

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/39

A61P 37/04



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817935.8

[43] 公开日 2005年3月23日

[11] 公开号 CN 1599623A

[22] 申请日 2002.9.16 [21] 申请号 02817935.8

[30] 优先权

[32] 2001.9.14 [33] US [31] 60/318,994

[32] 2002.4.22 [33] US [31] 60/374,145

[86] 国际申请 PCT/IB2002/004132 2002.9.16

[87] 国际公布 WO2003/024481 英 2003.3.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.12

[71] 申请人 赛托斯生物技术公司

地址 瑞士施利伦

[72] 发明人 帕特里克·毛雷尔 阿兰·蒂索

卡特林·施瓦策 埃德温·迈耶雷金

格拉达·利波夫斯基 保罗·庞普森

印杜利斯·西耶伦斯

雷吉娜·仁霍发 马丁·F·巴赫曼

塔齐奥·斯托尼

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书 23 页 说明书 119 页 序列表 77 页  
附图 58 页

[54] 发明名称 免疫刺激物向病毒样颗粒内的包装：  
制备方法与应用

[57] 摘要

本发明是基于病毒样颗粒 (VLP) 能够装载免疫刺激物，特别是含非甲基化 C 和 G (CpG) 的 DNA 寡核苷酸这一发现。这些 CpG - VLP 比不含 CpG 的对应物免疫原性大大增强，并且可诱发增强的 B 和 T 细胞应答。针对与 VLP 任选地偶联、融合或以其他方式附着之抗原的免疫应答，与针对 VLP 本身的免疫应答相似地增强。另外，针对 VLP 和抗原两者的 T 细胞应答尤其集中在 Th1 型。因此，附着于含 CpG 之 VLP 的抗原可以是理想的疫苗，用于对变态反应、肿瘤和其它自身分子以及慢性病毒病进行预防或治疗接种。

ISSN 1008-4274

1. 一种增强动物免疫应答的组合物，其包含：
- (a) 一种病毒样颗粒；和
- 5 (b) 一种免疫刺激物；
- 其中所述免疫刺激物与所述病毒样颗粒结合。
2. 权利要求 1 的组合物，其进一步包含至少一种抗原，其中所述抗原与所述病毒样颗粒结合。
3. 权利要求 1 的组合物，其中所述免疫刺激物是一种 toll 样受体激活物。
- 10 4. 权利要求 1 的组合物，其中所述免疫刺激物是一种细胞因子分泌诱导物。
5. 权利要求 3 的组合物，其中所述 toll 样受体激活物选自或基本由下列成分组成：
- 15 (a) 免疫刺激性核酸；
- (b) 肽聚糖；
- (c) 脂多糖；
- (d) 脂磷壁酸；
- (e) 咪唑并喹啉化合物；
- 20 (f) 鞭毛蛋白；
- (g) 脂蛋白；
- (h) 免疫刺激有机分子；
- (i) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸；和
- (j) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和/或(i)中至少一种物质
- 25 的任何混合物。
6. 权利要求 5 的组合物，其中所述免疫刺激物选自或基本由下列成分组成：
- (a) 核糖核酸；
- (b) 脱氧核糖核酸；

- (c) 嵌合核酸；和
- (d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种核酸的任何混合物。
7. 权利要求 6 的组合物，其中所述核糖核酸是 poly (I:C)或其衍生物。
- 5        8. 权利要求 6 的组合物，其中所述脱氧核酸选自或基本由下列成分组成：
- (a) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸；和
- (b) 不含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸。
9. 权利要求 1 的组合物，其中所述免疫刺激物是一种含非甲基
- 10 化 CpG 的寡核苷酸。
10. 权利要求 1 的组合物，其中所述病毒样颗粒缺乏含脂蛋白的包膜。
11. 权利要求 1 的组合物，其中所述病毒样颗粒是一种重组病毒样颗粒。
- 15        12. 权利要求 11 的组合物，其中所述病毒样颗粒选自：
- (a) 重组乙型肝炎病毒蛋白；
- (b) 重组麻疹病毒蛋白；
- (c) 重组辛德毕斯病毒蛋白；
- (d) 重组轮状病毒蛋白；
- 20        (e) 重组口蹄疫病毒蛋白；
- (f) 重组逆转录病毒蛋白；
- (g) 重组诺瓦克病毒蛋白；
- (h) 重组人乳头瘤病毒蛋白；
- (i) 重组 BK 病毒蛋白；
- 25        (j) 重组噬菌体蛋白；
- (k) 重组 RNA 噬菌体蛋白；
- (l) 重组 Q $\beta$ -噬菌体蛋白；
- (m) 重组 GA-噬菌体蛋白；
- (n) 重组 fr-噬菌体蛋白；

- (o) 重组 AP 205-噬菌体蛋白;
- (p) 重组 Ty 蛋白; 和
- (q) (a)-(p)中任何一种重组蛋白的片段。

13. 权利要求 12 的组合物, 其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心蛋白。

14. 权利要求 12 的组合物, 其中所述病毒样颗粒是 BK 病毒 VP1 蛋白。

15. 权利要求 1 的组合物, 其中所述病毒样颗粒包含 RNA-噬菌体的重组蛋白或其片段。

16. 权利要求 15 的组合物, 其中所述 RNA-噬菌体选自:

- (a)噬菌体 Q $\beta$ ;
- (b)噬菌体 R17;
- (c)噬菌体 fr;
- (d)噬菌体 GA;
- (e)噬菌体 SP;
- (f)噬菌体 MS2;
- (g)噬菌体 M11;
- (h)噬菌体 MX1;
- (i)噬菌体 NL95;
- (k)噬菌体 f2;
- (l)噬菌体 PP7; 和
- (m)噬菌体 AP205。

17. 权利要求 1 的组合物, 其中所述病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 Q $\beta$ 的重组蛋白或其片段。

18. 权利要求 1 的组合物, 其中所述病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP 205 的重组蛋白或其片段。

19. 权利要求 9 的组合物, 其中含非甲基化 CpG 的寡核苷酸包含序列:



其中 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 是任一种核苷酸。

20. 权利要求 19 的组合物，其中至少所述核苷酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 之一含有磷酸骨架修饰。

21. 权利要求 9 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸包含或基本由或由选自下列的序列组成：

(a) TCCATGACGTTTCCTGAATAAT;

(b) TCCATGACGTTTCCTGACGTT;

(c) GGGGTCAACGTTGAGGGGG;

(d) GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG; 和

(e) 如表 1 所述的“dsCyCpG-253”。

22. 权利要求 21 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

23. 权利要求 9 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸是回文结构。

24. 权利要求 23 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的回文寡核苷酸包含或基本由或由序列 GGGGTCAACGTTGAGGGGG 组成。

25. 权利要求 24 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的回文寡核苷酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

26. 权利要求 1 的组合物，其中所述免疫刺激物与所述病毒样颗粒非共价结合。

27. 权利要求 9 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸与所述病毒样颗粒非共价结合。

28. 权利要求 5 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸与一种病毒样颗粒位点结合，该位点选自寡核苷酸结合位点、DNA 结合位点和 RNA 结合位点。

29. 权利要求 9 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸与一种病毒样颗粒位点结合，该位点选自寡核苷酸结合位点、DNA

结合位点和 RNA 结合位点。

30. 权利要求 29 的组合物，其中所述寡核苷酸结合位点是一种非天然存在的寡核苷酸结合位点。

31. 权利要求 29 的组合物，其中所述病毒样颗粒位点包含一个富含精氨酸的重复片段。

32. 权利要求 5 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

33. 权利要求 9 的组合物，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

34. 权利要求 5 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 6-约 100000 个核苷酸。

35. 权利要求 34 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 6-约 2000 个核苷酸。

36. 权利要求 35 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 20-约 2000 个核苷酸。

37. 权利要求 36 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 20-约 300 个核苷酸。

38. 权利要求 37 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含 20-100 个核苷酸。

39. 权利要求 5 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含超过 100-约 2000 个核苷酸。

40. 权利要求 39 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含超过 100-约 1000 个核苷酸。

41. 权利要求 40 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含超过 100-约 500 个核苷酸。

42. 权利要求 5 的组合物，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种重组寡核苷酸。

43. 权利要求 5 的组合物, 其中所述免疫刺激性核酸, 优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 是一种基因组寡核苷酸。

44. 权利要求 5 的组合物, 其中所述免疫刺激性核酸, 优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 是一种合成寡核苷酸。

5 45. 权利要求 5 的组合物, 其中所述免疫刺激性核酸, 优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 是一种质粒衍生的寡核苷酸。

46. 权利要求 5 的组合物, 其中所述免疫刺激性核酸, 优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 是一种单链寡核苷酸。

10 47. 权利要求 5 的组合物, 其中所述免疫刺激性核酸, 优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 是一种双链寡核苷酸。

48. 权利要求 2 的组合物, 其中所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒通过至少一个共价键结合。

15 49. 权利要求 2 的组合物, 其中所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒通过至少一个共价键结合, 其中该共价键是非肽键。

50. 权利要求 2 的组合物, 其中所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒融合。

51. 权利要求 2 的组合物, 其中所述抗原或抗原决定簇进一步包含至少一个第二附着位点, 该位点选自:

- 20 (a) 所述抗原或抗原决定簇中非天然存在的附着位点; 和  
(b) 所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点。

52. 权利要求 2 的组合物, 其进一步包含一种氨基酸接头, 其中该氨基酸接头包含或由所述第二附着位点组成。

25 53. 权利要求 2 的组合物, 其中所述抗原选自:  
(a) 多肽;

(b) 碳水化合物;

(c) 类固醇激素; 和

(d) 有机分子。

54. 权利要求 53 的组合物, 其中所述抗原是一种有机分子。

55. 权利要求 54 的组合物, 其中所述有机分子选自:

- (a) 可待因;
- (b) 芬太尼;
- (c) 海洛因;
- 5 (d) 吗啡;
- (e) 苯丙胺;
- (f) 可卡因;
- (g) 亚甲二氧基去氧麻黄碱;
- (h) 去氧麻黄碱;
- 10 (i) 哌甲酯;
- (j) 烟碱;
- (k) LSD;
- (l) 麦斯卡林;
- (m) 赛洛西宾; 和
- 15 (n) 四氢大麻酚。

56. 权利要求 2 的组合物, 其中所述抗原是一种重组抗原。

57. 权利要求 2 的组合物, 其中所述抗原来源于:

- (a) 病毒;
- (b) 细菌;
- 20 (c) 寄生虫;
- (d) 朊病毒;
- (e) 肿瘤;
- (f) 自身分子;
- (g) 非肽半抗原分子;
- 25 (h) 变应原; 和
- (i) 激素。

58. 权利要求 57 的组合物, 其中所述抗原是一种肿瘤抗原。

59. 权利要求 58 的组合物, 其中所述肿瘤抗原选自:

- (a) Her2;



- (b) GD2;
- (c) EGF-R;
- (d) CEA;
- (e) CD52;
- 5 (f) CD21;
- (g) 人黑素瘤蛋白 gp100;
- (h) 人黑素瘤蛋白 melan-A/MART-1;
- (i) 酪氨酸酶;
- (j) NA17-A nt 蛋白;
- 10 (k) MAGE-3 蛋白;
- (l) p53 蛋白;
- (m) HPV16 E7 蛋白;
- (n) (a)-(m)中任一种肿瘤抗原的抗原性片段。

15 60. 权利要求 2 的组合物, 其中所述抗原与所述病毒样颗粒通过连接序列结合。

61. 权利要求 60 的组合物, 其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心蛋白。

62. 权利要求 60 的组合物, 其中所述病毒样颗粒是 BK 病毒核心蛋白。

20 63. 权利要求 2 的组合物, 其中所述抗原是一种细胞毒性 T 细胞表位、Th 细胞表位或至少两种所述表位的组合, 其中所述至少两种表位直接结合或通过连接序列结合。

64. 权利要求 63 的组合物, 其中所述细胞毒性 T 细胞表位是病毒性或肿瘤细胞毒性 T 细胞表位。

25 65. 权利要求 63 的组合物, 其中所述抗原与所述病毒样颗粒通过连接序列结合。

66. 权利要求 63 的组合物, 其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心蛋白。

67. 权利要求 66 的组合物, 其中所述细胞毒性 T 细胞表位与乙

型肝炎病毒核心蛋白的 C 端融合。

68. 权利要求 67 的组合物，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述乙型肝炎病毒核心蛋白的 C 端通过连接序列融合。

69. 权利要求 63 的组合物，其中所述病毒样颗粒是 BK 病毒 VP1  
5 蛋白。

70. 权利要求 69 的组合物，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述 BK 病毒 VP1 蛋白的 C 端融合。

71. 权利要求 70 的组合物，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述 BK 病毒 VP1 蛋白的 C 端通过连接序列融合。

10 72. 一种增强动物免疫应答的方法，包括向所述动物体内导入一种组合物，该组合物包含：

(a) 一种病毒样颗粒；和

(b) 一种免疫刺激物；

其中所述免疫刺激物与所述病毒样颗粒结合。

15 73. 权利要求 72 的方法，其进一步包含一种抗原，其中所述抗原与所述病毒样颗粒结合。

74. 权利要求 72 的方法，其中所述免疫刺激物是一种 toll 样受体激活物。

20 75. 权利要求 72 的方法，其中所述免疫刺激物是一种细胞因子分泌诱导物。

76. 权利要求 74 的方法，其中所述 toll 样受体激活物选自或基本由下列成分组成：

(a) 免疫刺激性核酸；

(b) 肽聚糖；

25 (c) 脂多糖；

(d) 脂磷壁酸；

(e) 咪唑并喹啉化合物；

(f) 鞭毛蛋白；

(g) 脂蛋白；

(h) 免疫刺激性有机分子;  
(i) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸; 和  
(j) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和/或(i)中至少一种物质的任何混合物。

5 77. 权利要求 76 的方法, 其中所述免疫刺激物选自或基本由下列成分组成:

- (a) 核糖核酸;
- (b) 脱氧核糖核酸;
- (c) 嵌合核酸; 和

10 (d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种核酸的任何混合物。

78. 权利要求 77 的方法, 其中所述核糖核酸是 poly (I:C)或其衍生物。

79. 权利要求 77 的方法, 其中所述脱氧核酸选自或基本由下列成分组成:

- 15 (a) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸; 和
- (b) 不含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸。

80. 权利要求 72 的方法, 其中所述免疫刺激物是一种含非甲基化 CpG 的寡核苷酸。

20 81. 权利要求 72 的方法, 其中所述病毒样颗粒缺乏含脂蛋白的包膜。

82. 权利要求 72 的方法, 其中所述病毒样颗粒是一种重组病毒样颗粒。

83. 权利要求 82 的方法, 其中所述病毒样颗粒选自:

- 25 (a) 重组乙型肝炎病毒蛋白;
- (b) 重组麻疹病毒蛋白;
- (c) 重组辛德毕斯病毒蛋白;
- (d) 重组轮状病毒蛋白;
- (e) 重组口蹄疫病毒蛋白;
- (f) 重组逆转录病毒蛋白;

- (g) 重组诺瓦克病毒蛋白;  
(h) 重组人乳头瘤病毒蛋白;  
(i) 重组 BK 病毒蛋白;  
(j) 重组噬菌体蛋白;  
5 (k) 重组 RNA 噬菌体蛋白;  
(l) 重组 Q $\beta$ -噬菌体蛋白;  
(m) 重组 GA-噬菌体蛋白;  
(n) 重组 fr-噬菌体蛋白;  
(o) 重组 AP 205-噬菌体蛋白;  
10 (p) 重组 Ty 蛋白; 和  
(q) (a)-(p)中任何一种重组蛋白的片段。

84. 权利要求 83 的方法, 其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心蛋白。

85. 权利要求 83 的方法, 其中所述病毒样颗粒是 BK 病毒 VP1  
15 蛋白。

86. 权利要求 72 的方法, 其中病毒样颗粒包含 RNA-噬菌体的重组蛋白或其片段。

87. 权利要求 86 的方法, 其中所述 RNA-噬菌体选自:

- (a)噬菌体 Q $\beta$ ;  
20 (b)噬菌体 R17;  
(c)噬菌体 fr;  
(d)噬菌体 GA;  
(e)噬菌体 SP;  
(f)噬菌体 MS2;  
25 (g)噬菌体 M11;  
(h)噬菌体 MX1;  
(i)噬菌体 NL95;  
(k)噬菌体 f2;  
(l)噬菌体 PP7; 和

(m)噬菌体 AP205。

88. 权利要求 72 的方法，其中所述病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 Q $\beta$  的重组蛋白或其片段。

89. 权利要求 72 的方法，其中所述病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP 205 的重组蛋白或其片段。

90. 权利要求 80 的方法，其中含非甲基化 CpG 的寡核苷酸包含序列：

5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3'

其中 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 是任一种核苷酸。

91. 权利要求 90 的方法，其中至少所述核苷酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 之一含有磷酸骨架修饰。

92. 权利要求 80 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸包含或基本由或由选自下列的序列组成：

(a) TCCATGACGTTCCCTGAATAAT;

(b) TCCATGACGTTCCCTGACGTT;

(c) GGGGTCAACGTTGAGGGGG;

(d) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG; 和

(e) 如表 1 所述的“dsCyCpG-253”。

93. 权利要求 92 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

94. 权利要求 80 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸是回文结构。

95. 权利要求 94 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的回文寡核苷酸包含或基本由或由序列 GGGGTCAACGTTGAGGGGG 组成。

96. 权利要求 95 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的回文寡核苷酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

97. 权利要求 72 的方法，其中所述免疫刺激物与所述病毒样颗

粒非共价结合。

98. 权利要求 72 的方法，其中所述病毒样颗粒是在一种细菌表达系统中生产的。

5 99. 权利要求 72 的方法，其中所述病毒样颗粒是在一种酵母表达系统中生产的。

100. 权利要求 80 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸与所述病毒样颗粒非共价结合。

101. 权利要求 72 的方法，其中所述免疫刺激性核酸被所述病毒样颗粒包装，优选地包封。

10 102. 权利要求 80 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸被所述病毒样颗粒包装，优选地包封。

103. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸与一种病毒样颗粒位点结合，该位点选自寡核苷酸结合位点、DNA 结合位点和 RNA 结合位点。

15 104. 权利要求 80 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸与一种病毒样颗粒位点结合，该位点选自寡核苷酸结合位点、DNA 结合位点和 RNA 结合位点。

105. 权利要求 104 的方法，其中所述寡核苷酸结合位点是一种非天然存在的寡核苷酸结合位点。

20 106. 权利要求 104 的方法，其中所述病毒样颗粒位点包含一个富含精氨酸的重复片段。

107. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

25 108. 权利要求 80 的方法，其中所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸含有磷酸骨架的一个或多个硫代磷酸酯修饰，或者该寡核苷酸磷酸骨架的每个磷酸部分均为硫代磷酸酯修饰。

109. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 6-约 100000 个核苷酸。

110. 权利要求 109 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 6-约 2000 个核苷酸。
111. 权利要求 110 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 20-约 2000 个核苷酸。
- 5 112. 权利要求 111 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含约 20-约 300 个核苷酸。
113. 权利要求 112 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含 20-100 个核苷酸。
114. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含超过 100-约 2000 个核苷酸。
- 10 115. 权利要求 114 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含超过 100-约 1000 个核苷酸。
116. 权利要求 115 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，包含超过 100-约 500 个核苷酸。
- 15 117. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种重组寡核苷酸。
118. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种基因组寡核苷酸。
119. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种合成寡核苷酸。
- 20 120. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种质粒衍生的寡核苷酸。
121. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种单链寡核苷酸。
- 25 122. 权利要求 76 的方法，其中所述免疫刺激性核酸，优选地所述含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，是一种双链寡核苷酸。
123. 权利要求 73 的方法，其中所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒通过至少一个共价键结合。
124. 权利要求 73 的方法，其中所述至少一种抗原或抗原决定簇

与所述病毒样颗粒通过至少一个共价键结合，其中该共价键是非肽键。

125. 权利要求 73 的方法，其中所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒融合。

5        126. 权利要求 73 的方法，其中所述抗原或抗原决定簇进一步包含至少一个第二附着位点，该位点选自：

(a) 所述抗原或抗原决定簇中非天然存在的附着位点；和

(b) 所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点。

10       127. 权利要求 73 的方法，其进一步包含一种氨基酸接头，其中该氨基酸接头包含或由所述第二附着位点组成。

128. 权利要求 73 的方法，其中所述抗原选自：

(a) 多肽；

(b) 碳水化合物；

(c) 类固醇激素；和

15       (d) 有机分子。

129. 权利要求 128 的方法，其中所述抗原是一种有机分子。

130. 权利要求 129 的方法，其中所述有机分子选自：

(a) 可待因；

(b) 芬太尼；

20       (c) 海洛因；

(d) 吗啡；

(e) 苯丙胺；

(f) 可卡因；

(g) 亚甲二氧基去氧麻黄碱；

25       (h) 去氧麻黄碱；

(i) 哌甲酯；

(j) 烟碱；

(k) LSD；

(l) 麦斯卡林；



(m) 赛洛西宾; 和

(n) 四氢大麻酚。

131. 权利要求 73 的方法, 其中所述抗原是一种重组抗原。

132. 权利要求 73 的方法, 其中所述抗原来源于:

5

(a) 病毒;

(b) 细菌;

(c) 寄生虫;

(d) 朊病毒;

(e) 肿瘤;

10

(f) 自身分子;

(g) 非肽半抗原分子;

(h) 变应原; 和

(i) 激素。

133. 权利要求 132 的方法, 其中所述抗原是一种肿瘤抗原。

15

134. 权利要求 133 的方法, 其中所述肿瘤抗原选自:

(a) Her2;

(b) GD2;

(c) EGF-R;

(d) CEA;

20

(e) CD52;

(f) CD21;

(g) 人黑素瘤蛋白 gp100;

(h) 人黑素瘤蛋白 melan-A/MART-1;

(i) 酪氨酸酶;

25

(j) NA17-A nt 蛋白;

(k) MAGE-3 蛋白;

(l) p53 蛋白;

(m) HPV16 E7 蛋白;

(n) (a)-(m) 中任一种肿瘤抗原的抗原片段。

135. 权利要求 73 的方法，其中所述抗原与所述病毒样颗粒通过连接序列结合。

136. 权利要求 135 的方法，其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心蛋白。

5 137. 权利要求 135 的方法，其中所述病毒样颗粒是 BK 病毒 VP1 蛋白。

138. 权利要求 73 的方法，其中所述抗原是一种细胞毒性 T 细胞表位、Th 细胞表位或至少两种所述表位的组合，其中所述至少两种表位直接连接或通过连接序列连接。

10 139. 权利要求 138 的方法，其中所述细胞毒性 T 细胞表位是病毒性或肿瘤细胞毒性 T 细胞表位。

140. 权利要求 138 的方法，其中所述抗原与所述病毒样颗粒通过连接序列结合。

15 141. 权利要求 138 的方法，其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心蛋白。

142. 权利要求 141 的方法，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述乙型肝炎病毒核心蛋白的 C 端融合。

143. 权利要求 142 的方法，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述乙型肝炎病毒核心蛋白的 C 端通过连接序列融合。

20 144. 权利要求 138 的方法，其中所述病毒样颗粒是 BK 病毒 VP1 蛋白。

145. 权利要求 144 的方法，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述 BK 病毒 VP1 蛋白的 C 端融合。

25 146. 权利要求 145 的方法，其中所述细胞毒性 T 细胞表位与所述 BK 病毒 VP1 蛋白的 C 端通过连接序列融合。

147. 权利要求 72 的方法，其中所述免疫应答是增强的 B 细胞应答。

148. 权利要求 72 的方法，其中所述免疫应答是增强的 T 细胞应答。

149. 权利要求 148 的方法，其中所述 T 细胞应答是一种 CTL 应答。

150. 权利要求 148 的方法，其中所述 T 细胞应答是一种 Th 细胞应答。

5 151. 权利要求 150 的方法，其中所述 Th 细胞应答是 Th1 细胞应答。

152. 权利要求 72 的方法，其中所述动物是一种哺乳动物。

153. 权利要求 152 的方法，其中所述哺乳动物是人。

154. 权利要求 72 的方法，其中所述组合物通过皮下、肌肉内、  
10 静脉内、鼻内或直接导入淋巴结内来导入动物体内。

155. 一种生产可增强动物免疫应答的组合物的方法，该组合物包含一种病毒样颗粒和与所述病毒样颗粒结合的免疫刺激物，该方法包括：

(a)所述病毒样颗粒与所述免疫刺激物一起孵育；

15 (b)添加 RNase；和

(c)纯化该组合物。

156. 权利要求 155 的方法，其中所述免疫刺激物是一种免疫刺激性核酸，其选自或基本由下列成分组成：

(a) 核糖核酸；

20 (b) 脱氧核糖核酸；

(c) 嵌合核酸；和

(d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种核酸的任何混合物。

157. 权利要求 156 的方法，其中所述核糖核酸是 poly (I:C)或其衍生物。

25 158. 权利要求 156 的方法，其中所述脱氧核酸选自或基本由下列成分组成：

(a) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸；和

(b) 不含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸。

159. 权利要求 155 的方法，其中所述免疫刺激物是一种含非甲

基化 CpG 的寡核苷酸。

160. 权利要求 155 的方法，其中所述病毒样颗粒是在一种细菌表达系统中生产的。

161. 权利要求 155 的方法，其中所述 RNase 是 RNase A。

5 162. 一种生产可增强动物免疫应答的组合物的方法，所述组合物包含病毒样颗粒和与所述病毒样颗粒结合的免疫刺激物，该方法包括：

(a) 将所述病毒样颗粒与 Rnase 一起孵育；

(b) 添加所述免疫刺激物；和

10 (c) 纯化该组合物。

163. 权利要求 162 的方法，其中所述免疫刺激物是一种免疫刺激性核酸，其选自或基本由下列成分组成：

(a) 核糖核酸；

(b) 脱氧核糖核酸；

15 (c) 嵌合核酸；和

(d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种核酸的任何混合物。

164. 权利要求 163 的方法，其中所述核糖核酸是 poly (I:C)或其衍生物。

20 165. 权利要求 163 的方法，其中所述脱氧核酸选自或基本由下列成分组成：

(a) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸；和

(b) 不含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸。

166. 权利要求 162 的方法，其中所述免疫刺激物是一种含非甲基化 CpG 的寡核苷酸。

25 167. 权利要求 162 的方法，其中所述病毒样颗粒是在一种细菌表达系统中生产的。

168. 权利要求 162 的方法，其中所述 RNase 是 RNase A。

169. 一种生产可增强动物免疫应答的组合物的方法，该组合物包含病毒样颗粒和与所述病毒样颗粒结合的免疫刺激物，该方法包

括:

- (a)解装配所述病毒样颗粒;
- (b)添加所述免疫刺激物; 和
- (c)重装配所述病毒样颗粒。

5       170. 权利要求 169 的方法, 其中所述免疫刺激物是一种免疫刺激性核酸, 其选自或基本由下列成分组成:

- (a) 核糖核酸;
- (b) 脱氧核糖核酸;
- (c) 嵌合核酸; 和

10       (d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种核酸的任何混合物。

171. 权利要求 170 的方法, 其中所述核糖核酸是 poly (I:C)或其衍生物。

172. 权利要求 170 的方法, 其中所述脱氧核酸选自或基本由下列成分组成:

- 15       (a) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸; 和
- (b) 不含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸。

173. 权利要求 169 的方法, 其中所述免疫刺激物是一种含非甲基化 CpG 的寡核苷酸。

20       174. 权利要求 169 的方法, 其进一步包括除去解装配的病毒样颗粒中的核酸。

175. 权利要求 169 的方法, 其进一步包括在重装配(c)后纯化所述组合物。

25       176. 一种生产可增强动物免疫应答的组合物的方法, 该组合物包含病毒样颗粒和与所述病毒样颗粒结合的免疫刺激物, 该方法包括:

- (a)将所述病毒样颗粒与包含金属离子、能够水解所述病毒样颗粒中核酸的溶液一起孵育;
- (b)添加所述免疫刺激物; 和
- (c)纯化该组合物。

177. 权利要求 176 的方法，其中所述免疫刺激物是一种免疫刺激性核酸，其选自或基本由下列成分组成：

- (a) 核糖核酸；
- (b) 脱氧核糖核酸；
- 5 (c) 嵌合核酸；和
- (d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种核酸的任何混合物。

178. 权利要求 177 的方法，其中所述核糖核酸是 poly (I:C)或其衍生物。

179. 权利要求 177 的方法，其中所述脱氧核酸选自或基本由下列成分组成：

- (a) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸；和
- (b) 不含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸。

180. 权利要求 176 的方法，其中所述免疫刺激物是一种含非甲基化 CpG 的寡核苷酸。

181. 权利要求 176 的方法，其中所述金属离子选自：

- (a) 锌 (Zn) 离子；
- (b) 铜 (Cu) 离子；
- (c) 铁 (Fe) 离子；和
- (d) (a)、(b)和/或(c)中至少一种离子的任何混合物。

182. 一种疫苗，其包含免疫有效量的权利要求 1 的组合物，和一种药物可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

183. 权利要求 182 的疫苗，其还包含一种佐剂。

184. 一种免疫或治疗动物的方法，包括对所述动物施用免疫有效量的权利要求 182 的疫苗。

185. 权利要求 184 的方法，其中所述动物是一种哺乳动物。

186. 权利要求 185 的方法，其中所述哺乳动物是人。

187. 一种疫苗，其包含免疫有效量的权利要求 2 的组合物，和一种药物可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

188. 权利要求 187 的疫苗，其还包含一种佐剂。

189. 一种免疫或治疗动物的方法，包括对所述动物施用免疫有效量的权利要求 187 的疫苗。
190. 权利要求 189 的方法，其中所述动物是一种哺乳动物。
191. 权利要求 190 的方法，其中所述哺乳动物是人。
- 5 192. 一种免疫或治疗动物的方法，包括通过施用免疫有效量的权利要求 182 的疫苗，在所述动物中引发 T 细胞应答。
193. 权利要求 192 的方法，其进一步包括在所述动物中加强免疫应答的步骤。
194. 权利要求 193 的方法，其中通过施用免疫有效量的权利要求 10 182 的疫苗或免疫有效量的异种疫苗实现这种加强。
195. 权利要求 194 的方法，其中所述异种疫苗是一种 DNA 疫苗。
196. 一种免疫或治疗动物的方法，包括通过施用免疫有效量的权利要求 182 的疫苗，在所述动物中加强 T 细胞应答。
197. 权利要求 196 的方法，其进一步包括在所述动物中引发 T 15 细胞应答的步骤。
198. 权利要求 197 的方法，其中通过施用免疫有效量的权利要求 182 的疫苗或免疫有效量的异种疫苗实现这种引发。
199. 权利要求 198 的方法，其中所述异种疫苗是一种 DNA 疫苗。
200. 一种免疫或治疗动物的方法，包括通过施用免疫有效量的 20 权利要求 187 的疫苗，在所述动物中引发 T 细胞应答。
201. 权利要求 200 的方法，其进一步包括在所述动物中加强免疫应答的步骤。
202. 权利要求 201 的方法，其中通过施用免疫有效量的权利要求 187 的疫苗或免疫有效量的异种疫苗实现这种加强。
- 25 203. 权利要求 202 的方法，其中所述异种疫苗是一种 DNA 疫苗或病毒疫苗或金丝雀痘疫苗。
204. 一种免疫或治疗动物的方法，包括通过施用免疫有效量的权利要求 187 的疫苗，在所述动物中加强 T 细胞应答。
205. 权利要求 204 的方法，其进一步包括在所述动物中引发 T

细胞应答的步骤。

206. 权利要求 205 的方法，其中通过施用免疫有效量的权利要求 187 的疫苗或免疫有效量的异种疫苗实现这种引发。

207. 权利要求 206 的方法，其中所述异种疫苗是一种 DNA 疫苗  
5 或病毒疫苗或金丝雀痘疫苗。



## 免疫刺激物向病毒样颗粒内的包装：制备方法与用途

### 5 发明背景

#### 发明领域

本发明涉及疫苗学、免疫学和医学领域。通过将免疫刺激物，特别是免疫刺激性核酸，更具体而言是含有至少一种非甲基化 CpG 序列的寡核苷酸，包装到病毒样颗粒（VLP）内，本发明提供用于增强免疫应答的组合物和方法，该应答针对 VLP 或者针对与 VLP 偶联、融合或以其他方式附着的抗原。本发明能用来诱发强烈、持续的 T 细胞应答，尤其可用于肿瘤和慢性病毒病以及变态反应和其它慢性的治疗。

#### 15 相关技术

免疫系统的本质建立在两个不同的基础支柱上：一个是特异性或获得性免疫，其特征在于相对较慢的应答动力学和记忆能力；另一个是非特异性或先天免疫，其显示快速的应答动力学，但缺乏记忆。淋巴细胞是获得性免疫系统的关键角色。每种淋巴细胞都表达具有独特特异性的抗原受体。在通过该受体识别抗原后，淋巴细胞增殖并产生效应功能。只有很少的淋巴细胞显示对一种给定抗原或病原体的特异性，通常需要大量增殖才能检测到效应应答—因此，获得性免疫系统具有较慢的动力学。由于相当一部分扩增淋巴细胞存活，并且在抗原消失后仍可保留一定的效应功能，当第二次遇到该抗原时，获得性免疫系统反应较快。这就是记忆能力的基础。

淋巴细胞对一种病原体的特异性仅局限于少数细胞，必须增殖才能获得功能，与之相反，先天免疫系统的细胞和分子通常大量存在，而且识别与病原体有关的数量有限的固定特征（Medzhitov, R. 和 Janeway, C.A., Jr., Cell 91:295-298 (1997)）。这类模式的例子包括脂

多糖 (LPS)、富含非甲基化 CG 的 DNA (CpG) 或双链 RNA, 它们分别是细菌和病毒感染特异的。

大多数免疫学研究都集中于获得性免疫系统, 只是最近先天免疫系统才受到关注。在历史上, 获得性和先天性免疫系统是作为两个不同的体系来处理和分析的, 它们很少有共性。由于这种差异, 很少有研究人员想知道为什么当使用刺激先天免疫的佐剂时抗原对特异性免疫系统的免疫原性大大增强 (Sotomayor, E.M.等人, *Nat. Med.* 5:780 (1999); Diehl, L.等人, *Nat. Med.* 5:774 (1999); Weigle, W.O., *Adv. Immunol.* 30:159 (1980))。然而, 这一问题的答案对于了解免疫系统以及理解保护性免疫与自身免疫之间的平衡十分关键。

对先天免疫系统的理性操作, 特别是激活参与 T 细胞引发 (priming) 的 APC 以有意诱发自身特异性 T 细胞应答, 提供了一种以 T 细胞为基础的肿瘤治疗方法。因此, 当前大多数治疗都集中在使用激活的树状细胞 (DC) 作为抗原载体, 以诱发持续的 T 细胞应答 (Nestle 等人, *Nat. Med.* 4:328 (1998))。同样, 为了提高肿瘤细胞的免疫原性, 与肿瘤细胞一起使用先天免疫系统的体内激活剂, 如 CpG 或抗-CD40 抗体 (Sotomayor, E.M.等人, *Nat. Med.* 5:780 (1999); Diehl, L.等人, *Nat. Med.* 5:774 (1999))。

刺激先天免疫的因子对 APC 的普遍激活通常可能是引发自身特异性淋巴细胞和自身免疫的原因。这种激活可提高共同刺激分子或细胞因子 (如 IL-12 或 IFN $\alpha$ ) 的表达。这一观点与以下发现一致: 与甲状腺提取物一起施以 LPS 能够克服耐受并引发自身免疫甲状腺炎 (Weigle, W.O., *Adv. Immunol.* 30:159 (1980))。而且, 在转基因小鼠模型上, 最近发现单独施以自身肽没能引起自身免疫, 除非 APC 被另一种途径激活 (Garza, K.M.等人, *J. Exp. Med.* 191:2021 (2000))。以下发现进一步强调了先天免疫与自身免疫病之间的联系: LPS、病毒感染或 APC 的普遍激活可延迟或防止外周耐受的形 (Vella, A.T.等人, *Immunity* 2:261 (1995); Ehl, S.等人, *J. Exp. Med.* 187:763 (1998); Maxwell, J.R.等人, *J. Immunol.* 162:2024 (1999))。这样, 先天免疫不

仅可增强自身特异性淋巴细胞的激活，而且可抑制其随后消失。这些发现可以扩展到肿瘤生物学和慢性病毒病的控制。

用次要组织相容性抗原（如 HY 抗原）免疫后细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答的诱发需要 T 辅助细胞 (Th 细胞) 存在 (Husmann, L.A. 和 M.J. Bevan, *Ann. NY. Acad. Sci.* 532:158 (1988); Guerder, S. 和 P. Matzinger, *J. Exp. Med.* 176:553 (1992))。通过交叉引发，即用可到达 I 类途径的外源抗原引发而诱导的 CTL 应答，也需要 Th 细胞存在 (Bennett, S.R.M. 等人, *J. Exp. Med.* 186:65 (1997))。这些发现对于肿瘤治疗具有重要意义, T 辅助细胞对于肿瘤细胞诱发保护性 CTL 应答可能非常重要 (Ossendorp, F. 等人, *J. Exp. Med.* 187:693 (1998))。

活化的 Th 细胞上的一种重要效应分子是 CD40-配体 (CD40L)，它可与 B 细胞、巨噬细胞和树状细胞 (DC) 上的 CD40 相互作用 (Foy, T.M. 等人, *Annu. Rev. Immunol.* 14:591 (1996))。B 细胞上 CD40 的触发对于同型转换和产生 B 细胞记忆是不可缺少的 (Foy, T.M. 等人, *Ann. Rev. Immunol.* 14:591 (1996))。最近表明，巨噬细胞和 DC 上 CD40 的刺激导致它们的激活和成熟 (Cella, M. 等人, *Curr. Opin. Immunol.* 9:10 (1997); Banchereau, J. 和 R.M. Steinman, *Nature* 392:245 (1998))。具体而言, DC 在激活后上调共同刺激分子并产生细胞因子, 如 IL-12。有意思的是, 这种 CD40L 介导的 DC 成熟似乎导致对 CTL 应答的辅助作用。实际上, 最近表明, Th 细胞引起的 CD40 触发使 DC 能够启动 CTL 应答 (Ridge, J.P. 等人, *Nature* 393:474 (1998); Bennett, S.R.M. 等人, *Nature* 393:478 (1998); Schoenenberger, S.P. 等人, *Nature* 393:480 (1998))。这与较早前的发现相一致: Th 细胞识别与 CTL 相同的 APC 上的配体, 表明它们需要相同的相互作用 (Bennett, S.R.M. 等人, *J. Exp. Med.* 186:65 (1997))。因此 CD40L 介导的 Th 细胞刺激导致 DC 的激活, 后者随后能够引发 CTL 应答。对于人类, I 型干扰素, 特别是干扰素  $\alpha$  和  $\beta$ , 可能与 IL-12 一样重要。

与这些依赖 Th 的 CTL 应答不同, 病毒通常能够在没有 T 辅助细胞的情况下诱发保护性 CTL 应答 (综述见 Bachmann, M.F. 等人, J.

Immunol. 161:5791 (1998))。具体而言,淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)(Leist, T.P.等人, J. Immunol. 138:2278 (1987); Ahmed, R.等人, J. Virol. 62:2102 (1988); Battegay, M.等人, Cell Immunol. 167:115 (1996); Borrow, P.等人, J. Exp. Med. 183:2129 (1996); Whitmire, J.K.等人, J. Virol. 70:8375 (1996))、水泡性口炎病毒(VSV)(Kündig, T.M.等人, Immunity 5:41 (1996))、流感病毒(Tripp, R.A.等人, J. Immunol. 155:2955 (1995))、痘苗病毒(Leist, T.P.等人, Scand. J. Immunol. 30:679 (1989))和小鼠脱脚病病毒(Buller, R.等人, Nature 328:77 (1987))在CD4<sup>+</sup> T细胞耗尽或II类或CD40表达缺陷的小鼠中能够引发CTL应答。病毒的这种不依赖Th细胞的CTL引发机制现在还不清楚。而且,大多数病毒不能完全刺激不依赖Th细胞的CTL应答,但是在Th细胞缺陷小鼠中病毒特异的CTL活性降低。因此, Th细胞可增强抗病毒CTL应答,但是这种辅助机制尚未完全清楚。最近表明, DC通过交叉引发呈递流感来源的抗原(Albert, M.L.等人, J. Exp. Med. 188:1359 (1998); Albert, M.L.等人, Nature 392:86 (1998))。因此,与次要组织相容性抗原和肿瘤抗原相似(Ridge, J.P.等人, Nature 393:474 (1998); Bennett, S.R.M.等人, Nature 393:478 (1998); Schoenenberger, S.P.等人, Nature 393:480 (1998)), Th细胞可能通过DC上的CD40触发辅助CTL的诱导。因此,利用CD40L或抗-CD40抗体刺激CD40可增强病毒或肿瘤细胞刺激后的CTL诱导。

然而,尽管CD40L是一种重要的DC激活剂,但是在免疫应答过程中似乎还有其它分子能够刺激DC的成熟和激活。实际上,CD40与LCMV或VSV特异性CTL的诱导没有明显相关性(Ruedl, C.等人, J. Exp. Med. 189:1875 (1999))。因此,尽管VSV特异的CTL应答部分依赖于CD4<sup>+</sup> T细胞的存在(Kündig, T.M.等人, Immunity 5:41 (1996)),但是这种辅助作用不是由CD40L介导的。在免疫应答过程中触发DC成熟的效应分子的候选者包括Trance和TNF $\alpha$ (Bachmann, M.F.等人, J. Exp. Med. 189:1025 (1999); Sallusto, F.和A. Lanzavecchia, J. Exp. Med. 179:1109 (1994))。

已经明确，单独施用纯化蛋白质通常不足以引起强烈的免疫应答；分离的抗原通常必须与被称为佐剂的辅助物质一起施用。施用的抗原在这些佐剂内受到保护，不会被快速降解，佐剂导致长时间释放低水平抗原。

- 5 与分离的蛋白质不同，在不用任何佐剂、有及没有 T 细胞辅助的情况下，病毒诱导快速、有效的免疫应答 (Bachmann & Zinkernagel, *Ann. Rev. Immunol.* 15:235-270 (1997))。尽管病毒通常几乎不含蛋白质，但它们比其分离的成分能引发更强的免疫应答。对于 B 细胞应答，众所周知病毒免疫原性的一个关键因素是表面表位的重复性和秩序。
- 10 许多病毒展示一种准晶体表面，其表面显示规则的表位阵列，可有效地将表位特异性免疫球蛋白交联在 B 细胞上 (Bachmann & Zinkernagel, *Immunol. Today* 17:553-558 (1996))。B 细胞上表面免疫球蛋白的这种交联是一种强激活信号，可直接诱导细胞周期的进展和 IgM 抗体的产生。进而，这些触发的 B 细胞能够激活 T 辅助细胞，进而诱导 B 细胞中由产生 IgM 抗体向产生 IgG 抗体的转换，以及长期 B
- 15 细胞记忆的产生——这是所有接种的目标 (Bachmann & Zinkernagel, *Ann. Rev. Immunol.* 15:235-270 (1997))。病毒结构甚至与自身免疫病中抗抗体的产生有关，是对病原体的自然应答的一部分 (参见 Fehr, T. 等人, *J. Exp. Med.* 185:1785-1792 (1997))。因此，以规则、重复阵列
- 20 组织起来的病毒颗粒上的抗原具有高度的免疫原性，因为它们能够直接激活 B 细胞。

- 除了强 B 细胞应答外，病毒颗粒也能诱导细胞毒性 T 细胞应答的产生，这是免疫系统的另一个重要目标。对于非细胞病变病毒 (如 HIV 或乙型肝炎病毒) 的消除和肿瘤的根除而言，这些细胞毒性 T 细胞特别重要。细胞毒性 T 细胞不识别天然抗原，而是识别与 MHC I
- 25 类分子结合的降解产物 (Townsend & Bodmer, *Ann. Rev. Immunol.* 7:601-624 (1989))。巨噬细胞和树状细胞能够摄取并加工外源病毒颗粒 (而不是其可溶性分离成分)，并且将产生的降解产物呈递给细胞毒性 T 细胞，使其激活并增殖 (Kovacsovic-Bankowski 等人, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 90:4942-4946 (1993); Bachmann 等人, Eur. J. Immunol. 26:2595-2600 (1996) )。

作为抗原的病毒颗粒与其分离的成分相比表现出两个优点：(1) 由于具有高度重复的表面结构，它们能够直接激活 B 细胞，产生高抗体滴度和长期的 B 细胞记忆；(2) 病毒颗粒，而不是可溶性蛋白质，具有诱发细胞毒性 T 细胞应答的能力，即使这些病毒是非感染性的且不使用佐剂。

几种新的疫苗策略是利用病毒所固有的免疫原性。这些方法中一些集中在病毒颗粒的颗粒性质上；例如，参见 Harding, C.V.和 Song, R. (J. Immunology 153:4925 (1994))，它公开了一种由乳胶珠和抗原组成的疫苗；Kovacsovic-Bankowski, M.等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4942-4946 (1993))，它公开了一种由氧化铁珠和抗原组成的疫苗；授予 Kossovsky, N.等人的美国专利号 5,334,394，它公开了抗原包被的核心颗粒；美国专利号 5,871,747，它公开了在表面上含有与之共价键合的一种或多种蛋白质的合成聚合物颗粒；和一种含有非共价结合的包被的核心颗粒，这种包被至少部分覆盖该核心颗粒的表面，以及与该包被核心颗粒接触的至少一种生物活性剂（参见，如 WO 94/15585）。

在进一步的发展中，由于病毒样颗粒（VLP）的结构特征及其非感染性，它们在疫苗生产领域得到应用。VLP 是由一种或多种类型的许多蛋白质分子以对称形式构成的超分子结构。它们缺乏病毒基因组，因此是非感染性的。VLP 通常能通过异源表达大量生产，并且易于纯化。

另外，例如在细菌和大多数非脊椎动物中存在的富含非甲基化 CG 基序（CpG）的 DNA，在体外及体内对 B 细胞、树状细胞和其它 APC 都显示强刺激活性。尽管细菌 DNA 在许多脊椎动物种之间是免疫刺激性的，但是具体 CpG 基序可能不同。实际上，刺激小鼠免疫细胞的 CpG 基序可能不一定刺激人免疫细胞，反之亦然。

尽管富含 CpG 基序的 DNA 寡聚体显示免疫刺激能力，但其有效

性通常有限，因为它们在体外及体内均不稳定。因此，它们显示不好的药代动力学。于是，为了使 CpG-寡核苷酸更加有效，通过向磷酸骨架引入硫代磷酸修饰来稳定它们通常是必要的。

5 使用 CpG-寡核苷酸刺激免疫应答的第二个局限性是它们缺乏特异性，因为与 CpG-寡核苷酸接触的所有 APC 和 B 细胞都受到刺激。因此，稳定或包装它们，将其细胞激活作用局限于同样呈递相关抗原的细胞，可提高 CpG-寡核苷酸的有效性和特异性。

10 另外，免疫刺激性 CpG-寡脱氧核苷酸也诱发严重的副作用，在小鼠中引起髓外血细胞形成伴脾大和淋巴结病（Sparwasser 等人, J. Immunol. (1999), 162:2368-74 和实施例 18）。

VLP 已经证明可在 MHC I 类分子上有效呈递，它们可能在通过微胞饮作用摄取后被有效加工并在 MHC I 类上交叉引发。交叉引发机制迄今为止尚不清楚，但是已经提出了依赖 TAP 和不依赖 TAP 的途径。

15 最近疫苗接种策略已经取得显著进展，但是现有策略仍然需要改进。特别是，本领域仍然需要研制新的改进的疫苗，与天然病原体一样有效地引起强 CTL 免疫应答和抗病原体保护，而 APC 和其它细胞未被普遍激活。

## 20 发明概述

本发明基于以下的意外发现：免疫刺激物如 DNA 寡核苷酸能够包装到 VLP 内，使其免疫原性增强。出乎意料的是，VLP 内的核酸和寡核苷酸分别能够用免疫刺激物和含有 CpG 基序的 DNA-寡核苷酸特异替换。令人吃惊的是，这些包装的免疫刺激物，特别是免疫刺激性核酸，如含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，保留了其免疫刺激能力，  
25 但是不会广泛激活先天免疫系统。根据本发明的含有 VLP 和免疫刺激物的组合物，特别是 CpG-VLP，免疫原性显著强于不含 CpG 的对应物，并且诱发更强的 B 和 T 细胞应答。针对与 VLP 任选地偶联、融合或以其他方式附着的抗原的免疫应答与针对 VLP 本身的免疫应

答相似地增强。另外，针对 VLP 和抗原的 T 细胞应答尤其集中于 Th1 型。因此，附着于含 CpG 的 VLP 的抗原可能是用于变态反应、肿瘤和其它自身分子和慢性病毒病的预防或治疗接种的理想疫苗。

5 在第一个实施方案中，本发明提供一种用于增强动物免疫应答的组合物，其包含病毒样颗粒和免疫刺激物，优选地免疫刺激性核酸，更优选地含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，其中所述免疫刺激物、核酸或寡核苷酸与病毒颗粒偶联、融合或以其他方式附着，或被后者包封，即结合。在另一个实施方案中，该组合物还包含与病毒样颗粒结合的抗原。

10 在本发明的一个优选实施方案中，免疫刺激性核酸，特别是含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，通过磷酸骨架的硫代磷酸修饰而稳定化。在另一个优选实施方案中，免疫刺激性核酸，特别是含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，通过消化 VLP 内的 RNA 同时添加含有所选 CpG 的 DNA 寡核苷酸，而被包装到 VLP 内。在一个同样优选的实施方案中，可  
15 将 VLP 解装配，之后在 CpG 存在下重装配。

在一个更优选的实施方案中，免疫刺激性核酸不含 CpG 基序，但是显示免疫刺激活性。这些核酸在 WO 01/22972 中有描述。该文献中所述的所有序列在此引用作为参考。

20 在一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒是一种重组病毒样颗粒。同样优选地，病毒样颗粒不含脂蛋白包膜。优选地，重组病毒样颗粒包含或者由下列成分组成：乙型肝炎病毒、BK 病毒或其它人多瘤病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺瓦克病毒或人乳头瘤病毒、RNA-噬菌体、Q $\beta$ -噬菌体、GA-噬菌体、fr-噬菌体和 Ty 的重组蛋白。在一个具体实施方案中，病毒  
25 样颗粒包含或者由一种或多种不同乙型肝炎病毒核心（衣壳）蛋白（HBcAg）组成。

在一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含 RNA-噬菌体的重组蛋白或其片段。优选的 RNA-噬菌体是 Q $\beta$ -噬菌体、AP 205-噬菌体、GA-噬菌体、fr-噬菌体。



在另一个实施方案中，抗原是一种重组抗原。在另一个实施方案中，抗原可选自：（1）适于诱发对癌细胞的免疫应答的多肽；（2）适于诱发对传染病的免疫应答的多肽；（3）适于诱发对变应原的免疫应答的多肽；（4）适于诱发对自身抗原的增强应答的多肽；（5）  
5 适于在家畜或宠物中诱发免疫应答的多肽。

在另一个实施方案中，抗原可选自：（1）适于诱发对癌细胞的免疫应答的有机分子；（2）适于诱发对传染病的免疫应答的有机分子；（3）适于诱发对变应原的免疫应答的有机分子；（4）适于诱发对自身抗原的增强应答的有机分子；（5）适于在家畜或宠物中诱发  
10 免疫应答的有机分子；（6）适于诱发对药物、激素或毒性化合物的应答的有机分子。

在一个具体实施方案中，抗原包含或由毒性 T 细胞表位组成。在一个相关实施方案中，病毒样颗粒包含乙型肝炎病毒核心蛋白，细胞毒性 T 细胞表位与该乙型肝炎核心蛋白的 C 端融合。在一个实施方案  
15 中，它们通过亮氨酸连接序列融合。

本发明的另一方面，提供了一种增强人或其它动物的免疫应答的方法，包括向该动物体内导入一种组合物，该组合物包含病毒样颗粒和免疫刺激物，优选地免疫刺激性核酸，更优选地含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，其中该刺激物，优选地核酸，更优选地寡核苷酸，与该  
20 病毒样颗粒结合（即偶联、附着或包封）。在另一个实施方案中，该组合物还包含与病毒样颗粒结合的抗原。

在本发明的另一个实施方案中，组合物通过皮下、肌肉内、鼻内、皮内、静脉内或直接导入淋巴结内来导入动物体内。在一个同样优选的实施方案中，局部施用这种免疫增强组合物，在希望接种的肿瘤或  
25 局部病毒灶附近施用。

在本发明的一个优选方面，免疫应答是 T 细胞应答，针对抗原的 T 细胞应答增强。在一个具体实施方案中，T 细胞应答是细胞毒性 T 细胞应答，针对抗原的细胞毒性 T 细胞应答增强。

本发明也涉及一种疫苗，其包含免疫有效量的本发明的免疫增强

组合物，以及药学可接受的稀释剂、载体或赋形剂。在一个优选实施方案中，该疫苗还包含至少一种佐剂，如弗氏不完全佐剂。本发明也提供一种免疫和/或治疗动物的方法，包括对动物施以免疫有效量的本发明公开的疫苗。

- 5        在本发明的一个优选实施方案中，含有免疫刺激物的 VLP，优选地含有免疫刺激性核酸的 VLP，更优选地含有非甲基化 CpG 的寡核苷酸 VLP，用于接种动物或人，以对抗 VLP 本身或与 VLP 偶联、融合或附着的抗原。这种经修饰的 VLP 可以用来例如分别针对肿瘤、病毒病、自身分子和自身抗原或非肽小分子接种。这种接种可以是用
- 10 于预防或治疗目的，或者同时用于这两种目的。该修饰的 VLP 也能用来对变态反应接种，以诱导免疫偏离。

- 在大多数情况下，希望的免疫应答是针对与含免疫刺激物的 VLP、优选地含免疫刺激性核酸的 VLP、更优选地含非甲基化 CpG 的寡核苷酸 VLP 偶联、融合或以其他方式附着的抗原。抗原可以是
- 15 肽、蛋白质、结构域、碳水化合物或小分子，如类固醇激素或药物，如烟碱。在某些条件下，希望的免疫应答可以是针对 VLP 本身。后一种用途将用于 VLP 来源于希望接种对抗的病毒的情况。

- 注射途径优选的是皮下或肌肉内，但是也可以通过真皮内、鼻内、静脉内或直接导入淋巴结内来给予含 CpG 的 VLP。在一个同样优选
- 20 的实施方案中，局部施用含 CpG 的抗原偶联的或游离的 VLP，在希望接种的肿瘤或局部病毒灶附近施用。

应当理解，以上的概述和下面的详述只是代表性和说明性的，旨在进一步说明申请保护的本发明。

## 25 附图简述

图 1 显示 CpG-寡核苷酸的 DNA 序列 (A) 和来源于乙型肝炎病毒核心的含 p33 肽的 VLP 的 DNA 序列 (B)。九聚体 p33 表位与乙型肝炎核心蛋白的 C 端在位点 185 处通过一个三亮氨酸连接序列以基因工程方法融合。

图 2 显示通过电子显微镜检查 (A) 和 SDS-PAGE (B) 分析的 p33-VLP 的结构。重组生产的野生型 VLP (由 HBcAg [aa 1-185] 单体组成) 和 p33-VLP 上样到 Sephacryl S-400 凝胶过滤柱 (Amersham Pharmacia Biotechnology AG) 上进行纯化。合并的级分上样到羟基磷灰石柱上。收集流出液 (含有纯化的 HBc 衣壳), 加样到还原性 SDS-PAGE 凝胶上进行单体分子量分析 (B)。

图 3 显示在对照孵育后或 RNase A 消化后, 非变性琼脂糖凝胶电泳 (1% 琼脂糖) 中的 p33-VLP, 用溴化乙锭 (A) 或考马斯蓝 (B) 染色, 以分析 RNA 或蛋白质的存在。重组生产的 p33-VLP 用 PBS 缓冲液稀释到终浓度  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  蛋白质, 在不含 (1 道) 或含有 (2 道) RNase A ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma, Division of Fluka AG, 瑞士) 的条件下  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 小时。随后向样品中补充 6 倍浓 DNA 加样缓冲液 (MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国), 在 1% 非变性琼脂糖凝胶中以 100 伏特电压电泳 30 分钟。用 Gene Ruler 标准 (MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国) 作为 p33-VLP 迁移速度的参照 (M 道)。箭头表明存在包装于 p33-VLP 中的 RNA (A) 或 p33-VLP 衣壳本身 (B)。在 3 个独立实验中获得了相同的结果。

图 4 显示在只有缓冲液或有含 CpG 的 DNA-寡聚体的存在下, 在对照孵育后或 RNase A 消化后, 非变性琼脂糖凝胶电泳 (1% 琼脂糖) 中的 p33-VLP, 用溴化乙锭 (A) 或考马斯蓝 (B) 染色, 以分析 RNA/DNA 或蛋白质的存在。重组 p33-VLP 用 PBS 缓冲液稀释到终浓度  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  蛋白质, 并在不含 (1 道) 或含有 (2 道) RNase A ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma, Division of Fluka AG, 瑞士) 的条件下  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 小时。在 RNase A 消化之前向样品 3 中添加  $5 \text{ nmol}$  CpG-寡核苷酸 (骨架含有硫代磷酸修饰)。用 Gene Ruler 标准 (MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国) 作为 p33-VLP 迁移速度的参照 (M 道)。箭头表明存在包装于 p33-VLP 中的 RNA 或 CpG-寡核苷酸 (A) 或存在 p33-VLP 衣壳本身 (B)。当 VLP 与 RNase A 共孵育中使用含磷酸二酯键的 CpG-寡核苷酸时, 获得相同的结果。

图 5 显示在存在含 CpG 的 DNA-寡聚体及随后透析(为了除去未与 VLP 结合的 CpG DNA)的条件下,在 RNase A 消化之前及之后,非变性琼脂糖凝胶电泳(1%琼脂糖)中的 p33-VLP,用溴化乙锭(A)或考马斯蓝(B)染色,以分析 DNA 或蛋白质的存在。重组 p33-VLP 用 PBS 缓冲液稀释到终浓度 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  蛋白质,在不含(1道)或含有(2-5道)RNase A(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )(Sigma, Division of Fluka AG, 瑞士)的条件下 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时。在 RNase A 消化之前向 VLP 中添加 50 nmol CpG-寡核苷酸(磷酸骨架含有硫代磷酸修饰:2道和3道,含有磷酸二酯键:4道和5道)。应用 300 kDa MWCO 透析膜(Spectrum Medical Industries Inc., Houston, USA),处理的样品对 PBS(4500 倍稀释)充分透析 24 小时,以除去过量的 DNA(3道和5道)。用 Gene Ruler 标准(MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国)作为 p33-VLP 迁移速度的参照(M道)。箭头表明存在包于 p33-VLP 中的 RNA 或 CpG-寡核苷酸(A)或存在 p33-VLP 衣壳本身(B)。

图 6 显示在对照孵育后或 RNase A 消化后,非变性琼脂糖凝胶电泳(1%琼脂糖)中的 p33-VLP,其中只在完成 RNA 消化后添加含 CpG 的寡核苷酸,用溴化乙锭(A)或考马斯蓝(B)染色,以分析 RNA/DNA 或蛋白质的存在。重组 p33-VLP 用 PBS 缓冲液稀释为终浓度 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  蛋白质,在不含(1道)或含有(2道和3道)RNase A(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )(Sigma, Division of Fluka AG, 瑞士)的条件下 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时。只在 RNase A 消化后向样品 3 中添加 5 nmol CpG-寡核苷酸(磷酸骨架含有硫代磷酸修饰)。用 Gene Ruler 标准(MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国)作为 p33-VLP 迁移速度的参照(M道)。箭头表明 p33-VLP 中存在 RNA 或 CpG-寡核苷酸(A)或存在 p33-VLP 衣壳本身(B)。当 VLP 的重装配使用含磷酸二酯键的 CpG-寡核苷酸时,获得相同的结果。

图 7 显示包装有 CpG-寡核苷酸(磷酸骨架含有硫代磷酸修饰)的 p33-VLP 在诱导病毒保护方面有效。用 100  $\mu\text{g}$  单独的 p33-VLP、与 20 nmol CpG-寡核苷酸混合的 p33-VLP(p33-VLP+CpG)或透析游

离 CpG-寡核苷酸后包装有 CpG-寡核苷酸的 p33-VLP( p33-VLP/CpG ) 皮下初次免疫小鼠。未处理的小鼠作为阴性对照。21 天后, 用 LCMV ( 200 pfu, 静脉内 ) 攻击小鼠, 5 天后测定脾脏中的病毒滴度, 方法如以下文献所述: Bachmann, M.F.,“淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒特异的细胞毒性 T 细胞应答的评价”, 《免疫学方法手册》( Immunology methods Manual ), Lefkowitz, I. 编著, Academic Press Ltd., New York, NY (1997) p.1921。

图 8 显示包装有 CpG-寡核苷酸 ( 含有磷酸二酯键 ) 的 p33-VLP 在诱导病毒保护方面有效。用 100  $\mu$ g 单独的 p33-VLP、与 20 nmol CpG-寡核苷酸混合的 p33-VLP ( p33-VLP+ CpG ) 或透析游离 CpG-寡核苷酸后包装有 CpG-寡核苷酸的 p33-VLP ( p33-VLP/CpG ) 皮下初次免疫小鼠。未处理的小鼠作为阴性对照。21 天后, 用 LCMV ( 200 pfu, 静脉内 ) 攻击小鼠, 5 天后测定脾脏中的病毒滴度, 方法如以下文献所述: Bachmann, M.F.,“淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒特异的细胞毒性 T 细胞应答的评价”, 《免疫学方法手册》, Lefkowitz, I. 编著, Academic Press Ltd., New York, NY (1997) p.1921。

图 9 显示单独用 CpG-寡核苷酸处理的小鼠没有受到免于病毒感染的保护。小鼠用 20 nmol CpG-寡核苷酸 ( p33-VLP ) 皮下初次免疫 ( CpG ), 或者不加处理作为阴性对照 ( 未处理 )。21 天后, 用 LCMV ( 200 pfu, 静脉内 ) 攻击小鼠, 5 天后测定脾脏中的病毒滴度, 方法如以下文献所述: Bachmann, M.F.,“淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒特异的细胞毒性 T 细胞应答的评价”, 《免疫学方法手册》, Lefkowitz, I. 编著, Academic Press Ltd., New York, NY (1997) p.1921。

图 10 显示 BKV ( AS ) VP1 蛋白的氨基酸序列 ( GI: 332779 )。该序列在酵母中表达, 产生 BKV 衣壳 ( Sasnauskas K. 等人, J. Biol. Chem. 380(3):381 (1999); K. 等人, “不同多瘤病毒的重组病毒样颗粒在酵母中的生产”, 第 3 届国际“作为疫苗的病毒样颗粒”会议, 柏林 ( 2001 ) )。

图 11 显示用于包装和稳定 BKV VLP 的 246 bp 双链 DNA 片段的

DNA 序列。

图 12 显示在对照孵育或 RNase A 消化，以及随后与荧光硫代磷酸 (pt) CpG-寡核苷酸一起孵育后，在非变性 0.8%琼脂糖凝胶电泳中的 BKV VLP (15  $\mu$ g)。紫外线激发能够在溴化乙锭染色的凝胶中检测 DNA (A)，以及在不使用溴化乙锭的情况下检测 CpG-FAM 寡聚物的荧光 (B)。1 道：未处理的 BKV VLP；2 道：RNase A 处理的 BKV VLP；3 道：RNase A 处理的 BKV VLP，加 CpG(pt)-FAM 孵育；4 道：RNase A 处理的 BKV VLP，加 CpG(pt)-FAM 孵育，加 DNaseI 处理；M 道：Gene Ruler 1 kb 分子量标准 (MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国)。箭头表明在 BKV VLP 中存在 RNA 或 CpG-FAM 寡聚物。

图 13 显示在对照孵育或 RNase A 消化，以及随后与双链 (ds) DNA (246 bp) 一起孵育后，在非变性 0.8%琼脂糖凝胶电泳中的 BKV VLP (15  $\mu$ g)，用溴化乙锭 (A) 或考马斯蓝 (B) 染色。1 道：未处理的 BKV VLP；2 道：RNase A 处理的 BKV VLP；3 道：RNase A 处理并与 ds DNA 一起孵育的 BKV VLP；M 道：Gene Ruler 1 kb 分子量标准 (MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国)。箭头表明在 BKV VLP 中存在 RNA 或 ds DNA。

图 14 显示在对照孵育或 RNase A 消化，以及随后与 CpG-寡核苷酸 (含磷酸或硫代磷酸 (pt) 骨架) 一起孵育后，在非变性 0.8%琼脂糖凝胶电泳中的 BKV VLP (15  $\mu$ g)，用溴化乙锭 (A) 或考马斯蓝 (B) 染色。1 道：BKV VLP 贮存液 (PBS/50%甘油)；2 道：未处理 (PBS 缓冲液) 的 BKV VLP；3 道：RNase A 处理的 BKV VLP；4 道：RNase A 处理的 BKV VLP，透析后；5 道：RNase A 处理的 BKV VLP，与 CpG-寡核苷酸孵育；6 道：RNase A 处理的 BKV VLP，与 CpG(pt)-寡聚物孵育；7 道：RNase A 处理的 BKV VLP，与 CpG(pt)-寡聚物孵育，透析后；M 道：Gene Ruler 1 kb 分子量标准 (MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国)。箭头表明在 BKV VLP 中存在 RNA 或 CpG-寡核苷酸。

图 15 显示用 BKV VLP 和硫代磷酸 (pt) CpG-寡核苷酸免疫后第 14 天,小鼠抗 BKV VLP IgG1 和 IgG2a OD50%抗体滴度。1 道: RNase 处理的 BKV VLP; 2 道: RNase 处理的 BKV VLP 以及 0.3 nmol CpG(pt)-寡聚物; 3 道: RNase 处理的 BKV VLP 以及 20 nmol CpG(pt)-寡聚物; 4 道: 含有 0.3 nmol CpG(pt)-寡聚物的 RNase 处理的 BKV VLP。

图 16 显示在对照孵育后或 RNase A 消化后,在非变性琼脂糖凝胶电泳 (1%琼脂糖) 中的 p33-VLP, 其中只在完成 RNA 消化后添加线性双链 DNA (长 350 个碱基对), 用溴化乙锭 (A) 或考马斯蓝 (B) 染色, 以分析 RNA/DNA 或蛋白质的存在。重组 p33-VLP 用 PBS 缓冲液稀释为终浓度 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  蛋白质, 在不含 (1 道) 或含有 (2、3、4 道) RNase A (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma, Division of Fluka AG, 瑞士) 的条件下 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时。只在 RNase A 消化后向样品 3 和 4 中添加长度为 350 bp 的线性双链 DNA, 至终浓度为 100 ng/ml, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 3 小时。样品 4 进一步在 37 $^{\circ}\text{C}$  下用 DNase I (50 IU/ml) (Sigma, Division of Fluka AG, 瑞士) 再消化 3 小时。Gene Ruler 标准 (MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, 德国) 作为 p33-VLP 迁移速度的参照 (M 道)。箭头表明存在游离的或包封于 p33-VLP 中的 RNA/dsDNA (A) 和 p33-VLP (B)。

图 17 显示 B-CpG 包装于 HBc33 VLP 内。

图 18 显示 NKCPG 包装于 HBc33 VLP 内。

图 19 显示 g10gacga-PO 包装于 HBc33 VLP 内。

图 20 显示 CyCpG-150 包装于 HBc33 VLP 内。

图 21 显示 NKCPGpt 包装于 HBcP1A VLP 内。

图 22 显示 p33 与 HBcAg VLP 的偶联。

图 23 显示 B-CpGpt 包装于 HBx33 VLP 内。

图 24 显示 p33 与 Q $\beta$  VLP 的偶联。

图 25 显示允许在 Q $\beta$  VLP 中用 RNase A 水解 RNA 的离子强度和低蛋白质浓度。

图 26 显示离子强度提高免疫刺激性核酸向 Q $\beta$  VLP 内的包装。

图 27 显示 B-CpGpt、g10gacga-PO 和 dsCyCpG 包装于 Qbx33 VLP 内。

图 28 显示在免疫刺激性核酸存在下, Q $\beta$  VLP 解装配并重装配后, 蔗糖梯度离心产生的级分的 SDS-PAGE 分析。

图 29 显示在寡核苷酸(CpG)<sub>20</sub>OpA 存在下, 解装配并重装配后, Q $\beta$  VLP 的电子显微照片。

图 30 显示解装配并重装配的 Q $\beta$  VLP 的 ouchterlony 分析 (免疫扩散)。

图 31 显示解装配并重装配的 Q $\beta$  VLP 的凝胶电泳分析。

图 32 显示解装配并与寡核苷酸 CyOpA 重装配的 Q $\beta$  VLP 的电子显微照片。

图 33 显示纯化的解装配并与不同免疫刺激性核酸重装配的 Q $\beta$  VLP 的电子显微照片。

图 34 显示与寡脱氧核苷酸 CyOpA 重装配的 Q $\beta$  VLP 与 p33GGC 肽偶联的 SDS-PAGE 分析。

图 35 显示在 Q $\beta$  VLP 解装配并重装配, 随后与 p33 GGC 肽偶联后, 包装的寡脱氧核苷酸。

图 36 显示通过大小排阻层析纯化解装配的 Q $\beta$  外壳蛋白。

图 37 显示通过大小排阻层析纯化重装配的 Q $\beta$  VLP。

图 38 显示在不同寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  VLP 的电子显微照片。

图 39 显示重装配并纯化的 Q $\beta$  衣壳中二硫键模式的分析。

图 40 显示通过核酸酶处理和琼脂糖凝胶电泳分析重装配 Q $\beta$  VLP 的核酸内容物。

图 41 显示通过蛋白酶 K 处理和聚丙烯酰胺 TBE/尿素凝胶电泳分析重装配 Q $\beta$  VLP 的核酸内容物。

图 42 显示解装配、随后在 CyCpG 存在下重装配的 AP205 VLP 的电子显微照片。



图 43 显示解装配并在 CyCpG 存在下重装配的 AP205 VLP 的琼脂糖凝胶电泳分析。

图 44 显示解装配并重装配的 AP205 的电子显微照片。

5 图 45 显示解装配并在 CyCpG 存在下重装配的 AP205 VLP 的琼脂糖凝胶电泳分析。

图 46 显示解装配并重装配的 AP205 VLP 的 SDS-PAGE 分析。

图 47 显示与解装配并重装配的 AP205 VLP 偶联的肽的 SDS-PAGE 分析。

10 图 48 显示是游离免疫刺激性核酸而不是包装于 VLP 内的免疫刺激性核酸诱发脾大。

图 49 显示包装于与抗原融合的 VLP 中的不同免疫刺激性核酸导致强抗原特异性 CTL 应答和抗病毒保护。

图 50 显示包装于与抗原融合的 VLP 内的免疫刺激性核酸 g10gacga-PS 导致强抗原特异性 CTL 应答和抗病毒保护。

15 图 51 显示包装于 HBcAg 和 Q $\beta$  VLP 内的免疫刺激性核酸导致强抗原特异性 CTL 应答和抗病毒保护。

图 52 显示包装于 VLP 内的免疫刺激性核酸在诱导 CTL 应答方面比与免疫刺激性核酸混合的 VLP 更有效。

图 53 显示 Q $\beta$  VLP 内 RNA 的非酶促 RNA 水解的分析。

20 图 54 显示非酶促 RNA 水解后寡脱氧核苷酸向 Q $\beta$  VL 内的包装。

图 55 显示非酶促 RNA 水解后寡脱氧核苷酸向 Q $\beta$  VLP 内包装的分析。

### 发明详述

25 除非另外定义，此处使用的所有科技术语与本发明所属领域技术人员通常理解的含义相同。尽管在本发明的实施与试验中可以使用与此处所述相似或相当的任何材料与方法，但是下文描述了优选的材料与方法。

#### 1. 定义

氨基酸接头：本说明书中的“氨基酸接头”，也被称为“接头”，用来连接抗原或抗原决定簇和第二附着位点，或者更优选地，该接头已经包含或含有第二附着位点，该附着位点一般（但不是一定）是一个氨基酸残基，优选地是半胱氨酸残基。然而，术语“氨基酸接头”在此使用时并非意味着这种氨基酸接头只由氨基酸残基组成，尽管由氨基酸残基组成的氨基酸接头是本发明的一个优选实施方案。氨基酸接头的氨基酸残基优选地由本领域公知的天然氨基酸或非天然氨基酸、所有 L-或所有 D-氨基酸或其混合物组成。然而，本发明也包括一种氨基酸接头，其含有一种带巯基或半胱氨酸残基的分子。该分子优选地含有 C1-C6 烷基、环烷基（C5,C6）、芳基或杂芳基部分。然而，除了氨基酸接头外，本发明范围内也包括优选地含有 C1-C6 烷基、环烷基（C5,C6）、芳基或杂芳基部分且不含任何氨基酸的接头。抗原或抗原决定簇或（任选地）第二附着位点与氨基酸接头的结合优选地是通过至少一个共价键，更优选地是通过至少一个肽键。

动物：在此使用的术语“动物”包括例如：人、绵羊、马、牛、猪、狗、猫、大鼠、小鼠、哺乳动物、鸟类、爬行动物、鱼、昆虫和蜘蛛类动物。

抗体：在此使用的术语“抗体”是指能够结合一种表位或抗原决定簇的分子。该术语包括完整的抗体及其抗原结合片段，包括单链抗体。最优选地，这些抗体是人抗原结合性抗体片段，包括但不限于：Fab、Fab'和 F(ab')<sub>2</sub>、Fd、单链 Fvs (scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs (sdFv)，以及包含 V<sub>L</sub> 或 V<sub>H</sub> 域的片段。抗体可以是任何动物来源的，包括鸟类和哺乳动物。优选地，抗体是人、鼠、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡抗体。在此使用的术语“人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，包括分离自人免疫球蛋白文库的抗体，或者来自表达一种或多种人免疫球蛋白且不表达内源免疫球蛋白的转基因动物，如授予 Kucherlapati 等人的美国专利号 5,939,598 所述。

抗原：在此使用的术语“抗原”是指如果被 MHC 分子呈递，即能够被抗体或 T 细胞受体 (TCR) 结合分子。术语“抗原”也包括 T 细

胞表位。抗原还能够被免疫系统识别，以及/或者能够诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答，导致 B 和/或 T 淋巴细胞的激活。然而，至少在某些情况下，这可能需要抗原含有或连接于一种 Th 细胞表位，并且包含于佐剂中。一种抗原可能包含一种或多种表位（B 和 T 表位）。

5 上述特异性反应是指抗原优选地通常以高选择性方式与其相应的抗体或 TCR 反应，而不与可能由其它抗原诱导的大量其它抗体或 TCR 反应。

“微生物抗原”在此是指微生物的抗原，包括但不限于：传染性病毒、传染性细菌、寄生虫和传染性真菌。这些抗原包括完整的微生物以及天然的分离物及其片段或衍生物，以及与天然微生物抗原相同或相似、并能诱发该微生物特异的免疫应答的合成或重组化合物。如果

10 一种化合物诱发针对一种天然微生物抗原的免疫应答（体液和/或细胞应答），则该化合物与该天然微生物抗原相似。这些抗原在本领域中常用，本领域技术人员周知。

15 已经在人体中发现的传染性病毒的例子包括但不限于：逆转录病毒科（例如人类免疫缺陷病毒，如 HIV-1（也称为 HTLV-III、LAV 或 HTLV-III/LAV，或 HIV-III）；和其它分离株，如 HIV-LP）；小 RNA 病毒科（例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒；肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、埃可病毒）；杯状病毒科（例如导致胃肠炎的毒株）；披膜病毒科（例如马脑炎病毒、风疹病毒）；黄病毒科（例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒）；冠状病毒科（例如冠状病毒）；弹状病毒科（例如水泡性口炎病毒、狂犬病病毒）；丝状病毒科（例如埃博拉病毒）；副粘病毒科（例如副流感病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒）；正粘病毒科（例如流感病毒）；本

20 扬病毒科（例如汉坦病毒、本扬病毒、静脉病毒和内罗病毒）；砂粒样病毒科（出血热病毒）；呼肠弧病毒科（例如呼肠弧病毒、环状病毒和轮状病毒）；双 RNA 病毒科；肝 DNA 病毒科（乙型肝炎病毒）；细小病毒科（细小病毒）；乳头多瘤空泡病毒科（乳头瘤病毒、多瘤病毒）；腺病毒科（大多数腺病毒）；疱疹病毒科（单纯疱疹病毒（HSV）

1、2，水痘带状疱疹病毒，巨细胞病毒（CMV），疱疹病毒）；痘病毒科（天花病毒，痘苗病毒，痘病毒）；虹彩病毒（例如非洲猪瘟病毒）；以及未分类的病毒（例如海绵状脑病的病原体，丁型肝炎的病原体（被认为是乙型肝炎病毒的一种缺陷型卫星病毒），非甲非乙型肝炎的病原体（1类=体内传播的；2类=肠胃外传播的（即丙型肝炎）；诺瓦克病毒及相关病毒，和星形病毒）。

在脊椎动物中，革兰氏阴性和革兰氏阳性菌都可作为抗原。这些革兰氏阳性菌包括但不限于：巴斯德氏菌属的种，葡萄球菌属的种和链球菌属的种。革兰氏阴性菌包括但不限于：大肠杆菌，假单胞菌属的种和沙门氏菌属的种。传染性细菌的具体例子包括但不限于：幽门螺杆菌（*Helicobacter pyloris*），布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*），嗜肺军团菌（*Legionella pneumophilia*），分枝杆菌属的种（例如结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）、鸟分枝杆菌（*M. avium*）、胞内分枝杆菌（*M. intracellulare*）、堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、戈登分枝杆菌（*M. gordonae*），金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*），淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*），脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*），单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*），酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）（A组链球菌），无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）（B组链球菌），链球菌（绿色组），粪链球菌（*Streptococcus faecalis*），牛链球菌（*Streptococcus bovis*），链球菌（厌氧种），肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*），致病性弯曲杆菌属的种，肠球菌属的种，流感嗜血菌（*Haemophilus influenzae*），炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*），白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*），棒杆菌属的种，猪红斑丹毒丝菌（*Erysipelothrix rhusiopathiae*），产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*），破伤风梭菌（*Clostridium tetani*），产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*），肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*），多杀巴斯德氏菌（*Pasturella multocida*），拟杆菌属（*Bacteroides*）的种，核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*），念珠状链杆菌（*Streptobacillus moniliformis*），苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*），极细密螺旋体

(*Treponema pertenu*e), 钩端螺旋体属(*Leptospira*), 立克次体属(*Rickettsia*), 衣氏放线菌(*Actinomyces israeli*)和衣原体(*Chlamydia*)。

传染性真菌的例子包括: 新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)。其它传染性微生物(如原生生物)包括: 疟原虫, 如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)和血吸虫属(*Shistosoma*)。

其它医学相关的微生物在文献中已有大量描述, 例如, 参见 C.G.A. Thomas, 《医学微生物学》, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, 其完整内容在此引用作为参考。

本发明的组合物和方法也可用于是通过刺激针对癌抗原的抗原特异性免疫应答治疗癌症。“肿瘤抗原”在此是指一种与肿瘤或癌症相关并能够引发免疫应答的化合物, 如肽。特别是, 该化合物在 MHC 分子中呈递时能够引发免疫应答。肿瘤抗原能够由癌细胞制备, 方法包括: 制备癌细胞粗提物, 如 Cohen 等人, *Cancer Research*, 54:1055 (1994)所述; 部分纯化抗原; 通过重组技术或从头合成已知抗原。肿瘤抗原包括作为整个肿瘤或癌症多肽或其抗原性部分的抗原。这些抗原能够分离或者通过重组或本领域公知的其它任何方法制备。癌症或肿瘤包括但不限于: 胆管癌; 脑癌; 乳腺癌; 宫颈癌; 绒毛膜癌; 结肠癌; 子宫内膜癌; 食道癌; 胃癌; 上皮肿瘤; 淋巴瘤; 肝癌; 肺癌(例如小细胞和非小细胞癌); 黑素瘤; 神经母细胞瘤; 口腔癌; 卵巢癌; 胰腺癌; 前列腺癌; 直肠癌; 肉瘤; 皮肤癌; 睾丸癌; 甲状腺癌; 肾癌, 以及其它癌和肉瘤。

抗原决定簇: 在此使用的术语“抗原决定簇”是指可被 B 或 T 淋巴细胞特异识别的抗原部分。B 淋巴细胞通过产生抗体对外源抗原决定簇起反应, 而 T 淋巴细胞是细胞免疫的介质。因此, 抗原决定簇或表

位是可被抗体识别或者（对于 MHC）可被 T 细胞受体识别的抗原部分。

5 抗原呈递细胞：在此使用的术语“抗原呈递细胞”是指具有免疫刺激能力的一群不均一的白细胞或骨髓衍生细胞。例如，这些细胞能够产生与 MHC 分子结合的肽，后者能够被 T 细胞识别。该术语与术语“佐细胞”同义，包括如朗罕氏细胞、交错突细胞、B 细胞、巨噬细胞和树状细胞。在某些条件下，上皮细胞、内皮细胞和其它非骨髓来源的细胞也可以作为抗原呈递细胞。

10 连接（association）：术语“连接”在用于第一和第二附着位点时，是指第一和第二附着位点优选地通过至少一个非肽键结合。连接的性质可能是共价、离子、疏水、极性的或其任意组合，优选地，连接的性质是共价的。

15 第一附着位点：在此使用的短语“第一附着位点”是指非天然或天然来源的一种组件，位于抗原或抗原决定簇上的第二附着位点可与之连接。第一附着位点可以是蛋白质、多肽、氨基酸、肽、糖、多核苷酸、天然或合成的聚合物、次级代谢物或化合物（生物素、荧光素、视黄醇、洋地黄毒苷、金属离子、苯甲基磺酰氟）或其组合，或者是其化学反应性基团。第一附着位点通常且优选地位于病毒样颗粒表面。病毒样颗粒表面上存在多个第一附着位点，一般呈重复构型。

20 第二附着位点：在此使用的短语“第二附着位点”是指与抗原或抗原决定簇结合的一种组件，位于病毒样颗粒表面上的第一附着位点可与之连接。抗原或抗原决定簇的第二附着位点可以是蛋白质、多肽、氨基酸、肽、糖、多核苷酸、天然或合成的聚合物、次级代谢物或化合物（生物素、荧光素、视黄醇、洋地黄毒苷、金属离子、苯甲基磺酰氟）或其组合，或者是其化学反应性基团。抗原或抗原决定簇上存在至少一个第二附着位点。因此，术语“包含至少一个第二附着位点的抗原或抗原决定簇”是指至少含有抗原或抗原决定簇和该第二附着位点的抗原或抗原构建体。然而，特别是对于非天然来源（即抗原或抗原决定簇内不天然存在）的第二附着位点，这些抗原或抗原构建体

含有“氨基酸接头”。

结合(bind): 在此使用的术语“结合”是指如下结合: 可能是共价的, 例如通过化学偶联, 或者是非共价的, 例如离子相互作用、疏水相互作用、氢键等。共价键可能是, 例如: 酯、醚、磷酸酯、酰胺、肽、  
5 亚胺、碳-硫键、碳-磷键等。该术语也包括物质的包封或部分包封。术语“结合”比术语“偶联”、“融合”、“包封”、“包装”和“附着”等更广泛, 并且包括后者。例如, 免疫刺激物, 如含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 可以用 VLP 包封, 而不存在实际上的结合, 既不是共价的也不是非共价的。

10 外壳蛋白: 在此使用的术语“外壳蛋白”是指噬菌体或 RNA 噬菌体的蛋白质, 它能够参与噬菌体或 RNA-噬菌体的衣壳装配。然而, 当指 RNA-噬菌体的外壳蛋白基因的特异基因产物时, 使用术语“CP”。例如, RNA-噬菌体 Q $\beta$ 的外壳蛋白基因的特异基因产物被称为“Q $\beta$  CP”, 而噬菌体 Q $\beta$ 的“外壳蛋白”包含“Q $\beta$  CP”以及 A1 蛋白。噬菌体  
15 Q $\beta$ 的衣壳主要由 Q $\beta$  CP 组成, 含有少量 A1 蛋白。同样, VLP Q $\beta$ 外壳蛋白主要含有 Q $\beta$  CP, 以及少量 A1 蛋白。

偶联: 在此使用的术语“偶联”是指通过共价键或通过强非共价相互作用而附着。本领域技术人员常用来偶联生物活性物的任何方法都可用于本发明。

20 融合: 在此使用的术语“融合”是指不同来源的氨基酸序列通过其编码核苷酸序列的框内组合而组合于一条多肽链中。除了与末端之一融合外, 术语“融合”还包括内部融合, 即不同来源的序列插入多肽链内。

CpG: 在此使用的术语“CpG”是指含有非甲基化胞嘧啶、鸟嘌呤二核苷酸序列的寡核苷酸(例如“CpG DNA”或含有胞嘧啶及随后的鸟嘌呤、并通过一个磷酸酯键连接的 DNA), 它能刺激/激活脊椎动物  
25 细胞, 例如对该细胞具有促细胞分裂作用, 或诱导或提高该细胞的细胞因子表达。例如, CpG 可用于激活 B 细胞、NK 细胞和抗原呈递细胞, 如单核细胞、树状细胞和巨噬细胞, 以及 T 细胞。CpG 也可包括

核苷酸类似物，如含有磷酸硫酸酯键的类似物，可以是双链或单链的。双链分子通常在体内更稳定，而单链分子免疫活性更高。

表位：在此使用的术语“表位”是指在动物、优选哺乳动物、最优选在人中具有抗原性或免疫原活性的多肽部分。“免疫原性表位”在此定义为能在动物中引发抗体应答或诱发 T 细胞应答的多肽部分，这种应答可通过本领域公知的任何方法测定。（参见，例如：Geysen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983)）。术语“抗原性表位”在此定义为抗体能够在其上免疫特异性结合相应抗原的蛋白部分，这种结合可用本领域众所周知的任何方法测定。免疫特异性结合不包括非特异性结合，但是不一定排除与其它抗原的交叉反应性。抗原性表位不需要必须是免疫原性的。抗原性表位也可以是 T 细胞表位，此时它们能被 MHC 分子内的 T 细胞受体免疫特异地结合。

一个表位可能包含 3 个氨基酸，具有该表位独特的空间构象。一个表位通常由至少约 5 个这样的氨基酸组成，更常见地由至少约 8-10 个这样的氨基酸组成。如果表位是一种有机分子，它可以象硝基苯基一样小。

免疫应答：在此使用时的术语“免疫应答”是指导致 B 和/或 T 淋巴细胞激活或增殖的体液免疫应答和/或细胞免疫应答。然而，在某些情况下，免疫应答可能是低强度的，只有在使用至少一种根据本发明的物质时才能检测到。“免疫原性”是指一种试剂能用来刺激活生物的免疫系统，使得免疫系统的一种或多种功能增强，并且针对该免疫原性剂。“免疫原性多肽”是引发细胞和/或体液免疫应答的多肽，无论它是单独的还是与载体相连接，使用或不使用佐剂。

免疫(immunization)：在此使用的术语“免疫”或相关术语是指产生针对靶抗原或表位的实质免疫应答（包括抗体或细胞免疫，如效应 CTL）的能力。这些术语不要求产生完全免疫，而是产生实质性地高于基线的免疫应答。例如，如果在使用本发明的方法后哺乳动物产生对靶抗原的细胞和/或体液免疫应答，则可认为对针该靶抗原免疫了该哺乳动物。



免疫刺激性核酸：在此使用的术语“免疫刺激性核酸”是指能够诱发和/或增强免疫应答的核酸。免疫刺激性核酸在此包括核糖核酸，特别是脱氧核糖核酸。优选地，免疫刺激性核酸包含至少一种 CpG 基序，如 CG 二核苷酸，其中 C 是未甲基化的。CG 二核苷酸可能是回文序列的一部分，或者可能包含于一种非回文序列内。如上所述的不含 CpG 基序的免疫刺激性核酸包括，例如，缺乏 CpG 二核苷酸的核酸，以及含有其中 CG 二核苷酸被甲基化的 CG 基序的核酸。在此使用的术语“免疫刺激性核酸”也指含有修饰碱基（如 4-溴-胞嘧啶）的核酸。

10 免疫刺激物：在此使用的术语“免疫刺激物”是指能够诱发和/或增强免疫应答的物质。在此，免疫刺激物包括但不限于 toll 样受体激活物和诱导细胞因子分泌的物质。Toll 样受体激活物包括但不限于：免疫刺激性核酸、肽聚糖、脂多糖、脂磷壁酸、咪唑并喹啉化合物、鞭毛蛋白、脂蛋白和免疫刺激性有机物，如紫杉醇。

15 天然来源：在此使用的术语“天然来源”是指其全部或部分不是合成的，而是自然存在或产生的。

非天然的：在此使用时的该术语通常是指并非来源于自然，更具体而言，该术语是指来自人工。

20 非天然来源：在此使用时的术语“非天然来源”通常是指合成的或并非来源于自然，更具体而言，该术语是指来自人工。

规则、重复的抗原或抗原决定簇阵列：在此使用的术语“规则、重复的抗原或抗原决定簇阵列”通常是指抗原或抗原决定簇的重复模式，其特征在于分别相对于核心颗粒和病毒样颗粒，抗原或抗原决定簇一般且优选地均匀空间排列。在本发明的一个实施方案中，这种重复模式可以是一种几何模式。合适的规则、重复抗原或抗原决定簇阵列的典型和优选实例具有严格重复的抗原或抗原决定簇类结晶排列，优选地间隔 0.5-30 纳米，更优选地 5-15 纳米。

寡核苷酸：在此使用的术语“寡核苷酸”或“寡聚体”是指包含 2 个或更多核苷酸的核酸序列，通常至少约 6 个核苷酸到约 100,000 个核

核苷酸，优选地约 6 个到约 2000 个核苷酸，更优选地约 6 个到约 300 个核苷酸，更优选地约 20 个到约 300 个核苷酸，进一步优选地约 20 个到约 100 个核苷酸。术语“寡核苷酸”或“寡聚体”也指包含超过 100 个到约 2000 个核苷酸、优选地超过 100 个到约 1000 个核苷酸、更优选地超过 100 个到约 500 个核苷酸的核酸序列。“寡核苷酸”通常也指任何一种聚核糖核苷酸或聚脱氧核糖核苷酸，可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或修饰的 RNA 或 DNA。“寡核苷酸”包括但不限于：单链和双链 DNA，作为单链和双链区的混合物的 DNA，单链和双链 RNA，作为单链和双链区的混合物的 RNA，包含 DNA 和 RNA 的杂合分子（它可能是单链的，或者更一般而言是双链的或是单链和双链区的混合物）。另外，“寡核苷酸”也指包含 RNA 或 DNA 或既含 RNA 又含 DNA 的三链区。此外，寡核苷酸也可能是合成的、基因组的或重组的，例如 $\lambda$ -DNA、粘粒 DNA、人工细菌染色体、酵母人工染色体和丝状噬菌体，如 M13。

术语“寡核苷酸”也包括含有一个或多个修饰碱基的 DNA 或 RNA，和为了稳定性或其它原因而含有修饰骨架的 DNA 或 RNA。例如，合适的核苷酸修饰/类似物包括肽核酸、肌苷、三苯甲基碱基、硫代磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、5-硝基咪唑脱氧呋喃核糖基、5-甲基脱氧胞嘧啶和 5,6-二氢-5,6-二羟基脱氧胸苷。已经对 DNA 和 RNA 进行了多种修饰；因此，“寡核苷酸”包括在自然界中常见的多核苷酸的化学、酶或代谢修饰形式，以及病毒和细胞特有的 DNA 和 RNA 的化学形式。本领域技术人员了解其它核苷酸类似物/修饰。

包装：术语“包装”在此是指免疫刺激物，特别是免疫刺激性核酸，与 VLP 有关的状态。在此，术语“包装”包括结合，这可能是共价的，例如化学偶联，或者是非共价的，例如离子相互作用、疏水相互作用、氢键等。共价键可能是，例如：酯、醚、磷酸酯、酰胺、肽、酰亚胺、碳-硫键、碳-磷键等。该术语也包括物质的包封或部分包封。术语“包装”包括如“偶联”、“包封”和“附着”等术语。例如，免疫刺激物如含非甲基化 CpG 的寡核苷酸可以用 VLP 包封，而不需存在实际上的结合，

既不是共价的也不是非共价的。具体而言，在一个优选实施方案中，如果免疫刺激性核酸作为免疫刺激物，术语“包装”是指包装状态的核酸不能被 DNase 或 RNase 水解。在优选实施方案中，免疫刺激性核酸包装于 VLP 衣壳内，最优选地以非共价方式包装。

5 本发明的组合物可以任选地与一种药学可接受的载体组合。术语“药学可接受的载体”在此是指适于对人或其它动物施用的一种或多种相容的固体或液体材料、稀释剂或封装物。术语“载体”是指一种天然或合成的有机或无机成分，活性成分与之结合，从而利于活性成分的应用。

10 有机分子：在此使用的术语“有机分子”是指天然或合成来源的任何化学物质。具体而言，术语“有机分子”在此包括例如选自下列的任何一种分子：核苷酸、脂类、碳水化合物、多糖、脂多糖、类固醇、生物碱、萜和脂肪酸，它是天然或合成来源的。术语“有机分子”具体包括如烟碱、可卡因、海洛因等分子或滥用药品中所含的其它药理学  
15 活性分子。有机分子通常含有或经修饰后含有一种化学功能团，使它  
能够与根据本发明的病毒样颗粒偶联、结合或以其它方法附着。

多肽：在此使用的术语“多肽”是指由单体（氨基酸）通过酰胺键（也称为肽键）线性连接组成的分子，是指氨基酸分子链，而对产物的特定长度没有限制。因此，多肽的定义内包括肽、寡肽和蛋白质。  
20 该术语也指多肽的表达后修饰，例如：糖基化、乙酰化、磷酸化等。重组或衍生的多肽不一定由指定的核酸序列翻译而来。也可以用任何方法生产，包括化学合成。

可“增强”免疫应答的物质是指这样一种物质，与未添加该物质时测得的相同免疫应答相比，添加该物质时观察到更高或增强或偏离的免疫应答。例如，可以在使用或不使用该物质的情况下，例如用  $^{51}\text{Cr}$   
25 释放试验，测定细胞毒性 T 细胞的裂解活性。与不加该物质时的 CTL 裂解活性相比，CTL 裂解活性提高时的物质含量被认为是足以增强动物对该抗原的免疫应答的量。在一个优选实施方案中，免疫应答至少提高至原水平的约 2 倍，更优选地约 3 倍或更多。分泌的细胞因子的

量也可以改变。

有效量：在此使用的术语“有效量”是指足以达到希望的生物效应的量或必需的量。组合物的有效量是能够获得所选结果的量，此含量可由本领域技术人员按常规方式确定。例如，治疗免疫系统缺陷的有效量是引起免疫系统激活、在暴露于抗原后产生抗原特异性免疫应答所必需的量。该术语也与“足量”同义。

用于任一种具体用途的有效量根据如下因素而不同：如所治疗的疾病、具体施用的组合物、患者体重和/或疾病的严重程度。本领域技术人员能够根据经验确定本发明的特定组合物的有效量，而不需要过多的实验。

自身抗原：在此使用的术语“自身抗原”是指宿主 DNA 编码的蛋白质，宿主 DNA 编码的蛋白质或 RNA 产生的产物被定义为自身的。另外，两种或几种自身分子组合产生的蛋白质、或代表自身分子一部分的蛋白质以及与上述两种自身分子具有高度同源性的蛋白质 (>95%，优选地>97%，更优选地>99%) 也可以认为是自身的。在本发明的一个更优选的实施方案中，抗原是一种自身抗原。可用于本发明的自身抗原非常优选的实施方案如 WO 02/056905 所述，其公开内容在此完整引用作为参考。

治疗 (treatment)：在此使用的术语“治疗”是指预防和/或治疗。例如，当用于传染病时，该术语是指提高患者对病原体感染的抗性，或者换句话说，降低患者感染病原体或表现感染所致病症的可能性的预防性治疗，以及患者感染后的抗感染治疗，例如减轻或消除感染或阻止其恶化。

疫苗：在此使用的术语“疫苗”是指包含本发明的组合物并且是能够对动物施用的形式的制剂。一般而言，疫苗包含常用的盐水或缓冲液，本发明的组合物悬浮或溶解于其中。以这种形式，本发明的组合物能够方便地用于预防、改善或治疗一种疾病。在导入宿主后，疫苗能够引起免疫应答，包括但不限于抗体、细胞因子的产生和/或其它细胞应答。

任选地，本发明的疫苗还包含一种佐剂，与本发明的化合物相比，它可能占一小部分或大部分。在此使用的术语“佐剂”是指免疫应答的非特异性刺激物，或可以在宿主中产生一种储存站的物质，与本发明的疫苗与该储存站结合时能够产生更强的免疫应答。有多种佐剂可以使用。例子包括弗氏不完全佐剂、氢氧化铝和修饰的胞壁酰二肽。在此，术语“佐剂”也指通常特异性的免疫应答刺激剂，当与本发明的疫苗组合时能够产生更强且通常特异的免疫应答。例子包括但不限于 GM-CSF、IL-2、IL-12、IFN $\alpha$ 。本领域技术人员知道更多的例子。

病毒样颗粒：在此使用时的术语“病毒样颗粒”是指一种类似于病毒颗粒但是未证明其具有致病的结构。一般而言，根据本发明的病毒样颗粒不携带编码病毒样颗粒蛋白质的遗传信息。病毒样颗粒通常缺乏病毒基因组，因此是感传染性的。病毒样颗粒通常也能通过异源表达大量生产，且易于纯化。某些病毒样颗粒可能含有与其基因组不同的核酸。如上所述，根据本发明的病毒样颗粒是非复制性和非感染性的，因为它缺乏病毒基因组的全部或一部分，特别是病毒基因组的复制性和传染性部分。根据本发明的病毒样颗粒可能含有与其基因组不同的核酸。根据本发明的病毒样颗粒的一个典型和优选的实施方案是一种病毒衣壳，如相应病毒、噬菌体或 RNA-噬菌体的病毒衣壳。术语“病毒衣壳”或“衣壳”在此可以互换使用，是指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配体。一般且优选地，病毒蛋白质亚单位分别装配为一种病毒衣壳和衣壳，它具有固有重复组织的结构，其中这种结构一般是球形或管状。例如，RNA-噬菌体或 HBcAg 的衣壳是二十面体对称的球形。在此使用的术语“衣壳样结构”是指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配体，它类似于如上所述衣壳形态，但是不同于典型的对称装配体，而保持足够程度的秩序和重复性。

噬菌体的病毒样颗粒：在此使用的术语“噬菌体的病毒样颗粒”是指类似于噬菌体结构的病毒样颗粒，它是非复制性和非感染性的，至少缺乏编码噬菌体复制机制的基因，一般也缺乏编码负责病毒附着或进入宿主的蛋白质的基因。然而，该定义也应当包括这样的噬菌体病

毒样颗粒，其中上述基因仍然存在但是无活性，于是也产生非复制性和非感染性的噬菌体病毒样颗粒。

RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP: 由 RNA 噬菌体外壳蛋白的 180 个亚单位自装配而成、任选地含有宿主 RNA 的衣壳结构，被称为“RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP”。一个具体例子是 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP。在此情况中，Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 可能仅仅由 Q $\beta$  CP 亚单位装配而成（通过表达含有如 TAA 终止密码子的 Q $\beta$  CP 基因产生，该终止密码子通过抑制阻止较长 A1 蛋白的表达，参见 Kozlovskaya, T.M. 等人, Intervirology 39:9-15 (1996)），或者在衣壳装配体中还含有 A1 蛋白亚单位。

术语“病毒颗粒”在此是指病毒的形态学形状。某些病毒类型含有由蛋白质衣壳围绕的基因组；其它的具有附加结构（例如包膜、尾等）。

无包膜病毒颗粒由围绕并保护病毒基因组的蛋白质衣壳组成。包膜病毒也具有围绕病毒遗传物质的衣壳结构，另外还有围绕该衣壳的脂双层包膜。在本发明的一个优选实施方案中，VLP 没有脂蛋白包膜或含脂蛋白的包膜。在一个更优选的实施方案中，VLP 完全不含包膜。

一种：术语“一种”在本公开内容中使用，除非另外说明，是指“至少一种”或“一种或一种以上”。

本领域技术人员应当清楚，本发明的某些实施方案涉及重组核酸技术的应用，如克隆、聚合酶链反应、DNA 和 RNA 的纯化、重组蛋白质在原核和真核细胞中的表达等。这些方法是本领域技术人员公知的，在出版的实验室方法手册中常见（例如，Sambrook, J. 等人编著，《分子克隆：实验室手册》，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel, F. 等人编著，《现代分子生物学方法》，John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)）。应用组织培养细胞系进行的基本实验室技术（Celis, J. 编著，《细胞生物学》，Academic Press, 第二版, (1988)）和基于抗体的技术（Harlow, E. 和 Lane, D., 《抗体：实验室手册》，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Deutscher, M.P., “蛋白质纯化指南”，Meth. Enzymol. 128,

Academic Press San Diego (1990); Scopes, R.K., 《蛋白质纯化原理与实践》, 第三版, Springer-Verlag, New York (1994)) 在文献中也有大量描述, 这些文献均在此引用作为参考。

## 5           2. 增强免疫应答的组合物和方法

本发明提供增强动物对一种或多种抗原的免疫应答的组合物和方法。本发明的组合物包含或者由下列成分组成: 病毒样颗粒和免疫刺激物, 优选地免疫刺激性核酸, 更优选地含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 其中免疫刺激物、免疫刺激性核酸或寡核苷酸与该病毒样颗粒  
10 结合。而且, 本发明能够使技术人员方便地构建这种组合物, 用于多种治疗和/或预防目的, 包括传染病以及慢性传染病的预防和/或治疗, 以及如癌症的预防和/或治疗。

本申请书中的病毒样颗粒是指类似于病毒颗粒但是不致病的结构。病毒样颗粒通常缺乏病毒基因组, 因此是非感染性的。另外, 病毒样颗粒能通过异源表达大量生产, 并且易于纯化。  
15

在一个优选实施方案中, 病毒样颗粒是一种重组病毒样颗粒。本领域技术人员能够利用重组 DNA 技术和可公开获得的病毒编码序列生产 VLP。例如, 为了使用可购得的杆状病毒载体在杆状病毒表达载体中表达, 可以将病毒包膜或核心蛋白的编码序列克隆在病毒启动  
20 子的调节控制下, 对序列进行适当修饰, 使编码序列与调节序列功能连接。例如, 也可以操作病毒包膜或核心蛋白的编码序列, 以便在细菌表达载体中表达。

VLP 的例子包括但不限于: 乙型肝炎病毒( Ulrich 等人, *Virus Res.* 50:141-182 (1998))、麻疹病毒( Warnes 等人, *Gene* 160:173-178 (1995))、辛德毕斯病毒、轮状病毒(美国专利号 5,071,651 和  
25 5,374,426)、口蹄疫病毒( Twomey 等人, *Vaccine* 13:1603-1610 (1995))、诺瓦克病毒( Jiang, X.等人, *Science* 250:1580-1583 (1990); Matsui, S.M. 等人, *J. Clin. Invest.* 87:1456-1461 (1991)) 的衣壳蛋白, 逆转录病毒 GAG 蛋白( PCT 专利申请号 WO 96/30523), 逆转录转座子 Ty 蛋白

p1, 乙型肝炎病毒 (WO 92/11291)、人乳头瘤病毒 (WO 98/15631)、人多瘤病毒 (Sasnauska K.等人, Biol. Chem. 380(3):381-386 (1999); Sasnauskas K.等人, “不同多瘤病毒的重组病毒样颗粒在酵母中的生产”, 第三届国际“作为疫苗的病毒样颗粒”会议, 柏林, 2001年9月 5 26-29日)、RNA噬菌体、Ty、fr-噬菌体、GA-噬菌体、AP 205-噬菌体、特别是QB-噬菌体的表面蛋白。

本领域技术人员应当理解, 本发明的VLP不限于任何特定形式。该颗粒能够化学合成或通过生物学方法生产, 可以是天然的或非天然的。例如, 这种实施方案包括病毒样颗粒或其重组形式。在一个具体 10 实施方案中, VLP可以包含或者由下列成分组成: 重组轮状病毒多肽; 重组诺瓦克病毒多肽; 重组甲病毒多肽; 可形成细菌菌毛或菌毛样结构的重组蛋白; 重组口蹄疫病毒多肽; 重组麻疹病毒多肽; 重组辛德毕斯病毒多肽; 重组逆转录病毒多肽; 重组乙型肝炎病毒多肽 (例如 HBcAg); 重组烟草花叶病毒多肽; 重组禽兽棚病毒多肽; 重组人乳 15 头瘤病毒多肽; 重组多瘤病毒多肽, 特别是重组人多瘤病毒多肽, 特别是重组BK病毒多肽; 重组噬菌体多肽, 重组RNA噬菌体多肽; 重组Ty多肽; 重组fr-噬菌体多肽, 重组GA-噬菌体多肽, 重组AP 205-噬菌体多肽, 特别是重组QB-噬菌体多肽。该病毒样颗粒还可以包含或者由这些多肽的一种或多种片段以及这些多肽的变体组成。多肽的 20 变体与其野生型对应物在氨基酸水平上例如至少80%、85%、90%、95%、97%或99%相同。

在一个优选实施方案中, 病毒样颗粒包含、基本由或者由RNA-噬菌体的重组蛋白或其片段组成。优选地, RNA-噬菌体选自: a)噬菌体QB; b)噬菌体R17; c)噬菌体fr; d)噬菌体GA; e)噬菌体SP; f) 25 噬菌体MS2; g)噬菌体M11; h)噬菌体MX1; i)噬菌体NL95; k)噬菌体f2; l)噬菌体PP7。

在本发明的另一个优选实施方案中, 病毒样颗粒包含或基本由或由RNA-噬菌体QB或RNA-噬菌体fr的重组蛋白或其片段组成。

在本发明的一个更优选的实施方案中, 重组蛋白包含或基本由或



由 RNA 噬菌体的外壳蛋白组成。

因此，形成衣壳或 VLP 的 RNA-噬菌体外壳蛋白，或者适于自装配为衣壳或 VLP 的噬菌体外壳蛋白的片段，是本发明的更优选的实施方案。例如，噬菌体 Q $\beta$  外壳蛋白能够在大肠杆菌中重组表达。而且，这些蛋白质在表达后自动构成衣壳。另外，这些衣壳也能形成具有固有重复组织的结构。

能够用来制备本发明的组合物的噬菌体外壳蛋白的具体优选实例包括如下 RNA 噬菌体的外壳蛋白，如噬菌体 Q $\beta$  (SEQ ID NO:10; PIR 数据库，登录号 VCBPQ $\beta$ ，指 Q $\beta$  CP，和 SEQ ID NO:11; 登录号 AAA16663，指 Q $\beta$  A1 蛋白)，噬菌体 R17 (SEQ ID NO:12; PIR 登录号 VCBPR7)，噬菌体 fr (SEQ ID NO:13; PIR 登录号 VCBPFR)，噬菌体 GA (SEQ ID NO:14; GenBank 登录号 NP-040754)，噬菌体 SP (SEQ ID NO:15; GenBank 登录号 CAA30374，指 SP CP，和 SEQ ID NO:16; 关于 SP A1 蛋白的登录号)，噬菌体 MS2 (SEQ ID NO:17; PIR 登录号 VCBPM2)，噬菌体 M11 (SEQ ID NO:18; GenBank 登录号 AAC06250)，噬菌体 MX1 (SEQ ID NO:19; GenBank 登录号 AAC14699)，噬菌体 NL95 (SEQ ID NO:20; GenBank 登录号 AAC14704)，噬菌体 f2 (SEQ ID NO:21; GenBank 登录号 P03611)，噬菌体 PP7 (SEQ ID NO:22)。此外，噬菌体 Q $\beta$  的 A1 蛋白或从 C 端丢失多达 100、150 或 180 个氨基酸的 C 端截短形式可以掺入在 Q $\beta$  外壳蛋白的衣壳装配中。为了确保衣壳形成，衣壳装配中 Q $\beta$  A1 蛋白相对于 Q $\beta$  CP 的百分比通常受到限制。

也发现 Q $\beta$  外壳蛋白在大肠杆菌中表达时自装配为衣壳 (Kozlovska TM. 等人, GENE 137:133-137 (1993))。获得的衣壳或病毒样颗粒显示二十面体噬菌体样衣壳结构，直径 25 nm，T=3 准对称。噬菌体 Q $\beta$  的晶体结构已经解析。衣壳含有 180 个拷贝的外壳蛋白，它们通过二硫键连接成共价五聚体和六聚体 (Golmohammadi R. 等人, Structure 4:543-5554 (1996))，使 Q $\beta$  外壳蛋白的衣壳具有显著的稳定性。然而，由重组 Q $\beta$  外壳蛋白构成的衣壳或 VLP 可能含有与衣壳

内的其它亚单位不是通过二硫键连接或不完全连接的亚单位。因此，在重组 Q $\beta$  衣壳加样到非还原 SDS-PAGE 之后，对应于单体 Q $\beta$  外壳蛋白的带以及对应于 Q $\beta$  外壳蛋白五聚体或六聚体的带可见。不完全二硫键连接的亚单位在非还原 SDS-PAGE 中可能表现为二聚体、三聚体乃至四聚体带。Q $\beta$  衣壳蛋白对有机溶剂和变性剂也显示异常的抗性。我们惊奇地发现，高至 30% 的 DMSO 和乙腈浓度和高至 1M 的胍盐浓度不影响衣壳的稳定性。Q $\beta$  外壳蛋白衣壳的高稳定性是一个有利的特征，特别是对于根据本发明免疫和接种哺乳动物和人来说。

在大肠杆菌中表达后，Q $\beta$  外壳蛋白的 N 端甲硫氨酸通常被除去，通过如 Stoll, E. 等人, *J. Biol. Chem.* 252:990-993 (1977) 所述的 N 端 Edman 测序可以检测。本发明的范围内也包括由其中 N 端甲硫氨酸尚未去除的 Q $\beta$  外壳蛋白组成的 VLP，或者含有其中 N 端甲硫氨酸被切除或仍然存在的混合 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP。

RNA 噬菌体外壳蛋白在细菌宿主中表达后也进一步表现为自装配 (Kastelein, RA 等人, *Gene* 23:245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. 等人, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 287:452-455 (1986), Adhin, MR. 等人, *Virology* 170:238-242 (1989), Ni, CZ. 等人, *Protein Sci.* 5:2485-2493 (1996), Priano, C. 等人, *J. Mol. Biol.* 249:283-297 (1995))。Q $\beta$  噬菌体衣壳除了外壳蛋白外还含有所谓的连读蛋白 A1 和成熟蛋白 A2。A1 通过在 UGA 终止密码子处抑制而产生，长度为 329 个氨基酸。本发明中使用的噬菌体 Q $\beta$  重组外壳蛋白的衣壳都缺乏 A2 裂解蛋白，而含有来自宿主的 RNA。RNA 噬菌体的外壳蛋白是一种 RNA 结合蛋白，与复制酶基因的核糖体结合位点的茎环相互作用，作为病毒生命周期中的一种翻译抑制物。这种相互作用的序列和结构组件已知 (Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. *Biochemistry* 28:71-76 (1989); Lim F. 等人, *J. Biol. Chem.* 271:31839-31845 (1996))。已知茎环和 RNA 通常参与病毒装配 (Golmohammadi, R. 等人, *Structure* 4:543-5554 (1996))。

在本发明的一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或基本由

或由 RNA-噬菌体的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含、基本由或由 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白、优选地上述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白组成。在另一个优选实施方案中，RNA 噬菌体的突变外壳蛋白已通过置换除去至少一个赖氨酸残基、或者通过置换添加至少一个赖氨酸残基而被修饰；此外，RNA 噬菌体的突变外壳蛋白也可以通过删除至少一个赖氨酸残基、或通过插入添加至少一个赖氨酸残基而修饰。

在另一个优选实施方案中，病毒样颗粒包含或基本由或由 RNA 噬菌体 Q $\beta$  的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含或基本由或由下列成分组成：具有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的外壳蛋白，或具有 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的外壳蛋白的混合物，或 SEQ ID NO:11 的突变体，其中 N 端甲硫氨酸优选地被切除。

在本发明的一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或由 Q $\beta$  的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含或基本由或由突变 Q $\beta$  外壳蛋白组成。在另一个优选实施方案中，这些突变外壳蛋白通过置换去除至少一个赖氨酸残基或者通过置换添加至少一个赖氨酸残基而被修饰。此外，这些突变外壳蛋白也可以通过删除至少一个赖氨酸残基或通过插入添加至少一个赖氨酸残基而被修饰。

有 4 个赖氨酸残基暴露于 Q $\beta$  外壳蛋白的衣壳表面。本发明也可以使用以精氨酸替换暴露赖氨酸残基的 Q $\beta$  突变体。在本发明中可以使用下列 Q $\beta$  外壳蛋白突变体和突变 Q $\beta$  VLP: “Q $\beta$ -240”(Lys13-Arg; SEQ ID NO:23), “Q $\beta$ -243”(Asn 10-Lys; SEQ ID NO:24), “Q $\beta$ -250”(Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO:25), “Q $\beta$ -251”(SEQ ID NO:26) 和“Q $\beta$ -259”(Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:27)。因此，在本发明的更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或由突变 Q $\beta$  外壳蛋白的重组蛋白组成，其包含具有选自下列的氨基酸序列的蛋白质：a) SEQ ID NO:23 的氨基酸序列；b) SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；c) SEQ ID NO:25 的氨基酸序列；d) SEQ ID NO:26 的氨基酸序列；e)

SEQ ID NO:27 的氨基酸序列。上述 Q $\beta$  外壳蛋白、突变 Q $\beta$  外壳蛋白 VLP 和衣壳的构建、表达和纯化分别在 2002 年 1 月 18 日提交的未决的美国申请号 10/050,902 中公开。具体参照上述申请的实施例 18。

在本发明的一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或由 Q $\beta$  的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含、基本由或由上述 Q $\beta$  突变体之一和相应 A1 蛋白的混合物组成。

在本发明的一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或由 RNA-噬菌体 AP205 的重组蛋白或其片段组成。

AP205 基因组由成熟蛋白质、外壳蛋白、复制酶和相关噬菌体中不存在的两个开放阅读框组成；一种裂解基因和开放阅读框在成熟基因的翻译中起作用 (Klovins, J. 等人, *J. Gen. Virol.* 83:1523-33 (2002))。AP205 外壳蛋白能够由质粒 pAP283-58 (SEQ ID NO:79) 表达，该质粒是 pQb10 的衍生物 (Kozlovskaja, T.M. 等人, *Gene* 137:133-37 (1993))，含有一个 AP205 核糖体结合位点。此外，AP205 外壳蛋白也可以克隆到 pQb185 内，位于载体中核糖体结合位点的下游。两种方法都导致蛋白质的表达和衣壳的形成，如 2002 年 7 月 17 日提交的标题为“分子抗原阵列”的共同未决的美国临时专利申请 (申请号 60/396,126) 所述，在此完整引用作为参考。载体 pQb10 和 pQb185 是由 pGEM 载体衍生的载体，克隆到这些载体中的基因的表达受 *trp* 启动子控制 (Kozlovskaja, T.M. 等人, *Gene* 137:133-37 (1993))。质粒 pAP283-58 (SEQ ID NO:79) 包含推断的具有下列序列的 AP205 核糖体结合位点，位于 AP205 外壳蛋白的 XbaI 位点下游和 ATG 起始密码子直接上游：

tctagaATTTTCTGCGCACCCATCCCGGGTGGCGCCCAAAGTGAGG  
AAAATCACatg。载体 pQb185 在 XbaI 位点下游和起始密码子上游包含一个 SD 序列 (tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAGTCAGGCCatg, SD 序列以下划线标出)。

在本发明的一个更优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或由 RNA-噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段组成。

本发明的这一优选实施方案包含可构成衣壳的 AP205 外壳蛋白。这些蛋白质是重组表达的或从天然来源制备的。电子显微镜检查 (EM) 和免疫扩散证实, 在细菌中产生的 AP205 外壳蛋白自发形成衣壳。在 EM 中可见, AP205 外壳蛋白 (SEQ ID NO:80) 形成的衣壳  
5 与 AP205 RNA 噬菌体外壳蛋白形成的衣壳的结构特征几乎无法辨别。AP205 VLP 具有高度免疫原性, 能够与抗原和/或抗原决定簇连接, 产生以重复方式展示抗原和/或抗原决定簇的疫苗构建体。能够产生针对这样展示的抗原的高滴度抗体, 这表明结合的抗原和/或抗原决定簇能够与抗体分子相互作用, 并且具有免疫原性。

10 在本发明的一个更优选的实施方案中, 病毒样颗粒包含、基本由或由 RNA-噬菌体 AP205 的重组突变外壳蛋白或其片段组成。

AP205 VLP 的可装配突变形式, 包括氨基酸 5 处的脯氨酸被置换为苏氨酸的 AP205 外壳蛋白 (SEQ ID NO:81), 也可以在本发明中使用, 形成本发明的一个更优选的实施方案。这些 VLP、来自天然来源的 AP205 VLP 或 AP205 病毒颗粒可以与抗原结合, 产生根据本发  
15 明的规则、重复的抗原阵列。

AP205 P5-T 突变外壳蛋白能够由质粒 pAP281-32 (SEQ ID NO:82) 表达, 该质粒由 pQb185 直接衍生, 含有突变 AP205 外壳蛋白基因代替 Q $\beta$  外壳蛋白基因。用表达 AP205 外壳蛋白的载体转染大  
20 肠杆菌, 以表达 AP205 外壳蛋白。

分别表达外壳蛋白和突变外壳蛋白、导致自装配为 VLP 的方法, 在 2002 年 7 月 17 日提交的题为“分子抗原阵列”的共同未决的美国临时专利申请 (申请号 60/396,126) 中描述, 在此完整引用作为参考。合适的大肠杆菌株包括但不限于: 大肠杆菌 K802、JM 109、RR1。  
25 合适的载体和菌株及其组合能够通过 SDS-PAGE 分别检测外壳蛋白和突变外壳蛋白的表达而鉴定, 衣壳形成和装配如下鉴定: 任选地首先通过凝胶过滤纯化衣壳, 随后用免疫扩散试验 (Ouchterlony 试验) 或电子显微镜检查 (Kozlovskaya, T.M. 等人, Gene 137:133-137 (1993)) 检测。

由载体 pAP283-58 和 pAP281-32 表达的 AP205 外壳蛋白由于在大肠杆菌细胞质中加工,可能缺乏起始甲硫氨酸。AP205 VLP 的切割、未切割形式或其混合物是本发明的进一步优选的实施方案。

在本发明的另一个优选的实施方案中,病毒样颗粒包含、基本由或由 RNA-噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段和 RNA-噬菌体 AP205 的重组突变外壳蛋白或其片段的混合物组成。

在本发明的另一个优选的实施方案中,病毒样颗粒包含、基本由或由 RNA-噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或重组突变外壳蛋白的片段组成。

在本发明中也可使用能够分别装配为 VLP 和衣壳的重组 AP205 外壳蛋白片段。可以通过内部删除或分别在外壳蛋白和突变外壳蛋白的末端删除产生这些片段。向外壳蛋白和突变外壳蛋白序列中插入抗原序列或抗原序列与外壳蛋白和突变外壳蛋白序列融合(与 VLP 装配相容),是本发明的另一实施方案,分别产生嵌合 AP205 外壳蛋白和颗粒。插入、缺失以及与外壳蛋白序列融合的结果,以及是否与 VLP 装配相容,能够通过电子显微镜检查确定。

由上述 AP205 外壳蛋白、外壳蛋白片段和嵌合外壳蛋白形成的颗粒能够分离为纯化形式,分离方法是组合使用通过沉淀的分级分离步骤和通过凝胶过滤的纯化步骤,例如使用 Sepharose CL-4B、Sepharose CL-2B、Sepharose CL-6B 柱及其组合,如 2002 年 7 月 17 日提交的题为“分子抗原阵列”的共同未决的美国临时专利申请(申请号 60/396,126)所述,在此完整引用作为参考。分离病毒样颗粒的其它方法在本领域公知,可以用来分离噬菌体 AP205 的病毒样颗粒(VLP)。例如,美国专利号 4,918,166 描述了利用超速离心分离酵母逆转录转座子 Ty 的 VLP,在此完整引用作为参考。

几种 RNA 噬菌体的晶体结构已经测定(Golmohammadi, R.等人, Structure 4:543-554 (1996))。利用这些信息,能够鉴定表面暴露残基,从而能够修饰 RNA-噬菌体外壳蛋白,使得通过插入或置换能插入一个或多个反应性氨基酸残基。因此,噬菌体外壳蛋白的这些修饰形式

也可以用于本发明。因此，也可以用形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质变体（例如噬菌体 Q $\beta$ 、噬菌体 R17、噬菌体 fr、噬菌体 GA、噬菌体 SP 和噬菌体 MS2、噬菌体 AP 205 的外壳蛋白）制备本发明的组合物。

5 尽管上述变异蛋白质的序列不同于其野生型，但是这些变异蛋白质通常保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。因此，本发明还包括：分别还包含可形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质变体的组合物和疫苗组合物，以及分别制备这些组合物和疫苗组合物的方法，用来制备这些组合物的各种蛋白质亚单位，和编码这些蛋白质亚单位的核酸分子。因此，本发明的范围内包括野生型蛋白质的变体形式，它们可形成衣壳或衣壳样结构，保留结合并形成衣壳或衣壳样结构的能力。

因此，本发明还包括包含如下蛋白质的组合物和疫苗组合物，该蛋白质包含或基本由或由与野生型蛋白质至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成，它们各自可形成规则的阵列，具有固有的重复结构。

15 本发明的范围内还包括编码用来制备本发明组合物的蛋白质的核酸分子。

在其它实施方案中，本发明还包括包含如下蛋白质的组合物，该蛋白质包含或基本由或由与 SEQ ID NO:10-27 所示任一种氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成。

20 适用于本发明的蛋白质也包括可形成衣壳或衣壳样结构或 VLP 的蛋白质的 C 端截短突变体。这类截短突变体的具体例子包括具有 SEQ ID NO:10-27 任一种所示氨基酸序列的蛋白质，其中已经从 C 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸。这些 C 端截短突变体一般保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

25 适用于本发明的其它蛋白质也包括可形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质的 N 端截短突变体。这类截短突变体的具体例子包括具有 SEQ ID NO:10-27 任一个所示氨基酸序列的蛋白质，其中已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸。这些 N 端截短突变体一般保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

适用于本发明的其它蛋白质包括可形成衣壳或衣壳样结构的 N 端和 C 端截短突变体。合适的截短突变体包括具有 SEQ ID NO:10-27 任一个所示氨基酸序列的蛋白质，其中已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸，从 C 端除去 1、2、5、7、9、10、5 12、14、15 或 17 个氨基酸。这些 N 端和 C 端截短突变体一般保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

本发明还包括包含如下蛋白质的组合物，这些蛋白质包含或基本由或由与上述截短突变体至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99% 相同的氨基酸序列组成。

10 本发明包括由可形成衣壳或 VLP 的蛋白质制备的组合物和疫苗组合物，由各种蛋白质亚单位和 VLP 或衣壳制备这些组合物的方法，制备这些蛋白质亚单位的方法，编码这些亚单位的核酸分子，和利用本发明的这些组合物接种和/或在个体中引发免疫应答的方法。

保留诱发免疫应答能力的 VLP 片段可能包含或由如下长度的多肽组成，这些多肽长度约为 15、20、25、30、35、40、45、50、55、15 60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450 或 500 个氨基酸，显然这取决于组成 VLP 的亚单位的序列长度。这些片段的例子包括此处所述适于制备免疫应答增强组合物的蛋白质片段。

20 在本发明的另一个优选实施方案中，VLP 缺少脂蛋白包膜或含脂蛋白的包膜。在另一个优选实施方案中，VLP 完全不含包膜。

缺少脂蛋白包膜或含脂蛋白的包膜，特别是完全缺少包膜，产生结构和组成更加明确的病毒样颗粒。这些更加明确的病毒样颗粒可以使副作用减至最小。而且，缺少含脂蛋白的包膜，或者特别是完全缺 25 少包膜，使得病毒样颗粒内掺入潜在毒性分子和热原的可能性消失或减至最小。

如前所述，本发明包括病毒样颗粒或其重组形式。本领域技术人员了解如何生产这些颗粒并将其与抗原附着。通过其它的实例，本发明在此说明作为病毒样颗粒的乙型肝炎病毒样颗粒的生产（实施例



1)。

在一个实施方案中，本发明的组合物中使用的颗粒由修饰的乙型肝炎衣壳（核心）蛋白（HBcAg）或 HBcAg 片段构成，它们经过修饰除去或减少了游离半胱氨酸残基的数量。Zhou 等人（J. Virol. 5 66:5393-5398 (1992)）证实，修饰后除去自然存在的半胱氨酸残基的 HBcAg 保留结合并形成多聚体结构的能力。因此，适于在本发明的组合物中使用的核心颗粒包括那些包含修饰 HBcAg 或其片段的颗粒，其中一个或多个自然存在的半胱氨酸残基已被删除或被替换为另一种氨基酸残基（例如丝氨酸残基）。

10 HBcAg 是通过加工乙型肝炎核心抗原前体蛋白产生的蛋白质。HBcAg 的一些同种型已经被鉴定，本领域技术人员能够容易地获得其氨基酸序列。例如，具有图 1 所示氨基酸序列的 HBcAg 蛋白长度为 185 个氨基酸，是通过加工 212 个氨基酸的乙型肝炎核心抗原前体蛋白而产生的。这种加工导致从乙型肝炎核心抗原前体蛋白的 N 端除去  
15 29 个氨基酸。类似地，长度为 185 个氨基酸的 HBcAg 蛋白通过加工 214 个氨基酸的乙型肝炎核心抗原前体蛋白而产生。

在优选实施方案中，用 HBcAg 的加工形式（即已经除去乙型肝炎核心抗原前体蛋白的 N 端前导序列的 HBcAg）制备本发明的疫苗组合物。

20 另外，在不发生加工的条件下生产 HBcAg 时，HBcAg 通常表达为“加工”形式。例如，细菌系统（如大肠杆菌）通常不会除去在真核细胞中正常表达的蛋白质的前导序列，也称为“信号肽”。因此，当利用将蛋白质定向表达于细胞质的大肠杆菌表达系统生产本发明的 HBcAg 时，这些蛋白质通常表达为不含乙型肝炎核心抗原前体蛋白 N  
25 端前导序列的形式。

可用于本发明的乙型肝炎病毒样颗粒的制备在下列专利中有描述，例如：WO 00/32227、特别是其实施例 17-19 和 21-24，以及 WO 01/85208、特别是其实施例 17-19、21-24、31-41，和 2002 年 1 月 18 日提交的未决的美国申请 10/050,902 号。最后一个申请中具体参照实

施例 23、24、31 和 51。全部三篇文献在此均明确引用作为参考。

本发明也包括经修饰后缺失或置换一个或多个其它半胱氨酸残基的 HBcAg 变体。因此，本发明的疫苗组合物包括包含如下 HBcAg 的组合物，其中图 1 所示氨基酸序列中不含的半胱氨酸残基已经被删除。

本领域众所周知，游离半胱氨酸残基可能参与一些化学副反应。这些副反应包括二硫键交换，与例如在与其它物质联合治疗中注射或形成的化学物质或代谢物反应，或暴露于紫外线后的直接氧化以及与核苷酸的反应。因而可能产生毒性加合物，特别是考虑到 HBcAg 具有结合核酸的强烈倾向。毒性加合物将会以多种形式分布，它们单个可能以低浓度存在，但在一起存在时达到毒性水平。

如上所述，在疫苗组合物中使用经修饰除去天然存在的半胱氨酸残基的 HBcAg 的一个优点是，当抗原或抗原决定簇附着时，毒性物能够结合的位点在数量上减少或者完全消失。

适用于本发明的一些天然存在的 HBcAg 变体已经被鉴定。例如，Yuan 等人 (J. Virol. 73:10122-10128 (1999)) 描述了在对应于 SEQ ID NO:28 位点 97 的位点处异亮氨酸残基被置换为亮氨酸残基或苯丙氨酸残基的变体。一些 HBcAg 变体以及几种乙型肝炎核心抗原前体变体的氨基酸序列公开于 GenBank 报告 AAF121240 (SEQ ID NO:29)、AF121239 (SEQ ID NO:30)、X85297 (SEQ ID NO:31)、X02496 (SEQ ID NO:32)、X85305 (SEQ ID NO:33)、X85303 (SEQ ID NO:34)、AF151735 (SEQ ID NO:35)、X85259 (SEQ ID NO:36)、X85286 (SEQ ID NO:37)、X85260 (SEQ ID NO:38)、X85317 (SEQ ID NO:39)、X85298 (SEQ ID NO:40)、AF043593 (SEQ ID NO:41)、M20706 (SEQ ID NO:42)、X85295 (SEQ ID NO:43)、X80925 (SEQ ID NO:44)、X85284 (SEQ ID NO:45)、X85275 (SEQ ID NO:46)、X72702 (SEQ ID NO:47)、X85291 (SEQ ID NO:48)、X65258 (SEQ ID NO:49)、X85302 (SEQ ID NO:50)、M32138 (SEQ ID NO:51)、X85293 (SEQ ID NO:52)、X85315 (SEQ ID NO:53)、U95551 (SEQ

ID NO:54)、X85256 (SEQ ID NO:55)、X85316 (SEQ ID NO:56)、X85296 (SEQ ID NO:57)、AB033559 (SEQ ID NO:58)、X59795 (SEQ ID NO:59)、X85299 (SEQ ID NO:60)、X85307 (SEQ ID NO:61)、X65257 (SEQ ID NO:62)、X85311 (SEQ ID NO:63)、X85301 (SEQ ID NO:64)、X85314 (SEQ ID NO:65)、X85287 (SEQ ID NO:66)、X85272 (SEQ ID NO:67)、X85319 (SEQ ID NO:68)、AB010289 (SEQ ID NO:69)、X85285 (SEQ ID NO:70)、AB010289 (SEQ ID NO:71)、AF121242 (SEQ ID NO:72)、M90520 (SEQ ID NO:73)、P03153 (SEQ ID NO:74)、AF110999 (SEQ ID NO:75) 和 M95589 (SEQ ID NO:76), 其公开内容均在此引用作为参考。这些 HBcAg 变体在多个位点处的氨基酸序列不同, 包括对应于 SEQ ID NO:77 中位点 12、13、21、22、24、29、32、33、35、38、40、42、44、45、49、51、57、58、59、64、66、67、69、74、77、80、81、87、92、93、97、98、100、103、105、106、109、113、116、121、126、130、133、135、141、147、149、157、176、178、182 和 183 处氨基酸残基的氨基酸残基。WO 00/198333、WO 00/177158 和 WO 00/214478 中描述了适于在本发明的组合物中使用、并可根据本说明书公开内容进一步修饰的其它 HBcAg 变体。

适用于本发明的 HbcAg 可以来源于任何生物, 只要它们能够封装或偶联或附着、特别是能够包装含非甲基化 CpG 的寡核苷酸, 并诱发免疫应答。

如上所述, 一般将加工的 HBcAg (即缺乏前导序列的) 用于本发明的疫苗组合物中。本发明包括使用上述变异 HbcAg 的疫苗组合物, 以及应用这些组合物的方法。

本发明的范围内还包括能够连接形成二聚或多聚结构的其它 HBcAg 变体。因此, 本发明还包括包含 HBcAg 多肽的疫苗组合物, 该多肽中包含或由与任何一种野生型氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 相同的氨基酸序列组成, 以及必要时加工除去 N 端前导序列的这些蛋白质的形式。

一种多肽的氨基酸序列是否具有与野生型氨基酸序列之一或其亚部分至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列，可以利用公知的计算机程序如 Bestfit 程序常规确定。当利用 Bestfit 或其它任何序列比对程序确定一种特定序列与参照氨基酸序列是否如 95%相同时，设置参数使得在参照氨基酸序列的全长上计算同一性百分数，并且允许同源性缺口达参照序列中氨基酸残基总数的 5%。

具有 SEQ ID NO:29-72 和 73-76 所示氨基酸序列的 HBcAg 变体和前体彼此相对相似。因此，HBcAg 变体中位于对应于 SEQ ID NO:77 中特定位点的位点处的氨基酸残基，是指 SEQ ID NO:77 所示氨基酸序列中该位点处的氨基酸残基。在感染哺乳动物的乙型肝炎病毒之间，这些 HBcAg 变体之间的同源性绝大部分足够高，因此本领域技术人员不难检查分别如 SEQ ID NO:77 和图 1 所示的氨基酸序列，以及特定 HBcAg 变体的氨基酸序列，并确定“相应的”氨基酸残基。此外，SEQ ID NO:73 所示 HBcAg 氨基酸序列，其显示来源于感染土拨鼠的病毒的 HBcAg 的氨基酸序列，与含有 SEQ ID NO:77 所示氨基酸序列的 HBcAg 有足够的同源性，显然在 SEQ ID NO:73 中，相当于在 SEQ ID NO:77 的氨基酸残基 155 与 156 之间插入了 3 个氨基酸残基。

本发明也包括包含感染鸟类的乙型肝炎病毒 HBcAg 变体的疫苗组合物，以及包含这些 HBcAg 变体的片段的疫苗组合物。本领域技术人员会理解，在添加到本发明的疫苗组合物中之前，这些多肽中自然存在的 1、2、3 个或更多的半胱氨酸残基可以被置换为另一种氨基酸残基或者缺失。

如上所述，去除游离半胱氨酸残基减少了毒性成分能够与 HBcAg 结合的位点数，也除去了该 HBcAg 或相邻 HBcAg 分子的赖氨酸和半胱氨酸残基交联的位点。因此，在本发明的另一个实施方案中，乙型肝炎病毒衣壳蛋白的一个或多个半胱氨酸残基缺失或被替换为另一种氨基酸残基。

在其它实施方案中，本发明的组合物和疫苗组合物分别含有已经除去 C 端区的 HBcAg (例如 SEQ ID NO:77 的氨基酸残基 145-185 或

150-185)。适于在本发明中使用的其它修饰 HBcAg 包括 C 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 C 端除去 1、5、10、15、20、25、30、34、35 个氨基酸的 HBcAg。

适于在本发明中使用的 HBcAg 也包括 N 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸的修饰 HBcAg。

适于在本发明中使用的 HBcAg 还包括 N 端和 C 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸并且从 C 端除去 1、5、10、15、20、25、30、34、35 个氨基酸的 HBcAg。

本发明还包括分别包含 HBcAg 多肽的组合物和疫苗组合物，该多肽包含或基本由或由与上述截短突变体至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成。

在本发明的某些实施方案中，向 HBcAg 多肽内引入赖氨酸残基，以介导抗原或抗原决定簇与 HBcAg 的 VLP 的结合。在优选实施方案中，用一种 HBcAg 制备本发明的组合物，该 HBcAg 包含或由 SEQ ID NO:77 的氨基酸 1-144 或 1-149、1-185 组成，对其修饰使对应于位点 79 和 80 的氨基酸被替换为氨基酸序列为 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly 的肽 (SEQ ID NO:78)。这些组合物尤其可用于抗原决定簇与 HBcAg 的 VLP 相偶联的实施方案中。在进一步优选的实施方案中，SEQ ID NO:77 的位点 48 和 107 处的半胱氨酸残基突变为丝氨酸。本发明还包括包含相应多肽的组合物，该多肽具有 SEQ ID NO:29-74 任一所示的氨基酸序列，它们也含有上述氨基酸改变。本发明的范围内还包括能够连接形成衣壳或 VLP 并且含有上述氨基酸改变的其它 HBcAg 变体。因此，本发明还包括组合物和疫苗组合物，它们分别包含如下 HBcAg 多肽，该多肽包含或由与任何一种野生型氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成，以及必要时加工除去 N 端前导序列和通过上述氨基酸改变修饰的这些蛋白质的变化形式。

本发明的组合物或疫苗组合物可包含不同 HBcAg 的混合物。因此，这些疫苗组合物可由氨基酸序列不同的多种 HbcAg 构成。例如，可以制备包含“野生型”HBcAg 和一个或多个氨基酸残基已经改变（例如缺失、插入或置换）的修饰 HBcAg 的疫苗组合物。本发明的优选疫苗组合物是具有高度规则、重复的抗原阵列的组合物。

如上所述，本发明是基于以下的意外发现：免疫刺激物，优选地免疫刺激性核酸，更优选地 DNA 寡核苷酸，能够包装到 VLP 内。出乎意料的是，VLP 内的核酸可被特异性地置换为免疫刺激物，优选免疫刺激性核酸，更优选含有 CpG 基序的 DNA-寡核苷酸。例如，CpG-VLP 比不含 CpG 的对应物免疫原性显著提高、引发特异性更高的效应，并且诱发增强的 B 和 T 细胞应答。针对与 VLP 偶联、融合或以其他方式附着的抗原的免疫应答与针对 VLP 本身的免疫应答相似地增强。另外，针对 VLP 和抗原两者的 T 细胞应答尤其集中在 Th1 型。而且，包装的核酸和 CpG 分别受到保护而免于降解，即它们更加稳定。而且，来自先天免疫系统的细胞的非特异性激活被大大降低。

先天免疫系统能够识别微生物病原体所共有的固定分子模式。最近的研究揭示，这种识别是诱发高效免疫应答中的一个关键步骤。微生物产物增强免疫应答的主要机制是刺激 APC，特别是树状细胞，产生促炎细胞因子，并且表达高水平的 T 细胞共同刺激分子。这些激活的树状细胞随后启动初次 T 细胞应答，决定 T 细胞介导的效应功能的类型。

两类核酸，即 1) 在特定侧翼碱基内含有免疫刺激序列、特别是非甲基化 CpG 二核苷酸的细菌 DNA（称为 CpG 基序），2) 由多种病毒类型合成的双链 RNA，是能增强免疫应答的微生物成分的重要成员。合成双链(ds)RNA，如聚肌苷酸-聚胞苷酸（poly I:C），能够诱导树状细胞产生促炎细胞因子并表达高水平的共同刺激分子。

Tokunaga 和 Yamamoto 等人的一系列研究表明，细菌 DNA 或合成寡脱氧核苷酸诱导人 PBMC 和小鼠脾细胞产生 I 型干扰素（IFN）（Yamamoto 等人的综述，Springer Semin Immunopathol. 22:11-19）。

最初合成 Poly I:C 作为 I 型 IFN 的一种强诱导剂，但它也能诱导其它细胞因子如 IL-12。

优选的核糖核酸包括聚肌苷酸-聚胞苷酸双链 RNA (poly I:C)。核糖核酸及其修饰及其生产方法在 Levy, H.B.(Methods Enzymol. 1981, 5 78:242-251)、DeClercq, E (Methods Enzymol. 1981, 78:227-236)和 Torrence, P.F. (Methods Enzymol 1981;78:326-331)以及其中的参考文献中有描述。核糖核酸可以从生物中分离。核糖核酸也包括其它合成核糖核酸，特别是合成的 poly (I:C)寡核苷酸，它们通过磷酸二酯骨架的修饰、特别是通过硫代磷酸酯修饰形成核酸酶抗性。在另一个实施  
10 方案中，用脱氧核糖代替 poly (I:C)的核糖骨架。本领域技术人员了解合成寡核苷酸的合成方法。

在本发明的另一个优选实施方案中，包括可激活 toll 样受体 (TLR) 的分子。迄今为止已知 10 种人 toll 样受体。它们由多种配体激活。TLR2 由肽聚糖、脂蛋白、脂磷壁酸和酵母聚糖激活；TLR3  
15 由双链 RNA 如 poly (I:C)激活；TLR4 由脂多糖、脂磷壁酸和紫杉醇激活；TLR5 由细菌鞭毛、特别是鞭毛蛋白激活；TLR6 由肽聚糖激活；TLR7 由咪喹莫特和咪唑并喹啉化合物如 R418 激活；TLR9 由细菌 DNA、特别是 CpG DNA 激活。TLR1、TLR8 和 TLR10 的配体迄今为止还不知道。然而，最近的报告表明，相同的受体能够与不同的配体  
20 相互作用，并且存在其它受体。以上所列配体并非群举，本领域技术人员知道其它配体。

优选地，含非甲基化 CpG 的寡核苷酸包含序列：



其中  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  是任一种核苷酸。另外，该寡核苷酸可以  
25 包含约 6 个到约 100,000 个核苷酸，优选地约 6 个到约 2000 个核苷酸，更优选地约 20 个到约 2000 个核苷酸，更优选地包含约 20 个到约 300 个核苷酸。另外，该寡核苷酸也可以包含超过 100 个到约 2000 个核苷酸，优选地超过 100 个到约 1000 个核苷酸，更优选地超过 100 个到约 500 个核苷酸。

在一个优选实施方案中，含 CpG 的寡核苷酸在磷酸骨架上含有一个或多个硫代磷酸酯修饰。例如，本发明的范围内包括其中有一个或多个磷酸骨架修饰或者全部磷酸骨架修饰的含 CpG 的寡核苷酸，以及其中一个、多个或全部核苷酸磷酸骨架修饰为硫代磷酸酯修饰的含 CpG 的寡核苷酸。

含 CpG 的寡核苷酸可以是重组的、基因组的、合成的、cDNA、质粒衍生的和单链或双链的。为在本发明中应用，可以利用本领域众所周知的多种方法之一从头合成核酸。例如， $\beta$ -氰乙基亚磷酰胺法（Beaucage, S.L.和 Caruthers, M.H., Tet. Let. 22:1859 (1981); 核苷 H-磷酸法（Garegg 等人, Tet. Let. 27:4051-4054 (1986); Froehler 等人, Nucl. Acid. Res. 14:5399-5407 (1986); Garegg 等人, Tet. Let. 27:4055-4058 (1986); Gaffney 等人, Tet. Let. 29:2619-2622 (1988)）。这些化学法可以用市售的多种自动寡核苷酸合成仪进行。或者，CpG 也可以在质粒中大规模生产（参见 Sambrook, T.等人, 《分子克隆：实验室手册》，Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989），它在对患者施用后降解为寡核苷酸。可以利用已知技术如使用限制性内切酶、外切核酸酶或内切核酸酶，由现有的核酸序列（例如基因组或 cDNA 序列）制备寡核苷酸。

免疫刺激物、免疫刺激性核酸以及含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，可以用本领域已知的任何一种方法与 VLP 结合，只要该组合物在动物中能够增强免疫应答。例如，寡核苷酸可以共价或非共价结合。另外，VLP 也可以完全或部分地包封免疫刺激物、免疫刺激性核酸以及含非甲基化 CpG 的寡核苷酸。优选地，免疫刺激性核酸以及含非甲基化 CpG 的寡核苷酸能够结合于 VLP 位点，如寡核苷酸结合位点（天然或非天然存在的）、DNA 结合位点或 RNA 结合位点。在另一个实施方案中，VLP 位点包含一个富含精氨酸的重复片段。

本发明组合物的一个具体用途是为了增强对抗原的特异性免疫应答而激活树状细胞。可以用离体（*ex vivo*）或体内技术增强免疫应答。离体技术可以用于自体或异源细胞，但优选地用于自体细胞。在



优选实施方案中，树状细胞从外周血或骨髓中分离，但是可以从任何树状细胞来源中分离。为了癌症免疫治疗对树状细胞的离体操作在本领域的几篇参考文献中已有描述，包括 Engleman, E.G., Cytotechnology 25:1 (1997); Van Schooten, W. 等人, Molecular Medicine Today, June, 255 (1997); Steinman, R.M., Experimental Hematology 24:849 (1996); Gluckman, J.C., Cytokines, Cellular and Molecular Therapy 3:187 (1997)。

也可以利用体内方法使树状细胞接触本发明的组合物。为了实现这一点，将 CpG 与一种任选地偶联、融合或以其他方式附着有抗原的 VLP 组合，直接给予需要免疫治疗的患者。在一些实施方案中，  
10 优选地在肿瘤局部区域施用 VLP/CpG, 这能够用本领域周知的任何一种方法实现，例如直接向肿瘤内注射。

本发明的组合物还可以包含与病毒样颗粒结合的抗原或抗原决定簇。本发明根据希望的治疗效果提供依所选抗原或抗原决定簇而不同的组合物。适用于本发明的非常优选的抗原或抗原决定簇公开在  
15 WO 00/32227、WO 01/85208 和 WO 02/056905 中，其公开内容在此完整引用作为参考。

抗原可以是来源已知或者未知的任何抗原。可以从细菌、病毒或其它病原体中分离，或者可以通过合适的编码核酸表达获得的重组  
20 抗原。也可以从朊病毒、肿瘤、自体分子、非肽半抗原分子、变应原和激素分离。在一个优选实施方案中，抗原是一种重组抗原。抗原的选择当然取决于希望的免疫应答和宿主。

在本发明的免疫增强组合物的一个实施方案中，诱发对 VLP 本身的免疫应答。在本发明的另一个实施方案中，病毒样颗粒与希望增强对其免疫应答的一种抗原/免疫原偶联、融合或以其他方式附着。  
25

在本发明的另一个优选的实施方案中，至少一种抗原或抗原决定簇与病毒样颗粒融合。如上所述，VLP 一般由至少一种可装配为 VLP 的亚单位组成。因此，在本发明的一个更优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇与病毒样颗粒的或能够掺入 VLP 内的蛋白质的至少一种

亚单位融合，产生嵌合的 VLP-亚单位-抗原融合体。

抗原或抗原决定簇的融合可以按如下实现：插入 VLP 亚单位序列内，或与 VLP 亚单位或能够掺入 VLP 内的蛋白质的 N 端或 C 端融合。在下文中，当提到一种肽与 VLP 亚单位的融合蛋白时，包括该  
5 肽与亚单位序列任一端的融合或向亚单位序列内的内部插入。

也可以通过向 VLP 亚单位变体内插入抗原或抗原决定簇序列实现融合，其中亚单位序列的一部分缺失，也被称为截短突变体。截短突变体可能在 N 端或 C 端或内部缺失 VLP 亚单位的部分序列。例如，氨基酸残基 79-81 缺失的具体 VLP HBcAg 是含有内部缺失的截短突  
10 变体。抗原或抗原决定簇与截短突变体 VLP-亚单位的 N 端或 C 端的融合也产生本发明的实施方案。同样，表位向 VLP 亚单位序列内的融合也可以通过置换实现，例如对于特定 VLP HBcAg，用一种外源表位代替氨基酸 79-81。因此，如下文所说的融合可以如下实现：向  
15 VLP 亚单位的序列中插入抗原或抗原决定簇序列，用抗原或抗原决定簇置换 VLP 亚单位序列的一部分，或者缺失、置换或插入的组合。

嵌合抗原或抗原决定簇-VLP 亚单位通常能够自装配为 VLP。能展示与亚单位融合的表位的 VLP 在此也称为嵌合 VLP。如上所述，病毒样颗粒包含或由至少一种 VLP 亚单位组成。在本发明的另一实施方案中，病毒样颗粒包含或由嵌合 VLP 亚单位和非嵌合 VLP 亚单  
20 位（即不与抗原融合的 VLP 亚单位）的混合物组成，产生所谓的镶嵌颗粒。这可能有利于确保 VLP 的形成和装配。在这些实施方案中，嵌合 VLP-亚单位的比例可能是 1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95%或更高。

侧翼氨基酸残基可以添加到与 VLP 亚单位序列的任一端融合的  
25 肽或表位序列的任一端，或者向 VLP 亚单位序列内部插入这种肽序列。甘氨酸和丝氨酸残基是特别有用的氨基酸，可以在向待融合肽中添加的侧翼序列中使用。甘氨酸残基提供额外的柔性，这可降低外源序列与 VLP 亚单位序列融合中潜在的去稳定作用。

在本发明的一个具体实施方案中，VLP 是一种乙型肝炎核心抗原

VLP。抗原或抗原决定簇与 HBcAg N 端的融合蛋白 (Neyrinck, S. 等人, Nature Med. 5:1157-1163 (1999)) 或向所谓的主要免疫显性区 (MIR) 中的插入已经有报道 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001), WO 01/98333), 也是本发明的优选实施方案。在

5 MIR 中有缺失的天然存在的 HBcAg 变体也已经有报道 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001), 在此完整引用作为参考), 与 N 端或 C 端的融合以及与野生型 HBcAg 相比在对应于缺失位点的 MIR 位点处的插入, 也是本发明的实施方案。与 C 端的融合也已经有

10 报道 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001))。本领域技术人员能容易地找到如何利用经典分子生物学技术构建融合蛋白的指南 (Sambrook, J. 等人编著, 《分子克隆: 实验室手册》, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ho 等人, Gene 77:51 (1989))。编码 HBcAg 和 HBcAg 融合蛋白并且可用于表达 HBcAg 和 HBcAg 融合蛋白的载体和质粒已经有报

15 道 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001), Neyrinck, S. 等人, Nature Med. 5:1157-1163 (1999)), 可用于实施本发明。优化自装配效率和插入 HBcAg MIR 内之表位展示的一个重要因素是插入位点的选择, 以及插入时从 MIR 内 HBcAg 序列上删除的氨基酸数量

20 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001); EP 0 421 635; 美国专利号 6,231,864), 换句话说, 哪些 HBcAg 氨基酸将被置换为新的表位。例如, 已经报道了用外源表位置换 HBcAg 氨基酸 76-80、79-81、79-80、75-85 或 80-81 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001); EP0421635; US 6,231,864)。HBcAg 含有一个长精氨酸尾 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114

25 (2001)), 它不是衣壳装配并能够结合核酸所必需的 (Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001))。包含或缺乏这一精氨酸尾的 HbcAg 都是本发明的实施方案。

在本发明的另一个优选的实施方案中, VLP 是一种 RNA 噬菌体的 VLP。RNA 噬菌体的主要外壳蛋白在细菌、特别是在大肠杆菌内

表达后自发装配为 VLP。可用来制备本发明组合物的噬菌体外壳蛋白的具体例子包括 RNA 噬菌体如噬菌体 Q $\beta$  (SEQ ID NO:10, PIR 数据库, 登录号 VCBPQ $\beta$ , 指 Q $\beta$  CP; 和 SEQ ID NO:11, 登录号 AAA16663, 指 Q $\beta$  A1 蛋白) 和噬菌体 fr (SEQ ID NO:13, PIR 登录号 VCBPFR) 的外壳蛋白。

在本发明的一个更优选的实施方案中, 至少一种抗原或抗原决定簇与 Q $\beta$  外壳蛋白融合。已经报道了如下融合蛋白构建体, 其中表位与 Q $\beta$  A1 蛋白截短形式的 C 端融合, 或插入 A1 蛋白内 (Kozlovska, T.M. 等人, *Intervirology*, 39:9-15 (1996))。A1 蛋白是通过 UGA 终止密码子处的抑制产生的, 长度为 329 个氨基酸, 或者如果考虑 N 端甲硫氨酸的切除, 为 328 个氨基酸。丙氨酸 (Q $\beta$  CP 基因编码的第二个氨基酸) 之前 N 端甲硫氨酸的切除在大肠杆菌中常常发生, Q $\beta$  外壳蛋白的 N 端就是如此。位于 UGA 琥珀密码子 3' 边的 A1 基因部分编码长度为 195 个氨基酸的 CP 延伸。在 CP 延伸的位点 72 与 73 之间插入至少一个抗原或抗原决定簇产生本发明另外的实施方案 (Kozlovska, T.M. 等人, *Intervirology* 39:9-15 (1996))。抗原或抗原决定簇在 C 端截短的 Q $\beta$  A1 蛋白 C 端处的融合产生本发明另外的优选实施方案。例如, Kozlovska, T.M. 等人 (*Intervirology* 39:9-15 (1996)) 描述了如下 Q $\beta$  A1 蛋白融合, 其中表位融合在位点 19 处截短的 Q $\beta$  CP 延伸的 C 端。

如 Kozlovska 等人 (*Intervirology* 39:9-15 (1996)) 所述, 展示融合表位的颗粒的装配一般需要存在 A1 蛋白-抗原融合和野生型 CP, 以形成镶嵌颗粒。然而, 仅由与至少一种抗原或抗原决定簇融合的 VLP 亚单位组成的病毒样颗粒、特别是 RNA 噬菌体 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 的实施方案也在本发明的范围内。

镶嵌颗粒的产生可以用数种方法实现。Kozlovska 等人, *Intervirology* 39:9-15 (1996) 描述了 3 种方法, 它们均用于实施本发明。第一种方法, 通过在如下大肠杆菌菌株中表达在 CP 与 CP 延伸之间含有一个 UGA 终止密码子的编码 Q $\beta$  A1 融合蛋白的质粒, 介导 VLP

上融合表位的有效展示, 该大肠杆菌菌株携带编码克隆 UGA 抑制性 tRNA 的质粒, 使 UGA 密码子翻译为 Trp( pISM3001 质粒( Smiley B.K. 等人, Gene 134:33-40 (1993))。另一种方法, 将 CP 基因终止密码子修饰为 UAA, 并与表达 A1 蛋白-抗原融合体的第二种质粒共转化。  
5 该第二种质粒编码不同的抗生素抗性, 其复制起点与第一种质粒相容 ( Kozlovska, T.M.等人, Intervirology 39:9-15 (1996))。第三种方法, CP 和 A1 蛋白-抗原融合体以双顺反子的形式编码, 与启动子如 Trp 启动子有效连接, 如 Kozlovska 等人, Intervirology 39:9-15 (1996)的图 1 所示。

10 在另外一个实施方案中, 抗原或抗原决定簇插入在 fr CP 的氨基酸 2 与 3 之间 (切割的 CP 的编号, 其中 N 端甲硫氨酸已经切除), 从而产生抗原或抗原决定簇-fr CP 融合蛋白。用于构建和表达可自装配为 VLP 的 fr CP 融合蛋白并且可用于本发明的载体和表达系统已经有报道 ( Pushko P.等人, Prot. Eng. 6:883-891 (1993))。在一个具体实  
15 施方案中, 抗原或抗原决定簇序列插入在 fr CP 缺失变体内氨基酸 2 之后, 该变体中 fr CP 的残基 3 和 4 缺失 ( Pushko P.等人, Prot. Eng. 6:883-891 (1993))。

表位在 RNA 噬菌体 MS-2 外壳蛋白的 N 端突起 $\beta$ -发夹中的融合, 以及随后融合表位在 RNA 噬菌体 MS-2 的自装配 VLP 上的呈递, 也  
20 已经有描述 ( WO 92/13081), 抗原或抗原决定簇通过插入或置换融合到 MS-2 RNA 噬菌体的外壳蛋白内也属于本发明的范围。

在本发明的另一个实施方案中, 抗原或抗原决定簇与乳头瘤病毒的衣壳蛋白融合。在一个更具体的实施方案中, 抗原或抗原决定簇与  
25 1 型牛乳头瘤病毒 ( BPV-1) 的主要衣壳蛋白 L1 融合。用于构建及在杆状病毒/昆虫细胞系统内表达 BPV-1 融合蛋白的载体和表达系统已经有描述 ( Chackerian, B. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955)。用一种抗原或抗原决定簇置换 BLV-1 L1 的氨基酸 130-136 产生 BPV-1 L1-抗原融合蛋白, 这是本发明的一个优选实施方案。在杆状病毒载体中克隆以及在杆状病毒感染

的 Sf9 细胞中表达已经有描述，可用于实施本发明（Chackerian, B. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955）。展示所融合抗原或抗原决定簇的装配颗粒可以用多种方法进行纯化，如凝胶过滤或蔗糖梯度超速离心（Chackerian, B. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955）。

在本发明的一个实施方案中，抗原或抗原决定簇与一种能够掺入 Ty VLP 内的 Ty 蛋白融合。在一个更具体的实施方案中，抗原或抗原决定簇与 TYA 基因编码的 p1 或衣壳蛋白融合（Roth, J.F., Yeast 16:785-795 (2000)）。酵母逆转录转座子 Ty1、2、3、4 已经从酿酒酵母中分离，而逆转录转座子 Tf1 已经从粟酒裂殖酵母中分离（Boeke, J.D. 和 Sandmeyer, S.B., “酵母转座因子”，《酵母的分子和细胞生物学：基因组动力学、蛋白质合成和能量学》，p.193, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991)）。逆转录转座子 Ty1 和 2 与植物和动物因子的 copia 类别有关，而 Ty3 属于逆转录转座子的 gypsy 家族，它与植物和动物逆转录病毒有关。在 Ty1 逆转录转座子中，p1 蛋白（也称为 Gag 或衣壳蛋白）的长度为 440 个氨基酸。p1 在 VLP 的成熟过程中在位点 408 处被切割，产生 p2 蛋白，后者是 VLP 的必要组分。

与 p1 的融合蛋白和用于在酵母中表达该融合蛋白的载体已经有描述（Adams, S.E. 等人, Nature 329:68-70 (1987)）。例如，通过向 pMA5620 质粒的 BamHI 位点内插入编码抗原或抗原决定簇的序列，该抗原或抗原决定簇可与 p1 融合（Adams, S.E. 等人, Nature 329:68-70 (1987)）。将编码外源表位的序列克隆到 pMA5620 载体内导致融合蛋白的表达，该融合蛋白包含 Ty1-15 的 p1 氨基酸 1-381，其 C 端与外源表位的 N 端融合。同样，抗原或抗原决定簇的 N 端融合，或向 p1 序列内的内部插入，或 p1 序列一部分的置换，也属于本发明的范围内。具体而言，将一种抗原或抗原决定簇插入 Ty 序列内 Ty 蛋白 p1 的氨基酸 30-31、67-68、113-114 和 132-133 之间（EP0677111），产生本发明的优选实施方案。

适于抗原或抗原决定簇融合的其它 VLP 有，例如：逆转录病毒

样颗粒 (WO9630523)、HIV2 Gag (Kang, Y.C.等人, Biol. Chem. 380:353-364 (1999))、豇豆花叶病毒 (Taylor, K.M.等人, Biol. Chem. 380:387-392 (1999))、细小病毒 VP2 VLP (Rueda, P.等人, Virology 263:89-99 (1999))、HBsAg (US 4,722,840, EP0020416B1)。

5 适于本发明的嵌合 VLP 的例子也包括 Intervirology 39:1 (1996) 中所描述的那些。可用于本发明的 VLP 的其它例子有: HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、COPV、HIV GAG、烟草花叶病毒。也已制备了 SV40、多瘤病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒、轮状病毒和诺瓦克病毒的病毒样颗粒, 包含抗原或抗原决定簇的这些 VLP 的嵌合 VLP 也属于本发明的范围。

10 如上所述, 通过插入病毒样颗粒构建单体的序列内, 包含与病毒样颗粒融合的抗原的实施方案, 也属于本发明的范围。有时, 抗原可以插入在包含缺失的病毒样颗粒构建单体形式中。此时, 在没有插入抗原的情况下, 病毒样颗粒构建单体可能不能形成病毒样结构。

15 有时, 可以应用重组 DNA 技术使一种异源蛋白质与一种 VLP 蛋白相融合 (Kratz, P.A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1915 (1999))。例如, 本发明包括与本发明的抗原 (或其部分, 优选地至少 10、20 或 50 个氨基酸) 重组融合或化学偶联 (包括共价和非共价偶联) 的 VLP, 产生融合蛋白或偶联物。这种融合不一定必须是直接融合, 可以通过接头序列发生。更一般而言, 当使用与病毒样颗粒融合、偶联或附着的表位作为根据本发明的抗原时, 一般在表位的一端或两端添加间隔或接头序列。这些接头序列优选地包含可被蛋白酶体、内体的蛋白酶或细胞的其它囊状区室识别的序列。

25 一种偶联方法是通过肽键, 其中偶联物可以是一种连续的多肽, 即融合蛋白。对于根据本发明的融合蛋白, 不同肽或多肽在框内彼此连接, 形成一条连续多肽。因此, 该融合蛋白的第一部分包含一种抗原或免疫原, 该融合蛋白的第二部分在第一部分的 N 端或 C 端包含 VLP。或者, 本发明也可以向 VLP 的内部插入, 在抗原两端任选地带连接序列。

当用 HBcAg 作为 VLP 时, 抗原优选地与 HBcAg 颗粒的 C 端连接。展示 MHC I 类限制的肽 p33 (来源于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)糖蛋白) 的 C 端融合的乙型肝炎核心抗原 (HBcAg) 作为模型抗原 (HBcAg-p33)。长度为 185 个氨基酸的野生型 HBc 蛋白装配为非常规则的颗粒, 它由 180 个亚单位组成, 表现为几何二十面体。可以在 HBcAg 和其它 VLP 的不同位点插入相对较大的外源序列, 而保留形成结构化衣壳的能力, 这种弹性在文献中有很好的证明。这使得 HBc VLP 成为设计非复制性疫苗的有力候选者。

可以向融合蛋白的抗原与配体之间插入一个柔性的接头序列 (例如, 含聚甘氨酸-聚丝氨酸的序列, 如[Gly<sub>4</sub>Ser]<sub>2</sub>(Huston 等人, Meth. Enzymol 203:46-88 (1991)))。也可以构建一种融合蛋白使之含有一个“表位标签”, 该标签使融合蛋白能够结合一种抗体 (例如单克隆抗体), 例如用于标记或纯化。表位标签的一个例子是 Glu-Glu-Phe 三肽, 它可被单克隆抗体 YL1/2 识别。

本发明也涉及含有编码 VLP 的序列和编码抗原/免疫原的序列的嵌合 DNA。例如, 该 DNA 能够在杆状病毒转化的昆虫细胞中、在酵母细胞或细菌中表达。对表达系统没有任何限制, 常规用途的表达系统有大量选择。优选使用允许蛋白质大量表达的系统。由于细菌表达系统的效率高, 通常优选该系统。适用于本发明的细菌表达系统的一个例子见 Clarke 等人, J. Gen. Virol. 71:1109-1117 (1990); Borisova 等人, J. Virol. 67:3696-3701 (1993); Studier 等人, Methods Enzymol. 185:60-89 (1990)中所述。合适的酵母表达系统的一个例子见 Emr. Methods Enzymol. 185:231-3 (1990)中所述; 杆状病毒系统也是适用的, 它们以前曾用于制备衣壳蛋白。可以使用组成型或诱导型表达系统。通过有效表达系统的选择和可能的修饰, 可能控制所获蛋白质的形式。

在本发明的一个具体实施方案中, 希望增强对其免疫应答的抗原与乙型肝炎病毒衣壳 (核心) 蛋白 (HBcAg) 在框内偶联、融合或以其它方式附着。然而, 本领域所有人员都应当清楚, 在本发明的融合



蛋白构建中也可以使用其它病毒样颗粒。

在本发明的一个更优选的实施方案中，所述至少一种抗原或抗原决定簇通过至少一个共价键与病毒样颗粒结合。优选地，该至少一种抗原或抗原决定簇通过至少一个共价键与病毒样颗粒结合，该共价键  
5 是一种非肽键，分别导致产生抗原或抗原决定簇阵列和抗原或抗原决定簇-VLP 偶联物。这种抗原或抗原决定簇阵列和偶联物一般且优选地分别具有重复、规则的结构，因为所述至少一种抗原或抗原决定簇以定向方式与 VLP 结合。所述至少一种抗原或抗原决定簇与 VLP 的定向及明确的结合和附着确保了重复、规则的抗原或抗原决定簇-VLP  
10 阵列和偶联物的形成，这在下文中可以看出。而且，VLP 固有的典型高度重复性规则结构有助于以高度规则、重复的方式展示抗原或抗原决定簇，分别产生高度规则、重复的抗原或抗原决定簇-VLP 阵列和偶联物。

因此，本发明优选的偶联物和阵列在高度组织化结构、大小和阵列表面抗原重复性等方面都不同于现有的偶联物。本发明优选的实施方案还允许颗粒在表达宿主中表达，保证 VLP 的正确折叠和装配，  
15 然后抗原进一步与之偶联。

本发明公开了抗原或抗原决定簇与 VLP 的结合方法。如上所述，在本发明的一个方面，通过化学交联，一般且优选地通过使用异双功能交联剂，将至少一种抗原或抗原决定簇与 VLP 结合。本领域已知  
20 一些异双功能交联剂。在优选实施方案中，异双功能交联剂的一个功能基团能够与优选的第一附着位点（即 VLP 或至少一个 VLP 亚单位的赖氨酸残基的侧链氨基）反应，另一个功能基团能够与优选的第二附着位点（即与抗原或抗原决定簇融合的、任选地也可进行还原反应的半胱氨酸残基）反应。该方法的第一步，一般称为衍生化，是 VLP  
25 与交联剂的反应。反应产物是活化的 VLP，也称为活化载体。第二步，按常用方法如凝胶过滤或透析除去未反应的交联剂。第三步，抗原或抗原决定簇与活化的 VLP 反应，该步骤一般称为偶联步骤。未反应的抗原或抗原决定簇任选地可在第四步中除去，例如通过透析。有几

种异双功能交联剂是本领域公知的。这包括优选的交联剂 SMPH (Pierce)、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、SVSB、SIA 和例如可从 Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA) 获得的其它交联剂，其含有一个对氨基有反应性的功能基团和一个对半胱氨酸残基有反应性的功能基团。上述交联剂均导致硫醚键的形成。适用于本发明的另一类交联剂，其特征在于偶联时在抗原或抗原决定簇与 VLP 之间引入一个二硫键。属于这一类的优选交联剂包括，例如 SPDP 和 Sulfo-LC-SPDP (Pierce)。交联剂衍化 VLP 的程度可受不同实验条件的影响，如反应双方各自的浓度，一种试剂相对于另一种的过量，pH，温度和离子强度。偶联程度，即相对于每个 VLP 亚单位的抗原或抗原决定簇的量，可通过改变上述实验条件来调节，以满足疫苗的要求。

抗原或抗原决定簇与 VLP 的一种特别优选的结合方法是 VLP 表面的赖氨酸残基与抗原或抗原决定簇上的半胱氨酸残基连接。在某些实施方案中，含有半胱氨酸残基作为第二附着位点或作为其一部分的氨基酸接头与抗原或抗原决定簇融合，可能是与 VLP 偶联所必需的。

柔性的氨基酸接头通常是优选的。氨基酸接头的例子选自：(a) CGG；(b) N-端 $\gamma$ -1 接头；(c) N-端 $\gamma$ -3 接头；(d) Ig 铰链区；(e) N-端甘氨酸接头；(f)  $(G)_kC(G)_n$ ，其中  $n=0-12$ ， $k=0-5$ ；(g) N-端甘氨酸-丝氨酸接头；(h)  $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$ ，其中  $n=0-3$ ， $k=0-5$ ， $m=0-10$ ， $l=0-2$ ；(i) GGC；(k) GGC-NH<sub>2</sub>；(l) C 端 $\gamma$ -1 接头；(m) C-端 $\gamma$ -3 接头；(n) C-端甘氨酸接头；(o)  $(G)_nC(G)_k$ ，其中  $n=0-12$ ， $k=0-5$ ；(p) C-端甘氨酸-丝氨酸接头；(q)  $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$ ，其中  $n=0-3$ ， $k=0-5$ ， $m=0-10$ ， $l=0-2$ ， $o=0-8$ 。

氨基酸接头的其它例子包括免疫球蛋白的铰链区、甘氨酸丝氨酸接头  $(GGGGS)_n$  和甘氨酸接头  $(G)_n$ ，它们均还含有一个半胱氨酸残基作为第二附着位点，任选地含有另外的甘氨酸残基。这类氨基酸接头的典型优选实例是：N-端 $\gamma$ 1: CGDKTHTSPP；C-端 $\gamma$ 1: DKTHTSPPCG；N-端 $\gamma$ 3 : CGGPKPSTPPGSSGGAP ; C-端 $\gamma$ 3 :

PKPSTPPGSSGGAPGGCG; N-端甘氨酸接头: GCGGGG; C-端甘氨酸接头: GGGGCG。

当疏水抗原或抗原决定簇与 VLP 结合时, 特别适于本发明的其它氨基酸接头有, 作为 N-端接头的 CGKKGG 或 CGDEGG, 或者作为 C-端接头的 GGKKGC 和 GGEDGC。对于 C-端接头, 末端半胱氨酸任选地被 C 端酰胺化。

在本发明的优选实施方案中, 优选肽 C-端的 GGCG、GGC 或 GGC-NH<sub>2</sub> (“NH<sub>2</sub>”表示酰胺化) 接头或肽 N-端的 CGG 作为氨基酸接头。甘氨酸残基通常插入大氨基酸与作为第二附着位点的半胱氨酸之间, 以避免偶联反应中较大氨基酸的可能空间位阻。在本发明的最优选的实施方案中, 氨基酸接头 GGC-NH<sub>2</sub> 与抗原或抗原决定簇的 C-端融合。

抗原或抗原决定簇上的半胱氨酸残基必须是还原状态, 才能与活化的 VLP 上的异双功能交联剂反应, 即必须有含有游离巯基的游离半胱氨酸或半胱氨酸残基。当作为结合位点的半胱氨酸残基是氧化形式时, 例如, 如果形成二硫键, 则需要用例如 DTT、TCEP 或 β-巯基乙醇还原该二硫键。如 WO 02/05690 所述, 低浓度还原剂适于偶联, 技术人员应当知道, 较高浓度抑制偶联反应, 此时必须在偶联前必须除去还原剂, 或者降低其浓度, 例如通过透析、凝胶过滤或反相 HPLC。

根据上述优选方法, 利用异双功能交联剂使抗原或抗原决定簇与 VLP 结合, 可使抗原或抗原决定簇与 VLP 以定向方式偶联。抗原或抗原决定簇与 VLP 结合的其它方法包括使用碳二亚胺 EDC 和 NHS 将抗原或抗原决定簇与 VLP 交联的方法。另外一些方法使用均双功能剂, 如戊二醛、DSG、BM[PEO]<sub>4</sub>、BS<sup>3</sup> (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) 或含有对 VLP 的氨基或羧基具有反应性的功能基团的其它已知均双功能交联剂, 使抗原或抗原决定簇与 VLP 附着。

VLP 与抗原或抗原决定簇结合的其它方法包括生物素化 VLP、抗原或抗原决定簇表达为链亲和素-融合蛋白的方法, 或抗原或抗原决定簇和 VLP 均被生物素化的方法, 如 WO 00/23955 所述。在这种情

况下，通过调节抗原或抗原决定簇与链亲和素的比例，首先使抗原或抗原决定簇与链亲和素或亲和素结合，使得仍有自由结合位点可与下一步添加的 VLP 结合。或者，也可以在“一锅”反应中混合所有成分。其它配体-受体对也可以作为结合抗原或抗原决定簇与 VLP 的结合剂，其中存在受体和配体的可溶形式，并且能够与 VLP 或抗原或抗原决定簇交联。或者，配体或受体也可以与抗原或抗原决定簇融合，从而介导分别与受体或配体化学结合或融合的 VLP 的结合。也可以通过插入或置换实现融合。

如前所述，在本发明的一个优选实施方案中，VLP 是 RNA 噬菌体的 VLP，在一个更优选的实施方案中，VLP 是 RNA 噬菌体 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP。

如果空间上允许，一个或几个抗原分子，即一个或几个抗原或抗原决定簇，能够附着于 RNA 噬菌体外壳蛋白的衣壳或 VLP 的一个亚单位上，优选地通过 RNA 噬菌体 VLP 的暴露赖氨酸残基附着。RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP，特别是 Q $\beta$  外壳蛋白 VLP 的一个特殊特征是每个亚单位能够偶联几个抗原。这能够产生密集的抗原阵列。

在本发明的一个优选实施方案中，所述至少一种抗原或抗原决定簇与病毒样颗粒的结合和附着分别是通过病毒样颗粒的至少一个第一附着位点与抗原或抗原决定簇的至少一个第二附着位点之间的相互作用和连接实现的。

Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 或衣壳在其表面展示数量确定的赖氨酸残基，具有确定的拓扑学，有 3 个赖氨酸残基指向衣壳内部，并与 RNA 相互作用，其它 4 个赖氨酸残基暴露于衣壳外面。这些明确的特性有利于抗原附着于颗粒外部，而不是赖氨酸残基与 RNA 相互作用的颗粒内部。其它 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 在其表面也有数量确定的赖氨酸残基，这些赖氨酸残基有确定的拓扑学。

在本发明的更优选的实施方案中，第一附着位点是赖氨酸残基，并且/或者第二附着位点包含巯基或半胱氨酸残基。在本发明的一个非常优选的实施方案中，第一附着位点是赖氨酸残基，第二附着位点是

半胱氨酸残基。

在本发明的一个非常优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇通过半胱氨酸残基与 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 的赖氨酸残基结合，特别是与 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 结合。

5 来源于 RNA 噬菌体的 VLP 的另一个优点是它们在细菌中的高表达量，这允许以较低的成本大量生产材料。

如上所述，本发明的偶联物和阵列在高度组织化结构、大小以及阵列表面抗原重复性等方面分别不同于现有的偶联物。而且，用 VLP 作为载体可以分别形成具有不同抗原密度的庞大的抗原阵列和偶联物。特别是，使用 RNA 噬菌体的 VLP，尤其是使用 RNA 噬菌体 Q $\beta$  10 外壳蛋白的 VLP，能够获得极高的表位密度。具体而言，将人 A $\beta$ 1-6 表位与 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 偶联，能够获得每个亚单位 1.5 个以上表位的密度。具有高表位密度的 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 组合物的制备可以根据本申请的教导实现。在本发明的优选实施方案中，当抗原 15 或抗原决定簇与 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 偶联时，每个亚单位的平均抗原或抗原决定簇数量为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或更高是优选的。

如此处定义的第二附着位点可能是抗原或抗原决定簇天然存在 20 或非天然存在的。如果抗原或抗原决定簇上没有合适的天然存在的第二附着位点，则必须为该抗原改造非天然第二种附着位点。

如上所述，有 4 个赖氨酸残基暴露于 Q $\beta$  外壳蛋白的 VLP 表面。这些残基一般在与交联剂分子反应时被衍化。如果不是所有的暴露赖氨酸残基都能与抗原偶联，与交联剂反应的赖氨酸残基在衍化步骤后 25  $\epsilon$ -氨基连接交联剂分子。这使得一个或几个正电荷丢失，这可能不利于 VLP 的可溶性和稳定性。通过用精氨酸代替一些赖氨酸残基，如下文所述的 Q $\beta$  外壳蛋白突变体，我们防止了正电荷的过多丢失，因为精氨酸残基不与交联剂反应。而且，用精氨酸置换赖氨酸残基可产生更明确的抗原阵列，因为有更少的位点可以与抗原反应。

因此，在本申请公开的下列 Q $\beta$  外壳蛋白突变体和突变 Q $\beta$  VLP 中，用精氨酸替换了暴露的赖氨酸残基：Q $\beta$ -240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO:23)、Q $\beta$ -250 (Lys2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO:25)和 Q $\beta$ -259 (Lys2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:27)。克隆了这些构建体，表达了蛋白质，纯化了 VLP，并用于与肽和蛋白质抗原偶联。也构建了 Q $\beta$ -251 (SEQ ID NO:26)，在本申请中能够找到如何表达、纯化和偶联 Q $\beta$ -251 外壳蛋白 VLP 的指南。

在另一个实施方案中，我们公开了含有一个额外赖氨酸残基的 Q $\beta$  突变外壳蛋白，它适用于获得更高密度的抗原阵列。经克隆该突变 Q $\beta$  外壳蛋白 Q $\beta$ -243 (Asn10-Lys; SEQ ID NO:24)，表达蛋白质，分离并纯化衣壳或 VLP，表明该额外赖氨酸残基的引入与亚单位自装配为衣壳或 VLP 相容。因此，可以用 Q $\beta$  外壳蛋白突变体的 VLP 分别制备抗原或抗原决定簇阵列和偶联物。抗原与 VLP、特别是与 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 附着的一种特别优选的方法是使 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 表面的赖氨酸残基与添加于抗原中的半胱氨酸残基连接。为了使半胱氨酸残基能够有效地作为第二附着位点，必须有一个巯基能用来偶联。因此，半胱氨酸残基必须是还原状态，即，必须有游离半胱氨酸或含有游离巯基的半胱氨酸残基。如果作为第二附着位点的半胱氨酸残基是氧化形式，例如，如果它形成二硫键，则需要使用如 DTT、TCEP 或  $\beta$ -巯基乙醇还原该二硫键。必须为每种抗原调节还原剂的浓度和还原剂超过抗原的摩尔数。必要时需要检测滴定范围，从低至 10 $\mu$ M 或更低的还原剂浓度，到可达 10-20mM 或更高，并评价抗原与载体的偶联。尽管如 WO 02/056905 所述低浓度还原剂适于偶联反应，较高浓度抑制偶联反应，但是本领域技术人员应当知道，此时必须除去还原剂或降低其浓度，例如通过透析、凝胶过滤或反相 HPLC。透析或平衡缓冲液的 pH 通常低于 7，优选地低于 6。必须检测低 pH 缓冲液与抗原活性或稳定性的相容性。

通过选择交联剂和其它反应条件，能够调节 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 上的表位密度。例如，交联剂 Sulfo-GMBS 和 SMPH 一般能

够获得高表位密度。高浓度反应物正面影响衍生化，可以通过操作反应条件来控制与 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 偶联、特别是与 Q $\beta$  外壳蛋白 VLP 偶联的抗原数量。

在设计非天然的第二附着位点之前，必须选择融合、插入或遗传构建的位置。第二附着位点的位置的选择例如可基于抗原的晶体结构。抗原的这种晶体结构可以提供关于分子 C 端或 N 端的可用性（例如取决于它们是否可接触到溶剂）或关于适于作为第二附着位点的残基（如半胱氨酸残基）暴露于溶剂的信息。暴露的二硫键也可能是第二附着位点的来源（对于 Fab 片段即如此），因为用例如 2-巯基乙胺、TCEP、 $\beta$ -巯基乙醇或 DTT 温和还原，它们通常能转化为单个半胱氨酸残基。选择不影响抗原免疫原性的温和还原条件。如果自身抗原免疫旨在抑制自身抗原与其天然配体的相互作用，通常添加第二附着位点使得能够产生针对与天然配体相互作用之位点的抗体。因此，选择第二附着位点的位置，以避免来自第二附着位点或含有它的任何氨基酸接头的空间位阻。在其它实施方案中，希望针对自身抗原与其天然配体的相互作用位点之外的一种位点的抗体应答。在这些实施方案中，可选择第二附着位点，以防止产生针对自身抗原与其天然配体的相互作用位点的抗体。

选择第二附着位点位置的其它标准包括：抗原的寡聚状态，寡聚位点，辅因子的存在，以及存在的揭示抗原结构和序列中位点（在该位点对该抗原的修饰与自身抗原的功能相容或者适于产生可识别自身抗原的抗体）的实验证据。

在非常优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇包含单一的第二附着位点或单一的反应性附着位点，后者分别能够与核心颗粒和 VLP 或 VLP 亚单位上的第一附着位点结合。这进一步确保至少有一种、但一般是一种以上、优选地超过 10、20、40、80、120 种抗原分别与核心颗粒和 VLP 明确、均一地结合。因此，抗原上含有单一的第二附着位点或单一的反应性附着位点确保了类型单一、均匀的结合，分别产生高度规则、重复的阵列。例如，如果通过赖氨酸-（作为第一

附着位点)和半胱氨酸-(作为第二附着位点)相互作用实现结合,根据本发明的这一优选实施方案,确保每个抗原只有一个半胱氨酸残基能够分别与 VLP 和核心颗粒的第一附着位点结合,而无论该半胱氨酸残基在抗原上是天然存在还是非天然的。

5 在某些实施方案中,在抗原上构建第二附着位点需要根据本发明的公开内容融合含有适于作为第二附着位点的氨基酸的氨基酸接头。因此,在本发明的一个优选实施方案中,氨基酸接头通过至少一个共价键与抗原或抗原决定簇结合。优选地,该氨基酸接头包含或由第二附着位点组成。在一个更优选的实施方案中,氨基酸接头包含一个巯基或半胱氨酸残基。在另一个优选实施方案中,该氨基酸接头是半胱氨酸。氨基酸接头的一些选择标准以及根据本发明的氨基酸接头的优选实施方案在上文中已经提及。

15 在本发明的另一个具体实施方案中,选择附着位点为与 HBcAg 框内融合的赖氨酸或半胱氨酸残基。在一个优选实施方案中,抗原与 HBcAg 的 C 端通过一个三亮氨酸接头融合。

当抗原或抗原决定簇与 VLP 通过一个赖氨酸残基连接时,有利的是置换或删除一个或多个天然存在的赖氨酸残基,以及 HBcAg 变体中存在的其它赖氨酸残基。

20 在许多情况下,当天然存在的赖氨酸残基被消除时,向 HBcAg 内引入另一个赖氨酸作为抗原或抗原决定簇的附着位点。插入赖氨酸残基的方法在本领域公知。也可以在不除去现有赖氨酸残基的情况下添加赖氨酸残基。

已经证明 HBcAg 的 C 端可引导该蛋白质的核定位(Eckhardt 等人, J. Virol. 65:575-582 (1991))。而且也认为该蛋白质的这一区域使 HBcAg 具有结合核酸的能力。

25 如上所述,适用于本发明的 HBcAg 也包括 N 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸的修饰 HBcAg。然而,在组成病毒样颗粒的亚单位序列内含有内部缺失的病毒样颗粒变体也适用于本发明,只要它们保



留病毒样颗粒的规则或颗粒结构。例如，HBcAg序列内的内部缺失是适宜的（Preikschat, P.等人, J. Gen. Virol. 80:1777-1788 (1999)）。

适用于本发明的其它 HBcAg 包括 N 端和 C 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15  
5 或 17 个氨基酸、并从 C 端除去 1、5、10、15、20、25、30、34、35、36、37、38、39、40、41、42 或 48 个氨基酸的 HBcAg。

本发明的疫苗组合物可包含不同 HBcAg 的混合物。因此，这些疫苗组合物可以由氨基酸序列不同的多个 HBcAg 组成。例如，可以制备包含“野生型”HBcAg 和修饰 HBcAg 的疫苗组合物，在修饰  
10 HBcAg 中一个或多个氨基酸残基已经改变（例如缺失、插入或置换）。然而在大多数应用中，只使用一种 HBcAg。

本发明适用于多种各样的抗原。在一个优选实施方案中，抗原是蛋白质、多肽或肽。在另一个实施方案中，抗原是 DNA。抗原也可以是脂类、碳水化合物或有机分子，特别是有机小分子，如烟碱。

15 本发明的抗原可选自：(a)适于诱发对癌细胞的免疫应答的多肽；(b)适于诱发对传染病的免疫应答的多肽；(c)适于诱发对变应原的免疫应答的多肽；(d)适于在家畜或宠物中诱发免疫应答的多肽；(e) (a)-(d)所述任一种多肽的片段（例如结构域）。

20 优选的抗原包括来自病原体（例如病毒、细菌、寄生虫、真菌）和肿瘤的抗原（特别是肿瘤相关抗原或“肿瘤标志物”）。其它优选抗原包括自身抗原。

在实施例所述的具体实施方案中，抗原是来源于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）的肽 p33。p33 肽是研究最多的 CTL 表位之一（Pircher 等人，“双特异性 T 细胞受体转基因小鼠中耐受性的诱导  
25 随抗原而不同”，Nature 342:559 (1989)；Tissot 等人，“体外表征重组 T 细胞受体的功能：基于 pMHC 四聚体的方法”，J Immunol Methods 236:147 (2000)；Bachmann 等人，“用 T 细胞激动剂、部分激动剂和拮抗剂刺激幼稚 T 细胞后 4 种类型的 Ca<sup>2+</sup> 信号”，Eur. J. Immunol. 27:3414 (1997)；Bachmann 等人，“抗病毒细胞毒性 T 细胞应答的功能成熟”，

J. Virol. 71:5764 (1997); Bachmann 等人,“肽诱导的幼稚 T 细胞的 TCR 下调预测激动剂/部分激动剂性质并与 T 细胞激活密切相关”, Eur. J. Immunol. 27:2195 (1997); Bachmann 等人,“LFA-1 和 CD28 在幼稚 T 细胞激活过程中的不同作用: 粘附还是共同刺激”, Immunity 7:549  
5 (1997)。p33 特异的 T 细胞被证实在转基因小鼠中诱发致死性糖尿病 (Ohashi 等人,“在病毒抗原转基因小鼠中病毒感染消除 ‘耐受’并诱导糖尿病”, Cell 65:305 (1991)) 并且能够阻止表达 p33 的肿瘤细胞的生长 (Kündig 等人,“成纤维细胞在淋巴器官中作为有效的抗原呈递细胞”, Science 268:1343 (1995); Speiser 等人,“内源性抗原特异的  
10 CTL 肿瘤治疗不会导致自身免疫病”, J. Exp. Med. 186:645 (1997))。因此,这种特异性表位特别适于研究自身免疫、肿瘤免疫以及病毒病。

在本发明的一个具体实施方案中,抗原或抗原决定簇是可用来预防传染病的那些。这种治疗可用于治疗影响多种宿主(例如人、牛、绵羊、猪、狗、猫、其它哺乳动物种和非哺乳动物种)的广泛的多种  
15 传染病。可治疗的传染病在本领域众所周知,例子包括:病毒病性疾病的传染,如 HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、EB、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、乳头瘤病毒等;或细菌性疾病的传染,如肺炎、结核、梅毒等;或寄生虫病的感染,如疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病、阿米巴病等。因此,为本发明的组合物选择的抗原或抗原决  
20 定簇在医学领域众所周知;抗原或抗原决定簇的例子包括: HIV 抗原 gp140 和 gp160; 流感抗原血凝素、M2 蛋白和神经酰胺酶、乙型肝炎表面抗原或核心抗原和疟疾环孢子蛋白或其片段。

如上所述,抗原包括来自天然来源或合成的传染性微生物,如病毒、细菌和真菌及其片段。人和非人脊椎动物的传染性病毒包括逆转  
25 录病毒、RNA 病毒和 DNA 病毒。逆转录病毒包括简单逆转录病毒和复杂逆转录病毒。简单逆转录病毒包括 B 型逆转录病毒、C 型逆转录病毒和 D 型逆转录病毒亚群。B 型逆转录病毒的一个例子是小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV)。C 型逆转录病毒包括 C 型 A 群的亚群(包括劳斯肉瘤病毒 (RSV)、禽白血病毒 (ALV) 和禽骨髓细胞性白血

病 (AMV)) 和 C 型 B 群 (包括鼠白血病病毒 (MLV)、猫白血病病毒 (FeLV)、鼠肉瘤病毒 (MSV)、长臂猿白血病病毒 (GALV)、脾坏死病毒 (SNV)、网状内皮组织增生病毒 (RV) 和猿肉瘤病毒 (SSV))。D 型逆转录病毒包括 Mason-Pfizer 猴病毒 (MPMV) 和 1 型猿逆转录病毒 (SRV-1)。复杂逆转录病毒包括慢病毒、T 细胞白血病病毒和泡沫病毒的亚群。慢病毒包括 HIV-1, 也包括 HIV-2、SIV、维斯那病毒、猫免疫缺陷病毒 (FIV) 和马传染性白血病病毒 (EIAV)。T 细胞白血病病毒包括 HTLV-1、HTLV-II、猿 T 细胞白血病病毒 (STLV) 和牛白血病病毒 (BLV)。泡沫病毒包括人泡沫病毒 (HFV)、猿泡沫病毒 (SFV) 和牛泡沫病毒 (BFV)。

在脊椎动物中作为抗原的 RNA 病毒的例子包括但不限于: 呼肠孤病毒科的成员, 包括正呼肠孤病毒属 (哺乳动物和禽逆转录病毒的多种血清型), 环状病毒属 (蓝舌病毒、Eugeningee 病毒、克米罗沃病毒、非洲马疫病毒和科罗拉多蜱热病毒), 轮状病毒属 (人轮状病毒、内布拉斯加牛腹泻病毒、鼠轮状病毒、猿轮状病毒、牛或绵羊轮状病毒、禽轮状病毒); 小 RNA 病毒科, 包括肠道病毒属 (脊髓灰质炎病毒, 柯萨奇病毒 A 和 B, 肠道致细胞病变性人肠道孤 (ECHO) 病毒, 甲、丙、丁、戊、庚型肝炎病毒, 猿肠道病毒, 鼠脑脊髓炎 (ME) 病毒, 脊髓灰质炎病毒, 牛肠道病毒, 猪肠道病毒), 心肌病毒属 (脑心肌炎病毒 (EMC), 门戈病毒), 鼻病毒属 (人鼻病毒, 包括至少 113 个亚型; 其它鼻病毒), 鹅口疮病毒属 (口蹄疫 (FMDV)); 杯状病毒科, 包括猪水泡疹病毒、圣米格尔海狮病毒、猫小 RNA 病毒和诺瓦克病毒; 披膜病毒科, 包括甲病毒属 (东方马脑炎病毒, 塞姆利基森林病毒, 辛德毕斯病毒, 屈曲病毒, 阿尼昂尼昂病毒, 罗斯河病毒, 委内瑞拉马脑炎病毒, 西方马脑炎病毒), 黄病毒属 (蚊传黄热病毒, 登革热病毒, 日本脑炎病毒, 圣路易脑炎病毒, 摩莱河谷脑炎病毒, 西尼罗河病毒, 库宁病毒, 中欧蜱传病毒, 远东蜱传病毒, 科萨努尔森林病毒, 跳跃病病毒, 波沃森病毒, 鄂木斯克出血热病毒), 风疹病毒属 (风疹病毒), 瘟病毒属 (粘膜病病毒, 猪霍乱病毒, 边

界病病毒)；布亚病毒科，包括布亚病毒属(布尼亚维拉病毒及相关病毒，加利福尼亚脑炎病毒)，静脉病毒属(白蛉热西西里岛病毒，裂谷热病毒)，内罗病毒属(克里米亚-刚果出血热病毒，内罗毕羊疾病病毒)，乌库病毒属(Uukuniemi病毒及相关病毒)；正粘病毒科，包括流感病毒属(A型流感病毒，多种人亚型)，猪流感病毒，禽及马流感病毒，B型流感(多种人亚型)，C型流感(可能分离的属)；副粘病毒科，包括副粘病毒属(1型副流感病毒，仙台病毒，血细胞吸附病毒，2-5型副流感病毒，新城疫病毒，腮腺炎病毒)，麻疹病毒属(麻疹病毒，亚急性硬化性全脑炎病毒，瘟热病毒，牛瘟病毒)，肺病毒属(呼吸道合胞体病毒(RSV)，牛呼吸道合胞体病毒和小鼠肺炎病毒)；森林病毒，辛德毕斯病毒，屈曲病毒，阿尼昂尼昂病毒，罗斯河病毒，委内瑞拉马脑炎病毒，西方马脑炎病毒)；黄病毒属(蚊传黄热病毒，登革热病毒，日本脑炎病毒，圣路易脑炎病毒，摩莱河谷脑炎病毒，西尼罗河病毒，库宁病毒，中欧蜚传病毒，远东蜚传病毒，科萨努尔森林病毒，跳跃病病毒，波沃森病毒，鄂木斯克出血热病毒)，风疹病毒属(风疹病毒)，瘟病毒属(粘膜病病毒，猪霍乱病毒，边界病病毒)；布亚病毒科，包括布亚病毒属(布尼亚维拉病毒及相关病毒，加利福尼亚脑炎病毒)，静脉病毒属(白蛉热西西里岛病毒，裂谷热病毒)，内罗病毒属(克里米亚-刚果出血热病毒，内罗毕羊疾病病毒)，乌库病毒属(Uukuniemi病毒及相关病毒)；正粘病毒科，包括流感病毒属(A型流感病毒，多种人亚型)，猪流感病毒，禽及马流感病毒，B型流感(多种人亚型)，C型流感(可能分离的属)；副粘病毒科，包括副粘病毒属(1型副流感病毒，仙台病毒，血细胞吸附病毒，2-5型副流感病毒，新城疫病毒，腮腺炎病毒)，麻疹病毒属(麻疹病毒，亚急性硬化性全脑炎病毒，瘟热病毒，牛瘟病毒)，肺病毒属(呼吸道合胞体病毒(RSV)，牛呼吸道合胞体病毒和小鼠肺炎病毒)；弹状病毒科，包括水泡性病病毒属(VSV)，钱迪普拉病毒，佛朗德-哈特公园病毒)，狂犬病病毒属(狂犬病病毒)，鱼弹状病毒和丝状病毒(马堡病毒和埃博拉病

毒)；砂粒样病毒科，包括淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCM)，塔卡里伯病毒复合物，拉萨病毒；冠状病毒科，包括传染性支气管炎病毒(IBV)，小鼠肝炎病毒，人肠道冠状病毒，和猫传染性腹膜炎病毒(猫冠状病毒)。

- 5 在脊椎动物中作为抗原的 DNA 病毒的例子包括但不限于：痘病毒科，包括正痘病毒属(重型天花病毒、轻型天花病毒、猴痘病毒、牛痘病毒、水牛痘病毒、兔痘病毒、小鼠脱脚病病毒)，野兔痘病毒属(粘液瘤病毒，纤维瘤病毒)，禽痘病毒属(鸡痘病毒，其它禽痘病毒)，羊痘病毒属(绵羊痘病毒，山羊痘病毒)，猪痘病毒属(猪痘病毒)，副痘病毒属(传染性脓疮性皮炎病毒，假牛痘病毒，牛丘疹性口炎病毒)；虹彩病毒科(非洲猪瘟病毒，蛙病毒2和3，鱼淋巴囊肿病毒)；疱疹病毒科，包括 $\alpha$ -疱疹病毒(1型和2型单纯疱疹病毒，水痘-带状疱疹病毒，马流产病毒，马疱疹病毒2和3，假狂犬病病毒，传染性牛角膜结膜炎病毒，传染性牛鼻气管炎病毒，猫鼻气管炎病毒，传染性喉气管炎病毒)和 $\beta$ -疱疹病毒(人巨细胞病毒和猪、猴、啮齿动物巨细胞病毒)； $\gamma$ -疱疹病毒(EB病毒(EBV)，马雷克病病毒，松鼠猴疱疹病毒(Herpes saimiri)，蛛猴疱疹病毒(Herpesvirus ateles)，兔疱疹病毒，豚鼠疱疹病毒，勒克肿瘤病毒)；腺病毒科，包括乳腺病毒属(人A、B、C、D、E亚群和未分组的；猿腺病毒(至少23种血清型)，传染性犬肝炎病毒，牛、猪、绵羊、蛙和其它许
- 10 多种的腺病毒，禽腺病毒属(禽腺病毒)；不可培养的腺病毒；乳头多瘤空泡病毒科，包括乳头瘤病毒属(人乳头状瘤病毒，牛乳头瘤病毒，兔乳头瘤病毒，其它物种的多种致病性乳头瘤病毒)，多瘤病毒属(多瘤病毒，猿空泡剂(SV-40)，兔空泡剂(RKV)，K病毒，
- 15 BK病毒，JC病毒，以及其它灵长类动物多瘤病毒，如亲淋巴乳头瘤病毒)；细小病毒科，包括腺伴随病毒属，细小病毒属(猫全血细胞减少症病毒，牛细小病毒，犬细小病毒，阿留申水貂病病毒等)。最后，DNA病毒可包括不属于上述科的病毒，如库鲁病病毒、克-雅氏症病毒和慢性传染性神经性病原体(CHINA病毒)。
- 20
- 25

以上所列均是举例说明性的，并非限制性的。

在本发明的一个具体实施方案中，抗原包含一种或多种细胞毒性 T 细胞表位、Th 细胞表位或这两种表位的组合。

除了增强人体抗原特异性免疫应答外，优选实施方案的方法尤其  
5 适于治疗其它哺乳动物或其它动物，例如鸟类，如母鸡、小鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑和雉。鸟类是多种感染的最初目标。

鸡中常见感染的一个例子是鸡传染性贫血病毒 (CIAV)。CIAV 最早是在 1979 年在马雷克病免疫接种研究过程中分离的 (Yuasa 等人, Avian Dis. 23:366-385 (1979))。自那时起，在所有主要家禽生产国的  
10 商品家禽中都检测到了 CIAV (van Bulow 等人, pp. 690-699, 《家禽疾病》，第九版, Iowa State University Press 1991)。

象其它脊椎动物一样，鸟类的接种可以在任何年龄段进行。对于活微生物，通常在 12 周龄之前进行接种，对于灭活微生物或其它类型的疫苗，通常在 14-18 周接种。对于卵内接种，可以在胚胎发育的  
15 最后四分之一时段内进行接种。疫苗可以通过皮下、喷雾、口服、眼内、气管内、鼻内、卵内或通过此处所述的其它方法施用。

牛和家畜也易受感染。影响这些动物的疾病能够导致严重的经济损失，特别是牛的疾病。本发明的方法可用于保护家畜如牛、马、猪、绵羊和山羊免遭感染。

20 牛可被牛病毒感染。牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 是一种小的包膜正链 RNA 病毒，与猪霍乱病毒 (HOCV) 和绵羊边界病病毒 (BDV) 一起归类为瘟病毒属。尽管瘟病毒以前被归类为披膜病毒科，但是一些研究建议它们应当与黄病毒和丙型肝炎病毒 (HCV) 群一起重新归类为黄病毒科。

25 马疱疹病毒 (EHV) 包括一组抗原性不同的生物剂，它们在马中引起从亚临床到致死性疾病的多种感染。它们包括马疱疹病毒-1 (EHV-1)，这是普遍存在于马中的一种病原体。EHV-1 与流产、呼吸道疾病、中枢神经系统疾病的流行有关。其它 EHV 包括 EHV-2 或马巨细胞病毒, EHV-3 或马性交疹病毒, 和 EHV-4(以前归类为 EHV-1

亚型 2)。

绵羊和山羊可以被多种危险微生物感染，包括维斯那-梅迪病毒。

灵长类动物如猴、猿和猕猴可能被猿免疫缺陷病毒感染。已经报告灭活的细胞病毒和不含细胞的全猿免疫缺陷疫苗在猕猴中产生保护( Stott 等人, Lancet 36:1538-1541 (1990); Desrosiers 等人, PNAS USA 86:6353-6357 (1989); Murphey-Corb 等人, Science 246:1293-1297 (1989); Carlson 等人, AIDS Res. Human Retroviruses 6:1239-1246 (1990))。已经报告重组 HIV gp120 疫苗在黑猩猩中产生保护( Berman 等人, Nature 345:622-625 (1990))。

10 猫科动物，无论是驯养的还是野生的，都易感染多种微生物。例如，猫传染性腹膜炎是在驯养和野生猫科(如狮、豹、猎豹和美洲虎)中都存在的疾病。当希望预防猫科动物感染这种和其它类型的病原微生物时，可以用本发明的方法接种猫科动物，防止它们感染。

家猫可能感染几种逆转录病毒，包括但不限于：猫白血病毒(FeLV)、猫肉瘤病毒(FeSV)、内源性 C 型致癌 RNA 病毒(RD-114)和猫合胞体形成病毒(FeSFV)。Pedersen 等人, Science 235:790-793 (1987)首先报告了猫亲 T 淋巴慢病毒(也称为猫免疫缺陷病毒)的发现。猫传染性腹膜炎(FIP)是在驯养和野生猫科动物中不可预期地发生的一种散发病。FIP 主要是家猫的一种疾病，但是也曾经在狮、美洲狮、豹、猎豹和美洲虎中诊断出。罹患 FIP 的较小型野生猫科动物包括猞猁和狞獾、sand cat 和 pallas cat。

25 有鳍鱼类、有壳水生动物或其它水生生物的病毒和细菌疾病给水产养殖业带来严重的问题。由于孵化场或封闭海水养殖区中动物密度高，传染病有可能消灭如有鳍鱼类、有壳水生动物或其它水生生物设施中的大部分动物。一旦疾病发展，对疾病的预防是比干预更希望的应对鱼类威胁的补救措施。鱼的接种是唯一可导致长期免疫保护的预防方法。例如，美国专利号 5,780,448 描述了基于核酸的鱼类接种。

鱼类免疫系统具有许多类似于哺乳动物免疫系统的特征，如存在 B 细胞、T 细胞、淋巴因子、补体和免疫球蛋白。鱼类具有淋巴细胞

亚类，其作用在许多方面似乎类似于哺乳动物的 B 细胞和 T 细胞。可以通过口服或通过浸没或注射施用疫苗。

水生物种包括但不限于有鳍鱼类、有壳水生动物和其它水生动物。有鳍鱼类包括所有有脊椎的鱼类，它们可能是硬骨鱼或软骨鱼，如鲑鱼、鲤鱼、鳘鱼、yellowtail、鲷和黑鲈。鲑鱼是有鳍鱼类的一个科，包括鳟鱼（包括虹鳟鱼）、鲑鱼和红点鲑。有壳水生动物的例子包括但不限于：蛤、龙虾、小河虾、螃蟹和牡蛎。其它培养的水生动物包括但不限于鳗鱼、鱿鱼和章鱼。

病毒性水产养殖病原体的多肽包括但不限于：病毒性出血性败血症病毒（VHSV）的糖蛋白或核蛋白；传染性造血坏死病毒（IHNV）的 G 或 N 蛋白；传染性胰腺坏死病毒（IPNV）的 VP1、VP2、VP3 或 N 结构蛋白；鲤鱼春季病毒血症病毒（SVC）的 G 蛋白；水道鳘鱼病毒（CCV）的膜结合蛋白、tegumin 或衣壳蛋白或糖蛋白。

细菌病原体的多肽包括但不限于：导致疝病的杀鲑气单胞菌（*Aeromonas salmonicida*）的铁调节外膜蛋白（IROMP）、外膜蛋白（OMP）、A-蛋白，导致细菌性肾病（BKD）的沙氏肾杆菌（*Renibacterium salmoninarium*）的 p57 蛋白，耶尔森氏菌的主要表面结合抗原（msa）、表面表达的细胞毒素（mpr）、表面表达的溶血素（ish）和鞭毛抗原；巴斯德氏菌的胞外蛋白（ECP）、铁调节外膜蛋白（IROMP）和结构蛋白；鳗弧菌（*Vibrosis anguillarum*）和奥氏弧菌（*V. ordalii*）的 OMP 和鞭毛蛋白；鳘鱼爱德华氏菌（*Edwardsiella ictaluri*）和迟钝爱德华氏菌（*E. tarda*）的鞭毛蛋白、OMP 蛋白、aroA 和 purA；小瓜虫属的表面抗原；柱状噬纤维菌（*Cytophaga columnari*）的结构性和调节性蛋白；立克次体的结构性和调节性蛋白。

寄生虫病原体的多肽包括但不限于小瓜虫属的表面抗原。

本发明的另一方面，提供了这样的疫苗组合物，其适于在由“自身”基因产物（例如肿瘤坏死因子）引起或加重之疾病的预防和/或缓解方法中使用。因此，本发明的疫苗组合物包括导致产生可预防和/或缓解由“自身”基因产物引起或加重疾病之抗体的组合物。这类疾病



的例子包括移植物抗宿主病、IgE-介导的变态反应、过敏反应、成人呼吸窘迫综合征、节段性肠炎、过敏性哮喘、急性淋巴细胞白血病（ALL）、非何杰金氏淋巴瘤（NHL）、Graves病、系统性红斑狼疮（SLE）、炎性自身免疫病、重症肌无力、免疫增生性疾病淋巴结病（IPL）、血管免疫增生性淋巴结病（AIL）、免疫母细胞性淋巴结病（IBL）、类风湿关节炎、糖尿病、朊病毒病、多发性硬化症、阿尔茨海默病和骨质疏松。

在相关具体实施方案中，本发明的组合物是一种免疫治疗剂，它能用来治疗和/或预防变态反应、癌症或药物成瘾。

10 治疗这类疾病的医学领域的技术人员应当知道如何选择用于制备组合物及在治疗变态反应的方法中使用的抗原或抗原决定簇。这类抗原或抗原决定簇的代表性例子包括：蜂毒磷脂酶 A<sub>2</sub>，Bet v I（桦树花粉变应原），5 Dol m V（白面黄蜂毒变应原），Der p I（屋尘螨变应原），以及能用来引发免疫应答的各自的片段。

15 治疗这类疾病的医学领域的技术人员应当知道如何为治疗癌症的组合物和方法选择抗原或抗原决定簇（参见 Renkvist 等人，Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15 (2001)，在此引用作为参考），本发明范围内包括这些抗原或抗原决定簇。这类抗原或抗原决定簇的代表性例子包括：Her2（乳腺癌）；GD2（神经母细胞瘤）；EGF-R（恶性胶质母细胞瘤）；CEA（甲状腺髓样癌）；CD52（白血病）；人黑素瘤蛋白 gp100；人黑素瘤蛋白 gp100 表位，如氨基酸 154-162（序列：KTWGQYWQV）、209-217（ITDQVPFSV）、280-288（YLEPGPVTA）、457-466（LLDGTATLRL）和 476-485（VLYRYGSFSV）；人黑素瘤蛋白 melan-A/MART-1；人黑素瘤蛋白  
20 melan-A/MART-1 表位，如氨基酸 27-35（AAGIGILTV）和 32-40（ILTVILGVL）；酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白（例如 TRP-1 和 TRP-2）；酪氨酸酶表位，如氨基酸 1-9（MLLAVLYCL）和 369-377（YMDGTMSQV）；NA17-A nt 蛋白；NA17-A nt 蛋白表位，如氨基酸 38-64（VLPDVFIRC）；MAGE-3 蛋白；MAGE-3 蛋白表位，如氨

氨基酸 271-279 (FLWGPRALV); 其它人肿瘤抗原, 例如 CEA 表位, 如氨基酸 571-579 (YLSGANLNL); p53 蛋白; p53 蛋白表位, 如氨基酸 65-73 (RMPEAAPPV)、149-157 (STPPPGTRV) 和 264-272 (LLGRNSFEV); Her2/neu 表位, 如氨基酸 369-377 (KIFGSLAFL) 和 654-662(IISAVVGIL); NY-ESO-1 肽 157-165 和 157-167, 159-167; HPV16 E7 蛋白; HPV16 E7 蛋白表位, 如氨基酸 86-93 (TLGIVCPI); 以及能够用来引发免疫应答的各自的片段。

治疗这类疾病的医学领域的技术人员应当知道如何为治疗药物成瘾、特别是精神药物成瘾的组合物和方法选择抗原或抗原决定簇。这类抗原或抗原决定簇的代表性例子包括, 例如: 阿片样物质和吗啡衍生物, 如可待因、芬太尼、海洛因、吗啡和阿片; 刺激剂, 如苯丙胺 (amphetamine)、可卡因、MDMA (亚甲二氧基去氧麻黄碱)、去氧麻黄碱、哌甲酯和烟碱; 致幻剂, 如 LSD、麦斯卡林和赛洛西宾; 以及大麻酯(cannabinoid), 如大麻(hashish)和大麻(marijuana)。

治疗这类疾病的医学领域的技术人员应当知道如何为治疗与自身抗原相关的其它疾病的组合物和方法选择抗原或抗原决定簇。这类抗原或抗原决定簇的代表性例子包括, 例如: 淋巴毒素 (例如淋巴毒素 $\alpha$  (LT $\alpha$ )、淋巴毒素 $\beta$  (LT $\beta$ )), 淋巴毒素受体, 核因子 $\kappa$ B 配体的受体激活剂 (RANKL), 血管内皮生长因子 (VEGF) 和血管内皮生长因子受体 (VEGF-R), 白介素 17 和淀粉样 $\beta$ 肽 ( $A\beta_{1-42}$ ), TNF $\alpha$ , MIF, MCP-1, SDF-1, Rank-L, M-CSF, 血管紧张肽 II, Endoglin, Eotaxin, Ghrelin, BLC, CCL21, IL-13, IL-17, IL-5, IL-8, IL-15, 缓激肽, 抵抗素, LHRH, GHRH, GIH, CRH, TRH 和胃泌素, 以及能用来引发免疫应答的各自的片段。

在本发明的一个具体实施方案中, 抗原或抗原决定簇选自: (a) 重组 HIV 多肽; (b) 重组流感病毒多肽 (例如流感病毒 M2 多肽或其片段); (c) 重组丙型肝炎病毒多肽; (d) 重组乙型肝炎病毒多肽; (e) 重组弓形体多肽; (f) 重组恶性疟原虫多肽; (g) 重组间日疟原虫多肽; (h) 重组卵形疟原虫多肽; (i) 重组三日疟原虫多肽; (j) 重组乳腺癌细胞

多肽；(k)重组肾癌细胞多肽；(l)重组前列腺癌细胞多肽；(m)重组皮肤癌细胞多肽；(n)重组脑癌细胞多肽；(o)重组白血病细胞多肽；(p)重组抑制蛋白（profiling）；(q)重组蜂螫变应原多肽；(r)重组坚果变应原多肽；(s)重组花粉多肽；(t)重组屋尘多肽；(u)重组猫或猫发变应原多肽；(v)重组食物变应原蛋白；(w)重组哮喘蛋白；(x)重组衣原体蛋白；(y) (a)-(x)所述任一种蛋白质的片段。

在本发明的另一个实施方案中，与病毒样颗粒偶联、融合或以其它方式附着的抗原是一种 T 细胞表位，它是细胞毒性或 Th 细胞表位。在一个更优选的实施方案中，抗原是至少两种、优选地不同表位的组合，其中所述至少两种表位直接连接或通过连接序列连接。这些表位  
10 优选地选自细胞毒性和 Th 细胞表位。

同样应当理解，本发明范围内也包括镶嵌病毒样颗粒，例如由分别与不同抗原和表位附着的亚单位组成的病毒样颗粒。本发明的这种组合物可以如下获得：例如，用两种相容的质粒转化大肠杆菌，这两种质粒分别编码与不同抗原和表位融合的组成病毒样颗粒的亚单位。  
15 在此情况中，镶嵌病毒样颗粒在细胞中直接装配或者在细胞裂解后装配。而且，本发明的这种组合物也可以按如下获得：不同抗原和表位的混合物与分离的病毒样颗粒附着。

本发明的抗原，特别是所述表位，可以被合成或重组表达，并且  
20 与病毒样颗粒偶联，或利用重组 DNA 技术与病毒样颗粒融合。抗原与病毒样颗粒附着的典型方法公开在 WO 00/32227、WO 01/85208 和 WO 02/056905 中，其公开内容在此完整地引用作为参考。

本发明也提供一种生产用来增强动物免疫应答的组合物的方法，该组合物包含 VLP 和与 VLP 结合的免疫刺激物、优选含非甲基化 CpG 的寡核苷酸，该方法包括 VLP 分别与免疫刺激物和寡核苷酸孵育，  
25 添加 RNase，并纯化该组合物。在一个同样优选的实施方案中，该方法包括 VLP 与 RNase 孵育，分别添加免疫刺激物和寡核苷酸，并纯化该组合物。在一个实施方案中，VLP 是在一种细菌表达系统中生产的。在另一个实施方案中，RNase 是 RNase A。

本发明还提供一种生产用来增强动物免疫应答的组合物的方法，该组合物包含与免疫刺激物结合、优选地与含非甲基化 CpG 的寡核苷酸结合的 VLP，该方法包括解装配 VLP，分别添加免疫刺激物和寡核苷酸，并重装配 VLP。该方法还可能包括除去解装配的 VLP 的核  
5 酸，和/或在重装配后纯化该组合物。

本发明也提供能用来预防和/或缓解疾病的疫苗组合物。本发明的疫苗组合物包含或由下列成分组成：免疫有效量的本发明的免疫增强组合物，以及药学可接受的稀释剂、载体或赋形剂。该疫苗任选地也可包含一种佐剂。

10 本发明还提供用来预防和/或缓解动物疾病的接种方法。在一个实施方案中，本发明提供用来预防多种动物物种（特别是哺乳动物，如人、猴、牛、狗、猫、马、猪等）的传染病的疫苗。该疫苗可以设计用来治疗病毒引起的感染，如 HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、EB、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘等；或细菌引起的感染，如肺  
15 炎、结核、梅毒等；或寄生虫引起的感染，如疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病、阿米巴病等。

在另一个实施方案中，本发明提供用来预防多种物种（特别是哺乳动物，如人、猴、牛、狗、猫、马、猪等）的癌症的疫苗。该疫苗可以设计用来治疗所有类型的癌症，包括但不限于淋巴瘤、癌、肉瘤  
20 和黑素瘤。

本领域技术人员会理解，当对动物施用本发明的组合物时，该组合物可以含有盐、缓冲剂、佐剂或希望用来提高组合物效力的其它物质。在大量资料中提出了适于制备药物组合物的材料的例子，包括  
25 Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990))。

根据不同的宿主物种，可以用不同佐剂增强免疫应答，包括但不限于：弗氏（完全及不完全）佐剂，无机凝胶如氢氧化铝，表面活性剂如溶血卵磷脂，多聚醇（pluronic polyols）、聚阴离子、肽、油状乳剂、匙孔戚血蓝蛋白、二硝基酚，以及可能用于人的佐剂，如 BCG

(卡介苗)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)。这些佐剂是本领域中众所周知的。可与本发明的组合物一起施用的其它佐剂包括但不限于:单磷酸脂免疫调节剂、AdjuVax 100a、QS-21、QS-18、CRL1005、铝盐、MF-59和病毒体佐剂技术。佐剂也可包括这些物质的混合物。

5 如果接受个体能够耐受本发明的组合物的施用,则称该组合物是“药理学可接受的”。而且,本发明的组合物以“治疗有效量”施用(即产生希望的生理学效果的量)。

本发明的组合物可以通过本领域所知的多种方法施用。选择的具体方式当然取决于所选择的具体组合物、所治疗疾病的严重程度和治  
10 疗有效所需的剂量。一般来说,本发明的方法可以用医学可接受的任何给药方式实施,即,产生有效水平的活性化合物而不会引起临床上不可接受的副作用的任何方式。这些给药方式包括口服、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(通过粉末、软膏、液滴或皮肤  
15 贴片)、面颊或口或鼻喷雾。术语“肠胃外”在此使用时是指包括静脉内、肌肉内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射和输液在内的给药方式。本发明的组合物也可以直接注射到淋巴结中。

用于给药的组合物成分包括无菌水(例如生理盐水)或非水溶液和悬液。非水溶剂的例子包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、  
20 和注射用有机酯如油酸乙酯。可以利用载体或封闭性包衣提高皮肤通透性并提高抗原吸收。

联合给药可以同时(例如作为混合物,或分开但同时或共同给药)或相继施用。这包括组合药剂作为治疗混合物一起施用各种形式,以及各种组合药剂分开但同时施用的方法,例如通过不同的静脉输入同一个体中。“联合”给药还包括先给予这些化合物或药剂之一,随后再  
25 给予第二种。

剂量水平取决于给药方式、患者状况和载体/佐剂制剂的质量。典型用量为每名患者约0.1  $\mu\text{g}$ -约20 mg。优选的量是每名患者至少约1  $\mu\text{g}$ -100  $\mu\text{g}$ 。优选多次给药以产生免疫,给药方案是本领域中适于所述对象的标准方案。

该组合物可以方便地制成单位剂量形式，可以按制药领域众所周知的任何方法制备。这些方法包括将本发明的组合物与构成一种或多种辅助成分的载体相结合的步骤。这些组合物通常按如下制备：使本发明的组合物均匀、密切地与一种液体载体、细碎的固体载体或这两种载体混合，然后在必要时使产品成形。

适于口服的组合物可以是分散的单位形式，如胶囊、片剂或锭剂，每个单位含有预定量的本发明的组合物。其它形式的组合物包括在水溶液或非水液体中的悬液，如糖浆、酏剂或乳剂。

其它给药系统包括定时释放、延时释放或持续释放给药系统。这些系统可以避免重复施用上述本发明的组合物，大大方便了患者和医生。有多种类型的释放给药系统可以应用，这些是本领域技术人员公知的。

本发明的其它实施方案包括生产本发明的组合物的方法，和利用所述组合物治疗癌症和变态反应的方法。

通过下列实施例和所附权利要求书，本发明的其它方面和实施方案将是显而易见的。

下列实施例只是说明性的，并非限制如所附权利要求书所限定的本发明的范围。本领域技术人员会理解，在不背离本发明的精神和范围的情况下，可以对本发明的方法进行多种修改和变化。因此，本发明覆盖对本发明的这种修改和变化，只要它们属于所附权利要求书的范围及其等同物。

本文提到的所有专利和公开文献均明确地完整引用作为参考。

### 具体实施方式

#### 25 实施例 1

##### p33-HBcAg VLP 的产生

在图 1B 中给出了含有 LCMV 肽 p33 的 HBcAg 的 DNA 序列。p33-HBcAg VLP (p33 - VLP) 如下产生：含有乙型肝炎病毒完整病毒基因组的乙型肝炎克隆 pEco63 购自 ATCC。将编码 HBcAg 的基因

导入表达载体 pkk223.3 (Pharmacia) 的 EcoRI/HindIII 限制性酶切位点内, 置于强 tac 启动子的控制下。通过标准 PCR 方法, 将来源于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 的 p33 肽 (KAVYNFATM) 与 HBcAg 的 C 端 (1-185) 通过一个三亮氨酸接头融合。为了良好表达而选择的大肠杆菌 K802 克隆用质粒转染, 细胞生长并重新悬浮于 5 ml 裂解缓冲液 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.25% Tween-20, pH 7.0) 中。添加 200 μl 溶菌酶溶液 (20 mg/ml)。超声处理后, 添加 4 μl Benzonase 和 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 悬液在室温下孵育 30 分钟, 在 4°C 下以 15000 rpm 离心 15 分钟, 保留上清液。

10 然后, 向上清液中添加 20% (w/v) (0.2 g/ml 裂解液) 硫酸铵。在冰上孵育 30 分钟后, 在 4°C 以 20000 rpm 离心 15 分钟, 弃去上清液, 沉淀重悬浮于 2-3 ml PBS 中。20 ml PBS 溶液加样到 Sephacryl S-400 凝胶过滤柱 (Amersham Pharmacia Biotechnology AG) 上, 将级分加样到 SDS-PAGE 凝胶上, 合并含有纯化 p33-VLP 的级分。将合并的级分加样到羟基磷灰石柱上。收集流出液 (含有纯化的 p33-VLP 衣壳) (图 2B)。电子显微镜检查按照标准程序进行。图 2A 显示一个代表性实例。

## 实施例 2

20 含 CpG 的寡核苷酸可被包装于 HBcAg VLP 内

对重组 p33-VLP 进行非变性琼脂糖 (1%) 凝胶电泳, 并用溴化乙锭或考马斯蓝染色, 以检测 RNA/DNA 或蛋白质 (图 3)。细菌产生的 VLP 含有高水平的单链 RNA, X-射线结晶学显示, 该单链 RNA 可能与靠近 HBcAg 蛋白 C 端的精氨酸重复片段结合, 在结构上位于 VLP 内部。通过 VLP 与 RNase A 孵育, 污染的 RNA 能被轻易地消化除去。高活性 RNase A 的分子量约为 14 kDa, 可能小到足以进入 VLP, 从而除去不希望的核糖核酸。

25 重组 p33-VLP 在 RNase A 消化之前添加 CpG-寡核苷酸 (图 1A)。如图 4 所示, CpG-寡核苷酸的存在保持了衣壳结构, 与未处理的

p33-VLP 相比类似的迁移证明了这一点。通过透析从未结合的寡核苷酸中纯化含 CpG-寡核苷酸的 VLP (用 PBS 稀释 4500 倍, 24 小时, 使用 300 kDa MWCO 透析膜) (图 5)。

### 5 实施例 3

通过用 RNase 除去 RNA, 随后向 VLP 内包装寡核苷酸, CpG-寡核苷酸可被包装于 VLP 内

p33-VLP (含有细菌单链 RNA) 首先与 RNase A 孵育, 以除去 RNA, 第二步, 向样品中添加免疫刺激性 CpG-寡核苷酸 (具有正常的磷酸二酯键, 也有磷酸骨架的硫代磷酸酯修饰) (图 6)。该实验清楚地表明, 在 RNA 降解反应过程中不是必须同时需要 CpG-寡核苷酸, 而是能够在稍后添加。

### 实施例 4

15 含有 CpG-寡核苷酸的 VLP (具有磷酸骨架的硫代磷酸酯修饰或正常的磷酸二酯键) 诱导增强的抗病毒保护

小鼠皮下接种 100  $\mu\text{g}$  含 CpG-寡核苷酸的 p33-VLP。在免疫前, 通过透析从未结合的 CpG-寡核苷酸中充分纯化 p33-VLP 制品 (见实施例 2 和图 5)。小鼠皮下接种单独的 100  $\mu\text{g}$  p33-VLP、与 20 nmol CpG-寡核苷酸混合的 100  $\mu\text{g}$  p33-VLP、单独的 20 nmol CpG-寡核苷酸, 或不予处理, 作为对照。21 天后, 用 LCMV (200 pfu, 静脉内) 攻击小鼠, 5 天后, 如 Bachmann, M.F. 在 “淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒特异性细胞毒性 T 细胞应答的评价”, 《免疫学方法手册》, Lefkowitz, I. 编著, Academic Press Ltd., New York, NY (1997) p.1921 所述检测脾脏中的病毒滴度。结果在图 7、8、9 中显示。

### 实施例 5

BKV 多瘤衣壳的产生

BK 病毒 (BKV) 是一种无包膜双链 RNA 病毒, 属于乳多空病



毒科的多瘤病毒亚家族。VP1 是主要的衣壳蛋白。VP1 含 362 个氨基酸 (图 10), 大小为 42 kDa。当在大肠杆菌、昆虫细胞或酵母中生产时, VP1 自发形成衣壳结构 (Salunke D.M.等人, Cell 46(6):895-904 (1986); Sasnauskas K. 等人, Biol. Chem. 380(3):381-6 (1999);  
5 Sasnauskas K.等人, 第三届国际“作为疫苗的病毒样颗粒”会议, 柏林, 2001 年 9 月 26-29 日; Touze, A.等人, J Gen Virol. 82(Pt 12):3005-9 (2001))。该衣壳被组织为 72 VP1 五聚体, 形成二十面体结构。衣壳的直径约为 45 nm。

#### 10 实施例 6

荧光素标记的含 CpG 的寡核苷酸可被包装于 BKV VLP 内

在酵母中生产的 VLP 含有少量 RNA, 该 RNA 可被容易地消化, 因此通过 VLP 与 RNase A 孵育除去。高活性 RNase A 酶的分子量约为 14 kDa, 它足够消, 可以进入 VLP, 从而除去不需要的核糖核酸。  
15 重组产生的 BKV VLP 在 PBS 缓冲液 pH 7.2 中浓缩为 1 mg/ml, 在存在或不存在 RNase A (200 µg/ml, Roche Diagnostics Ltd, Switzerland) 的条件下 37°C 孵育 3 小时。在 RNase A 消化后, 向 BKV VLP 中添加 75 nmol/ml 荧光素标记的硫代磷酸酯 CpG-FAM 寡核苷酸, 并在 37°C 下孵育 3 小时。随后 BKV VLP 在 37°C 下被 DNaseI 消化 3 小时(40 µ/ml  
20 AMPD1, Sigma, Divison of Fluka AG, Switzerland), 或者不经 DNaseI 消化即加样。样品中添加 6 倍浓缩的 DNA 加样缓冲液(10 mM Tris pH 7.5, 10% v/v 甘油, 0.4%橙黄 G), 在 0.8%非变性 tris-乙酸 pH 7.5 琼脂糖凝胶中 65 伏电压下电泳 1 小时。

图 12 显示对照孵育或 RNase A 消化, 并随后与荧光 CpG-FAM  
25 寡核苷酸 (图 1A 的寡核苷酸, 5'-荧光素标记) 孵育后, 非变性 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中的 BKV VLP, 用溴化乙锭染色后或不用溴化乙锭染色。在溴化乙锭存在下可以检测到核酸, 而在不含溴化乙锭时, 紫外线激发使 CpG-FAM 中的荧光素标记产生荧光。

RNase A 消化使 VLP 的迁移改变, 这在考马斯蓝染色的琼脂糖凝

胶上可见，这可能是由于缺乏 RNA 的负电荷所致（图 13 和 14）。添加 CpG-寡核苷酸恢复了 BKV VLP 的迁移，并且产生与未处理的 VLP 中存在的 RNA 带同样迁移的荧光带。这清楚地表明，CpG-FAM 寡核苷酸已经被包装于 VLP 内。

5

#### 实施例 7

大的双链寡核苷酸可被包装于 BKV VLP 内

为了导入双链(ds)核苷酸序列，向 RNase A 处理过的重组 BKV VLP（实施例 6）中添加 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (ds)DNA 片段（246 bp 长，图 11），并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 3 小时。样品中添加 6 倍浓缩的 DNA 加样缓冲液（10 mM Tris pH 7.5, 10% v/v 甘油, 0.4% 橙黄 G），在 0.8% 非变性 tris-乙酸 pH 8.0 琼脂糖凝胶中 65 伏电压下电泳 1 小时。

图 13 显示对照孵育或 RNase A 消化并随后与(ds)DNA 孵育后，非变性 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中的 BKV VLP（15  $\mu\text{g}$ ），用溴化乙锭或考马斯蓝染色，以检测 RNA/DNA 或蛋白质的存在与否。在溴化乙锭存在下，包装的 DNA 分子可见，是与考马斯蓝显色的 VLP 带同样迁移的一条带。

添加(ds)DNA 恢复了 BKV VLP 的迁移，并且产生与考马斯蓝染色的 VLP 同样迁移的 DNA 带。这清楚地表明，(ds)DNA 已经被包装于 BKV VLP 内。

20

#### 实施例 8

含 CpG 的寡核苷酸能够被包装于 BKV VLP 内

为了导入免疫刺激性 CpG-寡核苷酸，向 RNase A 处理过的重组 BKV VLP（实施例 6）中添加 150 nmol/ml 具有磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架的 CpG-寡核苷酸，并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 3 小时。使用 300 kDa MWCO 透析膜（Spectrum Medical industries Inc., Houston, USA），将用于免疫小鼠的 VLP 制剂用 PBS pH7.2 充分透析（10000 倍稀释）24 小时，以除去 RNase A 和过量的 CpG-寡核苷酸。样品中添加 6 倍浓

25

缩的 DNA 加样缓冲液 (10 mM Tris pH 7.5, 10% v/v 甘油, 0.4% 橙黄 G), 在 0.8% 非变性 tris-乙酸 pH 7.5 琼脂糖凝胶中 65 伏电压下电泳 1 小时。

图 14 显示对照孵育或 RNase A 消化并随后与 CpG-寡核苷酸 (具有磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架) 孵育后, 非变性 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中的 BKV VLP (15  $\mu$ g), 用溴化乙锭 (A) 或考马斯蓝 (B) 染色, 以检测 RNA/DNA 或蛋白质的存在与否, 以及透析后未结合的 CpG-寡核苷酸的还原。图中可见未结合的 CpG-寡核苷酸, 为一条低分子量溴化乙锭染色带。

添加 CpG-寡核苷酸恢复了 BKV VLP 的迁移, 并且产生与考马斯蓝染色的 VLP 同样迁移的 DNA 带。这清楚地表明, CpG-寡核苷酸已经被包装于 VLP 内。

#### 实施例 9

含 CpG-寡核苷酸 (磷酸骨架上有硫代磷酸酯修饰) 的 VLP 诱发增强的 Th1 定向免疫应答

雌性 BALB/C 小鼠 (每组 3 只小鼠) 皮下注射 10  $\mu$ g 含硫代磷酸酯 CpG-寡核苷酸的 BKV VLP (图 1A)。作为对照, 小鼠皮下注射溶于 200  $\mu$ l PBS pH7.2 中的 10  $\mu$ g 单独的 RNase 处理的 BKV VLP 或与 0.3 nmol 或 20 nmol 硫代磷酸酯 CpG-寡核苷酸混合的 BKV VLP, 或者不予处理。BKV VLP 如实施例 8 所述制备, 在免疫之前通过透析从未结合的 CpG-寡核苷酸中充分纯化。免疫后第 14 天, 采集血液, 测定对 BKV VLP 的 IgG1 和 IgG2a 抗体应答。

图 15 显示免疫后第 14 天的对 BKV VLP 的 IgG1 和 IgG2a 抗体应答。与用相同量 (0.3 nmol) 的与 BKV VLP 混合的 CpG-寡核苷酸或单独用 BKV VLP 免疫相比, 用 RNase A 处理的含硫代磷酸酯 CpG-寡核苷酸的 BKV VLP 免疫, IgG1 滴度降低和抗 BKV VLP IgG2a 滴度增加。用与 20 nmol 硫代磷酸酯 CpG-寡核苷酸混合的 BKV VLP 免疫的小鼠显示极低的 IgG1 滴度和高 IgG2a 滴度。与对照相比, IgG1

滴度降低, IgG2a 滴度升高, 这说明包装于 BKV VLP 中的硫代磷酸 CpG-寡核苷酸诱发了 Th1 细胞定向的免疫应答。图 15 清楚显示, 与仅与 CpG-寡核苷酸混合的 BKV VLP 相比, 含有包装于颗粒内的含 CpG-寡核苷酸的 BKV VLP 具有更好的效果。

5

#### 实施例 10

通过首先 RNase 消化, 随后添加 dsDNA, 线性双链 DNA( dsDNA) 可以被包装于 VLP 内

p33-VLP 制剂 (含有细菌 RNA) (实施例 1) 首先与 RNase A 孵育, 以除去 RNA, 第二步, 向样品中添加线性 dsDNA (350 bp 长) (图 16)。包装有 dsDNA 的 p33-VLP 的迁移类似于含有 RNA 的 p33-VLP 之一。该实验表明, 长度至少为 350 碱基对的线性 dsDNA 能够被包装于病毒样颗粒内。

15 

#### 实施例 11

免疫刺激性核酸能够被包装于含有与抗原融合的融合蛋白的 HBcAg VLP 内

当通过表达乙型肝炎核心抗原融合蛋白 HBc33 (实施例 1) 或与肽 P1A 融合的融合蛋白 (HBcP1A), 在大肠杆菌中生产 HBcAg VLP 时, 它含有 RNA, 该 RNA 可被消化, 因此通过 VLP 与 RNase A 孵育将其除去。

基因 P1A 编码由肥大细胞瘤肿瘤细胞系 P815 表达的一种蛋白质。显性 CTL 表位, 被称为 P1A 肽, 与 MHC I 类 (Ld) 结合, 复合物被特异 CTL 克隆识别 (Brändle 等人, 1998, Eur. J. Immunol. 28:4010-4019)。利用标准分子生物学技术, 使用合适的引物, 通过 PCR 进行肽 P1A-1 (LPYLGWLVF) 与 HBcAg C 端 (氨基酸 185, 参见实施例 1) 的融合。将一个三亮氨酸接头克隆到 HBcAg 与肽序列之间。如实施例 1 所述进行表达。HBcAg 与 P1A 的融合蛋白被称为 HBcP1A, 在大肠杆菌中表达时形成衣壳, 可以按类似于实施例 1 所

述的方法将其纯化。

酶促 RNA 水解: 重组产生的 HBcAg-p33 (HBc33) 和 HBcAg-P1A (HBcP1A) VLP, 在 1×PBS 缓冲液 (KCl 0.2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l, NaCl 8 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g/l) pH7.4 中浓度为 1.0 mg/ml, 在 300 μg/ml RNase A (Qiagen AG, Switzerland) 存在下, 在恒温混匀器中以 650 rpm 37°C 孵育 3 小时。

免疫刺激性核酸的包装: 用 RNase A 消化 RNA 后, 向 HBcAg-p33 VLP 中添加 130 nmol/ml CpG-寡核苷酸 B-CpG、NKcpg、G10-PO (表 I)。类似地, 分别以 130 nmol/ml 或 1.2 nmol/ml 的浓度添加 150mer 单链 Cy150-1 和 253mer 双链 dsCyCpG-253, 它们均含有多个拷贝的 CpG 基序, 在恒温混匀器中 37°C 孵育 3 小时。通过将 CyCpG 的双链多聚体克隆到 pBluescript KS-的 EcoRV 位点内产生双链 CyCpG-253 DNA。在大肠杆菌 XL1-blue 中产生并用 Qiagen Endofree 质粒 Giga 试剂盒分离获得的质粒, 用限制性内切核酸酶 XhoI 和 XbaI 消化, 产生的限制酶切产物通过琼脂糖电泳分离。253 bp 的插入片段通过电洗脱和乙醇沉淀分离。通过对两条链测序检验其序列。

表 I: 实施例中使用的免疫刺激性核酸的序列

小写字母表示通过硫代磷酸酯键连接的脱氧核苷酸, 而大写字母表示通过磷酸二酯键连接的脱氧核苷酸



部分抗性，利用 Benzonase 处理从制品中除去游离的寡核苷酸。添加 100-120 U/ml Benzonase (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 和 5 mM MgCl<sub>2</sub>，在透析前 37°C 孵育 3 小时。

透析：使用 300 kDa MWCO 透析膜 (Spectrum Medical industries Inc., Houston, US)，在小鼠免疫实验中使用的包装有免疫刺激性核酸的 VLP 制剂用 PBS pH 7.4 充分透析 (2 次，透析液为 200 倍体积) 24 小时，除去添加的酶和游离的核酸。

包装的分析：包装的免疫刺激性核酸的释放：向 50 μl 衣壳溶液中添加 1 μl 蛋白酶 K (600 U/ml, Roche, Mannheim, Germany)、3 μl 10% SDS-溶液和 6 μl 10 倍蛋白酶缓冲液 (0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 0.1 M Tris pH 7.4)，随后在 37°C 下孵育过夜。VLP 在该条件下完全水解。在 65°C 下加热 20 分钟灭活蛋白酶 K。向 25 μl 衣壳中添加 1 μl RNase A (Qiagen, 100 μg/ml, 稀释 250 倍)。2-30 μg 衣壳与 1 倍体积的 2×加样缓冲液 (1×TBE, 42% w/v 尿素, 12% w/v Ficoll, 0.01% 溴酚蓝) 混合，95°C 加热 3 分钟，加样到 10% (对于约 20 nt 长的寡核苷酸) 或 15% (对于 >40 mer 的核酸) TBE/尿素聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen) 上。此外，样品也可以与 6×加样染料 (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 10% v/v 甘油, 0.4% 橙黄 G) 一起加样到 1% 琼脂糖凝胶上。TBE/尿素凝胶用 CYBRGold 染色，琼脂糖凝胶用溴化乙锭染色。

图 17、18 和 19 显示 B-CpG、NKCpG 和 G10-PO 寡核苷酸被包装于 HBc33 内。在 RNase A 处理后，VLP 中的 RNA 内容物极大减少 (图 17A, 18A, 19A)，而大多数衣壳作为一条缓慢迁移的弥散带迁移，这可能是由于除去了带负电荷的 RNA (图 17B, 18B, 19B)。与过量寡核苷酸孵育后的衣壳比 RNase A 处理的衣壳含有更高含量的核酸，因此以类似于未处理衣壳的速度迁移。另外用 DNase I 或 Benzonase 降解游离的寡核苷酸，而包装于衣壳内的寡核苷酸不被降解，清楚地显示了寡核苷酸的包装。在某些情况下，在 DNase I /Benzonase 处理并透析后，通过蛋白酶 K 消化 (如实施例 15 和 16 所述) 证实寡核苷酸的包装。利用上述方法从衣壳中释放的寡核苷酸与

用于包装的寡核苷酸大小相同，这一发现清楚地证实了寡核苷酸的包装（图 17C，18C）。

图 20 显示大的单链寡核苷酸 Cy150-1 被包装于 HBc33 内。Cy150-1 含有 7.5 个重复的 CyCpG，按照标准寡核苷酸合成法（IBA, Göttingen, Germany）合成。衣壳中的 RNA 内容物在 RNase A 处理后极大减少，而大多数衣壳以缓慢迁移的弥散条带迁移（图 20A，B）。衣壳用 4 倍体积的水稀释，并浓缩到 1 mg/ml。与过量的 Cy150-1 孵育后，衣壳含有大量核酸，因此以类似于未处理衣壳的速度迁移。另外用 DNase I 处理降解游离的、未包装的寡核苷酸，而衣壳内的寡核苷酸不被降解（图 20A）。在 TBE/尿素加样缓冲液中 95℃加热 3 分钟，从包装的 VLP 中释放 DNase I 抗性的核酸，这表明存在 150 mer（图 20C）。

图 21 显示 NKCPGpt 被包装于 HBcP1A 内。RNase 处理减少核酸内容物，并使衣壳的迁移减慢。添加 NKCPGpt 可恢复衣壳中的核酸内容物并使迁移变快。

图 17 显示用 1%琼脂糖凝胶分析 B-CpG 被包装于 HBc33 VLP 内，用溴化乙锭（A）和考马斯蓝（B）染色。加样到凝胶上的是 50 μg 下列样品：1. 未处理的 HBc33 VLP；2. RNase A 处理的 HBc33 VLP；3. RNase A 处理并包装有 B-CpG 的 HBc33 VLP；4. RNase A 处理、包装有 B-CpG 并用 DNase I 处理的 HBc33 VLP；5. RNase A 处理、包装有 B-CpG、DNase I 处理并透析的 HBc33 VLP；6. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段。（C）显示用 1.5%琼脂糖凝胶溴化乙锭染色分析从 VLP 中提取的包装的 oligo 的量：加样到凝胶上的是下列样品：1. 0.5 nmol B-CpG 对照；2. 0.5 nmol B-CpG 对照；3. 酚/氯仿抽提后 HBc33 中的 B-CpG oligo 内容物；4. 酚/氯仿抽提并且用 RNase A 处理后 HBc33 中的 B-CpG oligo 内容物；5. 酚/氯仿抽提并且用 DNase I 处理后 HBc33 中的 B-CpG oligo 内容物；6. 空；7. MBI Fermentas DNA 标准分子量片段。

图 18 显示用 1%琼脂糖凝胶分析 NKCPG 被包装于 HBc33 VLP



内，用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的是 15  $\mu\text{g}$  下列样品：1. 未处理的 HBc33 VLP；2. RNase A 处理的 HBc33 VLP；3. RNase A 处理并包装有 NKCPG 的 HBc33 VLP；4. RNase A 处理、包装有 NKCPG、DNase I 处理并且透析的 HBc33 VLP；5. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段。(C) 显示用 15% TBE/尿素凝胶 CYBRGold 染色分析从 VLP 中提取的包装的寡核苷酸的量。加样到凝胶上的是下列样品：1. 蛋白酶 K 消化及 RNase A 处理后 HBc33 中的 NKCPG oligo 内容物；2. 20 pmol NKCPG 对照；3. 10 pmol NKCPG 对照；4. 40 pmol NKCPG 对照。

10 图 19 显示用 1%琼脂糖凝胶分析 g10gacga-PO 被包装于 HBc33 VLP 内，用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的是 15  $\mu\text{g}$  下列样品：1. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段；2. 未处理的 HBc33 VLP；3. RNase A 处理的 HBc33 VLP；4. RNase A 处理并包装有 g10gacga-PO 的 HBc33 VLP；5. RNase A 处理、包装有 g10gacga-PO、Benzonase 处理并透析的 HBc33 VLP。

15 图 20 显示用 1%琼脂糖凝胶分析 CyCpG-150 被包装于 HBc33 VLP 内，用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的是 15  $\mu\text{g}$  下列样品：1. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段；2. 未处理的 HBc33 VLP；3. RNase A 处理的 HBc33 VLP；4. RNase A 处理并包装有 CyCpG-150 的 HBc33 VLP；5. RNase A 处理、包装有 CyCpG-150、DNase I 处理并透析的 HBc33 VLP；6. RNase A 处理、包装有 CyCpG-150、DNase I 处理并透析的 HBc33 VLP。(C) 显示用 10% TBE/尿素凝胶 CYBRGold 染色分析从 VLP 中提取的包装的 oligo 的量。加样到凝胶上的是下列样品：1. 20 pmol CyCpG-150 对照；2. 10 pmol CyCpG-150 对照；3. 4 pmol CyCpG-150 对照；4. 应用 1 倍体积的 TBE/尿素加样缓冲液，在 95 $^{\circ}\text{C}$  下加热 3 分钟之后，4  $\mu\text{g}$  HBc33 中 CyCpG-150 oligo 的含量。

25 图 21 显示用 1%琼脂糖凝胶分析 NKCPGpt 被包装于 HBcP1A VLP 内，用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的

是 15  $\mu\text{g}$  下列样品: 1. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段; 2. 未处理的 HBcP1A VLP; 3. RNase A 处理的 HBcP1A VLP; 4. RNase A 处理并包装有 NKCPGpt 的 HBcP1A VLP。

## 5 实施例 12

免疫刺激性核酸能够被包装到与抗原偶联的 HBcAg-wt 内

重组产生的 HBcAg-wt VLP 在与来自淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 的肽 p33 (CGG-KAVYNFATM) 偶联后进行包装。为了偶联, HBcAg-wt VLP (2 mg/ml) 在恒温混匀器中用 25 $\times$ 摩尔过量的 SMPH(琥珀酰亚胺基-6-[( $\beta$ -马来酰亚氨基-丙酰氨基)己酸], Pierce) 25 $^{\circ}\text{C}$  衍化 1 小时。使用 MWCO 10,000 kD 透析膜, 将衍化的 VLP 在 4 $^{\circ}\text{C}$  下用 Mes 缓冲液 (2-(N-吗啉代)乙磺酸) pH7.4 透析 2 次各 2 小时。随后在恒温混匀器中 25 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时, VLP (50 $\mu\text{M}$ ) 与 p33 肽 (250 $\mu\text{M}$ ) 的 N 端半胱氨酸偶联。样品用 1 $\times$ PBS pH7.4 充分透析 15 (MWCO 300.000), 除去不需要的游离肽。

图 22 显示用 SMPH 衍化并与 p33 肽偶联的 HBcAg-wt VLP 的 SDS-PAGE 分析。样品通过 16% SDS-PAGE 分析, 并用考马斯蓝染色。HBcAg-wt 可见为一条 21 kD 蛋白条带。由于 SMPH 的分子量低, 衍化产物仅仅略微增大, 不能通过 SDS-PAGE 鉴别。单独的肽可见为 20 一条 3 kD 条带, 而偶联产物, 被称为 HBx33, 在约 24 kD 处显示第二条强条带, 占总 HBcAg-wt 的 50% 以上。

酶促 RNA 水解: 在 RNase A (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Qiagen AG, Switzerland) 存在下, 用 4 倍体积的  $\text{H}_2\text{O}$  稀释 HBx33 VLP (0.5-1.0 mg/ml, 1 $\times$ PBS 缓冲液 pH7.4), 使盐浓度降低至 0.2 $\times$ PBS 的终浓度, 并在恒温混匀器中以 650 rpm 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 小时。 25

免疫刺激性核酸的包装: RNase A 消化后, 用 Millipore Microcon 或 Centriplus 浓缩器浓缩 HBx33 VLP, 然后添加 130 nmol/ml CpG-寡核苷酸 B-CpGpt, 在恒温混匀器中在 0.2 $\times$ PBS pH 7.4 中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 小时。随后, 反应混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$  下用 DNaseI 消化 (5 U/ml) 3 小时

(DNaseI, 不含 RNase, Fluka AG, Switzerland)。使用 300 kDa MWCO 透析膜 (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, USA), 将用于免疫小鼠的 VLP 制剂用 PBS pH7.4 充分透析 (2 次, 透析液为 200 倍体积) 24 小时, 除去 RNase A 和过量的 CpG-寡核苷酸。图 23 显示 RNase 处理减少了衣壳的核酸内容物, 并且减缓其迁移。添加 B-CpGpt 可恢复衣壳的核酸内容物并使迁移加快。DNaseI 仅消化游离寡核苷酸, 而包装的寡核苷酸在透析后仍在 VLP 中保留 (图 23)。

图 22 显示与 HBc VLP 偶联的 p33 的 SDS-PAGE 分析, 考马斯蓝染色。加样到凝胶上的是下列样品: 1. NEB 预染色的蛋白质标准, 宽范围 (#7708S), 10  $\mu$ l; 2. CGG-p33 肽; 3. SMPH 衍化的 HBc VLP, 透析前; 4. SMPH 衍化的 HBc VLP, 透析后; 5. 与 CGG-p33 偶联的 HBc VLP, 上清液; 6. 与 CGG-p33 偶联的 HBc VLP, 沉淀。

图 23 显示用 1% 琼脂糖凝胶分析 B-CpGpt 被包装于 HBx33 VLP 内, 用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的是 50  $\mu$ g 下列样品: 1. 未处理的 HBx33 VLP; 2. RNase A 处理的 HBx33 VLP; 3. RNase A 处理并包装有 B-CpGpt 的 HBx33 VLP; 4. RNase A 处理、包装有 B-CpGpt 并用 DNase I 处理的 HBx33 VLP; 5. RNase A 处理、包装有 B-CpGpt、DNase I 处理并透析的 HBx33 VLP; 6. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段。

20

### 实施例 13

免疫刺激性核酸能够被包装于与抗原偶联的 Q $\beta$  VLP 内

p33 肽与 Q $\beta$  VLP 的偶联:

在与含有 N 端 CGG 和 C 端 GGC 延伸 (CGG-KAVYNFATM 和 KAVYNFATM-GGC) 的 p33 肽偶联后使用重组产生的 Q $\beta$  VLP。重组产生的 Q $\beta$  VLP 在 25 $^{\circ}$ C 下用 10 摩尔过量的 SMPH (Pierce) 衍化 0.5 小时, 随后在 4 $^{\circ}$ C 下用 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.2 透析, 除去未反应的 SMPH。添加 5 倍摩尔过量的肽, 并且在 30% 乙腈存在

下在恒温混匀器中 25°C 反应 2 小时。图 24 显示 SDS-PAGE 分析，证明了由一个、两个或三个与 Q $\beta$  单体偶联的肽组成的多个偶联带（箭头，图 24）。

5 当通过表达噬菌体 Q $\beta$  衣壳蛋白在大肠杆菌中产生 Q $\beta$  VLP 时，它含有 RNA，该 RNA 能被消化，因此通过 VLP 与 RNase A 孵育除去。

低离子强度和低 Q $\beta$  浓度使 RNase A 水解 Q $\beta$  VLP 中的 RNA:

10 在 20 mM HEPES/150 mM NaCl 缓冲液 (HBS) pH 7.4 中浓度为 1.0 mg/ml 的 Q $\beta$  VLP，通过添加 RNase A (300  $\mu$ g/ml, Qiagen AG, Switzerland) 直接消化，或者用 4 倍体积的 H<sub>2</sub>O 稀释至终浓度为 0.2 $\times$ HBS，然后与 RNase A (60  $\mu$ g/ml, Qiagen AG, Switzerland) 孵育。在恒温混匀器中以 650 rpm 37°C 孵育 3 小时。图 25 证实，在 1 $\times$ HBS 中只观察到极弱的 RNA 内容物的减少，而在 0.2 $\times$ HBS 中大多数 RNA  
15 均水解。与之一致的是，向 1 $\times$ HBS 中添加 RNase A 后衣壳的迁移不改变，而向 0.2 $\times$ HBS 中添加 RNase 后迁移较慢 (图 25B, D)。

低离子强度增加核酸在 Q $\beta$  VLP 中的包装

20 在 0.2 $\times$ HBS 中 RNase A 消化后，用 Millipore Microcon 或 Centriplus 浓缩器将 Q $\beta$  VLP 浓缩至 1 mg/ml，其等份样品用 1 $\times$ HBS 或 0.2 $\times$ HBS 透析。向 Q $\beta$  VLP 中添加 130 nmol/ml CpG-寡核苷酸 B-CpG，在恒温混匀器中 37°C 孵育 3 小时。随后，在 37°C 下用 Benzonase 消化 (100 U/ml) Q $\beta$  VLP 3 小时。利用 1% 琼脂糖凝胶在溴化乙锭或考马斯蓝染色后分析样品。图 26 显示，在 1 $\times$ HBS 中只有  
25 极少量的寡核苷酸能被包装，而在 0.2 $\times$ HBS 中可检测到强溴化乙锭染色带，它与衣壳的考马斯蓝染色位置重叠。

不同免疫刺激性核酸能够被包装于 Q $\beta$  VLP 中:

在 0.2 $\times$ HBS 中 RNase A 消化后，用 Millipore Microcon 或

Centriplus 浓缩器将 Q $\beta$  VLP 浓缩至 1 mg/ml, 并添加 130 nmol/ml CpG-寡核苷酸 B-CpGpt、g10gacga 和 253 mer dsCyCpG-253 (表 I), 在恒温混匀器中 37°C 孵育 3 小时。随后, 在 37°C 下用 DNaseI (5 U/ml) 或 Benzonase 消化 (100 U/ml) Q $\beta$  VLP 3 小时。利用 1% 琼脂糖凝胶在溴化乙锭或考马斯蓝染色后分析样品。图 27 显示, 不同的核酸 B-CpGpt、g10gacga 和 253 mer dsDNA 能够被包装于 Q $\beta$ x33 内。包装的核酸对 DNaseI 消化有抗性, 在透析过程中保持包装状态 (图 27)。通过蛋白酶 K 消化释放核酸, 随后进行琼脂糖电泳和溴化乙锭染色, 证实 B-CpGpt 的包装 (图 27C)。

图 24 显示与 Q $\beta$  VLP 偶联的 p33 在考马斯蓝染色后的 SDS-PAGE 分析。加样的是下列样品: (A) 1. NEB 预染色的蛋白质标准, 宽范围 (#7708S), 10  $\mu$ l; 2. Q $\beta$  VLP, 14  $\mu$ g; 3. SMPH 衍化的 Q $\beta$  VLP, 透析后; 4. 与 CGG-p33 偶联的 Q $\beta$  VLP, 上清液。(B) 1. NEB 预染色的蛋白质标准, 宽范围 (#7708S), 10  $\mu$ l; 2. Q $\beta$  VLP, 10  $\mu$ g; 3. 与 GGC-p33 偶联的 Q $\beta$  VLP, 上清液。

图 25 显示用 1% 琼脂糖凝胶分析, 在低及高离子强度下 RNase A 对 Q $\beta$  VLP 中 RNA 的水解, 用溴化乙锭 (A, C) 和考马斯蓝 (B, D) 染色。加样到凝胶上的是下列样品: (A, B) 1. MBI Fermentas 1kb DNA 标准分子量片段; 2. 未处理的 Q $\beta$  VLP; 3. 在 1 $\times$ HBS 缓冲液 pH 7.2 中用 RNase A 处理的 Q $\beta$  VLP。(C, D) 1. MBI Fermentas DNA 1kb 标准分子量片段; 2. 未处理的 Q $\beta$  VLP; 3. 在 0.2 $\times$ HBS 缓冲液 pH 7.2 中用 RNase A 处理的 Q $\beta$  VLP。

图 26 显示用 1% 琼脂糖凝胶分析, 在低及高离子强度下 B-CpG 在 Q $\beta$  VLP 内的包装, 用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的是下列样品: 1. 未处理的 Q $\beta$  VLP; 2. RNase A 处理的 Q $\beta$  VLP; 3. RNase A 处理、在 0.2 $\times$ HBS 缓冲液 pH 7.2 中包装 B-CpG 并用 Benzonase 处理的 Q $\beta$  VLP; 4. RNase A 处理、在 1 $\times$ HBS 缓冲液 pH 7.2 中包装 B-CpG 并用 Benzonase 处理的 HBx33 VLP。

图 27 显示用 1% 琼脂糖凝胶分析 B-CpGpt 在 Q $\beta$ x33 VLP 内的包

装，用溴化乙锭 (A) 和考马斯蓝 (B) 染色。加样到凝胶上的是 50  $\mu\text{g}$  下列样品：1. 未处理的 Qbx33 VLP；2. RNase A 处理的 Qbx33 VLP；3. RNase A 处理并包装有 B-CpGpt 的 Qbx33 VLP；4. RNase A 处理、包装有 B-CpGpt、DNase I 处理并透析的 Qbx33 VLP；5. 1 kb MBI Fermentas DNA 标准分子量片段。(C) 显示通过 CYBR Gold 染色 15% TBE/尿素分析从 VLP 中提取的包装的 oligo 的量。加样到凝胶上的是下列样品：1. 蛋白酶 K 消化和 RNase A 处理后 2  $\mu\text{g}$  Qbx33 VLP 中的 BCpGpt oligo 内容物；2. 20 pmol BCpGpt 对照；3. 10 pmol BCpGpt 对照；4. 5 pmol BCpGpt 对照。

10 图 27D 和 E 显示用 1% 琼脂糖凝胶分析 g10gacga-PO 在 Qbx33 VLP 内的包装，用溴化乙锭 (D) 和考马斯蓝 (E) 染色。加样到凝胶上的是 15  $\mu\text{g}$  下列样品：1. MBI Fermentas 1 kb DNA 标准分子量片段；2. 未处理的 Qbx33 VLP；3. RNase A 处理的 Qbx33 VLP；4. RNase A 处理并包装有 g10gacga-PO 的 Qbx33 VLP；5. RNase A 处理、包装有 g10gacga-PO、Benzonase 处理并透析的 Qbx33 VLP。

20 图 27E 和 F 显示用 1% 琼脂糖凝胶分析 dsCyCpG-253 在 Qbx33 VLP 内的包装，用溴化乙锭 (E) 和考马斯蓝 (F) 染色。加样到凝胶上的是 15  $\mu\text{g}$  下列样品：1. MBI Fermentas 1 kb DNA 标准分子量片段；2. 未处理的 Qbx33 VLP；3. RNase A 处理的 Qbx33 VLP；4. RNase A 处理、包装有 dsCyCpG-253 并用 DNaseI 处理的 Qbx33 VLP；5. RNase A 处理、包装有 dsCyCpG-253、用 DNaseI 处理并透析的 Qbx33 VLP。

#### 实施例 14

#### QB 解装配、重装配和免疫刺激性核酸的包装

25

#### QB VLP 的解装配和重装配

解装配：根据分光光度测定，70 mg 冻干纯 QB VLP 具有约 35 mg 的蛋白质含量，使用下列三个公式获得的平均结果：1.  $(183 \times \text{OD}^{230 \text{ nm}} - 75.8 \times \text{OD}^{260 \text{ nm}}) \times \text{体积}(\text{ml})$  - 2.  $((\text{OD}^{235 \text{ nm}} - \text{OD}^{280 \text{ nm}}) / 2.51) \times \text{体积}$  - 3.

$((OD^{228.5\text{ nm}} - OD^{234.5\text{ nm}}) \times 0.37) \times \text{体积}$ 。冻干的纯 Q $\beta$  VLP 溶解于 7 ml 6 M GuHCl 中, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。该溶液以 6000 rpm 澄清 15 分钟 (Eppendorf 5810 R, 固定角度转子 F34-6-38, 在下列所有步骤中使用)。弃去极微量的沉淀, 上清液用 200-300 ml NET 缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) 在 3 天内透析 5 次。此外, 上清液也在 3-4 天内以连续方式用 1.5 l NET 缓冲液透析。获得的上清液以 12000 rpm 离心 20 分钟。沉淀重新溶解于 2-3 ml 8 M 尿素中, 上清液中加入固体硫酸铵至 60% 饱和度以沉淀上清液。向预先溶解于尿素中的沉淀内添加饱和硫酸铵溶液至 60% 饱和, 使该溶液在 4 $^{\circ}$ C 下沉淀 4 天, 随后以 12000 rpm 离心 20 分钟。这种沉淀, 以及最初的上清液的沉淀, 在总体积为 3 ml 的 7 M 尿素, 10 mM DTT 中溶解并混合。该物质加样到 Sephadex G75 柱上, 用 7 M 尿素, 10 mM DTT 以 2 ml/h 的流速洗脱。分离到两个峰。高分子量峰早于较低表观分子量峰。用溶于相同洗脱缓冲液的胰凝乳蛋白酶校准该柱显示, 第二个峰的表现分子量与二聚体形式的 Q $\beta$  外壳蛋白一致。合并含有该二聚体物质的级分, 用硫酸铵沉淀 (2 天, 4 $^{\circ}$ C)。用几滴水洗涤沉淀, 再次离心, 溶解于 2 ml 7 M 尿素, 10 mM DTT 中。然后用短 (1.5 $\times$ 27 cm) Sepharose 4B 柱纯化该物质。合并从柱上洗脱下来的一个峰和级分, 获得 10 ml 体积的蛋白质制品, 280 nm 与 260 nm 的吸光度比为 0.68/0.5, 产生约 450 nmol 的 Q $\beta$  外壳蛋白 (考虑到 VLP 中有 180 个亚单位, 重装配后获得 2.5 nmol 最大量的 VLP), 蛋白质浓度为 630  $\mu$ g/ml (用上述分光光度法计算)。

重装配: 向 10 ml 二聚体级分中添加  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度为 10%, 并添加 300  $\mu$ l 含有 12.3 nmol 寡核苷酸的 (CpG) $_{20}$ OpA 寡脱氧核苷酸溶液。重装配混合物首先在 4 $^{\circ}$ C 下用 30 ml 含有 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 NET 缓冲液透析 2 小时, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下以连续方式, 以 8 ml NET 缓冲液/h 的流速透析 4 天。然后重装配混合物用水透析脱盐, 其中更换 6 次缓冲液 (4 $\times$ 100 ml, 2 $\times$ 1 升)。

280 nm 与 260 nm 的吸光度比为 0.167/0.24。蛋白质冷冻干燥。

干燥的蛋白质再溶解于水中,用 Beckman L 8-80 离心机通过蔗糖梯度超速离心纯化,使用 SW 50.1 转子在 4°C 以 22000 rpm 离心 17h。蔗糖梯度纯化如下进行: 5 层 1 ml 下列蔗糖浓度 (w/v) 的溶液被分层装到一个离心管内: 50%, 43%, 36%, 29% 和 22%。这样形成的连续层在 4°C 下放置过夜。0.5 ml 蛋白质样品在梯度上分层, 如上所述离心 17 小时。从离心管底部开始洗脱梯度, 5 ml 梯度分成 16 个约 300  $\mu$ l 的级分。梯度中的级分通过 SDS-PAGE (图 28) 和 Ouchterlony 试验分析。级分 6-9 含有 QB 外壳蛋白, 在 Ouchterlony 试验中产生 QB VLP 所特有的沉淀带。具有较低表观密度并且含有 QB 蛋白的级分 11-15 在 Ouchterlony 试验中不含衣壳带。重装配的 QB 与野生型 QB 在实验误差允许范围内具有相同的表观密度。合并蔗糖梯度的级分 6-9, 用水透析, 冻干。然后溶解该物质进行电子显微镜 (EM) 分析 (图 29) 和 Ouchterlony 试验 (图 30A 和 B)。EM 方法如下: 蛋白质悬液吸附到覆盖碳-聚醋酸甲基乙烯脂的网格上, 用 2% 磷钨酸 (pH 6.8) 染色。用 JEM 100C (JEOL, 日本) 电子显微镜, 以 80 kV 的加速电压检查该网格。用 Kodak 电子成像胶片进行照相记录 (负片), 在 Kodak Polymax 相纸上洗印负片获得电子显微照片。这两种方法都表明, 重装配的 VLP 具有与完整的 QB VLP 相同的大分子性质。另外, 纯化的重装配 QB VLP 展示的二硫键模式与未处理的 QB VLP 所展示的二硫键模式无法区别, 具有五聚体和六聚体的典型模式 (图 31A)。

核酸内容物的分析: 用胰 DNase I 如下消化重装配的 QB VLP。向 200  $\mu$ l 0.5 mg/ml 与 (CpG)<sub>20</sub>OpA 寡核苷酸重装配的 QB VLP 溶液中添加 20  $\mu$ l 1U/ $\mu$ l DNase I (Fluka) 溶液和 22  $\mu$ l DNase I 缓冲液 (20 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris, pH 8.3)。反应混合物在 37°C 下孵育 2 小时 30 分钟。随后通过酚/氯仿抽提分离样品中的核酸内容物, 加样到 2% 琼脂糖凝胶上, 用溴化乙锭染色 (图 31B)。在凝胶上检测到一条包装的寡脱氧核苷酸大小的带。还可见一条以较高表观分子量迁移的带。我们不能排除能在此高度产生一条带的 (CpG)<sub>20</sub>OpA 寡脱氧核苷酸多



聚体的存在。凝胶显示，在重装配的 Q $\beta$  VLP 中含有 DNase I 保护的  
正确大小的寡脱氧核苷酸，因为该寡脱氧核苷酸随后能被 DNase I 消  
化，而不被 RNase A 消化。因此，在最初解装配 VLP、从核酸中纯化  
解装配的外壳蛋白、随后在寡脱氧核苷酸存在下 VLP 重装配之后，  
5 寡脱氧核苷酸能够被成功包装于 Q $\beta$  VLP 中。

图 28 显示 SDS-PAGE 分析蔗糖梯度离心产生的级分。加样于凝  
胶上的是下列样品。1-10 道：蔗糖梯度超速离心的级分 6-15。

图 29 显示 (A) 完整的 Q $\beta$  VLP 以及 (B) 在寡核苷酸(CpG)<sub>20</sub>OpA  
存在下解装配并重装配、随后通过蔗糖梯度超速离心纯化的 Q $\beta$  VLP  
10 的 EM 照片。观察到密集覆盖的衣壳，这些衣壳显示与完整的 Q $\beta$  VLP  
相同的结构特征和性质。

图 30 显示重新构建的 Q $\beta$  VLP 的 Ouchterlony 分析(免疫扩散)。  
在图 30A 中，与寡核苷酸(CpG)<sub>20</sub>OpA 重装配的 Q $\beta$  VLP 在完整的 Q $\beta$   
VLP 旁加样。两条特有的沉淀带用黑色箭头指出。这两条沉淀带是并  
15 行的，表明重装配的 Q $\beta$  VLP 与完整的 Q $\beta$  VLP 一样扩散。在图 30B  
中，样品 1 是在核糖体 RNA 存在下重装配的 Q $\beta$  VLP，而样品 2 是完  
整的 Q $\beta$  VLP，样品 3 是与寡核苷酸(CpG)<sub>20</sub>OpA 重装配的 Q $\beta$  VLP。  
沉淀带用白色箭头指出。

图 31A 显示通过非还原 SDS-PAGE 分析未处理的和重装配的 Q $\beta$   
20 VLP。Q $\beta$  VLP 的五聚体和六聚体用箭头指出。

图 31B 显示与寡核苷酸(CpG)<sub>20</sub>OpA 重装配的 Q $\beta$  VLP 经 DNase I  
消化后提取的核苷酸内容物的琼脂糖凝胶电泳分析。核酸内容物未经  
处理(1 道)，或者随后用 DNase I 消化(2 道)或用 RNase A 消化  
(3 道)；33  $\mu$ g 重装配的 Q $\beta$  VLP 被加样到每个道中。300 ng 50 bp  
25 寡核苷酸加样到第 4 道，而 10  $\mu$ l GeneRuler 100 bp DNA 标准分子量  
片段+标记物(MBI Fermentas)加样到第 5 道。

### 实施例 15

Q $\beta$  的解装配以及与不同免疫刺激性核酸的重装配

### Q $\beta$ VLP 的解装配以及与不同序列的寡脱氧核苷酸的重装配

Q $\beta$  VLP 的解装配基本如实施例 1 所述进行, 不同之处在于用 8 M 尿素代替 7 M 尿素来重悬浮硫酸铵沉淀。

- 5 Q $\beta$  VLP 与 oligo CyOpA、CyCyCy、(CpG)<sub>20</sub>-OpA 和 CyCpG 的重装配除下列变化之外基本如实施例 1 所述进行。在向透析袋中的二聚体溶液中添加寡脱氧核苷酸溶液之前, 在程序中增加一个透析步骤, 在 4°C 下用 NET 缓冲液(20 mM Tris-HCl, pH7.8, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) 中的 10%  $\beta$ -巯基乙醇透析 1 小时。然后将寡脱氧核苷酸加到
- 10 二聚体溶液中, 如前所述, 大约获得比衣壳(180 个亚单位) 10 倍摩尔过量的寡核苷酸。重装配混合物首先在 4°C 下用 30 ml 含 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 NET 缓冲液透析 1 小时, 然后在 4°C 下以连续模式, 以 8 ml NET 缓冲液/h 的流速透析 4 天。在重装配反应结束时采集 Q $\beta$  VLP 与寡脱氧核苷酸 CyOpA 的重装配反应的样品进行 EM 分析(图 32)。
- 15 采用上述使用磷钨酸的 EM 法。重装配混合物然后用水透析脱盐并干燥。

干燥的蛋白质重新溶解于水, 通过蔗糖梯度超速离心纯化。对纯化的重装配的 Q $\beta$  VLP 也进行 EM 分析(图 33 A-D)。电子显微照片显示, 重装配的 VLP 具有与完整的 Q $\beta$  VLP 相同的大分子特征。纯化

20 可显著富集重装配颗粒制剂。因此, Q $\beta$  VLP 与不同长度和序列的寡脱氧核苷酸成功重装配。

p33 肽与重装配的 Q $\beta$  VLP 的偶联: 与寡脱氧核苷酸 CyOpA 重装配的 Q $\beta$  VLP 以 1.5 mg/ml 的浓度在 26°C 下 20 mM HEPES pH 7.4 中与终浓度为 536  $\mu$ M 的交联剂 SMPH(由 DMSO 中的贮存液稀释) 反应

25 35 分钟。衍化的 Q $\beta$  VLP 用一千倍体积的 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4 透析 2 次各 2 小时。随后, 透析的浓度为 1.4 mg/ml 的衍化 Q $\beta$  VLP 在 15°C 下 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4 中与终浓度为 250  $\mu$ M 的 p33GGC 肽(序列: KAVYNFATMGGC) 反应 2 小时。图 34 的凝胶显示 p33 肽与 Q $\beta$  VLP 成功偶联。对应于每个亚单位偶联一个、

分别两个肽的偶联带在图中用箭头指出。

核酸内容物的分析：重装配并偶联的 Q $\beta$  VLP 中的核酸内容物通过蛋白酶 K 消化、酚/氯仿抽提及随后将提取的寡核苷酸加样到 TBE/尿素 PAGE 凝胶上分析。分析方法如下。向 25  $\mu$ l 重装配的 Q $\beta$  VLP (0.5-1 mg/ml) 中添加 0.5  $\mu$ l 蛋白酶 K、1.5  $\mu$ l 10% SDS 和 3  $\mu$ l 10 $\times$ 蛋白酶缓冲液 (0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 0.1 M Tris pH7.4)。37 $^{\circ}$ C 孵育过夜后, 65 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟灭活蛋白酶 K, 并通过 1 $\times$ 酚和 1 $\times$ 氯仿抽提从样品中提取核酸内容物。随后, 样品与 1  $\mu$ l RNase A (Qiagen, 100  $\mu$ g/ml, 250 倍稀释) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。相当于 2  $\mu$ g 的初始蛋白质与 1 倍体积的 2 $\times$ 加样缓冲液 (1 ml 10 $\times$ TBE, 4.2 g 尿素, 1.2 g Ficoll, 1 ml 0.1% 溴酚蓝, H $_2$ O, 可达 10 ml) 95 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟, 加样到 15% TBE/尿素聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen) 上。凝胶在 180 V 电压下电泳 1.5 小时, 用 10% 乙酸/20% 乙醇固定, 用 CYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 染色。为了定量, 将 10 pmol 和 20 pmol 用于重装配的寡核苷酸加样到凝胶上作为参照。核酸内容物对 RNase 的抗性及其大小证明, 包装的核酸是用于重装配的寡核苷酸。包装的寡脱氧核苷酸的定量如下进行: 将提取的寡核苷酸的带强度与加样到同一凝胶上的参照含量的相同寡核苷酸的带强度进行比较。获得 1.75 nmol CyOpA/100  $\mu$ g Q $\beta$  VLP 的数值, 得出平均每个 VLP 44 个寡核苷酸的比例。

图 32 显示纯化前 Q $\beta$  VLP 与寡核苷酸 CyOpA 的重装配反应物的电子显微照片。放大倍数为 200 000 倍。

图 33 A-D 显示纯化的 Q $\beta$  VLP 与寡脱氧核苷酸(CpG)20 (A)、CyCyCy (B)、CyCpG (C) 和 CyOpA (D) 的重装配反应物的电子显微照片。放大倍数为 200 000 倍。

图 34 显示与寡脱氧核苷酸 CyOpA 重装配的 Q $\beta$  VLP 与 p33GGC 肽偶联的 SDS-PAGE 分析。加样到凝胶上的是下列样品: 1. 预染色的蛋白质标准, 宽范围 (#7708S), 10  $\mu$ l; 2. 与 CyOpA [1.5 mg/ml] 重装配的 Q $\beta$  VLP, 10  $\mu$ l; 3. 与 CyOpA [1.5 mg/ml] 重装配且 SMPH

衍化的 Q $\beta$  VLP, 10  $\mu$ l; 4. 与 CyOpA [1.5 mg/ml]重装配、SMPH 衍化且与 p33 肽偶联的 Q $\beta$  VLP, 10  $\mu$ l; 5. 与 CyOpA [1.5 mg/ml]重装配、SMPH 衍化且与 p33 肽偶联的 Q $\beta$  VLP, 沉淀的 1/5 体积。

图 35 显示通过尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳 CYBR Gold 染色分析提取的包装的寡脱氧核苷酸。下列样品加样到凝胶上: 1. 与寡核苷酸 CyOpA 重装配且与 p33 GGC 肽偶联的 Q $\beta$  VLP, 凝胶上加样 2  $\mu$ g 蛋白质。2. 与寡核苷酸 CyOpA 重装配且与 p33 GGC 肽偶联的 Q $\beta$  VLP, 在加样到凝胶之前冻融, 2  $\mu$ g 蛋白质。3. 与寡核苷酸 Cy(CpG)<sub>20</sub> 重装配且与 p33 GGC 肽偶联的 Q $\beta$  VLP, 在加样到凝胶之前冻融, 2  $\mu$ g 蛋白质。4. CyOpA 寡核苷酸, 20 pmol。5. CyOpA 寡核苷酸, 10 pmol。

### 实施例 16

#### Q $\beta$ 的解装配、重装配与包装

#### Q $\beta$ VLP 的解装配和重装配

解装配: 20 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl 中的 10 mg Q $\beta$  VLP (通过 Bradford 分析测定) 用固体硫酸铵沉淀, 至硫酸铵终饱和度为 60%。沉淀在 4 $^{\circ}$ C 下过夜进行, 沉淀的 VLP 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 60 分钟 (SS-34 转子) 沉淀。沉淀物重悬浮于含 100 mM DTT (终浓度) 的 1 ml 6M 盐酸胍 (GuHCl) 中, 4 $^{\circ}$ C 孵育 8 小时。

通过大小排阻层析纯化 Q $\beta$ 外壳蛋白: 溶液以 14000 rpm 离心澄清 10 分钟 (Eppendorf 5417R, 固定角度转子 F45-30-11, 在下列所有步骤中使用), 用含有 7 M 尿素, 100 mM TrisHCl, pH8.0, 10 mM DTT 的缓冲液 (2000 ml) 透析过夜。透析缓冲液更换一次, 继续透析 2 小时。获得的悬液在 4 $^{\circ}$ C 下以 14000 rpm 离心 10 分钟。弃去微量的沉淀, 保留上清液作为“上样级分”, 其中含有解装配的外壳蛋白和 RNA。蛋白质浓度通过 Bradford 分析测定, 5mg 总蛋白上样到 HiLoad<sup>TM</sup> Superdex<sup>TM</sup> 75 制备级柱 (26/60, Amersham Biosciences) 上, 该柱事先用 7 M 尿素, 100 mM TrisHCl 和 10 mM DTT 平衡。用平衡缓冲液 (7 M 尿素, 100 mM TrisHCl pH8.0, 10 mM DTT) 在 12 $^{\circ}$ C 下进行大小

排阻层析，流速为 0.5 ml/min。在洗脱过程中监测 254 nm 和 280 nm 的吸光度。分离到两个峰。高分子量峰早于较低表观分子量峰。以 1.5 ml 级分收集该峰，通过 SDS-PAGE、随后的考马斯蓝染色以及 SYBR<sup>®</sup>Gold 染色分析这些等份（图 36）。

5 通过离子交换层析纯化 QB 外壳蛋白：此外，澄清的上清液用含有 7 M 尿素, 20 mM MES, 10 mM DTT, pH6.0 的缓冲液(2000 ml)透析过夜。透析缓冲液更换一次，继续透析 2 小时。获得的悬液在 4°C 下以 14000 rpm 离心 10 分钟。弃去微量的沉淀，保留上清液作为“上样级分”，其中含有解装配的外壳蛋白和 RNA。蛋白质浓度通过 Bradford  
10 分析测定，10 mg 总蛋白用缓冲液 A（见下）稀释至终体积 10 ml，以 1 ml/min 的流速上样到 1ml HiTrap<sup>™</sup> SP HP 柱（Amersham Biosciences, 货号 17-1151-01）上，该柱事先用缓冲液 A（7 M 尿素, 20 mM MES, 10 mM DTT, pH6.0）平衡。收集含有 RNA 的流出液作为一种级分。用缓冲液 A（30 CV）充分洗涤该柱后，以 0%-100%缓冲液  
15 B 的线性梯度洗脱结合的 QB 外壳蛋白（梯度长度为 5 CV；缓冲液 A：见上，缓冲液 B：7 M 尿素, 20 mM MES, , 10 mM DTT, 2 M NaCl, pH6.0）。在上样、洗涤和洗脱过程中监测 254 nm 和 280 nm 的吸光度。收集 1 ml 的峰级分，通过 SDS-PAGE、随后的考马斯蓝染色以及 SYBR<sup>®</sup>Gold 染色分析。鉴定含有 QB 外壳蛋白而不含 RNA 的级分，  
20 通过添加 100  $\mu$ l 1 M TrisHCl, pH 8.0 调节 pH。

合并含 QB 外壳蛋白但不含 RNA 的样品，用 0.87 M 尿素, 100 mM TrisHCl, 10 mM DTT (2000 ml)透析过夜，缓冲液更换一次，继续透析 2 小时。获得的悬液在 4°C 下以 14000 rpm 离心 10 分钟。弃去微量的沉淀，保留上清液作为“解装配的外壳蛋白”。蛋白质浓度通过 Bradford  
25 分析测定。

重装配：浓度为 0.5 mg/ml 的纯化 QB 外壳蛋白用于在寡脱氧核苷酸存在下 VLP 的重装配。对于重装配反应，使用的寡脱氧核苷酸比计算的 QB-VLP 衣壳的理论量过量 10 倍（单体浓度除以 180）。重装配反应过程中，在 QB 外壳蛋白与将要包装的脱氧核苷酸混合后，该

溶液（体积可达 5 ml）首先在 4℃ 下用含有 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 500 ml NET 缓冲液透析 2 小时，然后在 4℃ 下以 8 ml NET 缓冲液/h 的流速，以连续模式透析 72 小时，最后以相同的连续模式用含有 20 mM TrisHCl, pH8.0, 150 mM NaCl 的缓冲液再透析 72 小时。获得的悬液在 4℃ 下以 14000 rpm 离心 10 分钟。弃去微量的沉淀，上清液含有重装配且包装的 VLP。蛋白质浓度通过 Bradford 分析测定，需要时用离心过滤装置（Millipore, UFV4BCC25, 5K NMWL）浓缩重装配且包装的 VLP，至终蛋白质浓度为 3 mg/ml。

重装配且包装的 VLP 的纯化：将可达 10 mg 的总蛋白质上样到 Sepharose<sup>TM</sup> CL-4B 柱（16/70, Amersham Biosciences）上，该柱预先用 20 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl 平衡。在室温下用平衡缓冲液（20 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl）以 0.4 ml/min 的流速进行大小排阻层析。在洗脱过程中监测 254 nm 和 280 nm 的吸光度。分离到两个峰。高分子量峰早于较低表观分子量峰。收集 0.5 ml 级分，通过 SDS-PAGE、随后的考马斯蓝染色分析（图 37）。用高度纯化的来自大肠杆菌的完整 Q $\beta$  衣壳校准该柱，显示主要第一峰的表观分子量与 Q $\beta$  衣壳相符。

在寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  VLP 的分析：

A) 衣壳的总体结构：在下列寡脱氧核苷酸之一（CyOpA, Cy(CpG)20OpA, Cy(CpG)20, CyCyCy, (CpG)20OpA）存在下，或在来自大肠杆菌的 tRNA（Roche Molecular Biochemicals, 货号 109541）存在下重装配的 Q $\beta$  VLP，通过电子显微镜检查分析（用乙酸双氧铀 pH4.5 负染），并与从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 相比较。阴性对照是没有核酸的重装配反应。重装配的衣壳显示与完整的 Q $\beta$  VLP 相同的结构特征和特性（图 38）。

B) 重装配衣壳的流体动力学大小：通过动态光散射（DLS）对在寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  衣壳进行分析，并与从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 进行比较。重装配的衣壳显示与完整 Q $\beta$  VLP 相同的流体动力学大小（取决于质量和构象）。

C) 重装配衣壳中二硫键的形成: 重装配的 Q $\beta$  VLP 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 并与从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 相比较。重装配的衣壳显示与完整 Q $\beta$  VLP 相同的二硫键模式(图 39)。

D) 通过琼脂糖凝胶电泳分析在寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  VLP 的核酸内容物: 5  $\mu$ g 重装配的 Q $\beta$  VLP 在 25  $\mu$ l 总反应体积中与 0.35 单位 RNase A (Qiagen, 货号 19101)、15 单位 DNase I (Fluka, 货号 31136) 或在不添加任何酶的情况下 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时。从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 作为对照孵育, 孵育条件与上述在寡脱氧核苷酸存在下重装配衣壳的孵育条件相同。反应液随后加样到 0.8% 琼脂糖凝胶上, 首先用溴化乙锭染色(图 40A), 随后用考马斯蓝染色(图 40B)。溴化乙锭染色显示, 添加的酶都不能消化重装配 Q $\beta$  衣壳中的核酸内容物, 表明核酸内容物(即寡脱氧核苷酸)受到保护。这一结果表明, 添加的寡脱氧核苷酸在重装配反应过程中被包装到新形成的衣壳内。相反, 从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 中的核酸内容物在添加 RNase A 后降解, 表明该 VLP 中的核酸内容物由 RNA 组成。另外, 琼脂糖凝胶的溴化乙锭染色和考马斯蓝染色都显示, 含核酸的 Q $\beta$  VLP (分别为重装配的, 从大肠杆菌中纯化的) 以大约相同的大小迁移, 这表明重装配反应产生的 Q $\beta$  VLP 与从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 大小相当。

凝胶显示, 重装配的 Q $\beta$  VLP 中存在 DNase I 保护的寡脱氧核苷酸。而且, 在用酚/氯仿抽提包装的寡脱氧核苷酸后, 它们可被 DNase I 消化, 但不被 RNase I 消化。因此, 在最初解装配 VLP、从核酸中纯化解装配的外壳蛋白并随后在寡脱氧核苷酸存在下重装配 VLP 后, 寡脱氧核苷酸能够被成功地包装于 Q $\beta$  VLP 内。

E) 通过变性聚丙烯酰胺 TBE-尿素凝胶电泳分析在寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  VLP 的核酸内容物: 40  $\mu$ g 重装配的 Q $\beta$  VLP (0.8 mg/ml) 在 60  $\mu$ l 总反应体积中与 0.5 mg/ml 蛋白酶 K (PCR 级, Roche Molecular Biochemicals, 货号 1964364) 和反应缓冲液按照使用说明书 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时。从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 作为对照与蛋白

酶 K 一起孵育, 孵育条件与上述在寡脱氧核苷酸存在下重装配衣壳的孵育条件相同。然后将反应液与 TBE-尿素加样缓冲液混合, 加样到 15% 聚丙烯酰胺 TBE-尿素凝胶 (Novex<sup>®</sup>, Invitrogen, 货号 EC6885) 上。用于重装配反应的 1 pmol、5 pmol 和 10 pmol 寡脱氧核苷酸加样到同一凝胶上, 作为定性及定量标准。该凝胶用 10% 乙酸, 20% 甲醇固定, 平衡至中性 pH, 并用 SYBR<sup>®</sup>-Gold (Molecular Probes 货号 S-11494) 染色。SYBR<sup>®</sup>-Gold 染色显示 (图 41), 重装配的 Q $\beta$  衣壳含有与重装配反应中使用的寡脱氧核苷酸共迁移的核酸。注意, 从大肠杆菌中纯化的完整 Q $\beta$  VLP 不含类似大小的核酸。总之, 对在寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  VLP 的核酸内容物的分析显示, 寡脱氧核苷酸受到保护而不被 DNase I 消化, 意味着它们被包装, 而且添加的寡脱氧核苷酸能够通过适当方法 (例如蛋白酶 K 消化 Q $\beta$  VLP) 重新分离。

图 36 显示通过大小排阻层析纯化解装配的 Q $\beta$  外壳蛋白。5  $\mu$ l 指定级分 (#) 与加样缓冲液混合, 加样到 16% Tris-甘氨酸凝胶 (Novex<sup>®</sup> by Invitrogen, 货号 EC64952) 上。电泳完成后, 凝胶首先用考马斯蓝染色 (A), 记录后该凝胶用 SYBR<sup>®</sup>-Gold 染色 (B)。注意, 第一个高分子量峰 (级分 #15-#20) 不含蛋白质而含核酸。另一方面, 第二个较低表观分子量峰含有与核酸分离的解装配的外壳蛋白。

图 37 显示通过大小排阻层析纯化重装配的 Q $\beta$  VLP。10  $\mu$ l 指定级分 (#) 与加样缓冲液混合, 加样到 16% Tris-甘氨酸凝胶 (Novex<sup>®</sup> by Invitrogen, 货号 EC64952) 上。电泳完成后, 凝胶用考马斯蓝染色。由于是还原条件, 二硫键被还原, 重装配的 VLP 的蛋白质单体可见为 14 kDa 外壳蛋白。

图 38 显示在不同寡脱氧核苷酸存在下重装配的 Q $\beta$  VLP 的电子显微照片。VLP 在指定寡脱氧核苷酸存在下或在 tRNA 存在下重装配, 但是没有通过大小排阻层析纯化为均匀的悬液。从大肠杆菌中纯化的“完整”Q $\beta$  VLP 制品作为阳性对照。重要的是, 在重装配反应中通过



添加任何指定核酸，与“阳性”对照相比，能够形成正确大小和构象的 VLP。这表明，重装配过程通常不依赖于核苷酸序列和所用寡脱氧核苷酸的长度。注意，在重装配反应过程中添加核酸是形成 QB VLP 所必需的，因为如果重装配反应中不含核酸，则不形成颗粒。

5 图 39 显示重装配并纯化的 QB 衣壳中二硫键模式的分析。5  $\mu$ l 指定衣壳与含或不含还原剂的加样缓冲液混合，加样到 16% Tris-甘氨酸凝胶上。电泳完成后，凝胶用考马斯蓝染色。与从大肠杆菌中纯化的“完整”衣壳相比，重装配的 QB VLP 显示相同的二硫键模式。

图 40 显示通过核酸酶处理和琼脂糖凝胶电泳分析重装配的 QB  
10 VLP 的核酸内容物。5  $\mu$ g 重装配并纯化的 QB VLP 和 5  $\mu$ g 从大肠杆菌中纯化的 QB VLP 分别如上所述处理。处理后，样品与加样染料混合，上样到 0.8% 琼脂糖凝胶上。电泳后，凝胶首先用溴化乙锭染色 (A)，记录后该凝胶用考马斯蓝染色 (B)。注意，重装配并纯化的 QB VLP 的核酸内容物对 RNase A 消化有抗性，而从大肠杆菌中纯  
15 化的 QB VLP 的核酸内容物在与 RNase A 孵育后被消化。这表明，重装配的 QB 衣壳的核酸内容物由寡脱氧核苷酸组成，它们当然不会被 RNase A 消化。因此，在重装配反应过程中寡脱氧核苷酸被包装于 QB VLP 内。

图 41 显示通过蛋白酶 K 处理和聚丙烯酰胺 TBE/尿素凝胶电泳分  
20 析重装配的 QB VLP 的核酸内容物。经蛋白酶 K 处理消化的相当于 1  $\mu$ g 的 QB VLP 与 TBE-尿素加样缓冲液混合，加样到 15% 聚丙烯酰胺 TBE-尿素凝胶 (Novex<sup>®</sup>, Invitrogen, 货号 EC6885) 上。用于重装配反应的 1 pmol、5 pmol 和 10 pmol 寡脱氧核苷酸加样到同一凝胶上，作为定性及定量标准。电泳完成后，固定凝胶，平衡至中性 pH，用  
25 SYBR<sup>®</sup>-Gold (Molecular Probes 货号 S-11494) 染色。注意，从大肠杆菌中纯化的完整 QB VLP 不含与从重装配 QB 衣壳中提取的核酸大小相似的核酸。另外，从重装配的 VLP 中分离的核酸与重装配反应中使用的寡脱氧核苷酸共迁移。该结果证实，使用的寡脱氧核苷酸被包装到重装配的 QB 衣壳中。

## 实施例 17

### AP205 解装配-纯化-重装配和免疫刺激性核酸的包装

A. AP205 VLP 的解装配和重装配，使用在不添加寡脱氧核苷酸  
5 的条件下能够重装配的材料

解装配：40 mg 冻干纯化的 AP205 VLP 溶解于 4 ml 6 M GuHCl  
中，4℃ 孵育过夜。解装配的混合物以 8000 rpm 离心 (Eppendorf 5810R，  
固定角度转子 F34-6-38，在下列所有步骤中使用)。沉淀溶解于 7 M  
尿素中，上清液用 NET 缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM EDTA,  
10 150 mM NaCl) 透析 3 天，其中更换 3 次缓冲液。另外，也以连续方  
式透析 4 天。透析的溶液以 8000 rpm 离心 20 分钟，沉淀溶解于 7 M  
尿素中，上清液用硫酸铵 (60% 饱和) 沉淀，溶解于含有 10 mM DTT  
的 7 M 尿素缓冲液中。合并溶解于 7 M 尿素中的上述所有沉淀，用硫  
酸铵 (60% 饱和) 沉淀，溶解于含有 10 mM DTT 的 7 M 尿素缓冲液  
15 中。合并溶解于含有 10 mM DTT 的 7 M 尿素缓冲液中的材料，加样  
到 Sephadex G75 柱上，该柱用含有 10 mM DTT 的 7 M 尿素缓冲液以  
2 ml/h 平衡并洗脱。从柱上洗脱下一个峰。收集 3 ml 的级分。合并含  
有 AP205 外壳蛋白的峰级分，用硫酸铵 (60% 饱和) 沉淀。以 8000 rpm  
离心 20 分钟分离沉淀。溶解于 7 M 尿素，10 mM DTT 中，加样到短  
20 Sepharose 4B 柱 (1.5×27 cm Sepharose 4B, 2ml/h, 7 M 尿素, 10 mM  
DTT 作为洗脱缓冲液) 上。从该柱上主要洗脱下一个峰，其含有一个  
小肩。含有 AP205 外壳蛋白的级分通过 SDS-PAGE 鉴定，合并，除  
去肩部。获得 10.3 ml 样品。通过分光光度法测定稀释 25 倍的蛋白质  
等份，来估计蛋白质浓度，使用下列公式： $(1.55 \times OD_{280} -$   
25  $0.76 \times OD_{260}) \times \text{体积}$ 。平均浓度为 1 nmol/ml VLP (2.6 mg/ml)。280 nm  
与 260 nm 的吸光度比为 0.12/0.105。

重装配：向样品中添加 1.1 ml  $\beta$ -巯基乙醇，配制下列重装配反应  
物：

1. 1 ml AP205 外壳蛋白，不含核酸

2. 1 ml AP205 外壳蛋白, rRNA (约 200 OD260 单位, 10 nmol)
3. 9 ml AP205 外壳蛋白, CyCpG (370  $\mu$ l 225 pmol/ $\mu$ l 溶液, 即 83 nmol)。

这些混合物用 30 ml 含 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 NET 缓冲液透析 1 小时。不含核酸的混合物分开透析。然后以连续方式继续透析 3 天, 更换 11 NET 缓冲液。反应混合物随后用水充分透析(更换 5 次缓冲液), 冻干。它们再溶解于水中, 进行 EM 分析。所有混合物均含有衣壳, 表明 AP205 VLP 重装配不依赖于可检测核酸的存在, 如同利用溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶电泳所测定的。与 CyCpG 重装配的 AP205 的 EM 分析在图 42B 中显示。EM 程序如下: 蛋白质悬液吸附到覆盖碳-聚醋酸甲基乙烯脂的网格上, 用 2% 磷钨酸(pH 6.8)染色。用 JEM 100C (JEOL, 日本)电子显微镜以 80 kV 的加速电压检查该网格。用 Kodak 电子成像胶片进行照相记录(负片), 在 Kodak Polymax 相纸上洗印负片获得电子显微照片。在 CyCpG 存在下重装配的 VLP 通过 Sepharose 4B 柱 (1 $\times$ 50 cm) 纯化, 用 NET 缓冲液洗脱 (1 ml/h)。级分通过 Ouchterlony 试验分析, 并合并含有 VLP 的级分。获得 8 ml 样品, 用水透析脱盐, 干燥。衣壳产量为 10 mg。用 0.6% 琼脂糖凝胶溴化乙锭染色分析溶解物质, 结果表明衣壳不含核酸。在重装配步骤之后和充分透析之前采集的含 CyCpG 的重装配反应样品用 0.6% 琼脂糖凝胶分析, 如图 43A 和 B 所示。能够获得迁移高度与完整的 AP205 VLP 相同并且能够用溴化乙锭和考马斯蓝染色的一条带, 表明含有寡脱氧核苷酸的 AP205 VLP 已经被重装配。重装配程序后的充分透析步骤可能导致寡脱氧核苷酸扩散到 VLP 之外。值得注意的是, 如利用溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶电泳所测定的, 在不含可检测的寡脱氧核苷酸条件下, AP205 VLP 也能被重装配。因此, 在最初解装配 VLP、从核酸中纯化解装配的外壳蛋白并随后在寡脱氧核苷酸存在下重装配 VLP 后, 寡脱氧核苷酸能够与 AP205 VLP 成功结合。

图 42 显示用于解装配步骤的完整的重组 AP205 VLP (A) 或解装配并且随后在 CyCpG 存在下重装配的 AP205 VLP (B) 的电子显

微照片。

图 43 显示在 CyCpG 存在下重装配的 AP205 VLP 样品的琼脂糖凝胶电泳分析，该分析直接在重装配步骤后透析前进行。图 43A 中的凝胶用溴化乙锭染色。与 CyCpG 重装配的 AP205 VLP 加样到第 1 道，未处理的纯 AP205 VLP 加样到第 2 道。箭头所指为重装配的 AP205 VLP 的带。图 43B 中的凝胶用考马斯亮蓝染色。未处理的 AP205 VLP 加样到第 1 道，与 CyCpG 重装配的 AP205 VLP 加样到第 2 道。

B. AP205 VLP 的重装配，使用在不添加寡脱氧核苷酸的情况下不能重装配的解装配材料

解装配：100 mg 纯化并干燥的重组 AP205 VLP (Cytos 专利) 如上所述解装配。所有步骤都基本如部分 A 的解装配所述进行，只是使用 8 M 尿素溶解硫酸铵沉淀步骤的沉淀物，并且省去了重装配之前使用 CL-4B 柱的凝胶过滤步骤。通过光谱测定，使用部分 A 所述公式，合并的 Sephadex G-75 柱级分含有 21 mg 蛋白质。样品的 280 nm 吸光度与 260 nm 吸光度之比为 0.16:0.125。样品稀释 50 倍进行测定。

重装配：Sephadex G-75 凝胶过滤纯化步骤获得的蛋白质制品用 60% 饱和的硫酸铵沉淀，获得的沉淀物溶解于 2 ml 7 M 尿素，10 mM DTT 中。样品用含 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 8 ml NET 缓冲液稀释，用 40 ml 含 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 NET 缓冲液透析 1 小时。通过向透析袋内的蛋白质样品中添加 0.4 ml CyCpG 溶液 (109 nmol/ml) 启动重装配。建立连续模式的透析，NET 缓冲液作为洗脱液。继续透析 2 天，在完成该透析步骤后采集样品进行 EM 分析 (图 44B)。透析的重装配溶液随后用含 50% v/v 甘油的 NET 缓冲液透析，实现浓缩。透析一天后更换一次缓冲液。透析继续进行共 3 天。

在 Sepharose 4-B 柱 (1×60 cm) 上，用 NET 缓冲液以 1ml/h 的流速进行凝胶过滤，纯化透析并浓缩的重装配溶液。级分用 Ouchterlony 试验检测，干燥含衣壳的级分，重悬浮于水中，并在 20 mM Hepes pH 7.6 平衡的 4-B 柱上重新层析。使用下列三个公式：

1.  $(183 \times OD^{230 \text{ nm}} - 75.8 \times OD^{260 \text{ nm}}) \times \text{体积}(\text{ml})$  - 2.  $((OD^{235 \text{ nm}} - OD^{280 \text{ nm}}) / 2.51) \times \text{体积}$  - 3.  $((OD^{228.5 \text{ nm}} - OD^{234.5 \text{ nm}}) \times 0.37) \times \text{体积}$

检测到 6-26 mg 重装配的 VLP 的蛋白质含量。

重装配的 AP205 VLP 通过如上所述的 EM、琼脂糖凝胶电泳和在非还原条件下 SDS-PAGE 分析。

解装配材料的 EM 分析显示，用盐酸胍处理 AP205 VLP 从根本上破坏了 VLP 的衣壳装配。该解装配材料与寡核苷酸的重装配产生衣壳（图 44B），其通过凝胶过滤纯化并进一步富集（图 44C）。获得两种大小的颗粒；在图 44C 的电子显微照片上可见直径约 25 nm 的颗粒和更小的颗粒。没有寡核苷酸时无法获得重装配。将重装配的颗粒加样到琼脂糖电泳上显示，重装配的颗粒含有核酸。通过酚抽提提取核酸内容物，随后加样到琼脂糖凝胶上电泳，用溴化乙锭染色，显示颗粒含有用于重装配的寡核苷酸（图 45A）。通过将该寡核苷酸样品与从颗粒中提取的核酸材料从左到右加样，确定包装的寡核苷酸的特性。已经加样了重装配的 AP205 VLP 并且已用溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶再用考马斯蓝染色，显示颗粒的寡核苷酸内容物与蛋白质内容物共迁移（图 45B），表明寡核苷酸已经被包装到颗粒中。

向 SDS-PAGE 凝胶上加样重装配的 AP205 VLP，在不含还原剂的条件下电泳（图 46），证实重装配的颗粒已经形成二硫桥接，如同未处理的 AP205 VLP 一样。而且，二硫键模式也与未处理的颗粒相同。

图 44 所示是解装配的 AP205 VLP 蛋白的电子显微照片，而图 44B 显示纯化前的重装配的颗粒。图 3C 显示纯化的重装配 AP205 VLP 的电子显微照片。图 3A-C 的放大倍数是 200 000 倍。

图 45A 和 B 显示通过琼脂糖凝胶电泳分析重装配的 AP205 VLP。两张图上加样到凝胶上的样品从左至右是：未处理的 AP205 VLP，含有不同含量的与 CyCpG 重装配并纯化的 AP205 VLP 的 3 个样品，未处理的 QB VLP。图 45A 的凝胶用溴化乙锭染色，而在图 45B 上同一凝胶用考马斯蓝染色。

图 46 显示在非还原条件下加样的重装配 AP205 VLP 的 SDS-PAGE 分析。5 个样品被加样到凝胶上。加样到凝胶上的样品从左到右是：蛋白质分子量标准，未处理的野生型 Q $\beta$ ，重装配的野生型 Q $\beta$ ，未处理的 AP205 VLP，重装配的 AP205 VLP。AP205 VLP 亚单位的分子量是 14.0 kDa，而 Q $\beta$  亚单位的分子量为 14.3 kDa（这两个分子量都是根据 N 端甲硫氨酸计算出来的）。二硫键连接的多聚体在图中均以箭头标出。

C. p33 表位（序列：H2N-KAVYNFATMGGC-COOH，不含 N 端和 C 端）与含 CyCpG 的重装配 AP205 VLP 的偶联

如部分 B 所述获得的重装配 AP205 VLP，在 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4 中，以 1.4 mg/ml 的浓度与 5 倍过量的交联剂 SMPH（由 50 mM DMSO 贮存液稀释而成）在 15°C 下反应 30 分钟。获得的所谓衍化的 AP205 VLP 用至少 1000 倍体积的 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4 缓冲液透析 2 次各 2 小时。衍化的 AP205 以 1 mg/ml 的浓度与 2.5 倍或 5 倍过量的肽（由 20 mM DMSO 贮存液稀释而成）在 15°C 下反应 2 小时。样品随后在液氮中骤冻以贮存。

偶联反应的结果如图 6 所示。在偶联反应中通过使用 5 倍过量的肽而不是 2.5 倍过量的肽能够达到更高层次的偶联。

图 47 所示为偶联反应的 SDS-PAGE 分析。将下列样品（从左到右）加样到凝胶上：蛋白质分子量标准；衍化的 AP205 VLP (d)；与 2.5 倍过量的肽偶联的 AP205 VLP, 上清液 (s)；与 2.5 倍过量的肽偶联的 AP205 VLP, 沉淀物 (p)；与 5 倍过量的肽偶联的 AP205 VLP, 上清液 (s)；与 5 倍过量的肽偶联的 AP205 VLP, 沉淀物 (p)。

#### 25 实施例 18

游离的免疫刺激性核酸而不是包装于 VLP 内的免疫刺激性核酸诱导脾肿大

小鼠不予处理，或皮下免疫单独的 100  $\mu$ g HBc33、20 nmol CyCpGpt、与 20 nmol CyCpGpt 混合的 100  $\mu$ g HBc33 或包装有

CyCpGpt 的 100  $\mu\text{g}$  HBc33。12 天后，分离脾脏，测量脾脏重量和脾的细胞构成。当单独给予 CyCpGpt 时，诱发脾脏重量和细胞数极大增加（图 48）。给予包装于 HBc33 中的 CyCpGpt 时没有观察到这一作用，但是该组合物能够诱导对抗病毒攻击的保护（参见实施例 4）。

5

### 实施例 19

#### 体内病毒保护试验

#### 牛痘保护试验

几组（每组 3 只）雌性 C57Bl/6 小鼠皮下免疫单独的 100  $\mu\text{g}$  与 p33 偶联或融合的 VLP、与 20 nmol 免疫刺激性核酸混合的或包装有免疫刺激性核酸的 100  $\mu\text{g}$  与 p33 偶联或融合的 VLP。为了评价周围组织中的抗病毒免疫，小鼠在 7-9 天后腹膜内感染  $1.5 \times 10^6$  pfu 表达 LCMV-糖蛋白的重组牛痘病毒（包含 p33 肽）。5 天后取出卵巢，测定病毒滴度。用匀浆器在含有 5% 胎牛血清并补充谷氨酰胺、Earls's 盐和抗生素（青霉素/链霉素/两性霉素）的最低必需培养基（Gibco）中研磨卵巢。悬液以 10 倍稀释滴定到 BSC40 细胞上。37°C 孵育过夜后，粘附细胞层用含有 50% 乙醇、2% 结晶紫和 150 mM NaCl 的溶液染色来显示病毒噬斑。未免疫的原初小鼠作为对照。

#### LCMV 保护试验

几组（每组 3 只）雌性 C57Bl/6 小鼠皮下免疫单独的或与佐剂/20 nmol CpG 寡核苷酸混合的 100  $\mu\text{g}$  与 p33 偶联或融合的 VLP。为了检测全身抗病毒免疫，小鼠在 11-13 天后腹膜内感染 200 pfu LCMV-WE。4 天后分离脾脏，测定病毒滴度。用匀浆器在含有 2% 胎牛血清并补充谷氨酰胺、Earls's 盐和抗生素（青霉素/链霉素/两性霉素）的最低必需培养基（Gibco）中研磨脾脏。悬液以 10 倍稀释滴定到 MC57 细胞上。孵育 1 小时后，细胞上覆盖含 5% 胎牛血清、1% 甲基纤维素和抗生素（青霉素/链霉素/两性霉素）的 DMEM。37°C 孵育 2 天后，通过细胞内染色法（染色病毒核蛋白）评价细胞的 LCMV 感染：细胞

用 4% 甲醛固定 30 分钟, 随后用 1% Triton X-100 裂解 20 分钟。与 10% 胎牛血清孵育 1 小时阻断非特异性结合。细胞用大鼠抗-LCMV-抗体 (VL-4) 染色 1 小时。过氧化物酶偶联的山羊抗大鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) 作为二抗, 随后按照标准程序用 ODP 底物进行显色反应。

### 实施例 20

包装于与抗原融合的 VLP 内的不同免疫刺激性核酸导致强抗原特异性 CTL 应答和病毒保护

10 HBcAg 与肽 p33 的融合蛋白 (HBc33) 如实施例 1 所述生产, 如实施例 11 所述包装不同的 CpG 核酸。

向小鼠注射 100  $\mu$ g 疫苗, 在重组牛痘攻击后如实施例 19 所述检测卵巢中的牛痘滴度。双链 CyCpGpt (dsCyCpGpt) 如下生产: 通过 80°C 10 分钟的加热步骤, 使 0.5 mM DNA 寡核苷酸 CyCpGpt 与 15 CyCpG-rev-pt (表 I) 在 15 mM Tris pH7.5 中退火, 随后冷却至室温。在 20% TBE 聚丙烯酰胺凝胶 (Novex) 上检查寡核苷酸的杂交。

含有 CyCpG、NKCpG、B-CpG 和 g10gacga-PS 的 HBc33 衣壳确实诱发了能够完全抑制病毒感染的 CTL 应答 (图 49, 图 50)。用含有磷酸二酯键或硫代磷酸酯键的核酸 (pt 或 PS) 可以观察到保护。 20 甚至双链寡核苷酸 dsCyCpGpt 也能诱导对抗牛痘攻击的保护 (图 49)。

### 实施例 21

包装于 HBcAg 和 Q $\beta$  VLP 中的免疫刺激性核酸导致强抗原特异性 CTL 应答和病毒保护

25 HBcAg 与肽 p33 的融合蛋白 (HBc33) 如实施例 1 所述生产, 如实施例 11 所述包装不同的 CpG 核酸。肽 p33 与 RNA 噬菌体 Q $\beta$  偶联, 寡核苷酸 B-CpGpt 如实施例 13 所述被包装。向小鼠注射 100  $\mu$ g、30  $\mu$ g、10  $\mu$ g 或 3  $\mu$ g 每种疫苗, 如实施例 19 所述检测重组牛痘攻击后卵巢中的牛痘滴度。100  $\mu$ g 和 30  $\mu$ g HBc33 和含包装的 B-CpG 的



Qbx33 确实诱导了对抗病毒攻击的完全保护，而在较低浓度下观察到部分保护或没有保护（图 51）。

#### 实施例 22

5 包装于与自身抗原偶联的 VLP 内的免疫刺激性核酸能够克服对自身抗原的耐受

用 200 pfu LCMV 免疫在胰β岛细胞中表达 LCMV 糖蛋白的转基因小鼠（Ohasi 等人, Cell 65, 305-317 (1991)），与 20 nmol CyCpGpt 混合的 100 μg HBc33、包装有 CyCpGpt 的 100 μg HBc33 或与 20 nmol  
10 CyCpGpt 混合的 100 μg p33 肽作为对照。每 4 天用 Glucotrend Plus 葡萄糖检测试剂盒（Roche）测定血糖水平。血糖水平高于 12 mM 的小鼠被认为患有糖尿病。LCMV 免疫在第 12 天在 4/4 动物中均诱发糖尿病。与 HBc33 混合的 CyCpGpt 只导致 1/3 的小鼠患糖尿病。用包装有 CyCpGpt 的 HBc33 免疫的 3 只小鼠中有 2 只在第 12 天发展为  
15 糖尿病，第 3 只小鼠在第 16 天发展为糖尿病。用与 CyCpGpt 混合的肽 p33 免疫在 3 只小鼠中均未诱发糖尿病。这清楚地表明，包装到与抗原融合的 VLP 内的免疫刺激性核酸在增强 CTL 应答方面比核酸与抗原的混合物更加有效。它们甚至能诱发比与 VLP 融合并与免疫刺激性核酸混合的抗原更强的应答。

20

#### 实施例 23

包装于与抗原偶联的 VLP 内的免疫刺激性核酸在诱导抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞方面比与免疫刺激性核酸混合的 VLP 更加有效

C57BL/6 小鼠皮下免疫单独的、与 CyCpGpt 混合的、或包装有  
25 CyCpGpt 的 100 μg HBc33。未处理的小鼠作为对照。

免疫 8 天后，血液淋巴细胞用 PE 标记的 p33 四聚体和 FITC 偶联的单克隆抗-CD8 抗体双染色，检测 p33 特异的 CD8<sup>+</sup> T 细胞，p33 特异性细胞占总 CD8<sup>+</sup> T 细胞群体的百分数通过 FACS 分析测定。

表 II. 接种与 CpG 混合或包装有 CpG 的 p33-VLP 后，p33 特异

性 CD8<sup>+</sup> T 细胞的诱导。数字对应于频率平均值（百分数）和标准差。

含包装的 CyCpGpt 的 HBc33 比与 CyCpGpt 混合的 HBc33 诱导了更高频率的 p33 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞（表 II）。由于包装的寡核苷酸的量大大低于（约 1/20）混合组使用的寡核苷酸量，这清楚地证明，含有包装的免疫刺激性核酸的 VLP 在诱导大量抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞方面更加有效。

#### 实施例 24

包装于 VLP 内的免疫刺激性核酸在诱发 CTL 应答方面比与免疫刺激性核酸混合的 VLP 更加有效

几组 C57BL/6 小鼠皮下用单独的、与 20 nmol CyCpGpt 混合的或包装有 CyCpGpt 的 100 μg p33-VLP 致敏。为了检测最初的离体细胞毒性，在致敏 9 天后用接种小鼠的脾脏制备效应细胞悬液。p33 肽脉冲作用于 EL-4 细胞（ $10^{-6}$  M，在 2% FCS MEM 培养基中 37°C 2h），用于 5 h <sup>51</sup>Cr 释放试验。

免疫	p33 特异性 CD8 <sup>+</sup> T 细胞的频率	每组小鼠数
未处理的	0.2	2
HBc33	0.3±0.1	4
HBc33+CyCpGpt（混合的）	2.1±0.9	5
HBc33/CyCpGpt（包装的）	4.3±1.1	5

图 52 显示皮下用单独的 100 μg p33-VLP（A）、与 20 nmol CyCpGpt 混合的（B）或包装有 CyCpGpt 的（C）100 μg p33-VLP 致敏的 C57BL/6 小鼠组的最初离体细胞毒性。9 天后，以指定的效:靶细胞比，对 p33 脉冲处理的（实心符号）或未脉冲处理的（空心符号）EL-4 靶细胞进行 5-h <sup>51</sup>Cr 释放试验，检测脾细胞的直接离体 CTL 活性。细胞培养上清液的放射性用 Cobra II 计数器（Canberra Packard,

Downers Grove, IL) 测定。自发释放始终<10%。每只小鼠的效应细胞进行两个系列的稀释。在(A)中, 每组使用 2 只小鼠, 而(B)和(C)显示每组 4 只小鼠的数据。

图 52 清楚地证明, 单独的 100  $\mu\text{g}$  HBc33 不会诱发最初的体内 CTL 应答, 而与 20 nmol CyCpGpt 混合的相同量的 HBc33 诱发明显的细胞毒性。然而, 尽管包装的寡核苷酸的量大大低于(约 1/20)混合组使用的寡核苷酸的量, 但是当使用含包装 CyCpGpt 的 100  $\mu\text{g}$  HBc33 进行免疫时, 细胞毒性增强(图 52)。

## 10 实施例 25

### VLP 的 RNA 内容物的非酶促水解和免疫刺激性核酸的包装

#### VLP 核酸内容物依赖于 $\text{ZnSO}_4$ 的降解

溶于 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl 中的 5 mg Q $\beta$  VLP(通过 Bradford 分析测定)在 SnakeSkin<sup>TM</sup> 折叠透析管(Pierce, 货号 68035)中在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 2000 ml 50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5%甘油, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  或 2000 ml 4 mM HEPES, pH7.4, 30 mM NaCl 透析 2 小时。每种透析缓冲液均更换一次, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下再继续透析 16 小时。透析的溶液以 14 000 rpm 澄清 10 分钟(Eppendorf 5417 R, 固定角度转子 F45-30-11, 在下列所有步骤中使用), 再次通过 Bradford 分析测定蛋白质浓度。溶于 50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5%甘油, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  中的 Q $\beta$  VLP 用相应缓冲液稀释至蛋白质终浓度为 1 mg/ml, 而溶于 4 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl 中的 Q $\beta$  VLP 用相应缓冲液稀释至蛋白质终浓度为 0.5 mg/ml。这种含衣壳的溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 14 000 rpm 再次离心 10 分钟。上清液与  $\text{ZnSO}_4$ (添加至 2.5 mM 终浓度)在 Eppendorf 恒温混匀器装置中以 550 rpm 60 $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 小时。24 小时后溶液以 14000 rpm 澄清 10 分钟, 弃去沉淀。 $\text{ZnSO}_4$  依赖性核酸降解效率通过琼脂糖凝胶电泳证实(图 53)。上清液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 5000 ml 4 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl 透析 2 小时。更换一

次 5000 ml 缓冲液，在 4℃ 下继续透析过夜。透析的溶液在 4℃ 下以 14 000 rpm 澄清 10 分钟，弃去微小的沉淀物，上清液的蛋白质浓度通过 Bradford 分析测定。

5 将寡脱氧核苷酸包装于 ZnSO<sub>4</sub> 处理的 VLP 内：  
技术人员了解 RNA 水解的备选非酶促方法。

将寡脱氧核苷酸包装于 ZnSO<sub>4</sub> 处理的 VLP 内：

寡脱氧核苷酸的包装使用 ZnSO<sub>4</sub> 处理且透析的 Qβ 衣壳，其蛋白质浓度（通过 Bradford 分析测定）为 0.4 mg/ml-0.9 mg/ml（分别对应于 159 nM 和 357.5 nM 的衣壳浓度）。添加与 Qβ VLP 衣壳相比 300 倍摩尔过量的寡脱氧核苷酸，在 Eppendorf 恒温混匀器中以 550 rpm 37℃ 孵育 3 小时。3 小时后反应液在 4℃ 下以 14 000 rpm 离心 10 分钟。上清液在 MWCO 300 000 的 Spectra/Por<sup>®</sup> CE DispoDialyzer (Spectrum, 货号 135 526) 中在 4℃ 下用 5000 ml 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl 透析 8 小时。更换一次 5000 ml 缓冲液，在 4℃ 下继续透析过夜。透析的样品的蛋白质浓度通过 Bradford 分析测定。如实施例 11 和 13 所述分析 Qβ 衣壳及其核酸内容物。

图 53 显示通过琼脂糖凝胶电泳分析 ZnSO<sub>4</sub> 处理的 Qβ VLP: 从大肠杆菌中纯化并用缓冲液 1 (50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% 甘油, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) 或缓冲液 2 (4 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl) 透析的 Qβ VLP 在存在或不存在 2.5 mM 硫酸锌 (ZnSO<sub>4</sub>) 的条件下 60℃ 孵育 24 小时。该处理后，等量指定样品 (5 μg 蛋白质) 与加样染料混合，加样到 0.8% 琼脂糖凝胶上。电泳后，凝胶用溴化乙锭染色。注意，用 ZnSO<sub>4</sub> 处理 VLP 导致核酸内容物的降解，而假处理的对照不受影响。

图 54 显示将寡脱氧核苷酸包装于 ZnSO<sub>4</sub> 处理的 VLP 内，以及通过琼脂糖凝胶电泳对它们的分析。2.5 mM 硫酸锌 (+ZnSO<sub>4</sub>) 处理的 Qβ VLP 用 4 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl 透析，与过量的寡脱氧核苷酸 37℃ 孵育 3 小时（由于透析，ZnSO<sub>4</sub> 的浓度降低 10<sup>6</sup> 数量级，

因此只在括号中标明)。在寡脱氧核苷酸存在下孵育后，等量的指定样品（5 μg 蛋白质）与加样染料混合，加样到 0.8%琼脂糖凝胶上。电泳后，凝胶用溴化乙锭染色。注意，与未处理的从大肠杆菌纯化的 Qβ 衣壳相比，向 ZnSO<sub>4</sub>处理的 Qβ VLP 中添加寡脱氧核苷酸恢复了这样处理的衣壳的电泳行为。

图 55 显示通过 Benzonase 和蛋白酶 K 消化和聚丙烯酰胺 TBE/尿素凝胶电泳分析 ZnSO<sub>4</sub>和寡脱氧核苷酸处理的 Qβ VLP 的核酸内容物：如上所述，将寡脱氧核苷酸包装于 ZnSO<sub>4</sub>处理的 Qβ VLP 内。按照使用说明用 25 μl Benzonase (Merck, 货号 1.01694.0001)消化 25 μg 该 VLP。在热灭活核酸酶后（80℃ 30 分钟），按照使用说明用蛋白酶 K（酶的终浓度为 0.5 mg/ml）处理 VLP。3 小时后，Benzonase 和蛋白酶 K 消化的等量 2 μg Qβ VLP 与 TBE-尿素样品缓冲液混合，加样到 15%聚丙烯酰胺 TBE-尿素凝胶（Novex<sup>®</sup>, Invitrogen, 货号 EC6885）上。加于第 2 道的衣壳在缓冲液 1（见上文）存在下用 2.5 mM ZnSO<sub>4</sub>处理，而加于第 3 道的衣壳在缓冲液 2（见上文）存在下用 2.5 mM ZnSO<sub>4</sub>处理。用于重装配反应的 1 pmol、5 pmol 和 10 pmol 寡脱氧核苷酸加样到同一凝胶上（4-6 道）作为定性及定量标准。作为对照，从大肠杆菌纯化的 Qβ 衣壳被完全相同处理，并用同一聚丙烯酰胺 TBE-尿素凝胶分析（1 道）。完成电泳后，固定凝胶，平衡至中性 pH，用 SYBR-Gold (Molecular Probes, 货号 S-11494) 染色。注意，完整的 Qβ VLP（从大肠杆菌中纯化）不含与从 ZnSO<sub>4</sub>和寡脱氧核苷酸处理的 Qβ 衣壳中提取的大小相似的核酸。另外，从后一种 VLP 分离的核酸与重装配反应中使用的寡脱氧核苷酸共迁移。该结果证实，所用的寡脱氧核苷酸被包装于 ZnSO<sub>4</sub>处理的 Qβ 衣壳内。

25

### 实施例 26

含有免疫刺激性核酸的 VLP 诱发 T 细胞应答，这种应答能被病毒载体 LCMV 加强

小鼠皮下用 20 μg 含有免疫刺激性核酸的 p33-VLP 致敏。免疫前，

通过透析从未结合的 CpG-寡脱氧核苷酸中充分纯化 p33-VLP 制品（参见实施例 2 和图 5）。12 天后采集血液，通过四聚体染色测定 p33 特异性 T 细胞的频率。小鼠用 200 pfu 活 LCMV 株 WE 加强，5 天后测定特异性 T 细胞的频率。加强前的频率为 3.5% +/- 1.8%，加强后为 15.5% +/- 1.9%。

#### 实施例 27

含有免疫刺激性核酸的 VLP 诱发 T 细胞应答，这种应答能被病毒载体：重组痘苗病毒加强

小鼠皮下用 20  $\mu$ g 含有免疫刺激性核酸的 p33-VLP 致敏。免疫前，通过透析从未结合的 CpG-寡脱氧核苷酸中充分纯化 p33-VLP 制品（参见实施例 2 和图 5）。12 天后采集血液，通过四聚体染色测定 p33 特异性 T 细胞的频率。小鼠用  $10^6$  pfu 表达 LCMV-GP 的重组痘苗病毒加强，5 天后测定特异性 T 细胞的频率。

15

#### 实施例 28

含有免疫刺激性核酸的 VLP 诱发 T 细胞应答，这种应答能被病毒载体：重组金丝雀痘病毒加强

小鼠皮下用 20  $\mu$ g 含有免疫刺激性核酸的 p33-VLP 致敏。免疫前，通过透析从未结合的 CpG-寡脱氧核苷酸中充分纯化 p33-VLP 制品（参见实施例 2 和图 5）。12 天后采集血液，通过四聚体染色测定 p33 特异性 T 细胞的频率。小鼠用  $10^7$  pfu 表达 LCMV-GP 的重组金丝雀痘病毒加强，5 天后测定特异性 T 细胞的频率。

25

#### 实施例 29

含有免疫刺激性核酸的 VLP 能够加强 T 细胞应答

小鼠静脉内感染表达 LCMV-GP 的重组痘苗病毒。20 天后采集血液，通过四聚体染色测定 p33 特异性 T 细胞的频率。在同一天用含有免疫刺激性核酸的 p33-VLP 制品加强小鼠（参见实施例 2 和图 5），

5 天后测定特异性 T 细胞的频率。

### 实施例 30

将免疫刺激核糖核酸包装于 VLP 内

5 免疫刺激性核酸如 poly (I:C) (Sigma) 或含有磷酸二酯键或硫代磷酸酯骨架的合成双链 30 mer 聚肌苷酸和聚胞苷酸溶于水中。此外，也用聚脱氧肌苷酸和聚脱氧肌苷酸制备双链 poly(I:C)类似物。如实施例 11、13 或 25 所述，用 RNase 处理 HBc33 VLP 和 Q $\beta$  VLP，以 0.2 $\times$ HBS 中 1、10、100 nmol/ml 的浓度添加核酸，在恒温混匀器中 37 $^{\circ}$ C 孵育 3  
10 小时。通过酶促水解或透析除去过量的核酸，并如实施例 11、13、25 所述对核酸进行分析。

此外，如实施例 14、15、16 所述，在 Q $\beta$  外壳蛋白重装配过程中包装免疫刺激性核糖核酸及其类似物。重装配如下进行：向 10 ml 二聚体级分中添加  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度为 10%，添加 300  $\mu$ l 核酸溶液，  
15 使其 1、10、100 摩尔过量于衣壳浓度。重装配混合物首先在 4 $^{\circ}$ C 下用 30 ml 含 10%  $\beta$ -巯基乙醇的 NET 缓冲液透析 2 小时，然后在 4 $^{\circ}$ C 下以连续模式，以 8 ml NET 缓冲液/h 的流速透析 4 天。然后用水透析使重装配的混合物脱盐，更换 6 次缓冲液 (4 $\times$ 100 ml, 2 $\times$ 1 l)。然后如  
20 实施例 14 所述通过蔗糖梯度离心，或者如实施例 16 所述通过凝胶过滤，分离重装配的 Q $\beta$  VLP。

- 
- <110> 赛托斯生物技术公司  
Bachmann, Martin F.  
Storni, Tazio  
Maurer, Patrick  
Tissot, Alain  
Schwarz, Katrin  
Meijerink, Edwin  
Lipowsky, Gerad  
Pumpens, Paul  
Cielens, Indulis  
Renhofa, Regina
- <120> 免疫刺激物向病毒样颗粒内的包装: 制备方法与用途
- <130> 1700.022PC02
- <140> 待定
- <141> Herewith
- <150> 60/374,145
- <151> 2002-04-22
- <150> 60/318,994
- <151> 2001-09-14
- <160> 73
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 10
- <211> 132
- <212> PRT



<213> 噬菌体 Q-beta

<400> 10

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 11

<211> 328

<212> PRT

<213> 噬菌体 Q-beta

<400> 11

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

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

Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly Ala  
 290 295 300

Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile Gln  
 305 310 315 320

Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala  
 325

<210> 12

<211> 129

<212> PRT

<213> 噬菌体 R17

<400> 12

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
 20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
 35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
 50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala  
 65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
 85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu  
 100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
 115 120 125

Tyr

<210> 13

<211> 130

<212> PRT

<213> 噬菌体 fr

<400> 13

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu  
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe  
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr  
100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
115 120 125

Ile Tyr  
130

<210> 14

<211> 130

<212> PRT

<213> 噬菌体 GA

<400> 14

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr  
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser  
65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe  
100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe  
115 120 125

Tyr Ala  
130

<210> 15

<211> 132

<212> PRT

<213> 噬菌体 SP

<400> 15

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys  
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe  
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 16

<211> 329

<212> PRT

<213> 噬菌体 SP

<400> 16

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val  
50 55 60

Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp  
65 70 75 80

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr  
85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala  
100 105 110

Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn  
115 120 125

Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp

---

130	135	140
Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro 145 150 155 160		
Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly 165 170 175		
Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg 180 185 190		
Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu 195 200 205		
Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp 210 215 220		
Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp 225 230 235 240		
Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly 245 250 255		
Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu 260 265 270		
Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala 275 280 285		
Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser 290 295 300		
Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro 305 310 315 320		
Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser 325		
<210> 17		
<211> 130		
<212> PRT		
<213> 噬菌体 MS2		
<400> 17		

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu  
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe  
85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu  
100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
115 120 125

Ile Tyr  
130

<210> 18

<211> 133

<212> PRT

<213> 噬菌体 M11

<400> 18

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60



Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr  
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser  
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu  
100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn  
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 19

<211> 133

<212> PRT

<213> 噬菌体 MXI

<400> 19

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly  
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr  
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu  
100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn



Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys  
180 185 190

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
195 200 205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp  
210 215 220

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp  
225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp  
245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr  
260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala  
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro  
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu  
325 330

<210> 21

<211> 129

<212> PRT

<213> 噬菌体 f2

<400> 21

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala  
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu  
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
115 120 125

Tyr

<210> 22

<211> 128

<212> PRT

<213> 噬菌体 PP7

<400> 22

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu  
1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val  
20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn  
35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp  
50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg  
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr  
85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala

---

100 105 110  
 Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg  
 115 120 125  
 <210> 23  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> 噬菌体 Q-beta  
  
 <400> 23  
 Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30  
 Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45  
 Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60  
 Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95  
 Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110  
 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125  
 Asn Pro Ala Tyr  
 130  
 <210> 24  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> 噬菌体 Q-beta

&lt;400&gt; 24

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 噬菌体 Q-beta

&lt;400&gt; 25

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 26

<211> 132

<212> PRT

<213> 噬菌体 Q-beta

<400> 26

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu

100 105 110  
 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125  
 Asn Pro Ala Tyr  
 130  
 <210> 27  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> 噬菌体 Q-beta  
 <400> 27  
 Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30  
 Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45  
 Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60  
 Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95  
 Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110  
 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125  
 Asn Pro Ala Tyr  
 130  
 <210> 28  
 <211> 184



<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
180

<210> 29

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 29

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 Gly Ser Gln Cys  
180

<210> 30

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 30

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

Glu Thr Cys Val Ile 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 Gly Ser Gln Cys  
180

<210> 31

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 31

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30  
 Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu  
 35 40 45  
 Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60  
 Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
 65 70 75 80  
 His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 90 95  
 Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp  
 100 105 110  
 Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125  
 Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val  
 130 135 140  
 Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175  
 Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190  
 Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205  
 Glu Ser Gln Cys  
 210  
 <210> 32  
 <211> 212  
 <212> PRT

## &lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 32

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Asn Ala Ser  
50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 33

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 33

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

Ser Phe Leu Pro Thr 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 Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
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 Cys 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  
180

<210> 34

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 34

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 35

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 35

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Asp Met Asp Ile  
20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190



Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
 210

<210> 36

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 36

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

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

				165						170									175
Val	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro				
			180					185					190						
Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg				
		195					200					205							
Glu	Ser	Gln	Cys																
	210																		
<210>	37																		
<211>	212																		
<212>	PRT																		
<213>	乙型肝炎病毒																		
<400>	37																		
Met	Gln	Leu	Phe	His	Leu	Cys	Leu	Ile	Ile	Ser	Cys	Ser	Cys	Pro	Thr				
1				5					10					15					
Val	Gln	Ala	Ser	Lys	Leu	Cys	Leu	Gly	Trp	Leu	Trp	Gly	Met	Asp	Ile				
			20					25					30						
Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu				
		35					40					45							
Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Thr	Ala	Ser				
	50					55					60								
Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys	Ser	Pro	His				
65					70					75					80				
His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu	Leu	Met	Thr				
				85					90					95					
Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Asp				
			100					105					110						
Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Phe	Arg	Gln				
		115					120					125							
Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val				
	130					135					140								

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Lys Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Gly Ser Gln Cys  
210

<210> 38

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 38

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 Phe Arg Asp 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 Ala  
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

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

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

Glu Thr Cys 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  
180

<210> 39

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 39

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 Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
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
180

<210> 40
<211> 212
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 40

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
1              5              10              15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
20              25              30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
50              55              60

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

His Thr Ala Leu Arg His Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Arg Thr
85              90              95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp
100             105             110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln
115             120             125

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

```

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 41

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 41

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Asp Met Asp Ile  
20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
50 55 60

Ala Leu Phe Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Ala Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Gln Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Cys  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 42

<211> 183

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成人乙型肝炎病毒核心蛋白基因

<400> 42

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 Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
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 Leu 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  
 180  
 <210> 43  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> 乙型肝炎病毒  
 <400> 43  
 Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10  
 Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30  
 Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu  
 35 40 45  
 Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60  
 Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
 65 70 75 80  
 His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Ser  
 85 90 95



Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ile Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 44

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 44

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 Asp 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 Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
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  
180

<210> 45

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 45

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 Asp  
50 55 60

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

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys



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 Thr 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  
 180

<210> 47

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 47

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
 65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 - 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
 210

<210> 48

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 48

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Thr

					85					90					95
Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Asp
			100					105					110		
Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Phe	Arg	Gln
		115					120					125			
Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val
	130					135					140				
Ile	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala
145					150					155					160
Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Thr
				165					170					175	
Val	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro
			180					185					190		
Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg
		195					200						205		
Glu	Ser	Gln	Cys												
	210														
<210>	49														
<211>	212														
<212>	PRT														
<213>	乙型肝炎病毒														
<400>	49														
Met	Gln	Leu	Phe	His	Leu	Cys	Leu	Ile	Ile	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro	Thr
1				5					10					15	
Val	Gln	Ala	Ser	Lys	Leu	Cys	Leu	Gly	Trp	Leu	Trp	Gly	Met	Asp	Ile
			20					25					30		
Asp	Pro	Tyr	Lys	Gln	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu
		35					40						45		
Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Thr	Ala	Ser
	50					55						60			

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ala Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 50

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 50

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
20 25 30

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

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

<210> 51

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa 可以是任何氨基酸



&lt;400&gt; 51

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Xaa Asp Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Ile Thr  
 85 90 95

Leu Ser Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Thr Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Thr Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
 210

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 52

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Asn Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 53

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 53

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

Leu Leu Trp Phe His Ile Cys Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val  
130 135 140

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
 210

<210> 54

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 54

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

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

				165					170					175				
Val	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro			
			180					185					190					
Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg			
			195				200					205						
Glu	Pro	Gln	Cys															
	210																	
<210>	55																	
<211>	212																	
<212>	PRT																	
<213>	乙型肝炎病毒																	
<400>	55																	
Met	Gln	Leu	Phe	His	Leu	Cys	Leu	Ile	Ile	Ser	Cys	Ser	Cys	Pro	Thr			
1				5					10					15				
Val	Gln	Ala	Ser	Lys	Leu	Cys	Leu	Gly	Trp	Leu	Trp	Gly	Met	Asp	Ile			
			20					25					30					
Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu			
		35					40					45						
Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser			
	50					55						60						
Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys	Ser	Pro	His			
65					70					75					80			
His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu	Leu	Met	Thr			
				85					90					95				
Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Asp			
			100					105					110					
Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Phe	Arg	Gln			
		115					120					125						
Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val			
	130					135					140							

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 56

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 56

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Leu Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 57

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 57

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp

100 105 110  
 Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Lys Gln  
 115 120 125  
 Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val  
 130 135 140  
 Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175  
 Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190  
 Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205  
 Glu Ser Gln Cys  
 210  
 <210> 58  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> 乙型肝炎病毒  
 <400> 58  
 Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30  
 Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu  
 35 40 45  
 Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
 65 70 75 80



His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 59

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 59

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

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Tyr 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

Thr 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 Gln Asp Pro Thr  
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 Val Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg  
100 105 110

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

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

Glu Thr Cys 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 Ser  
165 170 175

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
180

<210> 60

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 60

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 His Val Phe Leu Cys Trp Gly Asp  
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Thr





Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 63

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 63

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



Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser  
195 200 205

Arg Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 65

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 65

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 Asp 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 Asp  
 50 55 60  
 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
 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 Thr 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  
 180

<210> 66

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 66

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30  
 Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu





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

<210> 68

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 68

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Arg Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Thr Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
 210

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 69

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Val Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ala  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln  
 115 120 125

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

Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
 195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
 210

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 70

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
 20 25 30

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

Pro Ser Ala Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser  
 50 55 60

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

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Thr  
 85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
 115 120 125

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

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
 180 185 190

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

195	200	205
Glu Ser Gln Cys		
210		
<210> 71		
<211> 183		
<212> PRT		
<213> 乙型肝炎病毒		
<400> 71		
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 Ala 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 Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala	
65	70	75 80
Ser	Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys	
	85	90 95
Ile	Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg	
	100	105 110
Glu	Thr Val Leu 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  
180

<210> 72

<211> 183

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 72

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 Cys 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 Gly Ser Gln Cys  
180

<210> 73

<211> 188

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 73

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
35 40 45

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

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln  
65 70 75 80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys  
85 90 95

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

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

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

Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser  
145 150 155 160

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

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Thr Asn Cys  
180 185

\  
<210> 74



&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 74

Met Tyr Leu Phe His Leu Cys Leu Val Phe Ala Cys Val Pro Cys Pro  
 1 5 10 15

Thr Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Asp Met Asp  
 20 25 30

Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu Asn Phe  
 35 40 45

Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp Thr Ala  
 50 55 60

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

His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Glu Glu Leu Thr  
 85 90 95

Arg Leu Ile Thr Trp Met Ser Glu Asn Thr Thr Glu Glu Val Arg Arg  
 100 105 110

Ile Ile Val Asp His Val Asn Asn Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln  
 115 120 125

Thr Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val  
 130 135 140

Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro  
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr  
 165 170 175

Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ala Arg Ser Pro Arg Arg  
 180 185 190

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg  
 195 200 205

Arg Ser Gln Ser Pro Ala Ser Asn Cys  
210 215

<210> 75

<211> 262

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 75

Met Asp Val Asn Ala Ser Arg Ala Leu Ala Asn Val Tyr Asp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Asp Phe Phe Pro Lys Ile Glu Asp Leu Val Arg Asp Ala Lys Asp  
20 25 30

Ala Leu Glu Pro Tyr Trp Lys Ser Asp Ser Ile Lys Lys His Val Leu  
35 40 45

Ile Ala Thr His Phe Val Asp Leu Ile Glu Asp Phe Trp Gln Thr Thr  
50 55 60

Gln Gly Met His Glu Ile Ala Glu Ala Ile Arg Ala Val Ile Pro Pro  
65 70 75 80

Thr Thr Ala Pro Val Pro Ser Gly Tyr Leu Ile Gln His Asp Glu Ala  
85 90 95

Glu Glu Ile Pro Leu Gly Asp Leu Phe Lys Glu Gln Glu Glu Arg Ile  
100 105 110

Val Ser Phe Gln Pro Asp Tyr Pro Ile Thr Ala Arg Ile His Ala His  
115 120 125

Leu Lys Ala Tyr Ala Lys Ile Asn Glu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Arg  
130 135 140

Arg Leu Leu Trp Trp His Tyr Asn Cys Leu Leu Trp Gly Glu Ala Thr  
145 150 155 160

Val Thr Asn Tyr Ile Ser Arg Leu Arg Thr Trp Leu Ser Thr Pro Glu  
165 170 175

Lys Tyr Arg Gly Arg Asp Ala Pro Thr Ile Glu Ala Ile Thr Arg Pro  
180 185 190

Ile Gln Val Ala Gln Gly Gly Arg Lys Thr Ser Thr Ala Thr Arg Lys  
 195 200 205

Pro Arg Gly Leu Glu Pro Arg Arg Arg Lys Val Lys Thr Thr Val Val  
 210 215 220

Tyr Gly Arg Arg Arg Ser Lys Ser Arg Glu Arg Arg Ala Ser Ser Pro  
 225 230 235 240

Gln Arg Ala Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Ser Ser Ser His His Arg  
 245 250 255

Ser Pro Ser Pro Arg Lys  
 260

<210> 76

<211> 305

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 76

Met Trp Asp Leu Arg Leu His Pro Ser Pro Phe Gly Ala Ala Cys Gln  
 1 5 10 15

Gly Ile Phe Thr Ser Ser Leu Leu Leu Phe Leu Val Thr Val Pro Leu  
 20 25 30

Val Cys Thr Ile Val Tyr Asp Ser Cys Leu Cys Met Asp Ile Asn Ala  
 35 40 45

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

Lys Ile Asp Asp Leu Val Arg Asp Ala Lys Asp Ala Leu Glu Pro Tyr  
 65 70 75 80

Trp Arg Asn Asp Ser Ile Lys Lys His Val Leu Ile Ala Thr His Phe  
 85 90 95

Val Asp Leu Ile Glu Asp Phe Trp Gln Thr Thr Gln Gly Met His Glu  
 100 105 110

Ile Ala Glu Ala Leu Arg Ala Ile Ile Pro Ala Thr Thr Ala Pro Val

115					120					125					
Pro	Gln	Gly	Phe	Leu	Val	Gln	His	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Ile	Pro	Leu
	130					135					140				
Gly	Glu	Leu	Phe	Arg	Tyr	Gln	Glu	Glu	Arg	Leu	Thr	Asn	Phe	Gln	Pro
145					150					155					160
Asp	Tyr	Pro	Val	Thr	Ala	Arg	Ile	His	Ala	His	Leu	Lys	Ala	Tyr	Ala
				165					170					175	
Lys	Ile	Asn	Glu	Glu	Ser	Leu	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Trp	Trp
			180					185					190		
His	Tyr	Asn	Cys	Leu	Leu	Trp	Gly	Glu	Pro	Asn	Val	Thr	Asn	Tyr	Ile
		195					200					205			
Ser	Arg	Leu	Arg	Thr	Trp	Leu	Ser	Thr	Pro	Glu	Lys	Tyr	Arg	Gly	Lys
	210					215					220				
Asp	Ala	Pro	Thr	Ile	Glu	Ala	Ile	Thr	Arg	Pro	Ile	Gln	Val	Ala	Gln
225					230					235					240
Gly	Gly	Arg	Asn	Lys	Thr	Gln	Gly	Val	Arg	Lys	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
				245					250					255	
Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Val	Lys	Thr	Thr	Ile	Val	Tyr	Gly	Arg	Arg	Arg
			260					265					270		
Ser	Lys	Ser	Arg	Glu	Arg	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Gln	Arg	Ala	Gly	Ser
		275					280					285			
Pro	Leu	Pro	Arg	Thr	Ser	Arg	Asp	His	His	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg
	290					295					300				

Glu  
305

<210> 77

<211> 185

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 77

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 Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
 65 70 75 80

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

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

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

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

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
 180 185

<210> 78

<211> 152

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 78

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 Ala Ala Leu Tyr Arg Asp 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 Asp  
50 55 60

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

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

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

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

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

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val  
145 150

<210> 79

<211> 3635

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒 pAP283-58

<400> 79  
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60  
gctcgcccgg ggatcctcta gaattttctg cgcacccatc ccgggtggcg cccaaagtga 120  
ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt 180  
gtggtcggat ccaactcggt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt 240  
taaagttggt atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg tttataagcg 300

---

tcoctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgcoctgtgtc attatgccga atgaaaacca	360
atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg	420
ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt	480
ccttgaccct actgcggtc taatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata	540
gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgatata taaggttatg tattaattgt agccgcgttc	600
taacgacaat atgtacaagc ctaatttgtt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc	660
atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttgga cgaaccttct gagtttctgg	720
taacgccgtt ccgcaccccg gaaatggtca ccgaaccaat cagcagggtc atcgcctagc	780
agatcctcta cgccggagc atcgtggccg gcatcaccgg cgcacacagt gcggttgctg	840
gcgcttatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga	900
gcgcttggtt cggcgtgggt atgggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca	960
tctccttgea tgcaccattc cttgcccggg cgggtgcttca acggcctcaa cctactactg	1020
ggctgcttcc taatgcagga gtgcataag ggagagcgtc gatatgggtc actctcagta	1080
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat	1140
ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc	1200
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc	1260
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta	1320
tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg	1380
ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg	1440
ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt	1500
attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgagg cattttgcct tctgttttt	1560
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg	1620
ggttacatcg aactggatct caacagcggc aagatccttg agagttttcg ccccgaaaga	1680
cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgatt	1740
gacgcggggc aagagcaact cggtcgccc atacactatt ctcaaatga cttggttgag	1800
tactcaccag tcacagaaaa tcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt	1860
gctgccataa ccatgagtga taactcgc gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga	1920
ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggata atgtaactcg ccttgatcgt	1980
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta	2040
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg	2100
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc	2160

```

cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt 2220
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg 2280
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 2340
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 2400
cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaa 2460
atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 2520
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 2580
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 2640
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 2700
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgcctc tgctaatoct gttaccagtg 2760
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2820
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2880
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgcgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 2940
gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3000
agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt togccacctc 3060
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3120
agcaacgcgg ccttttttacg gttcctggcc ttttgcggc cttttgctca catgttcttt 3180
cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 3240
gctcgcgcga gccgaacgac gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc 3300
caatacgcga accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcagc tgtgggtgca 3360
tggtcggtga togccagggt gccgaocgc atctcactg catggtgcac caatgcttct 3420
ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggccgtgca ggtcgtaaat cactgcataa 3480
ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatggt ttttgcgccg acatcataac 3540
ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag 3600
tacgcaagtt cacgtaaaaa gggtatcgcg gaatt 3635

```

<210> 80

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>



<223> AP205 外壳蛋白

<400> 80

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
115 120 125

Thr Thr Ala  
130

<210> 81

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AP205 外壳蛋白

<400> 81

Met Ala Asn Lys Thr Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
115 120 125

Thr Thr Ala  
130

<210> 82

<211> 3607

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒 pAP281-32

<400> 82  
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60  
gctcgcccgg ggatcctcta gattaacca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag 120  
acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaat aaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta 180  
tcaactacat tttcagcaag tctgttaacgc caacgtgtta aagttggtat agccgaactg 240  
aataatgttt caggtaata tgtatctgtt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc 300  
agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaa ccaatccatt cgcacagtga tttcagggtc 360  
agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac 420  
actcttcgcg agcggcaacg cgggttggg tttccttgac cctactgcbg ctatcgtatc 480  
gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaactgta tgtgtatgat 540

---

acataaggtt atgtattaat ggtagccgcg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg	600
tgtagcatct ggcttactga agcagacct atcatctctc tcgtaaactg cgcgcagagt	660
cggttgggtt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgccc ttccgcaccc cggaaatggt	720
caccgaacca ttcagcaggg tcatcgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc	780
ccgcatcacc ggcgccacag gtgcggtgct ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg	840
gaagatcggg ctccgcaact cgggctcatg atcgtctggt tccgcctggg tatggtggca	900
ggccccgtgg cccgggggac tgttggggcg catctccttg catgcacat tccttgccgc	960
ggcgggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa	1020
gggagagcgt cgatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc	1080
caactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg	1140
ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgcttc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg	1200
tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagggcgc	1260
ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat	1320
ggtttcttag acgtcagggt gcacttttctg gggaaatgtg cgcggacccc ctattggttt	1380
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct	1440
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc	1500
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa	1560
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg	1620
taagatcctt gagagtttcc gcccgaaga acgtttttca atgatgagca cttttaaagt	1680
tctgctatgt gtcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggctcggc	1740
catacactat tctcagaatg acttgggtgt acctaccagt cacagaaaag catcttacgg	1800
atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacctgcgg	1860
ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca	1920
tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggaaccggga gctgaatgaa gccataccaa	1980
acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtac gaacggcaac aacgttgcc aaactattaa	2040
ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata	2100
aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat	2160
ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc	2220
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata	2280
gacagatcgc tgagataggt gctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt	2340
actcatatat actttagatt gatttaaac ttcattttta atttaaaagg atctagggtga	2400

agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag	2460
cggtcagacc ccgtagaaaag atcaaaaggat ottcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa	2520
tcctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag	2580
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg	2640
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat	2700
acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta	2760
ccgggttggg ctcaagacga taggtaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg	2820
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc	2880
gcgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagaaaa ggcggacagg tatccggtaa	2940
gcggcagggg cggaacaaga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc	3000
tttatagtcc tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt	3060
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttccctggcct	3120
ttggctggcc ttttgcac atgttctttc ctgcgttate ccctgattct gtggataacc	3180
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gacggcgag	3240
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcg	3300
ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggg gatcgccagg gtgccgacgc	3360
gcactctgac tgcatggtgc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg	3420
tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt	3480
ctggataatg tttttgctg cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct	3540
ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg	3600
cggaatt	3607

**A****5' TCCATGACGTTCCCTGAATAAT 3'****B**

1 atggacattg acccttataa agaatttga gctactgtgg agttactctc gtttttgcct tctgacttct ttccttccgt cagagatctc ctagacaccg  
 M D I D P Y K E F G A T V E L L S F L P S D F F P S V R D L L D T

101 cctcagctct gtatcgagaa gccttagagt ctccctgagca ttgctcaact caccatactg cactcaggca agccattctc tgctgggggg aattgatgac  
 A S A L Y R E A L E S P E H C S P H H T A L R Q A I L C W G E L M

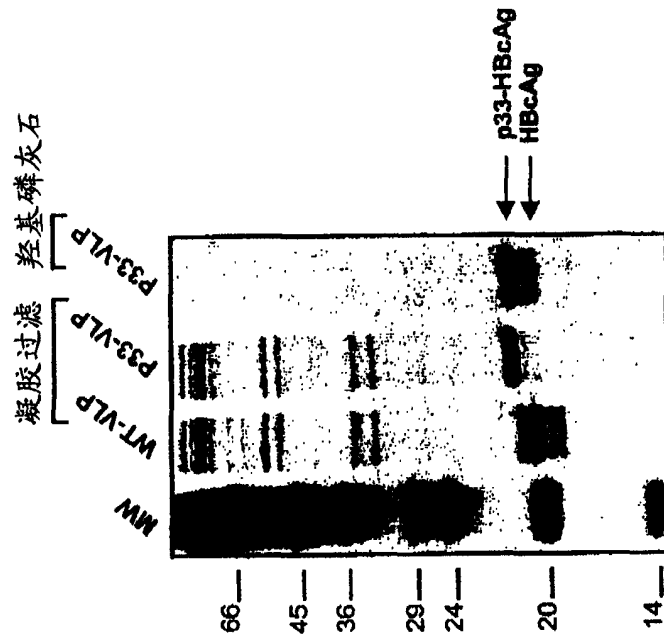
201 tctagctacc tgggtgggta ataatttga agatccagca tccaggatc tagtagtcaa ttaigttaat actaacatgg gtttaagat caggcaacta  
 T L A T W V G N N L E D P A S R D L V V N Y V N T N M G L K I R Q L

301 tfgtggtttc atatatcttg ccttactttt ggaagagaga ctgtacttga atatttggtc tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcctatagac  
 L W F<sup>†</sup> H I S C L T F G R E T V L E Y L V S F G V W I R T P P A Y R

401 caccaaatgc ccctatctta tcaacacttc cggaaactac tgttgttaga cgaocgggacc gaggcaggtc ccctagaaga agaactcctt cgctcgcag  
 P P N A P I L S T L P E T Y V V R R R D R G R S P R R R T P S P R

501 acgcagatct caatcgccgc gtcgcagaag atctcaatct cgggaatctc aatgtcttct ccttaagct gtttacaact tcgctaccat gtaa  
 R R R S Q S P R R R R S Q S R E S Q C L L L K A V Y N F A T M -

**图 1**



**B**

**A**



图 2

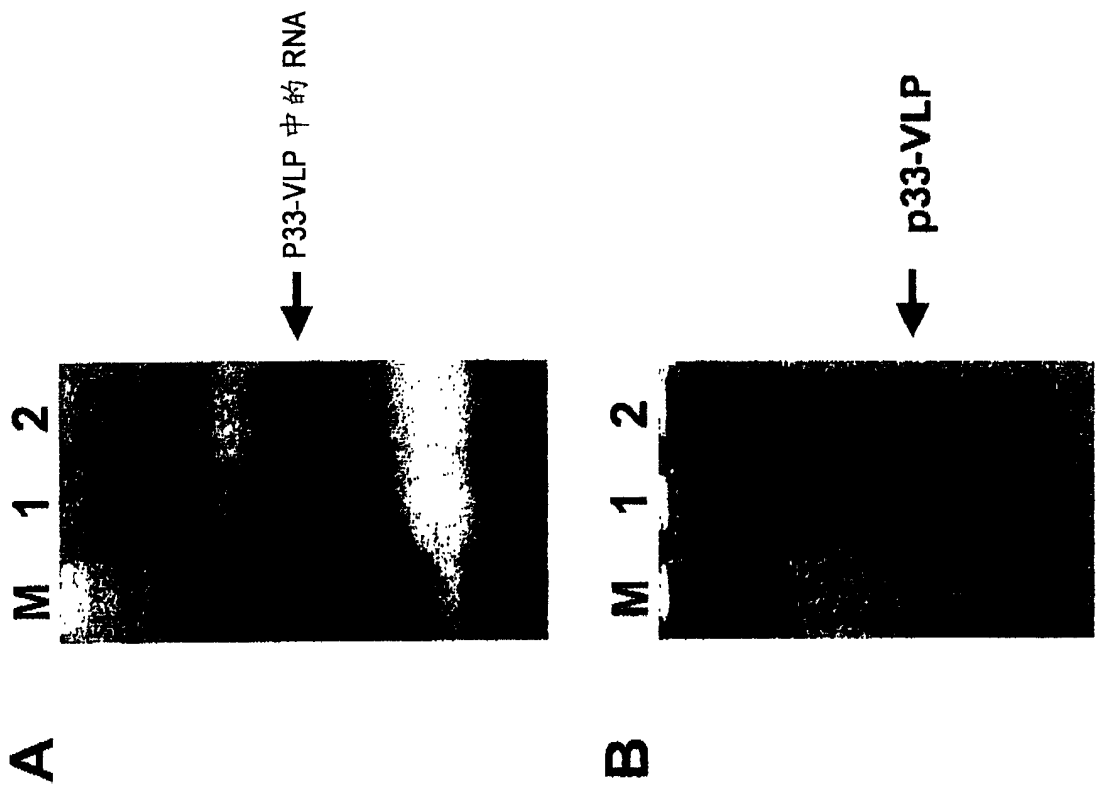


图 3

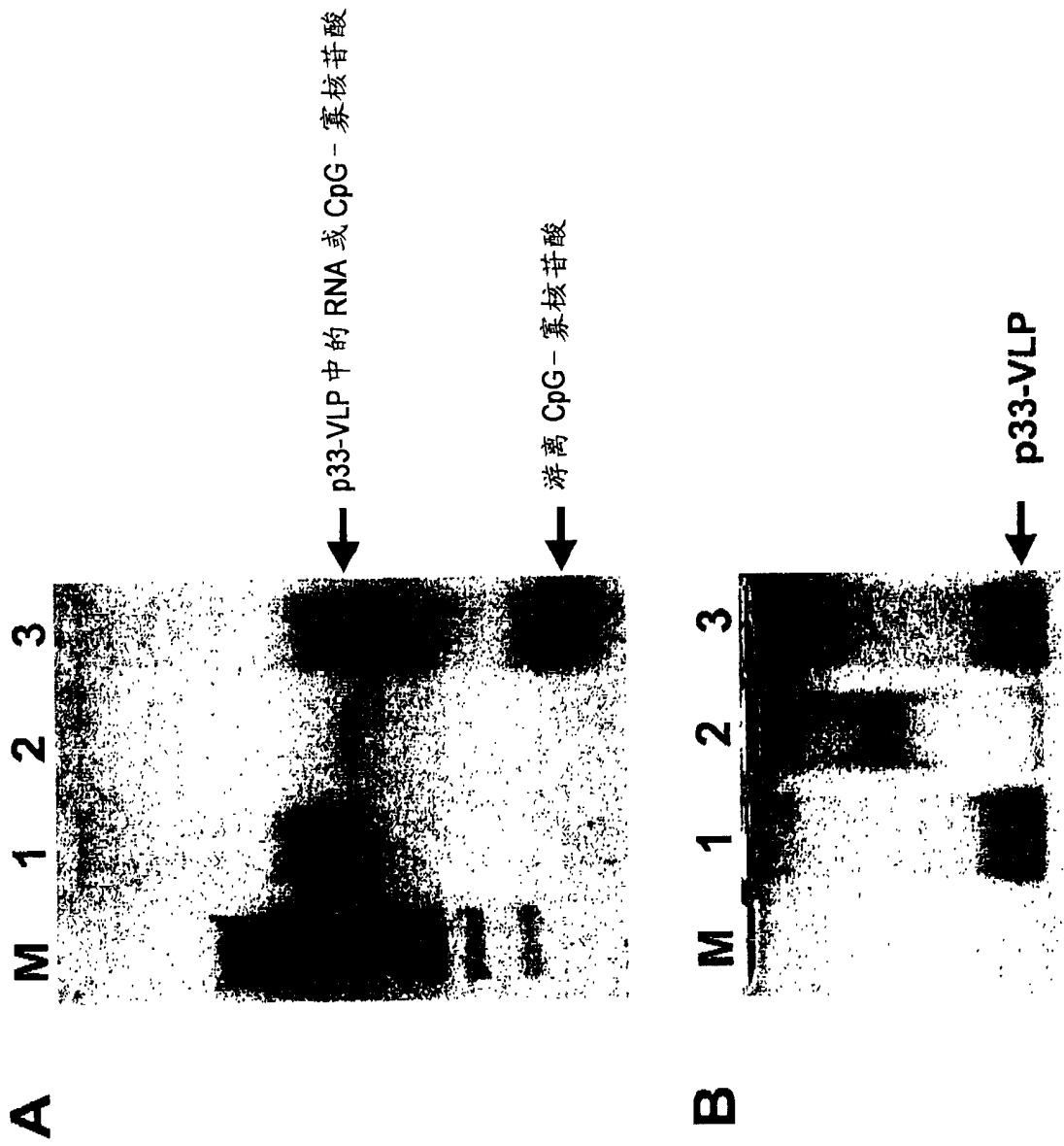


图 4



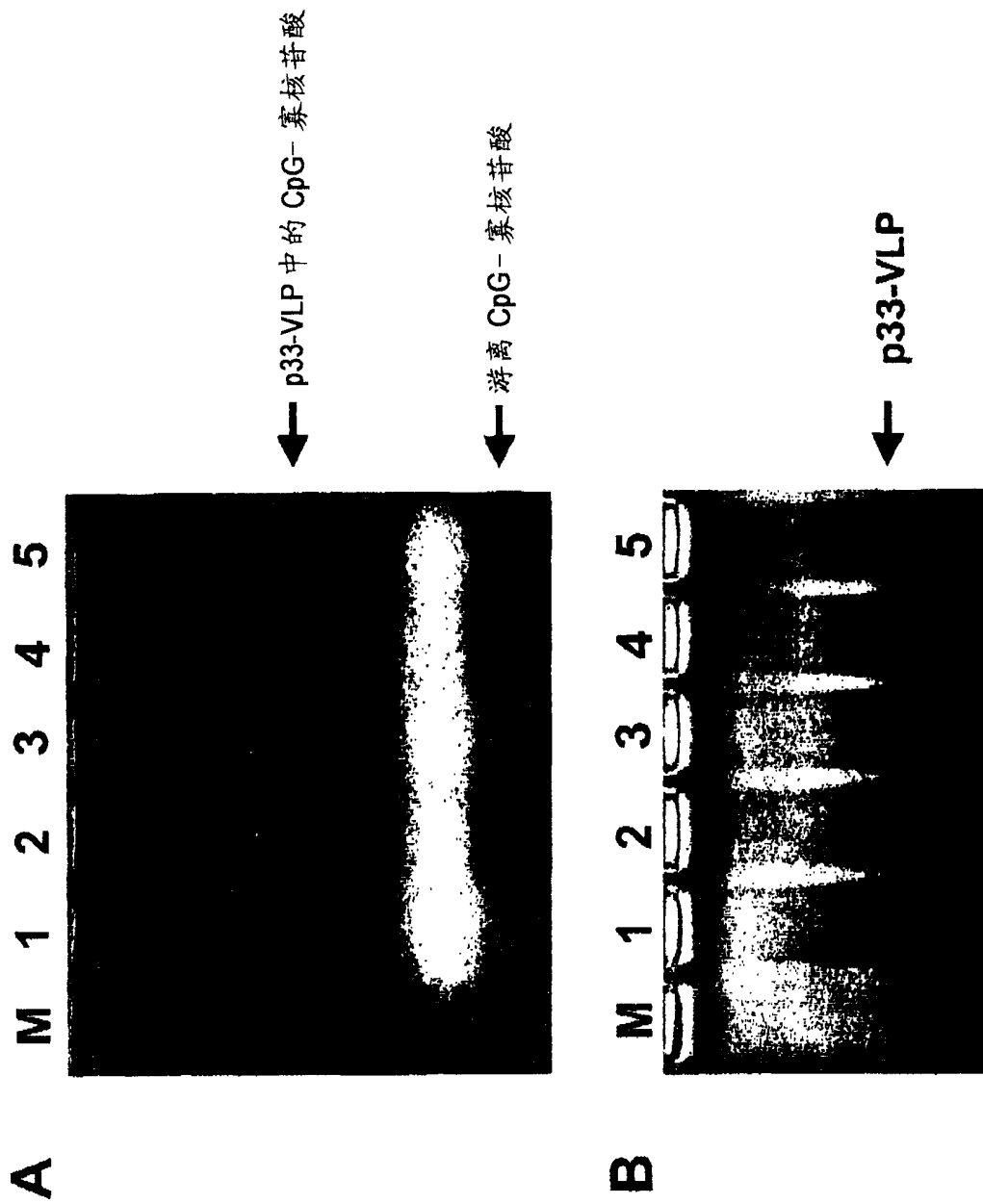


图 5

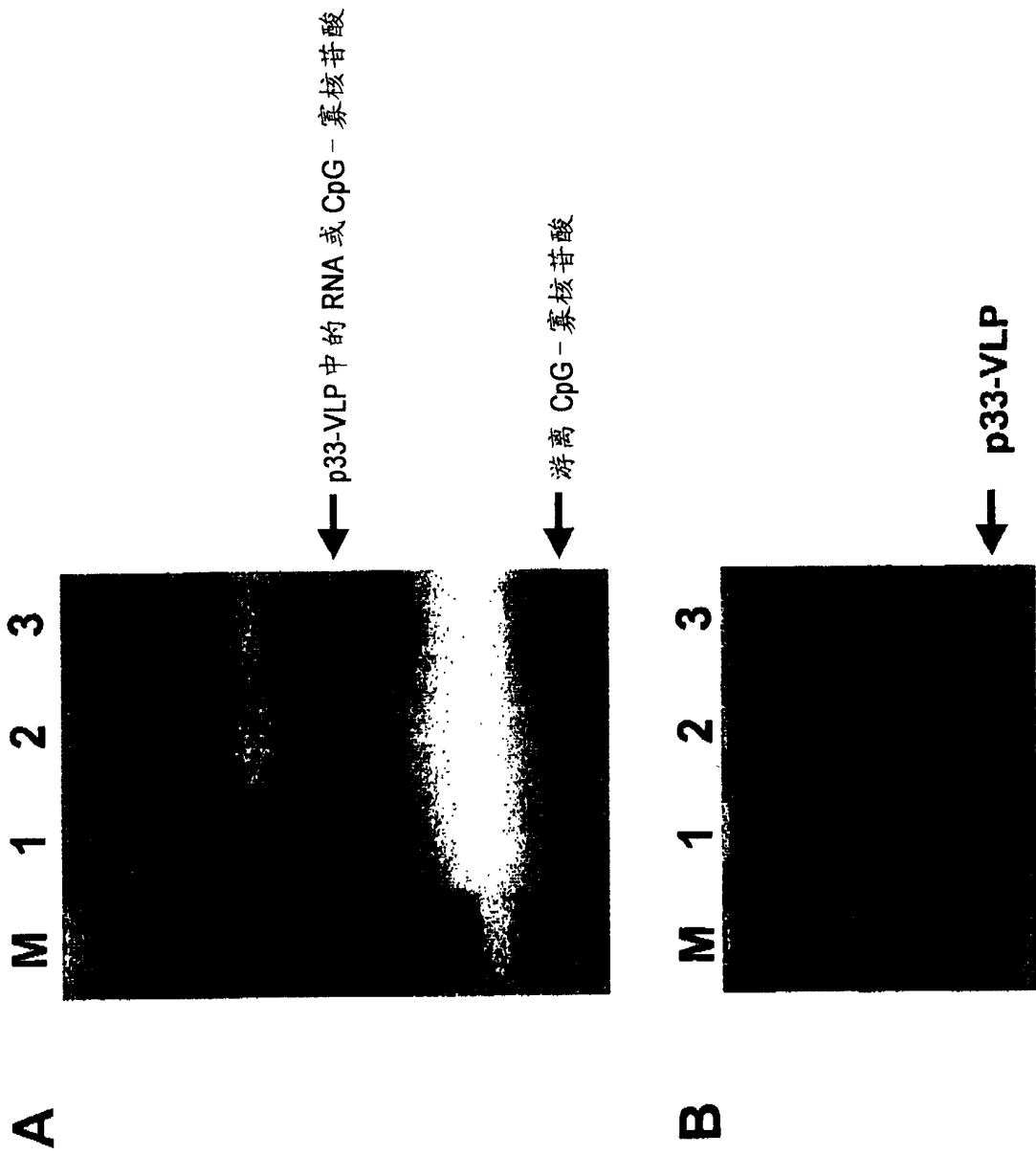
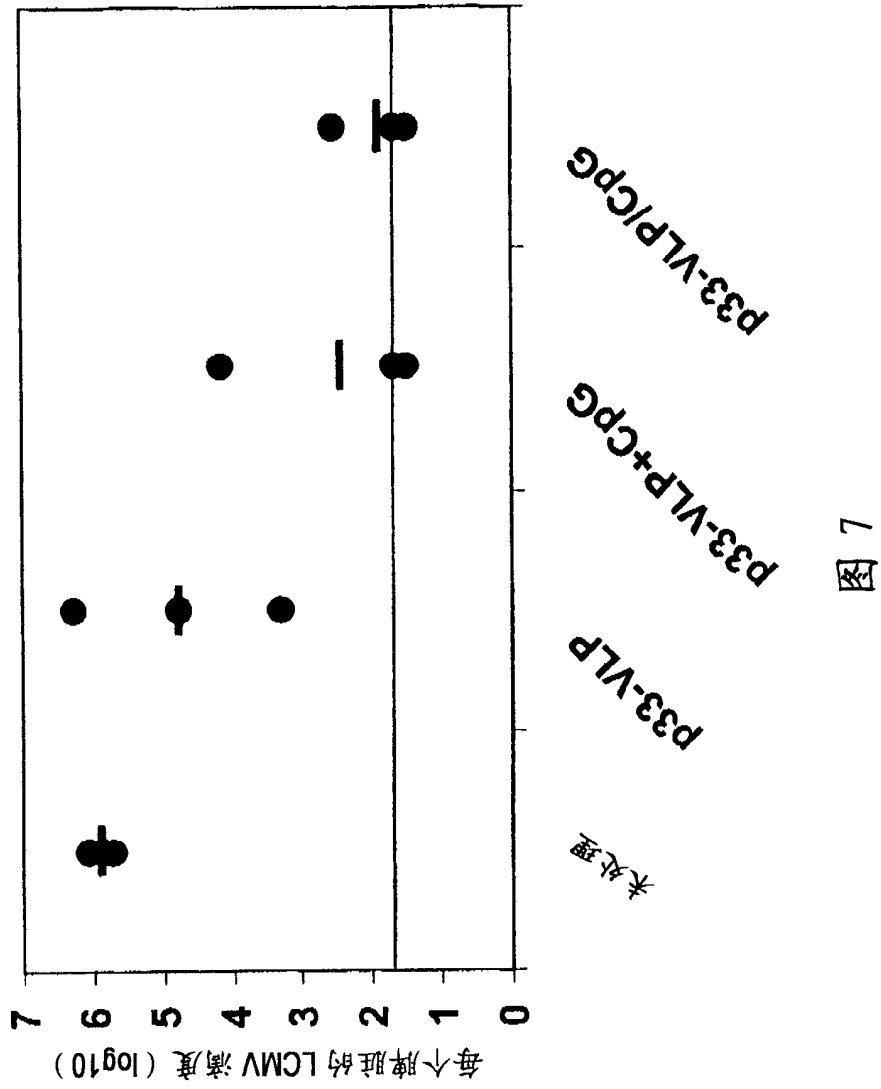
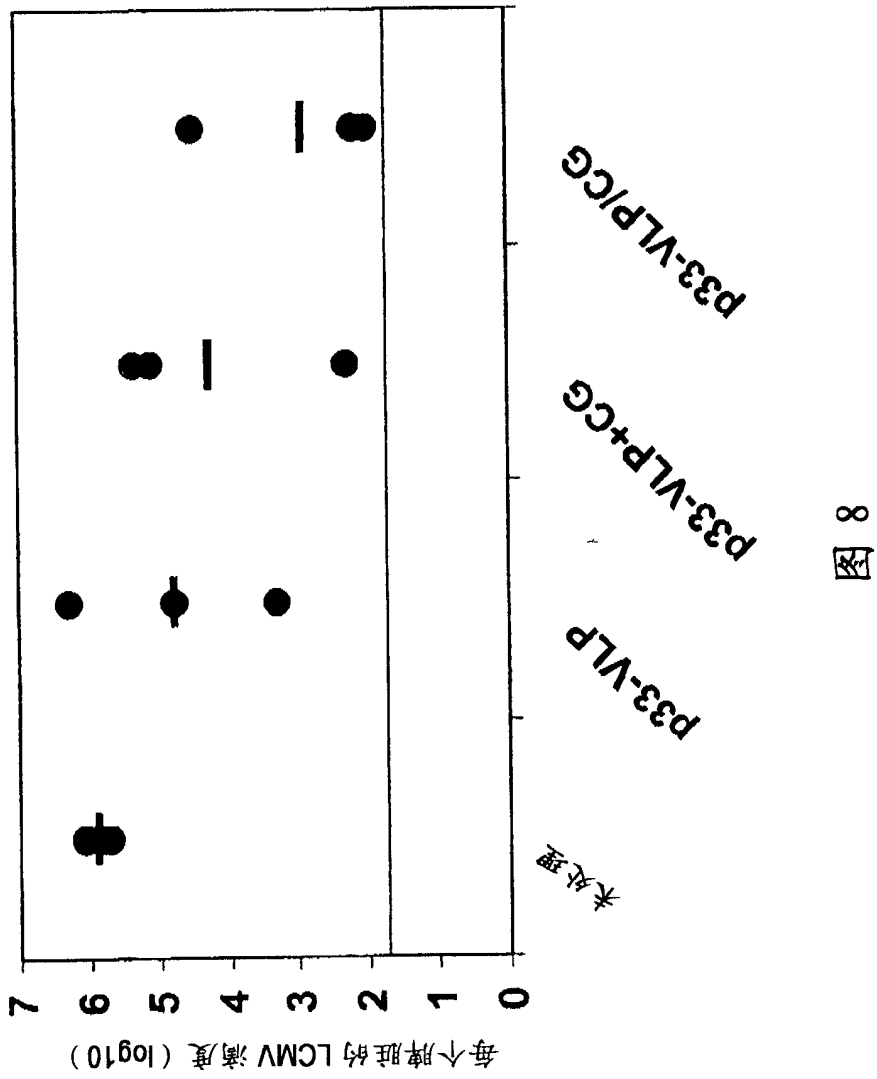


图 6





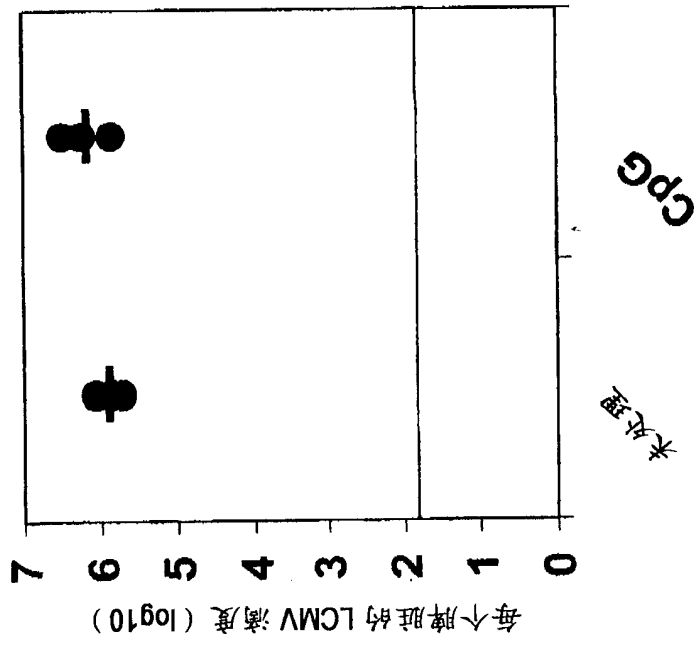


图 9

## BKVAS VP1 蛋白的氨基酸序列 (GI: 332779)

MAPTKRKGECPGAAPKKPKPEVQVPKLLIKGGVEVLEVKTGVDAIT  
EVECFLNPEMGDPPDDNLRGYSQHLSAENAFESDSPDRKMLPCYSTA  
RILPLNLNEDLTCGNLLMWEAVTVKTEVIGITSMNLNHAGSQKVHE  
NGGKPVQGSNFHFVAVGGDPLEMQGLMNYRTKYPQGTITPKNPT  
AQSQVMNTDHKAYLDKNNAYPVECWIPDPSRNENTRYFGTYTGGEN  
VPPVLHVTNTATTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAADICGLFTNSSG  
TQQRGLARYFKIRLRKRSVKNPYPI SFLLSDLINRRRTQKVDGQPM  
YGMESQVEEVRVFDGTEQLPGDPPMIRYIDRQGLQTKMV

图 10

## 246bp DNA 片段的核酸序列

```
1   GGCGGTGGTG TCAGATCTAC AATGATCGTC ATCACCTTGG TGATGCTGAA
51  GAAGAAACAG TACACATCCA TTCATCATGG TGTGGTGGAG GTTGACGCCG
101 CTGTCACCCC AGAGGAGCGC CACCTGTCCA AGATGCAGCA GAACGGCTAC
151 GAAAATCCAA CCTACAAGTT CTTTGAGCAG ATGCAGAACG CTAGCTATCC
201 ATACGATGTC CCTGATTACG CCTAACGCCG ATTCCGCCAGC ACAGTG
```

图 11

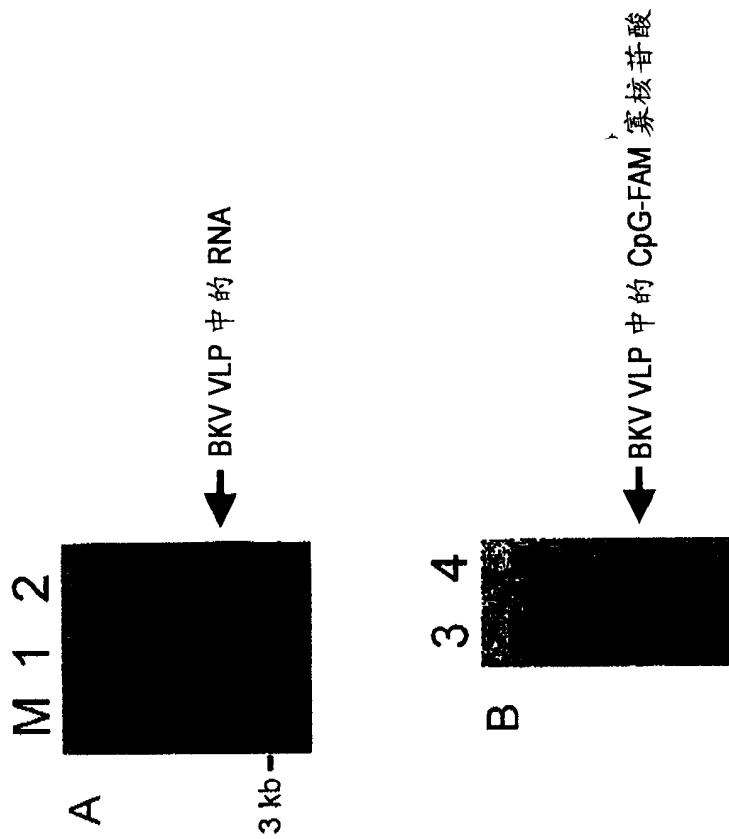


图 12



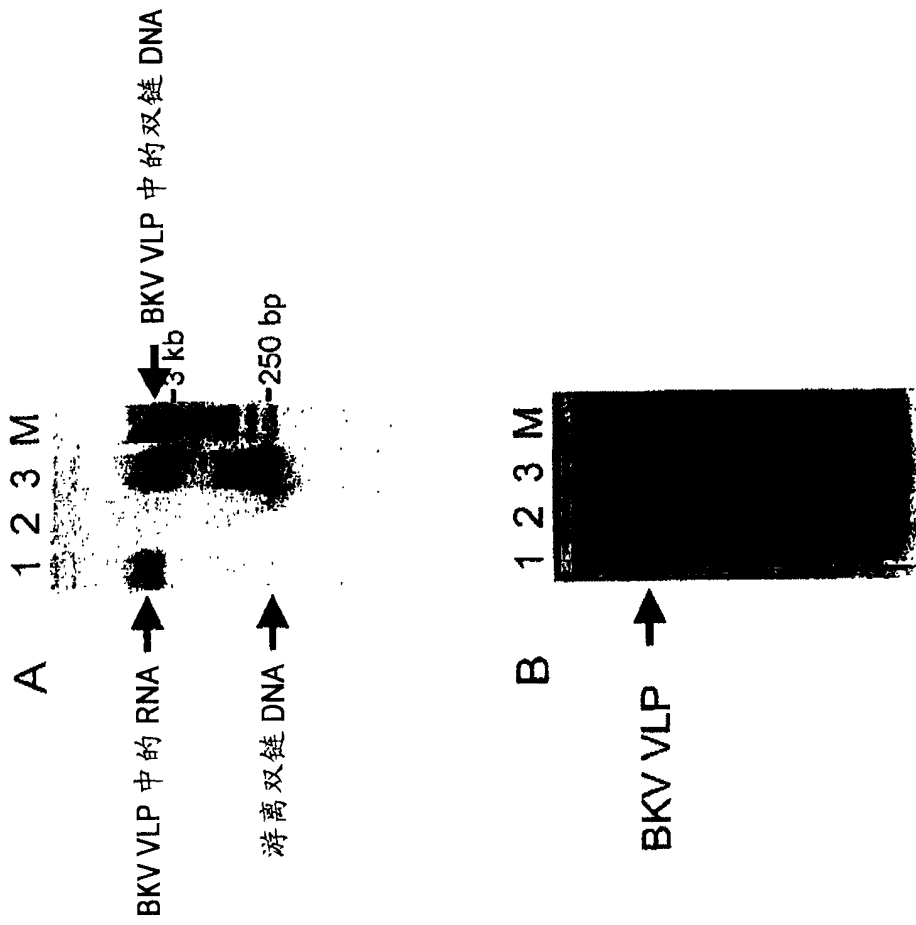


图 13

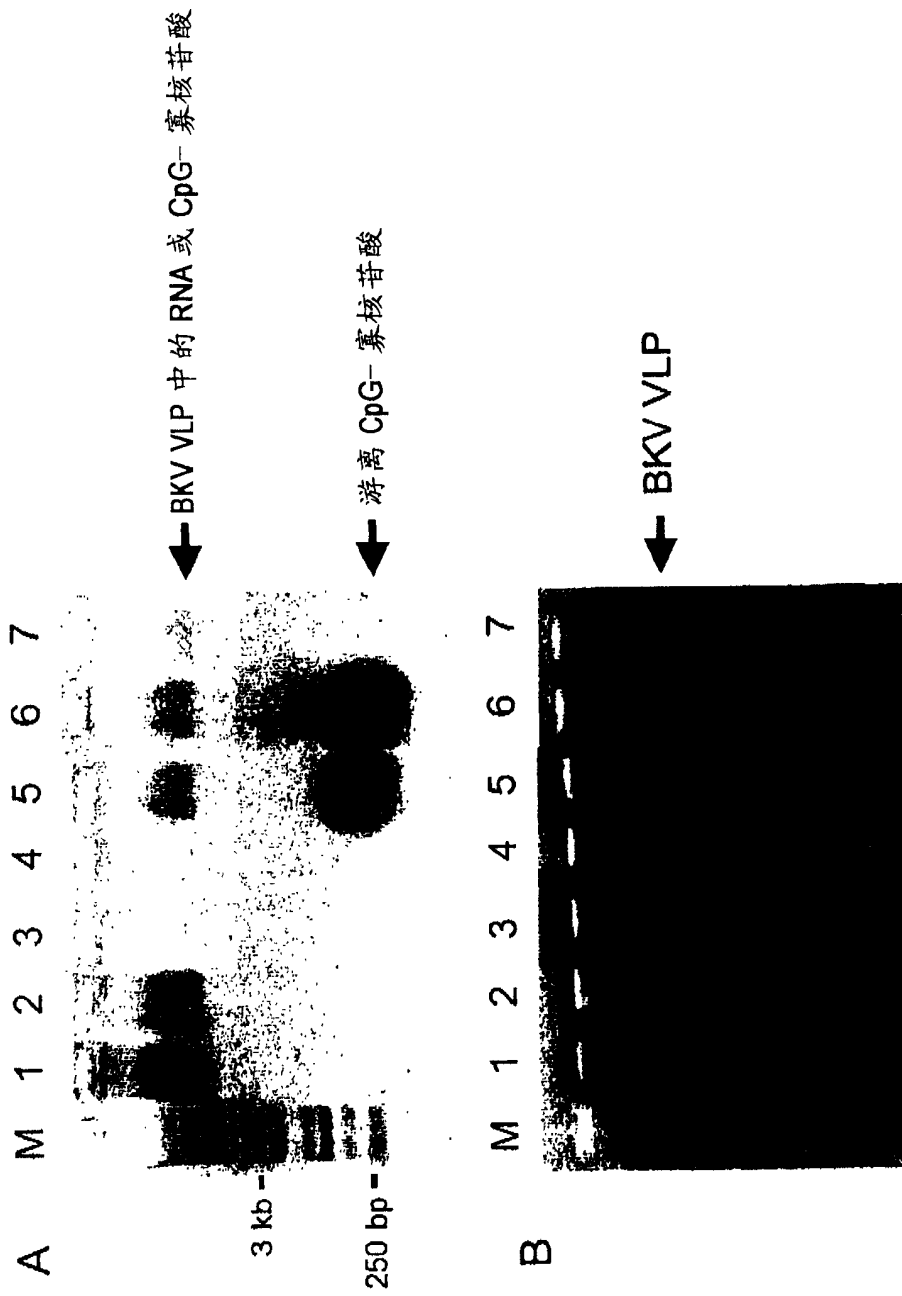


图 14

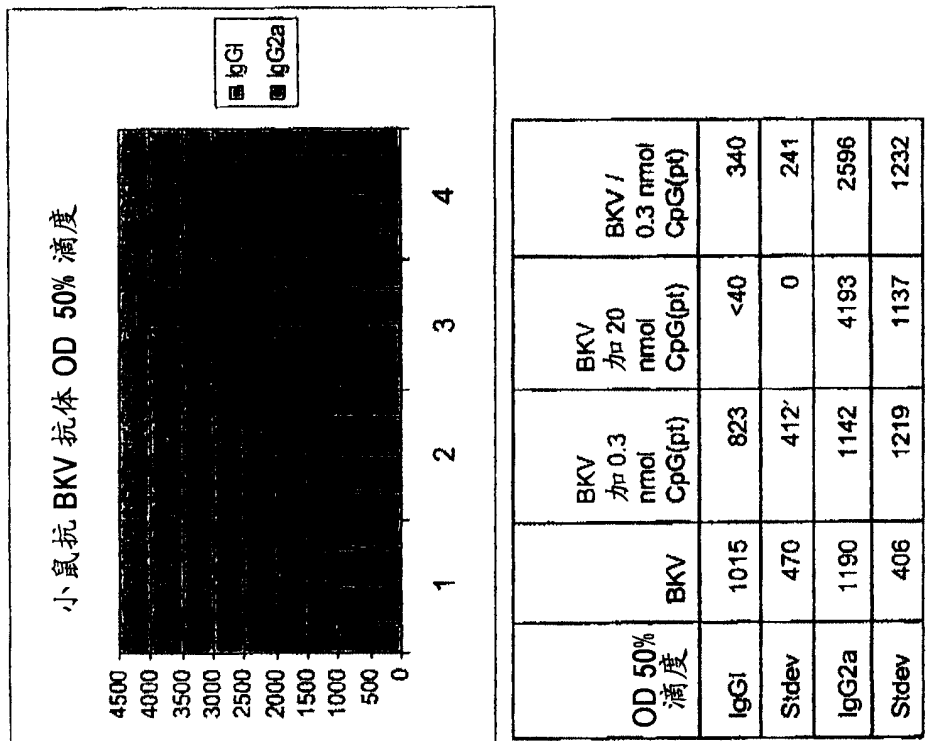


图 15

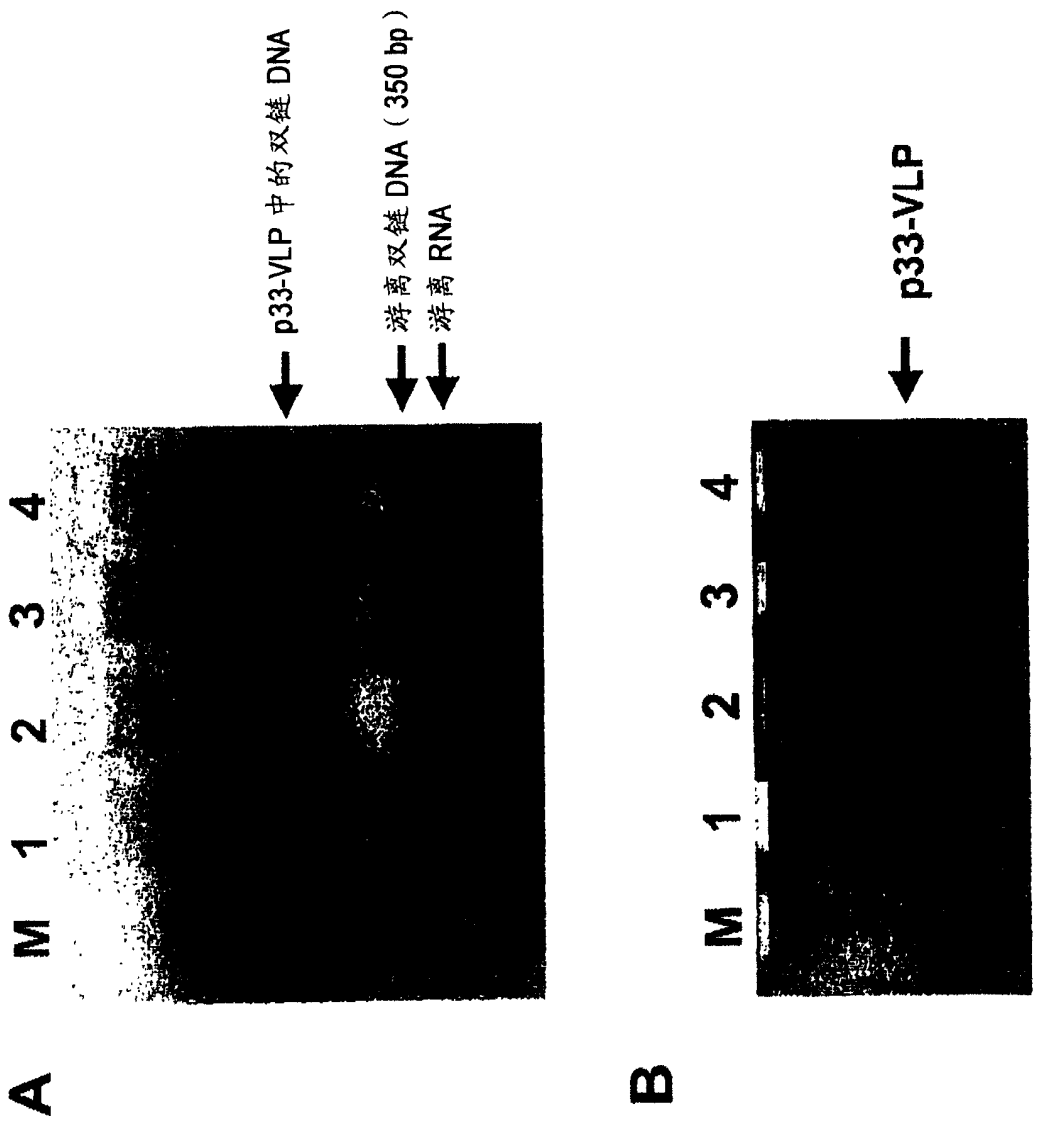


图 16

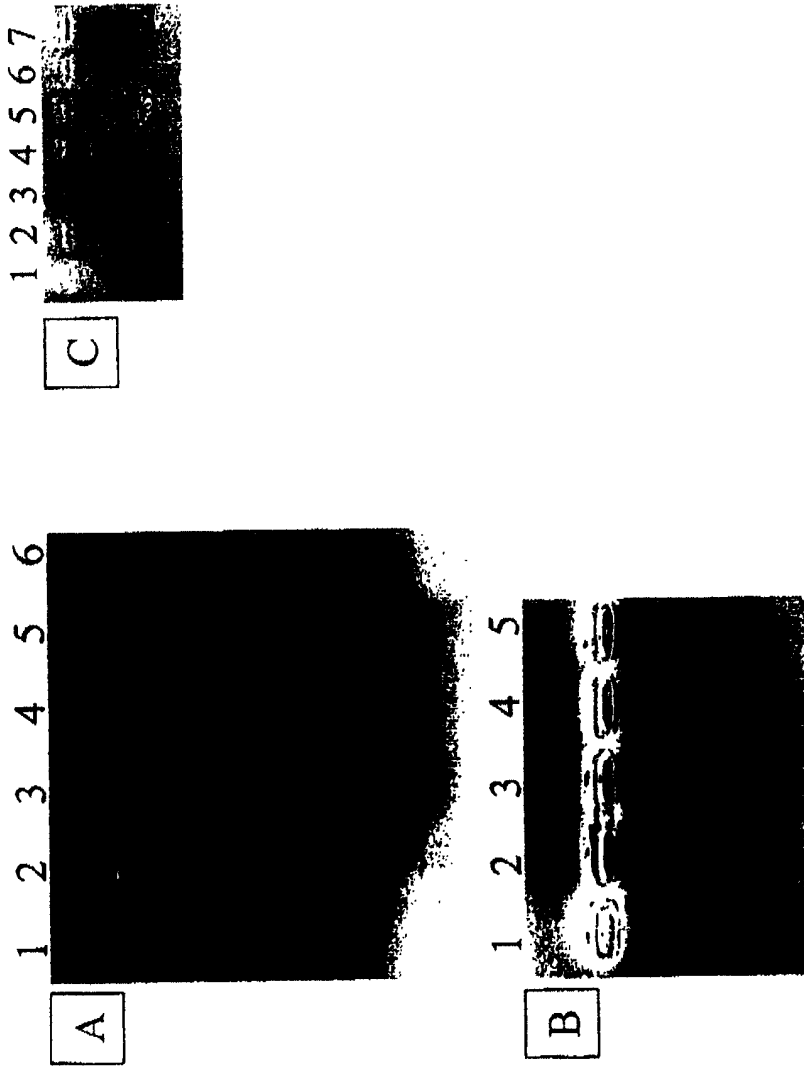


图 17

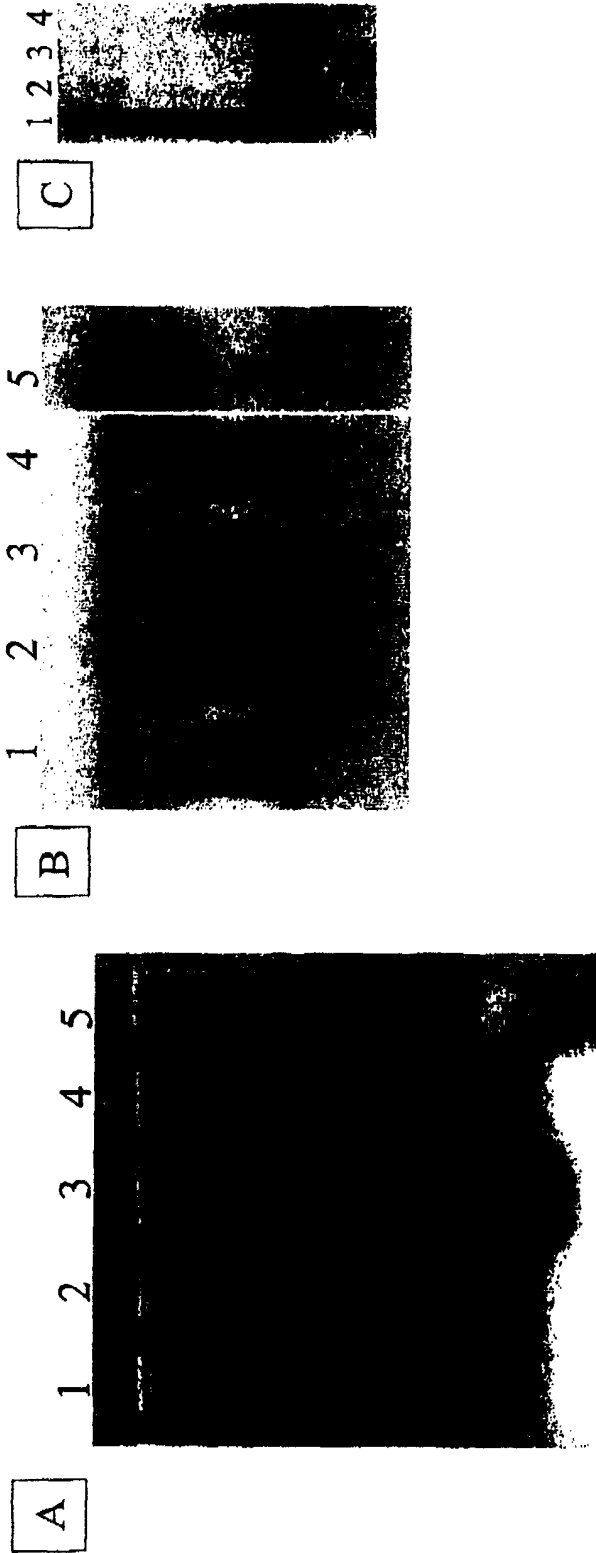


图 18

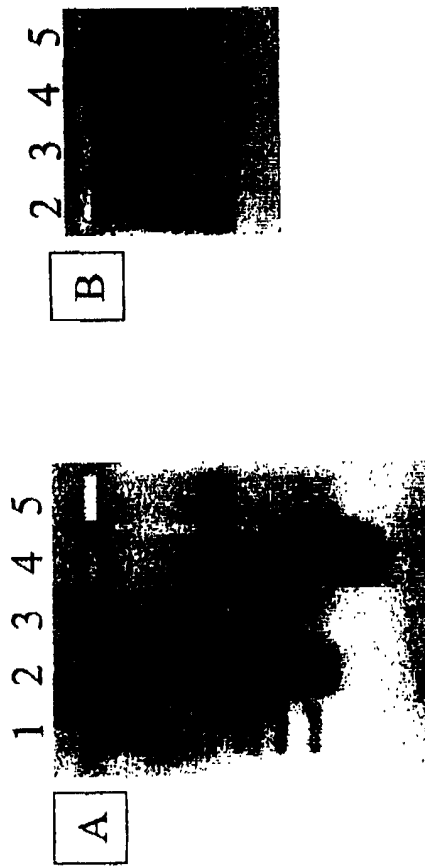


图 19

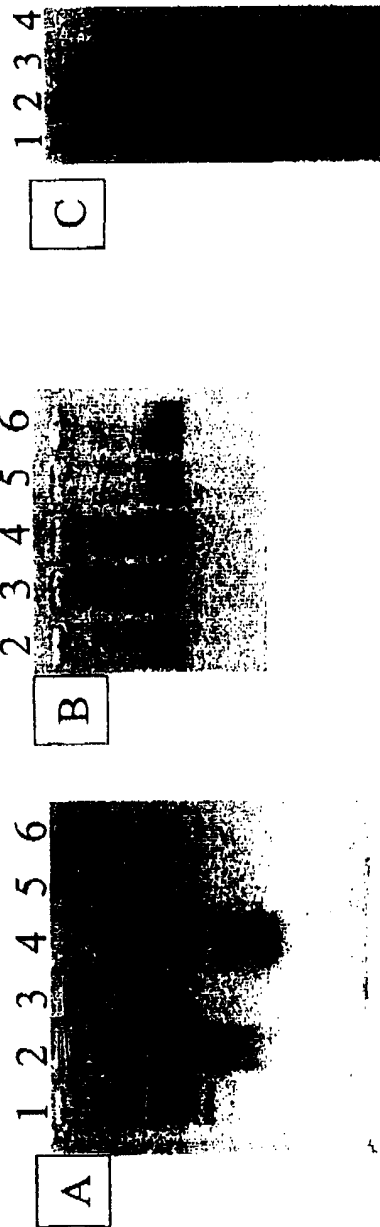


图 20



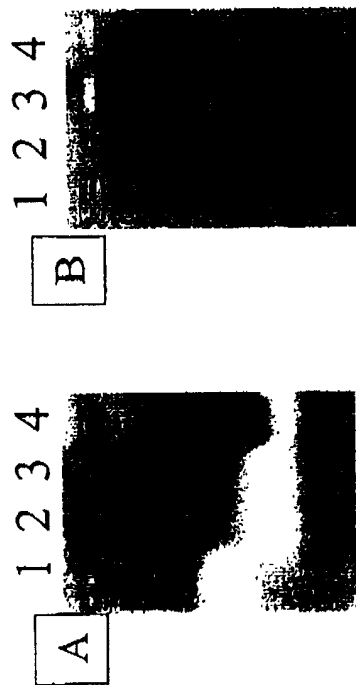


图 21

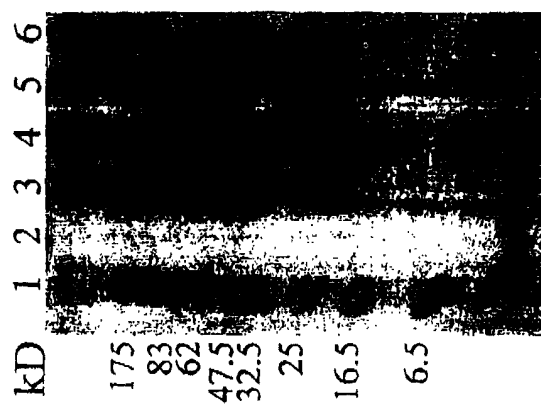


图 22

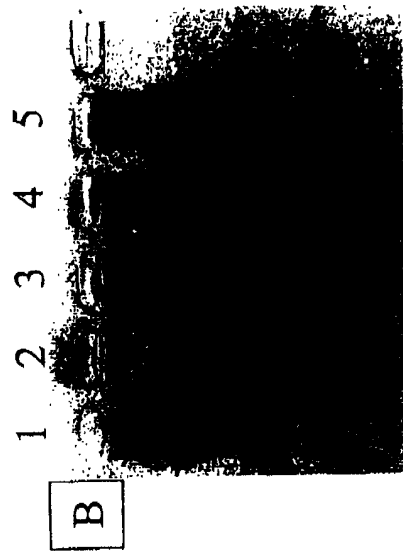


图 23

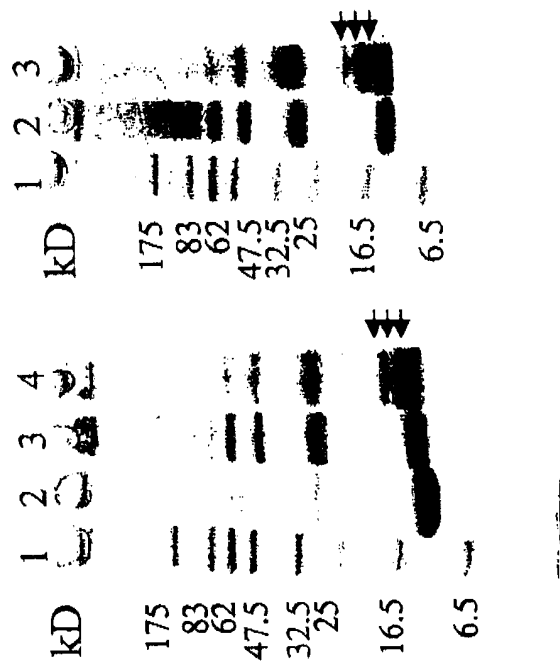


图 24

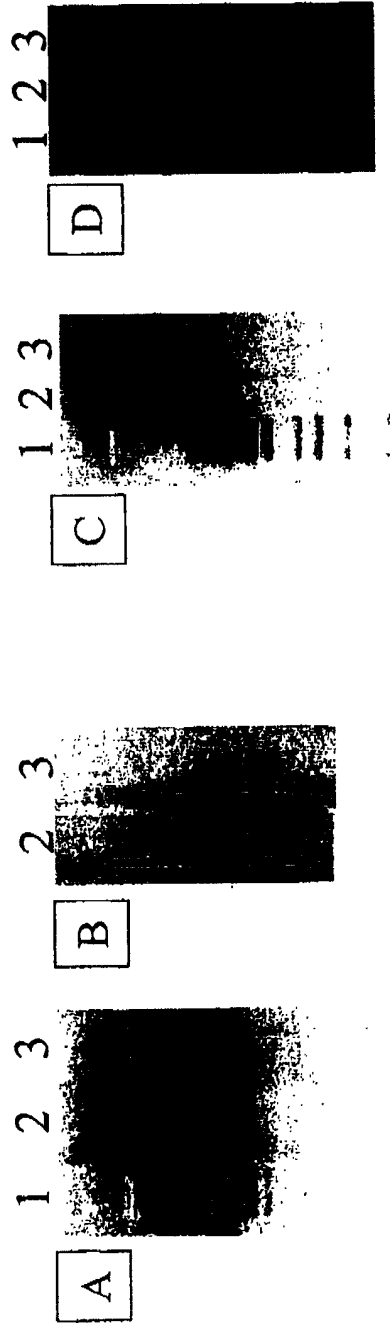


图 25

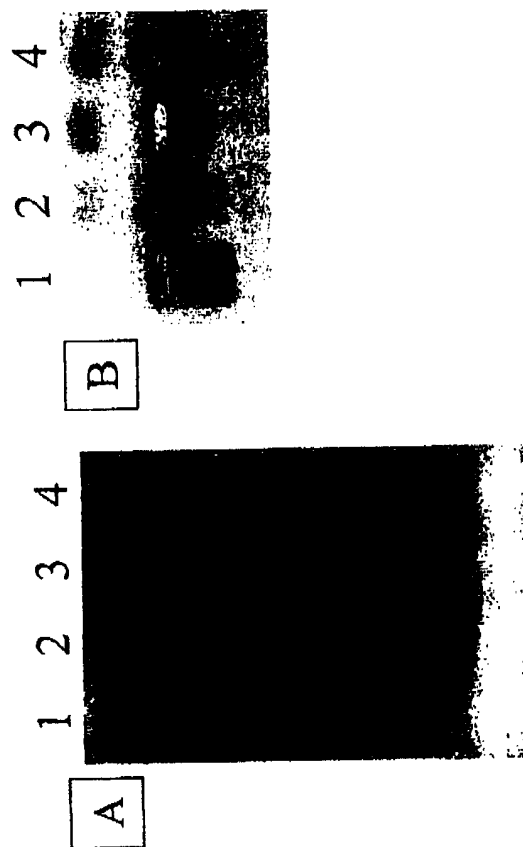


图 26

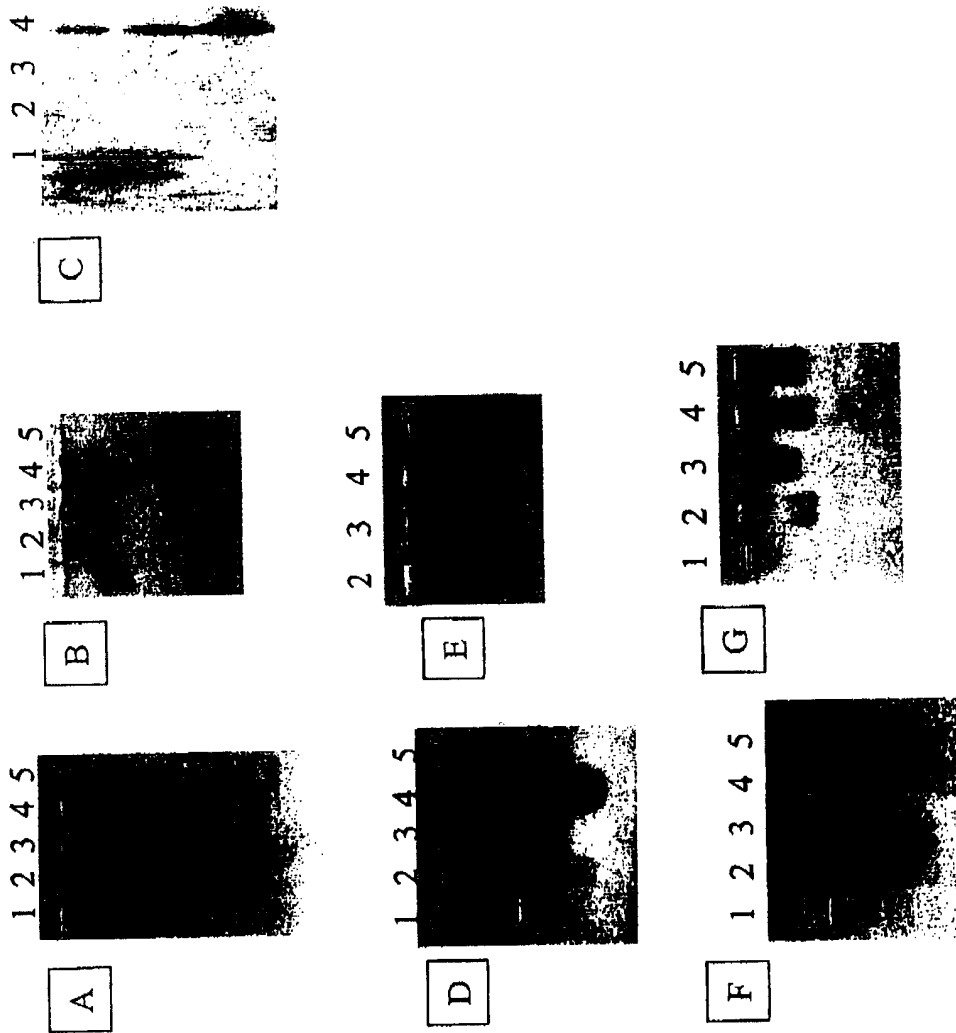


图 27

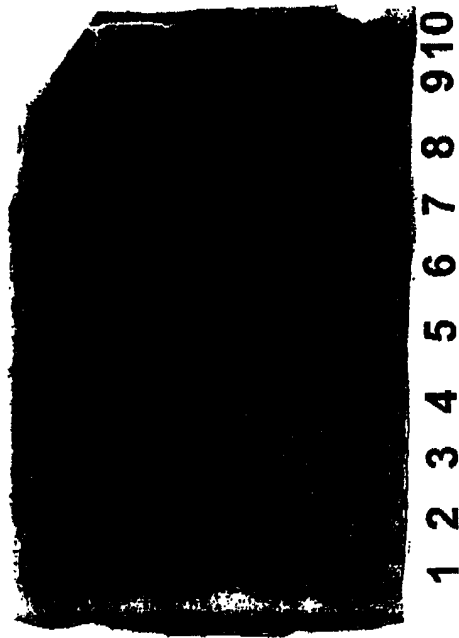
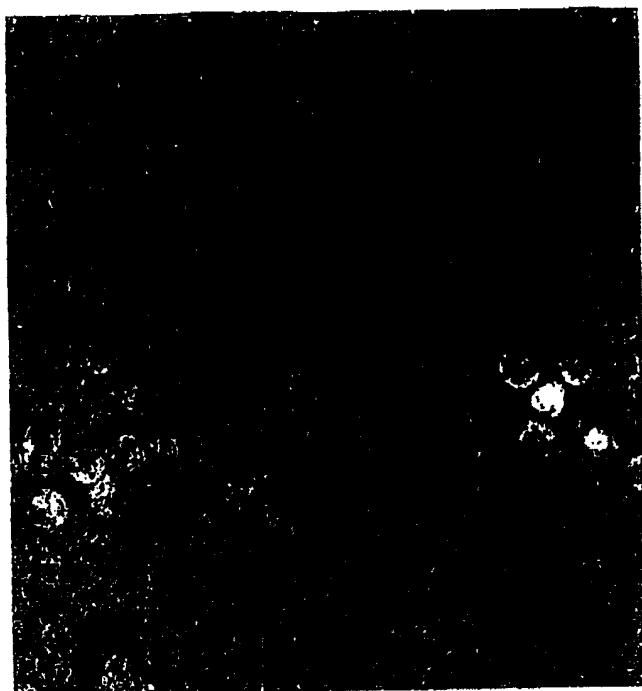
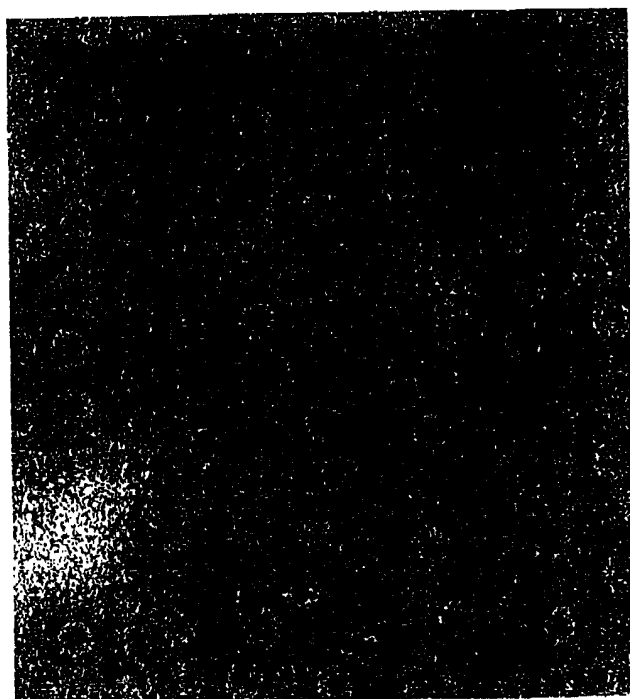


图 28





**B**



**A**

图 29

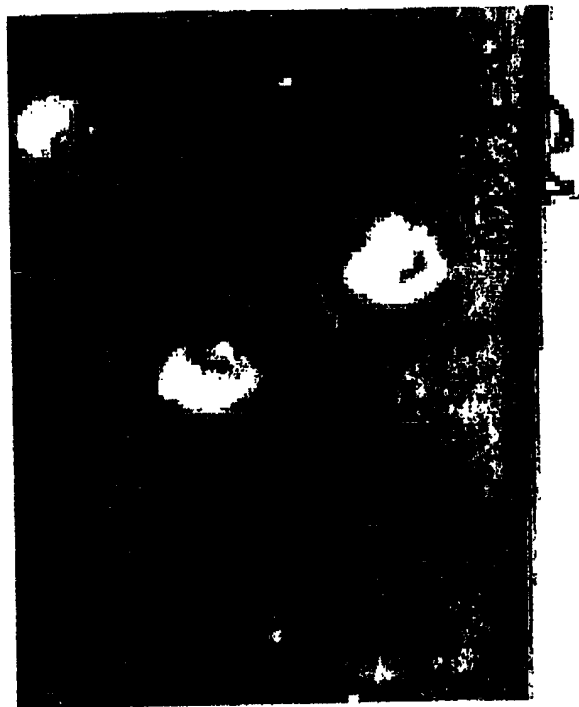


图 30A

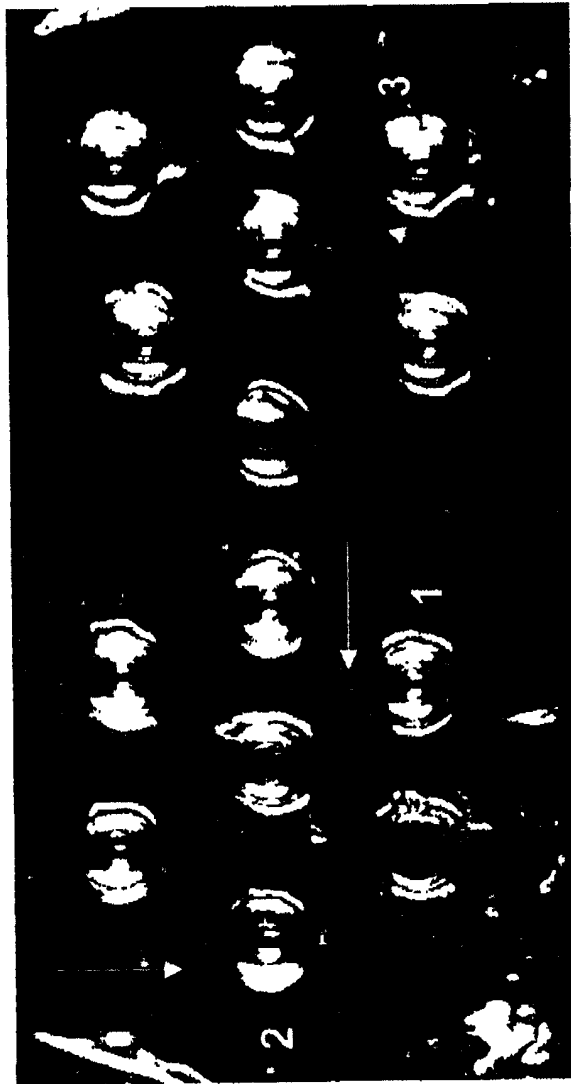


图 30B

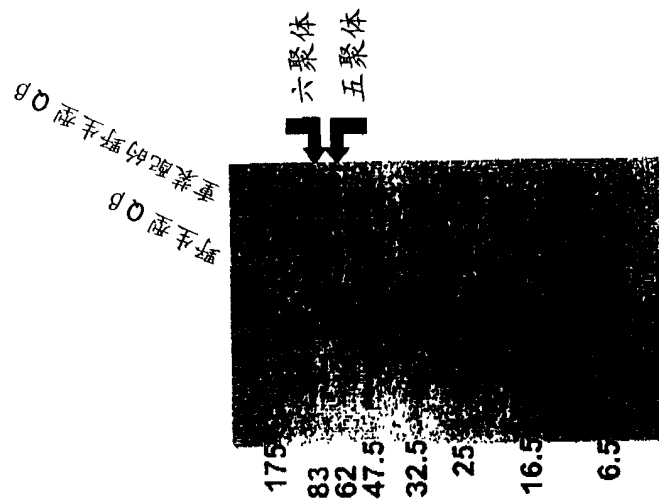


图 31A

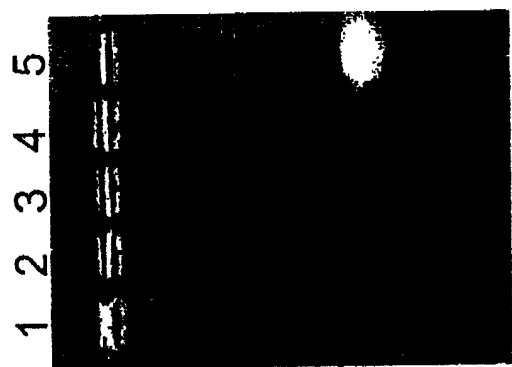


图 31B

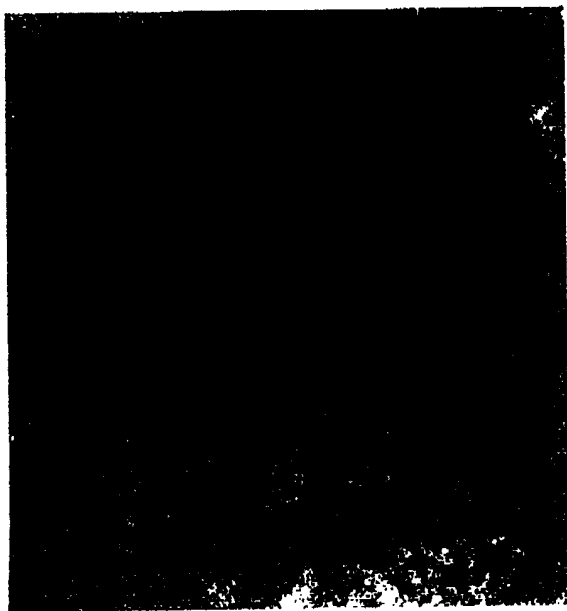


图 32

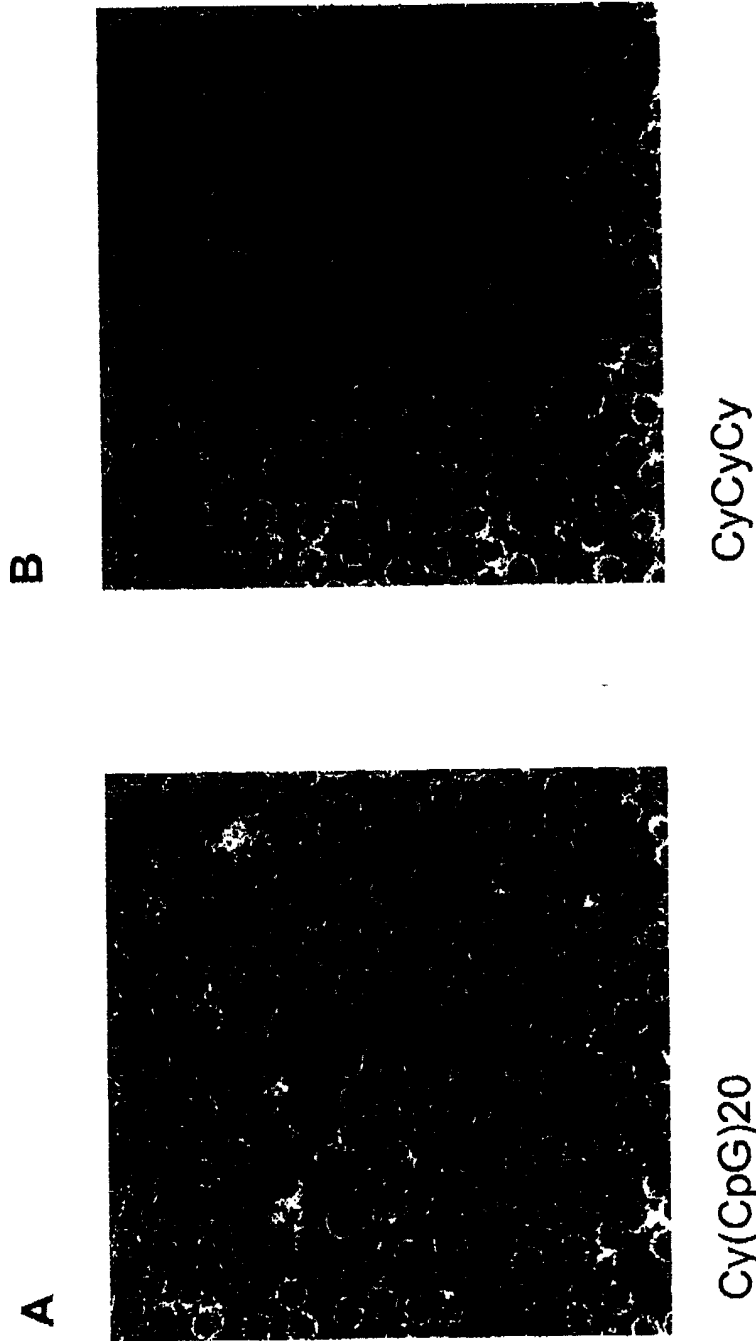


图 33

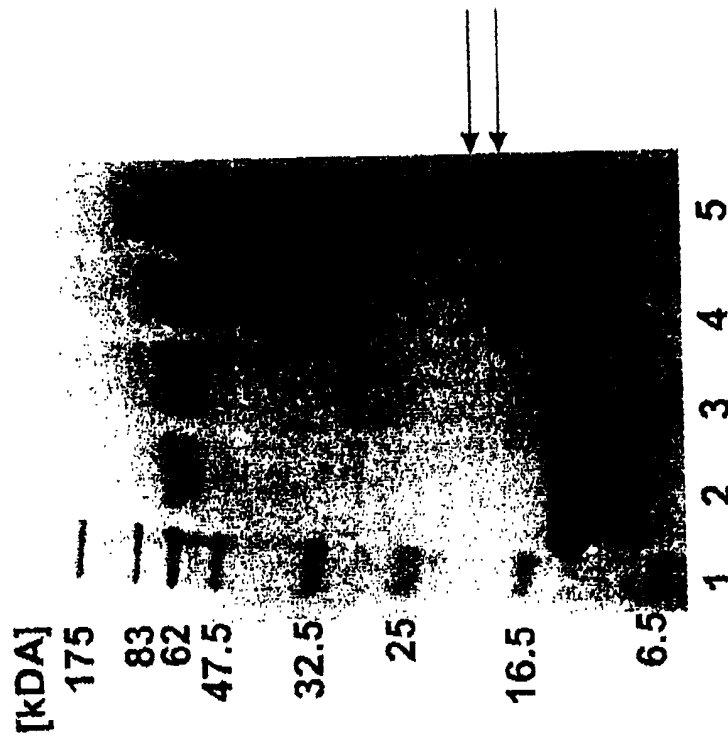


图 34



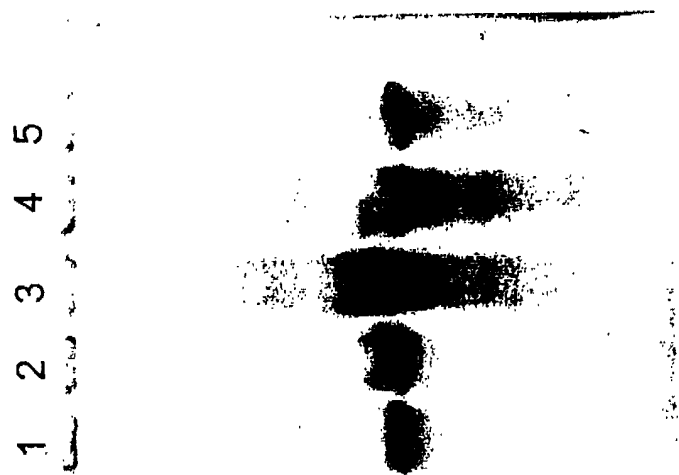


图 35

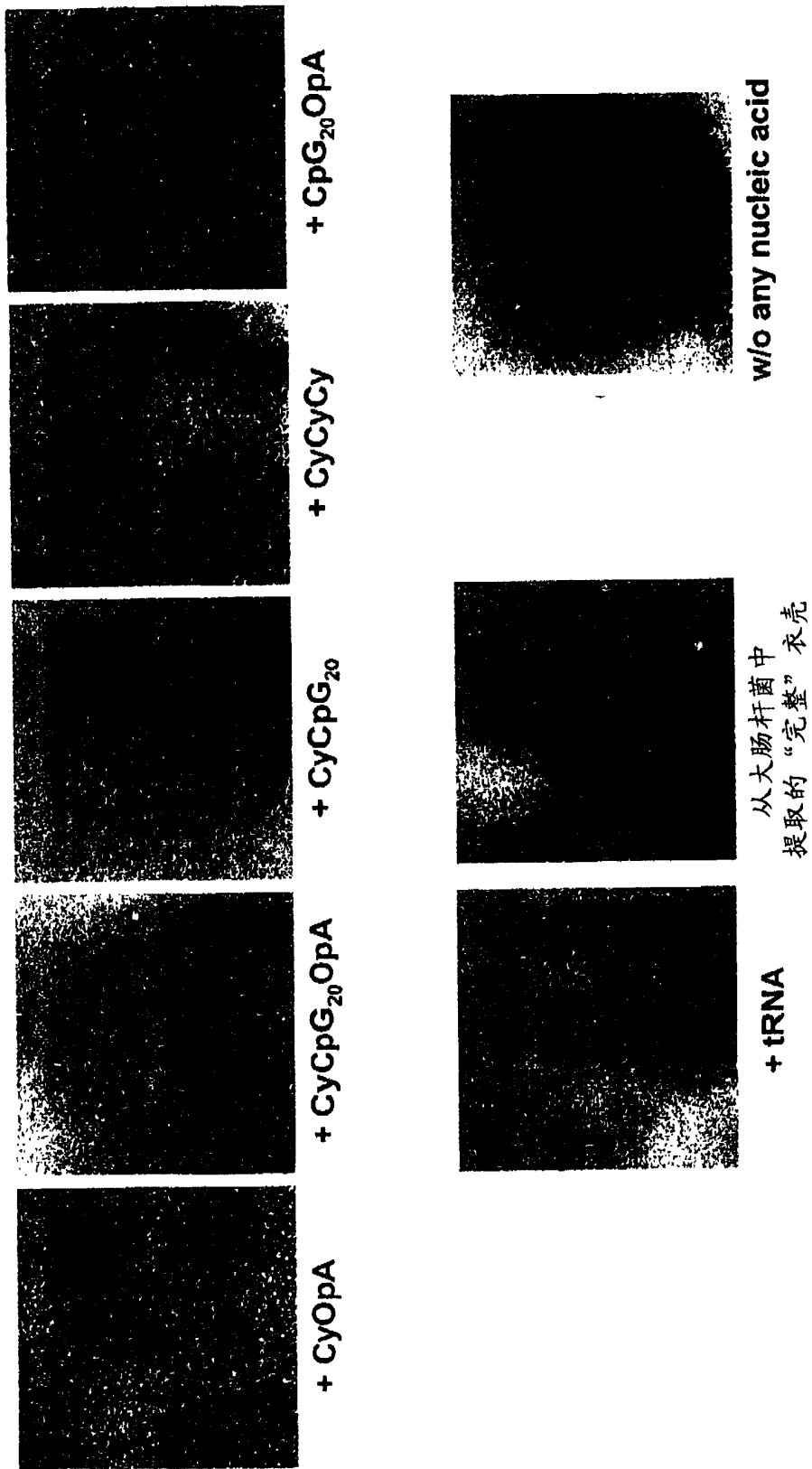


图 36

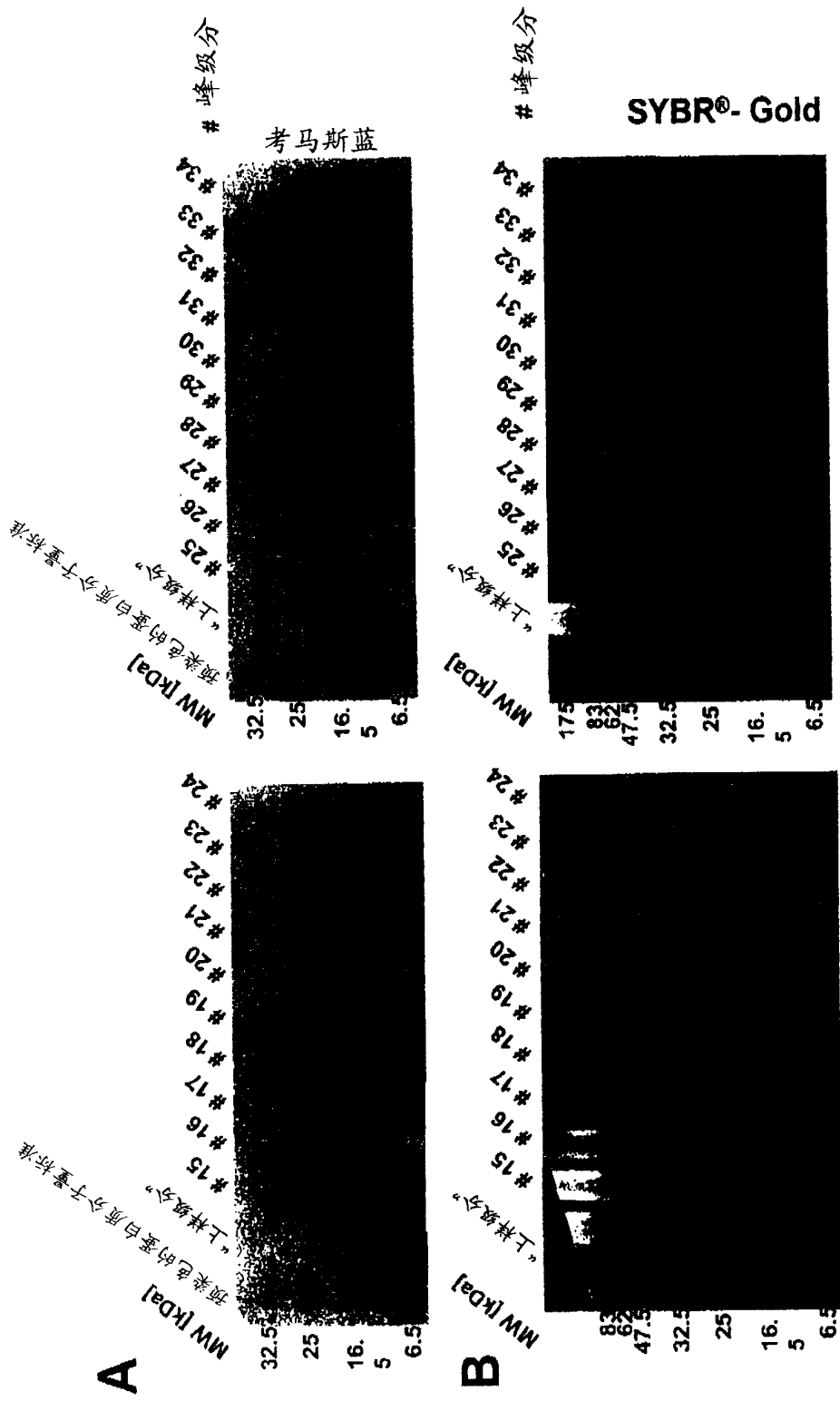


图 37

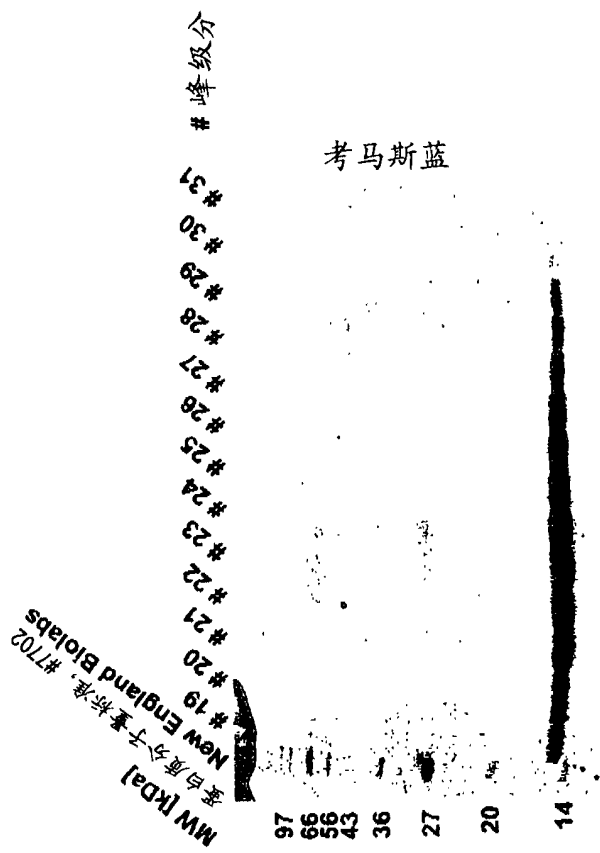


图 38

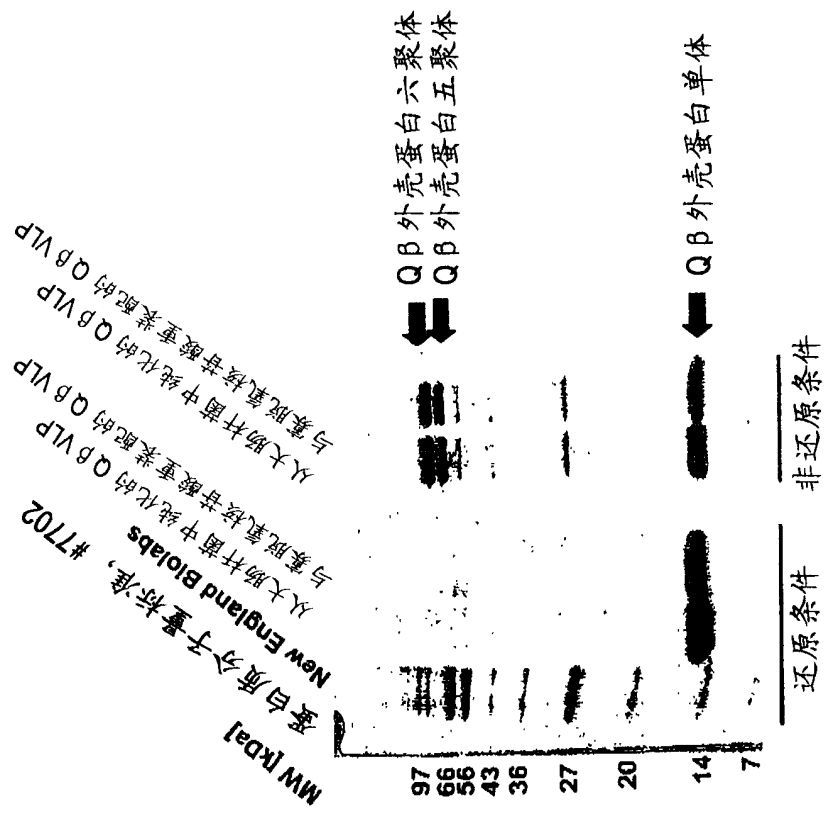


图 39

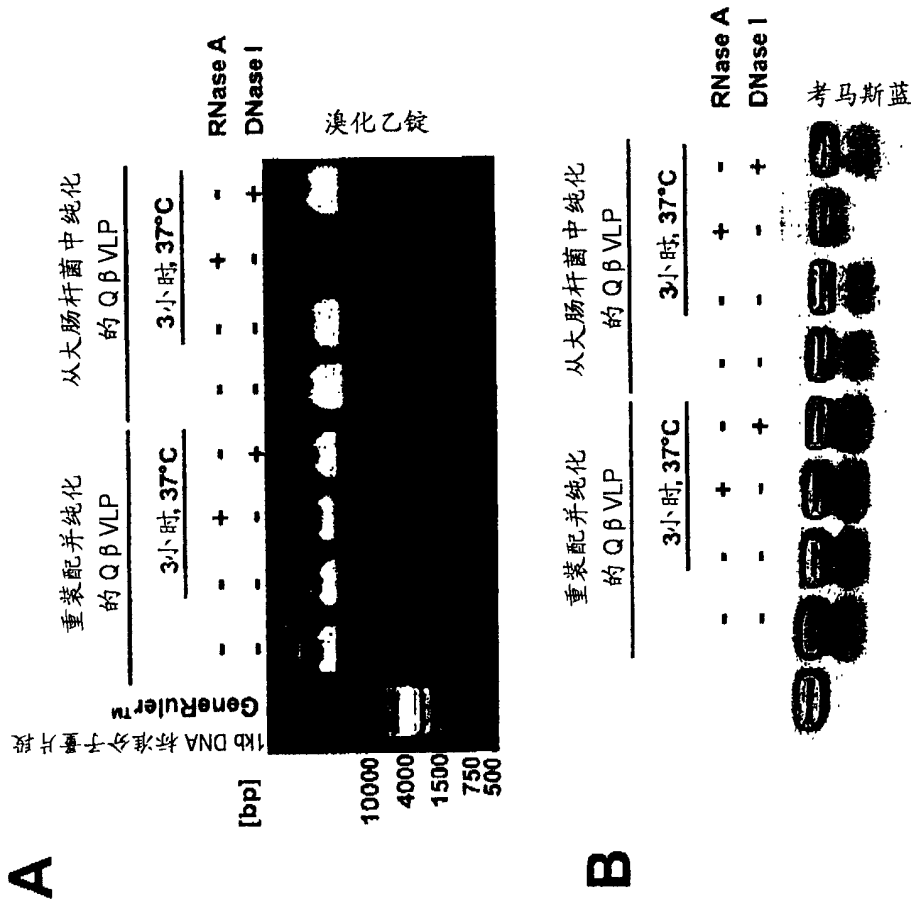
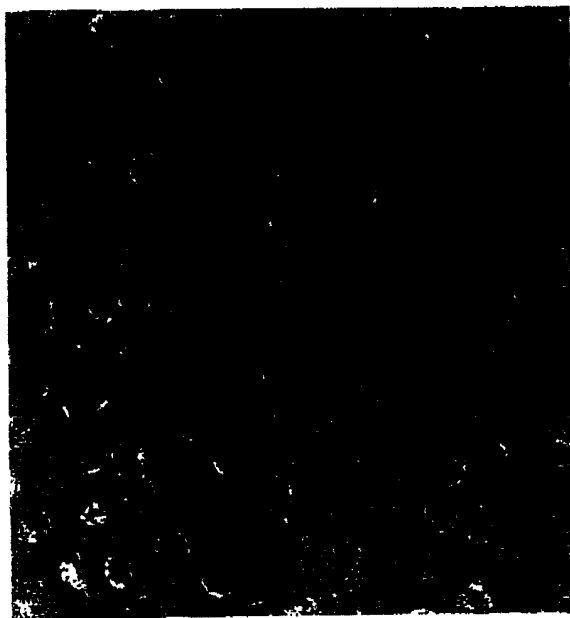


图 40



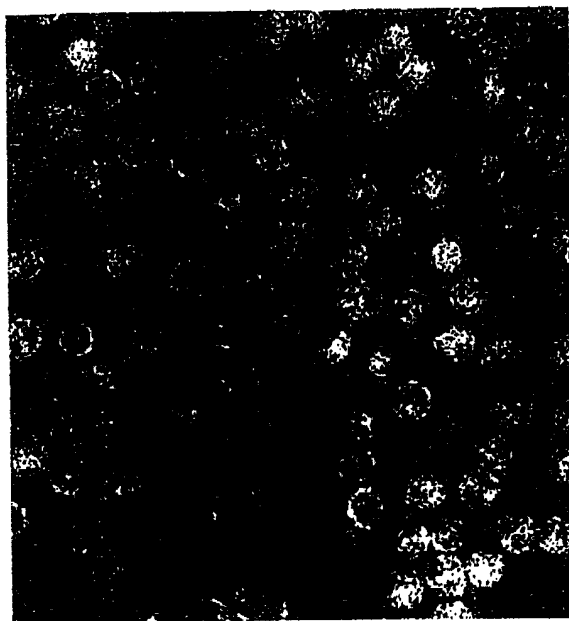
图 41

**B**



重装配

**A**



重组

图 42



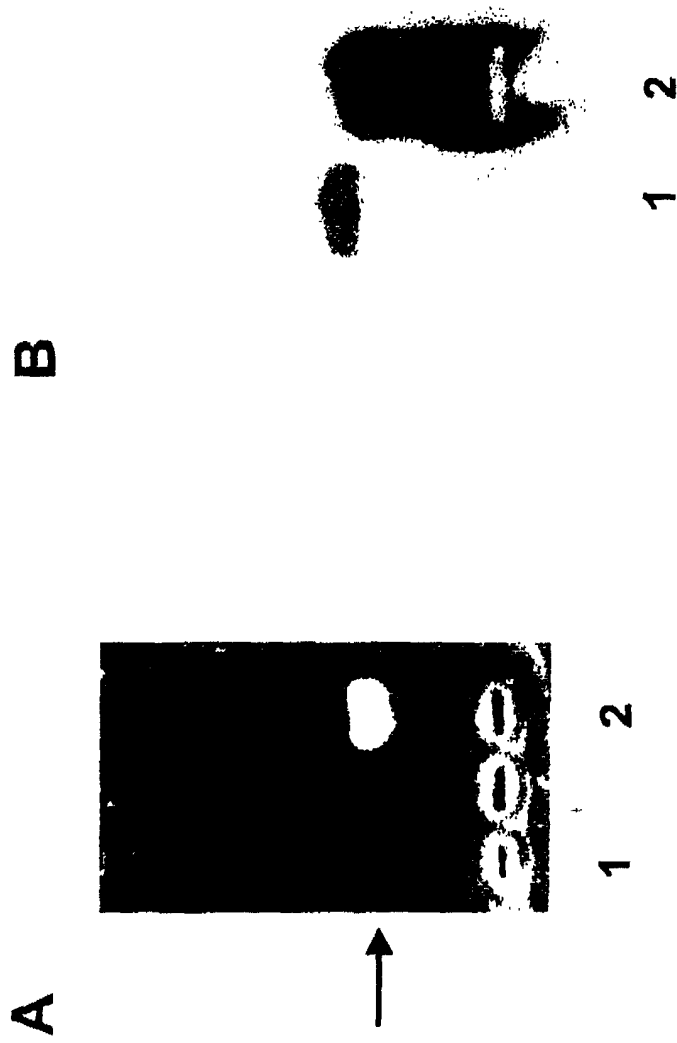


图 43

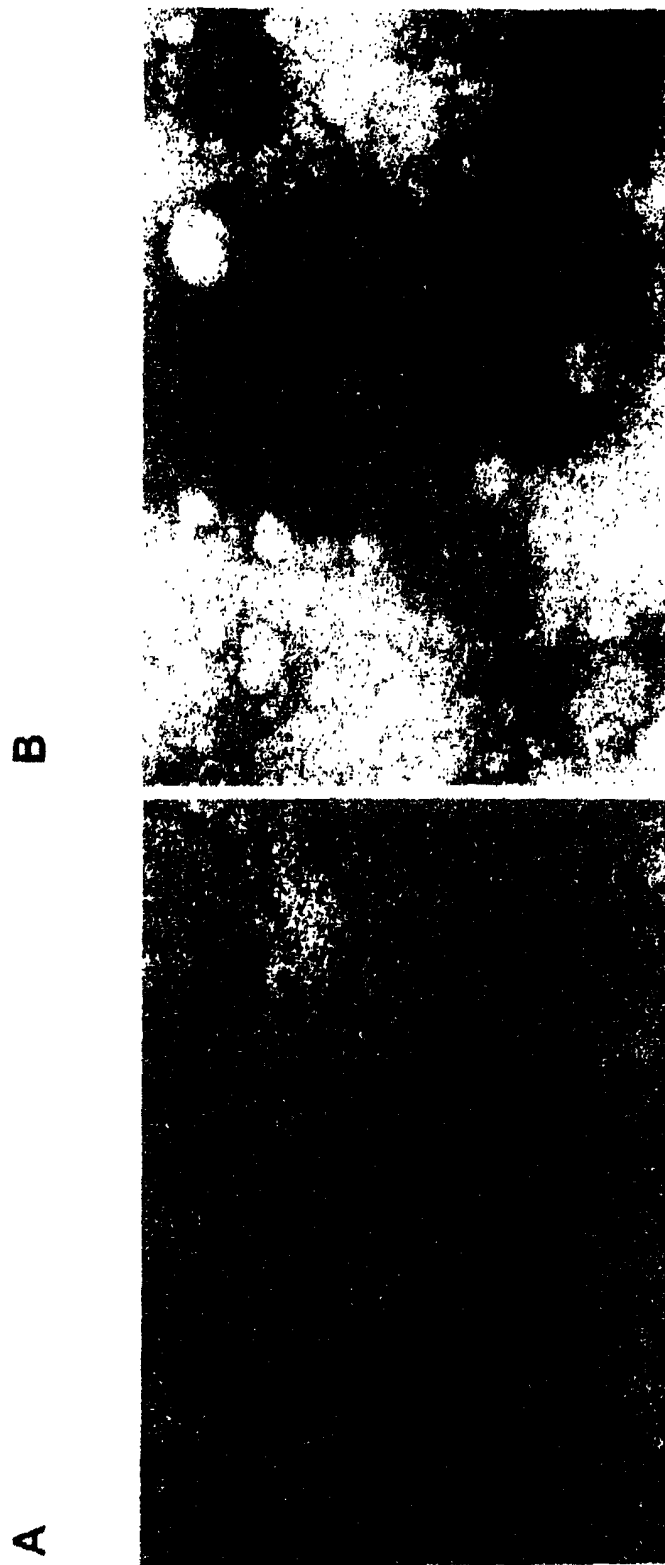
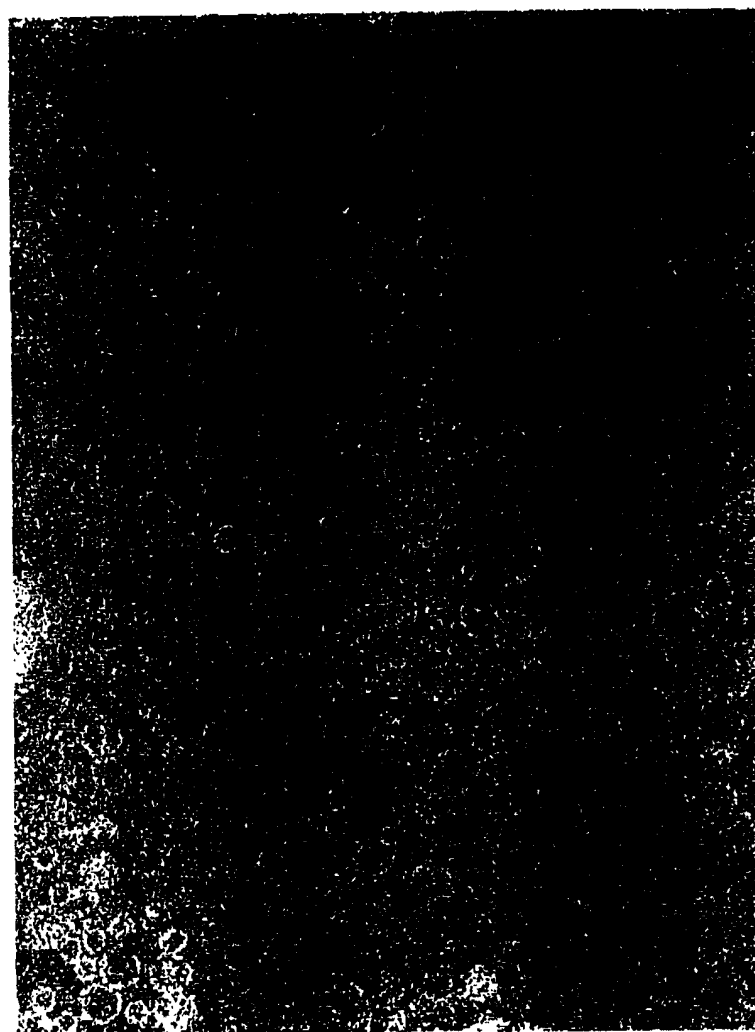


图 44



C

图 44

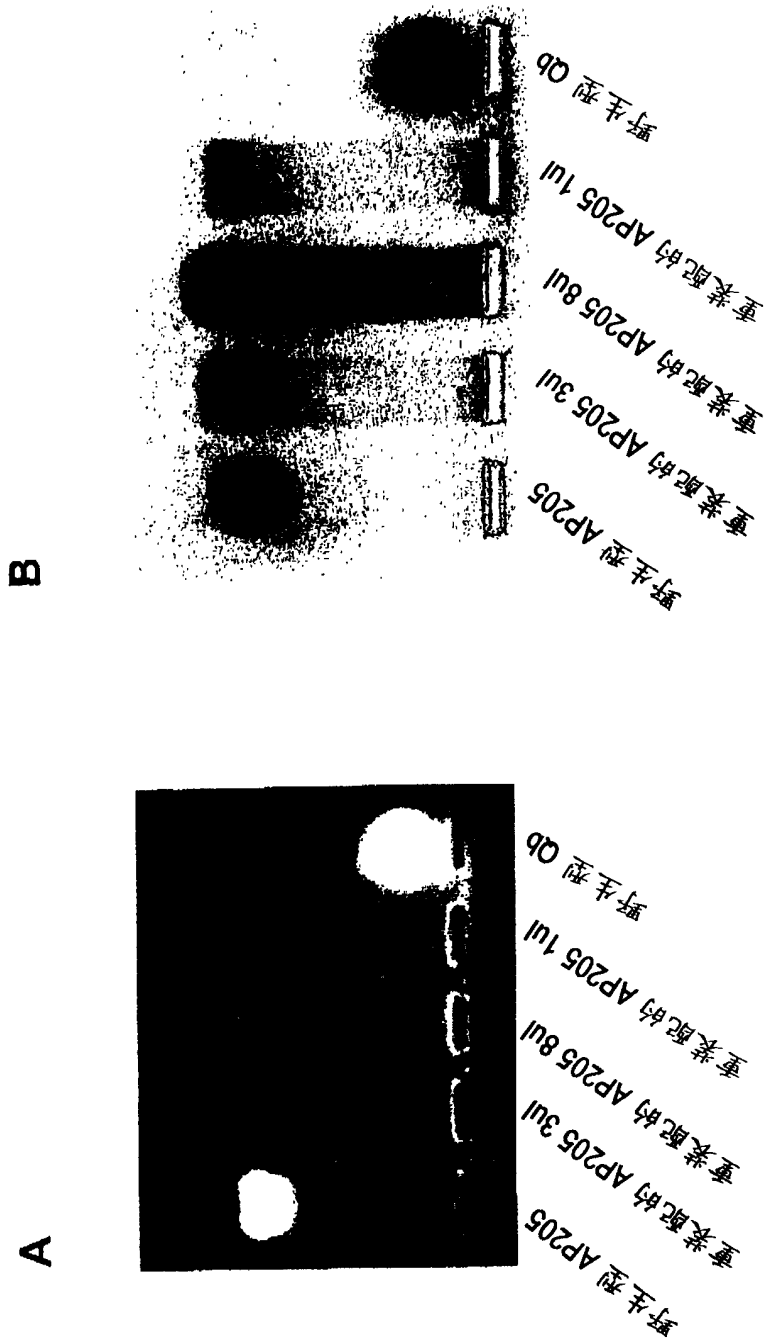


图 45

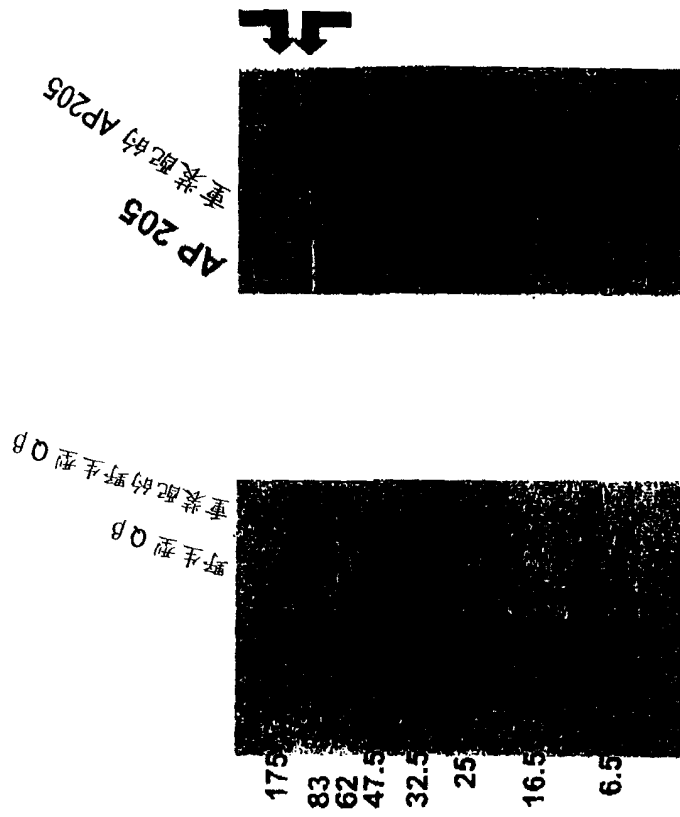


图 46

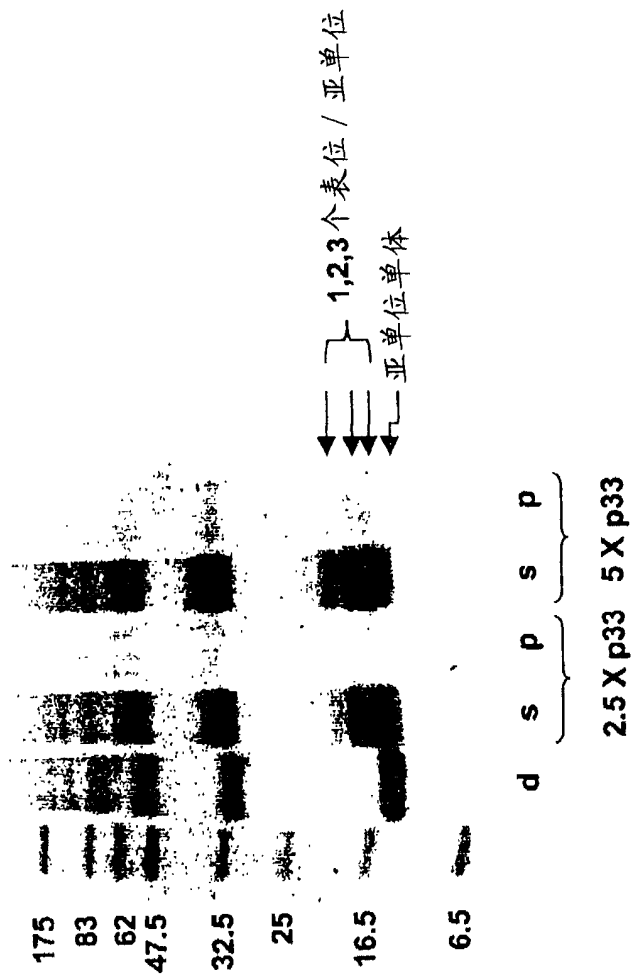


图 47

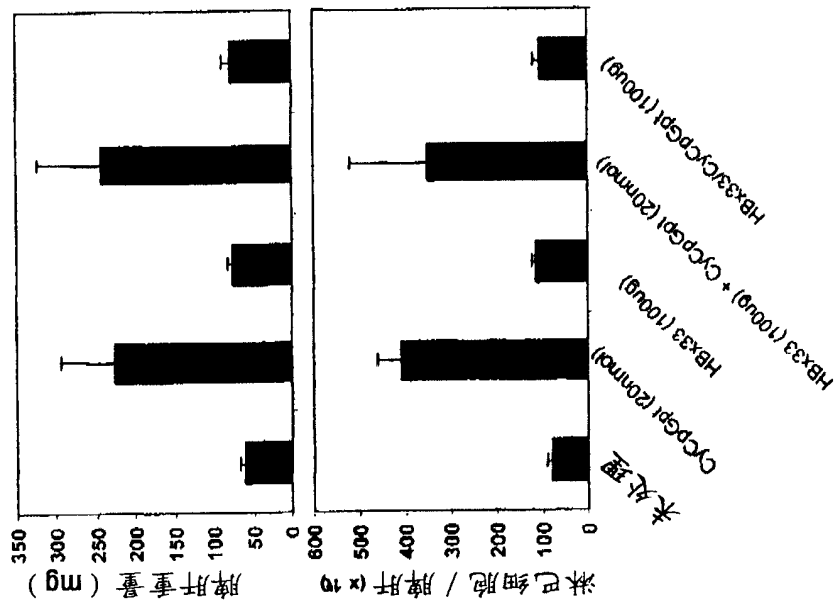


图 48

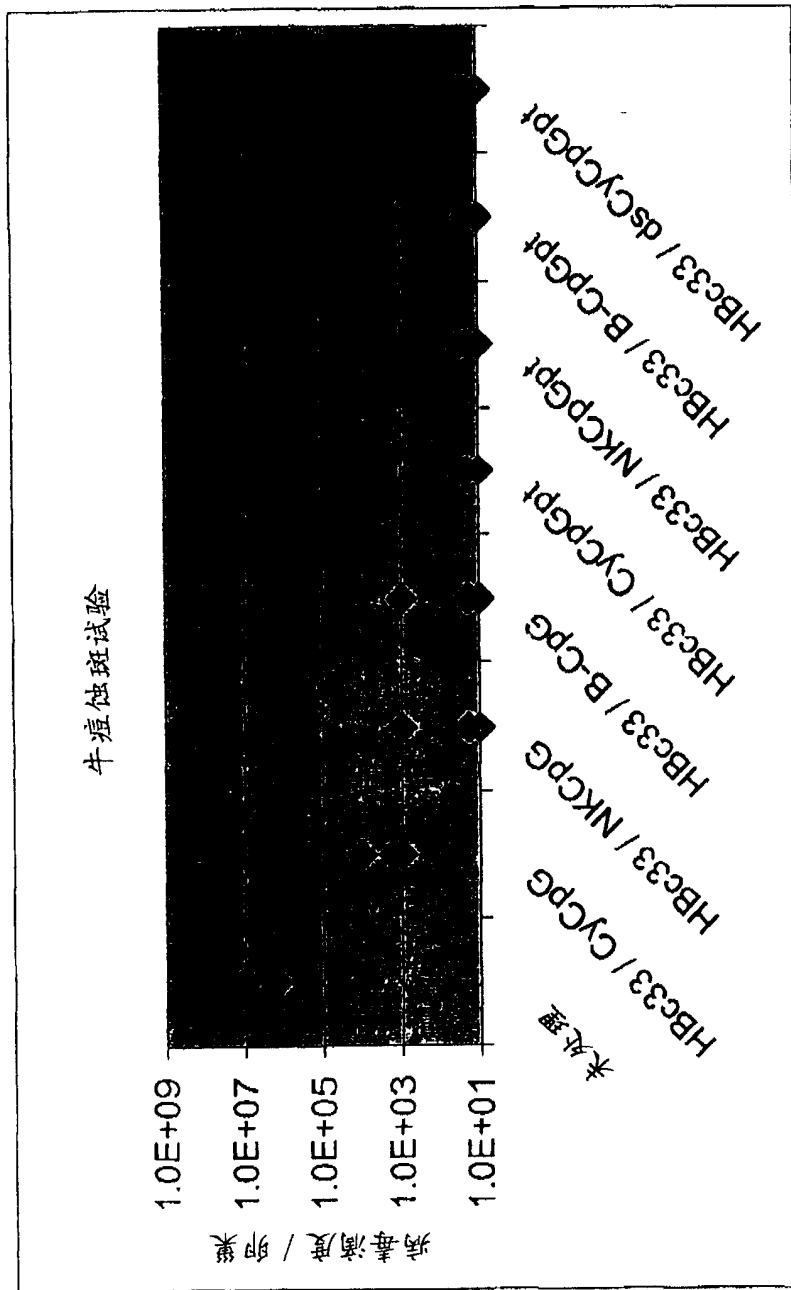


图 49



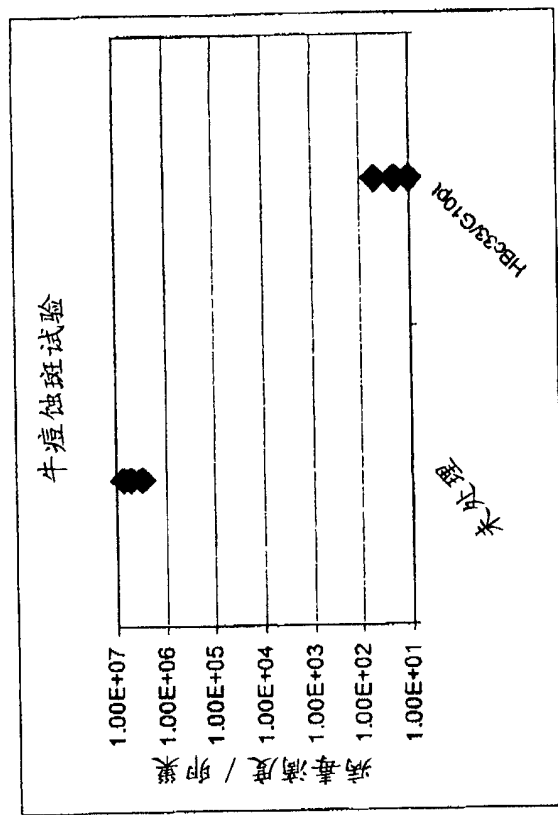


图 50

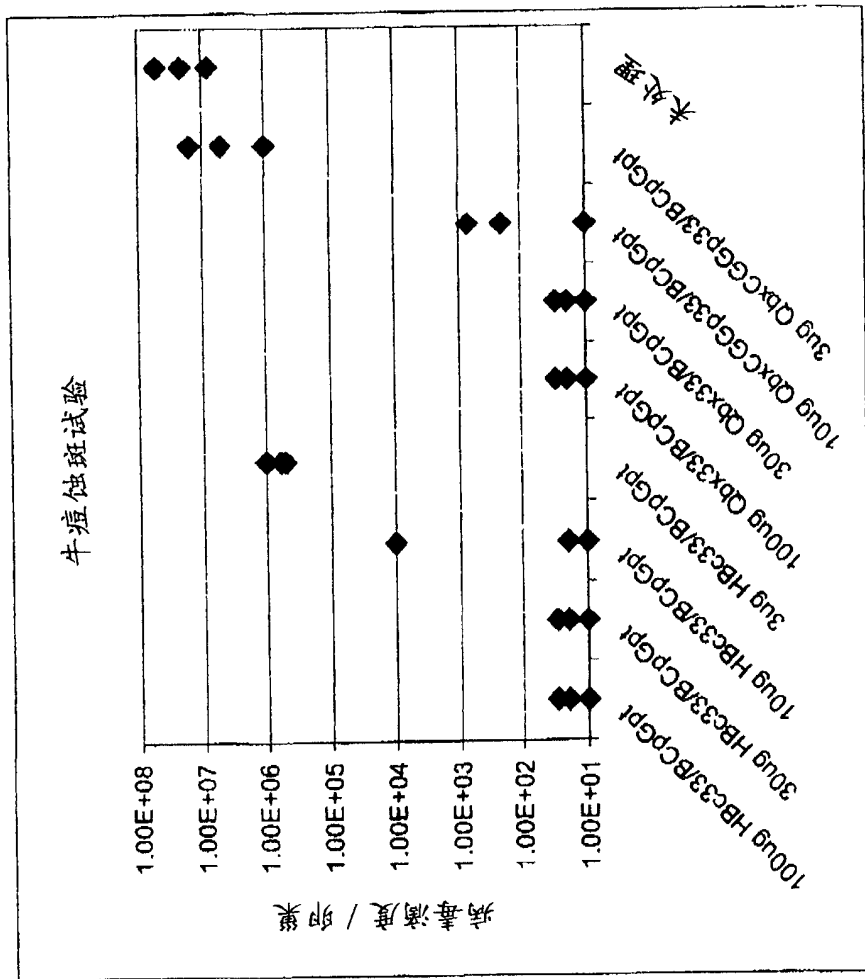


图 51

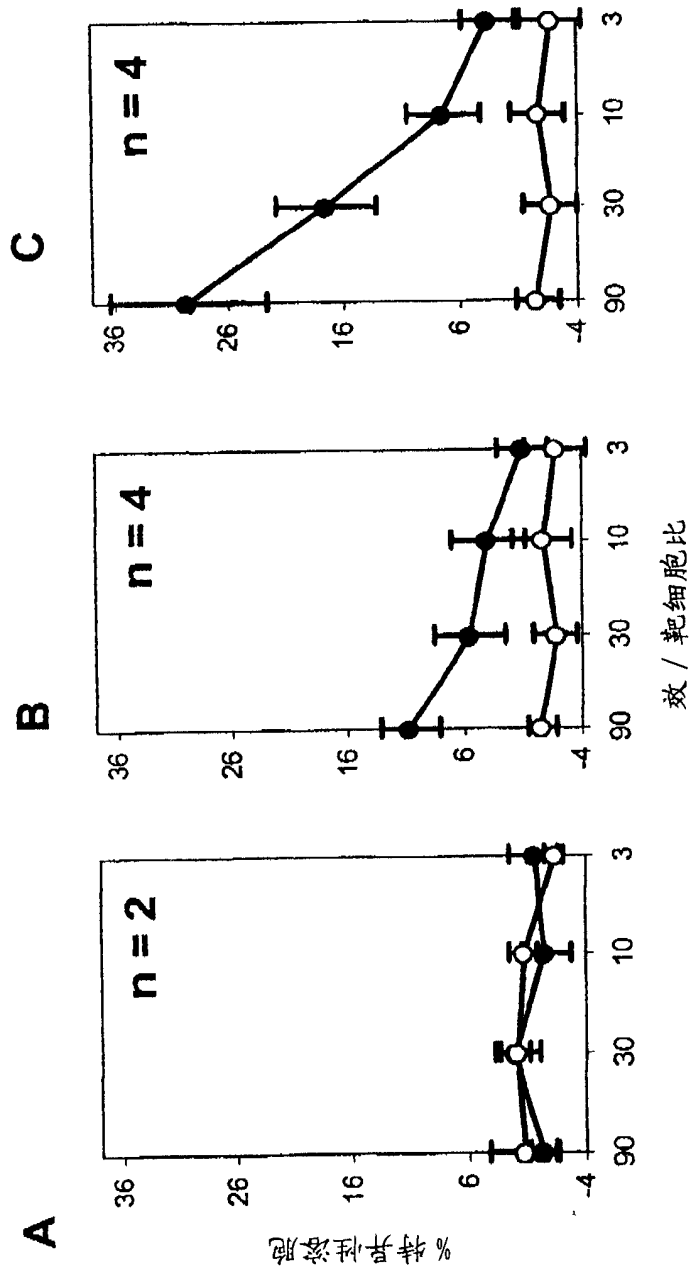


图 52

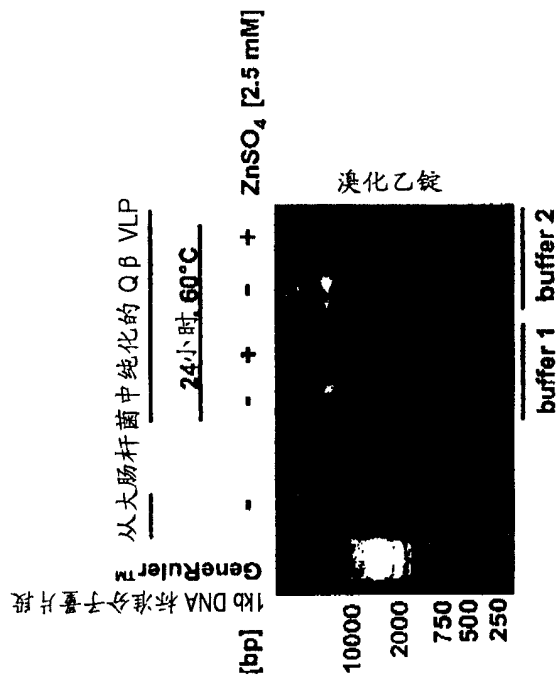


图 53

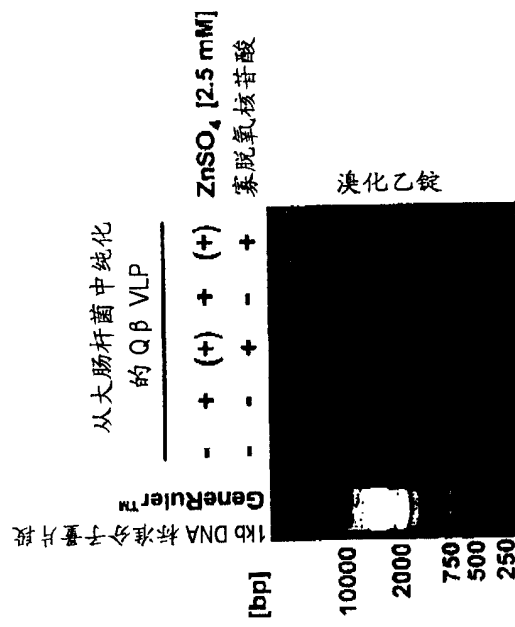


图 54

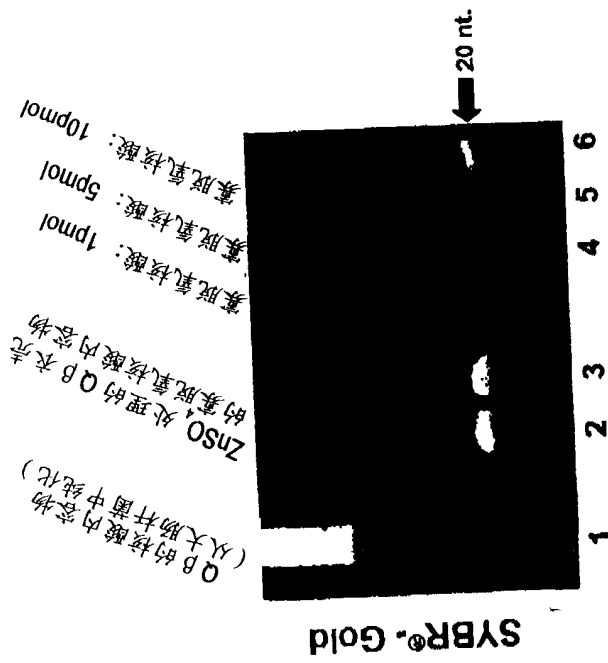


图 55