

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480010557.8

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 28 日

[11] 公开号 CN 101080239A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

C12N 15/51 (2006.01)

[22] 申请日 2004.2.20

[21] 申请号 200480010557.8

[30] 优先权

[32] 2003.2.21 [33] US [31] 10/372,076

[32] 2003.10.1 [33] US [31] 10/677,074

[86] 国际申请 PCT/US2004/005047 2004.2.20

[87] 国际公布 WO2004/075836 英 2004.9.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.19

[71] 申请人 洛伦蒂斯有限公司

地址 英国剑桥

[72] 发明人 M·帕格 M·弗里德

A·E·施密德特 D·施托伯尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝

权利要求书 9 页 说明书 96 页 序列表 87 页  
附图 8 页

[54] 发明名称

作为慢性肝炎治疗性疫苗的稳定性 HBc 嵌合体颗粒

[57] 摘要

公开了一种治疗慢性乙型肝炎的方法,所述方法包括将 T 细胞刺激量的疫苗给予患者。所述疫苗包含免疫原性量的嵌合的羧基端截短的乙型肝炎病毒核壳(核心)蛋白(HBc),所述蛋白经改造而增强了自我装配颗粒的稳定性并且其颗粒基本上不结合核酸。所述嵌合蛋白分子可包含一个或多个免疫原性表位,所述表位以肽键连接在 HBc 的 N 末端、免疫原性环和 C 末端中的一个或多个。因邻近所述嵌合分子的氨基端和羧基端的一端或两端存在至少一个异源半胱氨酸残基,从而获得了自我装配颗粒的增强的稳定性。

1. 一种治疗慢性肝炎的方法，所述方法包括：

(a) 给予慢性感染乙型肝炎病毒的患者 T 细胞刺激量的疫苗，所述疫苗包含溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的免疫原性颗粒，所述免疫原性颗粒包含重组乙型肝炎核心(HBc)嵌合蛋白分子，所述嵌合蛋白分子长度至多约为 550 个氨基酸残基并且含有

(i) HBc 分子 N 端 165 个氨基酸残基中至少约 125 个氨基酸残基的 HBc 序列，所述 HBc 分子包含 4 至约 75 位残基和约 85 至约 140 位残基的 HBc 序列，并且任选包含(a')以肽键连接的免疫原性表位，所述免疫原性表位位于所述嵌合体的 N 末端、HBc 优势免疫环中和 C 末端中的一个或多个；或(b')在 HBc 优势免疫环中的插入序列，所述插入序列的长度为 1 个至约 40 个氨基酸残基并且包含用于缀合半抗原的化学反应性接头残基，

(ii) 以下(a')和(b')之一或它们两者：(a')序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 1-3 个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置-20 至约+1，即 N 端半胱氨酸残基；和(b')位于从所述 HBc 序列 C 端残基开始向所述嵌合分子 C 端方向并且位于所述嵌合分子 C 端的约 30 个残基内的 1 个至约 3 个半胱氨酸残基，即 C 端半胱氨酸残基，

所述嵌合分子(a')所含有的 HBc 序列中的保守取代氨基酸残基不大于约 20%，(b')在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒，所述颗粒基本上不结合核酸，和

所述颗粒比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定：不含任何上述 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基，或者其中所提出的嵌合分子中存在的 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基被其它残基取代；和

(b) 让所述患者保持足够时间以诱导出抗 HBc 的活化 T 细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述以肽键连接的免疫原性表位或用于缀合表位的异源接头残基是免疫原性表位。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述免疫原性表位是 B 细胞表位。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有第二免疫原性表位，所述第二免疫原性表位在不同于第一免疫原性表位所键合的位置上以肽键连接在所述嵌合体的 N 末端、HBc 优势免疫环中或 C 末端。

5. 权利要求 3 的方法，其中所述 B 细胞表位以肽键连接在 HBc 序列氨基酸残基 76 和 85 之间的位置上，并且存在 HBc 序列 76 至 85 位中的至少 5 个残基。

6. 权利要求 5 的方法，其中在氨基酸残基 76 和 85 之间的 HBc 序列存在，但是被所述 B 细胞表位间隔开。

7. 权利要求 2 的方法，其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子还包括以肽键连接的免疫原性 T 细胞表位，所述 T 细胞表位在不同于第一免疫原性表位所键合的位置上以肽键连接在所述嵌合体的 N 末端、HBc 优势免疫环中或 C 末端。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述 T 细胞免疫原性表位以肽键连接 C 端 HBc 氨基酸残基。

9. 权利要求 8 的方法，其中存在至少一个所述 C 端半胱氨酸残基。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述嵌合体含有未被间隔的 4 位到至少 140 位的 HBc 氨基酸残基序列和一个在 HBc 嵌合蛋白分子 N 端的半胱氨酸残基。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述嵌合体含有未被间隔的 4 位至 149 位的 HBc 氨基酸残基序列。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述嵌合体含有存在于 HBc 优势免疫环中的用于缀合表位的异源接头残基。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述用于缀合表位的异源接头残基以肽键连接在 HBc 序列氨基酸残基 76 和 85 之间的位置上，并且至少存在 HBc 序列 76 至 85 位中的 4 个残基。

14. 权利要求 13 的方法，其中氨基酸残基 76 和 85 之间的 HBc 序列存在，但是被所述用于缀合表位的异源接头残基间隔开。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有 4 位到至少 140 位的 HBc 氨基酸残基序列。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述嵌合体含有 4 位至 149 位的 HBc 氨基酸残基序列。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述用于缀合表位的异源接头残基选自赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和酪氨酸残基。

18. 一种治疗慢性肝炎的方法，所述方法包括：

给予罹患慢性乙型肝炎病毒感染的患者 T 细胞刺激量的疫苗，所述疫苗由溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的免疫原性有效量的免疫原性颗粒组成，所述免疫原性颗粒由重组乙型肝炎病毒核心 (HBc) 蛋白嵌合分子组成，所述分子长度约 135 个至约 525 个氨基酸残基并且从其 N 端起含有 4 个以肽键连接的氨基酸残基序列结构域，所述结构域命名为结构域 I、II、III 和 IV，其中

(i) 结构域 I 包括约 71 个至约 110 个氨基酸残基，结构域 I 序列包含：(a') HBc 的至少 5 位至 75 位残基序列；(b') 序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 0-3 个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置 -20 至约 +1，即 N 端半胱氨酸残基；和 (c') 任选的免疫原性表位，所述免疫原性表位含有以肽键连接 HBc 残基 2-4 之一的至多约 30 个氨基酸残基；

(ii) 结构域 II 包括约 5 个至约 250 个氨基酸残基而且其以肽键连接结构域 I 的 HBc 残基 75，其中 (a) 存在 HBc 序列的 76-85 位中的零至所有残基，所述残基以肽键连接 (b) 任选存在的构成免疫原性表

位的 1 个至约 245 个氨基酸残基序列或用于缀合表位的异源接头残基;

(iii) 结构域 III 是从 86 位至 135 位的 HBc 序列而且其以肽键连接结构域 II 的残基 85; 和

(iv) 结构域 IV 包括(a') 136-149 位的 HBc 氨基酸残基序列中的 5-14 个残基而且其以肽键连接结构域 III 的 135 位残基, (b')自所述嵌合分子 C 端起约 30 个残基内的 0-3 个半胱氨酸残基, 即 C 端半胱氨酸残基, 和(c')免疫原性序列中的 0 至约 100 个氨基酸残基, 所述免疫原性序列对 165 位至 C 端的 HBc 来说是异源的,

所述嵌合分子(i)的 HBc 序列中不大于约 10%氨基酸残基被取代, (ii)在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒, 和(iii)含有至少一个 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基, 所述颗粒基本上不结合核酸并且比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定: (i)不含任何上述 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基, 或者(ii)其中所述嵌合分子中存在的所述半胱氨酸被其它残基取代。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有两个免疫原性表位。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有两个免疫原性表位, 所述表位存在于结构域 I 和 II、II 和 IV 或者 I 和 IV 中。

21. 权利要求 19 的方法, 其中所述两个免疫原性表位中的一个为 B 细胞表位。

22. 权利要求 19 的方法, 其中所述两个免疫原性表位中的一个为 T 细胞表位。

23. 权利要求 19 的方法, 其中所述两个免疫原性表位中的一个为相同或不同的 T 细胞表位。

24. 权利要求 18 的方法, 其中所述结构域 I 包括以肽键连接 HBc

残基 2-4 之一的免疫原性表位, 并且所述表位是 T 细胞表位。

25. 权利要求 18 的方法, 其中结构域 II 含有免疫原性表位并且所述表位是 B 细胞表位。

26. 权利要求 18 的方法, 其中对 165 位至 C 端的 HBc 来说是异源的所述序列是免疫原性 T 细胞表位而且其以肽键连接 HBc 残基 140-149 中的一个。

27. 权利要求 18 的方法, 其中结构域 II 含有一个用于缀合表位的异源接头残基。

28. 权利要求 24 的方法, 其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有 1-3 个位于所述嵌合分子 C 端约 30 个残基内的 C 端半胱氨酸残基。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有结构域 II 中存在的免疫原性表位, 所述表位是 B 细胞表位。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述 B 细胞表位含有 6 个至约 50 个氨基酸残基。

31. 权利要求 29 的方法, 其中所述 B 细胞表位含有 20 个至约 30 个氨基酸残基。

32. 权利要求 28 的方法, 其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有 1 个位于所述嵌合分子 C 端约 30 个残基内的半胱氨酸残基。

33. 权利要求 28 的方法, 其中在氨基酸残基 76 和 85 之间的 HBc 序列存在, 但是被所述免疫原性表位间隔开。

34. 权利要求 32 的方法, 其中所述半胱氨酸残基位于所述嵌合蛋白分子 C 端约 5 个氨基酸残基内。

35. 权利要求 18 的方法, 其中对 165 位至 C 端的 HBc 来说是异源的所述序列是免疫原性 T 细胞表位而且其以肽键连接 HBc 残基 140-149 中的一个。

36. 权利要求 18 的方法, 其中所述免疫原性表位或用于缀合表位的异源接头残基是用于缀合表位的异源接头残基。

37. 权利要求 36 的方法, 其中所述用于缀合表位的异源接头残

基选自赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和酪氨酸残基。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述重组 HBc 嵌合蛋白分子含有一个位于所述 HBc 嵌合蛋白分子 C 端的半胱氨酸残基。

39. 一种治疗慢性肝炎的方法，所述方法包括：

给予罹患慢性乙型肝炎病毒感染的患者 T 细胞刺激量的疫苗，所述疫苗由溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的免疫原性有效量的免疫原性颗粒组成，所述免疫原性颗粒由重组乙型肝炎病毒核心 (HBc) 蛋白嵌合分子组成，所述分子长度约 170 个至约 250 个氨基酸残基，所述分子从其 N 端起含有 4 个以肽键连接的氨基酸残基序列结构域，所述结构域命名为结构域 I、II、III 和 IV，其中

(a) 结构域 I 包括 HBc 4 位至 75 位残基序列以及至多约 25 个残基的第一序列，所述第一序列中以肽键连接所述 HBc 序列的氨基端残基，所述至多约 25 个残基的第一序列含有 0 或 1 个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置-14 至约+1，即 N 端半胱氨酸残基；

(b) 结构域 II 包括约 5 至约 55 个氨基酸残基而且其以肽键连接结构域 I 的 HBc 残基 75，其中至少存在 HBc 序列 76 至 85 位中的 4 个残基而且其以肽键连接任选的第二序列，第二序列至多约 50 个氨基酸残基而且所述第二序列对 76 至 85 位的 HBc 来说是异源的；

(c) 结构域 III 是从 86 位至 135 位的 HBc 序列而且其以肽键连接结构域 II 残基 85；和

(d) 结构域 IV 包括(i) 136-149 位的 HBc 氨基酸残基序列中的 5-14 个残基而且其以肽键连接结构域 III 的 135 位残基，(ii)在所述嵌合分子 C 端约 30 个残基内的 0 或 1 个半胱氨酸残基即 C 端半胱氨酸残基，和(iii)第三序列中的 0 至约 50 个氨基酸残基，第三序列对 165 位至 C 端的 HBc 来说是异源的，

所述嵌合分子(i)在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒，(ii)包括

至少总有一个所述 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基和(iii)相对于 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列中所示的序列来说, 其 HBc 序列中不大于约 5%的氨基酸残基被取代, 所述颗粒的 280nm 与 260nm 吸光度比值约 1.2 至约 1.7, 并且比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定: 缺乏所述 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基, 或者其中所述嵌合分子中存在的 N 端半胱氨酸或 C 端半胱氨酸残基被其它残基取代。

40. 权利要求 39 的方法, 其中结构域 II 的所述第二序列对 B 细胞表位进行限定。

41. 权利要求 40 的方法, 其中所述第二序列含有 15 个至约 50 个氨基酸残基。

42. 权利要求 40 的方法, 其中所述第二序列含有 20 个至约 30 个氨基酸残基。

43. 权利要求 40 的方法, 其中氨基酸残基 76 和 85 之间的 HBc 序列存在, 但是被所述第二序列间隔开。

44. 权利要求 40 的方法, 其中所述 B 细胞表位是存在于选自以下病原体中的氨基酸序列: 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)、人免疫缺陷病毒(HIV)、口蹄疫病毒、流感病毒、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、粘膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、柏氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)、约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)、表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、呼吸道合胞病毒(RSV)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)、曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)、乙型肝炎病毒(HBV)和埃博拉病毒(Ebola virus)。



45. 权利要求 40 的重组 HBc 嵌合蛋白分子，其中对 165 位至 C 端的 HBc 来说是异源的所述序列是免疫原性 T 细胞表位而且其以肽键连接 HBc 残基 140-149 中的一个。

46. 权利要求 45 的重组 HBc 嵌合蛋白分子，其中所述 T 细胞表位来自 HBV。

47. 权利要求 40 的重组 HBc 嵌合蛋白分子，其中所述 N 端半胱氨酸残基位于所述嵌合蛋白分子 N 端约 5 个氨基酸残基内。

48. 一种提高抗乙型肝炎病毒的一种或多种 $\gamma$ -生产 CD 8+ T 细胞、CD 4+ T 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞产量的方法，所述方法包括：

(a) 给予慢性感染乙型肝炎病毒的患者 T 细胞刺激量的疫苗，所述疫苗包含溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的免疫原性颗粒，所述稀释剂含有以下两种激动剂之一或它们两者：(a) toll 样受体-4 (TLR-4) 激动剂，和 (b) toll 样受体-9 (TLR-9) 激动剂，所述免疫原性颗粒包含重组乙型肝炎核心 (HBc) 嵌合蛋白分子，所述嵌合蛋白分子长度至多约为 550 个氨基酸残基并且含有

(i) HBc 分子 N 端 165 个氨基酸残基中至少约 125 个氨基酸残基的 HBc 序列，所述 HBc 分子包含 4 至约 75 位残基和约 85 至约 140 位残基的 HBc 序列，并且任选包含 (a') 以肽键连接的免疫原性表位，所述免疫原性表位位于所述嵌合体的 N 末端、HBc 优势免疫环中和 C 末端中的一个或多个；或 (b') 在 HBc 优势免疫环中的插入序列，所述插入序列的长度为 1 个至约 40 个氨基酸残基并且含有用于缀合半抗原的化学反应性接头残基，

(ii) 以下 (a') 和 (b') 之一或它们两者：(a') 序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 1-3 个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置 -20 至约 +1，即 N 端半胱氨酸残基；和 (b') 从所述 HBc 序列 C 端残基开始向所述分子 C 端方向并且位于所述嵌合分子 C 端的约 30 个残基内的 1 个至约 3 个半胱氨酸残基，即 C 端半胱

氨酸残基，

所述嵌合体分子(a')所含有的 HBc 序列中的保守取代氨基酸残基不大于约 20%，和(b')在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒，所述颗粒基本上不结合核酸，和

所述颗粒比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合体分子所形成的颗粒更稳定：不含任何上述 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基，或者其中所提出的嵌合体分子中存在的 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基被其它残基取代；和

(b) 让所述患者保持足够时间以诱导出抗 HBc 的活化 T 细胞。

49. 权利要求 48 的方法，其中所述 TLR-4 的激动剂与单磷酸脂质 A 在结构上相关。

50. 权利要求 49 的方法，其中与单磷酸脂质 A 在结构上相关的所述激动剂是氨基烷基葡糖胺磷酸酯。

51. 权利要求 48 的方法，其中将所述 TLR-4 激动剂和所述 TLR-9 激动剂中的一个或两个与所述药物可接受的稀释剂和所述免疫原性颗粒混合。

## 作为慢性肝炎治疗性疫苗的稳定性 HBc 嵌合体颗粒

### 相关申请的交叉引用

本申请是 2003 年 2 月 21 日申请的编号为 10/372,076 的部分继续申请，该申请本身又是 2002 年 2 月 21 日申请的编号为 10/080,299 和 2002 年 2 月 22 日申请的编号为 10/082,014 的部分继续申请，所述申请的公开内容通过引用结合到本文中。

### 技术领域

本发明涉及免疫学和蛋白质工程交叉领域，特别是涉及嵌合乙型肝炎病毒(HBV)核壳蛋白，所述核壳蛋白通过增强抗乙型肝炎病毒的免疫应答而在治疗慢性肝炎患者的疫苗中用作免疫原，并且所述核壳蛋白是经工程改造以通过 C 端半胱氨酸残基和 N 端半胱氨酸残基中的一个或两个增强自我装配颗粒的稳定性。

### 发明背景

全世界有超过 3.5 亿人是乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染携带者。HBV 是一种感染肝脏的病毒，能增加慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌(肝癌)的风险。乙型肝炎是超过 80%的肝细胞癌的诱因，而且在全世界每年夺取 1-2 百万人的生命，业已成为重要的公共卫生挑战，并且也代表了新型治疗药的不断增长的市场。

乙型肝炎感染的严重程度取决于感染时感染者免疫系统的状态。在分娩时，当乙型肝炎从母亲传给其婴儿时，乙型肝炎是非常严重的，因为婴儿免疫系统通常还没有建立抗该病毒的有效应答。结果，在分娩时感染的婴儿中有 90%发生慢性感染，其肝细胞癌的风险要高得多(20%至 30%)。如果在 1-5 岁发生感染，慢性感染的风

险下降到 25-50%。如果在儿童期后期或成年期发生感染，则慢性感染的机会仅为 2-6%。在成人期成为慢性感染的人群中，罕见肝细胞癌。

慢性携带者传染性高，其主要分为两类：(1)无症状的慢性迁延性乙型肝炎，其中大部分慢性携带者不会为其病症而就医，和(2)更严重的慢性活动性乙型肝炎，但是比慢性迁延性肝炎要少见。当带有无症状的慢性迁延性 HBV 的患者出现症状时，其症状可以相对较轻，例如疲劳、腹痛、虚弱、发热和对脂肪或酒精不耐受。该病并不总会发展成严重的肝病，但是少数患者可发展成慢性活动性乙型肝炎。慢性活动性乙型肝炎的后果包括肝硬化和原发性肝细胞癌 (PHC)。在肝硬化中，形成纤维组织，代替受损肝细胞。随后肝脏硬化、肿大并变形，最终可导致肝衰竭。PHC 在乙型肝炎的低流行区比较罕见，但在高流行区非常常见并且是致死的常见原因。

目前慢性乙型肝炎的治疗方法包括注射 4 个月干扰素 $\alpha$ -2。美国批准的干扰素 $\alpha$ -2 有 4 个品牌：Schering Plough 公司的 Intron<sup>®</sup> A、Amgen 公司的 Infergen、Hoffmann-La Roche 公司的 Roferon 和 GlaxoSmithKline 公司的 Wellferon。Intron<sup>®</sup> A 是唯一获准用于乙型肝炎的 $\alpha$ 干扰素，其它品牌仅获准用于丙型肝炎。

据信，干扰素 $\alpha$ 增加肝细胞表面的 I 类 MHC 分子数目，因而增强免疫细胞识别和破坏感染肝细胞的能力。干扰素 $\alpha$ 也增加在肝细胞中切割 HBV-RNA 的核糖核酸酶的数量，从而阻碍 HBV 的生长。

尽管干扰素 $\alpha$ 在某些人中可以完全消除慢性乙型肝炎感染，但是其应用因为超过半数患者对治疗无反应而受到限制。在慢性乙型肝炎患者中，干扰素 $\alpha$ 可通过减少其体内病毒数量并减缓对其肝脏的损害而减缓疾病。

干扰素 $\alpha$ -2 治疗的副作用可以很严重，以至于治疗开始时，会建议患者休息一两周。最常见的副作用是流感样症状——疲劳、发热、肌痛、浑身疼痛、寒战和恶心。也会发生温和的毛发稀疏和干燥、

皮肤瘙痒。

因为干扰素 $\alpha$ 疗法的无效性和副作用，所以正在研究抗病毒药和治疗性疫苗作为可能的替代治疗方案。第二代核苷类似物例如拉米夫定和泛昔洛韦已显示出有希望的结果。Zeffix<sup>®</sup> (拉米夫定)，即一种核苷逆转录酶抑制剂，是治疗慢性乙型肝炎的有希望的单药候选者，已获得 FDA 批准于 1999 年在美国上市和销售。其它正在评价中的抗病毒药包括 BMS200、475、更昔洛韦和阿德福韦二匹伏酯。以上候选者与干扰素 $\alpha$ 的联合疗法也正在研究之中。

Hoffman La Roche 和 Schering Plough 公司目前已向美国食品药品监督管理局(FDA)申请其所谓 PEG 化干扰素(名称为 PEGASYS<sup>™</sup> (Hoffman La Roche)和 PEG-INTRON<sup>™</sup> (Schering Plough Corp.))的上市。PEG 化干扰素是用聚乙二醇(PEG)修饰的 $\alpha$ 干扰素，以使它们可每周给药一次并在患者体内提供持续的干扰素水平。该 PEG 化制剂可避免因每周三次给药引起的干扰素水平的波峰和波谷和干扰素的副作用。PEG 化干扰素对单一疗法或联合疗法后的复发者尤其有益。

已经研究了疫苗方法以治疗慢性肝炎。Couillin 及其同事[Couillin 等(1999) *J. of Infect. Dis.*, **180**: 15-26]评价了用乙型肝炎表面抗原(HBsAg)接种是否能克服慢性肝炎患者对 HBsAg 的耐受性。他们确定 HBsAg 在一部分人群中是有效的。

也已在动物模型中进行了研究，以评价在该病的动物模型中是否可以诱导免疫应答。因此，Bocher 及其同事[Bocher 等(2001) *E. J. of Immun.*, **31**: 2071-2079]评价了在人源化(trimera)小鼠模型中针对接种的免疫应答。作为疾病模型，这些作者将 PBMC 从乙型肝炎慢性感染者转移到小鼠体内，然后用乙型肝炎核心蛋白(HBc)或编码乙型肝炎核心蛋白的 DNA 给这些小鼠接种。这些作者注意到，当用 HBc 或编码 HBc 的 DNA 免疫小鼠时，诱导出 HBc 特异性 T 辅助细胞和 B 细胞应答。这些作者还注意到，无论是 HBc 蛋白还是编码 HBc 的 DNA 都可以作为候选疫苗，用于抗慢性乙型肝炎感染的治疗性接种。

应当注意的是,在这些研究中,需要非常大剂量的 HBc 来诱导免疫应答。通过加入免疫刺激性寡核苷酸(ISN),可以进一步增强移植感染者 PBMC 的小鼠的免疫应答。

除了考虑主动接种外,也进行了被动免疫转移的尝试: Lau 及其同事[Lau 等(2002) *Gastroenterology*, **122**: 614-624]证明,将 HBV 免疫个体的骨髓转移给慢性感染者,导致感染被消除。感染消除与对 HBc 具有活性的 T 细胞的转移有关,这使得这些作者假定,在慢性乙型肝炎感染者体内,用 HBc 蛋白或[编码 HBc 的] DNA 进行治疗性免疫,是值得研究的。

因此,已经认识到乙型肝炎核心蛋白(HBc)是一种潜在有用的抗原,用于抗慢性乙型肝炎感染的治疗性接种。然而,将潜力付诸实施所必须解决的几个问题是: HBc 重组体的生产是困难的。正如下面将要讨论的,产率非常低,可能是因为 HBc 蛋白结合核酸的固有特性,此外,所得病毒样颗粒(VLP)难以纯化到法规可接受的水平。

因为生产 HBc 有困难,所以已经研究了替代方法,以在慢性 HBV 感染者体内诱导抗 HBc 免疫应答。因此,例如,转让给 Hultgren 和 Sallberg 的 WO 01/16163 提出了多个重叠合成肽的用途,所述肽包括几个跨越 HBc 序列 1-183 位的氨基酸残基序列。这些发明人提出,用跨越完整蛋白的肽混合物进行免疫,可在慢性感染者体内诱导免疫应答,促进对病毒的清除。也已采用编码 HBc 蛋白的 DNA 来免疫慢性感染 HBV 的黑猩猩[Sallberg 等, (1998) *Human Gene Therapy* **10**: 1719-1729]。采用编码蛋白的 DNA,克服了纯化蛋白的需要,但是 DNA 接种在人类的成功率并不显著。

授予 Thoma 的美国专利第 6,020,167 号公开了一种据称用于治疗慢性 HBV 感染的疫苗。该疫苗包括具有一种或多种 HBV Pre-S1 或 HBV 核心 T 细胞激活表位的多肽,所述表位结合到能够呈递多肽的载体上。优选据称能形成颗粒的、具有 HBV 核心和表面蛋白(分别为 HBc 和 HBsAg)完整部分或基本部分的载体作为要求保护的载体。

正如下面将要讨论的,完整的核心蛋白趋向于结合核酸,这对疫苗生产来说是个问题。另外,羧基端截短以减少核酸结合的核心分子可能是不稳定的并且可在疫苗中提供不均一混合物。

嗜肝 DNA 病毒科(hepadnaviridae)是有包膜的含 DNA 动物病毒,可在人类引起乙型肝炎(HBV)。嗜肝 DNA 病毒科包括其它哺乳动物乙型肝炎病毒和禽类乙型肝炎病毒,例如土拨鼠乙型肝炎病毒(WHV)和地松鼠乙型肝炎病毒(GSHV),以及鸭乙型肝炎病毒(DHV)和鹭鸶乙型肝炎病毒(HeHV)。本文使用的乙型肝炎病毒(HBV)是指嗜肝 DNA 病毒科成员,与感染禽类宿主的病毒相比,其感染哺乳动物,除非讨论涉及具体的非哺乳动物病毒的实例。

哺乳动物乙型肝炎病毒(HBV 或嗜肝 DNA 病毒)的核壳或核心含有一个 183 或 185 个氨基酸残基的序列(这取决于病毒亚型),而鸭病毒衣壳含有 262 个氨基酸残基。几种嗜肝 DNA 病毒科的乙型肝炎核心蛋白单体在感染细胞中自我装配成为稳定的聚集体,称为乙型肝炎核心蛋白颗粒(HBc 颗粒)。据报道,HBc 颗粒有两种三维结构。第一种包含次要群体,该群体含有 90 个拷贝的 HBc 二聚体亚基蛋白或 180 个单独的单体蛋白,而第二种即主要群体含有 120 个拷贝的 HBc 二聚体亚基蛋白或 240 个单独的单体蛋白。这些颗粒被认为分别是  $T=4$  或  $T=3$  的颗粒,其中“T”是三角划分数。这些感染人类的病毒(人类病毒)的 HBc 颗粒直径分别约为 30nm 或 34nm。Pumpens 等(1995) *Intervirology*, **38**: 63-74; 和 Metzger 等(1998) *J. Gen. Virol.*, **79**: 587-590。

Conway 等, (1997) *Nature*, **386**: 91-94 描述了在 9Å 分辨率下用低温电子显微照相观察到的人类 HBc 颗粒的结构。Bottcher 等(1997), *Nature*, **386**: 88-91 描述了所述多肽折叠成人类 HBc 单体,并且提供了氨基酸残基形成 $\alpha$ -螺旋区及其连接环状区的近似编号模式。Zheng 等(1992), *J. Biol. Chem.*, **267** (13): 9422-9429 报道,核心颗粒的形成并不依赖于富含精氨酸的 C 端结构域,核酸结合或二硫键形成是根据

他们对缺乏一个或多个半胱氨酸的突变蛋白的研究以及其他人用 C 端截短的蛋白进行的工作[Birnbaum 等, (1990) *J. Virol.* **64**, 3319-3330]。

已经公开了乙型肝炎核壳或病毒核心蛋白(HBc)作为免疫原性载体部分, 该部分刺激免疫宿主动物的 T 细胞应答。参见例如美国专利第 4,818,527 号、第 4,882,145 号和第 5,143,726 号。该载体特别有用的用途是其在优势免疫环(immunodominant loop)部位呈递外源或异源 B 细胞表位的能力, 所述表位存在于从所述蛋白的氨基端(N 端)起约 70-90 位残基上, 更常见在约 75-85 位残基上。Clarke 等(1991) F. Brown 等编著, *Vaccines 91*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 313-318 页。

在病毒复制过程中, HBV 核壳与病毒 RNA 前基因组、病毒逆转录酶(Pol)和末端蛋白(来自 Pol)缔合, 形成可复制的核心(replication competent core)。核壳和病毒 RNA 前基因组之间的缔合是由羧基端(C 端)富含精氨酸区介导的。当在异源表达系统(例如在不存在病毒 RNA 前基因组的大肠杆菌(*E. coli*))中表达时, 鱼精蛋白样 C 端(即在 150 至 183 位残基)可以结合大肠杆菌 RNA。Zhang 等(1992) *JBC*, **267** (13) 9422-29。

在用作疫苗部分中, 优选 HBV 核壳不结合来自宿主的核酸。Birnbaum 等(1990) *J. Virol.*, **64**: 3319-3330 证明, HBV 核壳的鱼精蛋白样 C 端结构域可以缺失而不干扰该蛋白装配成病毒样颗粒的能力。因此, 据报道, 截短至约 144 位的蛋白(即含有从 1 至约 144 位的 HBc 序列)可自我装配, 而缺失超过残基 139 则不能进行衣壳装配[Birnbaum 等, (1990) *J. Virol.*, **64**: 3319-30; 和 Seifer 等, (1995) *Intervirology*, **38**:47-62]。

Zlotnick 等, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **94**: 9556-9561 研究了全长和截短 HBc 蛋白的颗粒装配。除了讨论全长分子外, 这些作者还报道了含有 1-149 位 HBc 序列的截短蛋白的制备方法, 其中 48、



61 和 107 位的半胱氨酸各自被丙氨酸取代, 并且其中在 C 端(150 位)添加了一个半胱氨酸残基。该 C 端的硫醇在电子显微镜下进行标记时用于连接金原子簇。

新近, Metzger 等(1998) *J. Gen. Virol.*, **79**: 587-590 报道, 人类病毒序列 138 位上的脯氨酸(Pro-138 或 P138)是颗粒形成所必需的。这些作者也报道, 在羧基端截短到 142 和 140 残基长度的颗粒装配能力受到影响, 而截短到 139 和 137 残基的长度会引起装配能力的完全丧失。

几个研究小组已经证明, 截短颗粒与标准乙型肝炎核心颗粒相比, 表现出稳定性降低[Galena 等(1989) *J. Virol.*, **63**: 4645-4652; Inada 等(1989) *Virus Res.*, **14**: 27-48], 显示出在纯化制备物中颗粒大小的变异性 and 颗粒片段的存 在[Maassen 等, (1994) *Arch. Virol.*, **135**: 131-142]。因此, 在 Metzger 等(同上)的报道之前, Pumpens 等, (1995) *Intervirology*, **38**: 63-74 已总结了文献报道, 确定自我装配所需 HBc 序列羧基端的边缘位于氨基酸残基 139 和 144 之间, 而且前两个或三个氨基端残基可以被其它序列取代, 但是如果去掉 4 个或 11 个氨基端残基, 则嵌合蛋白在转化的大肠杆菌细胞中将完全消失。

已经通过在各种生物体中进行异源表达, 来制备重组产生的带有内部插入序列的杂合 HBc 颗粒(在本领域中称为 HBc 嵌合颗粒或 HBc 嵌合体), 所述颗粒含有多种插入多肽序列, 所述生物体包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、痘苗病毒(*Vaccinia*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。参见例如 Pumpens 等(1995) *Intervirology*, **38**: 63-74, 及其中引用的几个研究小组的工作。

当用电子显微镜进行分析时, 与缺失异源表位的颗粒相比, 这样的 HBc 嵌合体常呈现出有序程度较低的结构[Schodel 等, (1994) *J. Exp. Med.*, **180**: 1037-10461。在某些情况下, 将异源表位插入到 C 端截短的 HBc 颗粒中, 会产生显著的去稳定作用, 以至于杂合颗粒在

异源表达后不能复原[Schodel 等(1994) *Infect. Immunol.*, **62**: 1669-1676]。因此,许多嵌合 HBc 颗粒不稳定,以至于它们在纯化过程中因裂解而无法复原,或者它们显示出很差的稳定性,对疫苗开发造成困难。

上述 Pumpens 等(1995) *Intervirology*, **38**: 63-74 的报告中列举了形成颗粒的嵌合体,其中插入的多肽序列位于其 N 端、C 端和两端之间。在该文中报道的插入片段长度:在 N 端为 24-50 个残基,内部为 7-43 个残基,在 C 端为 11-741 个残基。

最近, Kratz 等, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **96**: 1915-1920 中公开了大肠杆菌表达的嵌合 HBc 颗粒,该颗粒包含内部融合 238 个残基的绿色荧光蛋白(GFP)的截短 HBc 序列。该嵌合体含有邻接一对富含甘氨酸柔性连接臂的插入 GFP 序列,该连接臂取代 HBc 的氨基酸残基 79 和 80。这些颗粒据称在兔子(作为宿主动物)体内能有效诱发抗天然 GFP 抗体。

美国专利第 5,990,085 号公开了由抗原性牛抑制素肽融合到以下结构中而成的两种融合蛋白:(i)残基 78 和 79 之间的免疫原性环和(ii)羧基端截短的 HBc 的残基 144 后。据称,当给予宿主动物时,表达的融合蛋白诱导产生抗抑制素抗体。据该专利报道,免疫后 30 天的滴度相当低,对于具有所述环插入的融合蛋白,为 1:3000-15,000,而对于在残基 144 后插入的融合蛋白为 1:100-125。

美国专利第 6,231,864 号公开了连接半抗原的战略性修饰的乙型肝炎核心蛋白的制备方法和用途。该修饰核心蛋白含有一个长度约 1 个至约 40 个残基的插入片段,该片段含有一个化学反应性氨基酸残基,半抗原悬挂连接(pendently linked)到该残基上。

WO 01/27281 公开了通过天然分子含有 C 端半胱氨酸的序列的存在与否,可改变抗 HBc 的免疫应答,从 Th1 应答变成 Th2 应答。其公开内容也记载了通过 C 端半胱氨酸形成的二硫化物可有助于使颗粒稳定。据称,优选紧接着其 C 端半胱氨酸上游存在的天然 HBc

序列的几个残基，但并不是必需的。据称，一个可用来取代截短 C 端的 HBc 序列的这样的替代物，包含一个 C 端半胱氨酸和一个对来自不同于 HBc 的表位进行限定的任选序列。

已公布的 PCT 申请 WO 01/98333 公开了，缺失的 4 个精氨酸重复序列中的一个或多个存在于天然 HBc C 端上，同时保留了 C 端半胱氨酸残基。该申请也公开了缺失区可以被来自不同于 HBc 的蛋白的表位取代，使得如此形成的所述分子的 HBc 部分对于添加的表位来说起到载体的作用。

已经公布的对应于 PCT/US01/25625 (于 2002 年 2 月 21 日公布的 WO 02/13765 A2)和 PCT/US01/41759 (于 2002 年 2 月 21 日公布的 WO 02/14478 A2)的 PCT 申请中公开了可以通过在嵌合蛋白中采用一个或多个添加的半胱氨酸残基，来达到 C 端截短的 HBc 颗粒(其颗粒由该嵌合蛋白装配而来)的稳定性。据介绍，这些添加的半胱氨酸残基在所述嵌合蛋白的 C 端上或其附近。

可以保留全长 HBc 颗粒稳定性、同时又消除全长 HBc 颗粒的核酸结合能力的结构特征，在采用嗜肝 DNA 病毒核壳传递系统的疫苗开发中非常有利。确实，Ulrich 等在其对采用 HBc 嵌合体作为外源表位载体的近期综述[*Adv. Virus Res.*, **50**: 141-182 (1998) Academic Press]中，指出了在人用疫苗中采用这样的嵌合体有待解决的 3 个潜在问题。第一个潜在的问题是嵌合疫苗中核酸的无意转移(inadvertent transfer)给免疫宿主。第二个潜在问题是先前存在的抗 HBc 免疫的干扰作用。第三个潜在问题涉及需要再生产性制备完整的嵌合体颗粒并可耐受长期贮存。

以上 4 个已经公布的 PCT 申请看来都记载了用于克服 Ulrich 等在上文中公开这些潜在问题的内容，如下文中公开的，本发明提供另一种 HBc 嵌合体，该嵌合体提供预料不到的高滴度的抗流感抗体，并且在一方面也提供解决 HBc 嵌合体稳定性以及该构建体核酸结合能力基本上缺失等方法。另外，一种所提出的重组嵌合体表

现出针对先前存在的抗 HBc 抗体的最小抗原性(如果有的话)。

尽管以上对颗粒不稳定性的发现涉及 N 端截短的 HBc 嵌合分子, Neiryneck 等, (1999 年 10 月) *Nature Med.*, **5(10)**: 1157-1163 报道了大肠杆菌中表达的 HBc 嵌合体的颗粒形成, 该嵌合体含有在残基 5 与全长 HBc 融合的流感 M2 蛋白 N 端 24 个残基部分。

前面讨论的带有截短 C 端的杂合 HBc 蛋白在疫苗应用中的用途, 比其全长对应物来说有几个优点, 包括增加的表达水平和缺乏对大肠杆菌 RNA 的结合。然而, 经工程改造以展示异源表位的 C 端截短颗粒通常是不稳定的, 导致颗粒或者在表达后不能缔合成稳定的颗粒结构, 或者在纯化中和/或纯化后容易解离成非颗粒结构。所述稳定性的缺乏, 表现为由嵌合 HBc 分子组成的颗粒, 该嵌合 HBc 分子是 C 端截短到 HBc 149 位并且还含有上述甲型流感 M2 蛋白残基 1-24。

其他人报道, 在野生型嗜肝 DNA 病毒核心抗原中, HBcAg 起始密码子上游的半胱氨酸残基直接参与阻止颗粒的形成[Schodel 等(1993 年 1 月 15 日) *J. Biol. Chem.*, **268 (2)**: 1332-1337; Wasenauer 等(1993 年 3 月) *J. Virol.*, **67 (3)**: 1315-1322; 和 Nassal 等(1993 年 7 月) *J. Virol.*, **67 (7)**: 4307-4315]。这三个研究小组都报道, 在野生型 HBeAg 中, 在前核心序列-7 位的半胱氨酸残基(当从-30 位上游启动子甲硫氨酸翻译核心基因时存在所述残基)负责阻止颗粒形成, 并因而促进颗粒 HBcAg 转变为分泌型非颗粒 HBeAg。

下文讨论的本发明的一个方面是提供一种蛋白免疫原, 所述免疫原预计用于给予乙型肝炎病毒慢性感染者, 以克服上述生产和污染等问题。此外, 所述蛋白已经工程改造, 以保持物理稳定性, 并能诱导尤其是用于清除体内已有的乙型肝炎病毒感染的免疫应答。

在下文中详细描述的本发明提供了用于治疗慢性肝炎的疫苗, 所述疫苗克服了先前已观察到的有关疫苗的几个问题。因此, 所提出的疫苗通过提供尤其可用于清除体内已存在的乙型肝炎病毒感染

的 T 细胞活化，诱导增强的免疫应答，并且利用稳定而均一的、同时也基本上缺乏核酸结合的载体分子。

### 发明概述

本发明提出一种治疗乙型肝炎病毒慢性感染者的方法，即通过给予该患者一种由溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的重组截短的和稳定化嗜肝 DNA 病毒核壳蛋白颗粒组成的疫苗，其用量足以加强慢性乙型肝炎病毒感染者对该病毒的免疫应答。单用或与其它疗法联用的如此增加的抗该病毒免疫应答，可以使该个体清除体内病毒并且不再被感染。优选重组截短的和稳定化嗜肝 DNA 病毒核壳蛋白基本上不含宿主核酸。

所述方法利用由重组嗜肝 DNA 病毒核壳蛋白即乙型肝炎核心(HBc)嵌合蛋白[本文中也称为嵌合乙型肝炎核心蛋白分子、HBc 嵌合分子或者就称为嵌合体]组成的疫苗，所述蛋白在宿主细胞中表达后可自我装配成颗粒，并且将其溶解或分散在药物可接受的稀释剂中。相对于其 C 端通常在约 183 位残基的天然核心分子来说，所提出的嵌合分子至少在 C 端被截短。含有所提出的嵌合分子的颗粒优选在 N 端或 C 端或这两端上或其附近被半胱氨酸残基稳定化。所提出的嵌合分子含有 HBc N 端 165 个氨基酸残基中约 125 个氨基酸残基至所有残基，并且可包括一个或多个其它氨基酸残基或残基序列，这些残基或残基序列通常是 HBV 的 B 细胞表位或 T 细胞表位、其它病原体蛋白或其它蛋白例如牛抑制素。

在本发明的一个方面，一种所提出的治疗慢性肝炎的方法包括下述步骤：给予慢性乙型肝炎病毒感染者抗 HBc 的 T 细胞刺激量的疫苗，所述疫苗由溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的免疫原性颗粒组成。优选免疫原性颗粒与免疫刺激佐剂联合用药。优选的免疫刺激佐剂包括脂质 A 类似物，例如单磷酸脂质 A 或合成的氨基烷基葡萄糖胺磷酸酯。免疫刺激分子优选与微颗粒载体例如水包油乳剂

或微颗粒矿物盐类例如氢氧化铝凝胶缔合。免疫原性颗粒本身由重组乙型肝炎核心(HBc)嵌合蛋白分子组成,其嵌合蛋白分子长度至多约为550个氨基酸残基。这些嵌合蛋白分子(a)含有HBc分子N端165个氨基酸残基中约125个氨基酸残基至所有氨基酸残基的HBc序列并且有4至约75位残基和约85至约140位残基的HBc序列。HBc嵌合分子序列任选包含:(a')以肽键连接的含有免疫原性表位的氨基酸序列,所述免疫原性表位位于所述嵌合体的N末端、HBc优势免疫环(即在约76至约85位残基之间)中和C末端中的一个或多个;或(b')在HBc优势免疫环中的插入序列,所述插入序列的长度为1个至约40个氨基酸残基并且包含用于缀合半抗原的化学反应性接头残基;或(c')76-85位序列的零至所有残基。

所述嵌合蛋白分子也含有以下(a')和(b')之一或它们两者:(a')序列中其氨基酸位置不同于HBc前核心序列的1-3个半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从SEQ ID NO: 1的HBc序列N端计算的氨基酸位置-20至约+1 [N端半胱氨酸残基];和(b')从HBc序列C端残基开始向所述分子C端方面并且位于所述嵌合分子C端的约30个残基内的1个至约3个半胱氨酸残基 [C端半胱氨酸残基]。

嵌合蛋白分子所含有的HBc序列中的保守取代氨基酸残基不大于约20%并且自我装配成颗粒。在宿主细胞表达(然后收集和纯化)中,优选这些颗粒基本上不结合核酸(表现出280nm与260nm吸光度比值约1.2至约1.7,如下所讨论),但也可包含最少量的结合核酸,使得280nm与260nm吸光度比值约0.9至约1.15。因此,本文可以使用280nm与260nm吸光度比值约0.9至约1.7的颗粒。所述颗粒比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的HBc嵌合分子所形成的颗粒更稳定:(i)不含任何上述C端半胱氨酸残基或N端半胱氨酸残基,或者(ii)其中所提出的嵌合分子中存在的C端半胱氨酸残基或N端半胱氨酸残基被其它残基取代。

让所述患者保持足够时间以诱导出抗 HBc 的活化 T 细胞。在本发明的其它方面，所述患者用抗病毒药例如拉米夫定进行治疗，以降低病毒载量。抗病毒药物治疗可以与接种同时进行，或者可以在接种之前进行。本发明所提出的一个方面包括一种药盒，所述药盒包括用于给予患者的抗病毒药和 HBc 嵌合体。

在本发明的其它方面，所述患者血清中含有 HBsAg，所述治疗使得患者血清中该抗原量降低。在本发明的另一方面，所述患者血清中含有 HBeAg，所述治疗使得患者血清中 HBeAg 抗原量降低。

优选的重组乙型肝炎病毒核心(HBc)蛋白嵌合分子长度约 135 个至约 525 个氨基酸残基，从其 N 端起含有 4 个以肽键连接的氨基酸残基序列结构域，命名为结构域 I、II、III 和 IV。

该嵌合分子的结构域 I 包括约 71 个至约 110 个氨基酸残基，其序列包含：(i) HBc 的至少 5 位至 75 位残基序列；(ii) 序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 0-3 个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置 -20 至约 +1 [N 端半胱氨酸残基]；和 (iii) 任选的免疫原性表位，所述表位含有以肽键连接 HBc 残基 2-4 之一的至多约 30 个氨基酸残基。

该嵌合分子的结构域 II 包括至多约 255 个氨基酸残基而且其以肽键连接结构域 I 的 HBc 残基 75，其中：(i) 存在 HBc 的 76-85 位序列中的零至所有残基，所述残基以肽键连接(ii) 任选存在的构成免疫原性表位的 1 个至约 245 个氨基酸残基或缀合表位的一个接头残基的序列。

嵌合体结构域 III 是从 86 位至 135 位的 HBc 序列而且其以肽键连接结构域 II 的残基 85。

嵌合分子结构域 IV 包括：(i) 136-165 位的 HBc 氨基酸残基序列的 5-30 个残基而且其以肽键连接结构域 III 的 135 位残基；(ii) 位于嵌合分子 C 端的约 30 个残基内的 0-3 个半胱氨酸残基 [C 端半胱氨酸

残基]; 和(iii)免疫原性序列中的 0 至约 100 个氨基酸残基, 所述序列与存在于 HBc 的 165 位到其 C 末端的序列不同。

一个优选的嵌合分子(i)具有所述嵌合体的 HBc 序列中的氨基酸残基不大于约 10%被取代的氨基酸残基序列, 和(ii)在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒。所述颗粒基本上不结合核酸, 并且比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定: (i)不含任何上述 C 端半胱氨酸残基和缺乏 N 端半胱氨酸残基, 或者(ii)其中所提出的嵌合分子中存在的 N 端半胱氨酸残基被其它残基取代。

在一些实施方案中, 优选结构域 I 的 HBc 序列包括 5 位至 75 位残基以及至少一个 N 端半胱氨酸残基。在其它实施方案中, 优选所提出的嵌合分子不仅含有 N 端半胱氨酸残基, 而且在如上所述的单独的或者在一个氨基酸残基序列中的结构域 IV 内也含有一个半胱氨酸残基。在另一些实施方案中, 一个优选的嵌合分子仅含一个或多个 C 端半胱氨酸残基且结构域 I 没有非 HBc 半胱氨酸残基。在图 1 的各 HBc 序列中, 半胱氨酸残基都存在于约 61 位。

一种所提出的方法使用一种包含上述自我装配的嵌合分子颗粒溶解或分散在药物可接受的稀释剂组合物中的疫苗, 所述组合物通常也含有水。特别优选的非 HBc 表位存在于所提出的嵌合分子的一个或多个结构域 I、II 和 III 中, 该表位是来自乙型肝炎表面蛋白(HBs) preS1 区或 preS2 区的免疫原性序列。

本发明具有几个益处和优点。

本发明的一个具体益处是其作为治疗性疫苗提供超常的 T 细胞活化的用途。

本发明另一个益处是采用众所周知的细胞培养技术容易地制备重组免疫原。

本发明的一个优点是采用众所周知的重组技术容易地制备免疫原。



本发明的另一个优点是，优选的免疫原在制备过程中表现出比缺乏 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基或它们两者的其它 HBc 嵌合体更高的稳定性，同时基本上不含核酸。

对普通技术人员来讲，根据以下公开内容，更多益处和优点将会是显而易见的。

### 附图简述

附图是本公开内容的一部分。

图 1 显示图 1A 和图 1B 两个图面，提供了 6 个已公开的来自 6 种病毒的哺乳动物 HBc 蛋白序列的比对。第一个(SEQ ID NO: 1)人类病毒序列是 *ayw* 亚型，公开于 Galibert 等(1983) *Nature*, **281**: 646-650; 第二个人类病毒序列(SEQ ID NO: 2)是 *adw* 亚型，公开于 Ono 等(1983) *Nucleic Acids Res.* **11** (6): 1747-1757; 第三个人类病毒序列(SEQ ID NO: 3)是 *adw2* 亚型，公开于 Valenzuela 等, *Animal Virus Genetics*, Field 等编著, Academic Press, New York (1980), 第 57-70 页; 第四个人类病毒序列(SEQ ID NO: 4)是 *adyw* 亚型，公开于 Pasek 等(1979) *Nature*, **282**: 575-579; 第五个序列(SEQ ID NO: 5)是土拨鼠病毒 HBc 蛋白序列，公开于 Galibert 等(1982) *J. Virol.* **41**: 51-65; 第六个哺乳动物序列(SEQ ID NO: 6)是地松鼠 HBc 蛋白序列，公开于 Seeger 等(1984) *J. Virol.*, **51**: 367-375。

图 2 显示，在本文中用于制备重组 HBc 嵌合体的质粒载体 pKK223-3N 的制备过程中，对商业质粒载体 pKK223-3 进行的修饰。修饰序列(SEQ ID NO: 7)示于市售载体序列(SEQ ID NO: 8)的下面。添加的 *NcoI* 位点的碱基用小写字母表示，添加的碱基用双下划线表示，而缺失的碱基用虚线表示。标出了该序列区段上存在的两个限制位点(*NcoI* 和 *HindIII*)。

图 3 是 ICC-1603 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图，其中纵坐标显示吸光度(280nm)，而横坐标显示时间(秒)。

图 4 同图 3 所讨论的一样, 是 ICC-1590 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图。

图 5 同图 3 所讨论的一样, 是 ICC-1560 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图。

图 6 同图 3 所讨论的一样, 是 ICC-1605 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图。

图 7 同图 3 所讨论的一样, 是 ICC-1604 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图。

图 8 同图 3 所讨论的一样, 是 ICC-1438 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图。

图 9 同图 3 所讨论的一样, 是 ICC-1492 颗粒的分析型大小排阻层析洗脱图。

图 10 是在颗粒制备后, 在还原性条件下进行的 SDS-PAGE 分析照片, 显示出与 ICC-1492 构建体(第 3 道)相比, ICC-1438 单体构建体在老化(aging)后不稳定(第 2 道), 其中 HBc-149 (第 1 道)、ICC-1475 (第 4 道)和 ICC-1473 (第 5 道)作为额外的分子量对照。

图 11 摘自 PCT/US01/25625 (ICC-102.2), 图解反应方案(方案 1), 显示两个反应程序: (i)用硫代-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷 1-羧酸酯(硫代-SMCC)将半抗原连接到嵌合乙型肝炎核心蛋白(sm-HBc)颗粒侧面, 形成活化载体, 然后(II)将巯基端(半胱氨酸端)半抗原连接到活化载体上, 形成缀合物颗粒。sm-HBc 颗粒表示为具有一个侧氨基的方框(为了使附图清楚), 而巯基端半抗原表示为末端为 SH 基团的线。

## 定义

HBc 嵌合体所附带的数值是指 SEQ ID NO: 1 的 HBc *ayw* 氨基酸残基序列中的位置, 其中从该序列已添加或缺失了一个或多个残基, 无论该氨基酸残基序列的添加或缺失是否存在。因此, HBc149 表示

嵌合体末端在残基 149，而 HBc149 + C150 表示相对于 SEQ ID NO: 1 序列号来讲相同的嵌合体在 HBc 的 150 位含有半胱氨酸残基。

术语“抗体”是指被称为免疫球蛋白的糖基化蛋白的家族成员分子，所述分子可专一性结合一种抗原。

术语“抗原”以前用来指抗体或受体所结合的实体，并且也指诱导抗体产生的实体。目前将抗原的定义限定在抗体或受体所结合的实体，而术语“免疫原”用作诱导抗体产生或结合受体的实体。当本文所讨论的实体既具有免疫原性又具有抗原性时，按照其预定用途，通常是指它们或者是免疫原或者是抗原。

“抗原决定簇”是指被抗体结合位点或 T 细胞受体免疫结合的抗原实际结构部分。该术语与“表位”也可互换使用。因此，抗原决定簇是刺激抗体产生或 T 细胞活化的结构，可以通过测定抗体结合或诱导 T 细胞活化的结构来确定这样的结构的存在。

本文所用的术语“缀合物”是指例如通过氨基酸残基侧链有效连接载体蛋白的半抗原。

本文所用的术语“保守取代”是指一个氨基酸残基被另一个生物学上类似的残基取代。保守取代的实例包括用一个疏水残基取代另一个疏水残基的取代，或者一个极性残基被另一个极性残基的取代，所述疏水残基例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸，所述极性残基的取代例如精氨酸和赖氨酸之间的取代、谷氨酸和天冬氨酸之间的取代、或者谷氨酰胺和天冬酰胺之间的取代等等。

术语“相应”在各种语法形式中用于肽序列时，是指所述肽序列在其氨基端和羧基端的一端或两端加上或减去至多 3 个氨基酸残基，并且在多肽序列特定氨基酸残基上仅含有保守取代。

本文所用的术语“结构域”是指重组 HBc 嵌合分子部分，所述分子是按照(i)相对于下文报道的 HBcAg 亚型 *ayw* 位数的残基位置数来鉴定：Galibert 等, (1979) *Nature*, **281**: 646-650 (SEQ ID NO: 1)。据信，存在至少嵌合体结构域 I、II 和 III 的多肽部分以类似于天然存

在 HBcAg 的相应序列的第三种形式(tertiary form)存在。

本文所用的术语“融合蛋白”是指含有至少 2 个氨基酸残基序列的多肽，所述序列通过各自的羧基端和氨基端氨基酸残基之间的肽键端到端(首尾)有效连接在一起，而它们在自然界正常情况下并不连接在一起。本发明的融合蛋白是 HBc 嵌合分子，所述分子诱导抗体产生，该抗体与多肽发生免疫反应，所述多肽在氨基酸残基序列中对应于融合蛋白的多肽部分。

本文所用的短语“乙型肝炎(病毒)”在广义上是指如上所述的哺乳动物嗜肝 DNA 病毒科的任何成员。

术语“多肽”和“肽”在本说明书中可互换使用，是指通过相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基和羧基之间的肽键彼此连接在一起的氨基酸残基的线状系列。多肽可以具有不同长度，无论是以中性(不带电荷)形式或是以盐形式。本领域众所周知，氨基酸残基序列含有酸性基团和碱性基团，并且当肽在溶液中时，肽所显示的特定电离状态取决于周围介质的 pH 值，或者当肽为固体形式时，肽的特定电离状态取决于所获得的介质的 pH 值。因此，“多肽”或其等同术语意指包括参考的合适氨基酸残基序列。本文的肽或多肽通常表示为从左到右并按照氨基端(N 端)到羧基端(C 端)的方向。

术语“残基”与短语氨基酸残基可互换使用。本文标识的所有氨基酸残基都为天然或 L-构型。为了与标准多肽命名法[J. Biol. Chem., 243, 3557-59 (1969)]保持一致，氨基酸残基的缩写见下列对照表。

## 对照表

单字母	三字母	氨基酸
Y	Tyr	L-酪氨酸
G	Gly	甘氨酸
F	Phe	L-苯丙氨酸
M	Met	L-甲硫氨酸
A	Ala	L-丙氨酸
S	Ser	L-丝氨酸
I	Ile	L-异亮氨酸
L	Leu	L-亮氨酸
T	Thr	L-苏氨酸
V	Val	L-缬氨酸
P	Pro	L-脯氨酸
K	Lys	L-赖氨酸
H	His	L-组氨酸
Q	Gln	L-谷氨酰胺
E	Glu	L-谷氨酸
Z	Glx	L-谷氨酸或 L-谷氨酰胺
W	Trp	L-色氨酸
R	Arg	L-精氨酸
D	Asp	L-天冬氨酸
N	Asn	L-天冬酰胺
B	Asx	L-天冬氨酸或 L-天冬酰胺
C	Cys	L-半胱氨酸

HBc 嵌合体所附带的数值是指 SEQ ID NO: 1 的 HBc *ayw* 氨基酸残基序列内的位置，其中从该序列已添加或缺失了一个或多个残基，无论该氨基酸残基序列的添加或缺失是否存在。因此，HBc149 表示

嵌合体末端在残基 149，而 HBc149 + C150 表示相对于 SEQ ID NO: 1 序列号来讲相同的嵌合体在 HBc 的 150 位含有半胱氨酸残基。

### 发明详述

本发明提出一种治疗慢性乙型肝炎感染的方法。所提出的方法使用一种包含嵌合重组嗜肝 DNA 病毒核壳蛋白即乙型肝炎核心(HBc)嵌合蛋白分子的疫苗，所述分子在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒。所提出的嵌合分子相对于天然核心分子来说至少在 C 端被截短，对于图 1 的 *ayw* 亚型来说，所述天然核心分子的 C 端通常在残基 183 位。含有所提出的嵌合分子的颗粒被位于 N 端或 C 端或这两端上或其附近的半胱氨酸残基稳定化并且优选基本上不结合核酸，如下所述。

所提出的嵌合分子含有 HBc N 端 165 个氨基酸残基中至少约 125 个残基、更优选至少约 135 个残基至所有残基并且可包括一个或多个其它氨基酸残基序列，这些序列通常为 HBV 的 B 细胞表位或 T 细胞表位、其它病原体蛋白或其它蛋白例如牛抑制素。来自非 HBV 蛋白并可掺入嵌合分子的 B 细胞表位和 T 细胞表位的实例见下表 A 和表 B。优选掺入嵌合分子的、来自乙型肝炎病毒的 T 细胞表位的实例是表面抗原 Pre-S2 序列 144-160。优选掺入嵌合分子的、来自乙型肝炎病毒的 B 细胞表位的实例是表面抗原 Pre-S2 序列 130-144。

一种所提出的治疗慢性肝炎的方法包括下述步骤：给予慢性乙型肝炎病毒感染者抗 HBc 的 T 细胞刺激量的疫苗，所述疫苗由溶解或分散在药物可接受的稀释剂中的免疫原性颗粒组成。优选将所述免疫原性颗粒与佐剂联合给予。

本文优选的佐剂是与 toll 样受体相互作用的分子。最优选的佐剂是脂质 A 类似物，例如单磷酸脂质 A 和氨基烷基葡萄糖胺磷酸酯。其它优选的佐剂包括皂苷类和化学修饰的烷基化皂苷类。佐剂可进一步包括微颗粒载体，例如水包油乳剂或矿物盐类。

所述免疫原性颗粒包括重组乙型肝炎核心(HBc)嵌合蛋白分子,嵌合蛋白分子长度至多约 550 个氨基酸残基。这些嵌合蛋白分子(a)含有 HBc 分子 N 端 165 个氨基酸残基中约 125 个氨基酸残基至所有残基的 HBc 序列并且含有 4 至约 75 位和约 85 至约 140 位残基的 HBc 序列。

HBc 嵌合分子序列任选包含: (a')以肽键连接的含有免疫原性表位的氨基酸序列,所述免疫原性表位位于所述嵌合体的 N 末端、HBc 优势免疫环(即在约 76 至约 85 位残基之间)中和 C 末端中的一个或多个;或(b')在 HBc 优势免疫环中的插入序列,所述插入序列的长度为 1 个至约 40 个氨基酸残基,所述残基包括无化学反应性残基或用于缀合半抗原的化学反应性接头残基;或(c') 76-85 位序列的零至所有残基。

所述嵌合蛋白分子也含有以下(a')和(b')之一或它们两者: (a')序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 1-3 个半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置-20 至约+1 [N 端半胱氨酸残基];和(b')从 HBc 序列 C 端残基开始向所述分子 C 端方面并且位于从所述嵌合分子 C 端起约 30 个残基内的 1 个至约 3 个半胱氨酸残基[C 端半胱氨酸残基]。

嵌合蛋白分子所含有的 HBc 序列中的保守取代氨基酸残基不大于 20%,并且在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒。在本发明的一个方面,所述颗粒基本上不结合核酸,表现出 280nm 与 260nm 吸光度比值约 1.2 至约 1.7,而在其它方面,存在着超过最小量的核酸结合,所述颗粒表现出 280nm 与 260nm 吸光度比值约 0.9 至约 1.15。因此,概括地讲,所提出的颗粒的 280nm 与 260nm 吸光度比值可以是约 0.9 至约 1.7。核酸结合讨论如下。所述颗粒比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定: (i) 不含任何上述 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基,或者(ii)其中

所提出的嵌合分子中存在的 C 端半胱氨酸残基或 N 端半胱氨酸残基被其它残基取代。

让接受所述疫苗的患者保持足够时间以诱导出抗 HBc 的活化 T 细胞。在其它实施方案中，对血流中具有 HBsAg 循环的患者实施所述方法，并让患者保持足够时间以使循环 HBsAg 量变小。在本发明的另一方面，所述患者血清中含有 HBeAg，所述治疗导致患者血清中 HBeAg 抗原量的降低。本领域技术人员熟知每种抗 HBc/HBeAg 和 HBsAg 的 T 细胞活化的已知检测方法。

嵌合蛋白可在 N 端、HBc 免疫原性(免疫优势)环中或 C 端、或者在免疫原性环中无反应性(异源)残基或 B 细胞表位或 T 细胞表位接头残基上，展示一个或多个免疫原性表位，或者具有 76 至 85 位残基的零至所有残基。在一个实施方案中，嵌合蛋白含有一个或多个 N 端半胱氨酸残基，所述残基在自我装配颗粒的形成中赋予增强的稳定性。

在另一个实施方案中，嵌合蛋白含有一个或多个 C 端半胱氨酸残基，所述残基在自我装配颗粒的形成中赋予增强的稳定性。所提出的嵌合蛋白分子在 N 端和 C 端的两端上或其附近也可含有半胱氨酸残基，也就是说，嵌合蛋白分子可同时含有 N 端半胱氨酸残基和 C 端半胱氨酸残基，如上所述。

在一些优选实施方案中，所提出的嵌合蛋白从 HBc 残基 149 位到羧基端下游基本上不含精氨酸和/或赖氨酸残基，使得自我装配颗粒基本上没有核酸结合。在其它实施方案中，存在着从 149 位至约 163 位的 HBc 序列，所述序列包括两个富含精氨酸的重复序列(参见图 1)。在其它实施方案中，存在着至约 156 位的 HBc 序列，所述序列含有一个富含精氨酸序列。在再一些实施方案中，C 端 HBc 序列在 HBc 140 和 149 位之间结束，而嵌合分子在图 1 的天然 HBc 序列中从 150 位至 C 端不含精氨酸重复序列，或者不含类似序列，所述类似序列含有赖氨酸残基替代一个或多个精氨酸残基。基本上没有核酸结合计



论如下，这是容易确定的。

为了便于讨论，本文涉及的所提出的嵌合体序列和序列位置编号是根据人类乙型肝炎核心蛋白亚型 *ayw* 的序列和位置编号[Galibert 等, (1979) *Nature*, **281**: 646-650]，其如 SEQ ID NO: 1 中所示。然而，可以理解，考虑到哺乳动物嗜肝 DNA 病毒衣壳蛋白序列之间的巨大相似性以及由这些蛋白表现出类似的颗粒形成(这对本领域技术人员来说是众所周知的)，有关人类 HBc 亚型 *ayw* 的讨论也适用于亚型 *adw*，以及土拨鼠蛋白和地松鼠蛋白。由于这些巨大相似性，所以本文列举的 HBc 序列通常为“HBc”序列，除非另有说明。

在一个实施方案中，所提出的 HBc 嵌合体长度至多约 550 个残基并且含有

(a) HBc 分子 N 端 165 个氨基酸残基中约 125 个氨基酸残基至所有残基的 HBc 序列，所述 HBc 分子包含 5 至约 75 位残基和约 85 至约 140 位残基的 HBc 序列，(a')以肽键连接的免疫原性表位，所述免疫原性表位位于所述嵌合体的 N 末端、HBc 优势免疫环中和 C 末端中的一个或多个；或(b')在 HBc 优势免疫环中的插入序列，所述插入序列的长度为 1 个至约 40 个氨基酸残基并且包含无化学反应性残基或用于缀合半抗原的化学反应性接头残基；或(c') 76-85 位序列的零至所有残基。

嵌合蛋白分子也含有以下(a')和(b')之一或它们两者：(a')序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 1-3 个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置-20 至约+1 [N 端半胱氨酸残基]；和(b') 从 HBc 序列 C 端残基开始向所述分子 C 端方向并且位于从所述嵌合分子 C 端的约 30 个残基内的 1 个至约 3 个半胱氨酸残基[C 端半胱氨酸残基]。

嵌合蛋白分子所含有的 HBc 序列中的保守取代氨基酸残基不大于约 20%，并且在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒。所述颗粒的

形成比满足下述条件的颗粒稳定得多：(i)由除了不含任何上述 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒，或者(ii)其中所提出的嵌合分子中存在的 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基被其它残基取代。正如已经注意到的，在一些实施方案中，所述颗粒基本上不结合核酸，在其它实施方案中，所述颗粒结合非最小量的核酸。

让所述患者保持足够时间以诱导出抗 HBc 的活化 T 细胞。在其它实施方案中，所述患者首先用抗病毒药例如拉米夫定治疗一段时间，使其足以降低病毒载量，然后一次或多次给予该患者所提出的嵌合分子以及可接受的赋形剂，任选给予佐剂。在又一个实施方案中，对血流中具有 HBsAg 循环的患者实施所述方法，并让患者保持足够时间以使循环 HBsAg 量变小。在本发明的另一方面，所述患者血清中含有 HBeAg，所述治疗导致患者血清中 HBeAg 抗原量的降低。

所提出的嵌合分子在以下一个或两个位置含有至少一个半胱氨酸残基：(i)相对于如图 1 和 SEQ ID NO: 1 中所示的 HBc N 端的约-20 至约+1 位，或(ii)从 HBc 序列 C 端残基开始向所述分子 C 端并且位于所述嵌合分子 C 端的约 30 个残基内。负氨基酸位置的概念通常与前导序列例如 HBc 的前核心序列相关。本文同样使用这一概念，是因为只需将给定嵌合分子序列与 SEQ ID NO: 1 进行简单比对，就可以确定对应于 HBc +1 位的起始甲硫氨酸残基的嵌合体位置。

由于氨基酸残基序列通常是从左到右排列，其方向从 N 端到 C 端，任何在被 HBc 起始甲硫氨酸占据的位置左边的比对嵌合分子残基具有负位置。一个所提出的半胱氨酸残基可以存在于 HBc 比对起始甲硫氨酸左边约 20 个残基到对应于该起始甲硫氨酸的位置上。

一方面，优选的 HBc 嵌合体具有一段约 135 个至约 525 个 L- $\alpha$ -氨基酸残基序列并且含有 4 个连续的以肽键连接的结构域，即结构域 I、II、III 和 IV。这 4 个结构域按照与天然蛋白相同的方式连接在

一起,也就是说,与含有不是 $\alpha$ -氨基酸的残基因而不能形成肽键的多肽、含有 D-氨基酸残基的多肽或寡肽缀合物(其中两个或更多个多肽有效连接至氨基酸残基侧链)相比,它们彼此通过肽键连接在一起。因此,可以使用重组技术常用方法,通过表达而制备所提出的嵌合 HBc 蛋白。

该嵌合分子的结构域 I 包括约 71 个至约 110 个氨基酸残基,其序列包含:(i)至少 HBc 的 5 至 75 位残基的序列;(ii)序列中其氨基酸位置不同于 HBc 前核心序列的 1-3 个半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基在所述嵌合分子中的氨基酸位置对应于从 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列 N 端计算的氨基酸位置-20 至约+1、优选氨基酸位置-14 位至约+1 位[N 端半胱氨酸残基];和(iii)任选含有与 HBc 残基 2-4 之一以肽键连接的至多约 30 个氨基酸残基的序列,所述序列包括免疫原性表位。该免疫原性序列(如果存在的话)通常是用于诱导抗乙型肝炎免疫应答的表位。

该嵌合分子结构域 II 包括以肽键连接结构域 I 的 HBc 残基 75 的至多约 255 个氨基酸残基,其中(i)存在 HBc 76 至 85 位序列中的零至所有残基,所述残基与以下序列以肽键连接:(ii)任选存在的构成免疫原性表位的 1 个至约 245 个氨基酸残基序列,或(iii)在 HBc 优势免疫环中的插入序列,所述插入序列的长度为 1 个至约 40 个氨基酸残基,所述残基含有无化学反应性的残基或用于缀合半抗原的化学反应性接头残基。特别优选 76-85 位的 10 个残基的序列(76-85 位序列)存在,但是被含有表位序列或含有接头序列的 1 个至约 245 个残基间隔开。

结构域 III 是 86 至 135 位肽序列而且其以肽键连接的结构域 II 残基 85。

嵌合分子结构域 IV 包括:(i) 136 位至 149 位的 HBc 氨基酸残基序列的 5-14 个残基而且其以肽键连接结构域 III 的 135 位残基,(ii)从所述嵌合分子 C 端起约 30 个残基内的 0-3 个半胱氨酸残基[C 端半

胱氨酸残基], 和(iii)在 150 位到其 C 端的 HBc 中并不存在的免疫原性序列中的 0 至约 100 个氨基酸残基。优选结构域 IV 含有 0 至约 50 个氨基酸残基的序列, 所述序列在上述 HBc 位置中不存在, 更优选所述序列是 0 至约 25 个残基。结构域 IV 也优选含有一个 C 端半胱氨酸残基。

所述嵌合分子(i)具有一个在所述嵌合体的 HBc 序列中不大于约 10%氨基酸残基被取代的氨基酸残基序列, 和(ii)在宿主细胞中表达后自我装配成颗粒。所述颗粒基本上不结合核酸, 并且比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定: (i)不含任何上述 C 端半胱氨酸残基和缺乏 N 端半胱氨酸残基, 或(ii)其中所提出的嵌合分子的 N 端半胱氨酸残基被其它残基取代。

一方面, 所提出的嵌合分子包括含表位的序列, 所述序列在 N 端以肽键连接 HBc 残基 2-5 之一。另一方面, 所提出的嵌合分子包含含有表位的序列或含有接头残基的序列, 所述序列以肽键连接位于优势免疫环中 HBc 残基 76 和 85 之间的分子的中部附近。又一方面, 含有表位的序列位于嵌合分子 C 端部分, 所述分子以肽键连接 HBc 残基 136-149 之一。在其它方面, 两个或三个含有表位的序列存在于以上位置, 或者一个或两个含有表位的序列与用于表位的接头残基一起存在。如上所述, 每个这样的嵌合分子也含有 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基或它们两者。这些嵌合分子及其自我装配颗粒的几个具体实例讨论如下。

正如已经注意到的, 在这一方面, 一种所提出的 HBc 嵌合分子含有约 135 个至约 525 个氨基酸残基。在一些优选的实施方案中, 存在 HBc 残基 4, 而在其它优选的实施方案中存在残基 2-5, 所以结构域 I 可在 HBc 残基 4 或 2 开始并延伸到残基 75, 即在 HBc 75 位的 HBc 残基。残基 1 是甲硫氨酸, 为 DNA 起始密码子的氨基酸。优选通常存在于 HBc 1 位的天然甲硫氨酸不存在, 使得在编码 DNA 或 NA 中仅存在一个起始信号。

可在结构域 I 或结构域 II 优势免疫环中存在的异源免疫原性表位优选含有约 15 至约 50 个残基, 尽管一个短至约 6 个氨基酸残基的插入序列可以诱导并被抗体和 T 细胞受体所识别, 因而是有用的。

在本发明的另一个实施方案中, 一个或多个无化学反应性的(异源)氨基酸残基插入到结构域 II 中, 不能起到 B-表位的作用, 但却能在感染乙型肝炎病毒患者体内的血中降低抗体循环对所述嵌合颗粒的识别作用。在本发明的一个优选方面, 所述嵌合分子在残基 75、76、77、78、79、80、81 或 82 位含有一个氨基酸插入, 最优选在残基 77 位含有一个氨基酸插入。所述插入的无化学反应性残基可以是丙氨酸、亮氨酸或异亮氨酸残基, 最优选是丙氨酸残基。有望赋予所述颗粒比天然 HBc 颗粒更小的抗原性; 也就是说, 由 HBV 感染产生的抗 HBc 抗体对该颗粒识别力更差。本领域技术人员可以使用任何数量的氨基酸残基和序列插入到结构域 II 中以降低其抗原性。

优选从 76 位至 85 位的结构域 II 所有残基都存在, 尽管被一个或多个其它残基间隔开。结构域 II 必须含有至少 4 个残基, 这样就可以具有不干扰表达或使用的任何序列, 但是这些残基优选为 75 和 85 位残基之间的序列部分。

结构域 III 含有以肽键连接残基 85 的 HBc 残基 86 至 135。

结构域 IV 含有由以下序列组成的至少 5 个残基的序列: (i) 136 至 140 位、优选至 149 位的 HBc 残基序列而且其以肽键连接残基 135, (ii) 0-3 个半胱氨酸残基和(iii)任选可含有至多约 100 个残基的免疫原性表位的序列, 特别是当 HBc 序列在残基 140 结束时, 尽管更优选至多约 25 个残基的更短序列。该结构域 IV 免疫原性序列优选对 HBc 序列来说是异源的, 并且与约 165 位至 HBc C 端的 HBc 序列不同。所述免疫原性序列, 当存在于结构域 IV 中时, 优选为 T 细胞表位, 但也可以是 B 细胞表位, 例如通常存在于结构域 I 和 II 的某一个中的情况正是如此。下表 A 和表 B 提供了来自 HBc 序列和来自乙型肝炎表面蛋白(HBs 或 HBsAg) preS1 区和 preS2 区的说明性 T 细胞表位。

结构域 IV 也可含有 0-3 个半胱氨酸残基并且这些 Cys 残基存在于嵌合分子羧基端(C 端)约 30 个残基内。优选存在一个半胱氨酸(Cys)残基并且该 Cys 优选作为羧基端(C 端)残基存在,除非 T 细胞表位作为结构域 IV 部分而存在。当这样的 T 细胞表位存在时,优选的 Cys 优选在 HBc 嵌合体 C 端的最后 5 个残基之内。

在一个实施方案中,特别优选的嵌合体含有两个免疫原性表位。这两个免疫原性表位存在于结构域 I 和 II、或者 II 和 IV、或者 I 和 IV 中。在一些实施方案中,这两个免疫原性表位之一优选为 B 细胞表位。在其它实施方案中,这两个免疫原性表位之一为 T 细胞表位。更优选这两个免疫原性表位是相同或不同的 T 细胞表位。另外,在 B 细胞表位位置上可以存在大量 B 细胞表位,同理,在 T 细胞表位位置上可存在大量 T 细胞表位。

在所述嵌合分子在结构域 II 中含有免疫原性表位的实施方案中,优选所述序列含有一个或多个 B 细胞表位,氨基酸残基 76 和 85 之间的 HBc 序列存在,但是被免疫原性表位间隔开,并且所述嵌合体在结构域 IV 中还包括一个或多个 T 细胞表位,所述结构域 IV 与 HBc 残基 140-165 之一以肽键连接。

同样优选这样的嵌合分子:其中在结构域 II 中存在缀合表位的异源接头残基,从而在结构域 II 中提供一个或多个免疫原性表位,残基 76 和 85 存在,但是被异源接头残基间隔开,其中存在以肽键连接 HBc 残基 140-165 之一的 T 细胞表位。由所述嵌合分子所形成的颗粒通常含有的缀合表位与 C 端以肽键连接的 T 细胞表位之比约为 1:4 至 1:1,其比例通常约为 1:2。

在上述嵌合分子的一个说明性结构中,缀合表位的异源接头残基存在于结构域 II 中,而 T 细胞表位存在于结构域 IV 中,在结构域 II 中不存在额外的 B 细胞表位。在如下讨论的 ELISA 测定中,通过结合抗环单克隆抗体测定,所述嵌合体表现出 T 细胞表位的免疫原性,同时表现出最小的 HBc 抗原性。

一种优选所提出的 HBc 嵌合分子含有约 135 个至约 525 个残基的序列。一种优选的 HBc 嵌合分子的序列长度约 170 个至约 250 个氨基酸残基，所述分子可含有一个或两个优选长度分别为约 15 至约 50 个残基、优选 HBc 部分长度为约 140 至约 165 个残基的免疫原性表位。特别优选的嵌合分子的长度约 190 至约 210 个残基，所述分子含有一个或两个免疫原性表位。一个特别优选的嵌合分子的长度约 140 至约 165 个残基，所述分子不含添加的免疫原性表位。可以理解，由于 N 端和 C 端 HBc 部分的长度变异和几个可插入到免疫原性环中的所提出的表位的不同长度，因而考虑了宽范围的嵌合分子长度。

一种所提出的重组蛋白在宿主细胞中表达后，自我装配形成基本上不结合核酸的颗粒。所提出的 HBc 嵌合体颗粒通常为球形，并且对给定的制备物来说，通常大小均一。因此，这些嵌合颗粒装配具有类似形状和大小的天然 HBc 颗粒并且可以从感染者体内回收。

一种所提出的嵌合颗粒包括上述嵌合分子。更概括地讲，所述嵌合颗粒包括嵌合 C 端截短的 HBc 蛋白，所述蛋白具有 N 端 165 个残基中至少约 125 个残基的序列并且含有(i)免疫原性表位，所述表位以肽键连接其 N 端、C 端或优势免疫环、或优势免疫环中的异源无反应性残基或用于表位的接头残基中的一个或多个，和(ii)上述 1-3 个 N 端半胱氨酸残基和 1-3 个 C 端半胱氨酸残基之一或它们两者，并且至少从 135 位起的 5 个 HBc 残基序列。

一种所提出的颗粒在结构域 IV 中基本上不含精氨酸和/或赖氨酸残基，致使所述自我装配颗粒基本上不结合核酸，并且表现出 280:260 吸光度比值约 1.2 至约 1.7，如下讨论。因此，一种所提出的嵌合蛋白不含约 155 和 183 位之间的 HBc 序列，更优选不含约 155 和 183 位之间的 HBc 序列。

上述 N 端半胱氨酸残基的存在，意想不到地增强了嵌合分子形成稳定的免疫原性颗粒的能力(如下所论述)。因此，一种所提出的 HBc

嵌合体颗粒免疫原趋向于形成颗粒,当通过分析型大小排阻层析法(其细节如下所论述)检测时,所述颗粒在收集和初步纯化中保持在一起。

所提出的颗粒比由除了以下两点不同之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定:(i)缺乏 N-端半胱氨酸残基并且也不含任何上述的 C 端半胱氨酸残基,或者(ii)其中在所提出的嵌合分子中存在的 N 端半胱氨酸残基被其它残基取代。在一些实例中,除非存在 N 端半胱氨酸,否则不形成颗粒。在以下实施例中举例说明两类序列稳定性增强的实例。

制备一种所提出的含有 N 端半胱氨酸残基的颗粒,通常比由缺乏 N 端半胱氨酸的嵌合分子装配而来的颗粒收率更高。可以从所得颗粒的数量上、或者从如下所述的使用 Superposes<sup>®</sup> 6 HR 的分析型凝胶过滤分析中,看出这样的收率上的增加。

所提出的颗粒表现出基本上没有核酸结合,这可以容易地通过比较所述颗粒在水溶液中 280 和 260nm 的吸光度(即 280:260 吸光度比值)来测定。所提出的颗粒基本上不结合核酸,所述核酸是用来表达所述蛋白的生物体的细胞中原有的寡聚 DNA 和/或多聚 DNA 和 RNA 种类。所述核酸表现出 260nm 吸光度和在 280nm 相对少的吸光度,而蛋白例如所提出的嵌合体在 260nm 吸光度相对少,在 280nm 具有较大吸光度。

因此,重组表达的 HBc 颗粒或嵌合 HBc 颗粒(所述颗粒在残基 150-183 (或 150-185)位含有富含精氨酸和富含赖氨酸的序列)在本领域有时称为鱼精蛋白区,所述颗粒 280nm 吸光度与 260nm 吸光度比值(280:260 吸光度比值)约为 0.8。另一方面,颗粒在结构域 IV 中基本上不含精氨酸和赖氨酸残基,致使自我装配颗粒基本上没有核酸结合,所述颗粒例如以下没有富含精氨酸的核酸结合区的天然存在的 HBc 样颗粒,所述 HBc 样颗粒含有少于约 10、优选少于约 6、更优选少于 3 个精氨酸或赖氨酸残基或其彼此相邻的混合物。说明性的蛋白具有在约 HBc 残基 165 位、优选在约 155、更优选在约 140



位至 149 位结束的天然序列或嵌合序列,其 280:260 吸光度比值约 0.9 至约 1.7。更典型的 280:260 吸光度比值,对于在约 165 位结束的序列来说约 0.9 至约 1.0,对于在约 155 结束的序列来说约 1.1 至约 1.2,对于其在约 140 至约 149 位结束的序列来说约 1.4 至约 1.7。其范围主要是因为给定的嵌合 HBc 颗粒的结构域 II 和 IV 中存在的芳族氨基酸残基数目。

所提出的嵌合 HBc 蛋白的结构域 I 构成起始为至少氨基酸残基 5 位至 75 位的 HBc 氨基酸残基序列,结构域 III 构成从 86 位至 137 位的 HBc 序列。来自任何哺乳动物嗜肝 DNA 病毒的序列都可用于结构域 I 和 III,而且来自两种或更多种病毒的序列可以在一个嵌合体中使用。为了便于构建,优选在整个嵌合体中始终使用人 *ayw* 序列。

已经报道,具有结构域 I(其含有最初 3 个氨基端(N 端)残基的多于一个缺失)的 HBc 嵌合体导致在大肠杆菌细胞中完全缺乏 HBc 嵌合蛋白。Pumpens 等,(1995) *Intervirology*, **38**: 63-74。另一方面,最近进行了一项研究:其中将来自流感 M2 蛋白的免疫原性 23 聚体多肽融合到 HBc N 端序列,据该研究报道,当天然 HBc 序列残基 1-4 被取代时,所得融合蛋白形成颗粒。Neiryneck 等(1999 年 10 月) *Nature Med.*, **5** (10): 1157-1163。因此,本领域认为,当添加的氨基酸序列以肽键连接 HBc 残基 2-4 之一时,颗粒可以形成,而如果不存在附加的序列并且多于残基 1-3 从 HBc 的 N 端缺失时,颗粒不能形成。

以肽键连接 HBc N 端的最初 5 个残基的 N 端表位序列可含有一个半胱氨酸残基或包括免疫原性序列的至多约 30 个残基的序列。1-3 个半胱氨酸残基可以存在于所述序列方便的位置上,但是通常邻近添加序列的 C 端,使得相对于 SEQ ID NO: 1 中所示的 HBc N 端来说,添加的 N 端半胱氨酸残基在约-20 至约+1 位,更优选在约-14 至约+1 位。示例性的序列包括如下讨论并举例的 B 细胞表位或 T 细胞表位(分别参见表 A 和表 B)、来自流感 M2 蛋白 23 聚体多肽(Neiryneck 等,同

上)(所述多肽包括 2 个半胱氨酸残基)以及含有至少约 6 个残基的序列变异体、另一种(异源)蛋白(例如由于所用表达系统而存在于融合蛋白中的 $\beta$ -半乳糖苷酶)的序列,或其它乙型肝炎相关序列例如来自 PreS1 区或 PreS2 区或主要 HBsAg 免疫原性序列。

结构域 II 是一个约 5 至约 250 个氨基酸残基的序列。在这些残基中,0 个(没有)、优选至少 4 个残基、更优选至少 8 个残基构成 HBc 序列的 76 至 85 位的部分,并且 1 个至约 245 个残基、优选 1 个至约 50 个残基对 HBc 来说是异源(外源)的或者对应于免疫原性 HBc 序列例如 B 细胞表位或 T 细胞表位。

因此,至少 HBc 残基 75 和 85 分别存在于结构域 I 和 II 中。这些残基构成(i)例如 B 细胞表位或 T 细胞表位等表位的异源接头残基,或(ii)免疫原性 B 细胞表位或 T 细胞表位,其优选含有 6 至约 50、更优选约 15 至约 50、最优选约 20 至约 30 个氨基酸残基,并且其位置使得它们以肽键连接在 0、或优选至少 4、更优选至少 8 个残基,或 HBc 序列 76 至 85 位所有残基之间。免疫原性 B 细胞表位优选在此位置连接接头残基或者以肽键连接 HBc 序列,B 细胞表位的用途说明性地讨论如下。

这些优选的至少 4 个 HBc 残基可以都在一个序列中(例如残基 82-85),或者可以分开在异源接头残基两侧(邻接),其中存在残基 76-77 和 84-85,或者其中存在残基 76 和 83-85。更优选,结构域 II 含有 HBc 序列从残基 76 至 85 的至少 8 个残基。最优选 76 至 85 位的所有 10 个残基的序列都存在于所述嵌合体中。

添加到 HBc 环状序列的 1 个至约 245 个残基对 HBc 序列来说可以是异源的,或者可以对应于 HBc 序列的一个或多个免疫原性部分。一个添加的异源残基是如上所述的 B 细胞表位的异源接头残基。如上所述,通常长达至少 6 个氨基酸残基至约 50 个氨基酸残基、更优选长约 15 至约 50 个残基的较长序列,是在包含免疫原(例如 B 细胞表位或 T 细胞表位)的序列中,除非是由限制位点编码的异源残基。

示例性的肽 B 细胞表位(用于所提出的嵌合体表达后连接接头残基并用于在 HBc 嵌合体内在一个或多个 N 端、在免疫原性环内或在所述嵌合体的 C 端表达), 以及所述基因(所述序列得自所述基因)的通用名称、已发表表位的文献或专利引文和 SEQ ID NO.一并如下表 A 所示。

表 A

B 细胞表位

<u>生物体</u>	<u>基因</u>	<u>序列</u>	<u>引文*</u>	<u>SEQ ID NO</u>
肺炎链球菌 ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )	PspA1	KLEELSDKIDELDAE QKKYDEDQKKTEE-	1	9
	PspP2	KAALEKAASEEM- DKAVAAVQQA	1	10
微小隐孢子虫 ( <i>Cryptosporidium parvum</i> )	P23	QDKPADAPAAEAPA-	2	11
		AEPAAQQDKPADA		
HIV	GP120	RKRIHIGPGR- AFYITKN	3	12
口蹄疫病毒	VP1	YNGECRYNRNA- VENLRGDLQVL- AQKVARTLP	4	13

流感病毒 A8/PR8	HA	YRNLLWLTEK	8	14
甲型流感病毒 (A8/PR8/34)	M2	SLLTEVETPIR- NEWGCRCNGSSD	29	15
		SLLTEVETPIR- NEWGCRCNDSSD	29	16
		SLLTEVETPIR- NEWGARANDSSD		17
		EQQSAVDADDS- HFVSIELE	35	18
		SLLTEVETPIR- NEWGSRSDNDSSD		19
		SLLTEVETPIR- NEWGSRCDNDSSD		20
		SLLTEVETPIR- NEWGCRSDNDSSD		21
		SLLTEVETPIR- NEWGCRANDSSD		22
		SLLTEVETPIR- NEWGARCNDSSD		23
		MSLLTEVETPIR- NEWGCRCNDSSD		24
		MSLLTEVETPIR- NEWGSRSDNDSSD		25
		MGISLLTEVETPIR- NEWGCRCNDSSD- ELLGWLWGI		26
		MSLLTEVETPIR- NEWGARANDSSD		27
		MSLLTEVETPIR- NEWGCRANDSSD		28
		MSLLTEVETPIR- NEWGARCNDSSD		29
		MSLLTEVETPIR- NEWGCRSDNDSSD		30
		MSLLTEVETPIR- NEWGSRCDNDSSD		31
		X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> T- X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> RX <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub> X <sub>18</sub> - 19X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> -X <sub>22</sub> X <sub>23</sub> X <sub>24</sub>		32
乙型流感病毒	NB	NNATFNVTNVNPISHIR		33
鼠疫耶尔森氏菌 ( <i>Yersinia pestis</i> )	V Ag	DILKVIIVDSMNH- GDARSKLREELAE- LTAELKIYSVIQA- EINKHLSSSGTIN- IHDKSINLMDKNL- YGYTDEBIFKASA- EYKILEKMPQTTI- QVDGSEKKIVSIK- DFLGSENKRTGAL- GNLKNSYSYNKDN- NELSHFATTCSD	9	34

流感嗜血菌				
<i>(Haemophilus influenzae)</i>	pbOMP	CSSSNNDAA-		
		GNGAAQFGGY	10	35
		NKLGTVSYGEE		36
		NDEAAYSKN-		
		RRAVLAY		37
粘膜炎莫拉氏菌				
<i>(Moraxella catarrhalis)</i>	copB	LDIEKDKKK-		
		RTDEQLQAE-		
		LDDKYAGKGY	11	38
		LDIEKNKKK-		
		RTEAELQAE-		
		LDDKYAGKGY		39
		IDIEKKGKI-		
		RTEAELLAE-		
		LNKDYPGQGY		40
牙龈卟啉单胞菌				
<i>(Porphyromonas gingivalis)</i>	HA	GVSPKVC KDVTV-		
		EGSNEFAPVQNL T	12	41
克氏锥虫		RIQSTWRQKT V-		
<i>(Trypanosoma cruzi)</i>		DLPAGTKYV		42
		KAAIAPAKAAA-		
		APAKAATAPA	14	43
恶性疟原虫				
<i>(Plasmodium falciparum)</i>	CS	(NANP) <sub>4</sub>	24	44
		NANPNVDF-		
		(NANP) <sub>3</sub> NVDP		45
		NANPNVDF-		
		(NANP) <sub>3</sub>		46
		(NANP) <sub>3</sub> NVDPNANP		47
		NANPNVDF-		
		(NANP) <sub>3</sub> NVDPNANP		48
		NPNVDP (NANP) <sub>3</sub> NV		49
		NPNVDF-		
		(NANP) <sub>3</sub> NVDP		50
		NPNVDP (NANP) <sub>3</sub> -		
		NVDPNA		51
		NVDP (NANP) <sub>3</sub> NV		52
		NVDP (NANP) <sub>3</sub> NVDP		53
		NVDP (NANP) <sub>3</sub> -		
		NVDPNA		54
		DP (NANP) <sub>3</sub> NV		55
		DP (NANP) <sub>3</sub> NVDP		56
		DP (NANP) <sub>3</sub> -		
间日疟原虫		NVDPNA		57
<i>(Plasmodium vivax)</i>	CS	GDRADGQPAG-		

		DRADGQPAG	20	58
		RADDRAAGQP-		
		AGDGGQPAG		59
		ANGAGNQPG-		
		ANGAGDQPG		60
		ANGADNQPG-		
		ANGADDQPG	27	61
		ANGAGNQPG-		
		ANGADNQPG		62
		ANGAGNQPG-		
		ANGADDQPG		63
		APGANQEGGAA-		
		APGANQEGGAA	28	64
		ANGAGNQPGAN-		
		GAGDQPGANGA-		
		DNQPGANGADD-		
		QPG		65
柏氏疟原虫 ( <i>Plasmodium berghi</i> )	CS			
		DPPPPNPN-		
		DPPPPNPN	2	66
约氏疟原虫 ( <i>Plasmodium yoelli</i> )	CS			
		(QGPGAP) <sub>4</sub>		67
表兄链球菌 ( <i>Streptococcus sobrinus</i> )	AgI/II			
		KPRPIYEA-		
		KLAQNQK	16	68
		AKADYEAK-		
		LAQYEKDL		69
弗氏志贺氏菌 ( <i>Shigella flexneri</i> )	侵染素	KDRTLIEQK	18	70
呼吸道合胞病毒(RSV)	G	CSICSNPT-		
		CWAICK	19	71
溶组织内阿米巴 ( <i>Entamoeba histolytica</i> )	凝集素			
		VECASTVCQNDN-		
		SCPIIADVEKCNQ	21	72
日本血吸虫 ( <i>Schistosoma japonicum</i> )	para			
		DLQSEISLSLE-		
		NGELIRRAKSA-		
		ESLASELQRRVD	22	73
曼氏血吸虫 ( <i>Schistosoma mansoni</i> )	para			
		DLQSEISLSLE-		
		NSELIRRAKAA-		
		ESLASDLQRRVD	22	74
牛抑制素	$\alpha$ c 亚基			
		STPPLPWPW-		
		SPAALRLLQ-		
		RPPEEPAA	30	75

埃博拉病毒				
(Ebola virus)	膜锚定糖蛋白			
		ATQVEQHRR-		
		TDNDSTA	31	76
		HNTPVYKLD-		
		ISEATQVE	31	77
		GKLGLITNTI-		
		AGVAVLI	31	78
大肠杆菌				
(Escherichia coli)	ST	CCELCCYPACAGCN	33	79
		NTFYCCELCC-		
		YPACAGCN	33	80
		SSNYCCELCC-		
		YPACAGCN	33	81
阿尔茨海默病 $\beta$ -淀粉样蛋白				
		DAEFRHDSGYE-	34	82
		VHHQKLVFFAE-		
		DVGSNKGAIIG-		
		LMVGGVVIA		
		DAEFRHDSGYE-		83
		VHHQKL		
		EDVGSNKGAI		84
		DAEFRHDSGYE-		85
		VHHQKLVFFAE-		
		DVGSNKGAIIG		
脑膜炎奈瑟氏球菌				
(Neisseria meningitidis)	Po7A	YVAVENGVAKKVA		86
		HFVQQTPKSQPTLVP		87
		HVVVMNKVATHVP		88
		PLQNIQPQVTKR		89
		AQAANGGAASGQVKVTKVTKA		90
		YVDEQSKYHA		91
		HFVQNKQNQPPTLVP		92
		KPSSTNAKTGNKVEVTKA		93
		YWTTVNTGSATTTTFVP		94
		YVDEKKKMVHA		95
		HYTRQNNADVFP		96
		YYTKDTNNNLTLVP		97
		PPQKNQSQPVVTKA		98
		PPSKGQTGNKVTKG		99
		PPSKSQPVKVTKA		100
		QPQTANTQQGGKVKVTKA		101
		QPQVTNGVQGNQVKVTKA		102

	QPSKAQGQTNNQVKVTKA	103
	PPSSNQGKNQAQTGNTVTKA	104
	PPSKSQGKTGNQVKVTKA	105
	PPSKSQGTNNNQVKVTKA	106
	PPSKSQPGQVKVTKVTKA	107
	QLQLTEQPSSTNGQTGNQVKVT-KA	108
	QLQLTEAPSKSQGAASNQVKVT-KA	109
	SAYTPAHVYVDNKVAKHVA	110
	SAYTPAHFVQNKQNNNPTLVP	111
	VEGRNYQLQLTE	112
	PAQNSKSAYTPA	113
	QLQLTEPPSKNQAQTQNKVTKA	114
	GRDAFELFLLGSGSDE	115
	RHANVGRDAFELFLLGSGSDEA-	
	KGTDPLKNH	116
	GRDAFNLFLLGRIGDDDE	117
	GRNAFELFLIGSATSDQ	118
	QVKVTKAKSRIRTKI	119
	TLVPAVVGKPGSD	120
NspA	HAKASSSLGSAKGFSPR	121
	TRYKNYKAPSTDFKL	122
	SLNRASVDLGGSDSFSQT	123
	GKVNTVKNVRSGELSAGVRVK	124
	GKVNTVKNVRSGELSVGVRVK	125
免疫球蛋白 E	APewPGSRDKRTL	126
	EDGQVMDVD	127
	STTQEGEL	128
	GHTFEDSTKK	129
	GGGHFPPT	130
	PGTINI	131
	FTPPT	132
	INHRGYWV	133
	GEFCINHRGYWVCGDPA	134
	MAPEWPGSRDKRTL	135
	MEDGQVMDVD	136
	MSTTQEGEL	137
	MGHTFEDSTKK	138
	MGGGHFPPT	139
	MPGTINI	140



	MFTPPT		141
	MINHRGYWV		142
	MGEFCINHRGYWVCGDPA		143
乙型肝炎			
	表面		
	PreS1	MGTNLSVPN-	
		PLGFFPDHQLDP	36
		PLGFFPDH	144
		PLGFFPDHQL	145
	PreS2	MQWNSTAFHQ-	36
		TLQDPRVRG-	146
		LYLPAGG	147
		MQWNSTAFHQ-	148
		TLQDP	149
		MQWNSTALHQ-	150
		ALQDP	151
		QDPRVR	37
		QDGRVR	37
		DPRVRG-	38
		LYLPAGG	152
		DPRVRG-	39
		LYFPAGG	153

\*下表 B 中给出了已发表表位所引用的参考文献。

在以上 SEQ ID NO: 32 的甲型流感 M2 序列中,

残基 X<sub>1</sub> 至 X<sub>8</sub> 不存在或存在, 并且当存在时为天然存在于 M2 蛋白序列中的残基, 即分别为甲硫氨酸、丝氨酸、亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸、缬氨酸和谷氨酸, 前提条件是当一个带下标 X 残基存在时, 任何具有更高下标数至 8 的剩余下标 X 也存在,

残基 X<sub>15</sub> 和 X<sub>16</sub> 存在或不存在, 并且当存在时, 分别为色氨酸和甘氨酸,

残基 X<sub>17</sub> 和 X<sub>19</sub> 存在或不存在, 并且当存在时, 独立地为半胱氨酸、丝氨酸或丙氨酸,

残基 X<sub>18</sub> 存在或不存在, 并且当存在时为精氨酸, 和

残基 X<sub>20</sub> 至 X<sub>24</sub> 存在或不存在, 并且当存在时, 为天然存在于 M2 蛋白序列中的残基, 即分别为天冬酰胺、天冬氨酸、丝氨酸、丝氨酸和天冬氨酸, 前提条件是当一个带下标 X 残基存在时, 任何剩余的具有更低下标数至 15 的下标 X 也存在。

位于异源残基或序列两侧的结构域 II 的剩余残基是 HBc 的 76-85 位的残基。因此, 在一个典型实例中, 当 78-82 残基被取代时, 结构域 II 中的嵌合序列是 76-77, 接着是限制位点编码残基、免疫原性(表位)序列、再是限制位点编码残基、然后是 HBc 序列 84-85。通过 78 和 79 残基之间的插入策略制备而来的嵌合体典型的示例性序列是 2-78 位的 HBc, 接着是限制位点编码残基、免疫原性序列、再是限制位点编码残基和 HBc 序列 79-85。其它跨越结构域 I 和 II 的所提出的嵌合体的序列从这些说明和下文中将会是显而易见的, 不需列举。

已经发现, 含有大量甘氨酸残基且长度约 5 至约 9 个残基的亲水性短肽可有助于含有所述序列的嵌合颗粒的表达, 所述短肽以肽键连接上述脑膜炎奈瑟氏球菌 B 细胞表位序列的 C 端。一个有用的短肽公开于 Karpenko 等, *Amino Acids* (2000) 18: 329-337, 其具有 SEQ ID NO: 144 的序列 GSGDEGG。

正如已经注意到的, 异源无化学反应性的残基或用于缀合表位的接头可以以肽键连接 HBc 序列中的氨基酸残基 76 和 85 之间的位置。在免疫原性表位的情况下, 残基 76-85 的 HBc 序列优选存在, 但是被添加的一个或多个残基间隔开。该嵌合体优选包括 4 位至至少 140 位的 HBc 序列和一个邻近嵌合体蛋白 N 端或 C 端的半胱氨酸残基。更优选 1-149 位的 HBc 序列存在, 但是在残基 76 和 85 之间被缀合表位的异源接头间隔开, 而且所述嵌合分子含有 C 端半胱氨酸。

先前讨论了无化学反应性的残基。缀合表位的异源接头最优选为赖氨酸(K)残基。谷氨酸或天冬氨酸、酪氨酸和半胱氨酸残基也可用作接头残基, 同样, 酪氨酸和半胱氨酸残基也可以。人们注意到, 可以存在不止一个接头, 例如 3 个赖氨酸的序列, 但是这样的用法并不是优选的, 因为可以从这样的用法中形成不均一缀合物: 其中缀合的半抗原在第一个嵌合体中键合一个接头并在第二个嵌合分子中键合一个不同的接头。美国专利第 6,231,864 B1 号公开了含有一个



个残基。因此，结构域 IV 序列基本上可以是任何序列，除了从 165 位至 C 端的 C 端 HBc 序列之外。

结构域 IV 序列的长度可以是 5 个残基；也就是说 136 至 140 位残基，至多约 125 个氨基酸残基(至多约 HBc 165 位加上至多约 100 免疫原性序列的免疫原性残基)，所述残基包含至多总共 3 个半胱氨酸，其长度足以使得所提出的嵌合蛋白总长度约 135 个至约 525 个残基。当以肽键连接结构域 I 或 II 中的一个或两个的表位分别含有至多约 30 或约 50 个残基时，正如优选的那些表位，所述嵌合分子(包括结构域 IV 的表位)的更优选长度约 170 个至约 250 个残基。含有两个免疫原性表位的特别优选的嵌合分子长度为约 190 至约 210 个残基。通过如上所述测定 280:260 吸光度比值，来确定所得颗粒未与核酸结合。

结构域 IV 序列可包括 0-3 个 Cys 残基。当存在时，优选一个或多个 Cys 残基在嵌合蛋白分子 C 端或在嵌合蛋白分子 C 端的约 5 个氨基酸残基内。另外，当不止一个 Cys 残基存在于结构域 IV 序列中，优选这些 Cys 残基彼此相邻。

优选结构域 IV 序列构成 T 细胞表位，生物体针对所提出的嵌合体的大量相同或不同的 T 细胞表位或额外的 B 细胞表位计划用作免疫原。同表 A 一样，下表 B 提供了示例性的结构域 IV 的 T 细胞表位序列，其中说明性的添加的 C 端半胱氨酸残基加有下划线。

## 表 B

## T 细胞表位

生物体	基因	序列*	引文	SEQ ID NO
HIV	P24	GPKEPFRDY- VDRFYKC	3	15
白喉棒杆菌 ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )	毒素	FQVVHNSYN- RPAYSPGC	5	159
布氏疏螺旋体 ( <i>Borrelia burgdorferi</i> )	ospA	VBIKEGTVTLKRE- IDKNGKVTVSLC	6	160
		TLSKNISKSG- EVSVELNDC	7	161
流感病毒 A8/PR8	HA	SSVSSFERFEC	8	162
		LIDALLGDP	32	163
		TLIDALLGC	32	164
克氏锥虫 ( <i>Trypanosoma cruzi</i> )		SHNFTLVASVII- EEAPSGNTC	13	165
恶性疟原虫 ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	MSP1	SVQIPKVPYPNGIVYC	15	166
		DFNHYYTLKTGLEADC		167
		PSDKHIEQYKKI- KNSIIC	23	168
		EYLNKIQNSLST- EWSPCSVT	26	169
间日疟原虫 ( <i>P. vivax</i> )		YLDKVRATVGTE- WTPCSVT		170
约氏疟原虫 ( <i>P. yoelii</i> )		EFVKQISSQLTE- EWSQCSVT		171
表兄链球菌 ( <i>Streptococcus sobrinus</i> )	AgI/II	KPRPIYEAKL- AQNQKC	16	172
		AKADYEAKLA- QYEKDL		173

## LCMV

(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)

NP	RPQASGVYM- GNLTAQC	17	174
破伤风梭菌( <i>Clostridium tetani</i> )			
tox	QYIKANSKFIG- ITELC	20	175
脑膜炎奈瑟氏球菌 ( <i>Neisseria meningitidis</i> )			
PorB	AIWQVEQKASIAGTDSGWC		176
	NYKNGGFFVQYGGAYKRHC		177
	HNSQTEVAATLAYRFGNVC		178
PorB	TPRVSYAHGFKGLVDDADC		179
	RFGNAVPRISYAHGFDFIC		180
	AFKYARHANVGRNAFELFC		181
	SGAWLKRNTGIGNYTQINAC		182
	AGEFGTLRAGRANQC		183
	IGNYTQINAASVGLRC		184
	GRNYQLQLTEQPSRTC		185
	SGSVQFVPAQNSKSAC		186
	HANVGRDAFNLFLGCG		187
	LGRIGDDDEAKGTDPC		188
	SVQFVPAQNSKSAYKC		189
	NYAFKYAKHANVGRDC		190
	AHGFDIFIERGKKGENC		191
	GVDYDFSKRTSAIVSC		192
	HDDMPVSVRYDSPDFC		193
	RFGNAVPRISYAHGFDIFIERGKKGENC		194
	NYAFKYAKHANVGRDAFNLFLGCG		195
	SGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRC		196
	SGSVQFVPAQNSKSAYTPAC		197
OpaB	TGANNTSTVSDYFRNRITC		198
	IYDFKLNDFKFKPYIGC		199
Opa-5d	LSAIYDFKLNDFKFKPYIGC		200
Opac	NGWYINPWSEVKFDLNSRC		201

## 乙型肝炎

表面			
PreS1	MGTNLSVFN- PLGFFPDHQLDP	36, 40	144
	PLGFFPDH		145
	PLGFFPDHQL		146
PreS2	MQWNSTAFHQ- TLQDFRVRG- LYLPAGG	36	147
	MQWNSTAFHQ- TLQDP		148
	MQWNSTALHQ- ALQDP		149
	QDPRVR	37	150
	QDGRVR	37	151

\*加有下划线的 C (C)不是来自天然序列。

**引用的参考文献:**

1. EPO 786 521A.
2. WO 98/07320.
3. US No. 5,639,854.
4. US No. 4,544,500.
5. EPO 399001B1.
6. Bockenstedt 等(1996) *J. Immunol.*, 157, 12: 5496.
7. Zhong 等(1996) *Bur. J. Immunol.*, 26, 11: 2749.
8. Brumeanu 等(1996) *Immunotechnology*, 2, 2: 85.
9. Hill 等(1997) *Infect. Immun.*, 65, 11: 4476.
10. EPO 432 220 B1.
11. WO 98/06851.
12. Kelly 等(1997) *Clin. Exp. Immunol.*, 110, 2: 285.
13. Kahn 等(1997) *J. Immunol.*, 159, 9: 4444.
14. WO 97/18475.
15. Ohta 等(1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 114, 1: 15.
16. Staffileno 等(1990) *Arch. Oral Biol.*, 35: 增刊 47S.
17. Saron 等(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7: 3314.
18. Corthesy 等(1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 52: 33670.
19. Bastien 等(1997) *Virology*, 234, 1: 118.
20. Yang 等(1997) *Vaccine*, 15, 4: 377.
21. Lotter 等(1997) *J. Exp. Med.*, 185, 10: 1793.
22. Nara 等(1997) *Vaccine* 15, 1: 79.
23. 美国专利第 4,886,782 号.
24. Zavala 等(1985) *Science*, 228: 1436.
25. Schodel 等(1994) *J. Exper. Med.*, 180: 1037.
26. Calvo-Calle 等(1997) *J. Immunol.* 159, 3: 1362.
27. Qari 等(1992) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 55(1-2): 105.
28. Qari 等(1993) *Lancet*, 341 (8848): 780.

29. Neiryneck 等(1999年10月) *Nature Med.*, 5 (10): 1157-1163.
30. Thompson 等(1994) *Eur. J. Biochem.*, 226 (3): 751-764.
31. Wilson 等(2000) *Science*, 287: 1664-1666.
32. Brown 等(1993) *J. Virol.*, 67 (5): 2887-2893.
33. 美国专利第 4,886,663 号.
34. Schenk 等(1999年7月8日) *Nature*, 400 (6740): 116-117.
35. Slepshkin 等(1995) *Vaccine*, 13 (15): 1399-1402.
36. Neurath 等, (1986) F. Brown 等编著, *Vaccine 85*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 185-189 页.
37. Kent 等, (1987) F. Brown 等编著, *Vaccine 86*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 365-369 页.
38. Milich 等, (1987) F. Brown 等编著, *Vaccine 86*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 377-382 页.
39. Thornton 等, (1987) F. Brown 等编著, *Vaccine 87*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 77-80 页.
40. Milich 等, (1987) F. Brown 等编著, *Vaccine 87*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 50-55 页.

在所提出的嵌合分子和颗粒中, 优选存在从残基 4 到至少 140 位残基的 HBc 氨基酸序列。更优选存在从 2 至 149 位和约 165 位的序列。B 细胞表位, 当存在时, 优选存在于残基 76 和 85 之间。正如已经注意的, 至少一个半胱氨酸残基存在于结构域 I 的 N 端上或其附近, 或者存在于其 C 端上或其附近。如上所述。一个或多个 T 细胞表位也可作为 HBc 序列 N 端或 C 端添加序列而存在。一种所提出的重组 HBc 嵌合体基本上不含结合核酸。一种含有添加的 N 端或 C 端 Cys 残基的所提出的嵌合体颗粒在形成后也比不含添加 Cys 的类似颗粒更稳定。

一种所提出的重组 HBc 嵌合分子通常存在并用作自我装配颗粒。这些颗粒由 180-240 个嵌合分子(90 或 120 个二聚体对)、通常为



240 个嵌合分子组成，所述分子在二硫化物还原剂例如 2-巯基乙醇存在下分解成蛋白分子，因此认为各分子主要通过二硫键结合在一起成为颗粒。

尽管不希望受到理论的束缚，但认为观察到所提出的 HBc 嵌合体增加的稳定性和在某些情况下增加的表达，是因为所述颗粒的嵌合蛋白分子之间形成 N 端胱氨酸二硫键。无论是否以半胱氨酸或胱氨酸形式存在，N 端半胱氨酸残基都被称为半胱氨酸，因为这就是由核酸中存在的密码子所编码的残基，从所述核酸表达所述蛋白和装配颗粒。

这些颗粒类似于在 HBV 感染者体内观察到的颗粒，但是这些颗粒是非感染性的。一旦在各种原核宿主和真核宿主中表达，各个重组 HBc 嵌合分子在宿主中装配成颗粒，所述颗粒可以容易地从宿主细胞中收获并纯化，如果需要的话。

如上所述，HBc 优势免疫环通常位于从所述完整蛋白氨基端(N 端)起约 75 至 85 位。将结构域 II 中含有免疫原性表位的序列插入到优势免疫环状序列中。这样的插入可基本上消除 HBc 环状序列的 HBc 免疫原性，而在装配的嵌合体颗粒中的极强免疫原性位置上存在免疫原性序列或接头残基。

除了上述 N-截短和 C-截短、各种表位和间隔基的插入外，所提出的嵌合分子在构成 HBc 结构域 I、II、III 和 IV 的氨基酸残基中也可含有保守取代。保守取代的定义同上。可以观察到一个说明性的保守取代：在 2 和 3 位(天冬氨酸和异亮氨酸；DI)残基被谷氨酸和亮氨酸(EL)残基取代，所述残基由 EcoRI 限制位点编码，所述限制位点用于添加编码所需 N 端表位(包括 N 端半胱氨酸残基)的核酸。

提出更罕见的“非保守”变化，例如用色氨酸取代甘氨酸。类似的小变化也可包括氨基酸缺失或插入，或两者都包括。采用本领域众所周知的计算机软件例如 LASERGENE 软件(DNASTAR Inc., Madison, WI)，可以知道如何确定哪些氨基酸残基可以被取代、插入

或缺失，而不会破坏生物学活性或颗粒形成。

本发明嵌合分子的 HBc 部分即具有 HBc 序列的部分，具有不同于作为限制酶人工产物的添加的表位、接头、柔性连接臂或异源残基的序列或残基，最优选具有图 1 (SEQ ID NO: 1)中所示的亚型 *ayw* 的氨基酸残基序列，较小的任何部分或亚型 *ayw* 序列因一端或两端截短而不存在的部分。通常该序列是 HBc 的 2 至 149 位序列。优选程度稍低的是亚型 *adw*、*adw2* 和 *adyw* 的相应氨基酸残基序列，也示于图 1 (SEQ ID NO: 2、3 和 4)。优选程度更低的是排在 2 至 149 位的土拨鼠和地松鼠序列，是图 1 中的最后两个序列(SEQ ID NO: 5 和 6)。正如别处所述，可以在一个嵌合体中一起使用来自不同哺乳动物 HBc 蛋白的不同序列部分。

当上述本发明嵌合分子的 HBc 部分具有不同于对应 2 至约 165 位的哺乳动物 HBc 分子的序列时，与 SEQ ID NO: 1 从 2 至 165 位相比，不大于约 20%的氨基酸残基被取代。与 SEQ ID NO: 1 从 2 至 165 位相比，优选不大于约 10%、更优选不大于约 5%、最优选不大于约 3%的氨基酸残基被取代。

因此，一个所提出的 164 个 HBc 残基的嵌合体可含有至多约 32 个、优选含有约 16 个不同于 SEQ ID NO: 1 的 2 至 165 位残基的残基。更优选约 8 个残基不同于残基 2-165 位的 *ayw* 序列(SEQ ID NO: 1)，最优选约 5 个残基不同。优选不在结构域 II 的优势免疫环或末端、而在所述嵌合分子的非螺旋部分的取代，并且通常在残基 2 至约 15 和残基 24 至约 50 之间，以有助于保证颗粒形成。参见 Koschel 等(1999 年 3 月), *J. Virol.*, **73** (3): 2153-2160。

当 HBc 序列在 C 端超过 165 位被截短或者在 N 端被截短，或者在免疫原性环中含有一个或多个缺失时，取代残基数目会按比例减少，因为序列总长度小于 164 个残基。为了计算的目的，在所述分子其它位置的缺失被认为是保守取代。

在本发明的再一方面，在 HBc 48 位和 107 位的一个或优选两个

半胱氨酸残基被其它残基取代,所述其它残基例如优选在任何上述 HBc 嵌合分子中的丝氨酸残基。在 37°C 下在 20mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.8)贮存 14 天后,这些自我装配的颗粒比除了在 48 位和 107 位含有两个半胱氨酸残基之外其他方面都相同的 HBc 嵌合分子所形成的颗粒更稳定。因此,当残基 48 位和 107 位的一个或者更优选两个半胱氨酸都不存在时,增强了另外因 N 端半胱氨酸或 C 端半胱氨酸或它们两者存在而稳定化的颗粒的贮存稳定性。

因此,在所有所提出的嵌合分子中,通常在 48 位和 107 位存在的 HBc 半胱氨酸残基被其它残基(例如丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺)取代,并且所提出的嵌合分子含有至少一个 N 端半胱氨酸残基或 C 端半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基对 HBc 序列来说并不是天然的。因此,在一些实施方案中,优选结构域 I 的 HBc 序列包括 5 位至 75 位残基以及至少一个 N 端半胱氨酸残基。在其它实施方案中,优选所提出的嵌合分子不仅含有 N 端半胱氨酸残基,而且如上所述在结构域 IV 内也含有一个单独的半胱氨酸残基或者在氨基酸残基序列中的半胱氨酸残基。在又一些实施方案中,优选的嵌合分子仅含一个或多个 C 端半胱氨酸残基,并且结构域 I 不含非 HBc 半胱氨酸残基。HBc 半胱氨酸残基存在于图 1 中各 HBc 序列的约 61 位。

### 嵌合体的制备

通常用众所周知的重组 DNA 技术,制备所提出的嵌合 HBc 免疫原。因此,向编码 HBc 的前体序列上添加入或从中缺失编码特定多肽序列的核酸序列,以形成编码所提出的嵌合体的核酸。

说明性的所提出的嵌合免疫原通常使用存在于甲型流感 M2 序列中的半胱氨酸残基作为 N 端半胱氨酸。下文讨论了通过体外诱变编码 HBc 分子的多核苷酸来制备所述嵌合分子的引物。当含有半胱氨酸的 M2 多肽表位在 N 端不存在时,可以通过体外诱变,采用仅

编码 M2 多肽的含有半胱氨酸部分的引物，或者就编码一个 N 端起始序列(例如 Met-Cys-或 Met-Gly-Cys-)的引物，来提供 N 端半胱氨酸。

在本发明的再一方面，将重组生产的免疫原性嵌合体颗粒给予 HBV 感染者，同时给予重组乙型肝炎表面抗原(HBsAg)。重组乙型肝炎表面抗原可任选含有 PreS1 区或 PreS2 区中的一个或两个都含有。

乙型肝炎表面抗原的制备方法是本领域众所周知的。用酵母生产重组乙型肝炎表面抗原的实例描述于美国专利第 4,977,092 号。HBc 嵌合体颗粒和 HBsAg 可以放在同一容器中或者可以作为一个药盒，其中 HBc 嵌合体颗粒放在一个容器中，HBsAg 放在第二个容器中，两者在注射前混合。一个优选的 HBsAg 剂量约 10 $\mu$ g 至约 100 $\mu$ g，最优选约 20 $\mu$ g 至约 50 $\mu$ g。HBsAg 任选配制在氢氧化铝凝胶中。在一个优选的使用方法中，联合给予 HBc 颗粒和 HBsAg 以及佐剂例如 MPL 或 RC-529。

免疫后，让所述患者保持足够时间以诱导针对 HBc 嵌合体颗粒的免疫应答。维持时间通常持续约 3 周至约 12 周的时间，并且可以包括一次加强免疫，即用所述疫苗进行第二次免疫。也提出后来的加强给药。

在如下所述的 ELISA 测定中，通过从免疫患者体内获取血浆或血清样品并测定其中抗体结合合适抗原(例如合成的 HBsAg 多肽抗原)的能力，或者通过另一种免疫测定(例如本领域众所周知的蛋白质印迹法)，容易确定抗 HBsAg 或其它抗体的产生。

以下两个策略都优选用于将免疫原性表位序列、化学反应性接头残基序列或无化学反应性序列插入到环状序列中。第一个策略是取代，其中编码优势免疫环部分的 DNA 被切下，并用编码免疫原性表位(例如 B 细胞序列)的 DNA 来取代。第二个策略是插入，其中将免疫原性表位插入到所述环的相邻残基之间。

在一个示例性取代方法中，用聚合酶链式反应(PCR)，采用定点

诱变,以提供编码一对不同的限制位点(例如 EcoRI 和 SacI)的嵌合 HBc DNA 序列,所述限制位点之一邻近编码优势免疫环的 DNA 的两端。示例性的被取代的残基是 76 至 81。编码环的部分被切下,编码免疫原性 B 细胞表位的所需序列连接到限制位点,并用所得 DNA 表达 HBc 嵌合体。参见例如 Pumpens 等, (1995) *Intervirology*, **38**: 63-74 中的表 2 中该项技术的示例性用途。

或者,一个限制位点或两个位点可以编码成定点诱变区,用限制酶切割该 DNA,以提供“粘”端。粘端可用于连接或者用核酸内切酶制成平端,然后将平端异源 DNA 区段连接到切割区。这类将序列取代到 HBc 中的实例可以在 Schodel 等, (1991) F. Brown 等编著, *Vaccines 91*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 319-325 页; Schodel 等, *Behring Inst. Mitt.*, 1997 (98): 第 114-119 页和 Schodel 等, *J. Exp. Med.*, (1994) 180 (3): 第 1037-4 页中报告的工作中找到,后两篇论文分别讨论了抗约氏疟原虫(*P. yoelii*)和柏氏疟原虫(*P. berghei*)疫苗的制备。

HBc 免疫原性环内的插入位置和环残基的存在对免疫原活性来说是重要的。因此,正如上述已公开的 PCT 申请 PCT/US01/25625 和 PCT/US01/41759 所述,疟疾 B 细胞表位在 HBc 残基 78 和 79 位之间的位置提供了颗粒免疫原,所述免疫原的免疫原性比位于残基 76 和 81 之间切下并替代的区域中相同的免疫原要高 10-1000 倍。另外,残基 78 和 79 之间插入相同的疟疾免疫原,与残基 77 和 78 之间插入的相比,提供意想不到的增加的免疫原性,约为 15 倍。

因此,总的来讲优选插入。在一个说明性的插入策略的实例中,用定点诱变产生彼此相邻的且位于编码相邻氨基酸残基(例如在残基 78 和 79 位)密码子之间的两个限制位点。该技术在 HBc 环内上述相邻残基之间添加了编码 4 个氨基酸残基(2 个用于限制位点)的 12 个碱基对。

在用限制酶进行切割、连接编码免疫原性 B 细胞表位序列的 DNA

以及该 DNA 表达形成 HBc 嵌合体之后, 可以看到, HBc 环状氨基酸序列在其 N 端侧被 2 个由 5'限制位点编码的残基间隔开、接着向 C 端方向是免疫原性 B 细胞表位序列、接着又是两个由 3'限制位点编码的免疫原性非环状残基, 然后是环状序列剩余部分。这一同样策略可用于将 N 端半胱氨酸或 N 端免疫原性序列插入到结构域 I 中, 正如 Neiryneck 等, (1999 年 10 月) *Nature Med.*, **5 (10)**: 1157-1163 中报道的一样, 或者用于将 T 细胞表位或一个或多个半胱氨酸残基插入到结构域 IV 中。Schodel 等, (1990) F. Brown 等编著, *Vaccines 90*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 193-198 页中报道了采用在残基 82 和 83 之间插入的类似策略。

更具体地讲, 编码 C 端截短的 HBc 序列(例如 HBc149)的 DNA 序列经工程改造, 使其在残基 78 和 79 之间含有相邻 EcoRI 和 SacI 位点。用这两种酶切割该 DNA, 提供一个编码 HBc 1-78 位 3'-端带有 EcoRI 粘端的片段, 而其它片段具有 5'-端 SacI 粘端并编码 79-149 位残基。将具有 5'AATT 突出端的合成核酸、接着是编码所需 B 细胞表位的序列和 AGCT 3'突出端连接起来, 提供编码 B 细胞表位的 HBc 嵌合体序列, 所述表位每侧都邻接两个在残基 78 和 79 之间的异源残基[分别为 GlyIle (GI)和 GluLeu (EL)], 同时通常破坏 EcoRI 位点而保留 SacI 位点。

将含有半胱氨酸的序列插入到结构域 IV 中的类似策略, 例如疟疾 T 细胞表位, 所述表位含有从 326 位至 345 位的恶性疟原虫(*P. falciparum*) CS 蛋白序列并在本文中称为 PF/CS326-345 (Pf-UTC)。此时, 将 EcoRI 和 HindIII 限制位点工程改造, 使之置于氨基酸残基 149 位之后的 HBc DNA 序列中。用 EcoRI 和 HindIII 消化后, 将具有上述 AATT 5'突出端的合成 DNA、接着是 T 细胞表位编码序列、一个或多个终止密码子和 3'AGCT 突出端连接到经消化的序列上, 形成编码 HBc 残基 1-149、接着是两个异源残基(GI)、终止密码子和 HindIII 位点的序列。

采用具有 SacI 限制位点、接着是在残基 79 位编码 HBc 起始的序列的正向引物，进行 PCR 扩增，然后用 SacI 和 HindIII 消化，提供编码 HBc 79-149 位加上两个添加的残基和 C 端 T 细胞表位的序列。用 SacI 消化该构建体，然后连接，提供编码所需重组 HBc 嵌合体免疫原的完整基因，所述免疫原从 HBc 1-78 位的 N 端起具有这样的序列：两个添加的残基、疟疾 B 细胞表位、两个添加的残基、HBc 79-149 位、两个添加的残基和 T 细胞表位，如图 2C 所示。

可以采用类似技术，将连接 B 细胞表位的异源接头残基放入环区序列中。所提出的接头残基包括特别优选的赖氨酸(Lys)以及天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、半胱氨酸(Cys)和酪氨酸(Tyr)。

人们注意到，SEQ ID NO: 1 中所示的氨基酸残基序列在 77 和 78 位含有 Glu 和 Asp 残基。尽管如此，仍可提出额外的、异源的、含羧基残基的引入。其它因素可以降低原有谷氨酸和天冬氨酸的化学反应性。例如，本领域已经知道，相邻脯氨酸(例如在 79 位上发现的)可以中和并因而降低邻近羧基的化学反应性。

此时，采用首次提到的插入策略，将 5 个异源残基插入到所述环状序列中；一个是用于缀合 B 细胞表位的异源接头残基，而邻近这个残基两侧的两个残基本上身也邻近环状序列残基并且是所述插入限制位点的表达产物(限制酶人工产物)。人们注意到，也可以用定点诱变，将单个密码子添加到编码 B 细胞表位的异源接头残基的 HBc 环状序列中。

人们注意到，优选使用在(邻接) B 细胞表位或 T 细胞表位两侧的两个异源残基是方便的。结果，也可以在插入序列的一侧或两侧采用不是 HBc 序列部分的 0-3 个或更多个添加的残基。插入序列和 HBc 核酸的一端或两端可以被合适的核酸酶(例如 S1 核酸酶)“逐个切掉(chewed back)”，以提供可以连接在一起的平端。添加的异源残基既不是插入的 B 细胞表位或 T 细胞表位的部分，也不是 HBc 序列的部分，因此所述添加的异源残基不计入到所述结构域中存在的残

基数, 除非这些残基是已存在的残基的保守取代, 正如下文讨论的某些构建体中的残基 GluLeu 取代 AspIle 一样。

人们也注意到, 采用众所周知的合成方法, 可以合成所需重组 HBc 嵌合体核酸的全部或部分, 所述合成方法如同美国专利第 5,656,472 号中讨论和说明的合成编码烟草(*Nicotiana tabacum*) 59 个残基的核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶信号肽的 177 个碱基对 DNA 的方法一样。例如, 可以合成具有平端或“粘端”的结构域 I 和 II, 所述平端或“粘端”可用于连接结构域 III 和 IV, 以提供表达所提出的 HBc 嵌合体的构建体, 所提出的 HBc 嵌合体在 B 细胞表位 N 端侧含有 0 个添加的残基, 而在 C 端侧或在结构域 II/III 连接部位或在其它所需位置上含有 0-3 个添加的残基。

Clarke 等(1991) F. Brown 等编著, *Vaccines 91*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 第 313-318 页报道了一个替代的插入技术。此时, 采用了遗传密码简并性的优点, 这些研究者改造了一个限制位点, 该位点对应于编码存在于这些位点的原来残基的残基 80 和 81。因此, 这些已表达的 HBc 嵌合体不含编码限制位点的残基, 而含有紧邻插入序列的 HBc 环的残基。

本文也提出编码上述 HBc 嵌合分子或该编码序列的互补序列的核酸序列(区段)。在一些优选的实施方案中, 所述核酸片段以分离纯化形式存在。

在活的生物体中, 蛋白质或多肽的氨基酸残基序列通过遗传密码与编码蛋白质的脱氧核糖核酸(DNA)基因序列直接相关。因此, 通过众所周知的遗传密码的简并性, 可以按需要制备另外的 DNA 序列和相应 RNA 序列(核酸), 所述另外的 DNA 和相应 RNA 序列编码相同的嵌合体氨基酸残基序列, 但是与上述基因序列完全不同, 以至于这两个序列在高严格性条件下不杂交, 而在中等严格性条件下才会杂交。

高严格性条件可定义为包括在约 50-55°C 的温度下在 6XSSC 中



杂交，并且最后在 68°C 温度下在 1-3XSSC 中洗涤。中等严格性条件包括在约 50°C 至约 65°C 下在 0.2-0.3 M NaCl 中杂交，接着在约 50°C 至约 55°C 的温度下在 0.2X SSC、0.1% SDS (十二烷基硫酸钠) 中洗涤。

以下核酸序列(DNA 序列或 RNA 序列): (1)自身编码或其互补序列编码其 HBc 部分从残基 4 至 136 位的嵌合分子，当存在时，是 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6; 和(2)至少在中等严格性条件(如上所述)下与 SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 或 207 的 DNA 序列杂交; 和(3)其 HBc 序列与 SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 和 207 的 DNA 序列共享至少 80%、更优选至少 90%、甚至更优选至少 95%、最优选 100% 的同一性，所述 HBc 序列定义为 DNA 变异体序列。众所周知，当有效连接合适的启动子时，核酸序列例如所提出的核酸序列可在如本文其它地方所述的合适的表达系统中表达。

编码所提出的嵌合分子的类似物或类似核酸(DNA 或 RNA)序列也提出作为本发明的一部分。一个嵌合体类似核酸序列或其互补核酸序列编码 HBc 氨基酸残基序列，所述 HBc 氨基酸残基序列与 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 中所示的 HBc 序列从残基 4 位至残基 136 位的部分至少有 80%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的同一性。该 DNA 或 RNA 在本文中称为“类似于”SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 和 207 的核酸序列或其“类似物”，并且在中度严格性杂交条件下，与 SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 和 207 的核酸序列或其互补序列杂交。编码类似序列的核酸，当适当转染和表达后，也会产生所提出的嵌合体。

不同宿主对用于编码特定氨基酸残基的特定密码子通常具有偏好性(preferences)。所述密码子偏好性是众所周知的，而且，采用例如体外诱变，可以改变编码所需嵌合体序列的 DNA 序列，使得宿主偏好密码子用于表达所述酶的特定宿主。另外，也可以利用遗传密码的简并性，来编码 SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 或 207 序列的 HBc 部分，以避免与 SEQ ID No: 1、2、3、4、5 或 6 的 DNA

或其互补序列的显著同一性。因此，一个有用的类似 DNA 序列在中等严格性条件下，不必与 SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 或 207 核苷酸序列或互补序列杂交，但仍可以提供所提出的嵌合分子。

在本发明中也提出重组核酸分子例如 DNA 分子，所述分子包含有效连接外源核酸区段(例如 DNA 区段或序列)和启动子的载体，所述外源核酸区段限定了编码上述所提出的嵌合体的基因，而所述启动子适合于驱动该基因在相容性宿主生物中的表达。更具体地讲，也提出包含载体的重组 DNA 分子，所述载体包含有效连接 DNA 区段的启动子，所述启动子用于驱动嵌合体在宿主生物细胞中表达，所述 DNA 区段限定了嵌合体或 DNA 变异体的 HBc 部分基因，所述变异体与 SEQ ID NO: 202、203、204、205、206 或 207 的嵌合体基因具有至少 90% 的同一性，并且与该基因在中度严格性条件下杂交。

还提出重组 DNA 分子，所述分子包括含有有效连接 DNA 区段的启动子的载体，所述启动子用于驱动嵌合体在宿主生物细胞中的表达，所述 DNA 区段是编码 HBc 嵌合体部分氨基酸残基序列的类似核酸序列，所述编码 HBc 嵌合体部分氨基酸残基序列与 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 序列的 HBc 部分具有至少 80% 同一性、更优选 90% 同一性、最优选 95% 同一性。当适当转染并在宿主细胞中表达后，该重组 DNA 分子提供所提出的嵌合分子。

人们注意到，因为地松鼠 HBc N 端序列 30 个氨基酸残基与其它任何 HBc 序列都不能比对，其序列及其编码核酸序列及其互补序列都不包括在以上的百分同一性内，而且也不是用于杂交测定的编码 30 个残基序列或其互补序列的核酸的部分。同样，在 HBc N 端和 C 端的一端或两端截短的序列也不包括在百分同一性计算中，而且也不是其中去除优势免疫环残基以便用于插入免疫原性表位的序列。因此，仅包括嵌合分子中存在的 HBc 编码碱基或 HBc 序列残基，并且在百分同一性计算中与比对的核酸或氨基酸残基序列进行比较。

由于本文公开的基因的编码序列示于 SEQ ID NO: 172、173、

174、175、176 和 177，因此分离的核酸区段、优选 DNA 序列、变异体及其类似物都可以通过体外诱变来制备，这是本领域众所周知的，在 Current Protocols In Molecular Biology, Ausabel 等编著, John Wiley & Sons (New York: 1987) 第 8.1.1-8.1.6 页中有讨论，它开始于基因的起始 ATG 密码子，结束于每个基因的终止密码子或正好在其下游。因此，所需限制位点可以在起始密码子或其上游进行改造，或者在终止密码子或其下游进行改造，使得可以制备、切除和分离其它基因。

正如本领域众所周知的，只要存在所需的核酸、说明性的 DNA 序列(包括起始信号和终止信号)，则添加的碱基对通常会存在于所述区段的两端，并且所述区段仍可以用于表达蛋白。这当然推测有效连接 DNA 序列的区段不存在，所述 DNA 序列抑制表达、表达另一种消耗需要表达的酶的产物、表达消耗需要由这个所需酶产生的反应产物的产物，或者干扰所述 DNA 区段的基因的表达。

因此，只要 DNA 区段不含这样的干扰 DNA 序列，本发明的 DNA 区段长度可以约 500 至约 15,000 个碱基对。重组 DNA 分子、特别是表达载体的最大尺寸主要取决于方便和宿主细胞可以容纳的载体大小，必要时，只要复制和表达所需的所有最小 DNA 序列都存在即可。最小载体尺寸是众所周知的。这样长度的 DNA 区段不是优选的，但仍可以使用。

可以通过化学技术，合成编码上述嵌合体的 DNA 区段，所述技术例如 Matteucci 等(1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**: 3185 的磷酸三酯法。当然，通过化学合成编码序列，可以通过取代编码天然氨基酸残基序列的合适碱基，即可简单地进行任何所需修饰。然而，优选包括上述序列的 DNA 区段。

所提出的 HBc 嵌合体可在各种转化宿主系统中、通常在宿主细胞中产生(表达)，尽管如此其还可在无细胞情况下表达，所以也提出了体外系统。这些宿主细胞系统包括但不限于微生物，例如用重组

噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌；用酵母表达载体转化的酵母；用病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统；用病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒)或用细菌表达载体(例如 Ti 质粒)转化的植物细胞系统；或者适当转化的动物细胞系统例如 CHO、VERO 或 COS 细胞。本发明并不限于所用的宿主细胞。

含有编码 HBc 嵌合体的基因的 DNA 区段优选得自含有该基因的重组 DNA 分子(质粒载体)。能够指导嵌合体基因表达成为 HBc 嵌合体蛋白的载体在本文被称为“表达载体”。

表达载体含有包括启动子在内的表达控制元件。嵌合体编码基因有效连接表达载体，使得启动子序列指导 RNA 聚合酶结合并表达嵌合体编码基因。用于表达多肽编码基因的是启动子，所述启动子是诱导型启动子、病毒启动子、合成启动子、组成型启动子，正如 Poszkowski 等(1989) *EMBO J.*, 3: 2719 和 Odell 等(1985) *Nature*, 313: 810 所述，并且被时间调节、空间调节和时空调节，正如 Chua 等(1989) *Science*, 244: 174-181 所述。

一个优选的用于原核细胞例如大肠杆菌的启动子是 Rec 7 启动子，该启动子被外源提供的萘啶酮酸所诱导。一个更优选的启动子存在于质粒载体 JHEX25 (得自 Promega Corp., Madison WI)中，所述启动子被外源提供的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖-吡喃糖苷(IPTG)所诱导。一个再更优选的启动子即 tac 启动子存在于质粒载体 pKK223-3 中，也可被外源提供的 IPTG 所诱导。使用约 25 $\mu$ M 至约 100 $\mu$ M IPTG 进行诱导，pKK223-3 质粒可以在各种大肠杆菌菌株(例如 XL-1、TB1、BL21 和 BLR)中成功表达。令人吃惊的是，已经发现，约 25 $\mu$ M 至约 50 $\mu$ M 浓度的 IPTG 在 2L 摇瓶和发酵罐中能提供最优化结果。

在已公布的上述申请 WO 02/14478 A2 中，详细讨论了所提出的嵌合分子在以下生物内的表达：其他微生物例如沙门氏菌属 (*Salmonella*) 如伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和鼠伤寒沙门氏菌-大肠杆菌的杂合体，酵母例如酿酒酵

母(*S. cerevisiae*)或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*), 哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 单子叶植物细胞和双子叶植物细胞、通常和特别是当需要口服疫苗或接种时在双子叶植物储藏器官例如根、种子或果实, 以及昆虫细胞例如通过使用苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)或杆状病毒得到的 *S. Frugiperda* 细胞或粉纹夜蛾属(*Trichoplusia*)。尽管这些表达模式是所提出的, 但是在本文中不再作进一步讨论。

已经开发了各种方法, 通过互补的粘端或平端, 使 DNA 有效连接载体。例如可以将互补的同聚物序列段添加到有待插入到载体 DNA 中的 DNA 区段中。然后, 将载体和 DNA 区段通过互补的同聚体尾之间的氢键连接, 形成重组 DNA 分子。

或者, 可以使用含有一个或多个限制性内切核酸酶位点的合成接头, 将 DNA 区段连接至表达载体上, 如上所述。将合成接头连接到平端的 DNA 区段上, 即在能催化该平端 DNA 分子连接的酶(例如噬菌体 T4 DNA 连接酶)存在下, 通过将平端 DNA 区段与大量过量的合成接头分子一起孵育。

因此, 反应产物是在其末端携带合成接头序列的 DNA 区段。然后, 用合适的限制性内切核酸酶切割这些 DNA 区段, 然后连接到表达载体中, 所述载体已经采用产生与所述合成接头相匹配的末端的酶进行切割。含有各种限制性内切核酸酶位点的合成接头可得自各种商业来源, 包括 New England BioLabs, Beverly, MA。也可采用 PCR 技术, 获取所需 DNA 区段, 在所述 PCR 技术中, 正向引物和反向引物均含有扩增后可以被切割的所需限制位点, 使得可以将基因插入到载体中。或者, 正如本领域众所周知的, PCR 产物可以直接克隆到含有 T 突出端的载体(Promega Corp., A3600, Madison, WI)中。

表达的嵌合蛋白在宿主细胞中自我装配成颗粒, 无论是在单细胞还是在多细胞宿主中的细胞中。用标准技术收获含有颗粒的细胞, 然后用弗氏压碎器、溶菌酶、超声波仪、玻璃珠打浆机或显微流体装

置(microfluidizer) (Microfluidics International Corp., Newton MA)来裂解细胞。细胞裂解液经澄清后,用 45%硫酸铵沉淀颗粒,重悬浮于 20mM 磷酸钠(pH 6.8)中,针对相同的缓冲液进行透析。用快速离心澄清透析物,然后上清液用琼脂糖<sup>®</sup> CL-4B 进行凝胶过滤层析。鉴别含有颗粒的流分,进行羟基磷灰石层析,再用硫酸铵沉淀,然后重新悬浮、透析和过滤除菌并贮存于-70℃。

### **HBc 嵌合体缀合物**

可以化学(共价)连接物质的嵌合 HBc 颗粒也构成本发明的一部分。具体地讲,对应于 HBV 表面抗原的肽序列可以共价结合嵌合颗粒。非 HBV 序列也可以有利地与 HBc 嵌合体缀合。或者,非肽化合物可以有利地与 HBc 嵌合体颗粒缀合。所述非肽化合物可包括寡核苷酸、糖类、免疫刺激性烷基化糖类。

任何化学反应性部分(半抗原)可以连接到所提出的 HBc 嵌合体或嵌合体颗粒上,所述嵌合体颗粒例如在结构域 II 的环状区含有赖氨酸、谷氨酸或天冬氨酸、半胱氨酸或酪氨酸等异源接头残基的嵌合体颗粒。目标分子通常是 B 细胞免疫原,但也可以是使所述嵌合体靶向免疫系统专一性受体或细胞的免疫刺激分子或肽序列。共价结合的半抗原可以是多肽、蛋白质、寡核苷酸、碳水化合物(糖;即寡糖或多糖)或非多肽化合物、非碳水化合物的化合物例如 2,4-二硝基苯或药物例如可卡因或尼古丁。

如此形成的 HBc 嵌合体颗粒缀合物用作接种物或疫苗,如下文所述。因为嵌合蛋白在表达后自我装配,而且表达后形成缀合物,与游离蛋白分子相比,通常用装配颗粒进行缀合物的形成。

通过蛋白或多肽的氨基酸残基侧链将各个半抗原分子有效连接到所述蛋白或多肽上,以形成悬挂连接的免疫原性缀合物(例如支链多肽聚合物)的方法在本领域是众所周知的,并且在 2002 年 2 月 21 日公布的 PCY WO 02/14478 A2 中有详细介绍。

## 接种物和疫苗

优选将呈颗粒形式的上述重组 HBc 嵌合体免疫原溶解或分散在免疫原性有效量的药物可接受的溶媒组合物中，以制成接种物或疫苗，所述组合物优选是水溶液。当给予需要诱导抗体的宿主动物或患有慢性乙型肝炎病毒感染并因此需要免疫的宿主动物(例如哺乳动物(例如小鼠、狗、山羊、绵羊、马、牛、猴子、猿或人类)或鸟(例如鸡、火鸡、鸭或鹅))时，接种物诱导抗体，所诱导的抗体与添加的 B 细胞表位(例如存在于免疫原中的 Pre-S2 B 细胞表位)发生免疫反应。在疫苗中，这些诱导的抗体也被认为在体内与病毒或病毒感染的细胞发生免疫反应(与病毒或病毒感染的细胞结合)，保护宿主不受流感感染。接种物在免疫宿主动物体内可以诱导活化 T 细胞的产生，但是这些活化 T 细胞没有保护性，而疫苗诱导的活化 T 细胞能保护宿主。

因此，在一种动物中是疫苗的组合物，对另一种宿主来说可以是接种物，因为在未感染甲型流感的第二种宿主中诱导抗体。在此情况下，据信，HBV 慢性携带者主要通过活化 T 细胞而得到保护。

每次免疫中重组 HBc 嵌合体免疫原的用量称为免疫原性有效量，该用量可以在宽范围内变动，取决于重组 HBc 嵌合体免疫原、免疫的动物宿主和疫苗中存在的佐剂，如下所述。疫苗和接种物的免疫原性有效量分别提供保护性或抗体活性，如上所述。

疫苗或接种物通常含有重组 HBc 嵌合体免疫原，其浓度为每次接种(单位剂量)约 1 微克至约 1 毫克，优选每单位剂量约 10 微克至约 50 微克。免疫小鼠通常含有 10 $\mu$ g 或 20 $\mu$ g 嵌合体颗粒。

在本发明的一个优选实施方案中，将嵌合 HBc 颗粒或悬挂连接半抗原的嵌合颗粒以诱导 T 细胞活化的方式给予慢性感染乙型肝炎病毒的患者。所述治疗包括重复注射给药。最优选的给药方法包括肌肉或皮下注射，但是替代的优选方法包括皮内给药。可以使用例如 Powderject Pharmaceuticals, Plc (Oxford, England)开发的设备，通过

颗粒轰击，进行皮内给药，或者可以通过使用贴剂来进行皮内给药。

优选用于给予免疫原性颗粒的贴剂具有多个约 50 微米至约 1000 微米长的短小突起，这些突起可以刺入表皮，提供免疫原性颗粒从贴剂进入真皮的通道。朗格汉斯细胞(Langerhans cell)活化剂优选与皮内给药同时给予。活化剂包括樟脑、二甲基亚砷和邻苯二甲酸二苯酯。如果通过肌肉或皮下注射给药，优选在 Th-1 启动佐剂存在下给予嵌合 HBc 分子颗粒。

给予患者一个或多个剂量的嵌合颗粒。所述颗粒的剂量优选约 10 $\mu$ g 至约 500 $\mu$ g，最优选约 20 $\mu$ g 至约 100 $\mu$ g，以诱导增强的抗乙型肝炎病毒的 T 细胞应答。抗病毒免疫应答的增强可以通过 T 细胞应答和/或 B 细胞应答来测量。所提出的方法的结果是，与患者原先的未经处理的应答相比，患者体内增强了两种抗 HBV 应答中的一种或两种。

在本发明的一些方面，免疫方案可包括所有或部分 HBsAg 分子，包括 Pre-S1 区和 Pre-S2 区。可以在同一天或隔天一起、单独给予这样的免疫，或者作为一个免疫原的几次免疫、接着是其他免疫原的几次免疫的系列给药。

可以通过多种技术测定 T 细胞活化。在常规实践中，用所提出的 HBc 嵌合体颗粒疫苗或接种物接种宿主动物，然后收集外周单核血细胞(PMBC)。然后，将这些 PMBC 在 T 细胞免疫原存在下，体外培养约 3-5 天。在抗 HBV 的 T 细胞应答的情况下，T 细胞免疫原可以是 HBsAg、HBc 或其片段。然后，可以分析培养 PMBC 的增殖或例如 IL-2、GM-CSF 或 IFN- $\gamma$ 等细胞因子的分泌。T 细胞活化的测定是本领域众所周知的。参见例如美国专利第 5,478,726 号及其中引用的技术。

测定 B 细胞应答就是测定抗体。就 HBV 而言，抗表面抗原的抗体(包括 pre-S1 区和 pre-S2 区)的出现是增强的免疫应答的指标。

疫苗通常含有重组 HBc 嵌合体免疫原，其浓度为每次接种(单位



剂量)约1微克至约1毫克,优选每单位剂量约10微克至约50微克。术语“单位剂量”当涉及本发明的疫苗或接种物时,是指适于作为动物单位剂量的物理上分离的剂量,每单位含有预定量的活性物质,所述预定量是根据单独或与所需稀释剂(即载体或溶媒)共同产生所需免疫原性效应而计算出来的。

通常从回收的重组 HBc 嵌合体免疫原制备疫苗,即通过将免疫原(优选以颗粒形式)分散在生理可耐受(可接受)的稀释用溶媒例如水、盐水、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、乙酸缓冲盐溶液(ABS)、5%甘露醇溶液、林格溶液等中,以形成含水组合物。稀释用溶媒也可包括如下文所述的油性材料,例如花生油、角鲨烷或角鲨烯。溶媒还可含有如下文所述的免疫刺激分子。

含有蛋白类材料作为活性成分的疫苗的制备方法也是本领域众所周知的。通常,这类疫苗制成供胃肠外用,或者可以呈液体溶液剂或者可以是混悬剂;也可制备适于在注射前配成溶液剂或混悬剂的固体形式。制剂也可以被乳化。

免疫原性活性成分通常与药物可接受的并与其活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂例如水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。另外,如有必要,接种物或疫苗可含有少量辅料,例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂,这些辅料可以增强所述组合物的免疫原性效力。

所提出的疫苗最好还包括佐剂。用于本发明的疫苗和接种物的合适的佐剂包括能够增强针对嵌合体 B 细胞表位的抗体应答的佐剂,以及能够增强针对嵌合体中含有的 T 细胞表位的细胞介导应答的佐剂。佐剂是本领域众所周知的(参见例如 Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, 第 6 卷, Powell, M. F. 和 Newman, M.J. 编著, Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X)。

示例性的佐剂包括不能用于人体的完全弗氏佐剂(CFA)、不完全

弗氏佐剂(IFA)、角鲨烯、角鲨烷和明矾[例如 Alhydrogel™ (Superfos, Denmark)], 这些都是本领域众所周知的材料, 可以从若干市售来源获得。

优选与本发明免疫原一起使用的佐剂包括铝盐或钙盐(例如氢氧化物或磷酸盐)。一个特别优选用于本文的佐剂是氢氧化铝凝胶, 例如 Alhydrogel™。对于氢氧化铝凝胶, 将嵌合蛋白与所述佐剂混合, 使得每剂含有约 50 微克至约 800 微克的铝, 优选含有介于 400 微克和 600 微克之间的铝。磷酸钙纳米粒(CAP)是一种由 Biosante, Inc (Lincolnshire, IL)开发的佐剂。目标免疫原或者可以在其颗粒外面包衣, 或者在里面包胶囊[He 等(2000 年 11 月) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(6): 899-903]。

另一种特别优选与本发明免疫原一起使用的佐剂是乳剂。所提出的乳剂可以是水包油乳剂或油包水乳剂。除了免疫原性嵌合体蛋白颗粒外, 这类乳剂还包括角鲨烯、角鲨烷、花生油等油相作为众所周知的分散剂。优选非离子型分散剂, 这类材料包括山梨坦和二缩甘露醇的单-和二-C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>-脂肪酸酯, 例如山梨坦单硬脂酸酯、山梨坦单油酸酯和二缩甘露醇单油酸酯。给予含有免疫原的乳剂作为乳剂。

优选这类乳剂为油包水乳剂, 与嵌合体蛋白颗粒在水相中乳化, 所述乳剂包含角鲨烯、甘油和表面活性剂例如二缩甘露醇单油酸酯(Arlacel™ A), 任选含有角鲨烷。油相优选包含约 0.1%至约 10%的疫苗, 更优选约 0.2%至约 1%。油相的替代组分包括 $\alpha$ -生育酚、混合链甘油二酯和甘油三酯和山梨坦酯。众所周知, 这类乳剂的实例包括 Montanide™ ISA-720 和 Montanide™ ISA 703 (Seppic, Castres, France), 每种都含有角鲨烯和角鲨烷, 其中以角鲨烯为主, 但是在 Montanide™ ISA 703 中较少。最优选使用 Montanide™ ISA-720, 并且使用油水比例为 7:3 (w/w)。其它优选的水包油乳化佐剂包括在 WO 95/17210 和 EP 0 399 843 中公开的佐剂。

本文也提出小分子佐剂的用途。本文使用的一类小分子佐剂是 7-取代-8-氧代-或 8-硫代-鸟苷衍生物, 该衍生物描述于美国专利第 4,539,205、4,643,992、5,011,828 和 5,093,318 号, 其公开内容通过引用结合到本文中。这些材料中, 特别优选 7-烯丙基-8-氧代鸟苷(洛索立宾)。该分子在诱导抗原-(免疫原-)特异性应答中已显示出是特别有效的。

优选有用的佐剂包括单磷酸脂质 A (MPL<sup>®</sup>), 即 3-脱酰单磷酸脂质 A (3D-MPL<sup>®</sup>), 这是一种众所周知由 Seattle, WA 的 Corixa 公司(以前为 Ribi Immunochem, Hamilton, Montana)生产的佐剂。该佐剂含有从细菌中提取的三种组分: 单磷酸脂质(MPL<sup>®</sup>) A、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS), 这三种组分(MPL+TDM+CWS)含在 2%角鲨烯/Tween<sup>®</sup> 80 乳剂中。可以通过 GB 2122204B 中公开的方法制备该佐剂。3-脱-O-酰基化单磷酸脂质 A 的一种优选形式是呈乳剂形式, 所述乳剂具有的小颗粒直径小于 0.2 $\mu\text{m}$  (EP 0 689 454 B1)。

最优选结构上与 MPL<sup>®</sup>佐剂相关的化合物, 所述佐剂称为氨基烷基葡萄糖胺磷酸酯(AGP), 例如得自 Corixa 公司, 其商品名为 RC-529 {2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基氨基]-乙基-2-脱氧-4-O-磷酸基-3-O-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基]-2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基氨基]-p-D-吡喃葡萄糖苷三乙基铵盐}。RC-529 佐剂在角鲨烯乳剂中作为 Corixa 公司的 RC-529SE 销售, 而在水性制剂中作为 Corixa 公司的 RC-529AF 销售(参见美国专利第 6,355,257 和 6,303,347 号; 美国专利第 6,113,918 号; 和美国公布号 03-0092643)。

其它最优选的佐剂包括 CpG (亦称 ODN; 含有 CpG 核苷酸基序一次或多次加上侧翼序列的寡核苷酸), 得自 Coley Pharmaceutical Group; 称为 QS21 的佐剂, 得自 Aquila Biopharmaceuticals, Inc.; 含有 QS21 和 MPL 离子水包油乳剂的 SBAS2 (现在称为 ASO2), 得自 SKB (现在称为 Glaxo-SmithKline); 所谓胞壁酰二肽类似物, 描述于美国专利第 4,767,842 号; 和 MF59, 得自 Chiron 公司(参见美国专利

第 5,709,879 号和第 6,086,901 号)。

更具体地讲,也可使用来自南美树木 *Quillaja Saponaria Molina* 树皮、具有佐剂活性的免疫活性皂苷流分(例如 Quil™ A)。Quil™ A 的衍生物例如 QS21 (Quil™ A 经 HPLC 纯化的流分衍生物),其生产方法公开于美国专利第 5,057,540 号。除了 QS21 (亦称 QA21)之外,也公开了其它流分例如 QA17。

胞壁酰二肽佐剂包括 N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (thur-MDP)、N-乙酰基-去甲-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(CGP 11637, 称为去甲-MDP)和 N-乙酰基-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油基-3-羟基磷酸氧基)-乙胺(CGP 1983A, 称为 MTP-PE)。

优选的佐剂混合物还包括 3D-MPL 和 QS21 的组合(EP 0 671 948 B1)、包括 3D-MPL 和 QS21 在内的水包油乳剂(WO 95/17210, PCT/EP98/05714)、与其它载体配制在一起的 3D-MPL (EP 0689 454B1)、配制在含胆固醇脂质体中的 QS21 (WO 96/33739)或免疫刺激性寡核苷酸(WO 96/02555)。备选佐剂包括描述于 WO 99/52549 中的佐剂以及聚氧乙烯醚的非颗粒混悬剂(英国专利申请第 9807805.8 号)。

特别优选使用以下两种激动剂之一或它们两者的佐剂:(a) toll 样受体-4 (TLR-4)激动剂,例如 MPL®或结构相关化合物例如 RC-529 佐剂或脂质 A 模拟物;和(b) toll 样受体-9 (TLR-9)激动剂,例如含有非甲基化寡脱氧核苷酸的 CpG 基序。当药物可接受的稀释剂与上述含有免疫原性 HBc 的颗粒混合或与所述免疫原性颗粒化学连接并且免疫合适的宿主动物(例如慢性感染乙型肝炎病毒的人)时,所述佐剂在免疫宿主体内提高 $\gamma$ -生产(gamma-producing) CD 8+ T 细胞、CD 4+ T 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞的产量。所述佐剂混合物中也可以含有明矾。初步结果表明,明矾趋向于增加促进 IgG1-型抗体产生的 Th2 免疫应答,而 RC-529-型佐剂增加促进 IgG2a 和 IgG2b 抗体产生的 Th1

免疫应答和 T 细胞应答(当 T 细胞免疫原存在时,如同当 HBc 颗粒包括所述免疫原的情况一样)。

最优的佐剂混合物包括稳定的油包水乳剂,所述乳剂还含有氨基烷基葡糖胺磷酸酯,例如描述于美国专利第 6,113,918 号。在氨基烷基葡糖胺磷酸酯中,最优称为 RC-529 {(2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基氨基]乙基-2-脱氧-4-O-磷酰基-3-O-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基]-2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基氨基]-p-D-吡喃葡萄糖苷三乙基铵盐}的分子。优选的油包水乳剂描述于 WO 9956776。

在一个优选的使用方法中,以药盒形式提供佐剂和免疫原。所述药盒包括重组生产的免疫原性嵌合体颗粒的容器和佐剂的容器。这两个容器的内容物在使用前混合在一起,优选在给予患者之前即刻混合。在最优的使用方法中,以冻干饼形式提供重组生产的嵌合体颗粒。冻干饼用佐剂的含水制剂重建。

佐剂按佐剂量来使用,佐剂量可以根据佐剂、哺乳动物和重组 HBc 嵌合体颗粒免疫原的不同而变化。通常用量可以在每次免疫约 1 $\mu$ g 至约 1mg 的范围内变化。本领域技术人员知道,可以容易地确定合适浓度或用量。

疫苗通常配制成供胃肠外给药。示例性的免疫可以以皮下(SC)、肌肉(IM)、静脉内(IV)、腹膜内(IP)或皮内(ID)形式进行。适于其它给药方式的其它制剂包括栓剂和在某些情况下的口服制剂。也提出供接种用的喷鼻剂的使用,正如 Neiryneck 等(1999 年 10 月) *Nature Med.*, **5 (10)**: 1157-1163 所述。对于栓剂,传统的粘合剂和载体可以包括例如 polyalkalene glycols 或甘油三酯,所述栓剂可以由含有范围在 0.5% 至 10%、优选 1-2% 的活性成分的混合物制备而来。口服制剂包括通常使用的赋形剂,例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

疫苗组合物采取以下形式:溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂或粉剂,并且含有免疫原性有效量的 HBc 嵌合体或

HBc 嵌合体缀合物(优选为颗粒)作为活性成分。在典型的组合物中,免疫原性有效量的优选 HBc 嵌合体或 HBc 嵌合体缀合物颗粒每剂约 1 $\mu$ g 至约 1mg 活性成分,更优选每剂约 5 $\mu$ g 至约 50 $\mu$ g,如上所述。

HBc 嵌合体颗粒和 HBc 嵌合体颗粒缀合物可以呈中性或盐形式配制在疫苗中。药物可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白或半抗原的游离氨基成盐),并且可以用无机酸或有机酸生成,所述无机酸例如盐酸或磷酸,所述有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等。与游离羧基生成的盐也可以衍生自无机碱和有机碱,所述无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,所述有机碱例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

在又一个实施方案中,提出一种疫苗或接种物,其中将编码所提出的 HBc 嵌合体的基因转染到合适的减毒肠道菌例如伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌-大肠杆菌杂合体或大肠杆菌中。以上提供的引文中公开了示例性的减毒或无毒伤寒沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌-大肠杆菌杂合体。特别提出这些疫苗和接种物用于抵抗通过鼻粘膜、肠粘膜和生殖道粘膜感染或传播的疾病,例如流感、酵母例如曲霉属(*Aspergillus*)和念珠菌属(*Candida*)、病毒例如脊髓灰质炎病毒、口蹄疫(moot-and-mouth disease)病毒、甲型肝炎病毒,以及细菌例如霍乱弧菌属(*Cholera*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)和大肠杆菌,以及在除了 IgG 系统应答以外或取代 IgG 系统应答而需要粘膜 IgA 应答的情况下。

肠道菌可以被冻干,与干的药物可接受的稀释剂混合,制成口服片剂或胶囊剂并且象常规固相药物一样给予宿主动物。另外,这类细菌疫苗的含水制剂适用于通过口服、鼻腔、直肠或阴道给药进行粘膜免疫。

可以通过口服转基因植物组织例如根(例如胡萝卜)或种子(例如大米或玉米),使用含有提出嵌合分子颗粒的植物材料,达到口服免疫。在这种情况下,唾液或胃肠道的体液提供用于免疫的常用含水

介质，而周围的植物组织提供药物可接受的稀释剂。

以与剂量配方相容的方式、以治疗有效量和免疫原性量给予疫苗。给药量取决于待治疗的受试者、受试者免疫系统合成抗体的能力和所需保护程度。给药所需活性成分精确用量取决于医生的判断并且每个个体都不相同。然而，合适的剂量范围每个个体大约为 10 微克活性成分。合适的初次给药和加强给药的方案也是可变的，但通常是初次给药后间隔一段时间(数周或数月)，再次注射给药或以其它方式给药。

人们注意到，在 HBV 感染者体内诱导治疗性免疫应答的替代方法是将免疫原性嵌合体颗粒离体给予患者的树突细胞，然后将该树突细胞回输给同一患者。从体内分离树突细胞并在抗原存在下培养它们的方法是本领域众所周知的[Nestle 等(2001) *Nature Medicine* 7, 761-765 及其中引用的参考文献]。

因此，本发明的另一方面是在慢性 HBV 感染者体内诱导抗 HBc 的 T 细胞应答的方法。该方法包括下述步骤：从患者体内分离树突细胞，使树突细胞接触免疫原性嵌合体颗粒并保持接触，以形成活化树突细胞，任选用细胞因子例如 GM-CSF 刺激所述树突细胞，然后将所述活化的树突细胞回输给同一患者。

用以下非限制性实施例说明本发明。

### **实施例 1: 含 B 细胞表位嵌合体的制备**

#### **A. 质粒载体 pKK223-3N (一种修饰形式的 pKK223-3)的制备**

通过建立唯一的 NcoI 限制位点，修饰质粒载体 pKK223-3 (Pharmacia)，能够使 HBc 基因作为 NcoI-HindIII 限制片段插入并随后在大肠杆菌宿主细胞中表达。为了修饰 pKK223-3 质粒载体，用 PCR 引物 pKK223-3/433-452-F 和 pKK223-NcoI-mod-R，并用 pKK223-3 作为模板，制备新的 SphI-HindIII 片段。该 PCR 片段用限制酶 SphI 和 HindIII 切割，产生 467 bp 片段，所述片段然后与 pKK223-3 载体





V1

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA SEQ ID NO:210

HBc-E77/EcoRI-R

5'-GCGGAATTCCTTCCAAATTAACACCCACC SEQ ID NO:211

HBc-D78/EcoRI-SacI-F

5'-CGCGAATTCAAAAAGAGCTCGATCCAGCCTCTAGAGAC  
SEQ ID NO:212

HBc149/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG SEQ ID NO:213

V2

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA SEQ ID NO:210

HBc-D78/EcoRI-R

5'-GCGGAATTCATCTTCCAAATTAACACCCAC SEQ ID NO:214

HBc-P79/EcoRI-SacI-F

5'-CGCGAATTCAAAAAGAGCTCCCAGCGTCTAGAGACCTAG  
SEQ ID NO:215

HBc149/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG SEQ ID NO:213

表达免疫优势环中含有 N 端半胱氨酸和来自恶性疟原虫的 CS-重复表位的嵌合体颗粒的载体

制备两个表达载体 [V2.Pf1 (N-MGCELDP) 和 V2.Pf1 (N-MGCDIDP)], 以确定 N 端半胱氨酸残基稳定嵌合体颗粒的能力。为

了制备载体 V2.Pf1 (N-MGCELDP), 用寡核苷酸 HBc (MGCELDP)-NcoI-F 和 HBc149/HindIII-R 扩增来自载体 V2.Pf1 的杂合 HBc 基因。所得 528 bp 片段用 NcoI 和 HindIII 切割并插入到已用相同的两种酶切割的 pKK-223-3N 中。

为了制备载体 V2.Pf1 (N-MGCDIDP), 用寡核苷酸 HBc (MGCDIDP) -NcoI-F 和 HBc149/HindIII-R 扩增来自载体 V2.Pf1 的杂合 HBc 基因。所得 528 bp 片段用 NcoI 和 HindIII 切割并插入到已用相同的两种酶切割的 pKK-223-3N 中。

HBc (MGCELDP) -NcoI-F

M G C E L D P Y K E F G  
5' -GCGCCATGGGGTGTGAGCTCGACCCTTATAAAGAATTTGG

SEQ ID NO:216

SEQ ID NO:217

HBc (MGCDIDP) -NcoI-F

M G C D I D P Y K E F G  
5' -GCGCCATGGGGTGTGACATCGACCCTTATAAAGAATTTGG

SEQ ID NO:218

SEQ ID NO:219

### C. V7 克隆载体的制备

为了能将 T 细胞表位与 HBc 嵌合体 C 端融合, 构建一个新的载体, 即 V7。在缬氨酸-149 和 HindIII 位点之间插入唯一的 EcoRI 和 SacI 限制位点, 以便将合成 dsDNA 定向插入到 EcoRI-HindIII (或 EcoRI-SacI) 限制位点中。采用以下 PCR 引物对, 扩增在氨基端带有 NcoI 限制位点、在羧基端带有 EcoRI、SacI 和 HindIII 位点的 HBc 149 基因。PCR 反应产物(479 bp)用 NcoI/HindIII 消化并克隆到 pKK223-3N 中, 形成 V7。

为了插入 T 细胞表位, 质粒(V7)用 EcoRI/HindIII (或 EcoRI-SacI)

消化,然后将具有 EcoRI/HindIII (或 EcoRI/SacI)突出端的合成 dsDNA 片段连接到 V7 上。对于所有 V7 构建体,天然 HBc 的最后一个氨基酸(缬氨酸-149)和插入的 T 细胞表位的第一个氨基酸被甘氨酸-异亮氨酸二肽序列间隔开,所述二肽序列由形成 EcoRI 限制位点的核苷酸编码。对于在 EcoRI/SacI 插入的表位,在 T 细胞表位之后、在终止密码子之前有由 SacI 位点贡献的额外的谷氨酸-亮氨酸残基。限制位点在以下引物中也加有下划线。

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

SEQ ID NO:210

HBc149/SacI-EcoRI-H3-R

5'-CGCAAGCTTAGAGCTCTTGAATTCCAACAACAGTAGTCTCCG

SEQ ID NO:220

#### D. V12 表达构建体的制备

从 V2 和 V7 载体构建 V12 载体, V12 载体在氨基酸 78 和 79 之间含有 B 细胞表位,并且在缬氨酸-149 下游含有 T 细胞表位。用两个 PCR 引物(HBc-P79/SacI-F 和 pKK223-2/4515-32R)扩增含有插入在 EcoRI/HindIII 的 T 细胞表位的 V7 载体的羧基端,以提供对应于氨基酸 79-149 加上 T 细胞表位的 dsDNA 片段,所述片段邻接 SacI 和 HindIII 限制位点。

PCR 产物用 SacI 和 HindIII 切割,然后克隆到已经用相同两种酶切割制备的所需 V2 载体中。PCR 引物适用于所有 V7 基因羧基端的扩增,其与 T 细胞表位存在于 HBc 基因氨基酸 149 之后无关。

对该方法普遍性的一个例外就是:含有 Pf-CS (C17A)突变的 V12 构建体的制备,该构建体从现有的 V12 构建体制备而来。在这种情况下,用 HBc149/NcoI-F (SEQ ID NO: 180)和错配反向 PCR 引物(SEQ ID NO: 292)扩增 V12 构建体,有利于 C17A 突变。所得 PCR 产物用 NcoI 和 HindIII 消化并克隆到 pKK223-3N (事先用相同的酶切割)中。限制位点加有下划线。

HBc-P79/SacI-F            5'-CGCGAGCTCCCAGCGTCTAGAGACCTAG  
SEQ ID NO:221

pKK223-2/4515-32R        5'-GTATCAGGCTGAAAATC  
SEQ ID NO:222

### E. 将恶性疟原虫 CS-重复 B 细胞表位插入到 V2 中

对于 V2 和 V7 构建体，将编码目的 B 细胞表位(V2)或 T 细胞表位(V7)的合成 dsDNA 片段插入到 EcoRI/SacI 限制位点中。编码目的 B 细胞表位和 T 细胞表位的合成 dsDNA 片段制备如下：通过以等摩尔浓度混合互补单链 DNA 寡核苷酸，加热到 95℃ 达 5 分钟，然后以每分钟-1℃ 的速率冷却至室温。该退火反应在 TE 缓冲液中进行。双链 DNA 如下所示，编码的表位序列如上所示。在以下一些氨基酸残基序列中使用符号#表示存在的终止密码子。

Pf1

I N A N P N A N P N A N P N A  
 AATTAACGCTAATCCGAACGCTAATCCGAACGCTAATCCGAACGCTA  
 TTGCGATTAGGCTTGCGATTAGGCTTGCGATTAGGCTTGCGAT

N P E L SEQ ID NO:223

ATCCGGAGCT SEQ ID NO:224

TAGGCC SEQ ID NO:225

Pf3

I N A N P N V D P N A N P N A N P  
 AATTAACGCTAATCCGAACGTTGACCCGAACGCTAATCCGAACGCTAATCCGA  
 TTGCGATTAGGCTTGCAACTGGGCTTGCGATTAGGCTTGCGATTAGGCT

N A N P N V D P N A N P E L SEQ ID NO:226

ACGCTAATCCGAACGTTGACCCGAACGCTAATCCGGAGCT SEQ ID NO:227

TGCGATTAGGCTTGCAACTGGGCTTGCGATTAGGCCTCGAGG

SEQ ID NO:228

Pf3.1

I N A N P N V D P N A N P N A N P  
 AATTAACGCGAATCCGAACGTTGATCCGAATGCCAACCCCTAACGCCAACCC  
 TTGCGCTTAGGCTTGACACCTAGGCTTACGGTTGGGATTGCGGTTGGG

N A N P E L SEQ ID NO:229

AAATGCCGAACCCAGAGCT SEQ ID NO:230

TTTACGCTTGGGTC SEQ ID NO:231

## Pf3.2

I N A N P N A N P N A N P N V D P  
 AATTAACGCGAATCCGAATGCCAACCCCTAACGCCAACCCAAACGTGGATCCGA  
 TTGCGCTTAGGCTTACGGTTGGGATTGCGGTTGGGTTTGCACCTAGGCT

N A N P E L	SEQ ID NO: 232
ATGCGAACCCAGAGCT	SEQ ID NO: 233
TACGCTTGGGTC	SEQ ID NO: 234

## Pf3.3

I N A N P N V D P N A N P N A N P  
 AATTAACGCGAATCCGAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAA  
 TTGCGCTTAGGCTTGCACCTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTT

N A N P N V D P N A N P E L	SEQ ID NO: 235
ACGCCAACCCGAATGTTGACCCCAATGCCAATCCGGAGCT	SEQ ID NO: 236
TGCGGTTGGGCTTACAAC TGGGGTTACGGTTAGGCC	SEQ ID NO: 237

## Pf3.4

I N P N V D P N A N P N A N P N A  
 AATTAATCCGAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCA  
 TTAGGCTTGCACCTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGCGGT

N P N V E L	SEQ ID NO: 238
ACCGAATGTTGAGCT	SEQ ID NO: 239
TGGGCTTACAAC	SEQ ID NO: 240

Pf3.5

I N P N V D P N A N P N A N P N A  
AATTAATCCGAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCA  
TTAGGCTTGCACCTAGGTTTACGGTTGGGATTGCCATTAGGTTTGCGGT

N P N V D P E L	SEQ ID NO: 241
ACCCGAATGTTGACCCTGAGCT	SEQ ID NO: 242
TGGGCTTACAACCTGGGAC	SEQ ID NO: 243

## Pf3.6

I N P N V D P N A N P N A N P N A  
 AATTAATCCGAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCA  
 TTAGGCTTGCACTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGGCGGT

N P N V D P N A E L	SEQ ID NO: 244
CCCGAATGTTGACCCTTATGCTGAGCT	SEQ ID NO: 245
TGGGCTTACAACCTGGGATTACGAC	SEQ ID NO: 246

## Pf3.7

I N V D P N A N P N A N P N A N P  
 AATTAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCAACCCGA  
 TTGCACCTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGGCGTTGGGCT

N V E L	SEQ ID NO: 247
ATGTTGAGCT	SEQ ID NO: 248
TACAAC	SEQ ID NO: 249

## Pf3.8

I N V D P N A N P N A N P N A N P  
 AATTAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCAACCCGA  
 TTGCACCTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGGCGTTGGGCT

N V D P E L	SEQ ID NO: 250
ATGTTGACCCTGAGCT	SEQ ID NO: 251
TACAACCTGGGAC	SEQ ID NO: 252



## Pf3.9

I N V D P N A N P N A N P N A N P  
 AATTAACGTGGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCAACC<sup>7</sup>GA  
 TTGCACCTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGC<sup>8</sup>GGTTGGGCT

N V D P N A E L	SEQ ID NO: 253
ATGTTGACCCCTAATGCTGAGCT	SEQ ID NO: 254
TACAAC <sup>7</sup> TGGGATTACGAC	SEQ ID NO: 255

## Pf3.10

I D P N A N P N A N P N A N P  
 AATTGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCAACC  
 CTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGC<sup>8</sup>GGTTGG

N V E L	SEQ ID NO: 256
CGAATGTTGAGCT	SEQ ID NO: 257
GCTTACAAC	SEQ ID NO: 258

## Pf3.11

I D P N A N P N A N P N A N P N V  
 AATTGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCAACCCGAATGTTG  
 CTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTGC<sup>8</sup>GGTTGGGCTTACAAC

D P E L	SEQ ID NO: 259
ACCCTGAGCT	SEQ ID NO: 260
TGGGAC	SEQ ID NO: 261

Pf3.12

I D P N A N P N A N P N A N P N V  
 AATTGATCCAAATGCCAACCCCTAACGCTAATCCAAACGCCAACCCGAATGTTG  
 CTAGGTTTACGGTTGGGATTGCGATTAGGTTTTCGGTTGGGCTTACAAC

D P N A E L	SEQ ID NO: 262
ACCCCTAATGCCGAGCT	SEQ ID NO: 263
TGGGATTACGGC	SEQ ID NO: 264

#### F. 恶性疟原虫通用 T 细胞表位

Pf-UTC (PF/CS326-345)

I E Y L N K I Q N S L S T E W S P  
 AATTGAATATCTGAACAAAATCCAGAACTCTCTGTCCACCGAATGGTCTCCGT  
 CTTATAGACTTGTTTTAGGTCTTGAGAGACAGGTGGCTTACCAGAGGCA

C S V T # #	SEQ ID NO: 265
GCTCCGTTACCTAGTA	SEQ ID NO: 266
CGAGGCAATGGATCATTCCA	SEQ ID NO: 267

#### 间日疟原虫(*P. vivax*) CS-重复 B 细胞表位

Pv-T1A

I P A G D R A D G Q P A G D R A A  
 AATTCCGGCTGGTGACCGTGCAGATGGCCAGCCAGCGGGTGACCGCGCTGCAG  
 GGCCGACCACTGGCACGTCTACCGGTGGTCCGCCACTGGCGCGACGTC

G Q P A G E L	SEQ ID NO: 268
GCCAGCCGGCTGGCGAGCT	SEQ ID NO: 269
CGGTCCGCCGACCGC	SEQ ID NO: 270

Pv-T1B

I D R A A G Q P A G D R A D G Q P  
 AATTGACAGAGCAGCCGGACAACCAGCAGGCGATCGAGCAGACGGACAGCCCG  
 CTGTCTCGTCCGGCCTGTTGGTCCGCTAGCTCGTCTGCCTGTCCGGC

A G E L	SEQ ID NO: 271
CAGGGGAGCT	SEQ ID NO: 272
GTCCCC	SEQ ID NO: 273

Pv-T2A

I A N G A G N Q P G A N G A G D Q  
 AATTGCCGACCGCGCCGGTAATCAGCCGGGGGCAAACGGCGCGGGTGATCAAC  
 CGCTTGCCCGCGCCATTAGTCGGCCCCCGTTTGCCCGCGCCCACTAGTTG

P G E L	SEQ ID NO: 274
CAGGGGAGCT	SEQ ID NO: 275
GTCCCC	SEQ ID NO: 276

Pv-T2B

I A N G A D N Q P G A N G A D D Q  
 AATTGCCAACGGCGCCGATAATCAGCCGGGTGCAAACGGGGCGGATGACCAAC  
 CGCTTGCCCGCGCTATTAGTCGGCCCACGTTTGCCCCGCCTACTGGTTG

P G E L	SEQ ID NO: 277
CAGGCGAGCT	SEQ ID NO: 278
GTCCGC	SEQ ID NO: 279

## Pv-T2C

I A N G A G N Q P G A N G A G D Q  
 AATTGCGAACGGCGCCGGTAATCAGCCGGGAGCAAACCGCGCGGGGGATCAAC  
 CGCTTGCCGCGGCCATTAGTCGGCCCTCGTTTGCCGCGCCCCCTAGTTG

P G A N G A D N Q P G A N G A D D  
 CAGGCGCAATGGTGCAGACAACCAGCCTGGGGCGAATGGAGCCGATGACC  
 GTCCGCGGTTACCACGTCTGTTGGTCCGACCCCGCTTACCTCGGCTACTGG

Q P G E L	SEQ ID NO: 280
AACCCGGCGAGCT	SEQ ID NO: 281
TTGGGCCGC	SEQ ID NO: 282

## PV-T3

I A P G A N Q E G G A A A P G A N  
 AATTGCGCCGGGCGCCAACCAGGAAGGTGGGGCTGCAGCGCCAGGAGCCAATC  
 CGCGGCCCGCGGTTGGTCCCTCCACCCCGACGTCCGCGGTCCTCGGTTAG

Q E G G A A E L	SEQ ID NO: 283
AAGAAGGCGGTGCAGCGGAGCT	SEQ ID NO: 284
TTCTTCCGCCACGTCCGC	SEQ ID NO: 285

**实施例 2: 测定方法****A. 抗原性****1. 颗粒 ELISA**

纯化颗粒稀释至浓度为 10 $\mu$ g/ml 的包被缓冲液(50mM 碳酸氢钠, pH 9.6)并包被在 ELISA 板的孔(50 $\mu$ L/孔)上。将 ELISA 板在室温下孵育过夜(约 18 小时)。翌日早上, 各孔用 ELISA 洗涤缓冲液[磷酸缓冲盐溶液(PBS), pH 7.4, 0.05% Tween<sup>®</sup>-20]洗涤并用 3% BSA 的 PBS (75 $\mu$ L/孔)封闭 1 小时。ELISA 板贮存于干燥的-20 $^{\circ}$ C 直至使用。

为了测定颗粒的抗原性, 抗血清用 1% BSA 的 PBS 稀释, 加入 50 $\mu$ L/孔到抗原包被的 ELISA 的各孔中。血清孵育 1 小时, 用 ELISA

洗涤缓冲液洗涤，然后用抗小鼠(IgG)-HRP (The Binding Site, San Diego, CA; HRP = 辣根过氧化物酶)缀合物(50 $\mu$ L/孔)或其它合适的抗体探测30分钟。用ELISA洗涤缓冲液洗涤后,加入TM蓝色底物(50 $\mu$ L/孔),目测其反应。10分钟后,加入1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 $\mu$ L/孔)终止反应,在设置在450nm的ELISA读板器上读数。

## **2. 合成肽 ELISA**

20个氨基酸残基的合成肽(NANP)<sub>5</sub>稀释至浓度为2 $\mu$ g/ml的包被缓冲液(50mM碳酸氢钠, pH 9.6)并包被在ELISA板的孔(50 $\mu$ L/孔)上。在通风橱中孵育过夜(约18小时),使各孔中的肽干燥。翌日早上,各孔用ELISA洗涤缓冲液(磷酸缓冲盐溶液, pH 7.4, 0.05% Tween<sup>®</sup>-20)洗涤并用3% BSA的PBS (75 $\mu$ L/孔)封闭1小时。ELISA板贮存于干燥的-20 $^{\circ}$ C直至使用。

为了测定颗粒的抗体抗原性,抗血清(单克隆或多克隆)用1% BSA的PBS稀释,加入50 $\mu$ L/孔到抗原包被的ELISA的各孔中。血清孵育1小时,用ELISA洗涤缓冲液洗涤,然后用抗小鼠(IgG)-HRP缀合物(同上, 50 $\mu$ L/孔)或其它合适的抗体探测30分钟,再用ELISA洗涤缓冲液洗涤,然后加入TM蓝色底物(50 $\mu$ L/孔)进行显现。10分钟后,加入1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 $\mu$ L/孔)终止反应,在设置在450nm的ELISA读板器上读数。

## **B. 颗粒的免疫原性**

为了测定颗粒的免疫原性,用20 $\mu$ g颗粒的完全弗氏佐剂免疫小鼠(IP),然后在4周用10 $\mu$ g颗粒的不完全弗氏佐剂加强接种。小鼠在2、4、6和8周放血。

## **C. 热稳定性方案**

用50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8)将纯化颗粒稀释至浓度为1mg/ml,然

后加入叠氮化钠至终浓度为 0.02%，以防止细菌生长。颗粒在 37℃ 孵育，在所需时间点取出等分试样。样品与 SDS-PAGE 样品缓冲液(还原性)混合，然后跑 15% SDS-PAGE 凝胶。凝胶用考马斯蓝染色，然后进行分析。

#### **D: 杂合颗粒分析型凝胶过滤的分析**

用 25ml Superose<sup>®</sup> 6 HR 10/30 层析柱(Amersham Pharmacia # 17-0537-01)和 BioCAD<sup>™</sup> SPRINT 灌注层析系统，对纯化的杂合 HBc 颗粒进行分析型凝胶过滤分析。设置紫外检测器，在波长 260nm 和 280nm 进行监测。柱子用 3 倍柱体积(CV; 约 75ml)的缓冲液(50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8)以 0.75ml/分钟的流速平衡。

待分析的颗粒用 50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.8)稀释至浓度为 1mg/ml。然后, 200 微升(μL)样品上样到 200μL 环并注入柱子。用 50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8)以 0.75ml/分钟的流速从柱子上洗脱样品。用 BioCAD<sup>™</sup> 软件(PerSeptive<sup>™</sup>)对 280nm 曲线进行积分，得到结果。

#### **实施例 3: 280:260 吸光度比值的测定**

蛋白样品用磷酸缓冲盐溶液(PBS) (pH7.4)稀释至浓度为 0.1mg/ml 和 0.3mg/ml 之间。用 PBS 作为分光光度计的空白，在 260nm 和 280nm 波长下测定蛋白样品的吸光度。然后，用 280nm 测定的样品吸光度值除以 260nm 测定的同一样品吸光度值，得到给定样品的 280:260 吸光度比值。包括天然颗粒(HBc183)、在残基 149 位(HBc149)后截短的 HBc 颗粒、以及本文鉴定的几个 HBc 嵌合体在内的几个样品得到的比值见下表 8。全长颗粒 ICC-1559 是首次报道于下文的颗粒的制备物: Neiryneck 等, (1999 年 10 月) *Nature Med.*, 5 (10): 1157-1163, 而全长颗粒 ICC-1607 是类似颗粒, 其中在多肽 17 和 19 位(SEQ ID NO: 9 的 X<sub>17</sub> 和 X<sub>19</sub>)的 M2 多肽半胱氨酸突变成丝氨酸残基。

表 8

颗粒编号	全长, (F) 或 C端截短, (T)	280:260 吸光度 比值
HBC183 ICC-1532	F	0.84
HBC149	T	1.59
ICC-1438	T	1.57
ICC-1473	T	1.64
ICC-1475	T	1.04
ICC-1492	T	1.33
ICC-1559	F	0.68
ICC-1560	T	1.36
ICC-1590	T	1.51
ICC-1603	T	1.68
ICC-1604	T	1.40
ICC-1605	T	1.26
ICC-1607	F	0.73
ICC-1600	T	1.23
ICC-1601	T	1.12
ICC-1634	T	0.92
ICC-1632	T	0.96
ICC-1642	T	未做
ICC-1643	T	0.77

#### 实施例 4: 截短的 HBc 颗粒 C 端半胱氨酸

##### A. 向杂合 HBc 颗粒 C 端添加半胱氨酸残基

用聚合酶链式反应(PCR), 表达杂合 HBc 颗粒的基因可以容易地突变, 以便在 N 端含有添加半胱氨酸的 HBc 嵌合体 C 端引入半胱氨酸或含有半胱氨酸的肽。例如, 可采用编码 SEQ ID NO: 287 的 PCR

寡核苷酸引物，与合适的第二引物一起，扩增杂合 HBc 基因并在密码子 V149 和终止密码子之间掺入一个半胱氨酸密码子。示例性的构建体是如下所述称为 ICC-1492 的构建体。另外参见如下所述的 V2.Pfl [N-M2 (17-24/C19S)]的制备方法。

乙型肝炎核心颗粒可以从 183 (或 185, 取决于病毒亚型)至 140 被截短并保留装配成颗粒状的病毒样颗粒的能力。许多研究小组已经采用截短至氨基酸 149 的颗粒, 因为氨基酸 150 代表了富含精氨酸的 C 端结构域的第一个精氨酸残基。

### **实施例 5: 流感 M2 构建体**

最近, Neiryneck 等, (1999 年 10 月) *Nature Med.*, 5 (10): 1157-1163 和 WO 99/07839 报道了 M2 的 24 个氨基酸的胞外结构域与缺乏氨基酸残基 1-4 的全长 HBc 颗粒(HBc183)的 N 端融合。该构建体的示意性代表在本文中称为 IM2HBc, 如下所示, 其中 24 聚体连接到 HBc 的 N 端。

#### **IM2HBc**

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD-HBc (5-183)

SEQ ID NO: 286

在一个说明性的制备方法中, M2 表位插入到乙型肝炎核心优势免疫环中, 用上述技术进行所述插入和纯化, 成功表达和纯化了被称为 ICC-1475 的颗粒。M2 表位的突变形式(其中在 M2 天然 17 和 19 位的两个半胱氨酸残基被丙氨酸残基取代)也在优势免疫环(ICC-1473 颗粒)和所得纯化颗粒中表达。这两种颗粒如下所示。

#### **ICC-1475**

HBc (1-78) -GI-SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD-EL-HBc (79-149)

SEQ ID NO: 287

#### **ICC-1473**

HBc (1-78) -GI-SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD-EL-HBc (79-149) -C

SEQ ID NO: 288

当与天然序列(ICC-1475)相比, ICC-1473 颗粒构建体产生的颗



粒纯度高约 7 倍。还需测定是否半胱氨酸残基的突变改变了所述颗粒的保护能力。然而,传递给 HBc 优势免疫环的表位通常比它们融合到其它区(包括 N 端)有明显更大的免疫原性,后者所得颗粒表现出降低的抗 HBc 免疫原性。

也已经制备了颗粒,其中 M2 N 端 24 聚体表位融合到 C 端截短的乙型肝炎核心颗粒的 N 端。所述构建体(ICC-1438)也含有 N 端前核心序列(SEQ ID NO: 289)。制备了类似构建体,所述构建体在杂合蛋白(ICC-1492)末端含有一个半胱氨酸残基,在这种情况下紧接在 HBc 基因的 Val-149 之后。这些构建体如下所示。

**ICC-1438**

MGISLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELLGWLWGI-HBc (2-149)

SEQ ID NO:289

**ICC-1492**

MGISLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELLGWLWGI-HBc (2-149) -C

SEQ ID NO:290

应当注意的是,为了防止从天然 HBc 起始甲硫氨酸开始翻译,使该残基的密码子发生突变,以编码异亮氨酸残基。对 EcoRI (GI)和 SacI (EL)限制位点作出贡献的残基加上下划线。前核心序列位于加有下划线的 EL 残基和“-HBc (2-149)”之间。

在本文其它地方讨论的 SDS-PAGE 分析显示,在制备时,ICC-1438 单体构建体与 ICC-1492 (第 3 道)相比是不稳定的(第 2 道),HBc-149 (第 1 道)、ICC-1475 (第 4 道)和 ICC-1473 (第 5 道)在图 10 的 SDS-PAGE 凝胶中作为额外的分子量对照。用颗粒的分析型凝胶过滤,不能证明 ICC-1438 单体的不稳定性。

预期 ICC-1475 (图 10, 第 4 道)和 ICC-1473 (图 10, 第 5 道)都具有比 ICC-1438 和 ICC-1492 略低的分子量,因为前两者均含有定向插入到优势免疫环中的 M2 表位并因而缺乏 ICC-1438 和 ICC-1498 中存在的前核心序列(SEQ ID NO: 259)。正如所预期的,ICC-1492 大于 ICC-1475 和 ICC-1473; 然而,与 ICC-1492 相同都保留 C 端半胱氨酸

酸残基的 ICC-1438 因为明显的切割, 清楚地显示不大于 ICC-1475 和 ICC-1473。

也提出一种构建体, 所述构建体含有连接到 HBc N 端(结构域 I) 或环(结构域 II)的如上所述 M2 的 N 端胞外序列, 也含有 HBc C 端(结构域 IV)的半胱氨酸残基。

为了修饰含有优势免疫环融合物的杂合 HBc 颗粒氨基端, 以便掺入半胱氨酸残基以及来自 M2 的最小序列, 合成一序列合成的寡核苷酸。为了制备 V2.Pf1 (N-M2 (17-24/C17S)), 采用寡核苷酸 M2 (17-24/C17S)-NcoI-F 和 HBc149/HindIII-R, 从载体 V2.Pf1 扩增杂合 HBc 基因。所得 546 bp 片段用 NcoI 和 HindIII 切割并插入到已经用相同两种酶切割的 pKK-223-3N 中。

为了制备 V2.Pf1[N-M2(17-24/C19S)], 采用寡核苷酸 M2(17-24/C19S)-NcoI-F 和 HBc149/HindIII-R, 在载体 V2.Pf1 中扩增杂合 HBc 基因。所得 540 bp 片段用 NcoI 和 HindIII 切割并插入到已经用相同两种酶切割的 pKK-223-3N 中。

M2 (17-24/C17S) -NcoI-F

M G S R C N D S S D I D P Y K E  
.GGCGCCATGGGGTCTAGATGTAACGATTCAAGTGACATCGACCCTTATAAAGA

F G

SEQ ID NO: 291

ATTTCG

SEQ ID NO: 292

M2 (17-24/C19S) -NcoI-F

M G C N D S S D I D P Y K E F G  
GCGCCATGGGGTGTAAACGATTCAAGTGACATCGACCCTTATAAAGAATTTGG

SEQ ID NO: 293

SEQ ID NO: 294

### 实施例 6: 有和无 N 端半胱氨酸残基和 C 端半胱氨酸残基的 HBc 嵌合分子

制备了一系列含有 HBc 嵌合分子的颗粒, 所述颗粒含有甲型流感 M2 蛋白残基 1-24, 所述蛋白以肽键连接在 HBc 的 N 端上或其附近, 所述 HBc 在 C 端残基 149 截短。所述组分嵌合蛋白分子含有不同的 N 端序列(包括 M2 序列或变体), 有些含有 C 端半胱氨酸残基。

通过分析型大小排阻层析法, 分析下表 9 中列出的所有纯化颗粒, 评价纯化后颗粒结构的保留。称为 ICC-1603 的、不含 N 端半胱氨酸残基的颗粒显示分解成亚颗粒结构的证据(图 3), 因为所述蛋白在 1500 秒范围内洗脱(颗粒在约 1000 秒洗脱)。

颗粒 ICC-1590 的类似分析(所述 ICC-1590 类似于 ICC-1603 ICC-颗粒, 除了 N 端 M2 序列的两个丝氨酸残基突变成半胱氨酸残基外)表明该构建体在纯化后保留了颗粒, 其洗脱发生在约 1000 秒, 这通常是杂合颗粒(图 4)。没有证据显示 ICC-1590 颗粒的分解。

对其嵌合蛋白也具有两个 N 端半胱氨酸残基的 ICC-1560 颗粒进行分析表明, 纯化后也是颗粒, 尽管它的确表现出某种程度的分解(图 5), 这表明其稳定性并不象 ICC-1590 颗粒一样强。比较 ICC-1590 和 ICC-1560 颗粒的 N 端构型(下表 11)显示, ICC-1560 颗粒中两个半胱氨酸残基的相对位置因 3 个氨基酸残基的缺失(DEL)相对于 ICC-1590 颗粒移位了 3 个氨基酸残基, 表明半胱氨酸残基可能是从核心基因开始到能够最优化交联之间的最小距离所需。

### 实施例 7: 具有 M2 或 M2 变体序列和 C 端半胱氨酸残基的颗粒

ICC-1603 颗粒见图 3, 在纯化后快速分解。包括 ICC-1605 颗粒的 HBc 嵌合分子类似于 ICC-1603 颗粒, 除了 ICC-1605 组分嵌合分子具有单个 C 端稳定性半胱氨酸以外。制备一种质粒, 指导 ICC-1605 颗粒的表达, 以研究是否将 C 端半胱氨酸残基添加到 ICC-1603 颗粒中, 可以更大程度地赋予颗粒稳定性。纯化后, 用分析型大小排阻层析,

来分析 ICC-1605 颗粒(图 6)。

该项研究的结果证明, 颗粒稳定性比 ICC-1603 颗粒更加完全, 但是与含有两个氨基端半胱氨酸残基和不含 C 端稳定性半胱氨酸的 ICC-1590 颗粒相比是不完全的。尽管大量 ICC-1605 保留颗粒, 但是有证据表明, 存在着宽范围被洗脱的亚颗粒结构的不均一混合物。这样的观察结果表明, 对于这一杂合颗粒(ICC-1603), ICC-1605 颗粒中看到的 C 端稳定性比 ICC-1590 颗粒中看到的 N 端稳定性更不完全。

为了研究杂合颗粒氨基端和羧基端半胱氨酸稳定性的相容性, 构建了一个表达质粒, 以指导 ICC-1604 颗粒的表达。ICC-1604 颗粒组分嵌合分子含有两个氨基端稳定化半胱氨酸残基以及一个 C 端稳定化半胱氨酸(正如在 ICC-1605 颗粒中一样), 所述氨基端稳定化半胱氨酸残基存在于天然 M2 多肽序列(如同在 ICC-1590)中。对 ICC-1604 颗粒的分析表明, 它们在纯化后保留均一的颗粒状态(图 7), 这表明这两种稳定化方法是互补的, 并且可以彼此一起使用。

用颗粒 ICC-1438 和 ICC-1492, 研究了 HBc N 端和 N 端半胱氨酸残基之间的备选接头序列。这些颗粒在 M2 融合物和 HBc 氨基酸 D4 之间都含有氨基酸序列 ELLGWLWGIDI (SEQ ID NO: 265)。该序列 C 端 9 个氨基酸残基来自 HBc 前核心序列的氨基酸-6 至 HBc 的氨基酸 I3, 其中 HBc 起始密码子突变成异亮氨酸, 以防止从该位置开始翻译(所述翻译将会破坏该项研究)。HB 前核心序列包括在-7 位的半胱氨酸。

这些颗粒仅在以下事实中是不同的: ICC-1438 组分嵌合分子终止于 HBc 的 149 位, 而 ICC-1492 组分嵌合分子终止于 HBc 的 149 并且在相对于 SEQ ID NO: 1 的 HBc 的 150 位含有一个末端半胱氨酸。当用分析型凝胶过滤进行分析时, 采用一个替代而与上述类似的方法, 其中颗粒约在 10 分钟洗脱, 这两种构建体在纯化后都显示为颗粒(图 8 中的 ICC-1438 和图 10 中的 ICC-1492)。该项研究证明了

截短颗粒的氨基端半胱氨酸和羧基端半胱氨酸稳定性的相容性，以及对在氨基酸序列和在 N 端半胱氨酸残基与 HBc 基因起点之间距离高上的相当大的变异性的耐受性。

表 9

构建体名称	N 端融合	HBc N 端起点	M2 和 HBc 之间的残基	C 端终点	结合的核酸	C 端半胱氨酸稳定
ICC-1560	M2 (1-24)	D4	无	149	无	无
ICC-1603	M2 (1-24) (2C > 2S)	D4	EL	149	无	无
ICC-1590	M2 (1-24)	D4	EL	149	无	无
ICC-1604	M2 (1-24)	D4	EL	149	无	有(C150)
ICC-1605	M2 (1-24) (2C > 2S)	D4	EL	149	无	有(C150)
ICC-1438	M2 (1-24)	D2	ELLGWLWGI	149	无	无
ICC-1492	M2 (1-24)	D2	ELLGWLWGI	149	无	有(C150)

下表 10 显示一个比对表，表明 HBeAg 以及称为 ICC-1590、ICC-1560、ICC-1603、ICC-1604 和 ICC-1605 的颗粒 N 端的构型。按照从所有构建体共享的 SEQ ID NO: 1 的 HBc N 端氨基酸残基 4 位，将各序列进行比对。给 N 端半胱氨酸残基(如存在的话)加上下划线。

表 10

<u>构建体名称</u>	<u>序列</u>	<u>SEQ ID NO</u>
HBeAg	SKL <u>C</u> IGLWLGMDID	295

ICC-1590/ICC-1604	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELD	296
ICC-1560	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	24
ICC-1603/ICC-1605	MSLLTEVETPIRNEWGSRNDSSDELD	297
ICC-1438/ICC-1492	MGISLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELLGWLWGIDID	298

下表 11 提供了一份结果的表格，其中对本文所提出的含有 N 端甲型流感 M2 序列或变异体的颗粒进行了稳定性评价。正如所看到的，从 HBc 嵌合分子已经制备了稳定的颗粒，所述 HBc 嵌合分子在相对于 SEQ ID NO: 1 的 HBc 序列的 N 端负 14 (-14) 位至约 N 端本身含有 N 端半胱氨酸残基。

表 11

构建体名称	HBc D4 和 N 端半胱氨酸残基之间的氨基酸		C 端半胱氨酸稳定性	所形成的稳定颗粒
	Cys 1	Cys 2		
HBeAg	-	9	无	无
ICC-1603	-	-	无	无
ICC-1605	-	-	有	有/无
ICC-1590	9	7	无	有
ICC-1604	9	7	有	有
ICC-1560	6	4	无	有
ICC-1438	18	16	无	有
ICC-1492	18	16	有	有

### 实施例 8. 部分截短的 HBc 颗粒：用于表达部分截短颗粒的表达载体的合成

为了制备用于表达部分截短的 HBc 颗粒的表达质粒，采用单个

氨基端寡核苷酸 PCR 引物(HBc149/NcoI-F)以及一个独特 C 端引物。例如, 为了制备 HBc156 (E. Cr; ICC-1600 颗粒)表达质粒, 使用引物 HBc149/NcoI-F 和 HBc156 (E. cR)-H3-R。使用引物 HBc149/NcoI-F 和 HBc156C (E. cR)-H3-R 来制备 HBc156 (E. cR) +C (ICC-1601 颗粒)表达质粒。所有使用的引物的序列显示如下。

除了截短所述颗粒, 以及在某些情况下掺入 C 端半胱氨酸残基之外, 也使用用于在大肠杆菌中优化表达的密码子。已知几个精氨酸密码子、特别是 AGA 和 AGG 在大肠杆菌中很少使用, 并且据信这在大肠杆菌有效表达蛋白中是个问题, 即通过在翻译过程中导致多肽合成中止而引起过早的终止。在 HBc 的 150 和 183 之间的 16 个精氨酸密码子中, 7 个由稀有 AGA 密码子编码, 2 个由非常稀有的 AGG 密码子编码。因此, 在该项研究中, 用大肠杆菌更常用的密码子取代所有 AGA 和 AGG 密码子。为了能够连续取代稀有精氨酸密码子, 首先合成 HBc156 基因(ICC-1600 和 HBc156+C ICC-1601 颗粒), 然后用作 HBc163 构建体(ICC-1634 和 HBc163+C ICC-1632 颗粒)的模板; 然后用 HBc163 构建体作为 HBc171 构建体(ICC-1642 和 HBc171+C ICC-1643 颗粒)的模板; 最后, 用 HBc171 构建体作为精氨酸密码子最优化 HBc182 和 HBc183 构建体的模板。也制备了一个非最优化 HBc182 构建体(ICC-1575)作为对照。所有 PCR 产物都用限制酶 NcoI 和 HindIII 切割并克隆到已经用如上所述相同的酶切割的表达载体 pKK223-3N 中。

氨基端引物序列(NcoI 限制位点加有下划线):

**HBc149/NcoI-F**

5' -TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

SEQ ID NO:210

羧基端引物序列(HindIII 限制位点加有下划线)

**Hbc156 (E.cR) -H3-R**

5' -GCGAAGCTTACTAAGGGGAGCGGCCTCGTCGACGAACAACAGTAGTCTCCGG

SEQ ID NO:299

**Hbc156C (E.cR) -H3-R**

5' -GCGAAGCTTACTAACAAGGGGAGCGGCCTCGTCGACGAACAACAGTAGT-

CTCCGG

SEQ ID NO:300

**Hbc163 (E.cR) -H3-R**

5' -GCGAAGCTTACTAAGGGGAGGGAGTGCGCCGACGAGGGGAGCGGCCTCG

SEQ ID NO:301

**Hbc163C (E.cR) -H3-R**

5' -GCGAAGCTTACTAACAAGGGGAGGGAGTGCGCCGACGAGGGGAGCGGCCTCG



SEQ ID NO:302

HBc171(E.cR) -H3-R

5' -GCGAAGCTTACTACGGCGATTGAGAGCGTCGACGGCGAGGCGAGGGAGT

SEQ ID NO:303

HBc171C(E.cR) -H3-R

5' -GCGAAGCTTACTAACACGGCGATTGAGACCGTCGACGGCGAGGCGAGGGAGT

SEQ ID NO:304

HBc180(E.cR) -H3-R

5' -GCGAAGCTTACTAACATTGAGATTCCCGAGATTGAGATCGCCGGCGACCGG-  
CGATTGAGACCGTC

SEQ ID NO:305

HBc182-H3-R

5' -GCGAAGCTTACTATTGAGATTCCCGAGATTGA

SEQ ID NO:306

HBc183-H3-R

5' -GGAAAGCTTACTAACATTGAGATTCCCG

SEQ ID NO:307

HBc149/HindIII-R

5' -CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

SEQ ID NO:213

HBc149+C/HindIII-R

5' -CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

SEQ ID NO:308

### 实施例 9. 颗粒制剂

含 Corixa 529-SE 制剂

重组乙型肝炎核心颗粒溶液在纯化后经过滤除菌。将适量的含有所需剂量的免疫原性颗粒(通常为 0.02-0.2mg)的溶液加入到小瓶中。以所需浓度(通常为 0.01-0.2mg)加入 Corixa 529-SE (得自 Corixa Corp., WA), 然后加入盐水使体积达到 1ml。搅拌所得混合物直至基本上均匀为止。

### 含 Alhydrogel 和 Corixa RC-529 制剂

将 Corixa RC-529 (通常为 0.02-0.2mg; 得自 Corixa Corp., WA)加入到氢氧化铝凝胶(1mg)中。然后加入重组纯化的免疫原性嵌合体颗粒(通常剂量为 0.02-2mg), 再加入盐水使体积达到 1ml。搅拌所得混合物直至基本上均匀为止。

本文引用的每篇专利和论文都通过引用结合到本文中。

以上描述和实施例都是说明性的, 不得解释为限制性的。还可以在本发明的精神和范围内作其它变动, 并且这对于本领域技术人员来说是容易提出的。

- <110> Page, Mark  
 Friede, Martin  
 Schmidt, Annette Elisabeth  
 Stober, Detlef
- <120> 作为慢性肝炎治疗性疫苗的稳定性 HBc 嵌合体颗粒
- <130> 4564/91569
- <140> 尚未指定
- <141> 2004-02-20
- <150> 10/677, 074  
 <151> 2003-10-01
- <150> 10/372, 076  
 <151> 2003-02-21
- <160> 308
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> 乙型肝炎病毒
- <400> 1

```

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

```



---

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
Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg		
	165	170
Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys		
	180	185
<210> 3		
<211> 185		
<212> PRT		
<213> 乙型肝炎病毒		
<400> 3		
Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu		
1	5	10
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp		
	20	25
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys		
	35	40
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu		
	50	55
Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala		
65	70	75
Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Val Gly Leu Lys		
	85	90
Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg		
	100	105
Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr		
	115	120
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro		
	130	135
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 Pro Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg  
    165     170     175  
 Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
    180     185  
 <210> 4  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> 乙型肝炎病毒  
 <400> 4  
 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 Pro Ala  
 65     70     75     80  
 Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val 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> 5  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> 北美土拨鼠(*Marmota monax*)

<400> 5

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 Cys  
           180

<210> 6  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> 地松鼠(*Spermophilus variegatus*)

<400> 6

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 Gly 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> 7

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 质粒 pkk223

&lt;400&gt; 7

ttcacacagg aaacagaatt cccggggatc cgtcgacctg cagccaagct t 51

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 质粒 pkk223

&lt;400&gt; 8

ttcacataag gaggaaaaaa ccatgggatc cgaagctt 38

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)

&lt;400&gt; 9

Lys Leu Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile Asp Glu Leu Asp Ala Glu  
 1                    5                    10                    15

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

<213> 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)

&lt;400&gt; 10

Gln Lys Lys Tyr Asp Glu Asp Gln Lys Lys Thr Glu Glu Lys Ala Ala  
 1                    5                    10                    15

Leu Glu Lys Ala Ala Ser Glu Glu Met Asp Lys Ala Val Ala Ala Val  
                   20                    25                    30

Gln Gln Ala  
                   35

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

<213> 微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)

<400> 11

Gln Asp Lys Pro Ala Asp Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu  
1                   5                   10                   15

Pro Ala Ala Gln Gln Asp Lys Pro Ala Asp Ala  
                  20                   25

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 12

Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ile Thr Lys  
1                   5                   10                   15

Asn

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> 口蹄疫病毒

<400> 13

Tyr Asn Gly Glu Cys Arg Tyr Asn Arg Asn Ala Val Pro Asn Leu Arg  
1                   5                   10                   15

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

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 14

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys  
1                   5                   10

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 15

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1                   5                   10                   15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp  
                  20

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 16

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1                   5                   10                   15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 17

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Ala Asn Asp Ser  
                  20

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 18

Glu Gln Gln Ser Ala Val Asp Ala Asp Asp Ser His Phe Val Ser Ile  
1                   5                   10                   15

Glu Leu Glu

<210> 19

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 19

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 20

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 21

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1                   5                   10                   15

Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 22

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1                   5                   10                   15

Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 23

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 24

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1                   5                   10                   15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 25

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp  
                  20

<210> 26

<211> 35

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 26

Met Gly Ile Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
1                   5                   10                   15

Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Leu Gly Trp Leu  
 20 25 30

Trp Gly Ile  
 35

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 27

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 28

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
 1 5 10 15

Cys Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 29

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
 1 5 10 15

Ala Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

<210> 30

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 30

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1                   5                   10                   15

Cys Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp  
          20

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 31

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
          20

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 其他特征

<222> (1).. (1)

<223> 1位的 Xaa 是甲硫氨酸或不存在。如果是甲硫氨酸，则 2 至 8 位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (2).. (2)

<223> 2位的 Xaa 是丝氨酸或不存在。如果是丝氨酸，则 3 至 8 位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (3).. (3)

<223> 3位的 Xaa 是亮氨酸或不存在。如果是亮氨酸，则 4 至 8 位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (4).. (4)

<223> 4位的 Xaa 是亮氨酸或不存在。如果是亮氨酸，则 5 至 8 位的 Xaa 不存在。

<220>

- 
- <221> 其他特征  
<222> (5).. (5)  
<223> 5 位的 Xaa 是苏氨酸、脯氨酸或不存在。如果是苏氨酸或脯氨酸，则 6 至 8 位的 Xaa 不存在。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (6).. (6)  
<223> 6 位的 Xaa 是谷氨酸或不存在。如果是谷氨酸，则 7 至 8 位的 Xaa 不存在。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (7).. (7)  
<223> 7 位的 Xaa 是缬氨酸或不存在。如果是缬氨酸，则 8 位的 Xaa 不存在。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (8).. (8)  
<223> 8 位的 Xaa 是谷氨酸或不存在。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (10).. (10)  
<223> 10 位的 Xaa 是脯氨酸、亮氨酸或组氨酸。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (11).. (11)  
<223> 11 位的 Xaa 是异亮氨酸或苏氨酸。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (13).. (13)  
<223> 13 位的 Xaa 是天冬酰胺或丝氨酸。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (14).. (14)  
<223> 14 位的 Xaa 是谷氨酸或甘氨酸。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (15).. (15)  
<223> 15 位的 Xaa 是色氨酸或不存在。
- <220>  
<221> 其他特征  
<222> (16).. (16)  
<223> 16 位的 Xaa 是甘氨酸、谷氨酸或不存在。如果是甘氨酸或谷氨酸，则 15 位的 Xaa



不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (17).. (17)

<223> 17位的 Xaa 不存在或存在，如果存在的话，17位的 Xaa 是半胱氨酸、丝氨酸或丙氨酸。如果17位的 Xaa 存在，则15至16位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (18).. (18)

<223> 18位的 Xaa 是精氨酸、赖氨酸或不存在。如果是精氨酸或赖氨酸，则15至17位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (19).. (19)

<223> 19位的 Xaa 不存在或存在，如果存在的话，19位的 Xaa 是半胱氨酸、丝氨酸或丙氨酸。如果19位的 Xaa 存在，则15至18位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (20).. (20)

<223> 20位的 Xaa 是天冬酰胺、丝氨酸或不存在。如果是天冬酰胺或丝氨酸，则15至19位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (21).. (21)

<223> 21位的 Xaa 是天冬氨酸、甘氨酸或不存在。如果是天冬氨酸或甘氨酸，则15至20位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (22).. (22)

<223> 22位的 Xaa 是丝氨酸或不存在。如果是丝氨酸，则15至21位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (23).. (23)

<223> 23位的 Xaa 是丝氨酸或不存在。如果是丝氨酸，则15至22位的 Xaa 不存在。

<220>

<221> 其他特征

<222> (24).. (24)

<223> 24位的 Xaa 是天冬氨酸或不存在。如果是天冬氨酸，则15至23位的 Xaa 不存在。

<400> 32

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 33

Asn Asn Ala Thr Phe Asn Tyr Thr Asn Val Asn Pro Ile Ser His Ile  
 1 5 10 15

Arg

<210> 34

<211> 142

<212> PRT

<213> 鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)

<400> 34

Asp Ile Leu Lys Val Ile Val Asp Ser Met Asn His His Gly Asp Ala  
 1 5 10 15

Arg Ser Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ala Glu Leu Thr Ala Glu Leu Lys  
 20 25 30

Ile Tyr Ser Val Ile Gln Ala Glu Ile Asn Lys His Leu Ser Ser Ser  
 35 40 45

Gly Thr Ile Asn Ile His Asp Lys Ser Ile Asn Leu Met Asp Lys Asn  
 50 55 60

Leu Tyr Gly Tyr Thr Asp Glu Glu Ile Phe Lys Ala Ser Ala Glu Tyr  
 65 70 75 80

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

Glu Lys Lys Ile Val Ser Ile Lys Asp Phe Leu Gly Ser Glu Asn Lys  
 100 105 110

Arg Thr Gly Ala Leu Gly Asn Leu Lys Asn Ser Tyr Ser Tyr Asn Lys  
 115 120 125

Asp Asn Asn Glu Leu Ser His Phe Ala Thr Thr Cys Ser Asp  
 130 135 140

<210> 35  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)  
 <400> 35

Cys Ser Ser Ser Asn Asn Asp Ala Ala Gly Asn Gly Ala Ala Gln Phe  
 1 5 10 15

Gly Gly Tyr

<210> 36  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)  
 <400> 36

Asn Lys Leu Gly Thr Val Ser Tyr Gly Glu Glu  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)  
 <400> 37

Asn Asp Glu Ala Ala Tyr Ser Lys Asn Arg Arg Ala Val Leu Ala Tyr  
 1 5 10 15

<210> 38  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 粘膜莫拉氏菌(Moraxella catarrhalis)  
 <400> 38

Leu Asp Ile Glu Lys Asp Lys Lys Lys Arg Thr Asp Glu Gln Leu Gln  
 1 5 10 15

Ala Glu Leu Asp Asp Lys Tyr Ala Gly Lys Gly Tyr  
 20 25

<210> 39  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 粘膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)

<400> 39

Leu Asp Ile Glu Lys Asn Lys Lys Lys Arg Thr Glu Ala Glu Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

Ala Glu Leu Asp Asp Lys Tyr Ala Gly Lys Gly Tyr  
           20                   25

<210> 40  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 粘膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)

<400> 40

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

Ala Glu Leu Asn Lys Asp Tyr Pro Gly Gln Gly Tyr  
           20                   25

<210> 41  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)

<400> 41

Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn  
 1                   5                   10                   15

Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr  
           20                   25

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)

<400> 42

Arg Ile Gln Ser Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly  
 1                   5                   10                   15

Thr Lys Tyr Val  
20

<210> 43  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)

<400> 43

Lys Ala Ala Ile Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala  
1 5 10 15

Ala Thr Ala Pro Ala  
20

<210> 44  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 44

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1 5 10 15

<210> 45  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 45

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro  
20

<210> 46  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 46

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro  
20

<210> 47  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 47

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro  
1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro  
20

<210> 48  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 48

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro  
20 25

<210> 49  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 49

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1 5 10 15

Asn Pro Asn Val  
20

<210> 50  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 50

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1                   5                   10                   15

Asn Pro Asn Val Asp Pro  
20

<210> 51  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 51

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1                   5                   10                   15

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala  
20

<210> 52  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 52

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1                   5                   10                   15

Asn Val

<210> 53  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 53

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1                   5                   10                   15

Asn Val Asp Pro  
20

<210> 54  
<211> 22  
<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 54

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
1                   5                   10                   15

Asn Val Asp Pro Asn Ala  
                  20

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 55

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val  
1                   5                   10                   15

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 56

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val  
1                   5                   10                   15

Asp Pro

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 57

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val  
1                   5                   10                   15

Asp Pro Asn Ala  
                  20

<210> 58

<211> 19

<212> PRT



<213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 58

Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln  
1                   5                   10                   15

Pro Ala Gly

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 59

Arg Ala Asp Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala Gly Asp Gly Gln Pro  
1                   5                   10                   15

Ala Gly

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 60

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Gly Asp Gln  
1                   5                   10                   15

Pro Gly

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 61

Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gln  
1                   5                   10                   15

Pro Gly

<210> 62  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 62

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln  
 1                   5                   10                   15

Pro Gly

<210> 63  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 63

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gln  
 1                   5                   10                   15

Pro Gly

<210> 64  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 64

Ala Pro Gly Ala Asn Gln Glu Gly Gly Ala Ala Ala Pro Gly Ala Asn  
 1                   5                   10                   15

Gln Glu Gly Gly Ala Ala  
 20

<210> 65  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 65

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Gly Asp Gln  
 1                   5                   10                   15

Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp  
 20 25 30

Asp Gln Pro Gly  
 35

<210> 66  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 柏氏疟原虫(Plasmodium berghei)

<400> 66

Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn  
 1 5 10 15

<210> 67  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 约氏疟原虫(Plasmodium yoelii)

<400> 67

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly  
 1 5 10 15

Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro  
 20

<210> 68  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 表兄链球菌(Streptococcus sobrinus)

<400> 68

Lys Pro Arg Pro Ile Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Gln Asn Gln Lys  
 1 5 10 15

<210> 69  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 表兄链球菌(Streptococcus sobrinus)

<400> 69

Ala Lys Ala Asp Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Gln Tyr Glu Lys Asp Leu  
 1 5 10 15



<210> 74  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> 曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)

<400> 74

Asp Leu Gln Ser Glu Ile Ser Leu Ser Leu Glu Asn Ser Glu Leu Ile  
 1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Ala Ala Glu Ser Leu Ala Ser Asp Leu Gln Arg Arg  
                  20                   25                   30

Val Asp

<210> 75  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> 牛抑制素

<400> 75

Ser Thr Pro Pro Leu Pro Trp Pro Trp Ser Pro Ala Ala Leu Arg Leu  
 1                   5                   10                   15

Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala  
                  20                   25

<210> 76  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 埃博拉病毒(*Ebola virus*)

<400> 76

Ala Thr Gln Val Glu Gln His His Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr  
 1                   5                   10                   15

Ala

<210> 77  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 埃博拉病毒(*Ebola virus*)

<400> 77

His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu Ala Thr Gln Val  
 1                    5                    10                    15

Glu

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> 埃博拉病毒(Ebola virus)

<400> 78

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

Ile

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<400> 79

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys Asn  
 1                    5                    10

<210> 80

<211> 18

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<400> 80

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly  
 1                    5                    10                    15

Cys Asn

<210> 81

<211> 18

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<400> 81

Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly  
 1 5 10 15

Cys Asn

<210> 82

<211> 42

<212> PRT

<213> 阿尔茨海默病  $\gamma$ -淀粉样蛋白(Alzheimer's disease  $\gamma$ -Amyloid)

<400> 82

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15

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

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 35 40

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> 阿尔茨海默病  $\beta$ -淀粉样蛋白(Alzheimer's disease  $\beta$ -Amyloid)

<400> 83

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15

Leu

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> 阿尔茨海默病  $\beta$ -淀粉样蛋白(Alzheimer's disease  $\beta$ -Amyloid)

<400> 84

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 1 5 10

<210> 85

<211> 33

<212> PRT

<213> 阿尔茨海默病  $\beta$ -淀粉样蛋白(Alzheimer's disease  $\beta$ -Amyloid)

<400> 85

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1                   5                   10                   15

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

Gly

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 86

Tyr Val Ala Val Glu Asn Gly Val Ala Lys Lys Val Ala  
1                   5                   10

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 87

His Phe Val Gln Gln Thr Pro Lys Ser Gln Pro Thr Leu Val Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 88

His Val Val Val Asn Asn Lys Val Ala Thr His Val Pro  
1                   5                   10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 89



Pro Leu Gln Asn Ile Gln Pro Gln Val Thr Lys Arg  
1                   5                   10

<210> 90

<211> 21

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis)

<400> 90

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

Lys Val Thr Lys Ala  
                  20

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis)

<400> 91

Tyr Val Asp Glu Gln Ser Lys Tyr His Ala  
1                   5                   10

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis)

<400> 92

His Phe Val Gln Asn Lys Gln Asn Gln Pro Pro Thr Leu Val Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis)

<400> 93

Lys Pro Ser Ser Thr Asn Ala Lys Thr Gly Asn Lys Val Glu Val Thr  
1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 94  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 94

Tyr Trp Thr Thr Val Asn Thr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Thr Phe Val  
 1                   5                   10                   15

Pro

<210> 95  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 95

Tyr Val Asp Glu Lys Lys Lys Met Val His Ala  
 1                   5                   10

<210> 96  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 96

His Tyr Thr Arg Gln Asn Asn Ala Asp Val Phe Val Pro  
 1                   5                   10

<210> 97  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 97

Tyr Tyr Thr Lys Asp Thr Asn Asn Asn Leu Thr Leu Val Pro  
 1                   5                   10

<210> 98  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 98

Pro Pro Gln Lys Asn Gln Ser Gln Pro Val Val Thr Lys Ala  
1                   5                   10

<210> 99

<211> 14

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 99

Pro Pro Ser Lys Gly Gln Thr Gly Asn Lys Val Thr Lys Gly  
1                   5                   10

<210> 100

<211> 14

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 100

Pro Pro Ser Lys Ser Gln Pro Gln Val Lys Val Thr Lys Ala  
1                   5                   10

<210> 101

<211> 18

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 101

Gln Pro Gln Thr Ala Asn Thr Gln Gln Gly Gly Lys Val Lys Val Thr  
1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 102

<211> 18

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 102

Gln Pro Gln Val Thr Asn Gly Val Gln Gly Asn Gln Val Lys Val Thr  
1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 103  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 103

Gln Pro Ser Lys Ala Gln Gly Gln Thr Asn Asn Gln Val Lys Val Thr  
 1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 104  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 104

Pro Pro Ser Ser Asn Gln Gly Lys Asn Gln Ala Gln Thr Gly Asn Thr  
 1                   5                   10                   15

Val Thr Lys Ala  
 20

<210> 105  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 105

Pro Pro Ser Lys Ser Gln Gly Lys Thr Gly Asn Gln Val Lys Val Thr  
 1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 106  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 106

Pro Pro Ser Lys Ser Gln Gly Thr Asn Asn Asn Gln Val Lys Val Thr  
 1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 107  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)

<400> 107

Pro Pro Ser Lys Ser Gln Pro Gly Gln Val Lys Val Thr Lys Val Thr  
 1                   5                   10                   15

Lys Ala

<210> 108  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)

<400> 108

Gln Leu Gln Leu Thr Glu Gln Pro Ser Ser Thr Asn Gly Gln Thr Gly  
 1                   5                   10                   15

Asn Gln Val Lys Val Thr Lys Ala  
 20

<210> 109  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)

<400> 109

Gln Leu Gln Leu Thr Glu Ala Pro Ser Lys Ser Gln Gly Ala Ala Ser  
 1                   5                   10                   15

Asn Gln Val Lys Val Thr Lys Ala  
 20

<210> 110  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)

<400> 110

Ser Ala Tyr Thr Pro Ala His Val Tyr Val Asp Asn Lys Val Ala Lys  
1                   5                   10                   15

His Val Ala

<210> 111

<211> 21

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 111

Ser Ala Tyr Thr Pro Ala His Phe Val Gln Asn Lys Gln Asn Asn Asn  
1                   5                   10                   15

Pro Thr Leu Val Pro  
                  20

<210> 112

<211> 12

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 112

Val Glu Gly Arg Asn Tyr Gln Leu Gln Leu Thr Glu  
1                   5                   10

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 113

Pro Ala Gln Asn Ser Lys Ser Ala Tyr Thr Pro Ala  
1                   5                   10

<210> 114

<211> 22

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 114

Gln Leu Gln Leu Thr Glu Pro Pro Ser Lys Asn Gln Ala Gln Thr Gln  
1                   5                   10                   15

Asn Lys Val Thr Lys Ala  
20

<210> 115  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 115

Gly Arg Asp Ala Phe Glu Leu Phe Leu Leu Gly Ser Gly Ser Asp Glu  
1                   5                   10                   15

<210> 116  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 116

Arg His Ala Asn Val Gly Arg Asp Ala Phe Glu Leu Phe Leu Leu Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Gly Ser Asp Glu Ala Lys Gly Thr Asp Pro Leu Lys Asn His  
20                   25                   30

<210> 117  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 117

Gly Arg Asp Ala Phe Asn Leu Phe Leu Leu Gly Arg Ile Gly Asp Asp  
1                   5                   10                   15

Asp Glu

<210> 118  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 118

Gly Arg Asn Ala Phe Glu Leu Phe Leu Ile Gly Ser Ala Thr Ser Asp  
1                   5                   10                   15

Gln

<210> 119  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

&lt;400&gt; 119

Gln Val Lys Val Thr Lys Ala Lys Ser Arg Ile Arg Thr Lys Ile  
 1                   5                   10                   15

<210> 120  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

&lt;400&gt; 120

Thr Leu Val Pro Ala Val Val Gly Lys Pro Gly Ser Asp  
 1                   5                   10

<210> 121  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

&lt;400&gt; 121

His Ala Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gly Ser Ala Lys Gly Phe Ser Pro  
 1                   5                   10                   15

Arg

<210> 122  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

&lt;400&gt; 122

Thr Arg Tyr Lys Asn Tyr Lys Ala Pro Ser Thr Asp Phe Lys Leu  
 1                   5                   10                   15

<210> 123  
 <211> 18



<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 123

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

Gln Thr

<210> 124

<211> 21

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 124

Gly Lys Val Asn Thr Val Lys Asn Val Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ala  
1                   5                   10                   15

Gly Val Arg Val Lys  
20

<210> 125

<211> 21

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 125

Gly Lys Val Asn Thr Val Lys Asn Val Arg Ser Gly Glu Leu Ser Val  
1                   5                   10                   15

Gly Val Arg Val Lys  
20

<210> 126

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人(*Homo sapiens*)

<400> 126

Ala Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu  
1                   5                   10

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 127

Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp

1 5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 128

Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu

1 5

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 129

Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys

1 5 10

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 130

Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 131

Pro Gly Thr Ile Asn Ile

1 5

<210> 132

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 132

Phe Thr Pro Pro Thr  
 1                    5

<210> 133  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 133

Ile Asn His Arg Gly Tyr Trp Val  
 1                    5

<210> 134  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 134

Gly Glu Phe Cys Ile Asn His Arg Gly Tyr Trp Val Cys Gly Asp Pro  
 1                    5                    10                    15

Ala

<210> 135  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 135

Met Ala Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu  
 1                    5                    10

<210> 136  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 136

---

Met Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp  
1                    5                    10

<210> 137  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)  
  
<400> 137

Met Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu  
1                    5

<210> 138  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)  
  
<400> 138

Met Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys  
1                    5                    10

<210> 139  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)  
  
<400> 139

Met Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr  
1                    5

<210> 140  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)  
  
<400> 140

Met Pro Gly Thr Ile Asn Ile  
1                    5

<210> 141  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)  
  
<400> 141

Met Phe Thr Pro Pro Thr  
1 5

<210> 142  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 142

Met Ile Asn His Arg Gly Tyr Trp Val  
1 5

<210> 143  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 143

Met Gly Glu Phe Cys Ile Asn His Arg Gly Tyr Trp Val Cys Gly Asp  
1 5 10 15

Pro Ala

<210> 144  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 144

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

His Gln Leu Asp Pro  
20

<210> 145  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 145

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His  
1 5



<400> 150

Gln Asp Pro Arg Val Arg  
1                   5

<210> 151

<211> 6

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 151

Gln Asp Gly Arg Val Arg  
1                   5

<210> 152

<211> 13

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 152

Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Leu Pro Ala Gly Gly  
1                   5                   10

<210> 153

<211> 13

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 153

Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly  
1                   5                   10

<210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 154

Gly Ser Gly Asp Glu Gly Gly  
1                   5

<210> 155

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 柔性连接臂序列

<400> 155

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr  
 1                   5                   10

<210> 156  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 柔性连接臂序列

<400> 156

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1                   5

<210> 157  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 柔性连接臂序列

<400> 157

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1                   5

<210> 158  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> HIV

<400> 158

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Cys  
 1                   5                   10                   15

<210> 159



<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)

<400> 159

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15

Cys

<210> 160  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)

<400> 160

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

Asn Gly Lys Val Thr Val Ser Leu Cys  
                   20                   25

<210> 161  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)

<400> 161

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

Asn Asp Cys

<210> 162  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 甲型流感病毒

<400> 162

Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Cys  
 1                   5                   10

<210> 163

<211> 10

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 163

Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Cys  
1                   5                   10

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒

<400> 164

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Cys  
1                   5

<210> 165

<211> 21

<212> PRT

<213> 克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)

<400> 165

Ser His Asn Phe Thr Leu Val Ala Ser Val Ile Ile Glu Glu Ala Pro  
1                   5                   10                   15

Ser Gly Asn Thr Cys  
                  20

<210> 166

<211> 16

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 166

Ser Val Gln Ile Pro Lys Val Pro Tyr Pro Asn Gly Ile Val Tyr Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 167

Asp Phe Asn His Tyr Tyr Thr Leu Lys Thr Gly Leu Glu Ala Asp Cys  
 1                   5                   10                   15

<210> 168

<211> 18

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 168

Pro Ser Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Lys Lys Ile Lys Asn Ser Ile  
 1                   5                   10                   15

Ser Cys

<210> 169

<211> 20

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 169

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro  
 1                   5                   10                   15

Cys Ser Val Thr  
                   20

<210> 170

<211> 19

<212> PRT

<213> 间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)

<400> 170

Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Thr Val Gly Thr Glu Trp Thr Pro Cys  
 1                   5                   10                   15

Ser Val Thr

<210> 171

<211> 20

<212> PRT

<213> 约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)

<400> 171

Glu Phe Val Lys Gln Ile Ser Ser Gln Leu Thr Glu Glu Trp Ser Gln  
1                   5                   10                   15

Cys Ser Val Thr  
                  20

<210> 172

<211> 16

<212> PRT

<213> 表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)

<400> 172

Lys Pro Arg Pro Ile Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Gln Asn Gln Lys Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 173

<211> 17

<212> PRT

<213> 表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)

<400> 173

Ala Lys Ala Asp Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Gln Tyr Glu Lys Asp Leu  
1                   5                   10                   15

Cys

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒

<400> 174

Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Thr Ala Gln Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 175

<211> 16

<212> PRT

<213> 破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)

<400> 175

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 176  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 176

Ala Ile Trp Gln Val Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asp Ser  
 1                   5                   10                   15

Gly Trp Cys

<210> 177  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 177

Asn Tyr Lys Asn Gly Gly Phe Phe Val Gln Tyr Gly Gly Ala Tyr Lys  
 1                   5                   10                   15

Arg His Cys

<210> 178  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 178

His Asn Ser Gln Thr Glu Val Ala Ala Thr Leu Ala Tyr Arg Phe Gly  
 1                   5                   10                   15

Asn Val Cys

<210> 179  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 179

Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Gly Leu Val Asp Asp  
 1                   5                   10                   15

Ala Asp Cys

<210> 180  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)  
 <400> 180

Arg Phe Gly Asn Ala Val Pro Arg Ile Ser Tyr Ala His Gly Phe Asp  
 1                   5                   10                   15

Phe Ile Cys

<210> 181  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)  
 <400> 181

Ala Phe Lys Tyr Ala Arg His Ala Asn Val Gly Arg Asn Ala Phe Glu  
 1                   5                   10                   15

Leu Phe Cys

<210> 182  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)  
 <400> 182

Ser Gly Ala Trp Leu Lys Arg Asn Thr Gly Ile Gly Asn Tyr Thr Gln  
 1                   5                   10                   15

Ile Asn Ala Cys  
 20

<210> 183  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)  
 <400> 183

Ala Gly Glu Phe Gly Thr Leu Arg Ala Gly Arg Val Ala Asn Gln Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 184

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 184

Ile Gly Asn Tyr Thr Gln Ile Asn Ala Ala Ser Val Gly Leu Arg Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 185

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 185

Gly Arg Asn Tyr Gln Leu Gln Leu Thr Glu Gln Pro Ser Arg Thr Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 186

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 186

Ser Gly Ser Val Gln Phe Val Pro Ala Gln Asn Ser Lys Ser Ala Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 187

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 187

His Ala Asn Val Gly Arg Asp Ala Phe Asn Leu Phe Leu Leu Gly Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 188

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 188

Leu Gly Arg Ile Gly Asp Asp Asp Glu Ala Lys Gly Thr Asp Pro Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 189

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 189

Ser Val Gln Phe Val Pro Ala Gln Asn Ser Lys Ser Ala Tyr Lys Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 190

Asn Tyr Ala Phe Lys Tyr Ala Lys His Ala Asn Val Gly Arg Asp Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 191

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 191

Ala His Gly Phe Asp Phe Ile Glu Arg Gly Lys Lys Gly Glu Asn Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 192

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 192

Gly Val Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Ile Val Ser Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 193

<211> 16

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)



<400> 193

His Asp Asp Met Pro Val Ser Val Arg Tyr Asp Ser Pro Asp Phe Cys  
1                   5                   10                   15

<210> 194

<211> 27

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 194

Arg Phe Gly Asn Ala Val Pro Arg Ile Ser Tyr Ala His Gly Phe Asp  
1                   5                   10                   15

Phe Ile Glu Arg Gly Lys Lys Gly Glu Asn Cys  
                  20                   25

<210> 195

<211> 24

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 195

Asn Tyr Ala Phe Lys Tyr Ala Lys His Ala Asn Val Gly Arg Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Phe Asn Leu Phe Leu Leu Gly Cys  
                  20

<210> 196

<211> 26

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 196

Ser Gly Ala Trp Leu Lys Arg Asn Thr Gly Ile Gly Asn Tyr Thr Gln  
1                   5                   10                   15

Ile Asn Ala Ala Ser Val Gly Leu Arg Cys  
                  20                   25

<210> 197

<211> 20

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 197

Ser Gly Ser Val Gln Phe Val Pro Ala Gln Asn Ser Lys Ser Ala Tyr  
1 5 10 15

Thr Pro Ala Cys  
20

<210> 198

<211> 19

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 198

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

Ile Thr Cys

<210> 199

<211> 19

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 199

Ile Tyr Asp Phe Lys Leu Asn Asp Lys Phe Asp Lys Phe Lys Pro Tyr  
1 5 10 15

Ile Gly Cys

<210> 200

<211> 19

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 200

Leu Ser Ala Ile Tyr Asp Phe Lys Leu Asn Asp Lys Phe Lys Pro Tyr  
1 5 10 15

Ile Gly Cys

<210> 201

<211> 19

<212> PRT  
 <213> 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 201

Asn Gly Trp Tyr Ile Asn Pro Trp Ser Glu Val Lys Phe Asp Leu Asn  
 1                            5                            10                            15

Ser Arg Cys

<210> 202  
 <211> 549  
 <212> DNA  
 <213> 乙型肝炎病毒

<400> 202

```
atggacatcg acccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc gtttttgcoct      60
tctgacttct ttccttcagt acgagatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa      120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agcaattctt      180
tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg ttaatttggg agatccagcg      240
tctagagacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gcctaaagt caggcaactc      300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga gtatttgggtg      360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaatgc ccctatccta      420
tcaaaccttc cggagactac tgttgttaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact      480
ccctgcctc gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa      540
tctcaatgt                                     549
```

<210> 203  
 <211> 555  
 <212> DNA  
 <213> 乙型肝炎病毒

<400> 203

```
atggacattg acccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc gtttttgcoct      60
tctgacttct ttccttcagt acgagatctc ctagacaccg cctcagctct gtatcagaaa      120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agccattctc      180
tgctgggggg aattgatgac tctagctacc tgggtgggta ataatttggc agatccagca      240
tccagagatc tagtagtcaa ttatgttaat actaacatgg gtttaaagat caggcaacta      300
ttgtggtttc atatatcttg ccttactttt ggaagagaga ctgtacttga atatttggtc      360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcctatagac caccaaatgc ccctatotta      420
tcaaaccttc cggaaactac tgttgttaga cgacgggacc gaggcaggtc ccctagaaga      480
agaactcct cgcctcgcag acgcagatct caatgcgcgc gtcgcagaag atctcaatct      540
cggaatctc aatgt                                     555
```

<210> 204  
 <211> 555  
 <212> DNA  
 <213> 乙型肝炎病毒

## &lt;400&gt; 204

atggacattg acccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc gtttttgcc	60
tctgacttct ttccttccgt cagagatctc ctagacaccg cctcagctct gtatcgagaa	120
gccttagagt ctctgagca ttgctcacct caccatactg cactcaggca agccattctc	180
tgctgggggg aattgatgac tctagctacc tgggtgggta ataatttggg agatccagca	240
tctagggatc ttgtagtaaa ttatgttaat actaacgtgg gtttaaagat caggcaacta	300
ttgtggtttc atatatcttg cttactttt ggaagagaga ctgtacttga atatttggtc	360
tctttgggag tgtggattcg cactcctcca gcctatagac caccaaatgc ccctatctta	420
tcaacacttc cggaaactac tgttgttaga cgacgggacc gaggcaggtc ccctagaaga	480
agaactccct cgcctcgcag acgcagatct ccatcgccgc gtcgcagaag atctcaatct	540
cggaatctc aatgt	555

## &lt;210&gt; 205

&lt;211&gt; 549

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 乙型肝炎病毒

## &lt;400&gt; 205

atggacattg acccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc gtttttgcc	60
tctgacttct ttccttccgt acgagatctt ctagataccg ccgcagctct gtatcgggat	120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agcaattctt	180
tgctggggag acttaatgac tctagctacc tgggtgggta ctaatttaga agatccagca	240
tctagggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatgtgg gcctaaagtt cagacaatta	300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cggttctaga gtatttggtg	360
tcttttgag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaatgc ccctatccta	420
tcaacgcttc cgggactac tgttgttaga cgacaggca ggtcccctag aagaagaact	480
ccctcgcctc gcagacgaag atctcaatcg ccgcgtcga gaagatctca atctcgggaa	540
tctcaatgt	549

## &lt;210&gt; 206

&lt;211&gt; 549

&lt;212&gt; DNA

<213> 北美土拨鼠 (*Marmota monax*)

## &lt;400&gt; 206

atggctttgg ggcattgaca tagatcctta taaagaattt ggttcatctt atcagttggt	60
gaattttctt cctttggact tctttctga tottaatgct ttggtggaca ctgctactgc	120
cttgatgaa gaagaactaa caggtaggga acattgctct ccgcaccata cagctattag	180
acaagcttta gtatgctggg atgaattaac taaattgata gcttggatga gctctaacat	240
aacttctgaa caagtaagaa caatcattgt aatcatgtc aatgatacct ggggacttaa	300
ggtgagacaa agtttatggt ttcatctgtc atgtctcact ttcgacaac atacagttca	360
agaattttta gtaagttttg gagtatggat caggactcca gctccatata gacctcctaa	420
tgcaccatt ctctcgactc ttccggaaca tacagtcatt aggagaagag gaggtgcaag	480
agcttctagg tccccagaa gacgcactcc ctctctctgc aggagaagat ctcaatcacc	540
cgctcgcag	549

## &lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 651

<212> DNA

<213> 地松鼠(*Spermophilus variegatus*)

<400> 207

```

atgtatcttt ttcacctgtg ccttgTTTT gctgtgttc catgtcctac tgttcaagcc      60
tccaagctgt gccttggatg gctttgggac atggacatag atccctataa agaatttggT    120
tcttcttatac agttgttgaa ttttcttctt ttggactttt ttcctgatct caatgcattg    180
gtggacactg ctgctgctct ttatgaagaa gaattaacag gtagggagca ttgttctcct    240
catcactactg ctattagaca ggccttagtg tgttgggaag aattaactag attaattaca    300
tggatgagtg aaaatacaac agaagaagtt agaagaatta ttgttgatca tgtcaataat    360
acttggggac ttaaagtaag acagacttta tggtttcatt tatcatgtct tacttttgga    420
caacacacag ttcaagaatt tttggttagt tttggagtat ggattagaac tccagctcct    480
tatagaccac ctaatgcacc cattttatca actcttccgg aacatacagt cattaggaga    540
agaggaggTt caagagctgc taggtcccc cgaagacgca ctccctctcc tgcaggaga    600
aggtctcaat caccgcgtcg cagacgctct caatctccag cttccaactg c              651

```

<210> 208

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 208

```

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala
1           5           10           15

```

Thr Gly

<210> 209

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 209

```

gogaagcttc ggateccatg gtttttctc ccttatgtga aattgttata cgetc      55

```

<210> 210

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物	
<400> 210	
ttgggccaatg gacatogacc cttta	24
<210> 211	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物	
<400> 211	
gcggaattcc ttccaaatta acacccacc	29
<210> 212	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物	
<400> 212	
cgogaattca aaaagagctc gatccagcgt ctagagac	38
<210> 213	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物	
<400> 213	
cgcaagctta aacaacagta gtctccggaa g	31
<210> 214	
<211> 31	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物	
<400> 214	
Gly Cys Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys	

1                    5                    10                    15  
 Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Ala Cys  
                          20                    25                    30

<210> 215  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 215

Cys Gly Cys Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala  
 1                    5                    10                    15

Gly Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Thr Ala Gly Ala  
                          20                    25                    30

Gly Ala Cys Cys Thr Ala Gly  
                          35

<210> 216  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 216

Met Gly Cys Glu Leu Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly  
 1                    5                    10

<210> 217  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 217

gcgccatggg gtgtgagctc gacccttata aagaatttgg

40

<210> 218





<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 222

gtatcaggct gaaaatc

17

<210> 223

<211> 19

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 223

Ile Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn

1

5

10

15

Pro Glu Leu

<210> 224

<211> 57

<212> DNA

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 224

aattaacgct aatccgaacg ctaatccgaa cgctaatacgc aacgctaatac cggagct

57

<210> 225

<211> 49

<212> DNA

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 225

ccggattagc gttcggatta gcggttcggat tagcgttcgg attagcgtt

49

<210> 226

<211> 31

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 226

Ile Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn

1

5

10

15

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Glu Leu

20

25

30





<400> 236		
aattaacgcg aatccgaacg tggatccaaa tgccaaccot aacgctaate caaacgccaa		60
cccgaatggt gaccccaatg ccaatccgga gct		93
<210> 237		
<211> 85		
<212> DNA		
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)		
<400> 237		
ccgattggc attggggtca acattcgggt tggcgtttgg attagcgta gggttggcat		60
ttgatccac gttcggattc gcggt		85
<210> 238		
<211> 23		
<212> PRT		
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)		
<400> 238		
Ile Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn		
1                    5                    10                    15		
Ala Asn Pro Asn Val Glu Leu		
20		
<210> 239		
<211> 69		
<212> DNA		
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)		
<400> 239		
aattaatccg aacgtggatc caaatgccaa ccctaacgt aatccaaacg ccaaccogaa		60
tgttgagct		69
<210> 240		
<211> 61		
<212> DNA		
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)		
<400> 240		
caacattcgg gttggcgttg ggattagcgt tagggttggc atttggatcc acgttoggat		60
t		61
<210> 241		
<211> 25		
<212> PRT		
<213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)		



<211> 73  
 <212> DNA  
 <213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 246  
 cagcattagg gtcaacattc gggttggcgt ttggattagc gttagggttg gcatttggat 60  
 ccacgttcgg att 73

<210> 247  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 247

Ile Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
 1                   5                   10                   15

Pro Asn Val Glu Leu  
                   20

<210> 248  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 248  
 aattaacgtg gatccaaatg ccaaccctaa cgctaatacca aacgccaaacc cgaatgttga 60  
 gct 63

<210> 249  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 249  
 caacattcgg gttggcgttt ggattagcgt tagggttggc atttggatcc acgtt 55

<210> 250  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)

<400> 250

Ile Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
 1                   5                   10                   15

Pro Asn Val Asp Pro Glu Leu

20

&lt;210&gt; 251

&lt;211&gt; 69

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 251

aattaaogtg gatccaaatg ccaaccctaa cgctaatcca aacgcccaacc cgaatgttga 60  
 ccctgagct 69

&lt;210&gt; 252

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 252

cagggtcaac attcgggttg gcggttggat tagcgtagg gttggcattt ggatccacgt 60  
 t 61

&lt;210&gt; 253

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 253

Ile Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
 1 5 10 15

Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Glu Leu  
 20 25

&lt;210&gt; 254

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 254

aattaaogtg gatccaaatg ccaaccctaa cgctaatcca aacgcccaacc cgaatgttga 60  
 ccctaatgct gagct 75

&lt;210&gt; 255

&lt;211&gt; 67

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 255

cagcattagg gtcaacattc gggttggcgt ttggattagc gttagggttg gcattttgat 60

ccacgtt

67

&lt;210&gt; 256

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 256

Ile Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
 1                    5                    10                    15

Val Glu Leu

&lt;210&gt; 257

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 257

aattgatcca aatgccaacc ctaacgctaa tccaaacgcc aaccggaatg ttgagct 57

&lt;210&gt; 258

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 258

caacattcgg gttggcgttt ggattagcgt tagggttggc atttgatc 49

&lt;210&gt; 259

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

&lt;400&gt; 259

Ile Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
 1                    5                    10                    15

Val Asp Pro Glu Leu  
 20

&lt;210&gt; 260

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)



<400> 260  
 aattgatcca aatgccaacc ctaacgctaa tccaaacgcc aaccggaatg ttgaccctga 60  
 gct 63

<210> 261  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 261  
 cagggtcaac attcgggttg gcgtttgat tagcgtagg gttggcattt ggatc 55

<210> 262  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 262

Ile Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
 1                    5                    10                    15

Val Asp Pro Asn Ala Glu Leu  
 20

<210> 263  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 263  
 aattgatcca aatgccaacc ctaacgctaa tccaaacgcc aaccggaatg ttgaccctaa 60  
 tgccgagct 69

<210> 264  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 264  
 cggcattagg gtcaacattc gggttggcgt ttggattagc gttagggttg gcatttggat 60  
 c 61

<210> 265  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 265



<212> DNA

<213> 间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)

<400> 270

cgccagccgg ctggcctgca gcgcggtcac ccgctggctg gccatctgca cggtcaccag 60  
ccgg 64

<210> 271

<211> 21

<212> PRT

<213> 间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)

<400> 271

Ile Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln  
1 5 10 15

Pro Ala Gly Glu Leu  
20

<210> 272

<211> 63

<212> DNA

<213> 间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)

<400> 272

aattgacaga gcagccggac aaccagcagg cgatcgagca gacggacagc ccgcagggga 60  
gct 63

<210> 273

<211> 55

<212> DNA

<213> 间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)

<400> 273

cccctgcggg ctgtccgtct gctcgatcgc ctgctggttg tccggetget ctgtc 55

<210> 274

<211> 21

<212> PRT

<213> 间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)

<400> 274

Ile Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Gly Asp  
1 5 10 15

Gln Pro Gly Glu Leu  
20

<210>	275	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	间日疟原虫(Plasmodium vivax)	
<400>	275	
	aattgcgaac ggcgccgta atcagccggg ggcaaacggc gcgggtgac aaccagggga	60
	gct	63
<210>	276	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	间日疟原虫(Plasmodium vivax)	
<400>	276	
	cccttggttg atcacccgcg ccgtttgccc ccggtgatt accggcgccg ttcgc	55
<210>	277	
<211>	21	
<212>	PRT	
<213>	间日疟原虫(Plasmodium vivax)	
<400>	277	
	Ile Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp	
	1                    5                    10                    15	
	Gln Pro Gly Glu Leu	
	20	
<210>	278	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	间日疟原虫(Plasmodium vivax)	
<400>	278	
	aattgcgaac ggcgccgata atcagccggg tgcaaacggg gcggatgacc aaccagggga	60
	gct	63
<210>	279	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	间日疟原虫(Plasmodium vivax)	
<400>	279	
	cgcttggttg gtcacccgcc ccgtttgcac ccggtgatt atcgcgccg ttcgc	55
<210>	280	

<211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 280

Ile Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Gly Asp  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala  
                   20                   25                   30

Asp Asp Gln Pro Gly Glu Leu  
           35

<210> 281  
 <211> 117  
 <212> DNA  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 281

aattgcgaac ggcgcccgta atcagccggg agcaaacggc gcgggggata aaccaggcgc   60  
 caatggtgca gacaaccagc ctggggcgaa tggagccgat gaccaaccgc gcgagct       117

<210> 282  
 <211> 109  
 <212> DNA  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 282

cgccgggttg gtcacggcct ccattcgccc caggctgggt gtctgcacca ttggcgccctg   60  
 gttgatcccc cgcgccgttt gtcceggct gattaccggc gccgttgcg       109

<210> 283  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 283

Ile Ala Pro Gly Ala Asn Gln Glu Gly Gly Ala Ala Ala Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15

Asn Gln Glu Gly Gly Ala Ala Glu Leu  
           20                   25

<210> 284  
 <211> 75  
 <212> DNA

<213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 284

aattgcgccg ggcgccaacc aggaaggtgg ggctgcagcg ccaggagcca atcaagaagg 60  
cggcgcagcg gagct 75

<210> 285

<211> 67

<212> DNA

<213> 间日疟原虫(Plasmodium vivax)

<400> 285

ccgctgcacc gccttttga ttggtcctg gcgctgcagc cccaccttcc tggttggcgc 60  
cggcgc 67

<210> 286

<211> 203

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HBc 嵌合体

<400> 286

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr  
20 25 30

Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg  
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro  
165 170 175

Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg  
180 185 190

Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
195 200

<210> 287

<211> 176

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HBc 嵌合体

<400> 287

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 Gly Ile  
65 70 75 80

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
85 90 95

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Pro Ala Ser Arg Asp Leu Val  
100 105 110

Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu  
115 120 125

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

Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg  
145 150 155 160

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val  
165 170 175

<210> 288

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HBc 嵌合体

<400> 288

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 Gly Ile  
65 70 75 80

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
85 90 95

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Pro Ala Ser Arg Asp Leu Val  
100 105 110

Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu  
115 120 125

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

Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg  
145 150 155 160



Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val  
 165 170 175

Cys

<210> 289  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> HBc 嵌合体

<400> 289

Met Gly Ile Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
 1 5 10 15

Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Leu Gly Trp Leu  
 20 25 30

Trp Gly Ile Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu  
 35 40 45

Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu  
 50 55 60

Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu  
 65 70 75 80

His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp  
 85 90 95

Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp  
 100 105 110

Pro Ala Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly  
 115 120 125

Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe  
 130 135 140

Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile  
 145 150 155 160

Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr  
 165 170 175

Leu Pro Glu Thr Thr Val Val

180

&lt;210&gt; 290

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HBc 嵌合体

&lt;400&gt; 290

Met Gly Ile Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
 1                    5                    10                    15

Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Leu Gly Trp Leu  
                   20                    25                    30

Trp Gly Ile Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu  
                   35                    40                    45

Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu  
                   50                    55                    60

Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu  
 65                    70                    75                    80

His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp  
                   85                    90                    95

Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp  
                   100                    105                    110

Pro Ala Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly  
                   115                    120                    125

Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe  
                   130                    135                    140

Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile  
 145                    150                    155                    160

Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr  
                   165                    170                    175

Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Cys  
                   180

&lt;210&gt; 291

<211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 291

Met Gly Ser Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu  
 1                   5                   10                   15

Phe Gly

<210> 292  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 292  
 ggcgccatgg ggtctagatg taacgattca agtgacatcg acccttataa agaatttcg           59

<210> 293  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 293

Met Gly Cys Asn Asp Ser Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly  
 1                   5                   10                   15

<210> 294  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 294  
 gcgccatggg gtgtaacgat tcaagtgaca tcgaccctta taaagaattt gg           52

<210> 295

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 295

Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp  
1                   5                   10

<210> 296

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 296

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1                   5                   10                   15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Asp  
                  20                   25

<210> 297

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 297

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Asp  
                  20                   25

<210> 298

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 298

Met Gly Ile Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
1                   5                   10                   15

Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Leu Gly Trp Leu  
          20                   25                   30

Trp Gly Ile Asp Ile Asp  
          35

<210> 299

<211> 52

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 299

Gly Cys Gly Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly  
1                   5                   10                   15

Gly Gly Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Ala  
          20                   25                   30

Cys Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala Gly Thr Cys Thr  
          35                   40                   45

Cys Cys Gly Gly  
          50

<210> 300

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 300

Gly Cys Gly Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Ala Cys Ala









<400> 307

Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Ala Cys Ala  
1                   5                   10                   15

Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys Cys Cys Gly  
                  20                   25

<210> 308

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有限制性内切核酸酶位点的扩增引物

<400> 308

Cys Gly Cys Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Gly Cys Ala  
1                   5                   10                   15

Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys  
                  20                   25                   30

Gly Gly Ala Ala Gly  
                  35

87

图 1A

	mylfhlcivf acvpoptvqa skiclgwlwd	
地松鼠		
HBC AYW	1	mdidpykefg atvellsflp sdfpfsvrđl ldtasalyre
HBC ADW		mdidpykefg atvellsflp sdfpfsvrđl ldtasalyre
HBC ADW2		mdidpykefg atvellsflp sdfpfsvrđl ldtasalyre
HBC ADYW		mdidpykefg atvellsflp sdfpfsvrđl ldtasalyre
土拔鼠		mdidpykefg ssyqlnflp ldfpdlnal vdtatalyee
地松鼠		mdidpykefg ssyqlnflp ldfpdlnal vdtasalyre
HBC AYW	41	alespehcsp hhtalrqail cwgelmtlat wvgvnledpa
HBC ADW		alespehcsp hhtalrqail cwgelmtlat wvgvnledpa
HBC ADW2		alespehcsp hhtalrqail cwgelmtlat wvgvnledpa
HBC ADYW		alespehcsp hhtalrqail cwgelmtlat wvgvnledpa
土拔鼠		eltgrehcsp hhtalrqalv cwdelklia wmsnitseq
地松鼠		eltgrehcsp hhtalrqalv cweeltrilit wmsentteev

图 1B

81  
 HBC AYW srdlvvsyvn tnmglkfrql lwfhiscldf gretvieylv  
 HBC ADW srdlvvnyvn tnmglkirql lwfhiscldf gretvleylv  
 HBC ADW2 srdlvvnyvn tnvglkirql lwfhiscldf gretvleylv  
 HBC ADYW srdlvvsyvn tnvglkfrql lwfhiscldf gretvleylv  
 土拔鼠 vrtiivnhvn dtwglkvrqs lwfhiscldf gqhtvqeflv  
 地松鼠 rriivdhvnn twglkvrqtl wfhlscldfg qhtvqeflvs

121  
 HBC AYW sfgvwirtpp ayppnapil stlpettvvr rrgsrprrrt  
 HBC ADW sfgvwirtpp ayppnapil stlpettvvr rrdigrsprir  
 HBC ADW2 sfgvwirtpp ayppnapil stlpettvvr rrdigrsprir  
 HBC ADYW sfgvwirtpp ayppnapil stlpettvvr rrgsrprrrt  
 土拔鼠 sfgvwirtpa pyppnapil stlpehtvir rrggarasrs  
 地松鼠 fgvwirtpap yppnapils tlpehtvirr rrgsraarsp

161  
 HBC AYW psprrrrsqs prrrrsqsre sqc  
 HBC ADW rtpsprrrrs qsprrrrsqs resqc  
 HBC ADW2 rtpsprrrrs qsprrrrsqs resqc  
 HBC ADYW psprrrrsqs prrrrsqsre sqc  
 土拔鼠 prrrtsprrr rrsqsprrrr sqc  
 地松鼠 rrrtsprrr rrsqsprrrrs qspasnc

## 图 2

HindIII  
pKK223-3  
TTCACACAGGAAACAGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGCCAAG  
CTT

pKK223-3N      TTCACATAAGGAGGAAAAAaccatggGATCCG--  
-----AAGCTT

NcoI

图 3

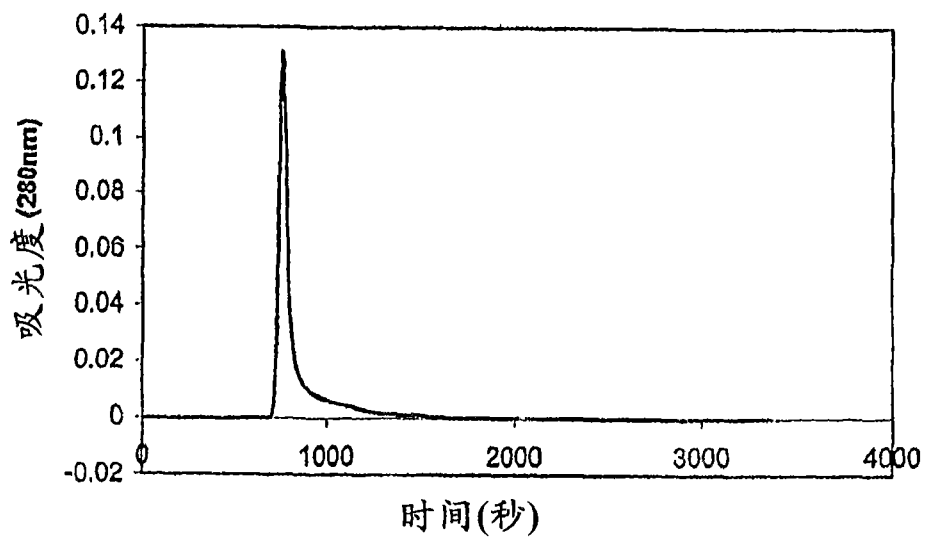
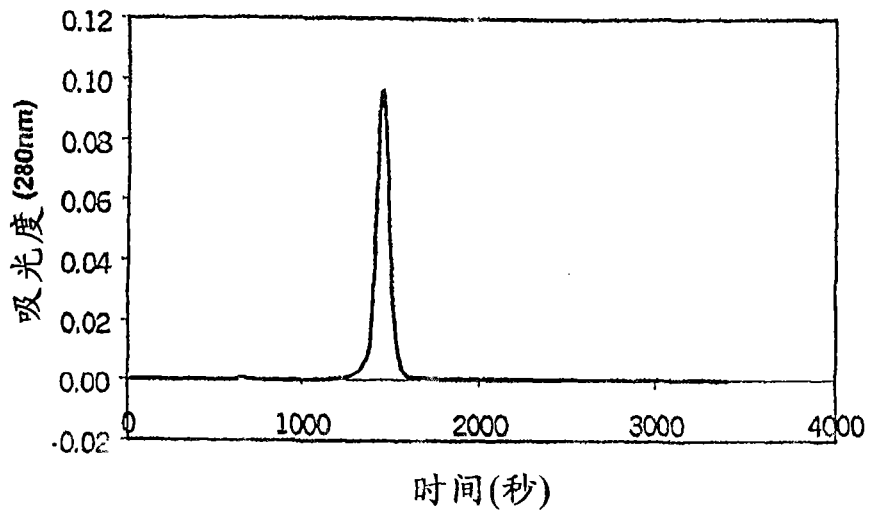


图 4

图 5

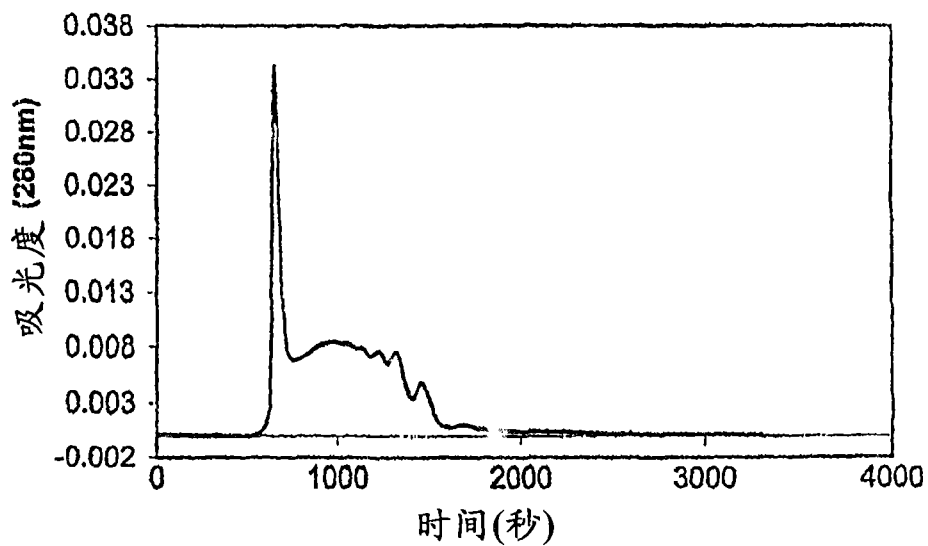
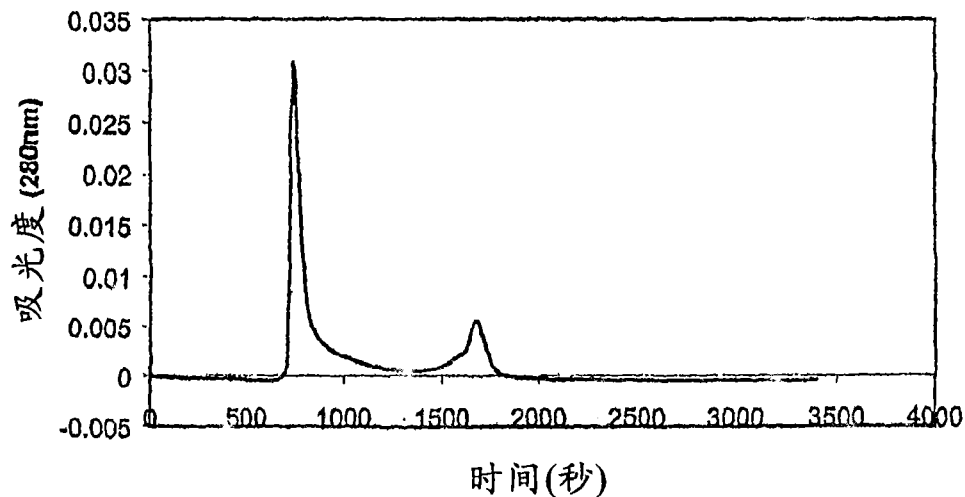


图 6

图 7

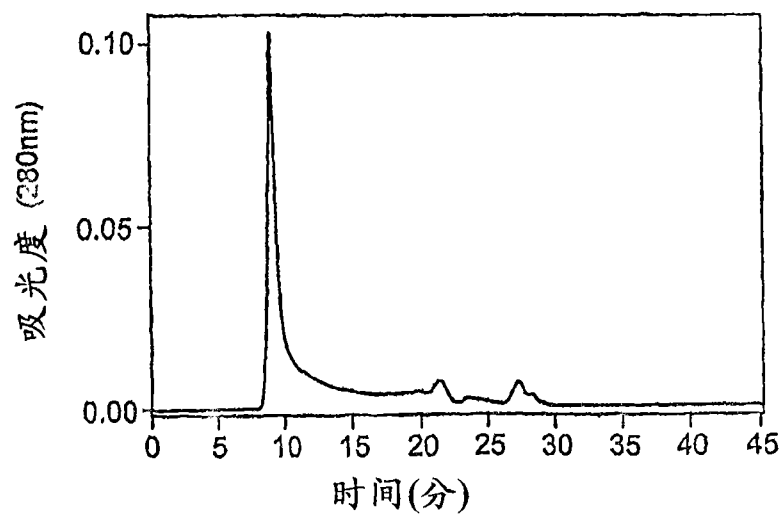
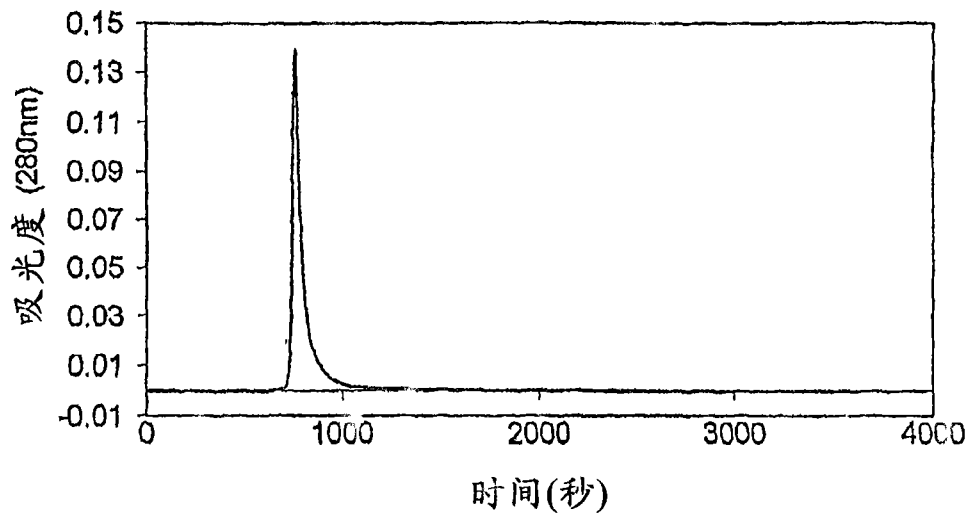


图 8

图 9

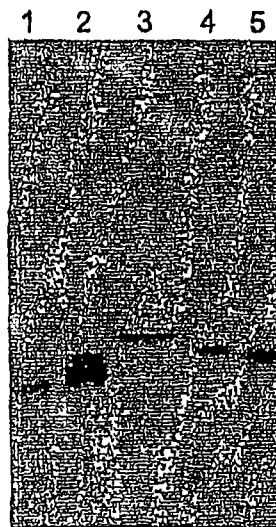
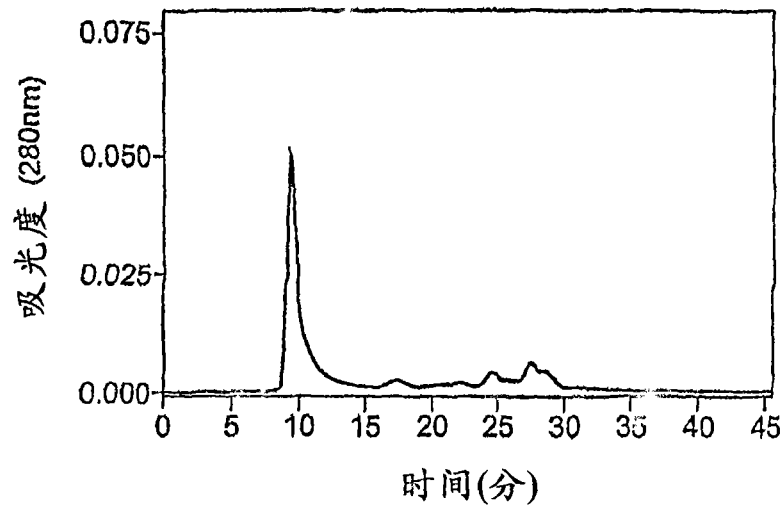


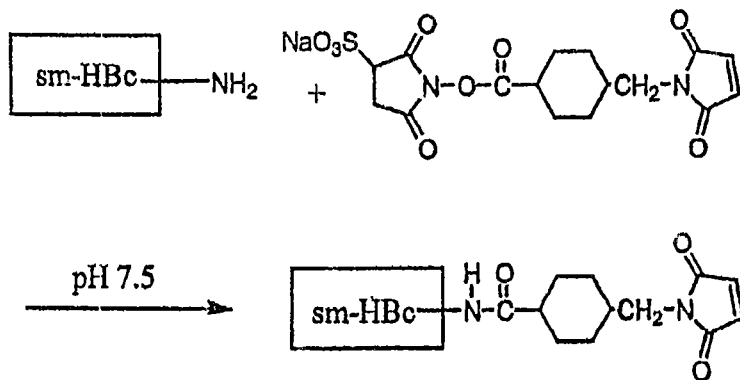
图 10



图 11

方案 1

I



II

