

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/63

C12N 15/33

C12N 15/39 A61K 39/12

A61K 39/285 A61P 37/04

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 92101747.2

[45] 授权公告日 2002 年 9 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1090239C

[22] 申请日 1992. 3. 14

[21] 申请号 92101747.2

[30] 优先权

[32] 1991. 3. 14 [33] GB [31] 9105383.5

[73] 专利权人 剑桥药物研究有限公司

地址 英国剑桥

[72] 发明人 M·E·G·伯瑟尔

S·C·伊格斯 A·J·穆诺

[56] 参考文献

WO90112880 1990. 11. 1 C12N15186

BIOCHEMICAL AND BROPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, V01. 174. 1991. 11. 15 A NAETO et al, "Homologous recombination in bovine papiuomavirus shuttlevector; effect of relative ori

THE EMBO JOURNAL. V01. 7, NO 6 1988. 1. 1 A STOREY et al. ; comparson of the in vitro transforming activities of human-papiuomarirus types"

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 10 页 说明书 30 页 附图页数 33 页

[54] 发明名称 重组病毒载体

[57] 摘要

本发明提供了一种用作免疫治疗剂或疫苗的重组病毒载体。该重组病毒载体包括至少一对异源于病毒的核苷酸序列且含有足以在它们之间产生重组的同源序列。该核苷酸序列对在病毒载体中彼此反向排列。该病毒载体能够感染哺乳动物宿主细胞并在宿主细胞中将异源核苷酸序列表达为多肽。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1.一种制备包含重组病毒载体的药物的方法,该病毒载体具有至少一对彼此具有同源性的核苷酸序列,并且其中每个所说的核苷酸序列都包括启动子和与所述病毒异源的开放读码,该核苷酸序列对编码全部人乳头状瘤病毒(HPV)蛋白或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分;

该方法包括下列步骤(i)使所说的核苷酸对以彼此相反的方向排列在所说的病毒载体中;

其中所说的同源性是足够的以便即使所说的序列没有以彼此相反的方向排列也能彼此间发生重组;并且

其中所说的病毒载体能够感染哺乳动物宿主细胞和在所说的宿主细胞中表达所说的核苷酸序列;和

(ii)将治疗有效量的重组病毒载体与一种或多种药物上可接受的赋形剂组合。

2.根据权利要求1的方法,该方法包括使两个或多个不同对的核苷酸序列融合起来以形成单一的开放读码。

3.根据权利要求1的方法,其中核苷酸序列对编码全部 HPV 野生型蛋白质 HPV 16E7 和 HPV 18E7 或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分。

4.根据权利要求1的方法,其中核苷酸序列对编码全部 HPV 野生型蛋白质 HPV16E6 和 HPV18E6 或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分。

5.根据权利要求3的方法，其中载体包括另外一对核苷酸序列，该核苷酸序列对编码全部 HPV 野生型蛋白质 HPV 16E6 和 HPV 18E6 或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分。

6.根据权利要求5的方法，该方法包括使两个或多个不同对的核苷酸序列融合起来以形成单一的开放读码。

7.根据权利要求6的方法，其中融合是通过编码小的中性氨基酸的单个密码子完成的。

8.根据权利要求7的方法，其中氨基酸是甘氨酸。

9.根据权利要求5的方法，该方法包括使核苷酸序列对按图26所示的任何一种方式排列在病毒载体中。

10.根据权利要求9的方法，其中载体包括：

具有编码得自 HPV16 的部分或全部野生型蛋白 E6 和 E7 的融合遗传序列的第一开放读码；以及

具有编码得自 HPV18 的部分或全部野生型蛋白 E6 和 E7 的融合遗传序列的单独的第二开放读码；

其中第一和第二开放读码以相反方向插入，从而使得：

i) HPV16 和 HPV18 的 E6 编码序列均位于 HPV16 和 HPV18 的 E7 编码序列之间；或

ii) HPV16 和 HPV18 的 E7 编码序列均位于 HPV16 和 HPV18 的 E6 编码序列之间；且

其中任何所说的野生型蛋白均可被与其发生免疫交叉反应的突变蛋白所取代。

11.根据权利要求10的方法，其中第一和第二开放读码各自具有相应的启动子，该方法包括使带有各自启动子的两个开放读码

在病毒中的排列彼此相连。

12.根据权利要求 11 的方法，其中：

i)启动子位于第一和第二开放读码之间，从而使得开放读码向外转录；或

ii)启动子位于第一和第二开放读码之外，从而使得开放读码向内转录。

13.根据权利要求 9 的方法，其中载体包括：

具有编码全部得自 HPV16 的野生型蛋白 E6 和 E7 的融合遗传序列或其抗原部分的第一开放读码；和

具有编码全部得自 HPV18 的野生型蛋白 E6 和 E7 的融合遗传序列或其抗原部分的单独的第二开放读码；

其中 HPV16 和 HPV18 的 E6 编码序列均位于 HPV16 和 HPV18 的 E7 编码序列之间；且

每一开放读码均有其相应的启动子，该启动子位于第一和第二开放读码之间，因此开放读码是向外转录的；且

其中任何所说的野生型蛋白均可被与其发生免疫交叉反应的突变蛋白所取代。

14.根据权利要求 9 的方法，其中所说的核苷酸序列对中的一个或两个核苷酸序列包括不改变转译的氨基酸序列但使得核苷酸序列本身比相应的野生型核苷酸序列同源性少的核苷酸突变。

15.根据权利要求 13 的方法，其中所说的核苷酸序列对中的一个或两个核苷酸序列包括不改变转译的氨基酸序列但使得核苷酸序列本身比相应的野生型核苷酸序列同源性少的核苷酸突变。

16.根据权利要求 14 的方法，其中核苷酸序列的改变并不导致

所编码的氨基酸序列的改变。

17.根据权利要求2的方法，其中核苷酸序列对编码全部野生型蛋白 HPV16E7 和 HPV18E7 的免疫交叉反应性突变体或其抗原部分并且所说的方法包括改变编码相应于野生型蛋白 HPV16E7 的 cys24 和 glu26 残基或相应于野生型蛋白 HPV18E7 的 cys27 和 glu29 残基的氨基酸的核苷酸序列以便编码甘氨酸残基。

18.根据权利要求1的方法，其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS: 7 - 14) 。

19.根据权利要求5的方法，其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS: 7 - 14) 。

20.根据权利要求9的方法，其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS: 7 - 14) 。

21.根据权利要求13的方法，其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS: 7 - 14) 。

22.一种制备包含重组病毒载体的药物的方法，该病毒载体具有至少一对与所述病毒异源的核苷酸序列，其中每个所说的核苷酸序列编码全部人乳头状瘤病毒 (HPV) 蛋白或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分；其中所说的核苷酸序列对编码不同 HPV 毒株的相应抗原；

该方法包括下列步骤：(i)使所说的核苷酸对以彼此相反的方式

向排列在所说的病毒载体中；并且

其中所说的病毒载体能够感染哺乳动物宿主细胞和在所说的宿主细胞中表达所说的核苷酸序列；和

(ii)将治疗有效量的重组病毒载体与一种或多种药物上可接受的赋形剂组合。

23.根据权利要求1的方法，该方法包括将核苷酸序列插入病毒载体的一个或多个中性位点。

24.根据权利要求1 - 23任一项的方法，其中载体是重组牛痘病毒载体。

25.根据权利要求23的方法，其中载体是重组牛痘病毒载体并且其中所说的一个或多个中性位点选自具有与下列序列至少90%序列同源性的位点：

A)具有如下序列的WR株的SalIF17R和SalIF19R之间的缺口：

CTATCTACCAGATTATTATGTGTTATAAGGTACTTTT
TCT (SEQ ID No:03)；

B)具有如下序列的WR株SalIF19R和SalIF20.5R之间的缺口：

TATTGTGCTACTGATTCTTCACAGACTGAAGATTGTT
GAA (SEQ ID No:04)；

C)基本上包括如下序列的WR株的SalIG2R中的区域：

TCTCTTAAAATGGTTGAGACCAAGCTTCGTTGTAGAA
ACA (SEQ ID No:05)；

D)具有如下序列的WR株的HindB3.5R中的区域：

TGAGGCTACCTCGACATACGTGTGCGCTATCAAAGT
GGAA (SEQ ID No:06) .

26. 一种制备包含重组病毒载体的药物的方法，该病毒载体具有至少一对具有大约 57 % 或更大的序列同源性的核苷酸序列，其同源性程度足以使所说的序列能够重组，并且其中每个所说的核苷酸序列包括启动子和与所述病毒异源的开放读码，该核苷酸序列对编码全部人乳头状瘤病毒（HPV）蛋白或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分；

其中所说的病毒载体能够感染哺乳动物宿主细胞和在所说的宿主细胞中表达所说的核苷酸序列；和

27.根据权利要求22的方法,其中核苷酸序列对编码全部 HPV 野生型蛋白质 HPV 16E7 和 HPV 18E7 或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分。

29.根据权利要求 27 的方法,其中载体包括另外一对核苷酸序列,该核苷酸序列对编码全部 HPV 野生型蛋白质 HPV 16E6 和 HPV 18E6 或其免疫交叉反应性突变体或编码其抗原部分。

的核苷酸序列融合起来以形成单一的开放读码。

31.根据权利要求 29 的方法,该方法包括使两个或多个不同对的核苷酸序列融合起来以形成单一的开放读码。

32.根据权利要求 30 的方法,其中融合是通过编码小的中性氨基酸的单个密码子完成的。

33.根据权利要求 32 的方法,其中氨基酸是甘氨酸。

34.根据权利要求 29 的方法,该方法包括使核苷酸序列对按图 26 所示的任何一种方式排列在病毒载体中。

35.根据权利要求 34 的方法,其中载体包括:

具有编码得自 HPV16 的部分或全部野生型蛋白 E6 和 E7 的融合遗传序列的第一开放读码; 以及

具有编码得自 HPV18 的部分或全部野生型蛋白 E6 和 E7 的融合遗传序列的单独的第二开放读码;

其中第一和第二开放读码以相反方向插入,从而使得:

i)HPV16 和 HPV18 的 E6 编码序列均位于 HPV16 和 HPV18 的 E7 编码序列之间; 或

ii)HPV16 和 HPV18 的 E7 编码序列均位于 HPV16 和 HPV18 的 E6 编码序列之间; 且

其中任何所说的野生型蛋白均可被与其发生免疫交叉反应的突变蛋白所取代。

36.根据权利要求 35 的方法,其中第一和第二开放读码各自具有相应的启动子,该方法包括使带有各自启动子的两个开放读码在病毒中的排列彼此相连。

37.根据权利要求 36 的方法,其中:

i)启动子位于第一和第二开放读码之间,从而使得开放读码向外转录;或

ii)启动子位于第一和第二开放读码之外,从而使得开放读码向内转录。

38.根据权利要求34的方法,其中载体包括:

具有编码部分或全部得自HPV16的野生型蛋白E6和E7的融合遗传序列的第一开放读码;和

具有编码部分或全部得自HPV18的野生型蛋白E6和E7的融合遗传序列的单独的第二开放读码;

其中HPV16和HPV18的E6编码序列均位于HPV16和HPV18的E7编码序列之间;且

每一开放读码均有其相应的启动子,该启动子位于第一和第二开放读码之间,因此开放读码是向外转录的;且

其中任何所说的野生型蛋白均可被与其发生免疫交叉反应的突变蛋白所取代。

39.根据权利要求34的方法,其中所说的核苷酸序列对中的一个或两个核苷酸序列包括不改变转译的氨基酸序列但使得核苷酸序列本身比相应的野生型核苷酸序列同源性少的核苷酸突变。

40.根据权利要求38的方法,其中所说的核苷酸序列对中的一个或两个核苷酸序列包括不改变转译的氨基酸序列但使得核苷酸序列本身比相应的野生型核苷酸序列同源性少的核苷酸突变。

41.根据权利要求39的方法,其中核苷酸序列的改变并不导致所编码的氨基酸序列的改变。

42.根据权利要求27的方法,其中核苷酸序列对编码全部野生

型蛋白 HPV16E7 和 HPV18E7 的免疫交叉反应性突变体或其抗原部分并且所说的方法包括改变编码相应于野生型蛋白 HPV16E7 的 cys24 和 glu26 残基或相应于野生型蛋白 HPV18E7 的 cys27 和 glu29 残基的氨基酸的核苷酸序列以便编码甘氨酸残基。

43.根据权利要求 22 的方法,其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS:7-14) 。

44.根据权利要求 29 的方法,其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS:7-14) 。

45.根据权利要求 34 的方法,其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS:7-14) 。

46.根据权利要求 38 的方法,其中所说的异源核苷酸序列可包括图 1(a)和 1(b)所示的部分或全部序列 (SEQ ID NOS:7-14) 。

47.根据权利要求 22 的方法,该方法包括将核苷酸序列插入病毒载体的一个或多个中性位点。

48.根据权利要求 26 - 47 任一项的方法,其中载体是重组牛痘病毒载体。

49.根据权利要求 47 的方法,其中载体是重组牛痘病毒载体并且其中所说的一个或多个中性位点选自具有与下列序列至少 90 % 序列同源性的位点:

A)具有如下序列的 WR 株的 SalIF17R 和 Sal IF19R 之间的缺口:

CTATCTACCAGATTATTATGTGTTATAAGGTACTTTT
TCT (SEQ ID No:03) ;

B)具有如下序列的 WR 株 Sal IF19R 和 Sal IF20.5R 之间的缺

口:

TATTGTGCTACTGATTCTTCACAGACTGAAGATTGTT
GAA (SEQ ID No:04) ;

C)基本上包括如下序列的 WR 株的 Sal IG2R 中的区域:

TCTCTTAAAATGGTTGAGACCAAGCTTCGTTGTAGAA
ACA (SEQ ID No:05) ;

D)具有如下序列的 WR 株的 Hind B3.5R 中的区域:

TGAGGCTACCTCGACATACGTGTGCGCTATCAAAGT
GGAA (SEQ ID No:06) .

50.根据权利要求 1 - 49 任一项的制备药物的方法,其中所说的药物用作抵抗认为是由 HPV 感染引起的病症,例如宫颈癌的免疫治疗剂或疫苗.

重组病毒载体

本发明涉及重组病毒载体，特别是涉及为克服同源核苷酸序列之间重组问题而设计的重组病毒载体。本发明还涉及编码人乳头状瘤病毒蛋白的重组病毒载体；对HPV感染所引起的症状的免疫治疗剂和疫苗；为表达由16型和18型人乳头状瘤病毒编码的抗原而操纵的病毒（例如牛痘苗病毒）的产生以及对宫颈癌的免疫治疗剂和疫苗。

近年来，对宫颈癌与某些类型人乳头状瘤病毒（HPV），特别是16，18，31，33和35型之间的联系已提出强有力的证据（Gissman et al. *Cancer Cells* 5: 275, 1987）这是基于杂交研究，研究结果表明取自宫颈癌的活组织有85—90%以上含有乳头状瘤病毒DNA。HPV 16 DNA是最常见的（见于大约60%的肿瘤），其次常见的是HPV 18（大约20%），其它类型占另外的5—10%。但在许多情况下，取自活组织的肿瘤细胞不含完整的基因组，而是一种缺失的形式。缺失的信息在病毒基因组内的程度和位置是可变的，但一般特征是保留一部分编码E7蛋白的基因组（Schwarz et al., *Nature* 314, 111, 1985）。另外，相邻的E6编码区通常是存在的。E7编码区在肿瘤细胞中的普遍存在表明该基因的蛋白产物可在诱导或维持转化的表型方面起作用。事实上，在由肿瘤活组织所建立的大多数细胞系中能够检测到E7基因的表达（Smolkin & Wettstein, *PNAS* 83, 4680, 1986）。此外，已证明E7基因产物可与成视

网膜细胞瘤 (Rb) 基因产物 (正常人细胞中的一种公认的“抗致癌基因”) 结合 (Munger et al., EMBO J. 8, 4099, 1989)。这印证了 E7 直接参与细胞转化。

E7 和 E6 基因在得自宫颈癌活组织的肿瘤细胞中的存在和表达表明这些蛋白可成为用于肿瘤细胞的免疫识别的潜在靶的可能性。众所周知, 哺乳动物细胞内部所产生的病毒蛋白可通过宿主细胞途径加工成短肽, 然后与宿主主要组织相容性复合物 (MHC) I 类分子形成一种复合物并运送到细胞表面。这些复合物可提供供宿主免疫系统识别的靶。该复合物与胞毒 T 细胞表面上受体分子 (T 细胞受体) 的相互作用会导致 T 细胞的活化以使识别的细胞增殖或破坏。因此, 能够识别表达 HPV E6 和/或 E7 蛋白的细胞的胞毒 T 淋巴细胞 (CTLs) 群体在体内的存在可对机体提供保护以防宫颈肿瘤的发展和增殖。确实已报道了为表达 HPV E7 蛋白而操纵的致癌小鼠细胞一般不能在预先用非致癌 E7 表达细胞免疫过的小鼠中形成肿瘤, 这种排斥作用是由 CD8+ 淋巴细胞 (CTLs) 介导的 (Cher et al., PNAS 88, 110, 1991)。此外, 继肿瘤发生之后这类细胞活性群体的产生会导致肿瘤退化。

有许多关于构建含有并表达外来基因的重组病毒, 例如牛痘苗病毒的报道 (Mackett & Smith, J. gen. Virol., 67, 2067, 1986), 还有几种利用这些重组病毒对所表达的外来抗原产生有效免疫应答的报道。这种为接种而提供抗原的途径的一个突出优点在于它可导致细胞免疫以及体液免疫的发生。这是因为在受感染的个体的细胞内将以与在自然感染过程中出现的相似的方式产生外来蛋白。这意味着它们应通过正确的途径加工以便产生 CTL 应

答。在几种情况下，已直接证实了用重组病毒免疫能够产生外来抗原特异性CTLs形式的细胞免疫应答(Moss & Flexner, Ann. Rev. Immunol., 5, 305, 1987)。此外，已经证实用表达某些肿瘤特异性抗原，例如人骨髓瘤相关抗原P97(Estin et al., PNAS, 85, 1052, 1988)，牛乳头状瘤病毒E7蛋白(Meneguzzi et al., Vaccine, 8, 199, 1990)和人乳腺癌相关抗原ETA(Hareuveni et al., PNAS, 87, 9498, 1990)的重组牛痘病毒接种动物可诱导对肿瘤发生和发展的免疫性。

本申请人已认识到生产可用作对HPV感染所引起的症状，例如宫颈癌的免疫治疗剂或疫苗的重组病毒载体的必要性。关于宫颈癌，在申请人进行本发明时的先有技术公认E7基因具有使细胞不灭的潜力。因此，会认为不宜将E7基因掺加到免疫治疗剂中。然而，本申请人已认识到E7基因包含在免疫治疗剂中的令人惊奇的适用性。本申请人还认识到通过用含有E7基因的免疫治疗剂治疗所获得的有益效果可能远远超过与E7基因的致癌活性相关的任何危险。因此，本发明的一个方面涉及表达E7基因的重组病毒载体作为免疫治疗剂或疫苗的应用。此外，本申请人提供了其发明的实施方案，其中这些危险还可通过基因序列的特异性改变而进一步减小，以便降低E7基因的致癌潜力而又不会损害E7基因激发适当免疫应答的能力。

申请人还认识到一旦可能是由不同的HPV株编码的许多HPV蛋白因与某一特定的HPV相关症状(例如，宫颈癌，HPV16和HPV18；生殖器瘤，尖锐湿疣，呼吸道乳头状瘤病，HPV6和HPV11；免疫抑制的个体中鳞状上皮细胞癌，HPV5和

HPV 8) 相关联而受到影响, 而不是产生众多的为表达每种受影响的蛋白而单独操纵的重组病毒, 它就会有利的产生能够表达不止一种蛋白的部分或全部序列的单个病毒组体。因此, 就宫颈癌而言, 不是产生四种表达每个用于宫颈肿瘤细胞识别的靶而单独操纵的重组病毒, 即 HPV 16 E 6, HPV 16 E 7, HPV 18 E 6 和 HPV 18 E 7 蛋白, 而是它会特别有利于产生能够表达一种以上蛋白, 较好是至少两种蛋白, 最好是所有四种蛋白的部分或全部序列的单个病毒重组体。本申请人能做到这一点是特别惊人的。这是因为, 许多 HPV 蛋白的编码序列是与其它相同的 HPV 蛋白 (例如来自其它病毒株的蛋白) 高度同源的。因此, HPV 16 E 6 和 HPV 18 E 6 蛋白显示出 62% 的总同源性并包括具有极高同源性的区域。同样, HPV 16 E 7 和 HPV 18 E 7 显示出 57% 的总同源性, 并具有同源性极高的特殊区域。这意味着人们可预期造成问题的重组, 例如基因序列的丧失。然而, 本申请人为了减小发生这种重组的可能性和为了在这种重组真的出现时防止其产生有害影响, 构思出一种新的解决方案。因此, 令人惊奇的是, 本发明提供了重组病毒载体, 它包括至少一对具有足够的序列同源性以致于可以预期它们之间的重组的核苷酸序列。该至少一对核苷酸序列可编码部分或全部人乳头状瘤病毒 (HPV) 野生型蛋白或与之具有交叉免疫反应性的突变蛋白。特别是, 本发明提供了一种能够稳定保持和表达四种来自 HPV 16 和 HPV 18 的所需基因序列的部分或全部的重组载体。

因此, 本发明提供了一种用作免疫治疗剂或疫苗的重组病毒载体, 它包括至少一对异源于所述病毒的核苷酸序列, 这对核苷酸序列具有足够的序列同源性以致于可以预期它们之间的重组, 其中这对核苷

酸序列在所说的病毒载体中彼此反向排列以减小导致部分或全部的所述序列丧失的重组可能性并且所说的病毒载体能够感染哺乳动物宿主细胞和在所说的宿主细胞中将异源核苷酸序列表达为多肽。该至少一对核苷酸序列可编码部分或全部人乳头状瘤病毒 (HPV) 野生型蛋白或与之具有交叉免疫反应性的突变蛋白。这对核苷酸序列可编码来自 HPV 16 和 HPV 18 二者的部分或全部 E7 蛋白, 或它们的功能上的等同物。这对核苷酸序列可编码来自 HPV 16 和 HPV 18 二者的部分或全部 E6 蛋白或它们的功能上的等同物。

这种重组病毒载体还可包括另外一对异源于所述病毒的核苷酸序列, 它们具有足够的序列同源性以致于可以预期它们之间的重组, 其中所说的另外一对核苷酸序列在所述的病毒载体中彼此反向排列并且所说的病毒载体能够感染哺乳动物宿主细胞和在所说的宿主细胞中将这另外一对异源核苷酸序列表达为载体。

这另外一对核苷酸序列可编码部分或全部 HPV 野生型蛋白或与之具有交叉免疫反应性的突变蛋白。

例如, 本发明还提供一种重组病毒载体, 它除了 E7 编码序列之外还包括并适合于表达编码来自 HPV 16 和 HPV 18 二者的部分或全部 E6 蛋白或它们的功能上的等同物的遗传序列。该遗传序列可包括如图 1 (a) 和 1 (b) 所示的编码 HPV 16 E6 / E7 和 HPV 18 E6 / E7 的序列。

该遗传序列可编码所述蛋白的抗原部分。

可改变一对核苷酸序列中的任一条或两条核苷酸序列以使之比一对等同的编码野生型 HPV 蛋白的核苷酸序列同源性少。核苷酸序列的改变可以是在具有高度序列同源性的某一区域。最好是核苷酸序列

的改变不会导致所编码的氨基酸序列改变。

可使各自编码各种蛋白的两个或多个核苷酸序列融合起来形成单个的开放读码。因此，可使编码来自HPV16的部分或全部E6和E7蛋白的遗传序列融合起来形成单个的开放读码。可使编码来自HPV18的部分或全部E6和E7蛋白的遗传序列融合起来形成单个的开放读码。可使编码来自HPV16和HPV18二者的部分或全部E6和E7蛋白的遗传序列融合起来形成单个的开放读码。这样，重组病毒载体可具有按照图26所示的任一种方式排列的核苷酸序列对。在重组病毒载体包括一个具有编码来自HPV16的部分或全部E6和E7蛋白的融合遗传序列的开放读码和一个具有编码来自HPV18的部分或全部E6和E7蛋白的融合遗传序列的单独的开放读码时，这两个开放读码可互为反向。例如，这两个开放读码可在重组病毒载体中相邻排列。可这样反向排列，即HPV16和HPV18的E6编码序列都位于HPV16和HPV18的E7编码序列之间。也可这样反向排列，即HPV16和HPV18的E7编码序列都位于HPV16和HPV18的E6编码序列之间。具体地说，各自有各自的启动子的这两个开放读码在重组载体中可彼此相邻排列。这样启动子可位于基因之间，它向外转录，启动子也可位于基因之外，它向内转录。

同样，可使编码来自HPV16的部分或全部E7蛋白和来自HPV18的部分或全部E7蛋白的遗传序列融合起来形成单个开放读码。可使编码得自HPV的部分或全部E6蛋白和来自HPV18的部分或全部E6蛋白的遗传序列融合起来形成单个开放读码。这将导致另一种与图26所示的相似的排列。这些融合可通过编码较小的中性氨基酸，例如甘氨酸的单个密码子来完成。

因此，本发明还提供了一种重组病毒载体，它包括具有编码得自 H P V 1 6 的部分或全部野生型 E 6 和 E 7 蛋白的融合遗传序列的第一开放读码；和具有编码来自 H P V 1 8 的部分或全部野生型 E 6 和 E 7 蛋白的融合遗传序列的单独的第二开放读码；其中第一和第二开放读码可以互为反向排列，从而或者：1) H P V 1 6 和 H P V 1 8 的 E 6 编码序列都位于 H P V 1 6 和 H P V 1 8 的 E 7 编码序列之间；或者：1 1) H P V 1 6 和 H P V 1 8 的 E 7 编码序列都位于 H P V 1 6 和 H P V 1 8 的 E 6 编码序列之间；并且其中所说的野生型蛋白的任一种可被与之具有交叉免疫反应性的突变蛋白所代替。

第一和第二开放读码各自都有相应的启动子并且这两个带有各自启动子的开放读码在病毒中彼此相邻排列。

本发明还提供一种重组病毒载体，其中或者：1) 启动子位于第一和第二读码之间，从而使得开放读码向外进行转录；或者：1 1) 启动子位于第一和第二开放读码之外，从而使得开放读码向内进行转录。

本发明还提供一种重组病毒载体，它包括具有编码来自 H P V 1 6 的部分或全部野生型 E 6 和 E 7 蛋白的融合遗传序列的第一开放读码；和具有编码来自 H P V 1 8 的部分或全部野生型 E 6 和 E 7 蛋白的融合遗传序列的第二开放读码，其中 H P V 1 6 和 H P V 1 8 的 E 6 编码序列都位于 H P V 1 6 和 H P V 1 8 的 E 7 编码序列之间；并且每个开放读码都有一个相应的启动子，该启动子位于第一和第二开放读码之间，从而使得开放读码向外进行转录；其中所说的野生型蛋白的任一种可被与之具有交叉免疫反应性的突变蛋白所代替。

野生型蛋白 H P V 1 6 E 7 和 H P V 1 8 E 7 可用突变蛋白替代。

该突变蛋白与所说的野生型蛋白是基本上同源的，且其中野生型蛋白 H P V 1 6 E 7 的 24 位半胱氨酸残基和 26 位谷氨酸残基及野生型蛋白 H P V 1 8 E 7 的 27 位半胱氨酸残基和 29 位谷氨酸残基均被甘氨酸残基替代。

重组病毒载体可衍生于牛痘苗病毒。

本申请人还认识到对于作为一种免疫治疗剂的有效功能，要求重组病毒应保持其复制能力，以便产生有效的感染，目的是发动对编码病毒的蛋白的细胞免疫应答。因此，本申请人提出应将外来基因序列插入载体病毒的某些位点，由于异源基因序列的插入而对这些位点的破坏基本上不会干扰病毒的功能，因此对与病毒在受感染的宿主动物体内的复制能力有关的任何功能基本上不会有不利的影响。申请人已将这些位点称为“中性位点”（尽管“中性”一词不应被精确地理解为所公认的那样，即这些位点的破坏可能对复制能力具有小的，但相对来说是微不足道的不利影响）。

影响病毒复制的 D N A 序列可分为几种：

- 1) 蛋白编码序列；
- 1 i) 参与基因表达控制的成分；和
- 1 i i) 参与病毒 D N A 复制的成分；

因此，非必需的中性插入位点必须避开这样的区域；而且，已根据核苷酸序列分析的研究鉴定了这样的位点。这样可将遗传序列插入到病毒基因组中性位点中。可将一个或多个遗传序列插入到相同的中性位点中。

中性位点可按照本领域熟知的技术容易地检验。例如，可用标准的方法选择、阻断或删除某一位点并将生成的重组病毒置于在正常情

况下可维持野生型病毒载体生长的条件下，估价操作的效果，在动物模型中进一步比较该病毒的致病性与未修饰的病毒载体株的致病性，以便估价其减毒水平。

在本发明中，病毒载体可以是牛痘苗病毒。可将牛痘苗病毒减毒或失活，以使它不能充分复制和对宿主细胞产生广泛的感染。

过去，牛痘苗病毒已广泛用于接种以预防天花，它的普通使用已完全消灭了这种疾病 (Bhebehani , Microbiol . Rev . 47, 455, 1983)。在世界卫生组织 (WHO) 消灭天花运动期间，将牛痘苗病毒的几个不同毒株用作疫苗。1984年，WHO 主办了一个讨论用牛痘苗病毒作为活病毒载体的会议 (Bulletin of the WHO 63 (3) : 471—477)。在这篇报告中的数据表明对于牛痘苗病毒的 Wyeth 毒株，与接种相关的并发症数目最低，因此按照本发明的实施方案已选择这一毒株作为构建重组病毒的基础。

众所周知，在某些优选的位点，例如胸苷激酶基因座位，将外来 DNA 插入到牛痘苗病毒的基因组中可显著降低病毒在体内的复制能力，如上所述，这里所述的治疗方法的目的是在体内产生有效的感染，以发动对编码病毒的蛋白的细胞免疫应答，本发明提供一种将外来基因插入病毒基因组内的中性位点的方法，由于插入而对这些位点的破坏不会干扰病毒的复制，因此对病毒复制基本上没有不利影响。

当病毒是牛痘苗病毒时，在牛痘苗病毒的 Wyeth 毒株内根据有关的 WR 毒株核苷酸序列可鉴定出中性位点。另外，当使用其它牛痘苗病毒株时，可使用与以上所鉴定的位点相同的位点。中性位点可以是下文中所鉴定的 A，B，C 和 D 中的任一个，或是其功能上的等同物。

为了由重组病毒载体成功地表达外来蛋白，可将外来基因置于可

由病毒操纵的启动子序列控制之下。因此，重组病毒载体可包括单个的启动子，它可控制单个开放读码内全部异源遗传序列的表达。另外，当重组病毒载体编码一个以上含有异源遗传序列的开放读码时，该病毒可包括一个控制第一开放读码的遗传序列表达的第一启动子，和控制一个或多个其它开放读码的遗传序列表达的一个或多个其它启动子。启动子序列可以是病毒特异性的，有几种启动子序列已有过叙述 (Davison & Moss , J . Mol . Biol . , 210, 749, 1989; Davison & Moss , J . Mol . Biol . , 210, 771, 1987)。单个启动子以及第一和一个或多个其它的启动子可以是P 7. 5启动子。已报道了外来抗原特异性CTLs的诱导需要早在病毒复制循环中抗原的表达 (Coupar et al . , Eur. J . Immunol . , 16, 1479, 1986)。因此，如本发明所提供的重组病毒可包括P 7. 5启动子 (Venkatesan et al . , Cell, 125, 805, 1981) 和/或H 6启动子 (Rosel et al . , J. Virol, 60, 436, 1988) 的使用，这两种启动子在感染的早期和晚期都是有效的。

如前所述，已报道了E 7基因本身具有使细胞不灭的潜力 (Phelps et al . , Cell 53, 539, 1988)。在本发明的一个实施方案中，蛋白表达的对策包括E 7作为与E 6的融合蛋白的产生，它不可能保持生物学功能。本发明的实施方案提供了通过在E 7基因内进行已知的改变以破坏它的致癌能力 (Chesters et al , J . Gen . Virol . 71, 449, 1990) 来更进一步减小这种危险的方法。因此，在本发明的重组病毒载体中，可由相同的野生型序列改变编码部分或全部E 7蛋白的遗传序列，以使用于重组

病毒载体的序列比其等同的野生型序列致癌性低。

本发明也提供了包括本文所定义的重组病毒载体的药物。该药物可用于抵抗由HPV感染所引起的症状，它包括免疫治疗有效量的重组病毒载体。该药物可用于抵抗宫颈癌。

该药物可以是一种对由HPV感染所引起的症状有免疫力的疫苗，它包括一定量的本发明所提供的重组病毒载体，当给予接受者时可特异性地使免疫系统的细胞活化以对付HPV蛋白。该疫苗可用于对宫颈癌的免疫。

该药物可包括一种或多种赋形剂。本发明也提供了用本文所定义的重组病毒载体制造用作抵抗认为是由HPV感染引起的症状的免疫治疗剂或疫苗的药物方法。例如预防和治疗宫颈癌。

本发明也提供了用本文所提供的重组病毒载体和药物治疗哺乳动物患者的方法。

本发明也提供了一种确定病毒载体中的中性位点的方法，由于插入异源基因序列而对中性位点的破坏不会干扰病毒的功能，因此对与病毒的复制能力有关的病毒功能基本上没有不利的影响。该方法包括：(a)分析病毒的基因组以通过寻找隔开的起始与终止密码子之预期密码子使用鉴定可能编码功能性基因的开放读码和(b)选择不在这类开放读码内但可能编码如(a)所鉴定的功能性基因的位点这种选择可包括选择在功能性基因序列的开放读码之间的位点和选择在具有某些功能性基因特点，如预期密码子使用，但丧失了其它必要特征如起始密码子的开放读码内的位点。该方法还可包括从病毒的基因组中阻断或删除所选的位点并将产生的病毒置于通常可维持野生型病毒生长的条件下。

本发明也提供了用上述方法鉴定的中性位点。

本发明提供了一个说明通过产生重组牛痘病毒诱导对通常在宫颈肿瘤细胞中表达的乳头状瘤病毒蛋白的细胞免疫应答的实施方案，该重组牛痘病毒在复制循环中已被操纵产生HPV E 6和E 7蛋白，或含有HPV E 6和E 7序列的蛋白。这种治疗用牛痘病毒含有来自HPV 16和HPV 18的E 6和E 7基因，这种病毒最常见的是与宫颈癌相关。因此用这种单个病毒接种可刺激对与80%以上宫颈肿瘤相关的HPV型E 6和E 7蛋白的免疫力。然而在单个病毒中全部四种基因序列（例如，HPV 16 E 6和E 7；HPV 18 E 6和E 7）的表达出现一个问题，因为通过重组可能丧失遗传序列。本发明提供了一种避开这一困难的方法，首先是通过特异性序列改变，目的是减少序列同源性，其次是通过将基因序列插入牛痘病毒基因组，插入的方式应使得一旦发生这样的重组，不会导致序列的丧失（即，彼此反向插入），所需要的四种基因序列在牛痘病毒基因组中的表达也可能难于（尽管不是不可能）以独立的表达单位实现，因此本发明提供了另一种方法，可将E 6和E 7开放读码融合起来。插入外来信息到牛痘病毒基因组中的标准方法存在的问题是用可选择的标记物提高重组的效率会使最终在重组病毒中也存在可选择的标记基因本身。然而，已发展了可随后删除这些外来序列的插入方法（Falkner & Moss J. Virology, 64, 3108, 1990），在本发明的实施方案中使用了这些方法以确保最终的重组牛痘病毒只有那些对其所需功能是必不可少的附加序列。

为了更全面地理解本发明，现参照附图更详细地描述一个实施方案。

图1(a)显示了HPV16 E6/E7聚合酶链反应产物的核苷酸序列和三码转译(下面划线的区域表示E6和E7编码序列);
图1(b)显示了HPV18 E6/E7聚合酶链反应产物的核苷酸序列和三码转译(下面划线的区域表明E6和E7编码序列);

图2显示了HPV16和HPV18 E6和E7基因的克隆和修饰;

图3显示了被四个片段Sa1 F, G, H和I所覆盖的17201—18450位区域中牛痘苗病毒的开放读码图;短垂线表示终止密码子,顶端有方框的线表示起始密码子,长方形表明相应的开放读码,箭头表明上方和下方DNA链的方向;

图4显示了被四个片段Sa1 F, G, H和I所覆盖的21001—22000位区域中牛痘苗病毒的开放读码图;短垂线表示终止密码子,顶端有方框的线表示起始密码子,长方形表明相应的开放读码,箭头表明上方和下方DNA链的方向;

图5显示了被四个片段Sa1 F, G, H和I所覆盖的23501—25000位区域中牛痘苗病毒的开放读码图;短垂线表示终止密码子,顶端有方框的线表示起始密码子,长方形表明相应的开放读码,箭头表明上方和下方DNA链的方向;

图6显示了被四个片段Sa1 F, G, H和I所覆盖的17201—18450位区域中牛痘苗病毒的密码子使用标绘图,箭头表明每个DNA链的方向;

图7显示了被四个片段Sa1 F, G, H和I所覆盖的21001—22000位区域中牛痘苗病毒的密码子使用标绘图,箭头表明每个DNA链的方向;

图8显示了被四个片段S a l F, G, H, I所覆盖的23501—25000位区域中牛痘苗病毒的密码子使用标绘图, 箭头表明每个D N A链的方向;

图9显示了位点A周围的D N A序列, 表明S a l F 17 R和S a l F 19 R基因的单字母氨基酸代码的转译;

图10显示了位点B周围的D N A序列, 表明S a l F 20 R和S a l F 20.5 R基因的单字母氨基酸代码的转译;

图11显示了S a l F 2 R开放读码与酵母鸟苷酸激酶基因序列的比较;

图12显示了位点D周围的D N A序列, 表明H i n d B 3 R和H i n d B 4 R基因的单字母氨基酸代码的转译;

图13显示了牛痘苗病毒(Wyeth毒株)中性位点的克隆;

图14显示了牛痘苗病毒启动子序列的克隆;

图15显示了牛痘苗启动子操纵的E 6—7暗盒的构建;

图16显示了E 6—7暗盒克隆到牛痘苗病毒(Wyeth毒株)中性位点中;

图17是表明产生最终的治疗用牛痘苗病毒—H P V重组病毒所需的重组的图解;

图18显示了用于构建治疗用牛痘苗病毒H P V重组体的合成寡核苷酸;

图19显示了牛痘苗病毒(WR毒株)中四个片段S a l F, G和I所覆盖的17201—18450位区域中的核苷酸序列;

图20显示了牛痘苗病毒(WR毒株)中被四个片段S a l F, G, H和I所覆盖的21001—22000位的区域中的核苷酸序

列;

图21显示了牛痘苗病毒(WR毒株)中被四个片段S a l F, G, H和I所覆盖的23501—25000位区域中的核苷酸序列;

图25显示了重组病毒载体中HPV16E6和E7及HPV18E6和E7的各种排列选择性。

所有克隆方法均按“分子克隆”(“Molecular Cloning”, A Laboratory Manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的方案进行。用于进行定点诱变的所有质粒均为“噬菌体质粒”(Phagemid)型,它们可通过用噬菌体f1进行起数感染而转变为单股DNA。单股DNA的制备和定点诱变按Brierley等人所述的方法进行(Brierley et al., Cell, 57, 537, 1989)。图18提供了所用的全部合成寡核苷酸的序列。

为将其插入牛痘病毒而从HPV 16和HPV 18制备出E 6和E 7基因

HPV 16和HPV 18 E 6和E 7的克隆

利用寡核苷酸S 0 5和S 0 6通过聚合酶链反应(P C R)扩增质粒p B R 3 2 2/HPV 16(Durst et al PNAS, 80, 3812, 1983)可制备出含有HPV 16 E 6/E 7编码区的DNA片段。而按照同样的方法,利用寡核苷酸S 0 1和S 0 2,可从质粒p B R 3 2 2/HPV 18(Boshart et al. EMBO J. 3, 1151)制备出含有HPV 18 E 6/E 7编码区的DNA片段。质粒p B R 3 2 2/HPV 16和p B R 3 2 2/HPV 18均可得自Behringwerke AG, P. O. Box 1140 D-3550, Marburg, Germany(或者根据本发明所提供的序列信息人工合成所需的序列)。

在这两种情况下均产生约800bp的DNA片段,且正好在E 6基因的起点处有一限制酶NcoI的切割位点(C C A T G G),在E 7基因的终止密码子的正下游有一SmaI位点(图1(a)和(b))。然后用NcoI和SmaI消化产物,并克隆至经NcoI-SmaI消化的质粒p U C 1 1 8 N S(经过消化的“噬菌体质粒”p U C 1 1 8(Viera & Messing, Methods Enzymol., 153, 3, 1987),其中NcoI和SmaI位点是在多聚连接子区域内通过定点诱变而产生的)中以产生含有HPV 16序列的质粒p I M S 7以及含有HPV 18序列的p I M S 8(图2)。由于能够进行定点诱变的任何质粒均可被成功地应用于该方法中,所以利用p U C 1 1 8并不是该方法的关键。

E 6和E 7 ORF的融合

为便于插入牛痘病毒, 首先将得自每一HPV型的E 6和E 7基因融合在一起, 形成单一、连续的ORF。这一目的是通过如下的定点诱变达到的:

(i) 利用寡核苷酸S 20将PIMS 7中HPV 16 E 6的终止密码子TAA转变为GGA A序列。其目的是将正常情况下分开的HPV 16 E 6和E 7的ORF转化为单一的ORF (PIMS 7.1—图2)。

(ii) 利用寡核苷酸S 21将PIMS 8中HPV 18 E 6的终止密码子TAA转变为GGA A序列。其目的是将正常情况下分开的HPV 18 E 6和E 7的ORF转化为单一的ORF (PIMS 8.1—图2)。

消除E 7的不灭能力

为了破坏每一E 7蛋白的不灭性质, 通过如下的定点诱变将HPV 16 E 7编码序列内的两个关键密码子(CYS 24和GLU 26—图1(a))以及HPV 18 E 7中的等价密码子(CYS 27和GLU 29—图1(b))转变为甘氨酸残基:

(i) 利用寡核苷酸S 22改变PIMS 7的E 7基因序列, 使在正常情况下分别编码半胱氨酸和谷氨酸的24和26密码子编码甘氨酸 (PIMS 7.2—图2)。

(ii) 利用寡核苷酸S 23改变PIMS 8中的E 7基因序列, 使在正常情况下分别编码半胱氨酸和谷氨酸的27和29密码子编码甘氨酸 (PIMS 8.1B—图2)。

降低HPV 16和HPV 18 E 6和E 7序列的内部重组能力并

消除潜在的牛痘病毒转录终止信号

将HPV 16和HPV 18两种E 6和E 7专一DNA加到单个病毒基因组中的一个潜在困难即两套相关序列的重组可能导致信息的丧失或重排,从而破坏所需蛋白质的表达。本发明提供了减少这一危险的方法。首先是将这两套遗传信息以反方向插入至牛痘基因组中(从而使重组将不会导致序列信息的丧失,而是导致其逆转)。其次是在每一HPV病毒株的E 6/7序列中存在最大同源性的位点产生特定的变化。但是所产生的这些变化并不改变基因编码氨基酸的能力。

因此,可通过如下的定点诱变改变HPV 18 E 6序列:

利用寡核苷酸S 24将序列TTT TTA T TCTAGAA T T AGAG(它从E 6起点(图1(b)划线部分)的210位核苷酸处开始)突变为序列TTTCTACAGTAGAATCAGAG(PIMS 8。2—图2)(所改变的核苷酸以黑体表示)。

进行这一改变的第二个目的是从HPV 18 E 6序列中除去序列TTT TTA T,该序列是早期牛痘病毒转录酶的潜在终止信号(Rohrmann et al., Cell, 46, 1029, 1986)。

牛痘病毒的来源及其繁殖

用牛痘病毒Wyeth毒株构建治疗病毒。为了进行遗传操作而将其在Vero细胞中繁殖,并在人二倍体成纤维细胞系MRC 5中生产最终的治疗病毒原种。这两种细胞系均得自National Institute of Biological Standards and Control, South Mims, U. K. 牛痘病毒Wyeth株、Vero细胞以及MRC 5细胞系也可得自American Type Culture Collection,

12301 . Parklawn Drive, Rockville , Maryland
20852, U S A.

鉴定和克隆来自牛痘病毒的中性位点

中性位点的叙述

为了将乳头状瘤病毒基因插入牛痘病毒基因组, 选择具有两种特性的位点。

首先, 它们应该非必要区, 即将外源基因插入这些位点后对牛痘病毒任何功能的破坏并未超过使病毒不能在组织培养液中生长的程度。

其次, 它们应该是中性位点, 即将外源基因插入这些位点后并不导致牛痘病毒减毒水平的提高或降低。

通过观察牛痘病毒胸苷激酶(TK)基因可看出这两个因素之间的差别。它为一非必要区, 因此, 带有插入在TK基因中的基因的病毒能够在组织培养中良好生长(Mackett et al, J. Virol, 49, 857, 1984)。但是, 已发现这类病毒在体内则大大减毒(Buller et al., Nature 317, 813, 1985)。

为了进行预防接种, 这种减毒的增强可能是需要的。但是, 在所要治疗的疾病的危险明显地超过与疫苗相关的并发症所带来的危险的免疫治疗方法中, 往往并不希望使用减毒病毒, 因为减毒病毒可能会损害对乳头状瘤病毒抗原的免疫应答。因此, 申请人已鉴定出他们认为不会使病毒进一步减毒的位点, 并将其命名为“中性位点”。通过分析WR株的DNA序列而在病毒基因组中鉴定出这些位点。最初是通过在鼠脑中传代Wyeth株而得到WR株。因此, 这两种病毒株是密切相关的。图19、20和21显示了含有所选择的中性位点的

WR基因组的三个区的核苷酸序列。根据以上所讨论的标准已选择出如下的四个中性位点(A—D)：

位点A：SalF17R和SalF19R之间的缺口。

位点B：SalF19R和SalF20.5R之间的缺口。

位点C：在SalG2R中，为潜在的非功能性基因。

位点D：在HindB3.5R中，为潜在的非功能性基因。

可利用如下展开的DNA序列鉴定这些位点(A—D)，所有这些序列的长度均为40个核苷酸：

A CTATCTACCAGATTATTATGTGTTATAAGGTACTTTTTCT
B TATTGTGCTACTGATTCTTCACAGACTGAAGATTGTTGAA
C TCTCTTAAATGGTTGAGACCAAGCTTCGTTGTAGAAACA
D TGAGGCTACCTCGACATACGTGTGCGCTATCAAAGTGGAA

在其它病毒株中这些序列可能有一些变化，但仍与上述序列高度同源。具体地说，位点与上述序列可能至少有90%、最好是95%的同源性。

图3~5显示了起始密码子和开放读码(ORF)在图19、20和21所示的牛痘病毒基因组的区域中的分布。图6~8显示的是同样的区域，它显示了每一读码与所期望的牛痘基因密码子使用图的符合程度。在每一方向为所有三种可能的读码绘制密码子使用图(Staden R., Nucl Acids Res. 12, 521, 1984; Staden, R., Nucl Acids Res. 12, 551, 1984)。在这些密码子使用图中，自横轴延伸的短垂直线代表起始密码子。位

于横轴上方的较长的垂直线代表终止密码子。这种图在帮助测定某一特定ORF是否为真正的牛痘基因方面非常有用。在很可能存在一真正基因时，密码子使用图将在起始密码子与终止密码子之间升高。例如，从图7中可以看出，密码子使用图升高至Sal G2R ORF区之上（虚线说明该读码与大部分预期密码子使用一致）。对于另外两个读码，该图显示它们不与牛痘密码子使用相符。用“gk部分”表示并以破折线标记的峰也与牛痘密码子用法非常一致。总之，真正的基因必须起始于起始密码子，终止于终止密码子，并在其长度上应与牛痘密码子用法一致。在大多数情况下，在该基因之外显著丧失了与牛痘密码子用法的一致性。

下面进一步叙述中性位点。

位点A：SalF17R和SalF19R之间的缺口

位点A已在图3和6中标出。图9显示了实际的DNA序列及该位点任一侧上ORF的翻译产物，从中可以看出位点A位于SalF17R和SalF19R之间的基因间区域内。它被置于SalF19R上游约195碱基处以避开与该基因相关的任何启动子成分，如果SalF17R基因为一早期基因，则序列TTTTTCT（以斜体字表示）将作为该基因的早期RNA转录的终止子。但是，该位点位于它们中第一个的下游，因此当它存在时并不影响转录的早期终止。观察图6可发现，在该点的相反链上不存在可识别的基因，因此，该序列的位置适于作为中性插入位点。

位点B：SalF19R和SalF20.5R之间的缺口

位点B已在图3和6中标出。图10显示了实际的DNA序列及该位点任一侧上ORF的翻译产物。可以看出，位点B位于SalF

19R和SalF20.5R之间的基因间区域内。图6显示它位于具有很高的牛痘密码子使用区域内，但该区域并不形成真正基因（无起始密码子）。另外，图6表明Sal20.5R不是一完整基因，因为在该基因的起点处显著地丧失了与牛痘密码子用法的一致性。在SalF20.5R为一真正基因的情况下，将位点B置于SalF20.5R上游约70碱基处，能够很好地避开与该基因相关的任何启动子成分（注：许多牛痘启动子成分位于该基因起始子上游约35碱基处）。另外，SalF20R无受位点B影响的TTTTTNT（N==任何核苷酸）转录终止信号。因此，该序列位置适于作为中性插入位点。

位点C：SalG2R内的一潜在非功能性基因

位点C已在图4中标出。ORF SalG2R与酵母鸟苷酸激酶（GK）基因具有显著的相似性。这一相似性示于图11中。已将SalG2R ORF上游的序列（但在不同的读码中）加至SalG2R中以观察它与GK的配对是否延伸到原始开放读码边界之外。配对似乎延伸到SalG2R ORF的5'末端之外。尤其是，酵母GK基因中一个重要的位点，即ATP/GTP结合位点（划线表示）仅在SalG2R ORF上游的读码序列中配对。因此，SalG2R基因很可能不是一种具有活性的鸟苷酸激酶，并可被称作“假基因”。如果该基因正如申请人所推测的那样不具有活性，那么它可被用作中性插入位点。

位点D：位于Hind B3.5R内的一潜在非功能性基因

图5显示位点D位于被称作Hind B3.5R的区域内。尽管该区域与牛痘密码子的用法一致，但由于缺少起始密码子，因此它并不

是一真正基因。图 8 所示的密码子用法图说明它可能曾经是一功能性基因，并很可能与 HindB 3 R 相连（在这里密码子用法发生了远离 HindB 3 R O R F 终止密码子的移动，这表明 HindB 3 R 的最后部分严格地讲不是该基因的一部分）。因此，HindB 3. 5 R 很可能不是一活性基因，可用作中性插入位点。图 1 2 显示了实际的 DNA 序列以及该位点任一侧上的 O R F 的翻译产物。从中可以看出，位点 D 位于 HindB 3 R 和 HindB 4 R 之间的基因间区域内，并且也位于非功能性的 Hind B 3. 5 R 内。

制备用于克隆中性位点的载体

为了将外源遗传信息插入如上所述的中性位点，必须首先将中性位点的 DNA 拷贝以及得自牛痘基因组的适当数量的侧翼 DNA（每侧约 500 个碱基）克隆至质粒载体中。然后利用这些质粒将外源 DNA 引入牛痘病毒基因组中；插入基因周围的牛痘病毒“侧翼序列”的作用是在质粒 DNA 和病毒 DNA 之间产生同源重组，从而将外源基因插入到所需的位置上。

克隆中性位点序列

按如下方法构建含有中性位点的侧翼区的质粒。按照 Esposito 等人的方法（J. Virol Meth, 2, 175, 1981）由牛痘病毒 Wyeth 株制备出 DNA，利用聚合酶链反应（PCR）从牛痘病毒 Wyeth 株的 DNA 中取出约 1000 碱基对的片段。在所选择的中性位点的任一侧选择约 500 bp 的寡核苷酸对，这些寡核苷酸是根据 WR 株的序列在 WR 株中与 Copenhagen 株（Goebel et al., Virology 179; 247, 1990）有着相同序列的区域内选择的。该寡核苷酸中整合了限制酶识别序列，从而能够被很容

易地克隆至质粒中。对于中性位点 A、B 和 D，限制性酶切位点为 E C O R I 和 H i n d Ⅲ。对于中性位点 C，由于在所选择的侧翼序列中有一个内部 H i n d Ⅲ 位点，所以用 S p h Ⅰ 位点代替了 H i n d Ⅲ 位点。

下面列出了用于 P C R 的寡核苷酸：

位点 A 左 M B 1 6

位点 A 右 M B 1 7

位点 B 左 M B 2 4

位点 B 右 M B 2 5

位点 C 左 M B 1 8

位点 C 右 M B 1 9

位点 D 左 M B 2 2

位点 D 右 M B 2 3

然后利用这些寡核苷酸对，通过 P C R 扩增制备出约 1 k b 的 D N A 片段，经用 E C O R I 和 H i n d Ⅲ（对位点 A、B 和 D）消化或用 E C O R I 和 S p h Ⅰ（对位点 C）消化并克隆至经 H i n d Ⅲ 和 E C O R I 消化的 p U C 1 1 8（图 1 3）中就产生了质粒 p I M M C 7 a、p I M M C 7 b、p I M M C 7 c 和 p I M M C 7 d。

为在中性位点进行插入而产生特定的限制性酶切位点

在每一质粒中所选定的位置加进合适的限制性酶切位点。这一目的是利用含有所需的新的特定定位点及通过 1 5 碱基序列与任一侧侧连的寡核苷酸（见下）通过定点诱变达到的。以此方式修饰的质粒称为 p I M M C 8 a - d（图 1 3）。

原始质粒

加进了寡核苷酸位点的新质粒

pIMMC7a	MB35SnaB1 pIMMC8a
pIMMC7b	MB36Hpa1 pIMMCb
pIMMC7c	MB37Stu1 pIMMC8c
pIMMC7d	MB38SnaB1 pIMMC8d

牛痘病毒早期/晚期启动子序列的克隆

按照下面所述的方法通过PCR扩增,由牛痘病毒基因组DNA制备出P7.5和H6启动子。

人工合成含有如下的限制酶切割位点的一对互补寡核苷酸(S7和S8): Hind III、SnaB1、Hpa1、Hind III、Sal I、Nco1、Sma1、SnaB1和EcoRI,从而使退火后在该寡核苷酸对的一端出现Hind III相容性的悬垂端,在另一端出现EcoRI相容性的悬垂端。使这两种寡核苷酸退火并插入到经EcoRI和Hind III切割的 ϕ UC118(图14)中。所产生的载体称为 ϕ IMMC3。

利用寡核苷酸MB15(上游退火并包括了5'-Sal I位点)和MB7(下游退火并包括了5'-Hind III位点)通过PCR扩增从牛痘病毒WR株中取出含有H6启动子的约180bp的DNA分子。将该分子克隆至经Hind III和Sal I切割的 ϕ IMMC3中以产生 ϕ IMMC4a(图14)。然后利用寡核苷酸MB32(上游退火并包括5'-Sal I位点)和MB33(下游退火并包

括5' Nco I位点)通过PCR扩增从牛痘病毒WR株中取出含有P7.5启动子的约200bp的DNA分子,将该分子克隆至经Nco I和Sal I切割的pIMMC3中,产生出pIMMC14b。

构建治疗病毒

根据如上所述的成分产生含有和表达来自HPV16和HPV18的E6-E7蛋白的重组牛痘病毒所需的方法涉及如下所述的5个主要步骤:

i) 将经过修饰的E6-7基因克隆至牛痘早期启动子序列的下游

通过Hind III和Sma I消化从pIMS7.2切下含有经过修饰的HPV16E6-7序列的DNA片段,并克隆至经Hind III和Hpa I消化的pIMMC4a中,产生出pIMS12(图15)。

通过用Nco I和Sma I消化从pIMS8.2中切割出含有经过修饰的HPV18E6-7序列的DNA片段,并克隆至经Nco I和Sma I消化的pIMMC14b中,产生出pIMS14(图15)。

ii) 制备含有HPV16和HPV18E6-7序列及其上游牛痘启动子的质粒载体

用Sal I和Sma I从pIMS14切下含有HPV18E6-7以及上游P7.5启动子的DNA片段,并将其插入至经Sal I和Sma I消化的pIMS12中以产生pIMS15(图15)。

iii) 将HPVE6-7/启动子“二元弹”插入至含有中性位点的质粒

利用 SnaBI 从 pIMS15 切下含有 HPV16 和 HPV18 E6-7 编码区及其上游启动子成分的 DNA 片段, 并将其插入至适当切割的含有中性位点的质粒 pIMMC7a-d 中。图 16 显示了这一步骤, 且将所产生的质粒称为 pIMMC9a-d。

iv) 通过同源重组将中性位点 DNA 及介入的 HPV 序列加进牛痘病毒基因组中以产生表达两种修饰 HPV E6-7 序列的重组病毒

纯化重组质粒 pIMMC9a-d, 并按照常规方法 (Mackett et al., in D. M. Glover (ed) DNA Cloning, a Practical Approach, Oxford and Washington DC IRL Press, 1985) 将其重组至牛痘中 (图 17)。

利用放射性标记的 HPV 特异性序列作为探针鉴定已获得了 HPV 序列的病毒。将病毒噬斑留在硝酸纤维素上 (Villareal and Berg, Science 196, 183, 1977), 并用来自含有 HPV18 E6-7 基因的 pIMS14 的放射性标记 NcoI - SmaI 片段进行探测。然后从琼脂糖涂层上分离重组病毒, 并纯化噬斑三次。利用得自 HPV E6 和 E7 基因的 DNA 探针通过对纯化的病毒 DNA 进行 Southern 吸印而检测出合适的 DNA 序列, 并利用对 HPV E6 和 E7 蛋白特异性的抗血清通过 Western 吸印而检测合适序列的表达。

在 MRC5 细胞中克隆治疗病毒

通过在 Vero 细胞中培养制备出最终重组病毒的原种, 并用它感染 MRC5 细胞, 该细胞被认为是适用于制备适用作人疫苗的材料。利用常规方法对该病毒进行噬斑纯化三次, 并最终制备出用于临床的

原种。

证实正确的 H P V D N A 插入子的存在

对该原种病毒样品再次进行检测,以证实具有正确构型的病毒 D N A 的存在以及正确的病毒蛋白的表达。图 2 2 显示了对重组牛痘病毒 (V 9 a . 1) 所进行的 P C R 分析,其中 H P V D N A 盒插入在位点 A。(a) 组所示的图形说明了所预期的 D N A 片段中是否已插入了正确的 D N A。从 (b) 组可以看出,所产生的 P C R 产物的实际图形与所预期的一致。

证实 H P V D N A 插入子的表达

然后对重组病毒进行检测,以证实预期 H P V 蛋白的表达。图 2 3 显示了这一分析的一个实例。用重组病毒 V 9 a . 1 (在位点 A 插入的 H P V D N A) 感染 V e r o 细胞,并利用对 H P V 1 6 E 7 蛋白 (C a m v i r 3) 和对 H P V 1 8 E 7 蛋白 (7 E 1 0) 特异性的单克隆抗体通过 W e s t e r n 吸印检测细胞,以证实 H P V E 6 7 融合蛋白的存在。可以看出,这两种单克隆抗体均能够特异性地识别被重组病毒 V 9 a . 1 感染的细胞中具有预期大小的蛋白质,而不能识别被对照亲代病毒 W y e t h 菌株感染的细胞中的蛋白质。这些被识别的蛋白质与通过编码预期的 H P V 融合蛋白 (H P V 1 6 E 6 7 和 H P V 1 8 E 6 7) 的 m R N A 的体外转译合成的蛋白质一起共同迁移。这一实验说明了来自重组病毒的异源基因序列的成功表达。

H P V D N A 插入子的稳定性

对于临床应用的重组病毒,很重要的一点就是在经过多次病毒传代后插入序列仍具有遗传稳定性,并精心设计 D N A 插入子以促进这种遗传稳定性。为了证实重组病毒基因组中 H P V 信息的稳定性,将

病毒在Vero细胞中连续传代9次(感染复数=10 pfu/细胞)。然后挑出20个噬斑分离物,按图2.2所述的PCR分析法对正确的HPV DNA插入子的存在进行分析。图2.4显示了得自重组病毒A的数据。所有20个病毒分离物均保留了在预期的遗传排列中的HPV信息,这说明它具有很高程度的遗传稳定性。

动物实验

将重组病毒的毒力与亲代Wyeth株的毒力在动物实验中进行比较。对每组20只小鼠中的每一只鼻内接种总体积为20 μ l的 10^7 pfu Wyeth株或重组病毒。于接种后第1、3和5天各处死两只小鼠,并解剖取出其肺。然后通过研磨组织并通过标准的牛痘病毒噬斑检测法检测匀浆而测定出肺内存在的病毒量。下表显示了对重组病毒v9a.1(在位点A插入的HPV信息)进行这一实验的结果。从中可以看出,重组病毒保留了在小鼠中复制的能力,且在感染动物肺中所产生的病毒水平与在亲代Wyeth株中所观察到的水平相似。

表

	病毒滴度($\log_{10}$ P f u)			
	实验 1		实验 2	
	Wyeth	v9a.1	Wyeth	v9a.1
1 天	4.02	4.65	4.11	2.93
3 天	5.44	4.46	4.86	3.20
5 天	4.20	3.76	3.93	3.26

治疗应用

通过感染 MRC 5 细胞制备出重组病毒的原种，并将其调至不小于 10^8 pfu/ml 的浓度。将 $20\mu l$ 该材料施用于患者臂上，然后按照为预防天花而种入牛痘疫苗所用的标准方法，用分叉针头划破患者的臂滴入病毒。

说明书附图

图1 (a)

ATCCCATGGACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGT 60
 I P W T K R E L Q C F R T H R S D P E S
 S H G P K E N C N V S G P T G A T Q K V
 P M D Q K R T A M F O D P O E R P R K L
 ^ E6编码区的起始子

TACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATACATGATATAATATTAGAATGTGTGT 120
 Y H S Y A Q S C K Q L Y M I * Y * N V C
 T T V M H R A A N N Y T * Y N I R M C V
 P O L C T E L O T T I H D I I L E C V Y

ACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCA 180
 T A S N S Y C D V R Y M T L L F G I Y A
 L Q A T V T A T * G I * L C F S G F M H
 C K O Q L L R R E V Y D F A F R D L C I

TAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTA 240
 * Y I E M G I H M L Y V I N V * S F I L
 S I * R W E S I C C M * * M F K V L F *
 V Y R D G N P Y A V C D K C L K F Y S K

AAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAAT 300
 K L V S I D I I V I V C M E Q H * N S N
 N * * V * T L L L * F V W N N I R T A I
 I S E Y R H Y C Y S L Y G T T L E O O Y

ACAACAAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAGCCACTGTGTGTC 360
 T T N R C V I C * L G V L T V K S H C V
 Q Q T V V * F V N * V Y * L S K A T V S
 N K P L C D L L I R C I N C O K P L C P

CTGAAGAAAAGCAAAAGACATCTGGACAAAAGCAAGATTCCATAATATAAGGGGTGCGT 420
 L K K S K D I W T K S K D S I I * G V G
 * R K A K T S G Q K A K I P * Y K G S V
 E E K O R H L D K K O R F H N I R G R W

GGACCGGTGATGTATGTCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGT 480
 G P V D V C L V A D H Q E H V E K P S C
 D R S M Y V L L Q I I K N T * R N P A V
 T G R C M S C C R S S R T R R E T O L *

AATCATGTCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGAC 540
 N H A W R Y T Y I A * I Y V R F A T R D
 I M H G D T P T L H E Y M L D L O P E T
 S C M E I H L H C M N I C * I C N Q R Q
 ^ E7 编码区的起始子

AACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGA 600
 N * S L L L * A I K * Q L R G G G * N R
 T D L Y C Y E O L N D S S E E E D E T D
 L I S T V M S N * M T A Q R R R M K * M

TGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGTG 660
 W S S W T S R T G Q S P L Q Y C N L L L
 G P A G O A E P D R A H Y N I V T F C C
 V Q L D K Q N R T E P I T I L * P F V A

图1 (Q) (续)

CAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACGCTAGACATTTCGTACTTT
Q V * L Y A S V V R T K H . T R R H S Y F
K C D S T L R L C V O S T H V D I R T L
S V . T L R F G C A Y K A H T * T F V L W

720

GGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATA
G R P V N G H T R N C V P H L F S E T I
E D L L M G T L G I V C P I C S O K P *
K T C * W A H * E L C A P S V L R N H N

780

ACCCGGGTGA

T R V

P G *

P G

840

图1(b)

ATCCCATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCTAGAAGCTACCTGATCTGTGCA 60
 I P W R A L R I Q H G D P T S Y L I C A
 S H G A L * G S N T A T L Q A T * S V H
 P M A R F E D P T R R P Y K L P D L C T
 ^E6 编码区的起始子

CGGAACCTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTAT 120
 R N * T L H C K T * K * P V Y I A R Q Y
 G T E H F T A R H R N N L C I L Q D S I
 E L N T S L O D I E I T C V Y C K T V L

TGGAACCTTACAGAGGTATTGAATTGCAATTAAAGATTATTTGTGGTGTATAGAGACA 180
 W N L Q R Y L N L H L K I Y L W C I E T
 G T I R G I * I C I * R F I C G V * R Q
 E L T E V F E F A F K D L F V V Y R D S

GTATACCCCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAA 240
 V Y P M L H A I N V * I F I L E L E N *
 Y T P C C M P * M Y R F L F * N * R I K
 I P H A A C H K C I D F Y S R I R E L R

GACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAACTGGGTTAT 300
 D I I Q T L C M E T H W K N * L T L G Y
 T L F R L C V W R H I G K T N * H W V I
 H Y S D S V Y G D T L E K L T N T G L Y

ACAATTTATTAATAAGGTGCGTGCCTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTA 360
 T I Y * * G A C G A R N R * I Q Q K N L
 Q F I N K V P A V P E T V E S S R K T *
 N L L I R C L R C O K P L N P A E K L R

GACACCTTAATGAAAAACGACGATTTCACAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCC 420
 D T L M K N D D F T T * L G T I E A S A
 T P * * K T T I S Q H S W A L * R P V P
 H L N E K R R F H N I A G H Y R G O C H

ATTCGTGCTGCAACCGAGCAGCAGGAACGACTCCAACGACGAGAGAAACACAAGTAT 480
 I R A A T E H D R N D S N D A E K H K Y
 F V L Q P S T T G T T P T T Q R N T S I
 S C C N R A R O E R L O R R R E T O V *

AATATTAAGTATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTAGAGCC 540
 N I K Y A W T * G N I A R H C I A F R A
 I L S M H G P K A T L O D I V L H L E P
 Y * V C M D L R Q H C K T L Y C I * S P
 ^E7 编码区的起始子

CCAAAATGAAATTCCGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGA 600
 P K * N S G * P S M S R A I K R L R G R
 O N E I P V D L L C H E O L S D S E E E
 K M K F R L T F Y V T S N * A T Q R K K

AAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCCGACGAGCCGAACCACA 660
 K R * N R W S * S S T F T S P T S R T T
 N D E I D G V N H O H L P A R R A E P Q
 T M K * M E L I I N I Y Q P D E P N H N

图1(b)(续)

ACGTCACACAATGTTGTGTATGTGTTGTAAGTGTGAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGA
T S H N V V Y V L * V * S Q N * A S S R
R H T M L C M C C K C E A R I E L V V E
V T Q C C V C V V S V K P E L S * * * K

720

AAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCTGTCCTTTGT
K L S R R P S S I P A A V S E H P V L C
S S A D D L R A F O O L F L N T L S F V
A Q Q T T F E H S S S C F * T P C P L C

780

GTGTCCGTGGTGTGCATCCCAGCAGTAACCCGGGTGA
V S V V C I P A V T R V
C P W C A S O O * P G *
V R G V H P S S N P G

840

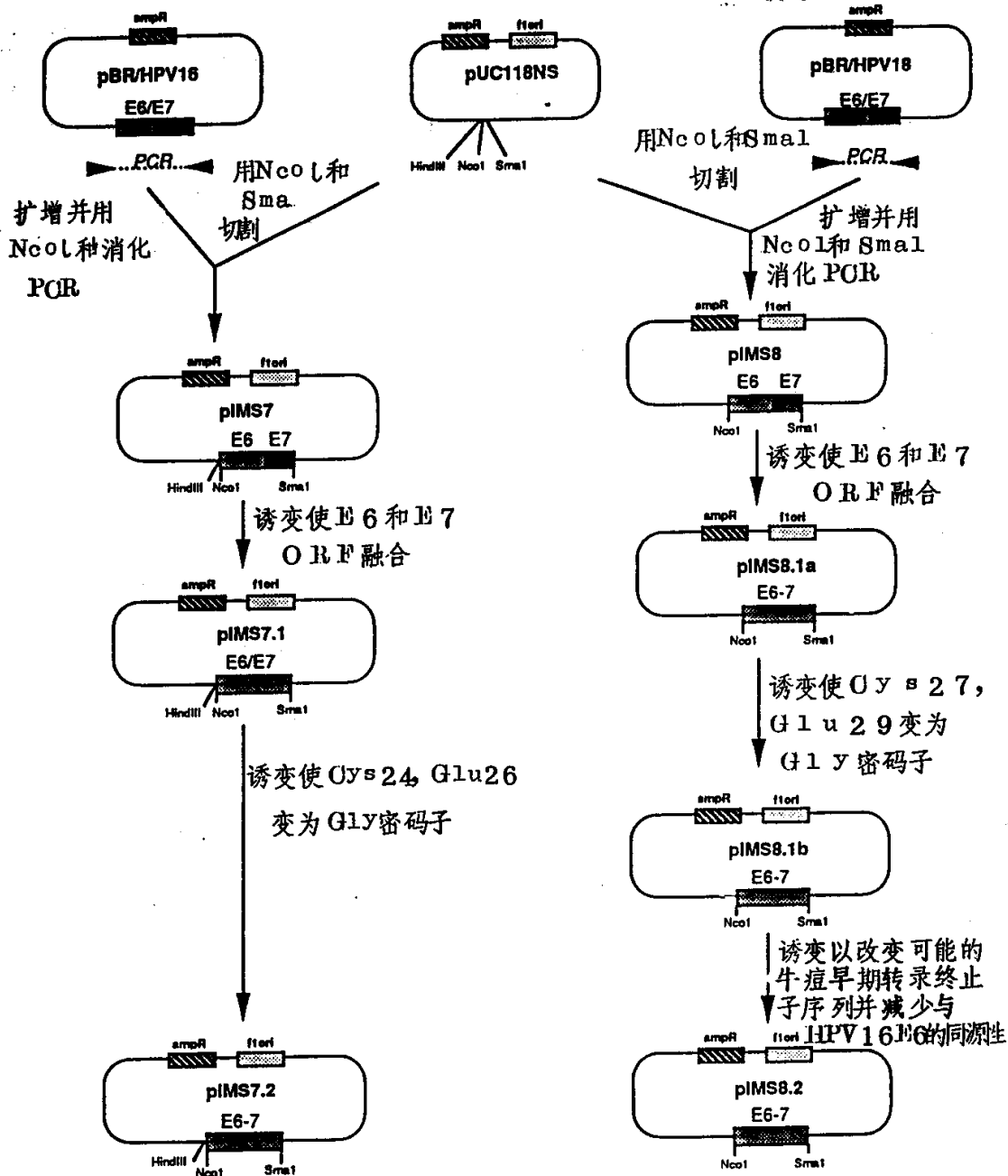


图 2

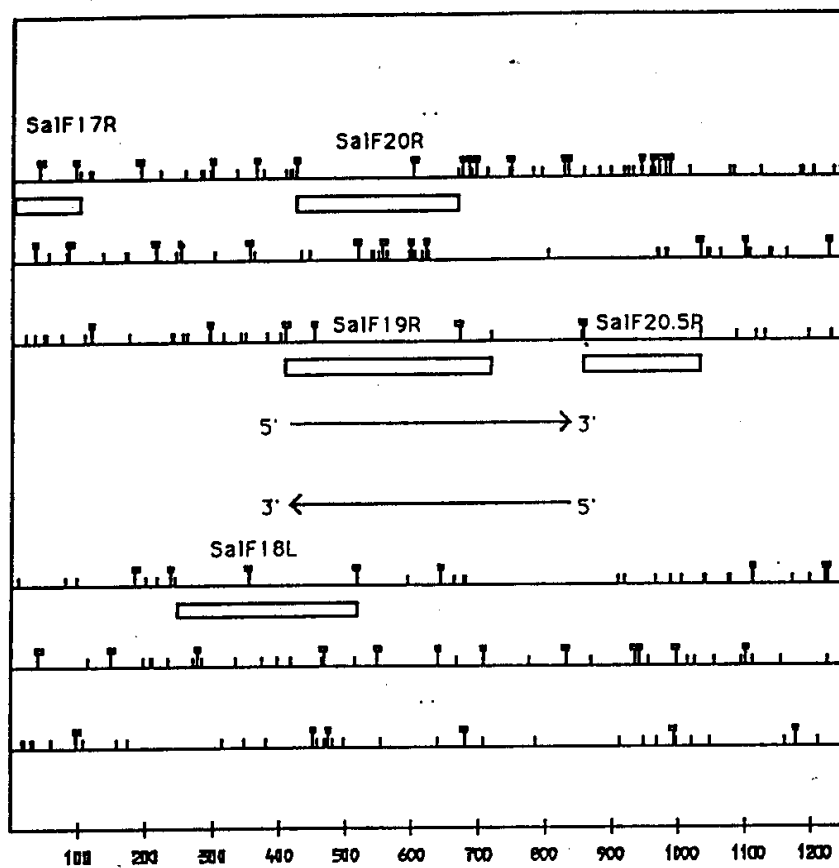


图 3

位点A

位点B

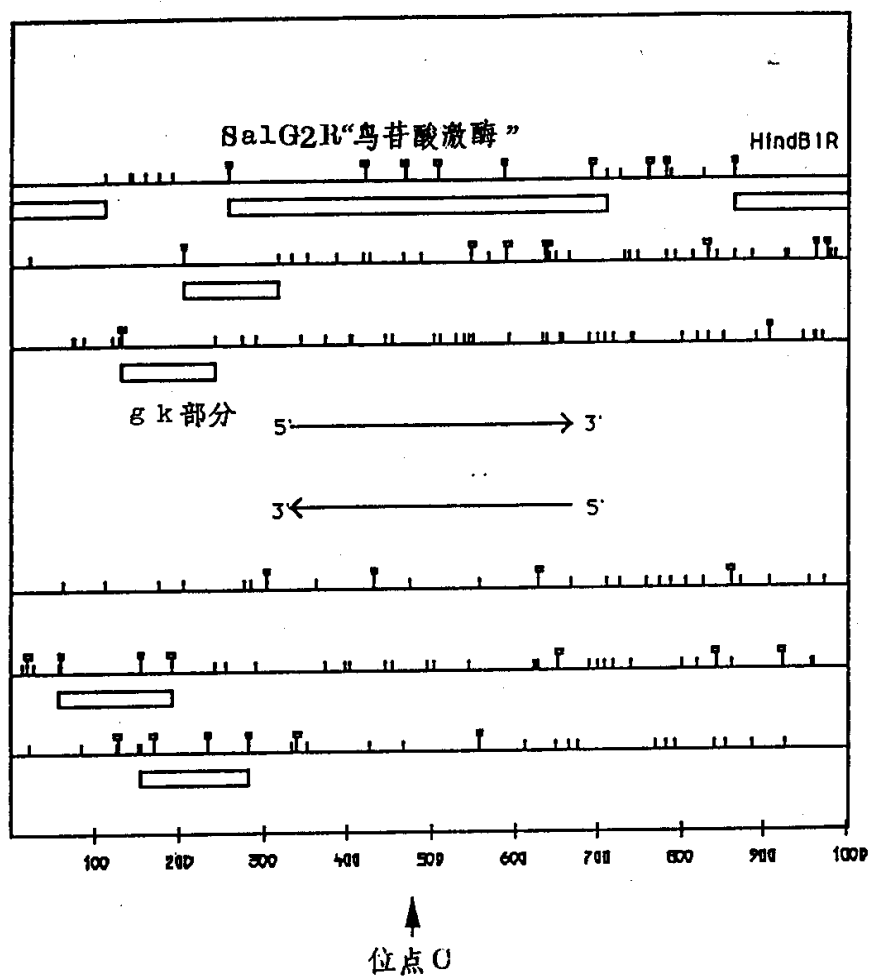


图 4

VVGLS 23501-25000 开放读码标绘图

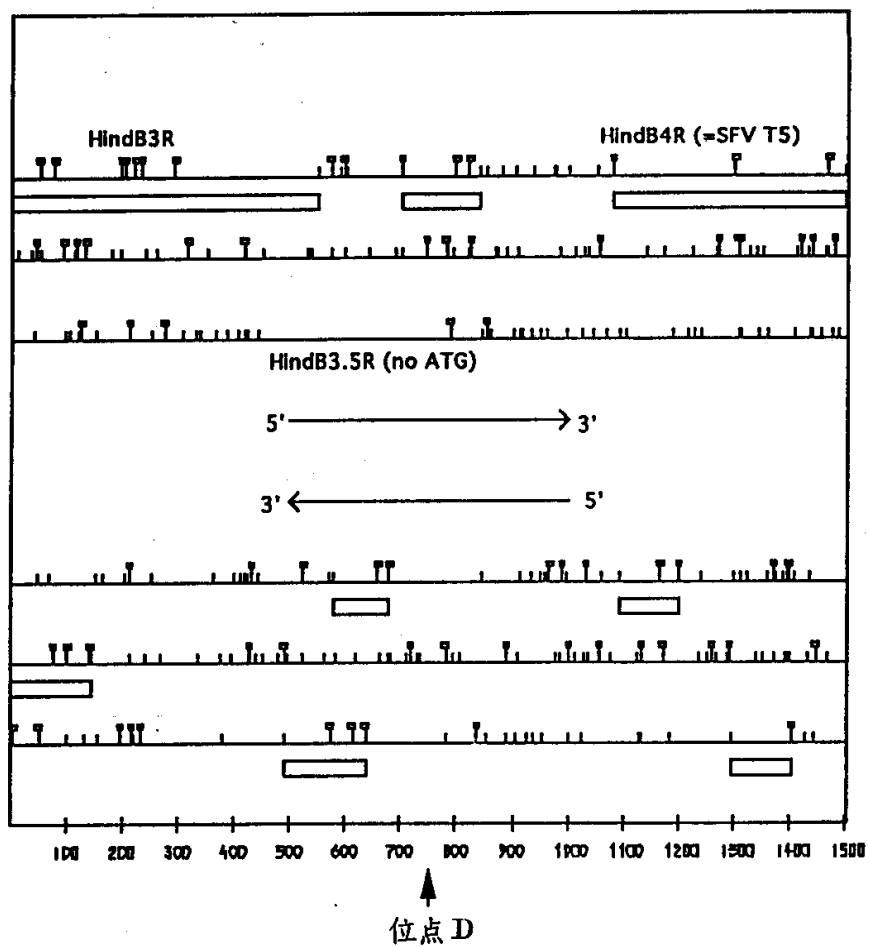


图 5

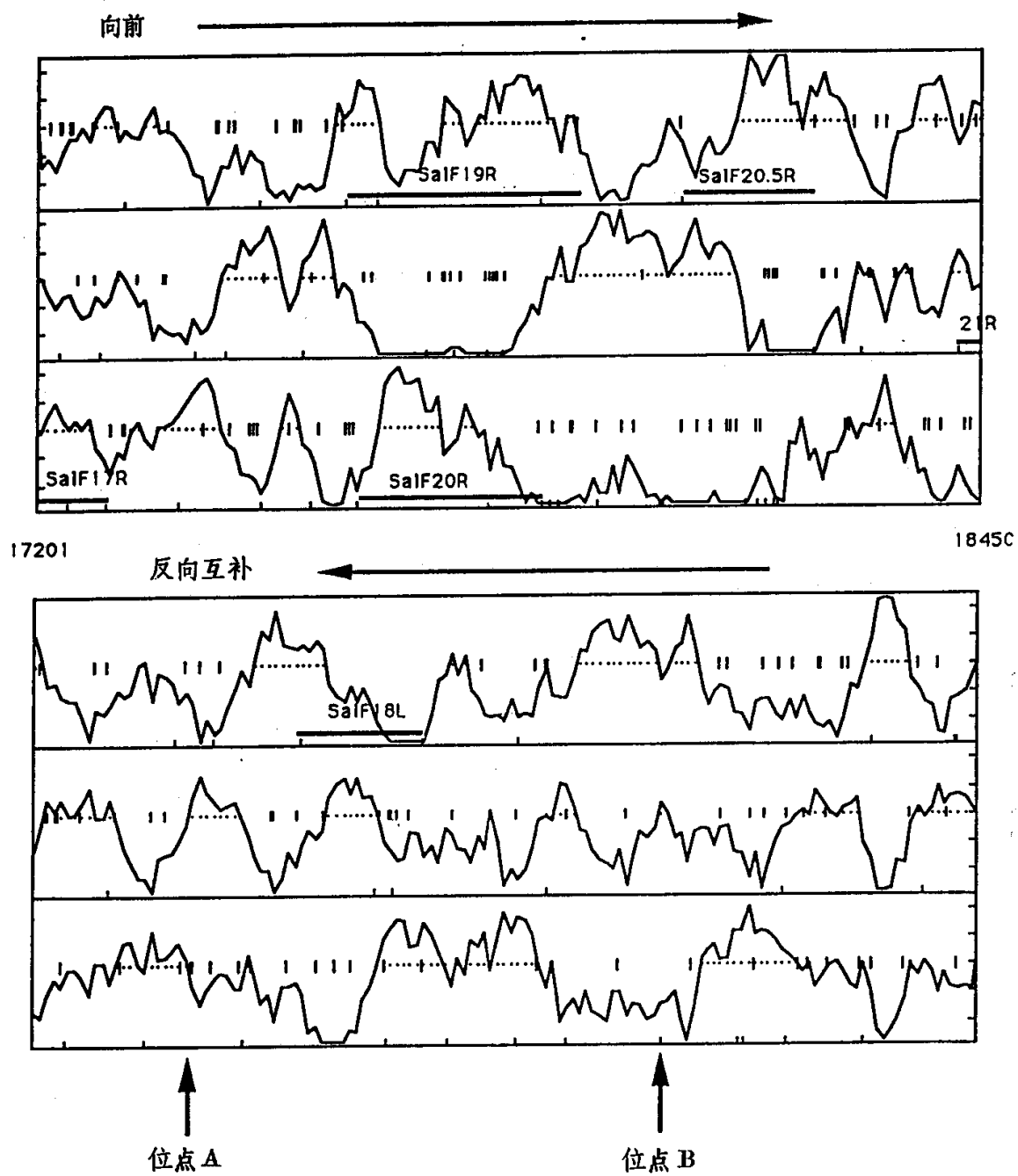


图 6

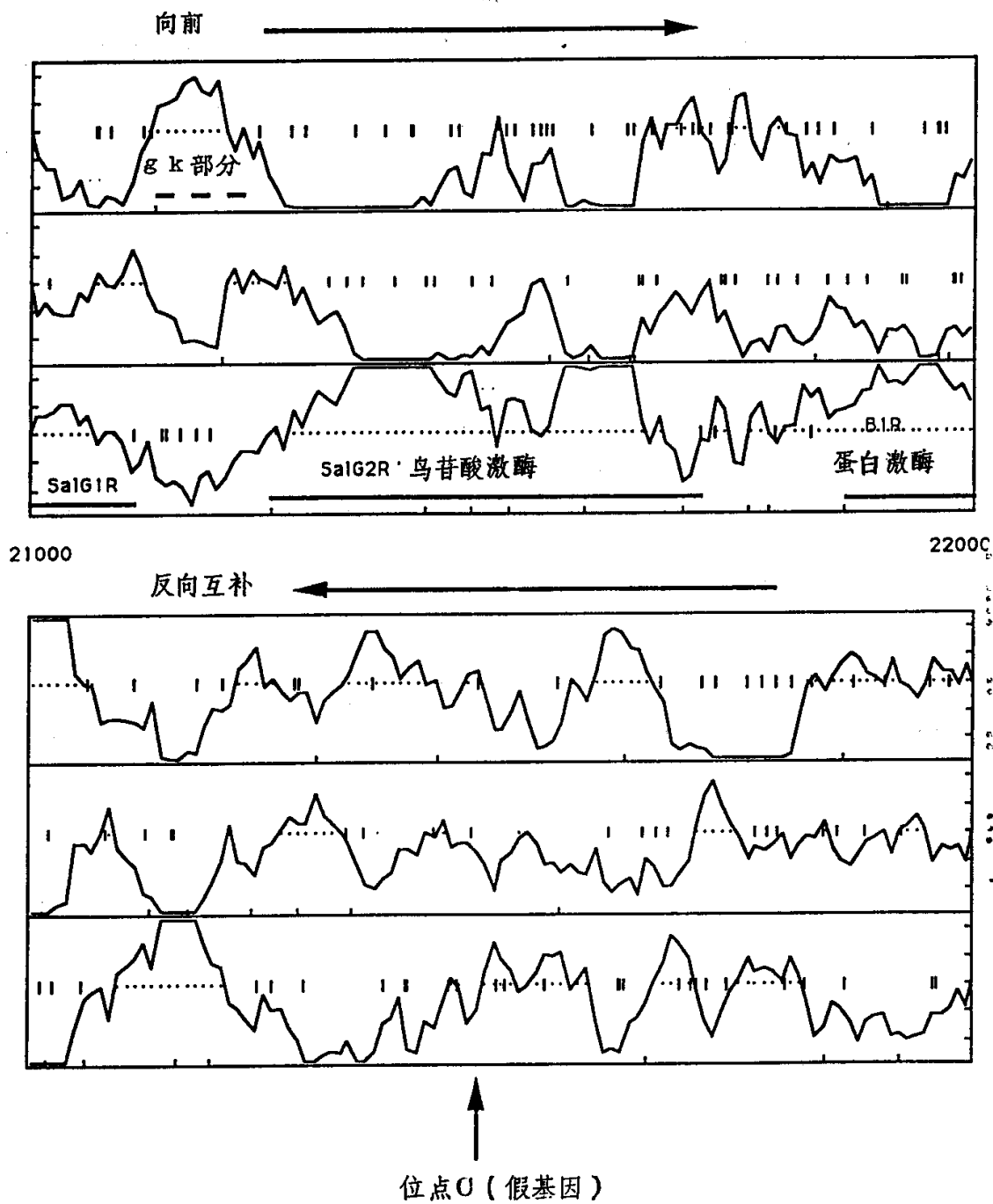


图 7

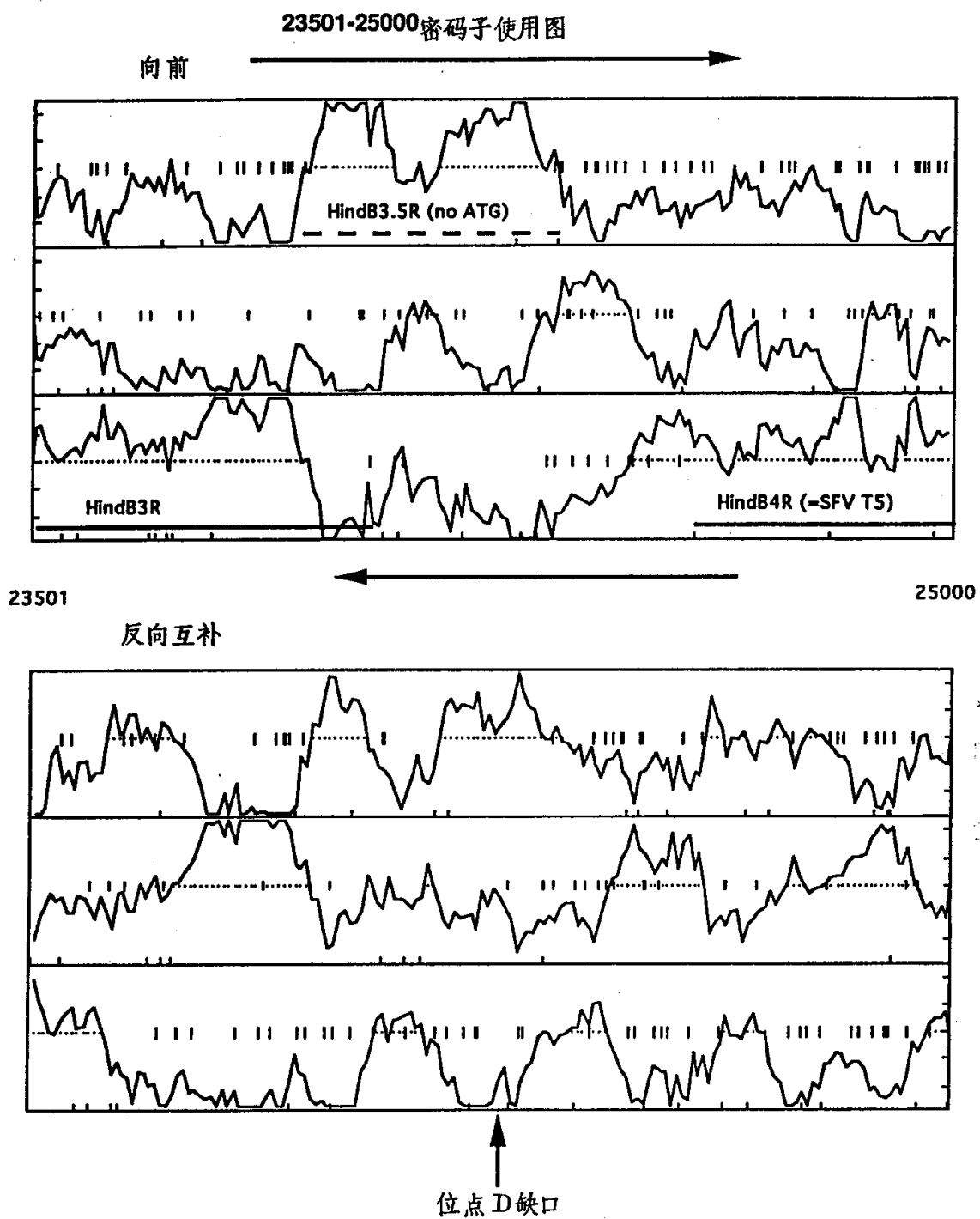


图 8

SalF17R
 GATTGTGTCATGCCGTGGTAGATGTTTGGAGAAATGAGAACTGTTTCTAGATGGAAT 501
 L C A C U U D U W R N E K L F S R W K Y

 ATTGTTTACGAGCTATTAACTGTTTATTAAATGATCAGATGCTTGATAAGATAAAATCTA 561
 C L R A I K L F I N D H N L D K I K S I

 TACTGCAGAAATAGACTAGTATATGTGGAAATGTCATAGAAAGTTAAAGTTAATGAGAGC 621
 L Q H A L U Y U E M S *

 AAAAATATATAAGGTTGTATTCCATATTTGTTATTTTTCTGTAATAGTTAGAAAAATAC 681
 位点 A
 ATTCGATGGTCTATCTACCAGATTATATGIGTTTATAAGGTACTTTTCTCATATAAAC 741

 TAGAGTATGAGTAAGATAGTGTGTTTTCAAAACATATAAATCTAAAATTGATGGATGAGAT 801

 ATACAGCTATTAAATTCGAAATATATTTTAACTGATAACTTTAAACATGGATTTTGA 861

SalF19R
 TGGTGGTTTAAACGTTTTAAAAAAGATTTTGTATTGTAGTATATGATAATATTAAGA 921
 M I I L K D

 TGGATATAAGAATTTGCTGACTGCATGTACTATTTTTTACATTACTACATTGGCTACGG 981
 G Y K E F A D C H Y Y F L H Y Y I G Y G

图 9

SaIF20R
 TGCCAAGGTTAGATGTAATGGTAACGATACACAAATGTGAACGCTGCCACCTCATAC 1140
 A K U R C N G N D N T K C E R C P P H T
 ATATACCACAAATCCCAATTATTCTAATGGATGTCATCAATGTAGAAATGCCCAACC3GA 1200
 Y T T I P I I L N D U I N U E N A Q P D
 TCATTGATAAGGTAAAGTGTACCGGAACACAGAACAGTAATGTTCTGTCTTCCTGGT 1260
 H L I A *
 位点B
 TGGTATTGTGCTACTGATTCTTCACAGACTGAAGATTGTTGAATTTGTGTACCAAAAAGG 1320
 SaIF20.5R
 AGATGTCCATGCGGATACCTTTGGTGGATAGATGAACAAGGAATCCTATTTGTAATCG 1380
 N N K E I L F U N A
 TGTGTGTTGGTGAATATTGCGACTACCTACGTAATTATAGACTTGATCCATTTCTCCA 1440
 U U L U N I A T T Y U I I D L I H F L H
 TGCRAACTATCTAATGTAATTAATTATGATTTTGTGATAATGTTACCATACATTATAT 1500
 A N Y L N U I N Y D F D D N U T I H Y I
 CGCTACTTGGTTAGTGTATTATTCAATATGAAGACCTATTATAATTACTTATCTTTTGA 1560
 A T W L U Y Y S U *
 CGATCTTGTATATTATATAATAAATACTTATGGCATAGTAACATATAATTGCTGAC 1620

图 10

1. The first group of students (Group A) was assigned to the traditional lecture method. They received a 45-minute lecture on the topic of "The Role of the Teacher in the Classroom."

2. The second group of students (Group B) was assigned to the interactive learning method. They participated in a 45-minute interactive session where they discussed and debated the same topic.

3. The third group of students (Group C) was assigned to the self-paced learning method. They were given a 45-minute self-paced module to read and complete.

4. The fourth group of students (Group D) was assigned to the blended learning method. They received a 45-minute lecture followed by a 15-minute interactive session.

5. The fifth group of students (Group E) was assigned to the flipped classroom method. They watched a 45-minute video lecture at home and then participated in a 15-minute interactive session in class.

6. The sixth group of students (Group F) was assigned to the project-based learning method. They were given a 45-minute project to work on, which involved researching and presenting on the topic.

7. The seventh group of students (Group G) was assigned to the inquiry-based learning method. They were given a 45-minute inquiry-based activity where they explored and discovered the topic through a series of questions and investigations.

8. The eighth group of students (Group H) was assigned to the collaborative learning method. They were given a 45-minute collaborative activity where they worked together to solve a problem related to the topic.

9. The ninth group of students (Group I) was assigned to the experiential learning method. They were given a 45-minute experiential activity where they learned through direct experience and reflection.

10. The tenth group of students (Group J) was assigned to the constructivist learning method. They were given a 45-minute constructivist activity where they built their understanding of the topic through active engagement and reflection.

Q 2 R起始子

Figure 1 shows a sequence of 16 small images arranged in a 4x4 grid, illustrating the progression of a face from a neutral expression to a full smile. The images are labeled with numbers 1 through 16 in the bottom right corner of each image.

- 14 -

HindB3R
 CTAAGAACACGTATACGGCAGCAGCTTCCTTTATACTCTCATCTTTTACCAACACAAAGG 507
 L R T R I R Q Q L P L Y S H L L P T Q R
 GTGGATATTTGTTTCATTGGAGTTGATAATAATACACACAAAGTAATTGGATTACGGTGG 567
 V D I C S L E L I I I H T K *
 GTCATGACTACCTCAGACTGGTAGAGAATGATATAGAAAAGCATATCAAAGACTTCGTG 627
 TTGTGCATTTCTGTGAGAAGAAAGAGGACATCAAGTACACGTGTCGATTCATCAAGGTAT 687
 位点D
 ATAAACCTGGGGATGAGGCTACCTCGACATACGTGCGCTATCAAAGTGGAAGATGCT 747
 GTTGTGCTGTGTTTGCAGATTGGCCAGAATCATGGTATATGGATACTAATGGTATCAAGA 807
 AGTATTCTCCAGATGAATGGGTGTCACATATAAAATTTTAATTAATGTAATAGAGAACAA 867
 ATAATAAGGTTGTAATATCATATAGACAATAACTAACAATTAATTAGTAACTGTTATCTC 927
 TTTTTTAACCTAACCTAATACTATATACCTATTAATACATCGTAATTATAGTCTTAACA 987
 TCTATTAATCATTAATTCGCTTCTTTAAT77777A7AACTAACATTGTTAATTGAAAAG 1047
HindB4R
 GGATAACATGTTACAGAAATATAAATTATATATGGATTTTTTTAAAAAGGAAATACTTGAC 1107
 M D F F K K E I L D
 TGGAGTATATATTTATCTCTTCATTATATAGCACGCGTGTTCCTCAATTTTCCACATCC 1167
 W S I Y L S L H Y I A R V F S N F S T S

图12

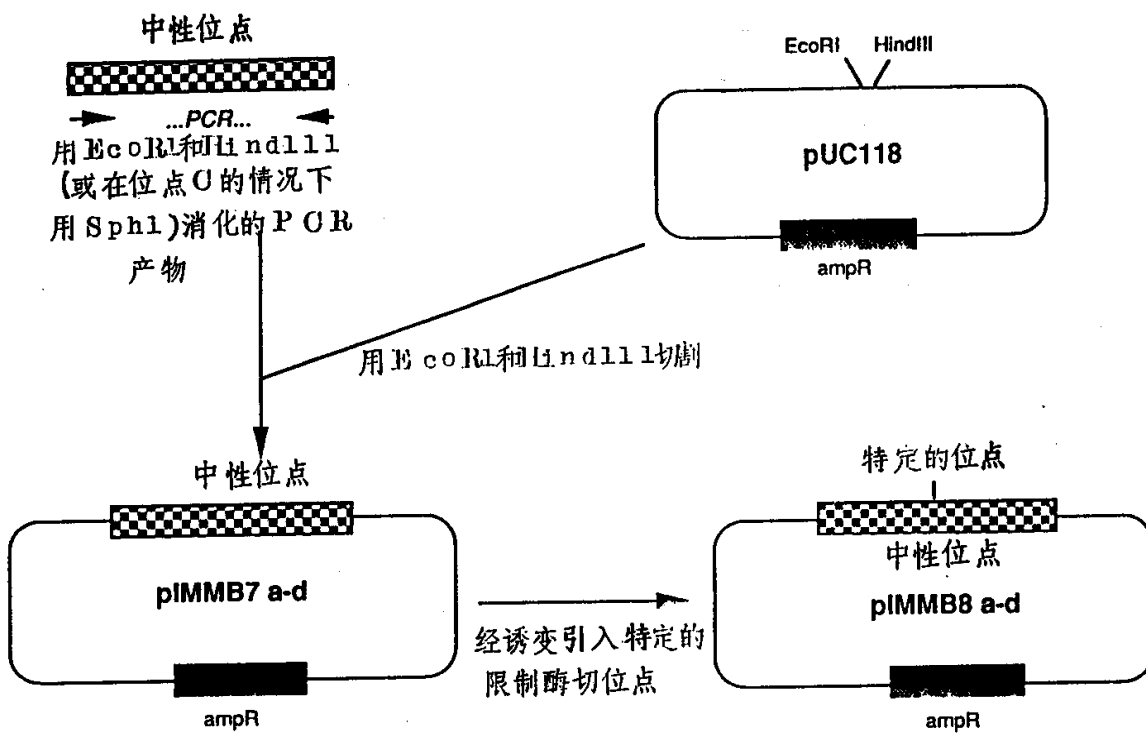


图13

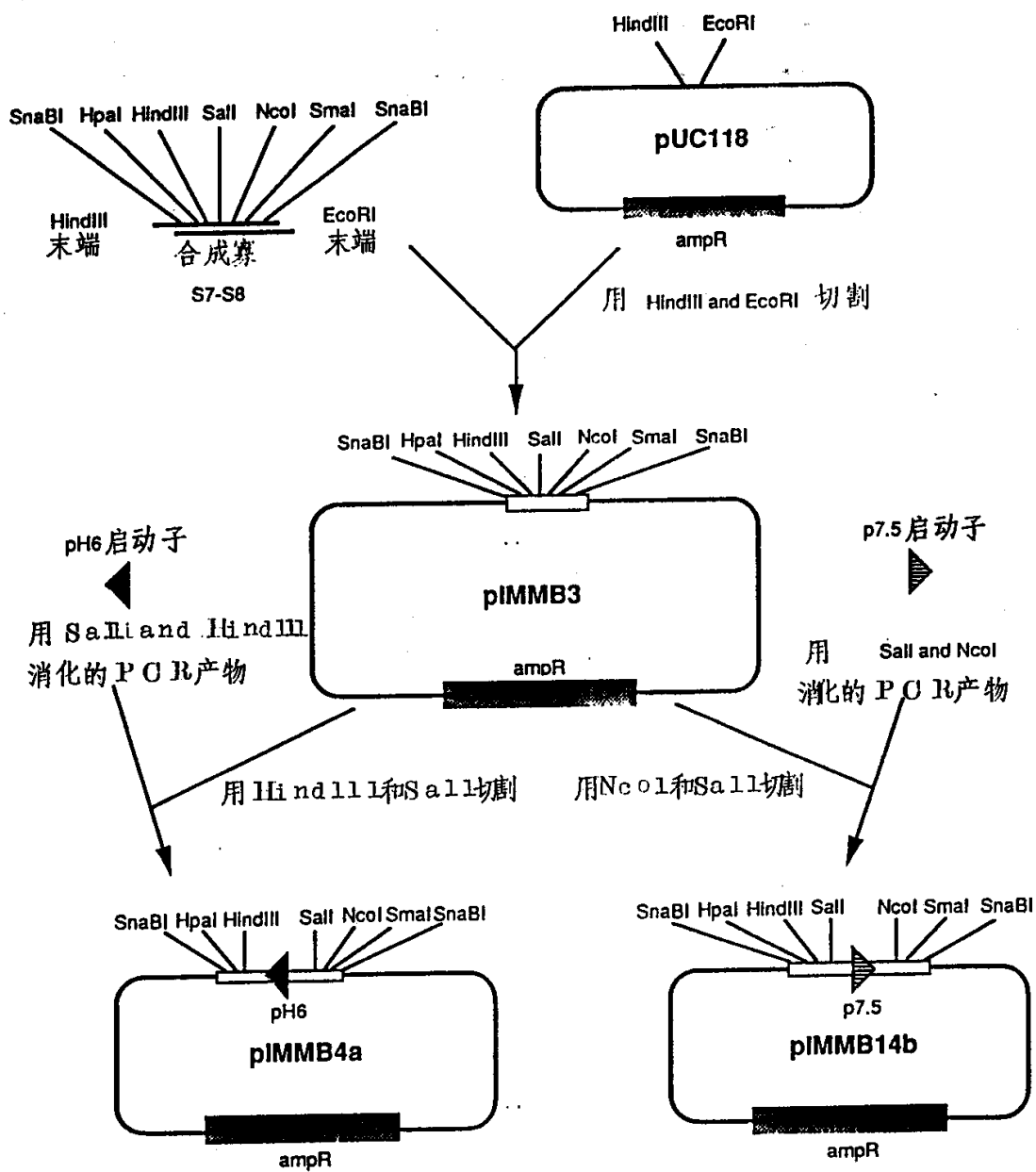


图14

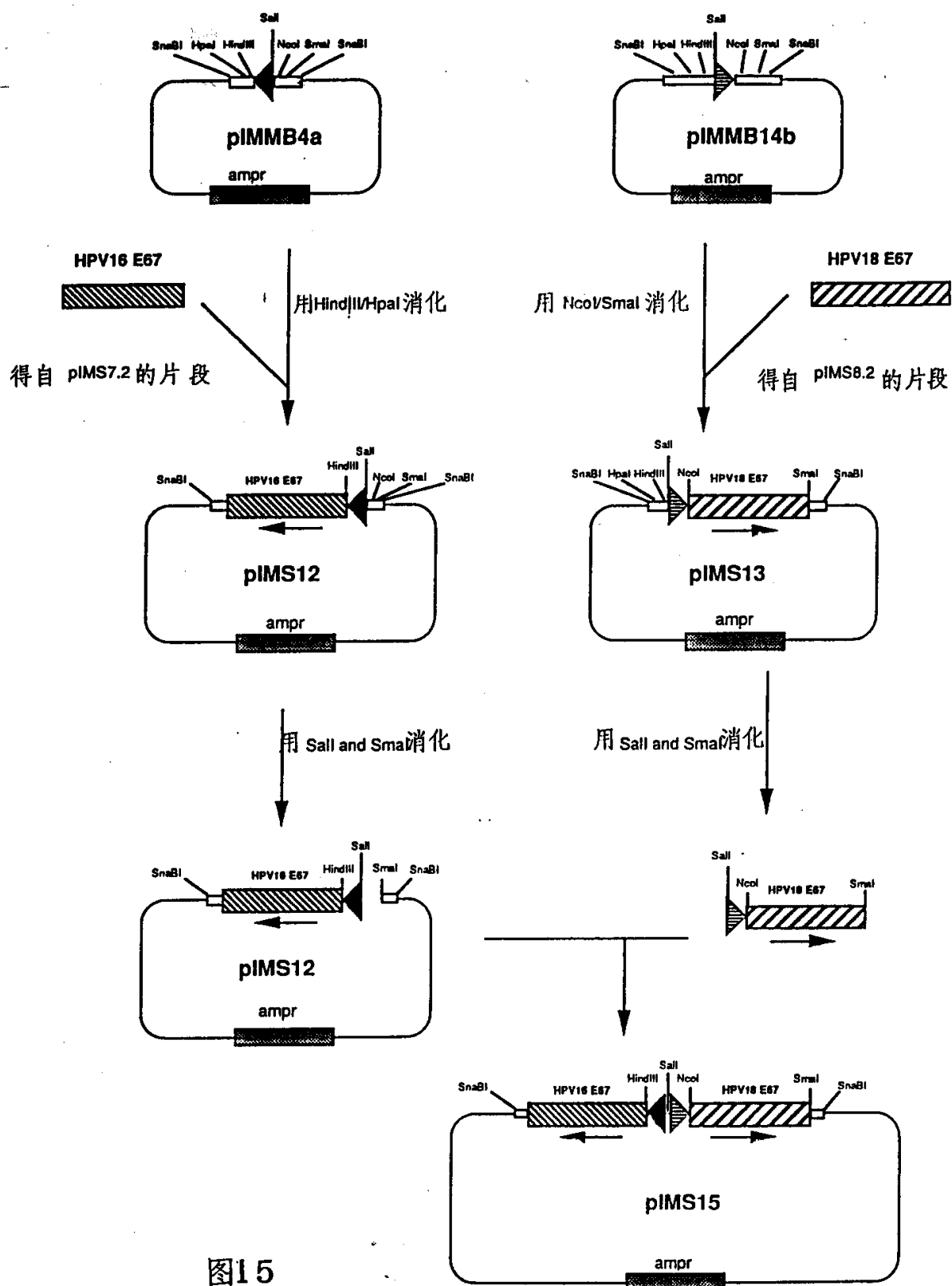


图15

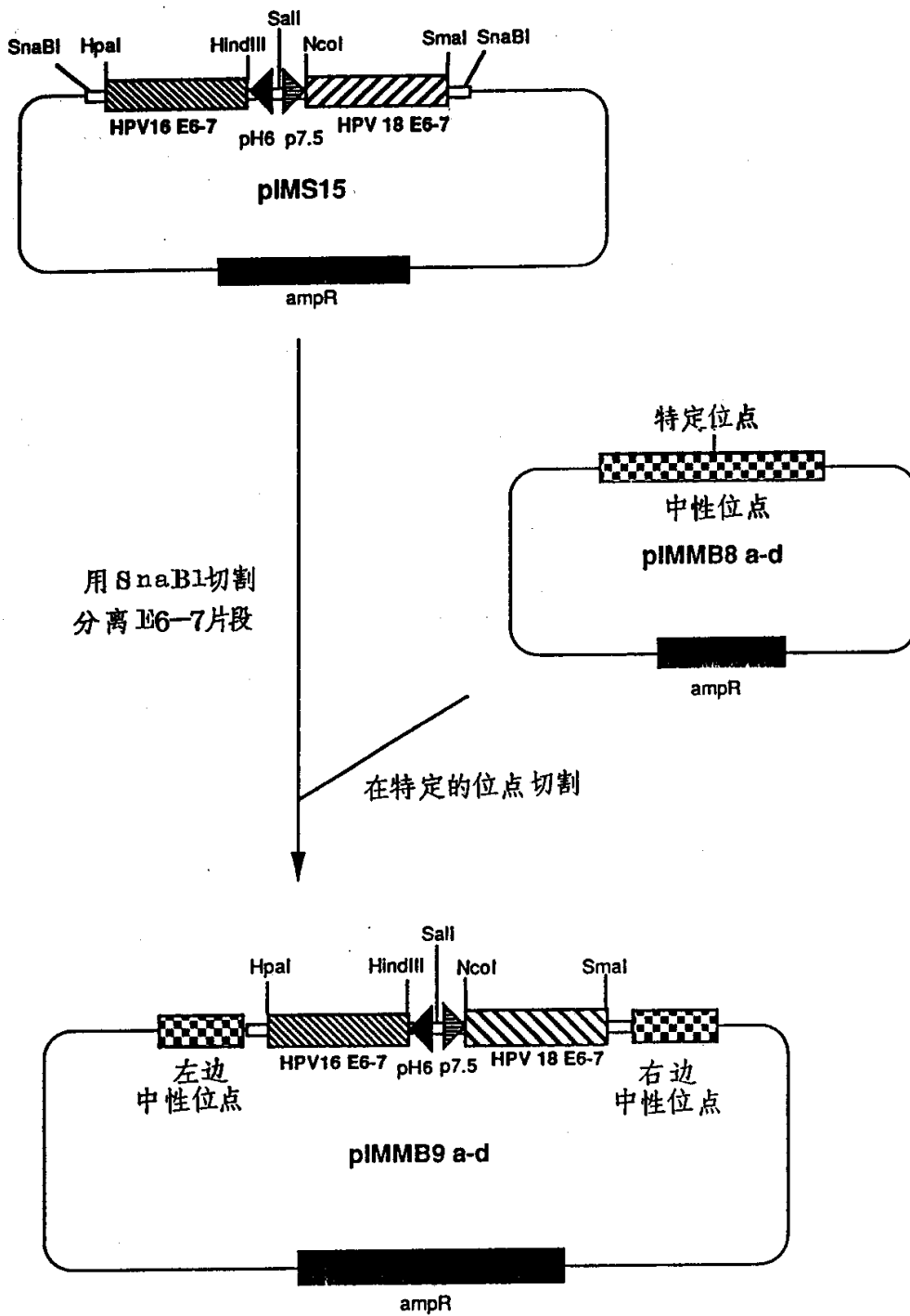


图16

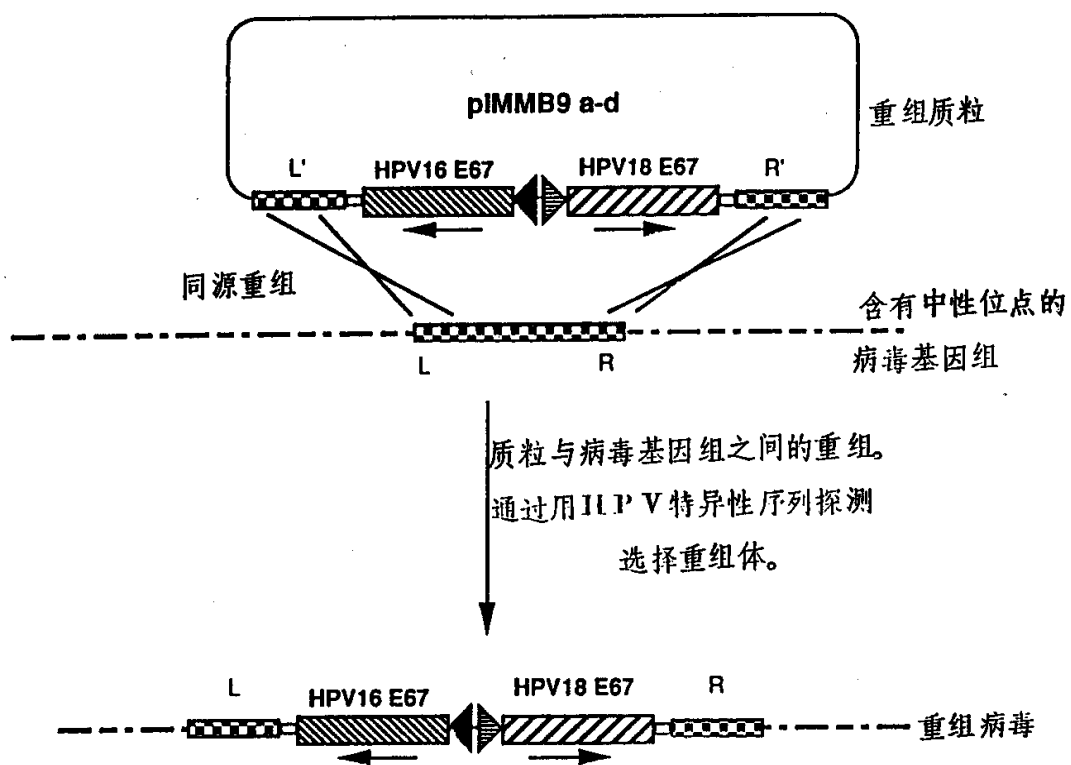


图17

图18

MB03	TCAGGATCCCACATGAGCGAAAAATACATCG
MB07	TCAAAGCTTATTACGATACAACTTAACGGA
MB09	TCAGTTAACATAAAAAGAACAACGCCCGGCAG
MB14	TCAAGGGCCTCTATATAGTAATACCAATACTC
MB15	TCAGTCGACTTACAAACAAC TAGGAAATTGG
MB16	TCAGAATTCTATGTACAGAGGTCTATTAGGC
MB17	TCAAAGCTTGTATGAGGTGGGCAGCGTTCAC
MB18	TCAGAATTCTTAATTATATTGTCGGCCGTGG
MB19	TCAGCATGCATGATCCGTTAGCTTTGGGCTC
MB22	TCAGAATTCGAAGCTCTAGAGTATCTTAGCG
MB23	TCAAAGCTTTCCTGTATTATATGGGATGTGG
MB24	TCAGAATTCATTGATGGATGAGATATACAGC
MB25	TCAAAGCTTTCACAAAATCG
MB26	TCAGAATTCACGTATACGGCAGCAGCTTCC
MB27	TCAAAGCTTTGTTCTACGTCCATTTTCAAGC
MB32	TCAGTCGACATACCAATACTCAAGACTACGA
MB33	TCACCATGGATTGCTATTGATTGAGTACTGTTG
MB35	AGTACCTTATAATACGTAATAATCTGGTAG
MB36	AATCTTCAGTCTGTTAACAATCAGTAGCAC
MB37	TACAACGAAGCTAGGCCTCAACCATTTTAA
MB38	TTTGATAGCGCATACGTATGTCGAGGTAGC
MB39	AATAGGTATATAGTTAACTGGTTAGTTAAA
S01	ATCCCATGGCGCGCTTTGAGGATCCAAC
S02	TCACCCGGGTTACTGCTGGGATGCACACCAC
S05	ATCCCATGGACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTC
S06	TCACCCGGGTTATGGTTTCTGAGAACAGATG
S07	AGCTCTACGTAGTTAACAAGCTTGTCGACCCATGGCCCGGTACGTA
S08	AATTTACGTACCCGGGCCATGGGTCGACAAGCTTGTTAACTACGTAG
S20	GAAACCCAGCTGGGAATCATGCATGG
S21	GAAACACAAGTAGGAATATTAAGTATG
S22	GATCTCTACGGTTATGGGCAATTAAATGAC
S23	GACCTTCTAGGTACGGGCAATTAAGCGAC
S24	ATGTATAGATTTCTACAGTAGAATCAGAGAATTAAG

图19

TATTGTTTACGAGCTATTAAACTGTTTATTAATGATCACATGCTTGATAAGATAAAATCT 60
Y C L R A I K L F I N D H M L D K I K S
I V Y E L L N C L L M I T C L I R * N L
L F T S Y * T V Y * * S H A * * D K I Y

ATACTGCAGAATAGACTAGTATATGTGGAATGTCATAGAAAGTTAAAGTTAATGAGAG 120
I L Q N R L V Y V E M S * K V K S * * E
Y C R I D * Y M W K C H R K L K V N E S
T A E * T S I C G N V I E S * K L M R A

CAAAAATATATAAGGTTGTATTCCATATTTGTTATTTTCTGTAATAGTTAGAAAAATA 180
Q K Y I R L Y S I F V I F S V I V R K I
K N I * G C I P Y L L F F L * * L E K Y
K I Y K V V F H I C Y F F C N S * K N T

CATTCCGATGGTCTATCTACCAGATTATTATGTGTTATAAGGTACTTTTTCTCATAATAAA 240
H S M V Y L P D Y Y V L * G T F S H N K
I R W S I Y Q I I M C Y K V L F L I I N
F D G L S T R L L C V I R Y F F S * * T

CTAGAGTATGAGTAAGATAGTGTTTTCAAAACATATAAACTTAAATGATGGATGAGA 300
L E Y E * D S V F Q N I * I * N * W M R
* S M S K I V F F K T Y K S K I D G * D
R V * V R * C F S K H I N L K L M D E I

TATACAGCTATTAATTTGAAAATATATTTTAATCTGATAACTTTAAACATGGATTTTG 360
Y T A I N F E N I F * S D N F K H G F L
I Q L L I S K I Y F N L I T L N M D F *
Y S Y * F R K Y I L I * * L * T W I F D

ATGGTGGTTTTAACGTTTTAAAAAAGATTTTGTATTGTAGTATATGATAATATTAAG 420
M V V * R F K K R F C Y C S I * * Y * K
W W F N V L K K D F V I V V Y D N I K R
G G L T F * K K I L L L * Y M I I L K D

ATGGATATAAGAATTTGCTGACTGCATGTACTATTTTTTACATTACTACATTGGCTACG 480
M D I K N L L T A C T I F Y I T T L A T
W I * R I C * L H V L F F T L L H W L R
G Y K E F A D C M Y Y F L H Y Y I G Y G

GCAGATATACCTACTCCGCCACCAACGGGTGATGTGACAAGGGAGAATATCTTGATAAGA 540
A D I P T P P P T G H V T R E N I L I R
Q I Y L L R H Q R V M * Q G R I S * * E
R Y T Y S A T N G S C D K G E Y L D K R

GGCATAATCAATGTTGTAATCGGTGTCCACCTGGAGAATTTGCCAAGGTTAGATGTAATG 600
G I I N V V I G V H L E N L P R L D V M
A * S M L * S V S T W R I C Q G * M * W
H N Q C C N R C P P G E F A K V R C N G

GTAACGATAACAAAAATGTGAACGCTGCCACCTCATACATATACCACAATCCCAATTA 660
V T I T Q N V N A A H L I H I P Q S Q L
* R * H K M * T L P T S Y I Y H N P N Y
N D N T K C E R C P P H T Y T T I P I I

图19 (续)

TTCTAATGGATGTCATCAATGTAGAAAATGCCCAACCGGATCATTGATAAGGTAAAGTG F * W M S S M * K M P N R . I I * * G K V S N G C H Q C R K C P T G S F D K V K C L M D V I N V E N A Q P D H L I R * S V	720
TACCGGAACACAGAACAGTAAATGTTTCGTGCTCTTCTGGTTGGTATTGTGCTACTGATT Y R N T E Q * M F V S S W L V L C Y * F T G T Q N S K C S C L P G W Y C A T D S P E H R T V N V R V F L V G I V L L I L	780
TTACAGACTGAAGATTGTTGAAATTGTGTACCAAAAAGGAGATGTCCATGCGGATACTT F T D * R L L K L C T K K E M S M R I L S Q T E D C * N C V P K R R C P C G Y F H R L K I V E I V Y Q K G D V H A D T L	840
TGGTGGAATAGATGAACAAGGAAATCCTATTTGTAAATCGTGTGTGTTGGTGAATATTG W W N R * T R K S Y L * I V L C W * I L G I D E Q G N P I C K S C C V G E Y C V E * M N K E I L F V N R V V L V N I A	900
CGACTACCTACGTAATTATAGACTTGATCCATTTCTCCATGCAAACCTATCTAAATGTAA R L P T * L * T * S I S S M Q T I * M * D Y L R N Y R L D P F P P C K L S K C N T T Y V I I D L I H F L H A N Y L N V I	960
TTAATTATGATTTTGATGATAATGTTACCATACATTATATCGCTACTTGGTTAGTGTATT L I M I L M I M L P Y I I S L L G * C I * L * F * * * C Y H T L Y R Y L V S V L N Y D F D D N V T I H Y I A T W L V Y Y	1020
ATTCAGTATGAAGACCTATTAATAATTACTTATCTTTTGACGATCTTGTATAATTATAA I Q Y E D L L I I T Y L L T I L L * L * F S M K T Y * * L L I F * R S C Y N Y N S V * R P I N N Y L S F D D L V I I I I	1080
TATAAAAATACTTATGGCATAGTAACTCATAATTGCTGACGCGATAAATTCGTAATAATC Y K N T Y G I V T H N C * R D K F V I I I K I L M A * * L I I A D A I N S * * S * K Y L W H S N S * L L T R * I R N N L	1140
TGTTTTGTTCAAATTTTATAAGGAATCTACAGGCATAAAAATAAAAATATAATTTATAA C F V Q I F I R N L Q A * K * K Y N L * V L F K F L * G I Y R H K N K N I I Y N F C S N F Y K E S T G I K I K I * F I I	1200
TATACTCTTACAGCGCGCCATCATGAATAACAGCAGTGAATTGATTGCTG Y T L T A R H H E * Q Q * I D C I L L Q R A I M N N S S E L I A Y S Y S A P S * I T A V N * L L	1260

图20

ATATTGGTATTACCGCATTAAATTATATTGTCGGCCGTGGCAATTTCTGTATTACATAT 60
 I F G I T A L I I L S A V A I F C I T Y
 Y L V L P H * L Y C R P W Q F S V L H I
 I W Y Y R I N Y I V G R G N F L Y Y I L

TATATATATAATAAACGTTACGTAATAACAAAACAGAGAACAAGTCTAGATTTTGGAC 120
 Y I Y N K R S R K Y K T E N K V * I F D
 I Y I I N V H V N T K Q R T K S R F L T
 Y I * * T F T * I Q N R E Q S L D F * L

TTACATAAATGTCTGGGATAGTAAATCTATCATATTGAGCGGACCATCTGGTTTAGGAA 180
 L H K C L G * * N L S Y * A D H L V * E
 Y I N V W D S K I Y H I E R T I W F R K
 T * M S G I V K S I I L S G P S G L G K

AGACAGCCATAGCCAAAAGACTATGGGAATATATTGGATTGTGGTGTCCCATACCACT 240
 R Q P * P K D Y G N I F G F V V S H T T
 D S H S Q K T M G I Y L D L W C P I P L
 T A I A K R L W E Y I W I C G V P Y H *

AGATTTCTCGTCTCTATGGAACGAGAAGGTGTGATTACCATTACGTTAACAGAGAGGCC 300
 R F P R P M E R E G V D Y H Y V N R E A
 D F L V L W N E K V L I T I T L T E R P
 I S S S Y G T R R C * L P L R * Q R G H

ATCTGGAAGGAATAGCCGCCGAAACTTTCTAGAACAATACTGAGTTTTTAGGAAATATT 360
 I W K G I A A G N F L E H T E F L G N I
 S G R E * P P E T F * N I L S F * E I F
 L E G N S R R K L S R T Y * V F R K Y L

TACGGAACCTCTAAACAGCTGTGAATACAGCGGCTATTAATAATCGTATTTGTGTGATG 420
 Y G T S K T A V N T A A I N N R I C V M
 T E L L K Q L * I Q R L L I I V F V * W
 R N F * N S C E Y S G Y * * S Y L C D G

GATCTAAACATCGACGGTGTAGAACTCTTAAAAATACGTACCTAATGCCTTACTCGGTG 480
 D L N I D G V R S L K N T Y L M P Y S V
 I * T S T V L E V L K I R T * C L T R C
 S K H R R C * K S * K Y V P N A L L G V

TATATAAGACCTACCTCTCTTAAATGGTTGAGACCAAGCTTCGTTGTAGAAACACTGAA 540
 Y I R P T S L K M V E T K L R C R N T E
 I * D L P L L K W L R P S F V V E T L K
 Y K T Y L S * N G * D Q A S L * K H * S

GCTAACGATGAGATTTCATCGTCGCGTGATATTGGCAAAAACGGATATGGATGAGGCCAAC 600
 A N D E I H R R V I L A K T D M D E A N
 L T M R F I V A * Y W Q K R I W M R P T
 * R * D S S S R D I G K N G Y G * G Q R

GAAGCAGGTCTATTGACACTATTATCATTGAAGATGATGTGAATTAGCATATAGTAAG 660
 E A G L F D T I I I E D D V N L A Y S K
 K Q V Y S T L L S L K M M * I * H I V S
 S R S I R H Y Y H * R * C E F S I * * V

TTAATTCAGATACTACAGGACCGTATTAGAATGTATTTTAACACTAATTAGAGACTTAAG 720
 L I Q I L Q D R I R M Y F N T N * R L K
 * F R Y Y R T V L E C I L T L I R D L R
 N S D T T G P Y * N V F * H * L E T * D

图20 (续)

ACTTAAACCTTGATAATTAATAATATAACTCGTTTTATATGTGGCTATTTCAACGTCTA	780
T * N L I I N N I T R F Y M W L F Q R L	
L K T * * L I I * L V F I C G Y F N V *	
L K L D N * * Y N S F L Y V A I S T S N	
ATGTATTAGTTAAATATTAAACCTTACCACGTAAACCTTAAATTTAAATGATATTTCA	840
M Y * L N I K T Y H V K L K I * N D I S	
C I S * I L K L T T * N L K F K M I F H	
V L V K Y * N L P R K T * N L K * Y F I	
TTGACAGATAGATCACACATTATGAACCTTCAAGGACTTGTGTTAACTGACAATTGCAAA	900
L T D R S H I M N F Q G L V L T D N C K	
* Q I D H T L * T F K D L C * L T I A K	
D R * I T H Y E L S R T C V N * Q L Q K	
AATCAATGGGTCGTTGGACCATTAAATAGGAAAAGGTGGATTCCGGTAGTATTTATACTACT	960
N Q W V V G P L I G K G G F G S I Y T T	
I N G S L D H * * E K V D S V V F I L L	
S M G R W T I N R K R W I R * Y L Y Y *	
AATGACAATAATTATGTAGTAAAAATAGAGCCCAAAGCTA	1020
N D N N Y V V K I E P K A	
M T I I M * * K * S P K L	
* Q * L C S K N R A Q S S	

图21

ACCATCGAGGTAACACCTCTCTGGAAGACAGCGTGAATAATGTACTCATGAAACGTTTG 60
 T I E V T T S L E D S V N N V L M K R L
 P S R * P P L W K T A * I M Y S * N V W
 H R G N H L S G R Q R E * C T H E T F G
 GAAACTATACGCCATATGTGGTCTGTCGTATATGATCATTGATATTGTGAATGGTAAA 120
 E T I R H M W S V V Y D H F D I V N G K
 K L Y A I C G L S Y M I I L I L * M V K
 N Y T P Y V V C R I * S F * Y C E W * R
 GAATGCTGTTATGTGCATACGCATTGCTCTAATCAAAATCTTATACCGAGTACTGTAAAA 180
 E C C Y V H T H L S N Q N L I P S T V K
 N A V M C I R I C L I K I L Y R V L * K
 M L L C A Y A F V * S K S Y T E Y C K N
 ACAAATTTGTACATGAAGACTATGGGATCATGCATTCAAATGGATTCCATGGAAGCTCTA 240
 T N L Y M K T M G S C I Q M D S M E A L
 Q I C T * R L W D H A F K W I P W K L *
 K F V H E D Y G I M H S N G F H G S S R
 GAGTATCTTAGCGAACTGAAGGAATCAGGTGGATGGAGTCCCAGACCAGAAATGCAGGAA 300
 E Y L S E L K E S G G W S P R P E M Q E
 S I L A N * R N Q V D G V P D Q K C R N
 V S * R T E G I R W M E S Q T R N A G I
 TTTGAATATCCAGATGGAGTGAAGACACTGAATCAATTGAGAGATTGGTAGAGGAGTTC 360
 F E Y P D G V E D T E S I E R L V E E F
 L N I Q M E W K T L N Q L R D W * R S S
 * I S R W S G R H * I N * E I G R G V L
 TTCATAGATCAGAACTTCAGGCTGGTGAATCAGTCAAATTTGGTAATTCTATTAATGTT 420
 F N R S E L Q A G E S V K F G N S I N V
 S I D Q N F R L V N Q S N L V I L L M L
 Q * I R T S G W * I S Q I W * F Y * C *
 AAACATACATCTGTTTCAGCTAAGCAACTAAGAACACGTATACGGCAGCAGCTTCCTTTA 480
 K H T S V S A K Q L R T R I R Q Q L P L
 N I H L F Q L S N * E H V Y G S S F L Y
 T Y I C F S * A T K N T Y T A A A S F I
 TACTCTCATCTTTTACCAACACAAAGGGTGGATATTTGTTTCATTGGAGTTGATAATAATA 540
 Y S H L L P T Q R V D I C S L E L I I I
 T L I F Y Q H K G W I F V H W S * * * Y
 L S S F T N T K G G Y L F I G V D N N T
 CACACAAAGTAATTGGATTACGGTGGGTCATGACTACCTCAGACTGGTAGAGAATGATA 600
 H T K * L D S R W V M T T S D W * R M I
 T Q S N W I H G G S * L P Q T G R E * Y
 H K V I G F T V G H D Y L R L V E N D I
 TAGAAAAGCATATCAAAGACTTCGTGTTGTGCATTTCTGTGAGAAGAAAGAGGACATCA 660
 * K S I S K D F V L C I S V R R K R T S
 R K A Y Q K T S C C A F L * E E R G H Q
 E K H I K R L R V V H F C E K K E D I K

图21 (续)

AGTACACGTGTCGATTCAAGGTATATAAACCTGGGGATGAGGCTACCTCGACATACG 720
S T R V D S S R Y I N L G M R L P R H T
V H V S I H Q G I * T W G * G Y L D I R
Y T C R F I K V Y K P G D E A T S T Y V

TGTGCGCTATCAAAGTGGAAAGATGCTGTTGTGCTGTGTTGCAGATTGCCAGAATCAT 780
C A L S K W K D A V V L C L Q I G Q N H
V R Y Q S G K M L L C C V C R L A R I M
C A I K V E R C C C A V F A D W P E S W

GGTATATGGATACTAATGGTATCAAGAAGTATTCTCCAGATGAATGGGTGTCACATATAA 840
G I W I L M V S R S I L Q M N G C H I *
V Y G Y * W Y Q E V F S R * M G V T Y K
Y M D T N G I K K Y S P D E W V S H I K

AATTTTAATTAATGTAATAGAGAACAATAAAGGTTGTAATATCATATAGACAATAAC 900
N F N * C N R E Q I I R L * Y H I D N N
I L I N V I E N K * * G C N I I * T I T
F * L M * * R T N N K V V I S Y R Q * L

TAACAATTAATTAGTAAGTCTTCTTTTTTAACCACTAATATATACCTATT 960
* Q L I S N C Y L F F N * P T N Y I P I
N N * L V T V I S F L T N Q L T I Y L L
T I N * * L L S L F * L T N * L Y T Y *

AATACATCGTAATTATAGTTCTTAACATCTATTAAATCATTAAATCGCTTCTTTAATTTTT 1020
N T S * L * F L T S I N H * F A S L I F
I H R N Y S S * H L L I I N S L L * F F
Y I V I I V L N I Y * S L I R F F N F L

TATAAACTAACATTGTTAATTGAAAAGGGATAACATGTTACAGAATATAAATTATATATG 1080
Y K L T L I E K G * H V T E Y K L Y M
I N * H C * L K R D N M L Q N I N Y I W
* T N I V N * K G I T C Y R I * I I Y G

GATTTTTTTTAAAAAGGAATACTTGACTGGAGTATATATTATCTCTTCATTATATAGCA 1140
D F F K K E I L D W S I Y L S L H Y I A
I F L K R K Y L T G V Y I Y L F I I * H
F F * K G N T * L E Y I F I S S L Y S T

CGCGTGTGTTTCCAATTTTTCCACATCCCATATAATACAGGATTATAATCTCGTTCGAACA 1200
R V F S N F S T S H I I Q D Y N L V R T
A C F P I F P H P I * Y R I I I S F E H
R V F Q F F H I P Y N T G L * S R S N I

TACGAGAAAGTGGATAAAACAATAGTTGATTTTTTATCTAGGTTGCCAAATTTATCCAT 1260
Y E K V D K T I V D F L S R L P N L F H
T R K W I K Q * L I F Y L G C Q I Y S I
R E S G * N N S * F F I * V A K F I P Y

ATTTTAGAATATGGGGAAATATTCTACATATTTATTCTATGGATGATGCTAATACGAAT 1320
I L E Y G E N I L H I Y S M D D A N T N
F * N M G K I F Y I F I L W M M L I R I
F R I W G K Y S T Y L F Y G * C * Y E Y

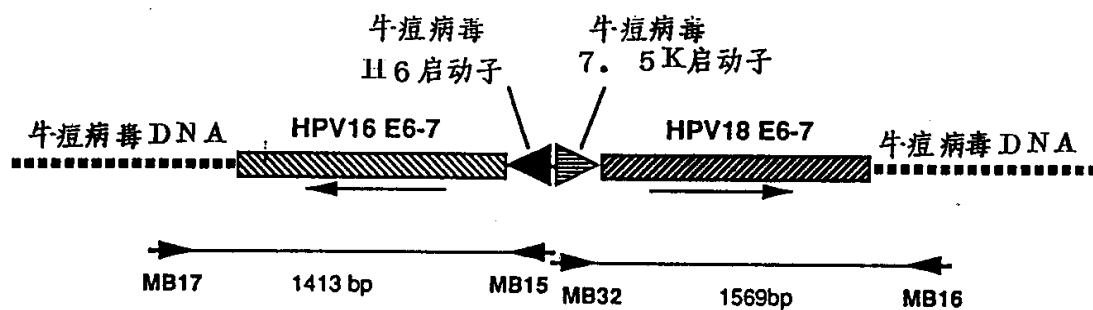
ATTATAATTTTTTTCTAGATAGAGTATTAAATATTAATAAGAACGGGTCATTTATACAC 1380
I I I F F L D R V L N I N K N G S F I H
L * F F F * I E Y * I L I R T G H L Y T
Y N F F S R * S I K Y * * E R V I Y T Q

图21 (续)

AATCTCAGGTTATCATCATCCATTAAATATAAAAGAATATGTATATCAATTAGTTAATAAT 1440
N L R L S S S I N I K E Y V Y Q L V N N
I S G Y H H P L I * K N M Y I N * L I M
S Q V I I I H * Y K R I C I S I S * * *
GATCATCCAGATAATAGGATAAGACTAATGCTTGAAAATGGACGTAGAACAAGACATTTT 1500
D H P D N R I R L M L E N G R R T R H F
I I Q I I G * D * C L K M D V E Q D I I
S S R * * D K T N A * K W T * N K T F F

图22

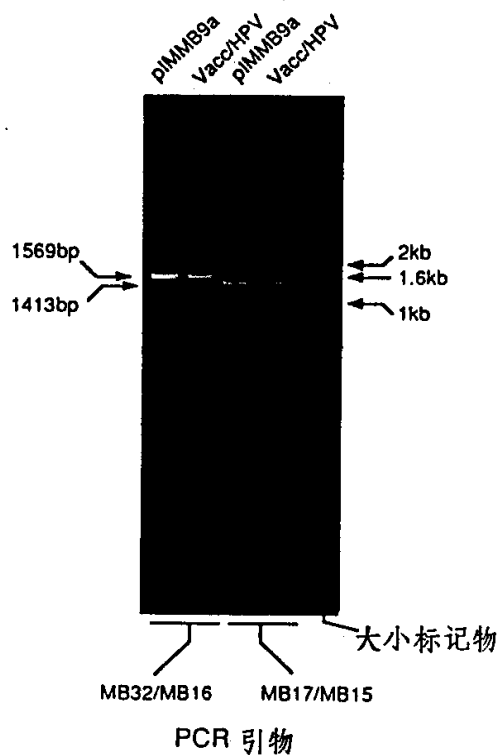
(a) 用以证实重组牛痘病毒A中所插入的HPV序列的存在和排列的PCR扩增反应



注：在PCR引物MB15和MB32的5'端存在的序列有6个核苷酸重叠。

(b)

用于PCR分析的模板



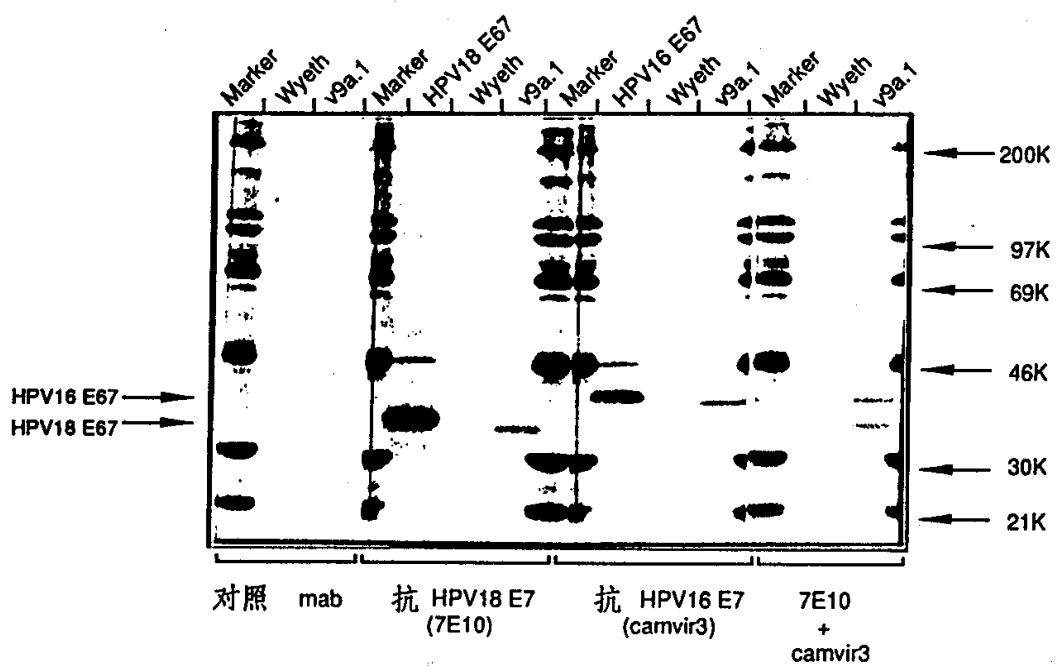
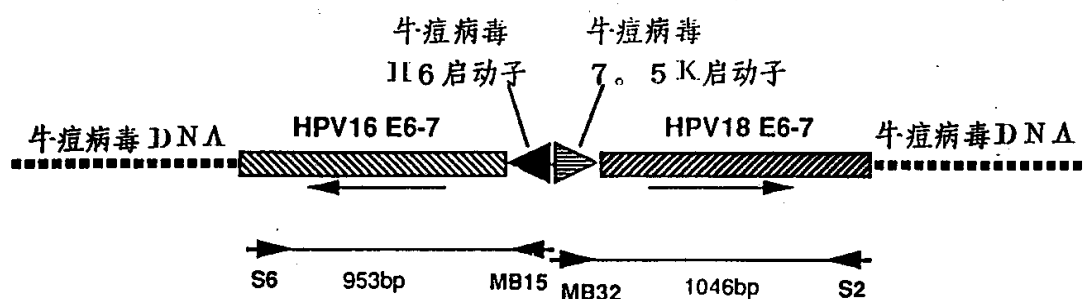


图23

图 2 4

(a) 用以证实在重组牛痘病毒A中所插入的HPV序列的存在和排列的PCR扩增反应。



注：在PCR引物MB15和MB32的5'端存在的序列有6个核苷酸重叠。

(b)

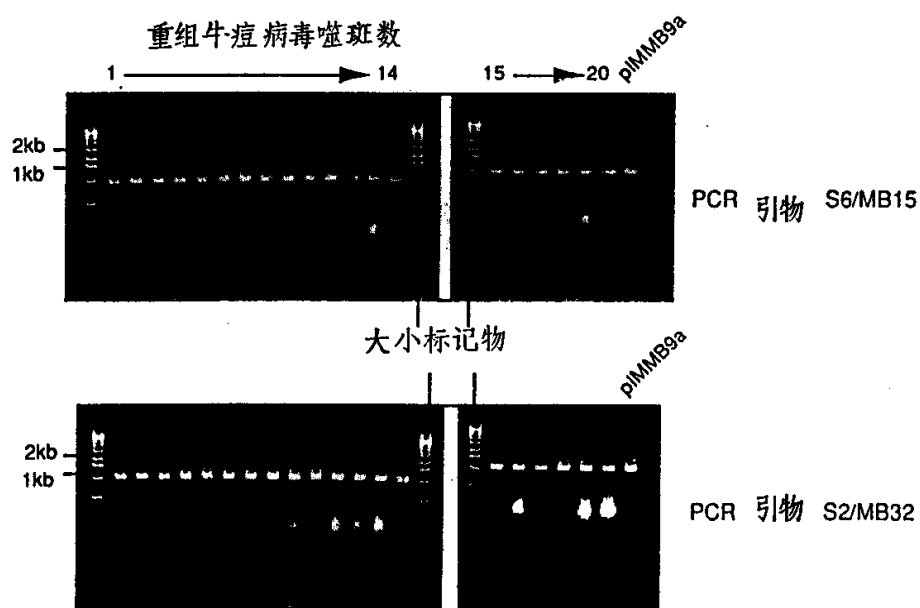
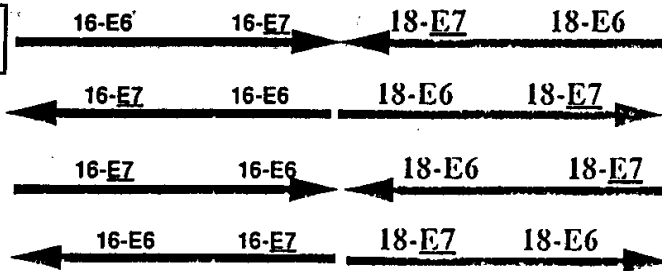
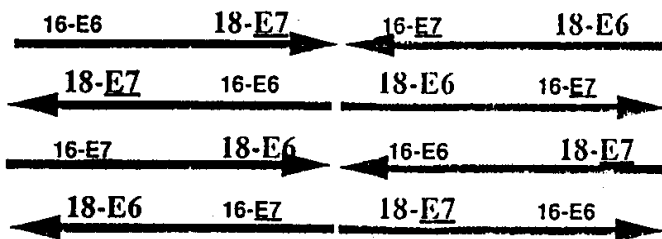


图 2 5

两个
融合的读码

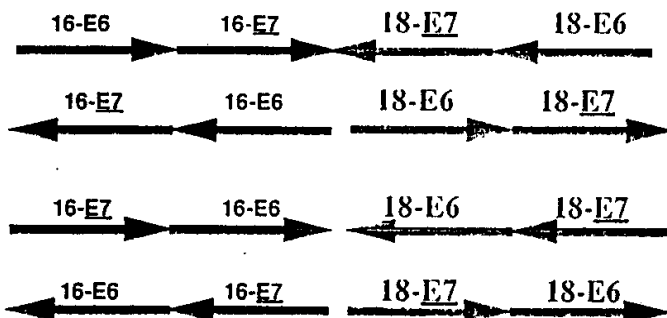


16 与 16
和 18 与 18



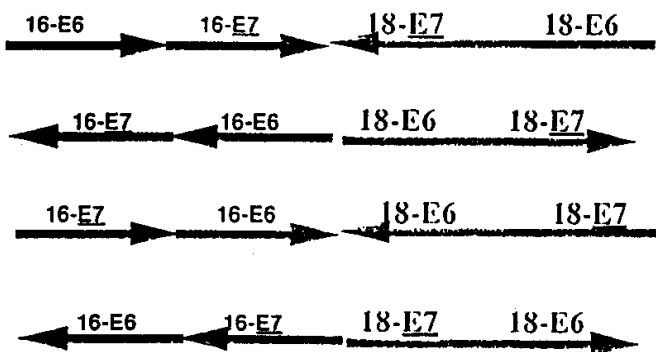
16 与 18
即混合的

无融
合的读码



16 与 16
和 18 与 18

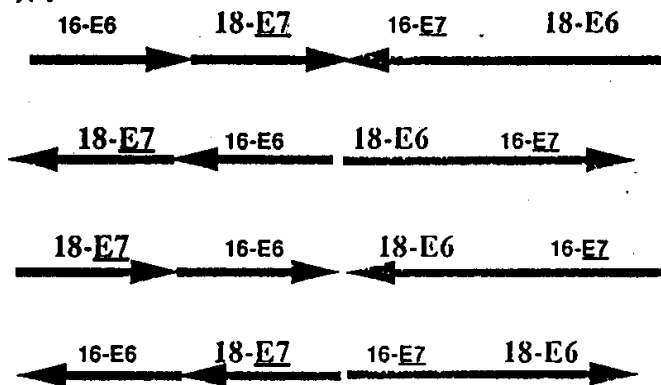
只有一个
融合的 O R F



16 与 16
和 18 与 18

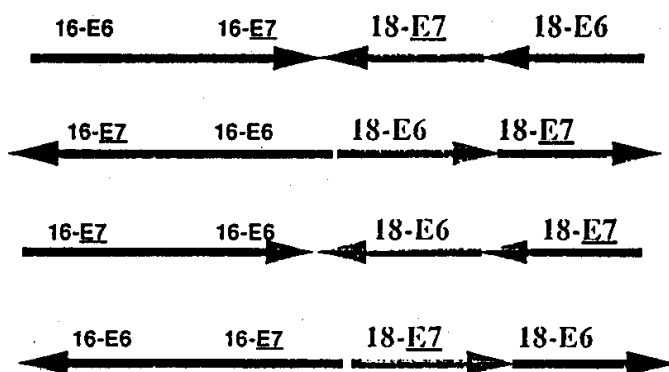
图 2 5 (续)

只有一个
融合的 ORF



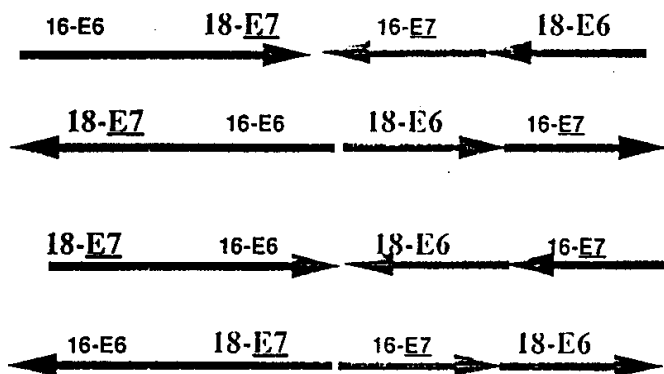
16 与 18
即混合的

只有一个
融合的 ORF



16 与 16
和 18 与 18

只有一个
融合的 ORF



16 与 18
即混合的