



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106701825 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201611011600.3

(22)申请日 2016.11.17

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 傅阳心 刘龙超 彭华

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 单骁越

(51)Int.Cl.

C12N 15/861(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表6页 附图7页

(54)发明名称

腺病毒疫苗Ad-LIGHT-HBsAg及其用于治疗
慢性乙肝的用途

(57)摘要

本发明提供一种用于慢性乙型肝炎病毒感
染的治疗性DNA疫苗,所述DNA疫苗包含通过将乙
肝表面抗原s-HBsAg和免疫共刺激分子LIGHT的
编码核酸序列构建到5型腺病毒载体中获得的核
酸构建体。本发明还提供一种用于治疗慢性乙型
肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含通过将
乙肝表面抗原s-HBsAg和免疫共刺激分子LIGHT
的编码核酸序列构建到5型腺病毒载体中获得的
核酸构建体、重组乙肝表面抗原s-HBsAg蛋白和
佐剂。本发明所述疫苗对于慢性乙型肝炎病毒感
染具有显著的治疗性效果,与抗-HBsAg中和性抗
体和抗-PDL1阻断抗体联合使用具有更好的治疗
效果。同时,过继转移经该疫苗活化的脾脏细胞
也具有显著的治疗性效果。

1. 核酸构建体,所述核酸构建体通过将乙肝表面抗原s-HBsAg和免疫共刺激分子LIGHT的编码核酸序列构建到5型腺病毒载体中获得。
2. 根据权利要求1所述的核酸构建体,其中所述乙肝表面抗原s-HBsAg的编码核酸序列如SEQ ID NO:1所示。
3. 根据权利要求1所述的核酸构建体,其中所述免疫共刺激分子LIGHT的编码核酸序列如SEQ ID NO:2所示。
4. 根据权利要求1所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体的核酸序列如SEQ ID NO:3所示。
5. 用于慢性乙型肝炎病毒感染的治疗性DNA疫苗,所述DNA疫苗包含根据权利要求1-4中任一项所述的核酸构建体。
6. 根据权利要求1-4中任一项所述的核酸构建体用于制备用于慢性乙型肝炎病毒感染的治疗性DNA疫苗的用途。
7. 用于治疗慢性乙型肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1-4中任一项所述的核酸构建体或根据权利要求5所述的DNA疫苗、重组乙肝表面抗原s-HBsAg蛋白和佐剂。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中所述佐剂是CpG。
9. 用于治疗慢性乙型肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1-4中任一项所述的核酸构建体或根据权利要求5所述的DNA疫苗以及抗-HBsAg抗体。
10. 用于治疗慢性乙型肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1-4中任一项所述的核酸构建体或根据权利要求5所述的DNA疫苗以及抗-PDL1抗体。

腺病毒疫苗Ad-LIGHT-HBsAg及其用于治疗慢性乙肝的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体地,涉及一种腺病毒疫苗Ad-LIGHT-HBsAg及其用于诱导HBsAg特异性免疫反应,治疗慢性乙肝的用途。同时,本发明还涉及该疫苗联合抗-HBsAg抗体以及抗-PDL1阻断抗体治疗慢性HBV感染的用途。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)属嗜肝病毒科,是一种不完整双链DNA病毒。主要通过血液和体液感染人和少数灵长类动物。乙型病毒性肝炎是由HBV感染引起的以肝脏炎症和坏死病变为主的传染病,严重威胁着人类的健康,慢性HBV感染更是导致原发性肝癌(HCC)和肝硬化的重要因素。全球有约2.4亿人是慢性乙肝感染者,而在我国就有约9300万。由于HBV不能感染小鼠等模式动物,缺乏合适的小动物模型是研究慢性乙肝感染引起的免疫耐受和致病机制的主要障碍。而现有的慢性乙型肝炎的治疗方案主要是通过干扰素和核苷类似物来抑制病毒复制从而改善临床症状及预后,这种方案并不能有效的清除病毒,同时极易引起耐药性。因此研发针对慢性乙型肝炎的治疗性疫苗及免疫策略具有极为重要的意义。

[0003] 慢性乙型肝炎诱导的免疫耐受机制至今仍没有被完全研究清楚。多种类型的细胞和分子参与了HBV诱导的免疫耐受。而最重要的一点原因在于HBV感染的靶器官是肝脏。肝脏既被认为是一个免疫器官,同时也被认为趋向于诱导免疫耐受,这使得打破嗜肝病毒引起的免疫耐受变得尤为困难。首先,肝脏中的多种抗原递呈细胞能够通过不同的机制来诱导免疫耐受。肝脏中的抗原递呈细胞主要有:髓系来源的DC(Myeloid DC)、浆样树突状细胞(Plasmacytoid DC)、Kupffer细胞、肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSEC)、肝实质细胞(Hepatocyte)和星形细胞(Stellate cell)。这些细胞可以通过分泌抑制性细胞因子如:IL10和TGF β ,或者表达共抑制分子如PD-L1和TIM-3来抑制T细胞免疫反应;也可以通过表达FasL和TRAIL来诱导抗原特异性T细胞凋亡;而MHC分子在肝脏细胞上的表达普遍较低,会导致TCR信号刺激不足而引起T细胞的耗竭和失能;同时,IL12产生的不足也会导致CD4细胞向Treg方向分化而不是Th1。而在慢性HBV感染过程中,其中的一些抑制已经被报道参与了HBV诱导的免疫耐受。

[0004] 腺病毒(Adenovirus,Ad)是无囊膜的二十面体颗粒,是一种线状双链DNA病毒,其基因组长约36kb。人类腺病毒共有51个血清型,依其基因组和致癌性的不同可分为A-E的6个亚群。其基因组由5个早期(E1A、E1B、E2、E3和E4)、4个中期和1个晚期转录单位组成。近20年来,腺病毒作为一种优良的基因载体,已被广泛用于基因治疗和疫苗研究等各个领域。腺病毒能够被如此广泛的应用于基因工程等领域,是因为其具有以下一些优点:1、宿主范围广,对人致病性低,副作用小。2、腺病毒颗粒相对稳定,病毒基因组很少发生重排,外源基因片段在插入病毒基因组后,不会随着病毒的复制而丢失。3、安全性好,腺病毒进入宿主细胞核后,会保持线状,在染色体外独立稳定存在,不会插入到宿主染色体中,不会引起宿主基因组的插入突变。4、可以同时表达多个基因。5、腺病毒携带的外源基因表达效率较高。6、腺

病毒的宿主范围广泛,可感染分裂和非分裂细胞,转导细胞种类多,如肺细胞、肝细胞、骨细胞、血管、肌肉、脑、中枢神经系统等。7、腺病毒可通过感染HEK293细胞大量扩增,通过CsCl密度梯度离心纯化,制备方便。8、嗜肝性:通过静脉感染5型腺病毒,90%以上的病毒特异性的进入了肝脏。这种嗜肝性并不是由萨科齐病毒受体(Coxsackie Adenovirus Receptor, CAR)介导的,而是先通过与凝血因子Ⅹ结合,进而通过凝血因子Ⅹ与肝实质细胞上的硫酸肝素蛋白聚糖的结合实现的。在静脉感染过程中,腺病毒主要被肝脏中的kupffer细胞通过清道夫受体捕获,而脾脏中的巨噬细胞和中性粒细胞吞噬的腺病毒数量很少。9、包装容量大:经改建的复制缺陷型腺病毒载体的克隆容量可达10kb,腺病毒基因完全缺失载体的克隆容量可高达37kb。

[0005] LIGHT是T细胞上可诱导表达的与单纯疱疹病毒的糖蛋白D竞争结合HVEM的淋巴毒素类似物(homologous to lymphotoxins,exhibits inducible expression,and competes with HSV glycoprotein D for HVEM,a receptor expressed by T lymphocytes,LIGHT)的简称,是1988年发现的TNF超家族的第14个成员。LIGHT可以通过LTβR招募和激活多种固有和获得性免疫细胞(如DC、T细胞、NK细胞等),上调趋化因子和粘附分子,并能激活NFκB,发挥诱导肿瘤细胞凋亡和刺激T细胞增殖的作用;还可作为一个共刺激分子,可通过CD28非依赖的信号传导途径刺激T细胞的生长和IFNγ的分泌。LIGHT的免疫活化功能主要是通过另一个受体HVEM直接活化T细胞和刺激NK细胞实现。

[0006] 早在90年代初,Daniel等人就提出了过继转移治疗HBV的概念。后来Lau等人通过系统的随访发现,将自限性乙肝感染者的骨髓移植给慢性乙肝患者,可以使患者发生表面抗原血清学转换并伴随着血清ALT的一过性升高。通过机制研究表明,治疗效果可能源于供者提供的记忆性T细胞的作用,尤其是HBcAg特异性的CD4+T细胞。该辅助性T细胞可以通过分泌细胞因子或帮助B细胞产生抗体来实现病毒的清除。同时,值得注意的是接种过预防性疫苗但没有感染过HBV的供体骨髓并不能清除慢性乙肝患者的HBV。这提示我们,HBV的清除有可能需要多种针对病毒抗原的CD4和CD8T细胞协同作用。

发明内容

[0007] 本发明目的在于提供一种腺病毒疫苗Ad-LIGHT-HBsAg及其用于治疗慢性乙肝的用途。

[0008] 在一方面,本发明提供了一种针对慢性HBV感染的治疗性疫苗,该疫苗的免疫能够有效的清除低剂量慢性HBV的感染。

[0009] 在一方面,本发明提供了一种续贯免疫方法,通过以CpG为佐剂的乙肝表面抗原疫苗与本发明所述疫苗的续贯免疫,能够有效的增强HBsAg特异性的免疫反应。

[0010] 在一方面,本发明提供了一种针对慢性乙型肝炎的联合治疗方法,本发明所述疫苗与抗-HBsAg中和性抗体的联合使用能够有效的清除慢性HBV的感染。

[0011] 在一方面,本发明提供了一种针对慢性乙型肝炎的联合治疗方法,本发明所述疫苗与抗-PDL1抗体的联合使用能够有效的清除慢性HBV的感染。

[0012] 在一方面,基于本发明所述疫苗的脾脏细胞过继转移疗法,在与射线照射联合使用后能够有效的清除慢性HBV的感染。

[0013] 在一个实施方案中,本发明构建一种乙型肝炎治疗性疫苗:利用5型腺病毒重组表

达HBV表面抗原(S-HBsAg)和免疫共刺激分子LIGHT。

[0014] 在一个实施方案中,本发明利用腺病毒疫苗Ad-LIGHT-HBsAg皮下免疫野生型C57BL6/J小鼠,能够在小鼠的脾脏和肝脏诱导HBsAg特异性的CD4⁺和CD8⁺T细胞免疫反应。

[0015] 在一个实施方案中,本发明利用Ad-LIGHT-HBsAg皮下免疫低剂量AAV/HBV1.3感染建立的慢性乙肝模型小鼠,能够打破免疫耐受,诱导HBsAg特异性的T细胞及B细胞免疫反应,清除HBV的感染。

[0016] 在一个实施方案中,本发明利用腹腔注射HBsAg的中和性抗体4周(2mg/周/鼠)再免疫Ad-LIGHT-HBsAg的方法,能够在高剂量AAV/HBV感染建立的慢性HBV感染小鼠中打破免疫耐受,诱导T细胞及B细胞免疫反应,清除HBV的感染。

[0017] 在一个实施方案中,本发明将重组乙肝表面抗原(2-10ug)与B型CpG(含有非甲基化的胞嘧啶和鸟嘌呤二核苷酸为核心序列的核苷酸序列),CpG-1826(50ug)在PBS缓冲液中进行混合后皮下免疫野生型小鼠,在免疫后的第14-28天后腹腔免疫Ad-LIGHT-HBsAg。在二次免疫后的第8天,能够在外周血中检测到大量HBsAg特异性的CD8⁺T细胞。在二次免疫后的第14天,能够在脾脏和肝脏中检测到大量的HBsAg特异性CD4⁺及CD8⁺免疫反应,与此同时也能够能够在血清中检测到大量的抗-HBsAg抗体。

[0018] 在一个实施方案中,HBsAg/CpG与Ad-LIGHT-HBsAg的续贯免疫能够诱导大量抗原特异性T及B细胞免疫反应的功能依赖于LIGHT-LTβR信号通路及在肝脏原位的免疫活化。

[0019] 在一个实施方案中,Ad-LIGHT-HBsAg活化14天后的脾脏细胞过继转移到AAV/HBV感染的Rag小鼠中能够清除HBV的感染。

[0020] 在一个实施方案中,Ad-LIGHT-HBsAg活化14天后的脾脏细胞过继转移到5Gy照射的AAV/HBV携带者小鼠中能够清除HBV的感染。

[0021] 在一个实施方案中,Ad-LIGHT-HBsAg活化14天后的脾脏细胞过继转移到HBV1.3转基因小鼠中能够清除HBV抗原的表达。

[0022] 在一个实施方案中,Ad-LIGHT-HBsAg与3次抗-PDL1的抗体(100ug/鼠/次)联合使用能够在高剂量AAV/HBV感染的小鼠中诱导抗原特异性T细胞免疫反应并清除HBV的持续性感染。

[0023] 具体地,本发明涉及以下方面:

[0024] 1.核酸构建体,所述核酸构建体通过将乙肝表面抗原s-HBsAg和免疫共刺激分子LIGHT的编码核酸序列构建到5型腺病毒载体中获得。

[0025] 2.根据1所述的核酸构建体,其中所述乙肝表面抗原s-HBsAg的编码核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0026] 3.根据1所述的核酸构建体,其中所述免疫共刺激分子LIGHT的编码核酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0027] 4.根据1所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体的核酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0028] 5.用于慢性乙型肝炎病毒感染的治疗性DNA疫苗,所述DNA疫苗包含根据1-4中任一项所述的核酸构建体。

[0029] 6.根据1-4中任一项所述的核酸构建体用于制备用于慢性乙型肝炎病毒感染的治疗性DNA疫苗用途。

[0030] 7.用于治疗慢性乙型肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含根据1-4中任一项

所述的核酸构建体或根据5所述的DNA疫苗、重组乙肝表面抗原s-HBsAg蛋白和佐剂。

[0031] 8. 根据7所述的试剂盒,其中所述佐剂是CpG。

[0032] 9. 用于治疗慢性乙型肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含根据1-4中任一项所述的核酸构建体或根据5所述的DNA疫苗以及抗-HBsAg抗体。

[0033] 10. 用于治疗慢性乙型肝炎病毒感染的试剂盒,所述试剂盒包含根据1-4中任一项所述的核酸构建体或根据5所述的DNA疫苗以及抗-PDL1抗体。

附图说明

[0034] 图1:根据本发明的Ad-LIHGT-HBsAg在野生型小鼠中诱导的T细胞免疫反应。包括在外周血中诱导的抗原特异性CD8⁺T细胞数量以及在脾脏和肝脏中诱导的分泌IFN γ 的抗原特异性细胞数量。

[0035] 图2:本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg在HBV慢性感染小鼠中诱导的免疫反应及治疗效果。包括血清中HBsAg和HBeAg的变化情况,肝脏中HBVgDNA的检测,以及肝脏中HBsAg特异性CTL的数量。

[0036] 图3:根据本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg与HBsAg中和性抗体联合治疗在高剂量HBV携带者小鼠中诱导的免疫反应及治疗效果。包括治疗过程中血清中HBsAg和HBeAg的变化情况,外周血中HBsAg特异性T细胞的数量以及治疗后肝脏中HBcAg的表达情况。

[0037] 图4:HBsAg/CpG与本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg续贯免疫诱导的免疫反应特点。包括HBsAg/CpG与Ad-LIGHT-HBsAg续贯免疫在脾脏和肝脏以及外周血中诱导的HBsAg特异性T细胞比例和抗体应答强度。

[0038] 图5:HBsAg/CpG与本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg续贯免疫诱导的免疫反应依赖于LIGHT-LT β R信号通路。包括HBsAg/CpG与Ad-LIGHT-HBsAg续贯免疫在野生型小鼠、LT β R敲除小鼠、HVEM敲除小鼠的外周血、肝脏、脾脏中诱导的HBsAg特异性T细胞数量以及抗体应答强度;以及用LT β R-Ig阻断后HBsAg/CpG与Ad-LIGHT-HBsAg续贯免疫在野生型小鼠中诱导的免疫反应。

[0039] 图6:利用本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg活化的脾脏细胞过继转移到Rag^{-/-}-HBV慢性感染小鼠后的治疗效果。包括血清中HBsAg和HBeAg的变化以及外周血、脾脏和肝脏中HBsAg特异性T细胞的数量。

[0040] 图7:利用本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg活化的脾脏细胞过继转移到5Gy射线照射的免疫健全HBV慢性感染小鼠后的治疗效果。包括血清中HBsAg和HBeAg的变化以及外周血、脾脏和肝脏中HBsAg特异性T细胞的数量和肝脏中HBVgDNA的变化。

[0041] 图8:利用本发明所述的Ad-LIHGT-HBsAg活化的脾脏细胞过继转移到5Gy射线照射的HBV1.3转基因小鼠后的治疗效果。

[0042] 图9:根据本发明所述的Ad-LIGHT-HBsAg与抗-PDL1联合治疗在中剂量HBV慢性感染小鼠中诱导的免疫反应及治疗效果。包括血清中HBsAg和HBeAg的变化情况,以及脾脏和肝脏中HBsAg特异性T细胞的数量。

具体实施方式

[0043] 下面的实施例仅用于进一步阐释本发明的内容,而不意欲在任何方面限制本发

明。本领域技术人员将领会,可对下述具体实施方式进行修饰而仍不偏离所附的权利要求所要求保护的本发明的范围、精神和主旨。

[0044] 在下面的所有实施例中,如无特别声明,均采用本领域技术人员惯常所用的方法、仪器、试剂和实验方案等。

[0045] 实施例

[0046] 实施例1:Ad-mLIGHT-HBsAg的制备

[0047] 首先,利用分子克隆方法将s-HBsAg (ayw亚型)(核酸序列见SEQ ID NO:1)和LIGHT分子(核酸序列见SEQ ID NO:2)的核酸序列构建于pShuttle载体(该载体的详细信息可参见He, T.C., et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 2509-2514 (1998)),通过质粒共转染的方式产生病毒(DNA病毒的全长序列见SEQ ID NO:3)。具体操作步骤严格按照Stratagene公司的AdEasy™ XL Adenoviral Vector System进行,现简要描述如下:

[0048] 一目的基因的克隆

[0049] 1.选择适当的酶切位点(EcoRV和NotI),进行酶切连接,将mLIGHT-HBsAg片段插入pshuttle-CMV质粒多克隆位点。

[0050] 2.重组质粒鉴定:酶切鉴定或测序。

[0051] 3.重组质粒扩增,纯化并准备适量含目的基因的穿梭质粒。

[0052] 4.用PmeI单酶切线性化重组穿梭质粒,电泳鉴定质粒完全被切开。

[0053] 5.胶回收线性化质粒,以备共转化使用。

[0054] 二共转化

[0055] 1大肠杆菌BJ5183电转感受态制备

[0056] ①从新鲜琼脂板上挑取单个BJ5183细菌,接种于LB培养基中,37℃振摇过夜。

[0057] ②接种25ml过夜培养物于500ml LB培养基,37℃振摇,至OD600达到0.4。

[0058] ③迅速将培养物置于冰浴中30min,至充分冷却。

[0059] ④将菌液转移至预冷的离心管中,4℃下以2500r/min离心15min,弃培养液,回收细胞。

[0060] ⑤以10ml预冷的10%甘油洗涤沉淀,低温离心,共两次。

[0061] ⑥加约1ml (适量)预冷的10%甘油重悬沉淀,稀释悬液100倍,测量OD600,至稀释浓度为 $2-3 \times 10^{10}$ 个细胞/ml (1.00D600约 2.5×10^{10} 个细胞/ml)。分装,-80℃或液氮保存待用。

[0062] 2病毒骨架质粒转化大肠杆菌,扩增,纯化。

[0063] 3将1-5 μ l (约1 μ g)线性化的穿梭质粒及1 μ l (约100ng/ μ l)病毒骨架质粒pAdEasy-1 (购自Stratagene公司)加入至含约40 μ l BJ5183电转感受态的EP管中混匀,冰上冷却。

[0064] 4将混合物加入电转杯,电击(1250-1500V/mm,5ms)。

[0065] 5电击结束取出样品,加入1ml SOC或LB培养液,37℃低速振荡40min。

[0066] 6取适当体积的电击转化细胞液涂于数个卡那霉素抗性平板(25-50mg/ml),37℃培养16-20hr。

[0067] 7次日挑取平板上长出的菌落(选择最小的菌落),接种于3ml含25-50mg/ml的LB培

培养基, 37°C 培养 10-15hr。

[0068] 8 碱裂法提取质粒, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳筛选, 大质粒为可能阳性克隆, 进一步酶切鉴定。以 PacI 单酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳如显示出一条大片段 (约 30kb), 及一条小片段 (约 3.0 或 4.5kb) (同时可进行其它酶切鉴定), 则基本确定为阳性克隆。

[0069] 9 取 1-5 μ l 阳性质粒转化至 DH5 α 大肠杆菌细胞 (BJ5183 为 recA+, 质粒 DNA 易发生突变, DH5 α 或 JM109, XL1-blue 菌株为重组缺陷性菌株, 可稳定扩增已鉴定的重组质粒), 扩增细菌并纯化质粒。

[0070] 三重组病毒质粒转导 293 细胞

[0071] 1 293 细胞培养: 转导 24 小时前, 以方瓶为例, 接种 2×10^6 293 细胞于 25cm² 方瓶, 使生长密度约 50-70%。(也可以使用 6 孔或 96 孔板)

[0072] 2 以 PacI 单酶切重组病毒质粒 (转导 25cm² 方瓶约需 4 μ g DNA), 完全线性化后, 乙醇沉淀, 再以 20 μ l ddH₂O 溶解。

[0073] 3 脂质体包裹质粒 (以 Lipofectamine 为例): 每 4 μ g PacI 约需 20 μ l Lipofectamine 包裹。质粒及脂质体分别稀释于 500 μ l 无血清培养基再混合, 置于室温下 15-30min。

[0074] 4 以无血清培养基轻轻洗涤培养瓶, 另加 2.5ml 无血清培养基, 37°C 放置 10min。

[0075] 5 将 Lipofectamine-DNA 混合物加入培养瓶, 37°C 孵箱放置 4hr。

[0076] 6 4hr 后, 弃 Lipofectamine-DNA 混合液, 另加入 6ml DMEM 完全培养基 (含 10% FCS)。如有大量细胞漂浮, 可不弃 Lipofectamine-DNA 液, 加入 6ml DMEM 完全培养基, 37°C 孵育过夜, 再换液。

[0077] 7 培养过程中观察细胞生长情况。约 2 周后可观察到细胞病变 (CPE) 出现。

[0078] 四重组病毒鉴定

[0079] 1 转导 10-14d 后, 收集细胞沉淀, 加入 2ml 灭菌的 PBS 混悬, 冻融细胞, 离心后收集上清保存于 -80°C。

[0080] 2 取 30-50% 步骤 1 中上清, 感染 50-70% 饱和度的 25cm² 方瓶中 293 细胞。2-3d 后出现明显细胞病变。

[0081] 3 感染后 3-5d, 当 1/3-1/2 细胞漂浮时收集病毒。按步骤 1 收集细胞并准备病毒上清。通过 Western blot 和/或 PCR 鉴定重组腺病毒产生。

[0082] 4 PCR 鉴定重组病毒。取 5 μ l 病毒上清加入 10 μ l 蛋白酶 K, 55°C 孵育 1hr, 再煮沸 5min, 离心后取 1-2 μ l 作 PCR。

[0083] 用构建成功的重组病毒感染 293cymr 细胞实现病毒的扩增。通过 MOI = 10 的感染剂量, 经过 48 小时的扩增, 收取细胞进行裂解并收取上清, 经过氯化铯的密度梯度离心, 收取成熟的病毒带进行脱盐, 脱盐缓冲液为 A195 (成分为: 10mM Tris-HCL PH7.4, 75mM NaCl, 5% (w/v) 蔗糖, 0.02% (w/v) Polysorbate 80 (Sigma), 1mM MgCL, 100mM EDTA, 0.5% EtOH, 10mM His (L-histidine) (Sigma), 2% 甘油, 经 0.22 微米滤膜过滤后常温保存)。

[0084] Ad-mLIGHT-HBsAg 的扩增方法:

[0085] (1) 使用 DMEM 完全培养基将 293cymr 接种于直径为 10 厘米的细胞培养皿中, 在 37°C, 5% 二氧化碳培养箱中培养。

[0086] (2) 当细胞密度为 70-80% 时, 加入 MOI = 10 的病毒 (以上方法制备的 Ad-mLIGHT-HBsAg) 感染细胞, 培养 36-48 小时并随时观察是否出现细胞质病变效应 (CPE)。

- [0087] (3) 当大部分细胞出现CPE效应时,用刮刀将细胞刮下,连同培养基一起转入50ml离心管,2500rpm离心10分钟后用 1×10^7 /ml培养基重悬细胞冻于 -80°C 。
- [0088] Ad-mLIGHT-HBsAg的纯化方法:
- [0089] 纯化腺病毒使用氯化铯密度梯度离心法,步骤如下:
- [0090] (1) 使用液氮和 37°C 反复冻融细胞悬液3次并充分震荡1分钟,4000rpm离心20分钟,收集上清。
- [0091] (2) 在 4°C 预冷SW28/Beckman转头。
- [0092] (3) 用10ml注射器吸取6ml 1.2g/ml 的CsCl,缓慢加入到超离管中,同样吸取8ml 1.4g/ml 的CsCl,用注射器针头插到超离管的底部,不扰动上层液面,轻轻推入溶液。
- [0093] (4) 将20ml细胞裂解上清沿侧壁缓缓加到液面上(从小于 10^9 被感染细胞中获得)。
- [0094] (5) 用1xTE补平至距离管口5mm,再加入液体石蜡至距管口2mm并配平。
- [0095] (6) SW28转头23000rpm 4°C 离心90分钟,加速度为慢,减速度为0。
- [0096] (7) 小心取出超离管,用10ml注射器从液面上吸走大部分不含病毒层的溶液。可以看到液面中下部,有一条白色条带,即含腺病毒的溶液层。用2ml配备18G针头的注射器刺破超离管腺病毒液面处,细心的吸出该液体层置于15ml离心管中。
- [0097] (8) 用A195缓冲液平衡GE脱盐柱(NP-25)5次,每次5ml。
- [0098] (9) 将病毒粗纯液加入脱盐柱。
- [0099] (10) 加入A195缓冲液洗脱,并分装贮存于 -80°C 。
- [0100] Ad-mLIGHT-HBsAg滴度的测定方法:
- [0101] 针对腺病毒的Hexon进行细胞免疫组化分析可以计算病毒滴度,方法如下:
- [0102] (1) 在12孔板中,每孔接种 5×10^5 个293cymr细胞,加入100u1已稀释好的病毒(从 10^{-6} 到 10^{-8})放入培养箱中培养48小时。
- [0103] (2) 吸去培养基,室温干燥5分钟。
- [0104] (3) 沿管壁轻柔地加入预冷的甲醇, 0.5ml/孔 。将板至于 -20°C ,孵育10分钟。
- [0105] (4) 轻轻吸去甲醇,轻柔地用PBS洗涤,每次每孔 0.5ml ,洗3次。
- [0106] (5) 用PBS稀释一抗,稀释倍数为1:1000。
- [0107] (6) 轻轻吸去孔中洗涤液,每孔加入稀释好的一抗200u1, 37°C 孵育1小时。
- [0108] (7) 轻轻地吸去一抗,用PBS洗三次,每次5分钟。
- [0109] (8) 每孔加入即用型二抗(抗小鼠IgG-HRP)(购自中杉金桥), 37°C 孵育1小时。
- [0110] (9) 轻轻吸去二抗,用PBS洗三次,每次5分钟。
- [0111] (10) 每孔加入已稀释好的DAB显色液,室温放置5分钟。
- [0112] (11) 吸去DAB溶液,每孔加入PBS溶液。在显微镜下观察。
- [0113] (12) 计算每孔感染单位(ifu/ml) = (平均阳性细胞数/视野) \times (视野数/孔) / (病毒体积 \times 稀释倍数)
- [0114] 实施例2:Ad-mLIGHT-HBsAg在野生型小鼠中的免疫反应
- [0115] C57BL6/J小鼠(雄性,6-8周,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)接受了 $1 \times 10^9\text{pfu}$ 的Ad-LIGHT-HBsAg以及对照疫苗的皮下免疫(用PBS将滴度调整为 $1 \times 10^{10}\text{pfu/ml}$,注射体积为100u1)。在免疫后的第8天,通过流式细胞仪检测了外周血中H2-KbENV190阳性的CD8+T 细胞比例(图1A-B),在免疫后的第14天,肝脏中的淋巴细胞被分离出来并用

ENV190和OT1刺激48小时,通过Elispot的方法检测了分泌IFN γ 的抗原特异性CD8⁺T细胞数量(图1D-E)。通过与其他疫苗免疫的比较可以看出,Ad-LIGHT-HBsAg在淋巴结、脾脏和肝脏均有效的诱导了HBsAg特异性免疫反应(图1C)。

[0116] 实施例3:Ad-mLIGHT-HBsAg在HBV慢性感染小鼠中的免疫反应及治疗效果

[0117] AAV/HBV1.3感染C57BL6/J小鼠建立慢性HBV感染模型的方法:

[0118] 将AAV/HBV1.3病毒(购买自北京五加和分子医学研究有限公司)按一定比例稀释于0.9%NaCl的生理盐水中,每次尾静脉注射的总体积为200 μ l。成年鼠(6-8周龄,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)使用尾静脉注射的方法进行感染。在感染四周后按照实施例2所述的方法对HBV慢性感染小鼠进行了Ad-mLIGHT-HBsAg的免疫以及对照疫苗的免疫(Engerix-B,葛兰素史克公司,2 μ g/鼠,皮下免疫,体积为100 μ l)。通过Elisa的方法检测了血清中HBeAg的变化(图2A-B)。在免疫后的第32天,通过Elispot的方法检测了小鼠肝脏中抗原特异性T细胞分泌IFN γ 的水平(图2C),并检测了肝脏中HBV DNA的拷贝数(图2D)。

[0119] 实施例4:HBsAg中和性抗体与Ad-mLIGHT-HBsAg在HBV慢性感染小鼠中的联合治疗效果

[0120] 首先,按照实施例3所述方法建立HBV慢性感染的小鼠模型。在感染四周后,开始为模型小鼠注射HBsAg的中和性抗体(H25B10,小鼠杂交瘤细胞产生,小鼠IgG1,2mg/鼠,注射体积为500-1000 μ l,每周2次,共4周),之后按照实施例2所述的方法免疫Ad-mLIGHT-HBsAg。在免疫后的第8天用2的方法检测了外周血中HBsAg特异性的T细胞数量(图3B),并通过Elisa的方法检测了血清中HBsAg和HBeAg的变化(图3A),在治疗后的第49天,通过免疫组化的方法检测了肝脏中HBcAg的表达情况。

[0121] 实施例5:HBsAg/CpG与Ad-mLIGHT-HBsAg的续贯免疫能够增强HBsAg特异性免疫反应

[0122] HBsAg/CpG的制备及免疫:

[0123] 用PBS将CpG粉末(CpG1826,由生工生物公司合成,序列为TCCATGACGTTCCCTGACGTT)溶解至500 μ g/ml的浓度,取100 μ l与5 μ g重组HBsAg进行充分混合后进行皮下免疫(免疫方法及所用动物与实施例2所述一致)。在免疫后第21天,按照实施例2所述方法进行Ad-mLIGHT-HBsAg的免疫。在二次免疫后的第7天,用流式的方法检测了外周血中HBsAg特异性T细胞的比例(图4A)。在二次免疫后的第21天,用流式的方法检测了脾脏和肝脏中HBsAg特异性T细胞的比例(图4B),用Elisa的方法检测了血清中anti-HBsAg的滴度(图4C)。

[0124] 实施例6:HBsAg/CpG与Ad-mLIHGT-HBsAg续贯免疫诱导的免疫反应依赖于LIGHT-LTBR信号通路

[0125] 首先,对野生型C57BL6/J小鼠(6-8周龄,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司),LTBR敲除小鼠以及HVEM敲除小鼠(以上2种敲除小鼠由本实验室保种)按照实施例5所述的方法进行续贯免疫。在二次免疫后的第7天检测了外周血中HBsAg特异性T细胞的比例(图5A,B),在二次免疫后的第21天检测了脾脏和肝脏中HBsAg特异性T细胞的比例(图5A,B)以及分泌IFN γ 的T细胞数量(图5D,E)。同时检测了二次免疫后第14和21天血清中抗-HBsAg的水平(图5C)。其次,在对野生型C57BL6/J小鼠(6-8周龄,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)按照实施例5所述的方法进行续贯免疫的同时用anti-LTBR抗体(免

疫的第0,7,14天腹腔免疫三次,每次100ug/鼠)来阻断LIGHT-LTBR信号通路,在二次免疫后的第7天检测了外周血中HBsAg特异性的T细胞比例(图5F,G)以及血清中抗-HBsAg的水平(图5H)。

[0126] 实施例7:HBsAg/CpG与Ad-mLIGHT-HBsAg的续贯免疫活化的脾脏细胞在Rag-/-HBV慢性感染小鼠中的治疗作用

[0127] 首先,对野生型C57BL6/J小鼠(雄性,6-8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)按照实施例5所述的方法进行续贯免疫。在Ad-mLIGHT-HBsAg免疫后的第14天处死小鼠,分离脾脏细胞过继转移给AAV/HBV1.3感染的Rag-/-小鼠(5*10⁷脾脏细胞通过尾静脉注射的方式进行过继转移,体积为200-300ul)。过继转移后通过Elisa的方法检测了血清中HBsAg和HBeAg的变化情况(图6A)。在过继转移后的第7天检测了外周血中HBsAg特异性的CD8+T细胞比例(图6B)。在过继转移后第28天检测了脾脏和肝脏中分泌IFN γ 的CD8+T细胞数量(图6C)。

[0128] 实施例8:HBsAg/CpG与Ad-mLIGHT-HBsAg的续贯免疫活化的脾脏细胞在经射线照射的HBV慢性感染小鼠中的治疗作用

[0129] 首先,对野生型C57BL6/J小鼠(雄性,6-8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)按照实施例5所述的方法进行续贯免疫。在Ad-mLIGHT-HBsAg免疫后的第14天处死小鼠,分离脾脏细胞。与此同时,对AAV/HBV1.3感染的小鼠(按照实施例3所述操作进行)进行射线照射(小鼠在北京大学化学学院洁源室进行5Gy剂量的全身射线照射)。并将分离到的脾脏细胞按实施例6所述方法进行过继转移。在过继转移后的不同时间点通过Elisa的方法检测了血清中HBsAg、HBeAg、anti-HBsAg的变化情况(图7A)。在过继转移后的第7天通过流式的方法检测了外周血中HBsAg特异性的T细胞比例(图7B)。在过继转移后的第28天,通过Elispot的方法检测了脾脏和肝脏中分泌IFN γ 的细胞数量(图7C)并通过real-timePCR的方法检测了肝脏中HBVDNA的拷贝数(图7D)以及HBcAg的表达情况(图7E)。

[0130] 实施例9:HBsAg/CpG与Ad-mLIGHT-HBsAg的续贯免疫活化的脾脏细胞在经射线照射的HBV1.3转基因小鼠中的治疗作用

[0131] 首先,对野生型C57BL6/J小鼠(雄性,6-8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)按照实施例5所述的方法进行续贯免疫。在Ad-mLIGHT-HBsAg免疫后的第14天处死小鼠,分离脾脏细胞。与此同时,对HBV1.3转基因小鼠(由解放军458医院刘光泽教授惠赠)进行射线照射(小鼠在北京大学化学学院洁源室进行5Gy剂量的全身射线照射)。并将分离到的脾脏细胞按实施例6所述方法进行过继转移。在过继转移后的不同时间点通过Elisa的方法检测了血清中HBsAg、anti-HBsAg的变化情况(图8)。

[0132] 实施例10:HBsAg/CpG与Ad-mLIGHT-HBsAg的续贯免疫联合PDL1的阻断在HBV慢性感染小鼠中的治疗作用

[0133] 首先,按照实施例3所述方法建立HBV慢性感染的小鼠模型。在感染四周后,开始对HBV慢性感染小鼠注射PDL1阻断抗体(抗-PDL1,clone:10F.9G2,100ug/鼠/次,每5天一次,直到Ad-LIGHT-HBsAg免疫后的第7天为止),与此同时按照实施例5所述的方法对同批小鼠进行续贯免疫。通过Elisa的方法检测血清中HBsAg和HBeAg的变化情况(图9A-B),在二次免疫后的第28天,通过Elispot的方法检测脾脏和肝脏中分泌IFN γ 的HBsAg特异性CD8+T细胞的数量(图9C-D)。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 腺病毒疫苗Ad-LIGHT-HBsAg及其用于治疗慢性乙肝的用途

<130> IB168024

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 682

<212> DNA

<213> 乙肝病毒

<400> 1

```

atcaaatgta tacccaaaga caaaagaaaa ttggtaacag cggtaaaaag ggactcaaga 60
tgctgtacag acttggeccc caataccaca tcatecatat aactgaaagc caaacagtgg 120
gggaaagccc tacgaaccac tgaacaaatg gcactagtaa actgagccag gagaaacggg 180
ctgaggccca ctcccatagg aatthttccga aagcccagga tgatgggatg ggaatacagg 240
tgcaatttcc gtccgaaggt ttggtacagc aacaggaggg atacatagag gttccttgag 300
cagtagtcat gcaggctcgg catggtcccg tgctggttgt tgaggatcct ggaattagag 360
gacaaacggg caacatacct tgatagtcca gaagaaccaa caagaagatg aggcatagca 420
gcaggatgaa gaggaagatg ataaaacgcc gcagacacat ccagcgataa ccaggacaag 480
ttggaggaca agaggttggg gagtgattgg aggttgggga ctgcgaattt tggccaagac 540
acacggtagt tccccctaga aaattgagag aagtccacca cgagtctaga ctctgcggta 600
ttgtgaggat tcttgtcaac aagaaaaacc ccgcctgtaa cacgagaagg ggtcctagga 660
atcctgatgt gatatctatc at 682

```

<210> 2

<211> 725

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```

gcggccgctc atcacacat gaaggegcgc aagtagctcc tgggtccgctc cctgggcctc 60
accagcctgt tgccgggcac cctcaccacc acctctctgc cggcctccag gtgcaccacg 120
ccgccagga agctgtgttc ccaccacaet cggtctctgt tggeectgcc acaggggctc 180
cgcttgagga ccagcagctc cagctctctg gggatatctg tggctctctt gtacaggccg 240
tgggtgatgg gcaggccgtt ggccaggccc tgagggcagc cactccgga cagctgcacc 300
ttctgtaca cgtagtagta gccgggctcc atggtcacca gggcgcgctc gtggtaggtc 360
aggcccctca ggaaagccag gccagcctg gtctcccaca gcaggggctc gccgatgccg 420
atcaggctgg cgttggcgcc tgtcaggtgg gcggcagggt tggcctggtg gctcctctgg 480
tctgccagc tgcccttgcc gccatcgggc aggtgggcca cgatgtctcc cagcctctgg 540
tgcagcctca gcagaaacca gccctgggtg gccaggccag cggccagcag cagcaccagg 600

```

gccagggaca cctgcacggt gccacatctc ctccgcctgt ggttctgctc cagcctcctg 660
 aaggggatgt cggctctggcc gtccaccacg aacacgctgg gctgcaccac gctctccatg 720
 gtggc 725
 <210> 3
 <211> 10164
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 taacatcate aataatatac cttatnttgg attgaagcca atatgataat gagggggtgg 60
 agtttgtgac gtggcgcggg gcgtgggaac ggggcgggtg acgtagtagt gtggcggaag 120
 tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180
 ttggtgtgcg ccggtgtaca caggaagtga caatnttgcg gcggtnttag gcggatgttg 240
 tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccatntt cgcgggaaaa ctgaataaga 300
 ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatactgtc gagtctagge 360
 tcaagcagtg atccttatcg atnttaccac atntttagag gntnttacttg ctttaaaaaa 420
 cctcccacat ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaatnttgg ttgttaactt 480
 gnttatgtca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcaciaaata 540
 agcattnttt tcaactgcatt ctagtnttgg tntgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca 600
 tgtctgctcg aagcggccct agaggtacca cgcgtgaatt ctcgaggcta gagctntgctg 660
 aaatattgat atcatcaaat gtatacccaa agacaaaaga aaatntgtaa cagcggtaaa 720
 aagggactca agatgctgta cagactntggc cccaatacc acatcatcca tataactgaa 780
 agccaaacag tgggggaaag ccctacgaac cactgaacia atggcactag taaactgagc 840
 caggagaaac gggctgagge ccactcccat aggaatnttc cgaaagccca ggatgatggg 900
 atgggaatac aggtgcaatt tccgtccgaa gntnttgtag agcaacagga gggatacata 960
 gagnttccct gagcagtagt catgcaggtc cggcatngtc cctgctnggt gntntgagat 1020
 cctggaatta gaggaciaac gggcaicata cntntgatag ccagaagaac caaciaagaag 1080
 atgaggcata gcagcagat gaagaggaag atgataaaac gccgcagaca catccagcga 1140
 taaccaggac aagnttgagg acaagagntt gntgagtagt tggagnttgg gactgcgaa 1200
 tnttgccaa gacacacggt agntccccct agaaaatntga gagaagntcca ccacagntct 1260
 agactctgcg gtatnttgtag gantnttntc aaciaagaaaa accccgctg taacacgaga 1320
 aggggtccta ggaatcctga tntgatntct atcactgntt tnttcaaagg aaaaccacgt 1380
 cccctngntt cggggggcct agacgntntt ttaacctega ctaaacacat gtaaagcatg 1440
 tgcaccgagg cccagatca gatccatac aatngngtag cttctnggca tccntcagcc 1500
 cctnttgtaa tacgnttgag gagagccatt tgactntntc caiaactatc caactcaiaa 1560
 cgtngcactg gngntntgccc gcntntgca gntgatntta tacacngtggc tnttgcccgc 1620
 agaggcact gntgccaggt gggggnttcc gntgctgca aagngtctct acagacngttg 1680
 tntgntntca agaagnttcc agaggaactg cttcctntca gacntntcaac agacntntgca 1740
 tntcctntggc gagaggggaa agaccctag gaatgctctg caagaagaca gggccagntt 1800
 tccnggccc cactntntgca aaagacngca atatngntga aaataacata tagaciaaac 1860

cacaccggcc ttattccaag cggttcggc cagtaacgtt aggggggggg gagggagagg 1920
ggcggaaattg gcagatcttt atcaattatt caggcgtagc accaggcgtt taagggcacc 1980
aataactgcc ttgcggccgc tcatcacacc atgaaggcgc cgaagtagct cctggtgccg 2040
tccttgggcc tcaccagcct gttgccgggc accctcacca ccacctctc gccggcctcc 2100
aggtgcacca cgccgccag gaagctgctg tcccaccaca ctcggctgct gttggcctg 2160
ccacaggggc tccgctgga gaccagcagc tccagctcct tggggtatct gctggtcctc 2220
ttgtacaggc cgtgggtgat gggcaggccg ttggccaggc cctgagggca gccactccg 2280
gacagctgca cttgctgta cacgtagtag tagccgggct ccatggtcac cagggcgccg 2340
tcgtggtagg tcaggccct caggaaagcc agggccagcc tggctctcca cagcaggggt 2400
ccgccgatgc cgatcaggct ggcgttggcg cctgtcaggt gggcggcagg gttggcctgg 2460
tggtcctct ggtcctgcca gctgccctg ccgccatcgg gcaggtgggc cacgatgtcg 2520
cccagcctct ggtgcagcct cagcagaaac cagcctggg tggccaggcc agcggccagc 2580
agcagcacca gggccaggga cacctgcacg gtgccacatc tcctccgct gtggttctgc 2640
tccagcctcc tgaaggggat gtcggtctgg ccgtccacca cgaacacgct gggctgcacc 2700
acgtctcca tgggtggcgc gccgcagatc ttcgactcga agatcaaact tggacctggg 2760
agtggacacc tgtggagaga aaggcaaagt ggatgtcatt gtcactcaag tgtatggcca 2820
gatcgggcca ggtgaatata aaatcctct cgtttttgga aactgacaat cttagcgcag 2880
aagtaatgcc cgcttttgag agggagtact cacccaaca gctggatctc aagcctgcca 2940
cacctcact cgaccatccg ccgtctcaag accgcctact ttaattacat catcagcagc 3000
acctccgcca gaaacaacc cgaccgccac ccgtgcccgc ccgccacggt gctcagccta 3060
ccttgcgact gtgactggtt agacgccttt ctgagaggt tttccgatcc ggtcgatgcg 3120
gactcgtca ggtccctcgg tggcggagta ccgttcggag gccgacgggt ttcgatcca 3180
agagtactgg aaagaccgcg aagagtttgt cctcaaccgc gagccaaca gctggcctc 3240
gcagacagcg atgcggaaga gactgaccgc ggaggctgga tcggtcccgg tgtcttctat 3300
ggaggtcaaa acagcgtgga tggcgtctcc aggcgatatg aggcgcgccc gtttactaa 3360
acaccgtaa caaacagaca atctggtctg tttgattata ccggttgctt atataggcct 3420
cccaccgtac acgcctacct cgaccggca agcttgccca tttgcgtcaa cggggcgggg 3480
gtattacgac attttgaaa gtcccgttga ttttggtgcc aaaacaaact ccattgacg 3540
tcaatggggt ggagacttgg aaatcccgt gagtcaaacc gctatccacg ccattggtg 3600
tactgcaaaa accgcatcac catggtata gcgatgacta atacgtagat gtactgcaaa 3660
gtaggaaagt cccgtaaggt catgtactgg gcataatgcc aggcgggcca tttaccgtca 3720
ttgacgtcaa tagggggcgg acttggcata tgatacactt gatgtactgc caagtgggca 3780
gtttaccgta tatactccat ccattgacgt caatggaaag tcctattgg cgttactatg 3840
ggaacatacg tcattattga cgtcaatggg cgggggtcgt tgggcggtea gccaggggg 3900
ccatttaccg taagtattgt aacgaagctt ctgaggtcg agatcgatct gggcgtggtt 3960
aaggtgggga aagaatata aaggtggggg tcttatgtag tttgtatct gttttgcagc 4020
agccgccgcc gccatgagca ccaactcgtt tgatggaagc attgtgagct catatttgac 4080
aacgcgatg ccccatggg ccggggtgcg tcagaatgtg atgggctcca gcattgatgg 4140
tcgccccgtc ctgccccgaa actctactac cttgacctac gagaccgtgt ctggaacgcc 4200

gttggagact gcagcctccg ccgccgcttc agccgctgca gccaccgccc gcgggattgt 4260
 gactgacttt gctttcctga gcccgcttgc aagcagtgca gttcccgtt catccgcccc 4320
 cgatgacaag ttgacggctc ttttggcaca attggattct ttgaccggg aacttaatgt 4380
 cgtttctcag cagctgttgg atctgcgcca gcaggtttct gccctgaagg cttcctcccc 4440
 tcccaatgcg gtttaaaaca taaataaaaa accagactct gtttggattt ggatcaagca 4500
 agtgtcttgc tgtctttatt taggggtttt gcgcgcgcgg taggccccgg accagcggtc 4560
 tcggctcgtt agggctcctgt gtatTTTTT caggacgtgg taaaggtagac tctggatgtt 4620
 cagatacatg ggcataagcc cgtctctggg gtggaggtag caccactgca gagcttcatg 4680
 ctgcgggggtg gtgtttaga tgatccagtc gtagcaggag cgctgggctt ggtgcctaaa 4740
 aatgtcttcc agtagcaagc tgattgccag gggcaggccc ttggtgtaag tgtttacaaa 4800
 gcggttaagc tgggatgggt gcatacgtgg ggatatgaga tgcattctgg actgtatTTT 4860
 taggttggct atgttcccag ccatacctt ccggggattc atgttTgtgca gaaccaccag 4920
 cacagtgtat ccggtgcaact tgggaaattt gtcatgtagc ttagaaggaa atgcgtggaa 4980
 gaacttggag acgcccttgt gacctcaag attttccatg cattcgtcca taatgatggc 5040
 aatgggcccc cgggcggcgg cctgggcgaa gatatttctg ggatacctaa cgtcatagtt 5100
 gtgttccagg atgagatcgt cataggccat ttttacaag cgcgggcgga gggTgccaga 5160
 ctgcgggata atggttccat ccggcccagg ggcgtagtta cctcacaaga tttgcatttc 5220
 ccacgcttTg agttcagatg gggggatcat gtctacctgc ggggcgatga agaaaacggt 5280
 ttccggggta ggggagatca gctgggaaga aagcaggttc ctgagcagct gcgacttacc 5340
 gcagccggtg ggcccgtaaa tcacacctat taccgggtgc aactggtagt taagagagct 5400
 gcagctgccg tcatccctga gcaggggggc cacttcgtta agcatgtccc tgactcgcatt 5460
 gttttccctg accaaatccg ccagaaggcg ctccgccccc agcgatagca gttcttTgcaa 5520
 ggaagcaaaag tttttcaacg gttttagacc gtccgccgta ggcatgcttt tgagcgtttg 5580
 accaagcagt tccaggcggT cccacagctc ggtcacctgc tctacggcat ctcgatccag 5640
 catatctcct cgtttcgctg gttggggcgg ctttcgctgt acggcagtag tcgggtgctcg 5700
 tccagacggg ccagggtcat gtctttccac gggcgcaggg tcctcgtcag cgtagtctgg 5760
 gtcacggTga aggggtgcgc tccgggctgc gcgctggcca gggTgcgctt gaggctggtc 5820
 ctgctggTgc tgaagcgtg ccggtcttcg ccctgcgctg cggccaggta gcatttgacc 5880
 atggTgtcat agtccagccc ctccgcgcgT tggccctTgg cgcgcagctt gcccttggag 5940
 gaggcgccgc acgaggggca gtgcagactt ttgagggcgt agagcttggg cgcgagaaat 6000
 accgattccg gggagtaggc atccgcgcgT caggccccgc agacggtctc gcattccacg 6060
 agccaggTga gctctggccc ttcggggTca aaaaccaggt tcccccatg ctttttTgatg 6120
 cgtttcttac ctctggtttc catgagccgg tgtccacgct cggTgacgaa aaggctgtcc 6180
 gtgtccccgt atacagactt gagagggagT ttaaaccgaa tcaatagctt gttgcatggg 6240
 cggcgatata aaatgcaagg tgetgctcaa aaaatcaggc aaagcctcgc gcaaaaaaga 6300
 aagcacatcg tagtcatget catgcagata aaggcaggta agctccgaa ccaccacaga 6360
 aaaagacacc atttttctct caaacatgtc tgcgggttTc tgcataaaca caaaataaaa 6420
 taacaaaaaa acatttaaac attagaagcc tgtettTcaa caggaaaaac aacccttata 6480
 agcataagac ggactacggc catgccggcg tgaccgTaaa aaaactggtc accgtgatta 6540

aaaagcacca ccgacagctc ctcggtcatg tccggagtca taatgtaaga ctcggtaaac 6600
 acatcaggtt gattcatcgg tcagtgctaa aaagcgaccg aatagccccg ggggaataca 6660
 taccgcaggg cgtagagaca acattacagc ccccatagga ggtataacaa aattaatagg 6720
 agagaaaaac acataaacac ctgaaaaacc ctctgccta ggcaaaatag caccctcccc 6780
 ctccagaaca acatacagcg cttcacagcg gcagcctaac agtcagcctt accagtaaaa 6840
 aagaaaacct attaaaaaaa caccactcga cacggcacca gctcaatcag tcacagtgtg 6900
 aaaaagggcc aagtgcagag cgagtatata taggactaaa aatgacgta acggttaaag 6960
 tccacaaaaa acaccagaa aaccgcacgc gaacctacgc ccagaaacga aagccaaaaa 7020
 acccacaact tectcaaate gteacttecg ttttcccacg ttacgtaact tcccatttta 7080
 agaaaaactac aattccaac acatacaagt tactccgccc taaaacctac gtcaccgcgc 7140
 ccgttcccac gccccgcgc acgtcaaaa ctccacccc tcattatcat attggcttca 7200
 atccaaaata aggtatatta ttgatgatgt taattaacat gcatggatcc atatgcgggtg 7260
 tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgctctt ccgcttctc 7320
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 7380
 ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 7440
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 7500
 ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaaccgcac 7560
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagetcc ctctgcgct ctctgttcc 7620
 gacctgccg cttaccgat acctgtccgc ttttctcct tcgggaagcg tggcgctttc 7680
 tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg 7740
 tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga 7800
 gtccaaccg gtaagacacg acttatgcc actggcagca gccactggta acaggattag 7860
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta 7920
 cactagaagg acagtattg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcgaaaaag 7980
 agttggtagc tctgatccg gcaaaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg 8040
 caagcagcag attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tctttctac 8100
 ggggtctgac gtcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc 8160
 aaaaaggatc ttacctaga tcttttaaa ttaaaatga agttttaaat caatctaaag 8220
 tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 8280
 agcgatctgt ctatttcggt catecatagt tgctgactc cccgtcgtgt agataactac 8340
 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc 8400
 accggtcca gatttatcag caataacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 8460
 tctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 8520
 tagttcga gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcagcca tgagattatc 8580
 aaaaaggatc ttacctaga tcttttccac gtagaaagcc agtccgcaga aacggtgctg 8640
 accccgatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg gaaaacgca gcgcaaagag 8700
 aaagcaggta gcttgcagtg ggcttcatg gcgatagcta gactgggcgg ttttatggac 8760
 agcaagcga cgggaattgc cagctggggc gccctctggt aaggttggga agccctgcaa 8820
 agtaaacctg atggctttct cgccgccaag gatctgatgg cgcaggggat caagctctga 8880

tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 8940
tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 9000
ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac 9060
cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 9120
cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg 9180
gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgcca 9240
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 9300
cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg 9360
tcttgcgat caggatgate tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactggt 9420
cgccaggctc aaggcgagca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc 9480
ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 9540
gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 9600
gcttggcggc gaatgggetg accgettctc cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatc 9660
gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgaattttgt taaaatcttt 9720
gttaaatcag ctcatctttt aaccaatagg ccgaaatcgg caacatccct tataaatcaa 9780
aagaatagac cgcgataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccaactattaa 9840
agaacgtgga ctccaacgac aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac 9900
gtgaaccatc acccaaatca agttttttgc ggtcgaggtg ccgtaaagct ctaaatecga 9960
accctaaagg gagccccga tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa 10020
aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcgggcg ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc 10080
tgcgcgtaac caccacacce gcgcgcttaa tgcgcgctta cagggcgcgt ccattcgcca 10140
ttcaggatcg aattaattct taat 10164

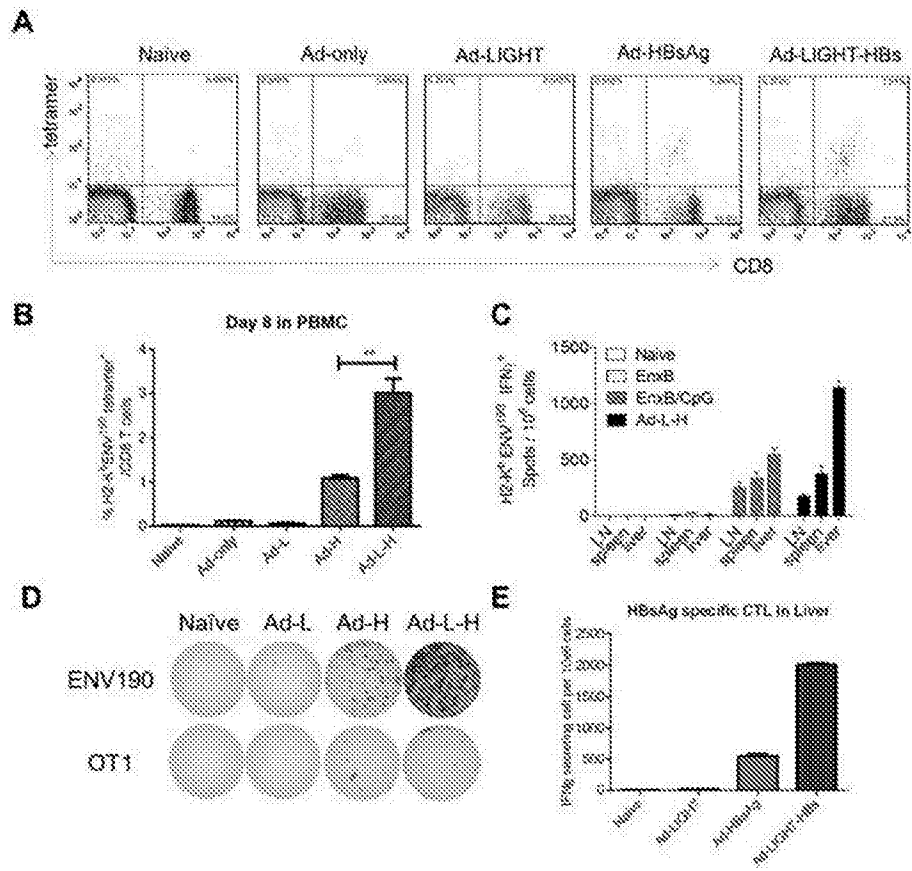


图1

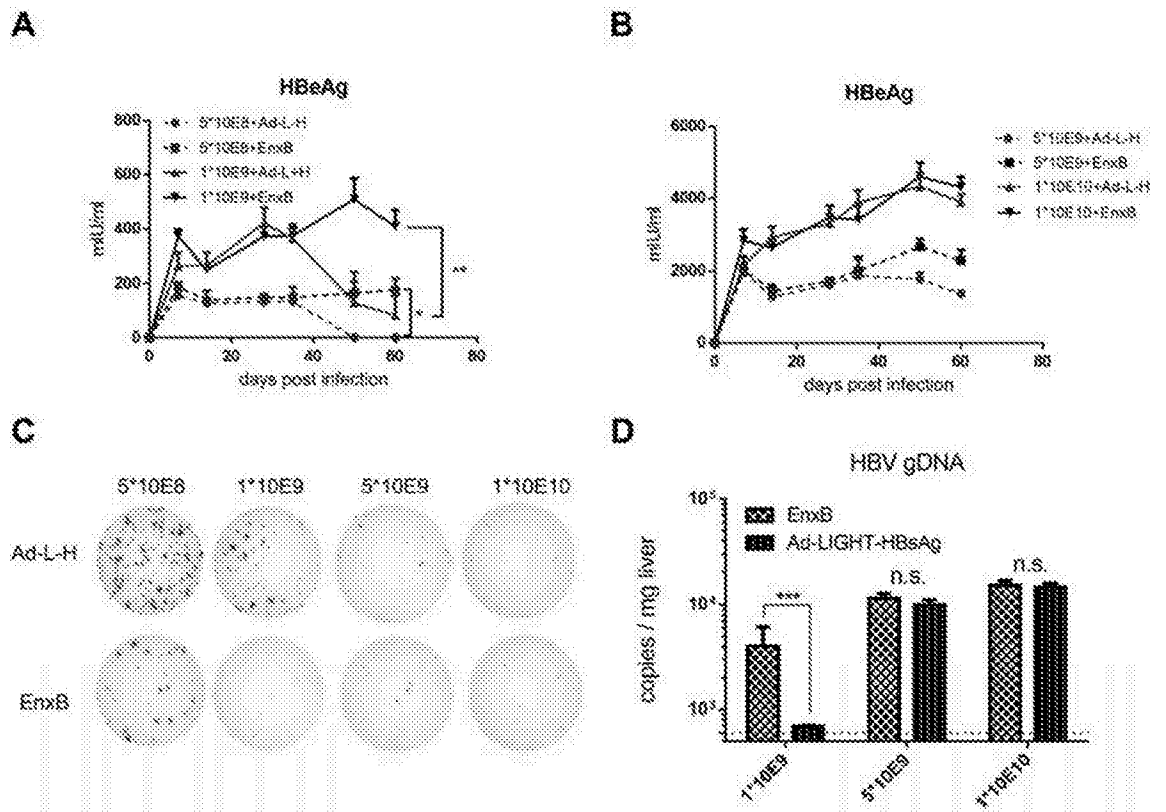


图2

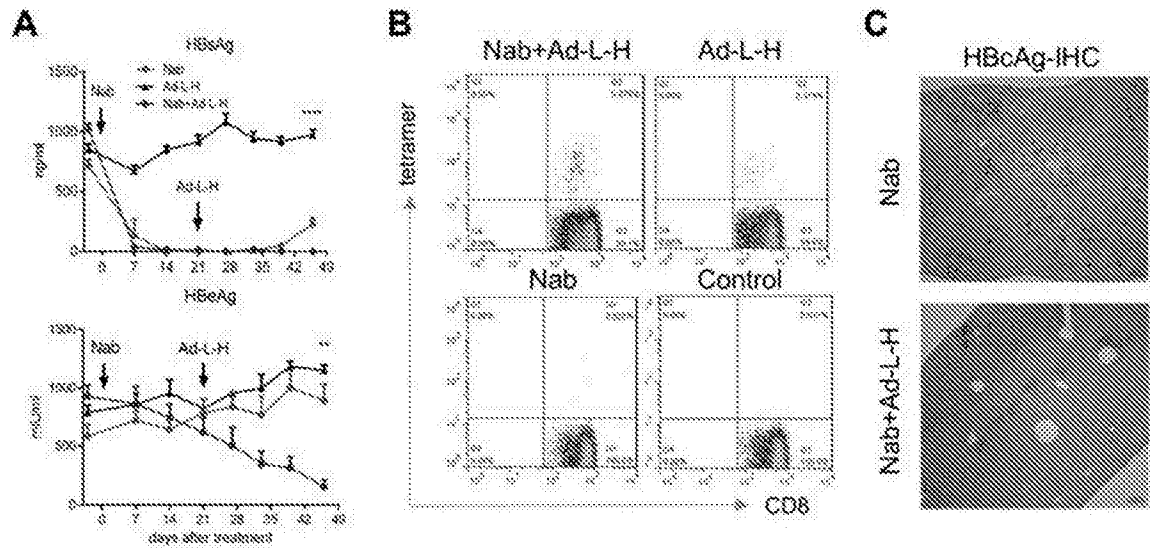


图3

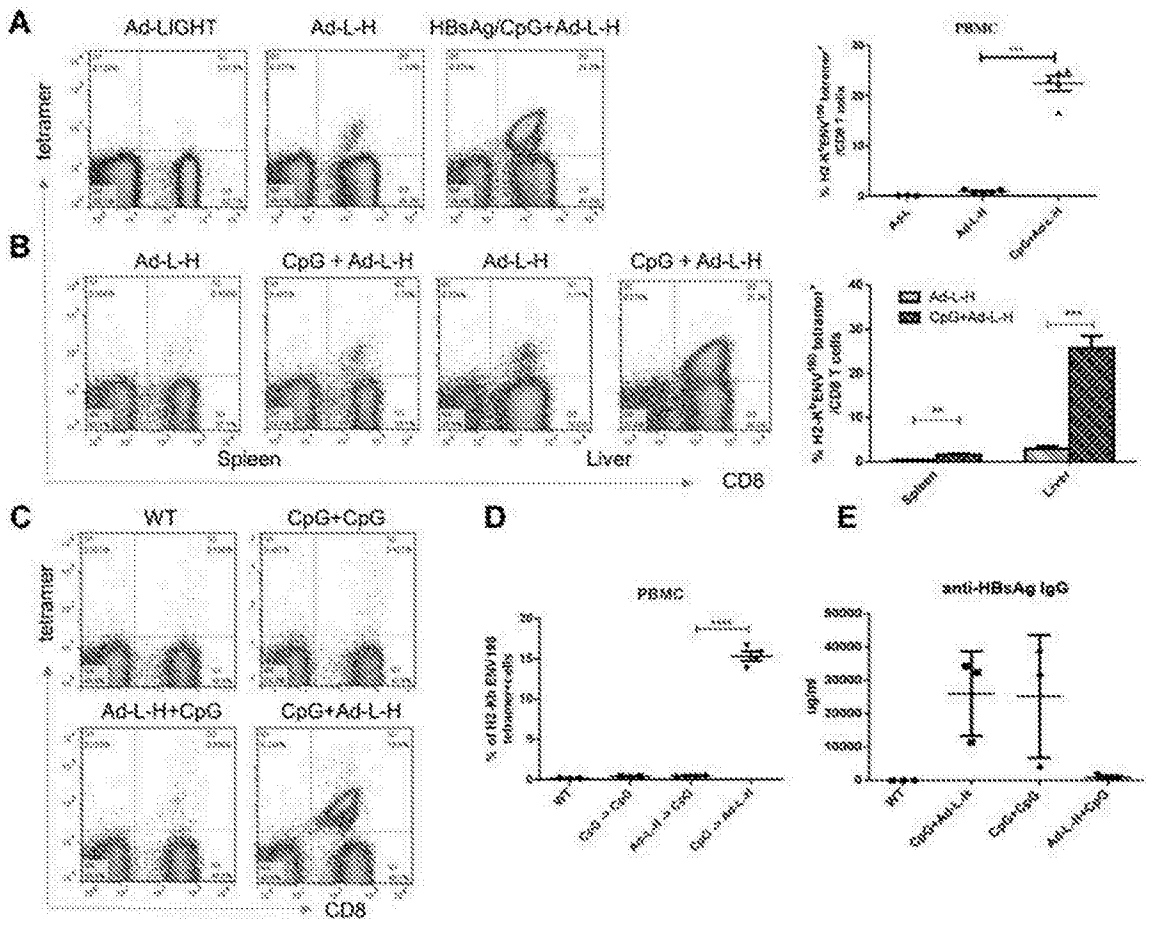


图4

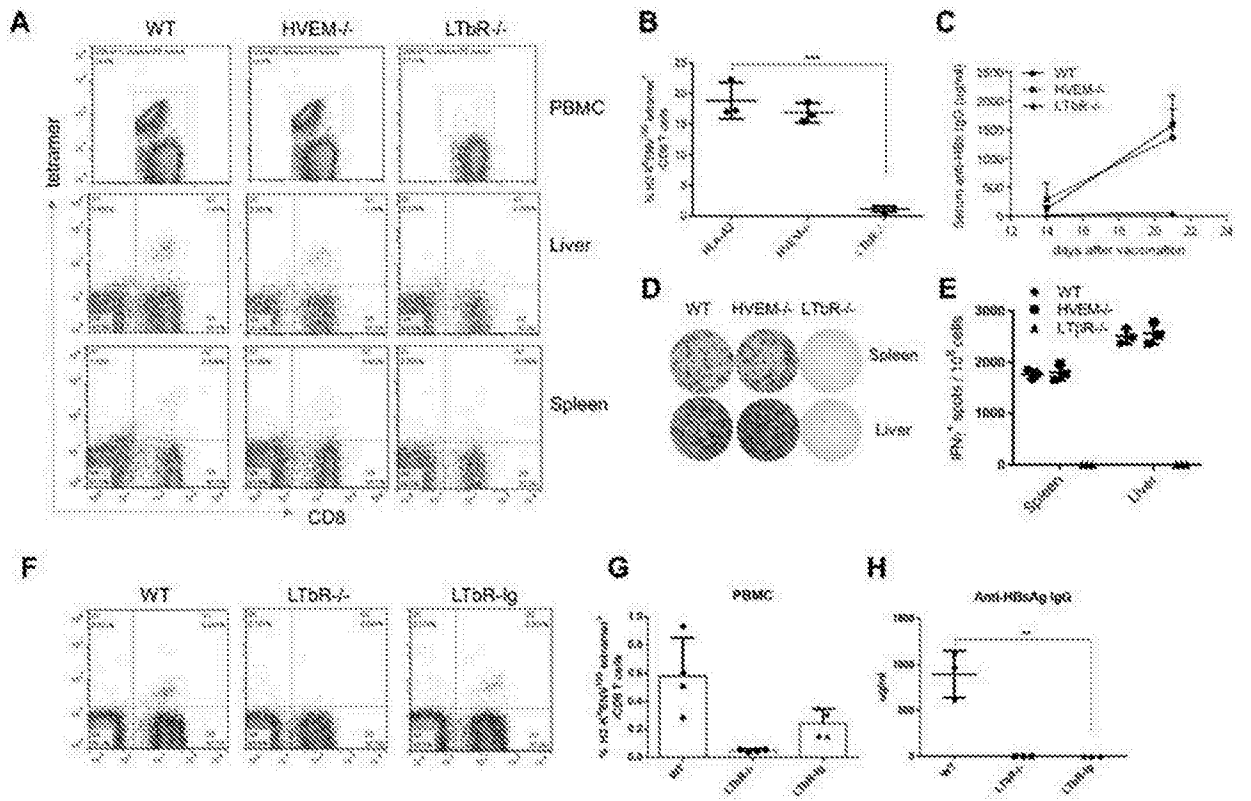


图5

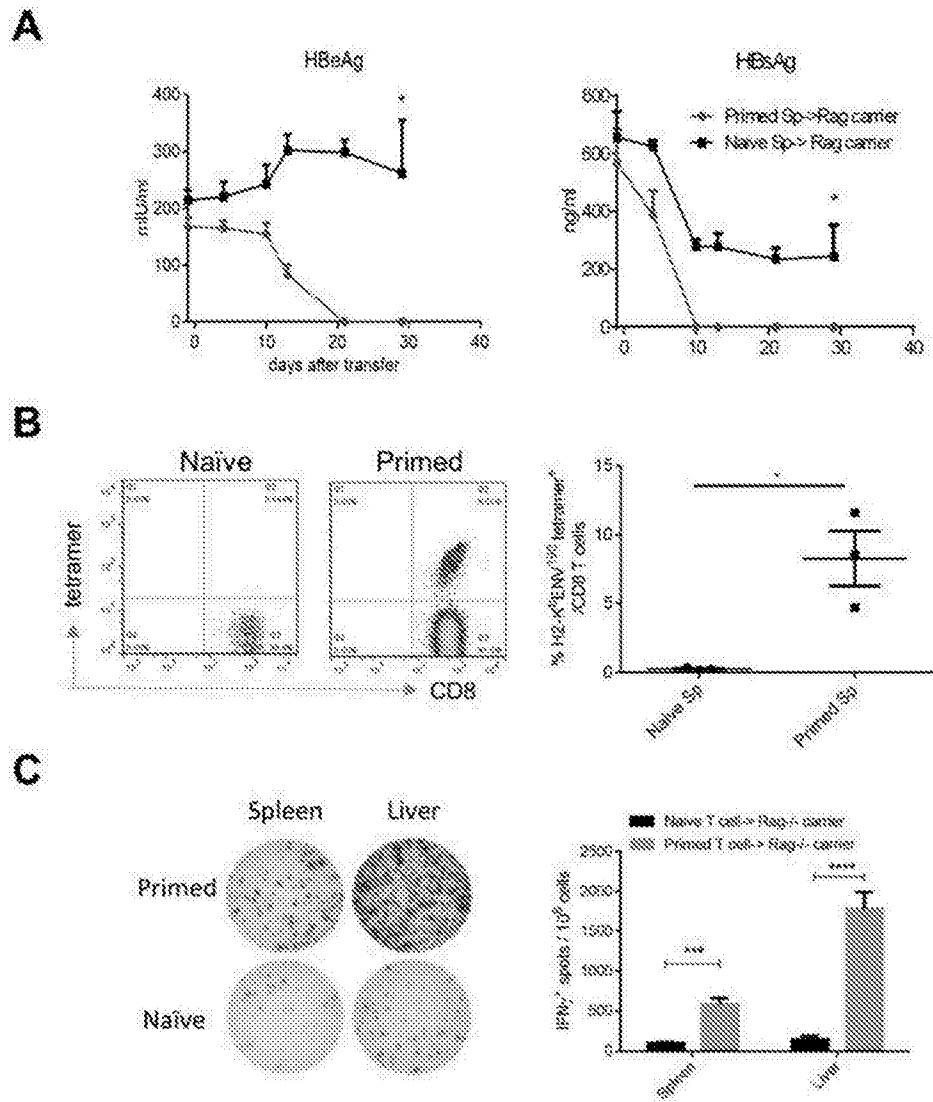


图6

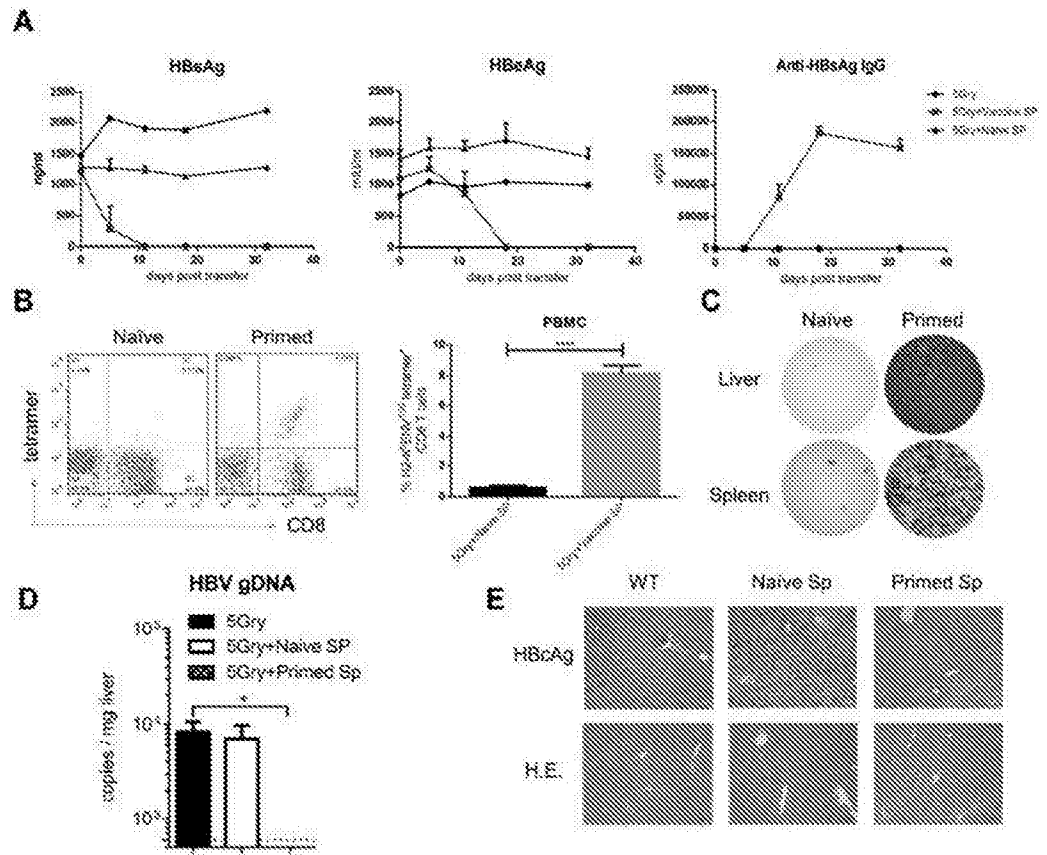


图7

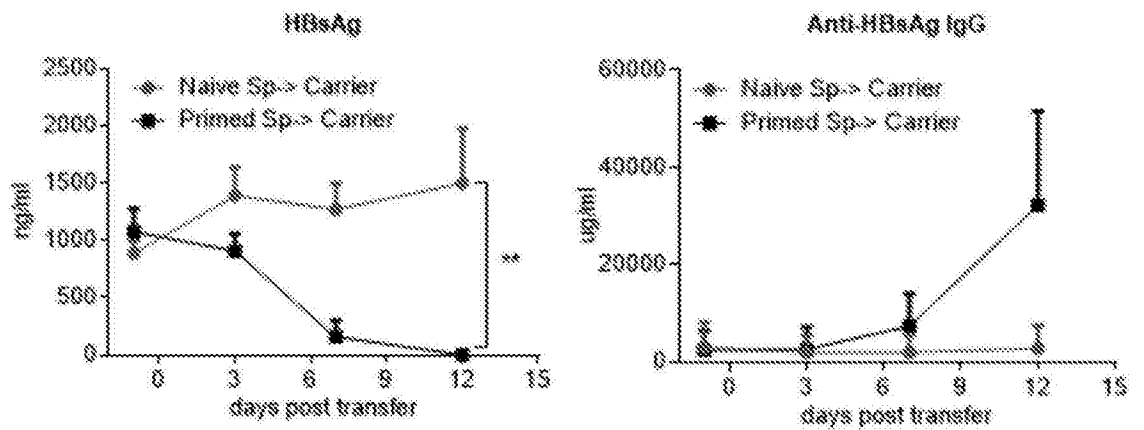


图8

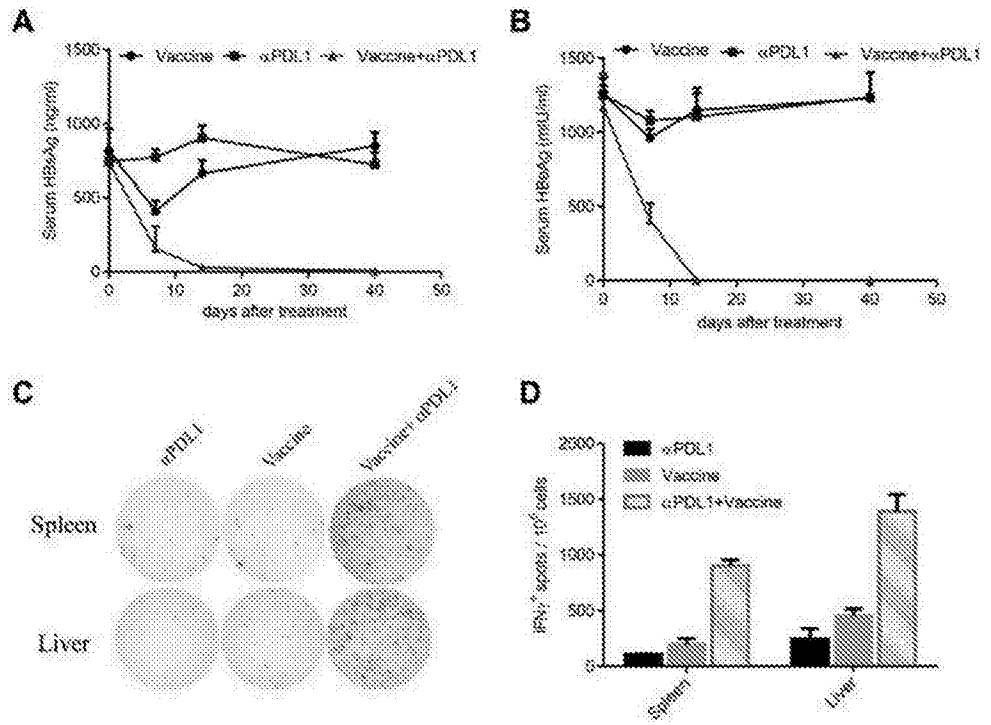


图9