tyr Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr
305 310 315 320

Ser Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln
325 330 335

Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser
340 345 350

Lys His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu
355 360 365

Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Ile His
370 375 380

Pro Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His
385 390 395 400

Ser Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro
405 410 415

Val Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser
420 425 430

Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala
435 440 445

Arg Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe
450 455 460

Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn
465 470 475 480

Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile
485 490 495

Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val
500 505 510

Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe
515 520 525

Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala
530 535 540

Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
545 550 555 560

Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His
565 570 575

Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg
580 585 590

Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn Tyr Gln His
595 600 605

Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val
610 615 620

Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr
625 630 635 640

Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly
645 650 655

Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
660 665 670

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Gly Ala Lys Ser
675 680 685

Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu
690 695 700

Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr
705 710 715 720

Ser Leu His Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly Ser Leu Pro
725 730 735

Gln Asp His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro
740 745 750

Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu
755 760 765

Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met
770 775 780

Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro
785 790 795 800

Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val
805 810 815

Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala His Ala Thr Pro
820 825 830

Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe
835 840 845

Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala
850 855 860

Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu
865 870 875 880

Asn Pro Tyr His Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Ser Arg Pro
885 890 895

Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr
900 905 910

Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe
915 920 925

Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
930 935

<210> 7
<211> 860
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變型 Y07587 聚合酶與 env1 及 env2 免疫原域之融合體

<400> 7

Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Asn
245 250 255

Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val Arg Lys
260 265 270

Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly
275 280 285

His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln
290 295 300

Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser
305 310 315 320

Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu
325 330 335

Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro
340 345 350

Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn
355 360 365

Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe
370 375 380

Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn
385 390 395 400

Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser
405 410 415

Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala
420 425 430

Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala
435 440 445

Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr Met
450 455 460

Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu
465 470 475 480

Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro
485 490 495

Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro
500 505 510

Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg
515 520 525

Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe
530 535 540

Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp
545 550 555 560

Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Gly
565 570 575

Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn
580 585 590

Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg
595 600 605

Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly
610 615 620

Ser Leu Pro Gln Asp His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg
625 630 635 640

Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile
645 650 655

Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro
660 665 670

Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr
675 680 685

Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu
690 695 700

Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala His
705 710 715 720

Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln Arg Met Arg
725 730 735

Gly Thr Phe Leu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
740 745 750

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
755 760 765

Ser Val Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala
770 775 780

Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Tyr Pro Ser Ala
785 790 795 800

Leu Asn Pro Tyr His Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Ser Arg
805 810 815

Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu
820 825 830

Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His
835 840 845

Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
850 855 860

- <210> 8
- <211> 1007
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 截斷型核心(1-148)-突變型 Y07587 聚合酶-env1 與 env2 之間之融合體
- <400> 8

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg Leu Leu Leu
145 150 155 160

Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala
165 170 175

Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn
180 185 190

Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly
195 200 205

Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro
210 215 220

Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu
225 230 235 240

Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu
245 250 255

Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu
260 265 270

Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr
275 280 285

Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu
290 295 300

Tyr Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr
305 310 315 320

Ser Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln
325 330 335

Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser
340 345 350

Lys His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu
355 360 365

Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Ile His
370 375 380

Pro Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His
385 390 395 400

Ser Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro
405 410 415

Val Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser
420 425 430

Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala
435 440 445

Arg Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe
450 455 460

Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn
465 470 475 480

Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile
485 490 495

Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val
500 505 510

Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe
515 520 525

Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala
530 535 540

Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
545 550 555 560

Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His
565 570 575

Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg
580 585 590

Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn Tyr Gln His
595 600 605

Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val
610 615 620

Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr
625 630 635 640

Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly
645 650 655

Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
660 665 670

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Val Leu Gln Ala
675 680 685

Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp
690 695 700

Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu
705 710 715 720

Gly Gln Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala
725 730 735

Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys
740 745 750

Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly
755 760 765

Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu
770 775 780

Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys
785 790 795 800

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

Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln
820 825 830

Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr
835 840 845

Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val
850 855 860

Phe Ala His Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln
865 870 875 880

Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu
885 890 895

Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
900 905 910

Val Trp Leu Ser Val Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu
915 920 925

Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Tyr
930 935 940

Pro Ser Ala Leu Asn Pro Tyr His Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly
945 950 955 960

Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg
965 970 975

Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp
980 985 990

Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
995 1000 1005

<210> 9
 <211> 1042
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 天然核心(1-183)-突變型 Y07587 聚合酶-env1 與 env2 之間之融合體

<400> 9

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 100 105 110

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
 145 150 155 160

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 165 170 175

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg
 180 185 190

Leu Leu Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro
195 200 205

Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn
210 215 220

Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn
225 230 235 240

Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp
245 250 255

Lys Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys
260 265 270

Lys Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg
275 280 285

Leu Gln Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr
290 295 300

Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val
305 310 315 320

Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala
325 330 335

Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly
340 345 350

Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe
355 360 365

His Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser
370 375 380

Leu Gln Ser Lys His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln
385 390 395 400

Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala
405 410 415

Gly Ile His Pro Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly
420 425 430

Ser Gly His Ser Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr
435 440 445

Gln Ser Pro Val Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu
450 455 460

Lys His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro
465 470 475 480

Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp
485 490 495

Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His
500 505 510

Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu
515 520 525

His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val
530 535 540

Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val
545 550 555 560

Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro
565 570 575

Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser
580 585 590

Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu
595 600 605

Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly
610 615 620

Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn
625 630 635 640

Tyr Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn
645 650 655

Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu
660 665 670

His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met
675 680 685

Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile
690 695 700

Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Val
705 710 715 720

Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln
725 730 735

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr
740 745 750

Val Cys Leu Gly Gln Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu
755 760 765

Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn
770 775 780

Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe Met Gly Tyr
785 790 795 800

Val Ile Gly Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp His Ile Ile Gln Lys
805 810 815

Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp
820 825 830

Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe
835 840 845

Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln
850 855 860

Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys
865 870 875 880

Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu
885 890 895

Cys Gln Val Phe Ala His Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met
900 905 910

Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Trp Ala Ser Ala Arg Phe
 915 920 925

Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu
 930 935 940

Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro
 945 950 955 960

Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe
 965 970 975

Val Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu Asn Pro Tyr His Asp Pro Ser Arg Gly
 980 985 990

Arg Leu Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr
 995 1000 1005

Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser
 1010 1015 1020

His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala
 1025 1030 1035

Trp Arg Pro Pro
 1040

<210> 10
 <211> 880
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 訊號序列-突變型 Y07587 聚合酶與跨膜序列之間之融合體

<400> 10

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg
 20 25 30

Leu Leu Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro
 35 40 45

Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn
50 55 60

Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn
65 70 75 80

Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp
85 90 95

Lys Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys
100 105 110

Lys Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg
115 120 125

Leu Gln Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr
130 135 140

Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val
145 150 155 160

Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala
165 170 175

Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly
180 185 190

Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe
195 200 205

His Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser
210 215 220

Leu Gln Ser Lys His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln
225 230 235 240

Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala
245 250 255

Gly Ile His Pro Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly
260 265 270

Ser Gly His Ser Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr
275 280 285

Gln Ser Pro Val Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu
290 295 300

Lys His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro
305 310 315 320

Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp
325 330 335

Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His
340 345 350

Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu
355 360 365

His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val
370 375 380

Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val
385 390 395 400

Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro
405 410 415

Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser
420 425 430

Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu
435 440 445

Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly
450 455 460

Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn
465 470 475 480

Tyr Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn
485 490 495

Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu
500 505 510

His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met
515 520 525

Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile
530 535 540

Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Gly
545 550 555 560

Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn
565 570 575

Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg
580 585 590

Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly
595 600 605

Ser Leu Pro Gln Asp His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg
610 615 620

Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile
625 630 635 640

Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro
645 650 655

Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr
660 665 670

Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu
675 680 685

Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala His
690 695 700

Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln Arg Met Arg
705 710 715 720

Gly Thr Phe Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly
725 730 735

Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Tyr Pro
740 745 750

Ser Ala Leu Asn Pro Tyr His Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu
755 760 765

Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr
770 775 780

Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg
785 790 795 800

Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro Tyr Val
805 810 815

Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu
820 825 830

Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn
835 840 845

Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys
850 855 860

Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
865 870 875 880

<210> 11
<211> 1027
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列訊號-截斷型核心(1-148)-突變型 Y07587 聚合酶-序列 TM
之間之融合體

<400> 11

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly
20 25 30

Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser
35 40 45

Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu
50 55 60

Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala
65 70 75 80

Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly
85 90 95

Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn
100 105 110

Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser
115 120 125

Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe
130 135 140

Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro
145 150 155 160

Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Pro Leu Ser Tyr Gln His
165 170 175

Phe Arg Arg Leu Leu Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu
180 185 190

Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu
195 200 205

Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys
210 215 220

Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn
225 230 235 240

Pro His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp
245 250 255

Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu
260 265 270

Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val
275 280 285

Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu
290 295 300

His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu
305 310 315 320

Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser
325 330 335

Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala
340 345 350

Glu Ser Phe His Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val
355 360 365

Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln
370 375 380

Ser Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser
385 390 395 400

Ile Arg Ala Gly Ile His Pro Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu
405 410 415

Pro Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser
420 425 430

Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser
435 440 445

Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn
450 455 460

Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro
465 470 475 480

Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys
485 490 495

Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu
500 505 510

His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr
515 520 525

Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser
530 535 540

Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val
545 550 555 560

Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu
565 570 575

Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe
580 585 590

Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly
595 600 605

Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg
610 615 620

Ile Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys
625 630 635 640

Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly
645 650 655

Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys
660 665 670

Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr
675 680 685

Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala
690 695 700

Phe Ser Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala
705 710 715 720

Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys
725 730 735

Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly
740 745 750

Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu
755 760 765

Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys
770 775 780

Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys
785 790 795 800

Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln
805 810 815

Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr
820 825 830

Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val
835 840 845

Phe Ala His Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln
850 855 860

Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp
865 870 875 880

Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val
885 890 895

Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu Asn Pro Tyr His Asp Pro Ser Arg Gly Arg
900 905 910

Leu Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr
915 920 925

Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu
930 935 940

Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro
945 950 955 960

Pro Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile
965 970 975

Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr
980 985 990

Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln
995 1000 1005

Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly
1010 1015 1020

Glu Thr Arg Leu
1025

<210> 12
 <211> 1095
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 訊號序列-核心(1'148)-突變型 Y07587 聚合酶-env1-env2
 及 TM 序列之間之融合體

<400> 12

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly
 20 25 30

Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser
 35 40 45

Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu
 50 55 60

Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala
 65 70 75 80

Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly
 85 90 95

Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn
 100 105 110

Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser
 115 120 125

Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe
 130 135 140

Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Pro Leu Ser Tyr Gln His
 165 170 175

Phe Arg Arg Leu Leu Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu
 180 185 190

Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu
195 200 205

Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys
210 215 220

Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn
225 230 235 240

Pro His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp
245 250 255

Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu
260 265 270

Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val
275 280 285

Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu
290 295 300

His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu
305 310 315 320

Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser
325 330 335

Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala
340 345 350

Glu Ser Phe His Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val
355 360 365

Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln
370 375 380

Ser Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser
385 390 395 400

Ile Arg Ala Gly Ile His Pro Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu
405 410 415

Pro Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser
420 425 430

Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser
435 440 445

Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn
450 455 460

Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro
465 470 475 480

Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys
485 490 495

Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu
500 505 510

His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr
515 520 525

Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser
530 535 540

Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val
545 550 555 560

Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu
565 570 575

Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe
580 585 590

Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly
595 600 605

Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg
610 615 620

Ile Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys
625 630 635 640

Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly
645 650 655

Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys
660 665 670

Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr
675 680 685

Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala
690 695 700

Phe Ser Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr
705 710 715 720

Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly
725 730 735

Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu
740 745 750

Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile
755 760 765

His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe
770 775 780

Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp His Ile
785 790 795 800

Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro
805 810 815

Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala
820 825 830

Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala
835 840 845

Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala
850 855 860

Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg
865 870 875 880

Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala His Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly
885 890 895

Leu Val Met Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Trp Ala Ser
900 905 910

Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe
915 920 925

Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ser Arg Lys Tyr Thr
930 935 940

Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly
945 950 955 960

Thr Ser Phe Val Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu Asn Pro Tyr His Asp Pro
965 970 975

Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe
980 985 990

Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val
995 1000 1005

Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His
1010 1015 1020

Val Ala Trp Arg Pro Pro Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu
1025 1030 1035

Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg
1040 1045 1050

Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly
1055 1060 1065

Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser
1070 1075 1080

Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
1085 1090 1095

- <210> 13
- <211> 2379
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 編碼突變型 Y07587 聚合酶之核苷酸序列

<400> 13

atgccactga gctaccagca ctttcgcagg ctgttactgc tggatgatga agctggaccg	60
ctggaggagg agctgccacg tctggctgat gagggactga accgtcgtgt ggctgaggac	120
ctgaacctgg gcaacctgaa cgtgagcatt ccttggactc ataagggtggg aaacttttacg	180
ggacttttatt cttctactgt acctgtcttt aaccctcatt ggaaaacacc ctcttttccct	240
aatatacatt tacaccaaga cattatcaag aaatgtgaac aatttgtagg accactcaca	300
gtcaatgaga aaagaagact gcaattgatt atgcctgcta ggttttatcc aaatgttacc	360
aaatatttgc cattggataa gggattataa ccttattatc cagaacatct agttaatcat	420
tacttccaaa ccagacatta ttacacact ctatggaagg caggtatatt atataagaga	480
gaaacaacac atagtgcctc attttgtggg tcaccatatt ctggggaaca aaagctacag	540
catggagcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttaga	600
tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac	660
ctggccagac gccacaagg taggagctgg agcattcgag ctgggattca cccacccgca	720
cggaggtctt ttgggggtgga gccctcaggc tcagggcatt ctacaaacct tgccagcaaa	780
tcagcctcct gcccttacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccctgc tgtctccacc	840
tttgagaaac atcctcctc aggccatgca gtggaactcc acaaccttcc accaaactct	900
gcaagatccc agagtgagag gcctgtatct cctgtctggt ggctccagtt caggaacagt	960
aaacctgtt ccgactactg tctctcccat atcgtcaatc ttctcgagga ttggggaccc	1020
tgcgctgaac acggtgagca ccataatcgc atcccgagaa cgccagcacg cgtgaccggt	1080
ggcgtgttcc tgggtgataa gaaccacat aacacggctg aaagccgtct ggttgttgac	1140
tttagccagt tcagccgtgg caattatcgc gtttagctggc ctaagtttgc ggtgccgaat	1200
ctgcagagcc tgacgaatct gttaagcagc aatttaagct ggctgagctt agacgttagc	1260
gcagccttct accacctgcc actgcaccca gcagcgatgc cacacctgct ggtgggcagc	1320
agcggctctga gccgttacgt ggcacgcctg agcagcaaca gccgtatatt taattatcaa	1380
catggcacga tgcaaaatct acatgatagc tgtagccgta atctgtacgt gagcctgtta	1440
ctgttatatc agacgttttg tcgcaagctg catttataca gccacccgat tattttaggg	1500
ttccgcaaga tcccgatggg tgttggtctg tctccattcc tgtttagcgca attcaccagc	1560
gcaatctgca gcgttgtgcg cagagcgttt ccgcattgcc tggcgtttag cggtgcgaaa	1620
agcgtgcaac acctggaaag cctgttcacg gcagtgcga acttcctgct gagcctgggc	1680
attcacctga accctaaca aacaaagaga tggggttact ctttacattt catgggctat	1740
gtcattggat gttatgggtc attgccacaa gatcacatca tacaaaagat caaagaatgt	1800

tttcgaaaac ttccgtgttaa cagacctatt gattggaaaag tctgtcaacg tattgtgggt 1860
cttttgggtt ttgctgtccc ttttacacaa tgtgggtatc ctgctttaat gcctttgtat 1920
gcatgtattc agtcgaagca ggcttttact ttctcgccaa cttacaaggc ctttctgtgt 1980
aaacaatacc tgaaccttta ccctgttgct cggcaaagac caggctctgtg ccaagtgttt 2040
gctcacgcaa cccctactgg ctggggattg gtcattgggac atcagcgcac gcgtggaacc 2100
tttctgtcca gaaaatatac atcgtttcca tggctgctag gctgtgctgc caactggata 2160
ctgagaggca ccagcttcgt gtattatccc agcgcctcga acccttacca tgatccttct 2220
cgaggtagac tgggcctgag cagacctctg ctgagactcc ccttccgacc cacaaccgga 2280
agaacaagcc tgtatgccga tagccctagc gtccccagcc acctccctga tagagtccat 2340
tttgccagcc cactccatgt ggccctggagg cctccctaa 2379

<210> 14
<211> 2820
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼截斷型核心(1-148)與突變型 Y07587 聚合酶之間的融合體之核苷酸序列

<400> 14
atggatatcg atccctacaa ggagttcggg gccaccgtcg aactgctgag cttcctgccc 60
agcgatttct tcccaagcgt acgtgacctt ctagatacag cctcagctct gtatcgggaa 120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
tgctggggag aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agatccaata 240
tccagggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gactaaagtt ccgacaacta 300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaacgc accgatactg 420
agcaccctgc cagaaaccac cgtgccactg agctaccagc actttcgcag gctgttactg 480
ctggatgatg aagctggacc gctggaggag gagctgccac gtctggctga tgagggactg 540
aaccgtcgtg tggctgagga cctgaacctg ggcaacctga acgtgagcat tccttgact 600
cataaggtgg gaaactttac gggactttat tcttctactg tacctgtctt taaccctcat 660
tggaacacac cctcttttcc taatatacat ttacaccaag acattatcaa gaaatgtgaa 720
caatttgtag gaccactcac agtcaatgag aaaagaagac tgcaattgat tatgcctgct 780
agggtttatc caaatgttac caaatatttg ccattggata agggtattaa accttattat 840

ccagaacatc tagttaatca ttacttccaa accagacatt atttacacac tctatggaag	900
gcaggatatat tatataagag agaaacaaca catagtgcct cattttgtgg gtcaccatat	960
tcttgggaac aaaagctaca gcatggagca gaatctttcc accagcaatc ctctgggatt	1020
ctttcccgac caccagttag atccagcctt cagagcaaac accgcaaatc cagattggga	1080
cttcaatccc aacaaggaca cctggccaga cgccaacaag gtaggagctg gagcattcga	1140
gctgggattc accccaccgc acggaggctt tttgggggtg agccctcagg ctcagggcatt	1200
tctacaaacc ttgccagcaa atcagcctcc tgcctctacc aatcgccagt caggaaggca	1260
gcctaccctg ctgtctccac ctttgagaaa cactcactct caggccatgc agtggaaactc	1320
cacaaccttc caccaaactc tgcaagatcc cagagtgaga ggccctgtatt tccctgctgg	1380
tggtctcagt tcaggaacag taaacctgt tccgactact gtctctccca tatcgtcaat	1440
cttctcgagg attggggacc ctgcgctgaa cacggtgagc accatattcg catcccgaga	1500
acgccagcac gcgtgaccgg tggcgtgttc ctgggtggata agaaccacaca taacacggct	1560
gaaagccgtc tggttgttga ctttagccag ttccagccgtg gcaattatcg cgtttagctgg	1620
cctaagtttg cggtgccgaa tctgcagagc ctgacgaatc tgtaagcag caatttaagc	1680
tggttgagct tagacgttag cgcagccttc taccacctgc cactgcaccc agcagcgatg	1740
ccacacctgc tggtagggcag cagcggctctg agccgttacg tggcacgcct gagcagcaac	1800
agccgtatat ttaattatca acatggcacg atgcaaaatt tacatgatag ctgtagccgt	1860
aatctgtacg tgagcctgtt actgtttatat cagacgtttg gtcgcaagct gcattttatac	1920
agccacccga ttattttagg gttccgcaag atcccgatgg gtgttggtct gtctccattc	1980
ctgttagcgc aattcaccag cgcaatctgc agcgttgtgc gcagagcgtt tccgcattgc	2040
ctggcgttta gcggtgcgaa aagcgtgcaa cacctggaaa gcctgttcac ggcagtgcag	2100
aacttcctgc tgagcctggg cattcacctg aaccctaaca aaacaaagag atgggggttac	2160
tctttacatt tcatgggcta tgtcattgga tgttatgggt cattgccaca agatcacatc	2220
atacaaaaga tcaaagaatg ttttcgaaaa ctctctgtta acagacctat tgattggaaa	2280
gtctgtcaac gtattgtggg tcttttgggt tttgctgctc cttttacaca atgtggttat	2340
cctgctttta tgcctttgta tgcattgtatt cagtcgaagc aggcttttac tttctcgcca	2400
acttacaagg cctttctgtg taaacaatac ctgaaccttt accctgttgc tccgcaaaga	2460
ccaggctctgt gccaaagtgtt tgctcacgca acccctactg gctggggatt ggtcatggga	2520
catcagcgca tgcgtggaac ctttctgtcc agaaaatata catcgtttcc atggctgcta	2580

ggctgtgctg ccaactggat actgagaggc accagcttcg tgtattatcc cagcgcctctc 2640
aacccttacc atgatacttc tcgaggtaga ctgggcctga gcagacctct gctgagactc 2700
cccttccgac ccacaaccgg aagaacaagc ctgtatgccg atagccctag cgtccccagc 2760
cacctccctg atagagtcca ttttgccagc ccactccatg tggcctggag gcctccctaa 2820

<210> 15
<211> 3024
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼截斷型核心(1-148)-突變型 Y07587 聚合酶-env1 與 env2
之間的融合體之核苷酸序列

<400> 15
atggatatcg atccctacaa ggagttcggg gccaccgtcg aactgctgag cttcctgccc 60
agcgatttct tcccaagcgt acgtgacctt ctagatacag cctcagctct gtatcgggaa 120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
tgctggggag aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agatccaata 240
tccagggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gactaaagtt ccgacaacta 300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaacgc accgatactg 420
agcaccctgc cagaaaccac cgtgccactg agctaccagc actttcgcag gctgttactg 480
ctggatgatg aagctggacc gctggaggag gagctgccac gtctggctga tgagggactg 540
aaccgtcgtg tggctgagga cctgaacctg ggcaacctga acgtgagcat tccttggaact 600
cataaggtgg gaaactttac gggactttat tcttctactg tacctgtctt taaccctcat 660
tggaacacac cctcttttcc taatatacat ttacaccaag acattatcaa gaaatgtgaa 720
caatttgtag gaccactcac agtcaatgag aaaagaagac tgcaattgat tatgcctgct 780
agggtttatc caaatgttac caaatatttg ccatgggata agggatttaa accttattat 840
ccagaacatc tagttaatca ttacttccaa accagacatt atttacacac tctatggaag 900
gcaggatatat tatataagag agaaacaaca catagtcctt cttttgtgg gtcaccatat 960
tcttgggaac aaaagctaca gcatggagca gaatctttcc accagcaatc ctctgggatt 1020
ctttcccgac caccagttgg atccagccct cagagcaaac accgcaaatc cagattggga 1080
cttcaatccc aacaaggaca cctggccaga cgccaacaag gtaggagctg gagcattcga 1140
gctgggattc accccaccgc acggagggtc tttgggggtg agccctcagg ctcagggcac 1200

tctacaaacc ttgccagcaa atcagcctcc tgcctctacc aatcgccagt caggaaggca	1260
gcctaccctg ctgtctccac ctttgagaaa cactcatcct caggccatgc agtggaaactc	1320
cacaaccttc caccaaactc tgcaagatcc cagagtgaga ggccctgtatt tccctgctgg	1380
tggctccagt tcaggaacag taaacctgt tccgactact gtctctccca tategtcaat	1440
cttctcgagg attggggacc ctgcgctgaa cacggtgagc accatattcg catcccgaga	1500
acgccagcac gcgtgaccgg tggcgtgttc ctgggtggata agaaccacac taacacggct	1560
gaaagccgtc tggttgttga ctttagccag ttacgccgtg gcaattatcg cgtttagctgg	1620
cctaagtttg cggtgccgaa tctgcagagc ctgacgaatc tgttaagcag caatttaagc	1680
tggctgagct tagacgttag cgcagccttc taccacctgc cactgcaccc agcagcgatg	1740
ccacacctgc tgggtgggcag cagcggctctg agccgttacg tggcacgcct gagcagcaac	1800
agccgtatat ttaattatca acatggcacg atgcaaaatt tacatgatag ctgtagccgt	1860
aatctgtacg tgagcctgtt actgtttatat cagacgtttg gtcgcaagct gcattttatac	1920
agccacccga ttatttttagg gticcgcgaag atcccgatgg gtgttggctct gtctccattc	1980
ctgttagcgc aattcaccag cgcaatctgc agcgttgtgc gcagagcggt tccgcattgc	2040
ctggcgttta gcgtcctgca agcaggccttc ttccctgctga cccgtattct gaccattcca	2100
caaagccctgg atagctgggtg gaccagcctg aacttcctgg gtggcaccac ggtttgcctg	2160
ggtcagggtg cgaaaagcgt gcaacacctg gaaagccgtt tcacggcagt gacgaacttc	2220
ctgctgagcc tgggcattca cctgaacctt aacaaaacaa agagatgggg ttactcttta	2280
catttcatgg gctatgtcat tggatgttat gggtcattgc cacaagatca catcatacaa	2340
aagatcaaag aatgttttcg aaaacttcct gttaacagac ctattgattg gaaagtctgt	2400
caacgtattg tgggtctttt gggttttgtc gctcctttta cacaatgtgg ttatcctgct	2460
ttaatgcctt tgtatgcatg tattcagtcg aagcaggctt ttactttctc gccaaacttac	2520
aaggcctttc tgtgtaaaca atacctgaac ctttaccctg ttgctcggca aagaccaggt	2580
ctgtgccaaag tgtttgctca cgcaacctct actggctggg gattggtcac gggacatcag	2640
cgcatgcgtg gaacctttct gtgggcaagc gcacgcctta gctggctgag cctgctgggt	2700
ccgttcgtgc aatggtttgt gggctctgagc ccaaccgtgt ggctgagcgt gtccagaaaa	2760
tatacatcgt ttccatggct gctaggctgt gctgccaaact ggatactgag aggcaccagc	2820
ttcgtgtatt atcccagcgc tctcaacctt taccatgac cttctcgagg tagactgggc	2880
ctgagcagac ctctgctgag actccccttc cgaccacaaa ccggaagaac aagcctgtat	2940

gccgatagcc ctacgctccc cagccacctc cctgatagag tccattttgc cagcccactc 3000
catgtggcct ggaggcctcc ctaa 3024

<210> 16
<211> 3723
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼核心(1-183)IRES 及突變型 Y07587 聚合酶-env1-env2 之間的融合體之核苷酸序列

<400> 16
atggatatcg atccctacaa ggagttcggg gccaccgtcg aactgctgag ctccctgccc 60
agcgatttct tcccaagcgt acgtgacctt ctagatacag cctcagctct gtatcgggaa 120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
tgctggggag aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agatccaata 240
tccagggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gactaaagtt ccgacaacta 300
ttgtgggttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaacgc accgatactg 420
agcaccttgc cagaaaccac cgtgggtgctg cgtcgtgggtc gcagcccacg caggcgtacc 480
ccaagcccac gtcgtcgcag aagccagagc ccacgacgtc gcaggagcca gagccgtgag 540
agccagtgtt aaaagcttga tatcgaattc acgcgtcccc cccctaactg tactggccga 600
agccgcttgg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt tattttccac catattgccg 660
tcttttggca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct tcttgacgag cattcctagg 720
ggcttttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa ggaagcagtt 780
cctctggaag cttcttgaag acaaacaacg tctgtagcga ccctttgcag gcagcggaac 840
ccccacctg gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccac gtgtataaga tacacctgca 900
aaggcggcac aacccagtg ccacgttgtg agttggatag ttgtggaaag agtcaaatgg 960
ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgccc agaaggtagc ccattgtatg 1020
ggatctgata tggggcctcg gtgcacatgc ttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaac 1080
gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataatacc 1140
atgccactga gctaccagca ctttcgcagg ctgttactgc tggatgatga agctggaccg 1200
ctggaggagg agctgccacg tctggctgat gagggactga accgtcgtgt ggctgaggac 1260
ctgaacctgg gcaacctgaa cgtgagcatt ccttggactc ataaggtggg aaactttacg 1320

ggacttttatt cttctactgt acctgtcttt aaccctcatt ggaaaacacc ctcttttcct	1380
aatatacatt tacaccaaga cattatcaag aaatgtgaac aatttgtagg accactcaca	1440
gtcaatgaga aaagaagact gcaattgatt atgcctgcta ggttttatcc aaatgttacc	1500
aaatatttgc cattggataa ggggtattaaa ccttattatc cagaacatct agttaatcat	1560
tacttccaaa ccagacatta ttacacact ctatggaagg caggtatatt atataagaga	1620
gaaacaacac atagtgcctc attttgtggg tcaccatatt ctggggaaca aaagctacag	1680
catggagcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttgga	1740
tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac	1800
ctggccagac gccacaagg taggagctgg agcattcgag ctgggattca cccaccgca	1860
cggaggtctt ttgggggtgga gccctcaggc tcagggcatt ctacaaacct tgccagcaaa	1920
tcagcctcct gcctctacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccctgc tgtctccacc	1980
tttgagaaac actcatcctc aggccatgca gtggaactcc acaaccttc accaaactct	2040
gcaagatccc agagtgaag gcctgtatft ccctgctggg ggctccagtt caggaacagt	2100
aaacctgtt ccgactactg tctctcccat atcgtcaatc ttctcgagga ttggggaccc	2160
tgcgctgaac acggtgagca ccatattcgc atcccagaaa cggcagcacg cgtgaccggt	2220
ggcgtgttcc tgggtgataa gaaccacat aacacggctg aaagccgtct ggttgttgac	2280
tttagccagt tcagccgtgg caattatcgc gttagctggc ctaagtttgc ggtgccgaat	2340
ctgcagagcc tgacgaatct gtttaagcagc aatttaagct ggctgagctt agacgttagc	2400
gcagccttct accacctgcc actgcacca gcagcgatgc cacacctgct ggtgggcagc	2460
agcggcttga gccgttacgt ggcacgcctg agcagcaaca gccgtatatt taattatcaa	2520
catggcacga tgcaaaattt acatgatagc tgtagccgta atctgtacgt gagcctgtta	2580
ctgttatatc agacgtttgg tcgcaagctg catttataca gccacccgat tattttaggg	2640
ttccgcaaga tcccgatggg tgttggctctg tctccattcc tgttagcgca attcaccagc	2700
gcaatctgca gcgttgtgcg cagagcgttt ccgcattgcc tggcgtttag cgtcctgcaa	2760
gcaggcttct tcctgctgac ccgtattctg accattccac aaagcctgga tagctgggtg	2820
accagcctga acttcctggg tggcaccacg gtttgcctgg gtcagggtgc gaaaagcgtg	2880
caacacctgg aaagcctgtt cacggcagtg acgaacttcc tgctgagcct gggcattcac	2940
ctgaacccta acaaaacaaa gagatggggg tactctttac atttcatggg ctatgtcatt	3000
ggatgttatg ggtcattgcc acaagatcac atcatacaaa agatcaaaga atgttttcga	3060

```

aaacttctg ttaacagacc tattgattgg aaagtctgtc aacgtattgt gggctctttg 3120
ggttttgctg ctcccttttac acaatgtggg tctctgtctt taatgccctt gtatgcatgt 3180
attcagtcga agcaggcttt tactttctcg ccaacttaca aggcctttct gtgtaaacia 3240
tacctgaacc ttaccctgtg tgctcggcaa agaccaggctc tgtgccaagt gtttgctcac 3300
gcaacccta ctggctgggg attggctcatg ggacatcagc gcatgcgtgg aacctttctg 3360
tgggcaagcg cacgcttttag ctggctgagc ctgctgggtc cgctcgtgca atggtttgtg 3420
ggctctgagcc caaccgtgtg gctgagcgtg tccagaaaat atacatcgtt tccatggctg 3480
ctaggctgtg ctgccaaactg gatactgaga ggcaccagct tcgtgtatta tcccagcgt 3540
ctcaaccctt accatgatcc ttctcgaggt agactgggcc tgagcagacc tctgctgaga 3600
ctccccctcc gaccacaaac cggaagaaca agcctgtatg ccgatagccc tagcgtcccc 3660
agccacctcc ctgatagagt ccattttgcc agcccactcc atgtggcctg gaggcctccc 3720
taa 3723

```

<210> 17
 <211> 3723
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 編碼突變型 Y07587 聚合酶-env1-env2 IRES 核心(1-183)融合體之核苷酸序列

```

<400> 17
atgccactga gctaccagca ctttcgcagg ctgttactgc tggatgatga agctggaccg 60
ctggaggagg agctgccacg tctggctgat gagggactga accgtcgtgt ggctgaggac 120
ctgaacctgg gcaacctgaa cgtgagcatt ccttggactc ataaggtggg aaactttacg 180
ggactttatt ctctactgt accgtgtctt aaccttcatt ggaaaacacc ctcttttctt 240
aatatacatt tacaccaaga cattatcaag aaatgtgaac aatttgtagg accactcaca 300
gtcaatgaga aaagaagact gcaattgatt atgcctgcta ggttttatcc aaatgttacc 360
aaatatttgc cattggataa gggatattaaa ccttattatc cagaacatct agttaatcat 420
tacttccaaa ccagacatta ttacacact ctatggaagg caggtatatt atataagaga 480
gaaacaacac atagtgcctc attttgtggg tcacatatt cttgggaaca aaagctacag 540
catggagcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttgga 600
tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac 660
ctggccagac gccacaagg taggagctgg agcattcgag ctgggattca cccaccgca 720

```

cggaggtctt ttggggtgga gccctcaggc tcagggcatt ctacaaacct tgccagcaaa	780
tcagcctcct gcctctacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccctgc tgtctccacc	840
tttgagaaac atcatcctc aggccatgca gtggaactcc acaaccttcc accaaactct	900
gcaagatccc agagtgagag gcctgtatit ccttgcctgt ggctccagtt caggaacagt	960
aaacctgtt ccgactactg tctctcccat atcgtcaatc ttctcgagga ttggggaccc	1020
tgcgctgaac acggtgagca ccatattcgc atcccgagaa cgccagcacg cgtgaccggt	1080
ggcgtgttcc tgggtggataa gaaccacat aacacggctg aaagccgtct ggttgttgac	1140
tttagccagt tcagccgtgg caattatcgc gttagctggc ctaagtttgc ggtgccgaat	1200
ctgcagagcc tgacgaatct gttaagcagc aatttaagct ggctgagctt agacgttagc	1260
gcagccttct accacctgcc actgcaccca gcagcgatgc cacacctgct ggtgggcagc	1320
agcggctctga gccgttacgt ggcacgcctg agcagcaaca gccgtatatt taattatcaa	1380
catggcacga tgcaaaatit acatgatagc tgtagccgta atctgtacgt gagcctgtta	1440
ctgttatatc agacgttttg tcgcaagctg catttataca gccacccgat tatttttaggg	1500
ttccgcaaga tcccgatggg tgttggctctg tctccattcc tgttagcgca attcaccagc	1560
gcaatctgca gcgttgtgcg cagagcgitt ccgcattgcc tggcgtttag cgtcctgcaa	1620
gcaggcttct tcctgctgac ccgtattctg accattccac aaagcctgga tagctggtgg	1680
accagcctga acttcctggg tggcaccacg gtttgcctgg gtcagggtgc gaaaagcgtg	1740
caacacctgg aaagcctgtt cacggcagtg acgaacttcc tgctgagcct gggcattcac	1800
ctgaacccta acaaaacaaa gagatggggg tactctttac atttcatggg ctatgtcatt	1860
ggatgttatg ggtcattgcc acaagatcac atcatacaaa agatcaaaga atgttttcga	1920
aaacttcctg ttaacagacc tattgattgg aaagtctgtc aacgtattgt gggctttttg	1980
ggttttgctg ctccittttac acaatgtggg tatcctgctt taatgccttt gtatgcatgt	2040
attcagtcga agcaggcttt tactttctcg ccaacttaca aggcttttct gtgtaaacaa	2100
tacctgaacc ttaccctgt tgctcggcaa agaccaggtc tgtgccaagt gtttgctcac	2160
gcaaccctta ctggctgggg attggatcat ggacatcagc gcatgcgtgg aacctttctg	2220
tgggcaagcg cacgcttttag ctggctgagc ctgctggctc cgttcgtgca atggtttgtg	2280
ggtctgagcc caaccgtgtg gctgagcgtg tccagaaaat atacatcgtt tccatggctg	2340
ctaggctgtg ctgccaactg gatactgaga ggcaccagct tcgtgtatta tcccagcgt	2400
ctcaaccttt accatgatcc ttctcgaggt agactgggcc tgagcagacc tctgctgaga	2460

ctcccccttcc gaccacacaac cggaagaaca agcctgtatg ccgatatgcc tagcgtcccc	2520
agccacctcc ctgatagagt ccattttgcc agcccactcc atgtggcctg gaggcctccc	2580
taaaagcttg atatcgaatt cacgcgtccc cccctaacg ttactggccg aagccgcttg	2640
gaataaggcc ggtgtgctgt tgtctatatg ttattttcca ccatattgcc gtcttttggc	2700
aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggctctttcc	2760
cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa	2820
gttctttgaa gacaaacaac gtctgttagcg accctttgca ggcagcggaa cccccacct	2880
ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca	2940
caacccccagt gccacgttgt gagttggata gttgtggaaa gagtcaaatg gctctcctca	3000
agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtag cccattgtat gggatctgat	3060
ctggggcctc ggtgcacatg ctttacctgt gtttagtcga ggttaaaaaa cgtctaggcc	3120
ccccgaacca cggggacgtg gttttccttt gaaaaacacg atgataatac catggatata	3180
gatccctaca aggagttcgg tggcaccgtc gaactgctga gcttcctgcc cagcgatttc	3240
ttcccaagcg tacgtgacct tctagataca gcctcagctc tgtatcggga agccttagag	3300
tctcctgagc attgttcacc tcaccatact gctctcaggc aagcaattct gtgctgggga	3360
gaactaatga ctctagctac ctgggtgggt ggtaatttgg aagatccaat atccagggac	3420
ctagtagtca gttatgtcaa cactaatatg ggactaaagt tccgacaact attgtggttt	3480
cacatttctt gtctcacttt tggaagagaa acagttatag aatatttggg gtctttcgga	3540
gtgtggattc gcactcctcc agcttataga ccaccaaacg caccgatact gagcacctg	3600
ccagaaacca ccgtggtgcg tcgtcgtggg cgcagcccac gcaggcgtac cccaagccca	3660
cgtcgtcgca gaagccagag cccacgacgt cgcaggagcc agagccgtga gagccagtgc	3720
taa	3723

- <210> 18
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> FLP 肽(核心 18-27)
- <400> 18

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ILC 肽(核心 99-108)

<400> 19

Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLQ 肽(env1)

<400> 20

Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FLG 肽(env1 41-49)

<400> 21

Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GLS 肽(env2)

<400> 22

Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
1 5 10

<210> 23
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SLY 肽(聚合酶 816-824)

<400> 23

Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val
1 5

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VSA 肽(聚合酶)

<400> 24

Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu
1 5 10

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

<220>
<223> N13F 肽(聚合酶)

<400> 25

Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F13L 肽(env)

<400> 26

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu
1 5 10 15

七、申請專利範圍：

1. 一種突變聚合酶多肽，其包含一具有在功能上破壞該聚合酶活性之內部缺失的突變型HBV聚合酶區域，其中該內部缺失係至多30個胺基酸殘基，且包含序列辨識編號：1中所示的胺基酸序列，但至少缺少位置203的酪胺酸殘基、位置204的甲硫胺酸殘基、位置205的天門冬胺酸殘基、位置206的天門冬胺酸殘基、位置207的纈胺酸殘基、位置208的纈胺酸殘基及位置209的白胺酸殘基。
2. 如申請專利範圍第1項之突變聚合酶多肽，其進一步包含一突變型RNaseH區域，該RNaseH區域包含在功能上破壞一原生HBV聚合酶會正常展現的RNaseH活性之一或多個胺基酸殘基的突變體。
3. 如申請專利範圍第2項之突變聚合酶多肽，其中突變型RNaseH區域中所包含的該一或多種突變體係選自由下列所組成之群組：
 - 至少8個胺基酸及至多60個胺基酸之缺失，其至少包括自序列辨識編號：3之約位置39的麩胺酸(E)殘基延伸至約位置46的丙胺酸(A)殘基之一部分；
 - 用天門冬胺酸(D)以外的一胺基酸殘基取代序列辨識編號：3之位置10的天門冬胺酸(D)殘基；
 - 用纈胺酸(V)以外的一胺基酸殘基取代序列辨識編號：3之位置90的纈胺酸(V)殘基；
 - 用蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)以外的一胺基酸殘基取代序列辨識編號：3之位置97的蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)

殘基；

- 用天門冬胺酸(D)以外的一胺基酸殘基取代序列辨識編號：3之位置98的天門冬胺酸(D)殘基；及
- 其任何組合。

4. 如申請專利範圍第3項之突變聚合酶多肽，其中該突變型RNaseH區域包含序列辨識編號：3中所示的胺基酸序列，但(a)缺少自位置31的Xaa殘基延伸至約位置63的白胺酸(L)殘基之具有33個胺基酸之部分，及包含(b)用一個組胺酸(H)殘基取代位置10的天門冬胺酸(D)殘基(D689H)；(c)用一個酪胺酸(Y)殘基取代位置90的纈胺酸(V)殘基(V769Y)；(d)用一個酪胺酸(Y)殘基取代位置97的殘基(T/A776Y)及(e)用一個組胺酸(H)殘基取代位置98的天門冬胺酸(D)殘基(D777H)。
5. 一種融合蛋白，其包含如申請專利範圍第1至4項中任一項之突變聚合酶多肽及一HBV核心多肽。
6. 一種融合蛋白，其包含如申請專利範圍第1至4項中任一項之突變聚合酶多肽與一或多種HBsAg免疫性區域；或者是進一步包含一或多種HBsAg免疫性區域之如申請專利範圍第5項之融合蛋白。
7. 如申請專利範圍第5或6項之融合蛋白，在其N端包含與該突變聚合酶多肽融合之一核心多肽，及一或二個融合而代替突變型聚合酶區域之內部缺失及/或代替突變型RNaseH區域之缺失的HbsAg免疫性區域。
8. 一種核酸分子，其編碼如申請專利範圍第1至4項中任一

項之聚合酶突變體多肽或如申請專利範圍第5至7項中任一項之融合蛋白。

9. 一種載體，其包含如申請專利範圍第8項之核酸分子。
10. 如申請專利範圍第9項之載體，其中該載體係源自人類或黑猩猩之腺病毒之複製缺陷型腺病毒載體。
11. 如申請專利範圍第10項之載體，其中該載體係源自金絲雀痘、禽痘或牛痘病毒之痘病毒載體。
12. 如申請專利範圍第9至11項中任一項之載體，其中該載體係感染性病毒顆粒之形式。
13. 一種用於產生如申請專利範圍第12項之載體之方法，其包括以下步驟：將該病毒載體導入一適宜的細胞株中；在適宜的條件下培養該細胞株，從而容許產生該感染性病毒顆粒；從該細胞株的培養物中回收所產生的感染性病毒顆粒；及選擇性地純化該病毒顆粒。
14. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第8項之核酸分子或如申請專利範圍第9至12項中任一項之載體。
15. 一種用於重組生產如申請專利範圍第1至4項中任一項之突變聚合酶多肽或如申請專利範圍第5至7項中任一項之融合蛋白之方法，其包括以下步驟：將如申請專利範圍第9至12項中任一項之載體導入一適宜的宿主細胞中，而產生經轉染或感染的一宿主細胞；在適合宿主細胞生長的條件下，在試管內培養該經轉染或感染的宿主細胞；回收細胞培養物及選擇性地純化所產生的突變體聚合酶多肽或融合蛋白。

第 101124905 號專利申請案申請專利範圍替換本 修正日期：105.9.10

16. 一種組成物，其至少包括如申請專利範圍第1至4項之突變聚合酶多肽、如申請專利範圍第5至7項中任一項之融合蛋白、如申請專利範圍第8項之核酸分子、如申請專利範圍第9至12項中任一項之載體、如申請專利範圍第14項之宿主細胞或其任何組合。
17. 一種活性劑在製備用於治療或預防HBV感染或與HBV相關聯的疾病與病理性病況之醫藥品的用途，該活性劑係選自於下列所構成之群組：如申請專利範圍第1至4項中任一項之突變聚合酶多肽、如申請專利範圍第5至7項中任一項之融合蛋白、如申請專利範圍第8項之核酸分子、如申請專利範圍第9至12項中任一項之載體、如申請專利範圍第14項之宿主細胞或如申請專利範圍第16項之組成物。
18. 一種活性劑在製備用於在所治療的生物體中引發或刺激一免疫反應之醫藥品的用途，該活性劑係選自於下列所構成之群組：如申請專利範圍第1至4項中任一項之突變體聚合酶多肽、如申請專利範圍第5至7項中任一項之融合蛋白、如申請專利範圍第8項之核酸分子、如申請專利範圍第9至12項中任一項之載體、如申請專利範圍第14項之宿主細胞或如申請專利範圍第16項之組成物。
19. 一種部件套組，其係在一個體中用於治療HBV感染或用於引發一免疫反應，其中該套組係包含選自由以下所組成之群組的多種活性劑：如申請專利範圍第1至4項中任

第 101124905 號專利申請案申請專利範圍替換本 修正日期：105.9.10

一項之突變聚合酶多肽、如申請專利範圍第5至7項中任
一項之融合蛋白、如申請專利範圍第8項之核酸分子、
如申請專利範圍第9至12項中任一項之載體、如申請專
利範圍第14項之宿主細胞或如申請專利範圍第16項之
組成物。