



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103298486 B

(45)授权公告日 2016.10.05

(21)申请号 201080023595.2

J·K·米德玛 J·L·G·瑟斯

(22)申请日 2010.05.26

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(65)同一申请的已公布的文献号

利商标事务所 11038

申请公布号 CN 103298486 A

代理人 罗菊华

(43)申请公布日 2013.09.11

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61K 39/12(2006.01)

09161368.7 2009.05.28 EP

A61K 39/145(2006.01)

61/181,835 2009.05.28 US

C07K 14/11(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(56)对比文件

2011.11.28

和晶亮.DNA疫苗的相关研究进展.《动物医学进展》.2007,44-47页.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/057221 2010.05.26

吕文利等.病毒外源因子检测方法的探讨.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/136476 EN 2010.12.02

《现代中西医结合杂志》.2004,第13卷(第24期),
3102-3103页.

(73)专利权人 雅培生物学有限责任公司

审查员 刘东吉

地址 荷兰韦斯普

权利要求书2页 说明书24页

(72)发明人 P·J·肖恩 A·J·科斯坦

序列表7页 附图8页

(54)发明名称

分部试剂盒。

外来物质测试

(57)摘要

本发明属于制药工业领域且详细说明了用于测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质的方法,所述方法包括步骤:a)使针对多核苷酸构建体的表达产物产生的抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中抗体结合于活性物质,以及b)在步骤a)之后确定组合物中外来物质存在与否。此外,本发明详细说明了通过实施所述方法来生产药物组合物的方法、多核苷酸构建体用于测试待测组合物中活性物质或任何外来或感染性物质存在与否的用途。本发明还涉及在流感疫苗领域中作为有用的物质的具体的多核苷酸和多核苷酸构建体,以及包含所述多核苷酸和/或多核苷酸构建体的非人生物体、转基因动物或微生物。本发明还针对

1. 测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质的方法,所述方法包括:
 - a) 使针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中所述抗体结合于所述活性物质,以及
 - b) 在步骤a)之后确定组合物中外来物质存在与否,其中步骤a)包括:
 - a-1) 用包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体免疫非人受试者,以及
 - a-2) 使所述抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,其中所述活性物质在步骤b)之前通过抗体的结合而被中和或灭活。
2. 根据权利要求1的方法,其中确定组合物中外来物质存在与否的步骤包括:
 - a) 使用已用所述多核苷酸构建体接种过的非人动物并用待测组合物接种所述动物,
 - b) 在一段时间后评估活动物的百分比,其中假如在所述时间段内至少80%经接种的动物存活且不显示感染迹象,则认为所述组合物不含有外来物质;假如在所述时间段内少于80%经接种的动物存活和/或至少一只动物显示感染迹象,则认为所述组合物含有外来物质。
3. 根据权利要求1的方法,其中确定组合物中外来物质存在与否的步骤包括:
 - a) 用含有被中和或灭活的活性物质的待测组合物接种非人动物,
 - b) 在一段时间后评估活动物的百分比,其中假如在所述时间段内,至少80%经接种的动物存活且不显示感染迹象,则认为组合物不含有外来物质;假如在所述时间段内,少于80%经接种的动物存活和/或至少有一只动物显示感染迹象,则认为组合物含有外来物质。
4. 根据权利要求2或3的方法,其中非人动物选自成年小鼠、乳小鼠和豚鼠,且其中在至少7的时间段之后评估活动物的百分比和感染迹象的发生。
5. 根据权利要求4的方法,其中被接种的动物为成年小鼠,并且在用待测组合物接种后21天的时间段后评估感染迹象的发生。
6. 根据权利要求4的方法,其中被接种的动物为乳小鼠,并且在用待测组合物接种后14天的时间段后评估感染迹象的发生。
7. 根据权利要求4的方法,其中被接种的动物为豚鼠,并且在用待测组合物接种后至少42天的时间段后评估感染迹象的发生。
8. 根据权利要求2或3的方法,其中待测组合物的接种是在脑内和/或腹膜内实施的。
9. 根据权利要求1的方法,其中确定组合物中外来物质存在与否的步骤是符合欧洲药典,2005,2.6.16章的要求而实施的。
10. 根据权利要求1的方法,其中待测组合物分别是从中产生活性物质的细胞培养物样品,或源自所述细胞培养物的产物,或者种子病毒或含有种子病毒的组合物。
11. 根据权利要求1的方法,其中组合物是药物组合物,其包括疫苗制备物或其中间产物。
12. 根据权利要求1的方法,其中活性物质是病毒抗原或包含病毒颗粒的至少一种组分。
13. 根据权利要求12的方法,其中所述活性物质是流感病毒颗粒。

14. 根据权利要求1的方法,其中抗体和活性物质不是源自相同的多核苷酸构建体。
15. 根据权利要求1的方法,其中抗体用于测试作为外来物质的病毒。
16. 根据权利要求1的方法,其中多核苷酸构建体包含HA(血凝素)和/或NA(神经氨酸酶)编码序列。
17. 根据权利要求1的方法,其中包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体是经密码子优化的,是通过针对用于以所述多核苷酸构建体进行免疫的受试者的密码子优化来进行的。
18. 根据权利要求1的方法,其中所述多核苷酸构建体被包含在非人生物体中。
19. 根据权利要求18的方法,其中所述非人生物体是转基因动物或微生物。
20. 根据权利要求1的方法,其中所述抗体特异于如SEQ ID NO:1或2中所描述的多核苷酸序列所编码的多肽。
21. 根据权利要求1的方法,其中活性物质包含流感抗原,并且多核苷酸构建体包含如SEQ ID NO:1或2中所描述的序列。
22. 生产药物组合物的方法,在所述生产方法的至少一个时间点包括:
 - a) 实施根据权利要求1-21中任一项的方法;以及,任选地,
 - b) 通过能够移除和/或灭活外来物质的处理而处理药物组合物,和/或处理所述药物组合物从其中源自的细胞培养物的步骤,
其中所述药物组合物包括疫苗或其中间产物。

外来物质测试

发明领域

[0001] 本发明属于制药工业领域且涉及用于在包含至少一种活性物质的组合物中测试外来物质(extraneous agents)的方法,并涉及通过实施所述方法生产药物组合物的方法。此外,本发明还涉及多核苷酸构建体用于测试待测组合物中活性物质或任何外来或感染性物质存在与否的用途。此外,本发明涉及多核苷酸、包含特定多核苷酸的多核苷酸构建体,以及包含这些多核苷酸或多核苷酸构建体的用于病毒(特别涉及流感病毒)抗原制备领域的宿主细胞。还提供了包含此类多核苷酸和/或多核苷酸构建体的非人生物体、转基因动物或微生物。此外,其涉及特异于由所述多核苷酸编码的多肽的抗体以及用于生产所述抗体的方法,还涉及针对多核苷酸构建体的表达产物产生的抗体用于纯化活性物质的用途。本发明还针对分部试剂盒。

[0002] 发明背景

[0003] 在制药工业领域,有需求生产无污染物(如外来或偶然性物质(adventitious agent))的组合物,因为所述污染物可能导致不想要的副作用。此需求在疫苗领域尤其具有挑战性。不存在外来或偶然性物质还可能是监管问题。

[0004] 为保证组合物不含有污染物,可测试各组合物是否含有此类污染物。

[0005] 通常,此类测试可以例如基于检测组合物中存在的可能的外来物质,任选地包括外来物质的预先扩增。

[0006] 在这方面,W00172964A2描述了定量PCR方法,其用于同时检测和定量生物学来源的材料样品中的活的偶然性物质。此方法包括使用定量聚合酶链式反应(PCR)测量样品中多核苷酸的量,在允许所述物质复制的条件下孵育样品,孵育一段时间后使用定量PCR测量样品中多核苷酸的量以及比较孵育时间段前后样品中存在的多核苷酸的量。多核苷酸的量的增加表示样品中存在活的物质。

[0007] W02007/100397A2涉及对样品中偶然污染物病毒的存在与否的鉴别或确定,包括使来自样品的核酸与至少一个引物对接触,并通过质谱法确定扩增产物的分子量。

[0008] 另一个可能性是在偶然性物质测试之前中和待测组合物中存在的活性物质。在中和活性物质之后,将经中和的组合物加入特定的细胞系中,或在动物模型中进行测试。如果此细胞系显示出病原性效应,则组合物含有偶然性物质。

[0009] 在此情境中,US2004/0005546A1提供用于检测包含呼肠孤病毒的组合物中的偶然性物质的方法,通过使用特异性切割呼肠孤病毒基因组的核酶使病毒灭活。将编码此核酶的质粒引入对呼肠孤病毒感染易感的细胞。经转染的细胞通过表达此核酶能够使呼肠孤病毒灭活并因此将不被该病毒感染。然后,使所述表达核酶的细胞经受含有呼肠孤病毒的组合物,由呼肠孤病毒制备物引起的任何病原性效应将表明存在偶然性物质。W003072811A2基本上涉及相同的原理。

[0010] 组合物中活性物质的中和还可通过使用特异于此活性物质的抗体而实现,例如在欧洲药典2.6.16.章中所描述的。例如,如果活性物质为疫苗病毒抗原,此疫苗病毒抗原可被含有特异性结合此抗原的抗体的抗血清所中和。为了制备抗血清,使用在来自不同于用

于疫苗生产的物种的细胞培养物或其它系统(例如鸡胚蛋)中生产的且不含外来物质的免疫抗原。

[0011] 然而,尽管有上文描述的用于实施外来物质测试的方法,仍然需要改进的测试方法,尤其需要用于对非特定的感染性污染物进行可能的鉴定的非特异性测试方法,还需要进行合适的测试的有用工具,并因此需要用于药物组合物的改善的生产系统,尤其是在疫苗领域。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明涉及以下方面、主题及优选的实施方式,其分别单独地或组合地促成解决本发明的目标:

[0014] (1)用于测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质的方法,所述方法包括:

[0015] a)使针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中抗体结合于活性物质,以及

[0016] b)在步骤a)之后,确定组合物中外来物质存在与否。

[0017] 优选地,抗体特异性地结合于活性物质。

[0018] (2)用于测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质的方法,所述方法包括:

[0019] a)提供针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,

[0020] b)使此抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,其中抗体结合于活性物质,以及

[0021] c)在步骤b)之后确定组合物中外来物质存在与否。

[0022] (3)用于测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质的方法,所述方法包括:

[0023] a)提供通过用多核苷酸构建体免疫受试者而生成的抗体,

[0024] b)使所述抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,其中抗体结合于活性物质,以及

[0025] c)在步骤b)之后,确定组合物中外来物质存在与否。

[0026] (4)根据项目(1)-(3)中任何一项的方法,其中活性物质在项目(1)的步骤b)之前或项目(2)和(3)的步骤(c)之前通过与抗体结合,优选特异性结合,而被中和或灭活。

[0027] 换言之,活性物质在确定组合物中外来物质存在与否的步骤之前通过与抗体结合而被中和或灭活。

[0028] (5)根据项目(1)-(3)中任何一项的方法,其中确定组合物中外来物质存在与否的步骤包括:

[0029] a)使用已经用多核苷酸构建体接种过(优选免疫过)的非人动物,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,以及用待测组合物接种所述动物,

[0030] b)在一段时间后评估活动物的百分比,其中假如在所述时间段内至少80%经接种的动物存活并不显示感染迹象,认为组合物不含有外来物质;假如在所述时间段内少于

80%经接种的动物存活和/或至少一只动物显示感染迹象,认为组合物含有外来物质。

[0031] (6)根据项目(1)-(4)中任何一项的方法,其中确定组合物中外来物质存在与否的步骤包括:

[0032] a)用含有被中和或灭活的活性物质的待测组合物接种非人动物,

[0033] b)在一段时间后评估活动物的百分比,其中假如在所述时间段内,至少80%经接种的动物存活并不显示感染迹象,认为组合物不含有外来物质;假如在所述时间段内,少于80%经接种的动物存活和/或至少一只动物显示感染迹象,认为组合物含有外来物质。

[0034] 确定待测组合物中外来物质存在与否的步骤可以例如通过两种方式实施:一个可能性是在用组合物接种测试生物体(例如非人动物)之前,中和待测组合物中存在的活性物质(见例如项目(6))。此中和在体外实施,即,不在测试生物体自身中进行。组合物被中和之后,用待测组合物接种测试生物体。另一个可能性(见例如项目(5))是原位(例如,在测试生物体自身中)实施中和步骤。这是通过用多核苷酸构建体对测试生物体进行主动免疫而实现的,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列。通过这种做法,测试生物体产生针对活性物质的至少一部分的抗体。一旦用待测组合物(其含有尚未被中和的活性物质)接种测试生物体,这些抗体转而能够中和活性物质。因此,确定待测组合物中外来物质存在与否可在相同的测试生物体中实施,而无需活性物质的体外中和步骤。这显著地减少了实施测试方法所需的时间、所需的测试生物体的数量并进一步增加测试的稳健性和安全性。

[0035] (7)根据项目(5)或(6)的方法,其中非人动物选自成年小鼠、乳小鼠和豚鼠,其中在至少7-10天的时间段之后评估活动物的百分比以及感染迹象的发生,任选地,在经接种的动物为成年小鼠的情况下在用待测组合物接种后21天的时间段后评估,在经接种的动物为乳小鼠的情况下在用待测组合物接种后14天的时间段后评估,在经接种的动物为豚鼠的情况下在用待测组合物接种后至少42天的时间段后评估。

[0036] (8)根据项目(5)-(7)中任何一项的方法,其中接种待测组合物是在脑内和/或腹膜内实施的。

[0037] (9)根据任意前述项目的方法,其中确定待测组合物中外来物质存在与否的步骤符合监管要求,优选符合欧洲药典,2005,2.6.16章的要求而实施。

[0038] (10)根据任意前述项目的方法,其中待测组合物是来自其中产生活性物质的细胞培养物的样品、或源自所述细胞培养物的产物。

[0039] 此外,备选地,待测组合物有可能是种病毒(seed virus),或含有种病毒的组合物。在本发明意义之内,种病毒为意欲用于生产抗原或疫苗的病毒。例如,种病毒可被遗传改变以使其安全,且能够在细胞培养物或蛋中生长。

[0040] (11)根据项目(1)-(10)中任何一项的方法,其中组合物为药物组合物,优选疫苗制备物或其中间产物。

[0041] (12)根据项目(1)-(11)中任何一项的方法,其中活性物质为抗原,优选灭活或减毒病毒,更优选病毒抗原,如裂解病毒抗原、亚单位病毒抗原或病毒体(virosome),或者活性物质包含病毒或病毒颗粒的至少一种组分,优选活性物质为流感病毒颗粒。

[0042] (13)根据项目(1)-(12)中任何一项的方法,其中活性物质为由多核苷酸序列编码的抗原。

[0043] (14)根据任意前述项目的方法,其中通过用多核苷酸构建体免疫受试者而提供抗体。

[0044] (15)根据任意前述项目的方法,其中抗体及活性物质不是源自使用相同的多核苷酸构建体。

[0045] (16)根据项目(15)的方法,其中多核苷酸构建体在至少一种结构和/或功能性元件上有差异。

[0046] (17)根据项目(15)或(16)的方法,其中多核苷酸构建体在其编码的多肽方面有差异。

[0047] (18)根据前述项目中任何一项的方法,其中抗体用于测试作为外来物质的病毒,例如选自下列的病毒:肺病毒亚科(Pneumovirinae),例如肺病毒(Pneumovirus)属,包括呼吸道合胞体病毒(RSV);副黏液病毒科(Paramyxoviridae)的麻疹病毒属(Morbilliviruses),例如麻疹病毒;小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)的肠道病毒属(Enteroviruses),如柯萨奇(Coxsackie)病毒(例如柯萨奇B5,埃柯病毒,A-D型肠道病毒和鼻病毒);哺乳动物呼肠病毒科(Reoviridae),特别是正呼肠病毒(例如哺乳动物呼肠病毒如1、2和3型呼肠病毒)和轮状病毒;逆转录病毒科(Retroviridae)的成员,例如正逆转录病毒(Orthoretrovirinae)(如逆转录酶病毒),副黏液病毒科的偏肺病毒(Metapneumovirus)如人偏肺病毒(HMPV)或1、2、3和4型副流感病毒;副黏液病毒科的腮腺炎病毒属(Rubulaviruses),如腮腺炎病毒;披膜病毒科(Togaviridae),如风疹病毒(Rubellavirus);冠状病毒科(Coronaviridae),如SARS冠状病毒及其它人冠状病毒,如冠状病毒OC43、229E、NL63和HKU1;小核糖核酸病毒科的鼻病毒,例如鼻病毒M-株;水痘带状疱疹病毒(VZV),也已知为人疱疹病毒2(HHV3);多瘤病毒科(Polyomaviridae),如SV-40多瘤病毒、BK多瘤病毒和JC多瘤病毒;猪圆环病毒;猪小核糖核酸病毒,如猪水疱病病毒(SVDV)和捷申-泰法(Teschen-Taifan)病毒;微小病毒科(Parvoviridae)的成员,例如犬微小病毒(CPV),博卡病毒或猪微小病毒;副流感病毒科(Orthomyxoviridae)的成员,包括A和B型流感病毒;副黏液病毒科(Paramyxoviridae)的成员,包括PIV-1、PIV-2和PIV-3;疱疹病毒科(Herpesviridae),如1和2型单纯性疱疹病毒,6、7或8型人单纯性疱疹病毒,巨细胞病毒和EB病毒;腺病毒科(Adenoviridae),例如腺病毒,包括人、猿、和鸟腺病毒,如鸟腺病毒1;鸟圆环病毒;鸟呼肠病毒科,特别是正呼肠病毒,如鸟呼肠孤病毒;乳头状瘤病毒科(Papillomaviridae)的成员,包括人乳头状瘤病毒;黄病毒科(Flaviviridae)的成员,如西尼罗河病毒;以及双核糖核酸病毒科(Birnaviridae),例如传染性法式囊病毒(也已知为甘布罗病毒),和/或其中抗体用于测试作为外来物质的细菌,例如衣原体(Chlamydia)细菌,包括沙眼衣原体(*C. trachomatis*)、肺炎衣原体(*C. pneumoniae*)和鸚鵡热衣原体(*C. psittaci*);以及支原体(*Mycoplasma*)。

[0048] (19)根据任意前述项目的方法,其中多核苷酸构建体包含HA(血凝素)和/或NA(神经氨酸酶)编码序列。

[0049] 在一个优选的实施方式中,多核苷酸构建体单独地或相互组合地包含任何这些HA和/或NA编码序列。多核苷酸构建体还可能只包含这些序列的部分。优选地,多核苷酸构建体单独地或相互组合地包含编码H1、H2、H3、H5、H6、H7、N1、N2、N3或N7(优选单独编码H5)的序列的完整序列或一部分。在进一步优选的实施方式中,多核苷酸构建体包含编码H1N1、

H2N2、H3N2、H6N1、H7N3或H7N7的序列或序列的部分,优选包含编码H5N1的序列或序列的部分。

[0050] (20)根据任意前述项目(尤其是根据项目(14))的方法,其中包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体是经密码子优化的,特别是通过对用于用多核苷酸构建体免疫的受试者的密码子优化。

[0051] (21)根据任意前述项目的方法,其中活性物质包含流感抗原,并且多核苷酸构建体包含与SEQ ID NO:1或2中所示的核酸具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的序列。

[0052] (22)根据任意前述项目的方法,其中活性物质包含流感抗原,且多核苷酸构建体包含如SEQ ID NO:1或2中所描述的序列。

[0053] (23)用包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体产生特异性针对所述活性物质的抗体而用于测试任何以下条件的用途:

[0054] i)待测组合中活性物质的存在与否,

[0055] ii)组合中任何外来或感染性物质的存在与否,

[0056] 其中通过用多核苷酸构建体免疫受试者而提供抗体,并且其中活性物质被所述抗体中和或灭活。

[0057] (24)根据项目(23)的用途,其中活性物质显示感染性活性,并且组合物缺少任何感染性表示抗体中和或灭活了活性物质且不存在其它感染性物质。

[0058] (25)根据项目(23)或(24)的用途,其中活性物质为抗原,优选为病毒颗粒,或者活性物质包含病毒颗粒的至少一种组分,特别是其中所述病毒颗粒为流感病毒颗粒。

[0059] (26)根据项目(23)-(25)中任一项的用途,其中对组合物的测试为阳性或阴性对照测试。

[0060] (27)根据项目(23)-(26)中任一项的用途,其中对组合物的测试为对外来物质的测试。

[0061] (28)用于生产药物组合物,特别是疫苗的方法,在生产方法中的至少一个时间点包括:

[0062] a1)实施根据项目(1)-(22)中任何一项的方法;或

[0063] a2)实施根据项目(23)-(27)中任何一项的用途;以及,任选地,

[0064] b)通过移除和/或灭活外来物质的处理而处理药物组合物,特别是疫苗或其中间产物,和/或处理药物组合物或疫苗从其中所源自的细胞培养物的步骤。

[0065] (29)项目(28)的方法,其中在已经确定了病原性物质的情况下,步骤b)中的处理被特异性地调节用于移除和/或灭活所述病原性外来物质。

[0066] (30)针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体用于纯化所述活性物质的用途,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中抗体特异性地结合于活性物质,其中抗体和活性物质不是源自使用相同的多核苷酸构建体。

[0067] (31)根据项目(30)的用途,其中所使用的抗体是如项目(14)-(22)中所定义的。

[0068] (32)根据项目(30)或(31)的用途,其中抗体包含用于结合于固相的亲和性标签。

[0069] (33)多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的序列。

[0070] (34)根据项目(33)的多核苷酸,其中此多核苷酸其有如SEQ ID NO:1或2中所描述的序列。

[0071] (35)包含根据项目(33)或(34)的多核苷酸的多核苷酸构建体。

[0072] (36)包含项目(33)或(34)的多核苷酸或项目(35)的多核苷酸构建体的宿主细胞。

[0073] (37)根据项目(36)的宿主细胞,其中所述宿主细胞为细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、藻类细胞或昆虫细胞,优选为细菌细胞或酵母细胞,最优选为细菌细胞。

[0074] (38)根据项目(36)或(37)的宿主细胞,其中宿主细胞为大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞、链霉菌属(*Streptomyces*)细胞、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞或裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)细胞,优选为大肠杆菌细胞。

[0075] (39)非人生物体、转基因动物或微生物,其含有根据项目(33)或(34)的多核苷酸或根据项目(35)的多核苷酸构建体。

[0076] (40)特异于由根据项目(33)或(34)的多核苷酸编码的多肽的抗体。

[0077] (41)用于生产根据项目(40)的抗体的方法,其包括:

[0078] a)提供根据项目(35)的多核苷酸构建体,以及

[0079] b)用所述多核苷酸构建体免疫合适的受试者,优选合适的动物,如小鼠、大鼠或兔子,更优选为兔子。

[0080] (42)分部试剂盒用于测试组合物中的外来物质的用途,所述试剂盒包括

[0081] a)多核苷酸构建体,其包含编码活性物质的至少一部分的序列,以及

[0082] c)宿主细胞。

[0083] (43)分部试剂盒,包括

[0084] a)包含编码与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体,或包含如SEQ ID NO:1或2中所描述的序列的多核苷酸构建体,以及

[0085] b)宿主细胞。

[0086] 发明详述

[0087] 现在通过优选的实施方式和实施例更详细地描述本发明,其仅仅为阐述性目的而呈递,不应被理解为以任何方式限制本发明的范围。

[0088] 本发明提供了通过使用特异性结合组合物中存在的活性物质的抗体而用于检测组合物中的污染物的有效、快速、可靠的方法,条件是所述的抗体是针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列。已经发现,通过利用重组多核苷酸构建体进行免疫而制备的抗体对于在测试外来或偶然性物质之前中和或灭活活性物质是特别有利且有用的。此类抗体特别适合于测试含有蛋白质性物质(如活性物质)的组合物中的外来物质。由于待用于制备抗体的多核苷酸构建体为通过合成制备的并包含编码指定活性物质中存在的氨基酸序列的至少一部分的多核苷酸,此多核苷酸构建体编码待中和或灭活的靶标的同源序列,但在测试期间将抗体加入组合物中时没有被外来或偶然性物质所污染。与此相反,使用抗体(其是通过用给定的活性物质本身免疫动物而产生的)进行的其它免疫学外来物质测试很可能导致形成特异于组合物中存在的外来物质的抗体,从而产生了假阴性结果的风险。在动物中不希望地产生此类抗体可以例如是由污染物所诱导的,所述污染物产生自其中产生活性物质的细胞培养系统。然而,结果

是,不像根据本发明使用多核苷酸构建体免疫来生产抗体,对外来物质有特异性的抗体会在测试过程中中和外来物质,从而导致分析中的错误。根据本发明的方法允许避免或至少减少特异于污染物的抗体形成的风险。因此,例如,可避免假阴性外来物质测试结果。此外,降低了产生交叉反应性的风险。此外,多核苷酸构建体可在适当的测试系统中被直接测试,以显示污染性外来物质不存在,例如可就广泛的一系列潜在污染物通过PCR或通过应用欧洲药典2.6.16章中所描述的方法来直接测试所述构建体。

[0089] 特别地,已经发现通过用编码例如病毒抗原(如流感病毒抗原)的多核苷酸构建体直接免疫受试者,有可能迅速产生特异性结合此流感病毒抗原的抗体,目的是随后的测试主要不对流感病毒本身响应。因此,通过使用根据本发明的方法,不再需要产生特异性的抗体(例如,通过用野生型病毒或在疫苗制备过程中获得的病毒颗粒本身免疫动物),这显著减少了要用于后续测试阶段的抗体产生所需要的时间。此外,不再需要依赖于交叉反应株的鉴别和培养,因为一旦鉴别出了(潜在的)流行性或季节性流感病毒株,就能制备多核苷酸构建体。这在流行性或季节性流感爆发的情况下尤其有用,因为需要将流行性或季节性疫苗快速投放市场。通过应用根据本发明的方法,可迅速产生针对这些流感抗原的特异性抗体并将其用于测试和任选的在流感疫苗制备过程中进一步处理的目的。因此,本发明减少了疫苗投放前置时间。由于所生成的抗体还能被用于疫苗或其中间产物所经受的质量测试(如外来物质测试),本发明还产生改善的疫苗质量。此外,通过应用本发明的教导,有可能通过使昂贵的生产批次经受特殊处理以灭活或去除检测到的偶然性物质而在检测到外来物质之后进一步使用所述批次。

[0090] 总而言之,通过应用根据本发明的方法,可实现所测试组合物的改善的质量和安全性以及偶然性物质测试的改善的支出。因此,所测试组合物的投放前置时间可被减少。

[0091] 在一个具体的方面,本发明涉及用于测试包含至少一种活性物质的组合物中外来物质的方法,所述方法包括以下步骤

[0092] a)使针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中抗体结合于活性物质,以及

[0093] b)在步骤a)之后确定组合物中外来物质的存在与否。

[0094] 在本发明的意义之内,术语“外来物质”或“偶然性物质”指待测组合物中可能存在的污染。偶然或外来物质为不意欲包括在组合物中并会对含有此组合物的产品的特性有不利影响的物质。例如,如果组合物构成药物制备物或将其而使用,偶然性物质可以例如是感染性物质(病原体),即能够感染人或动物的物质。这种感染性物质可以是微生物,例如,细菌、真菌、藻类、病毒或其部分。病毒常常也能够用于生物学制品生产的系统(如细胞培养物)中生长。此外,组合物还可被宿主细胞DNA污染。

[0095] 用于生物学制品生产(特别是用于生产病毒颗粒)的典型细胞系为哺乳动物细胞系,包括MDCK、CHO、BHK、Vero、MRC-5、PER.C6、WI-38等等。可能无意地感染这些细胞并因此代表根据本发明的待测试的潜在外来或偶然性物质的感染性病毒和细菌的实例包括,例如选自以下的病毒:肺病毒亚科(Pneumovirinae),例如肺病毒(Pneumovirus)属,包括呼吸道合胞体病毒(RSV);副黏液病毒科(Paramyxoviridae)的麻疹病毒属(Morbilliviruses),例如麻疹病毒;小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)的肠道病毒属(Enteroviruses),如柯萨

奇(Coxsackie)病毒(例如柯萨奇B5,埃柯病毒,A-D型肠道病毒和鼻病毒);哺乳动物呼肠病毒科(Reoviridae),特别是正呼肠病毒(例如哺乳动物呼肠病毒如1、2和3型呼肠病毒)和轮状病毒;逆转录病毒科(Retroviridae)的成员,例如正逆转录病毒(Orthoretrovirinae)(如逆转录酶病毒),副黏液病毒科的偏肺病毒(Metapneumovirus)如人偏肺病毒(HMPV)或1、2、3和4型副流感病毒;副黏液病毒科的腮腺炎病毒属(Rubulaviruses),如腮腺炎病毒;披膜病毒科(Togaviridae),如风疹病毒(Rubellavirus);冠状病毒科(Coronaviridae),如SARS冠状病毒及其它人冠状病毒,如冠状病毒OC43、229E、NL63和HKU1;小核糖核酸病毒科的鼻病毒,例如鼻病毒M-株;水痘带状疱疹病毒(VZV),也已知为人疱疹病毒2(HHV3);多瘤病毒科(Polyomaviridae),如SV-40多瘤病毒、BK多瘤病毒和JC多瘤病毒;猪圆环病毒;猪小核糖核酸病毒,如猪水疱病病毒(SVDV)和捷申-泰法(Teschen-Talfan)病毒;微小病毒科(Parvoviridae)的成员,例如犬微小病毒(CPV),博卡病毒或猪微小病毒;副流感病毒(PIV);正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)的成员,包括A和B型流感病毒;副黏液病毒科(Paramyxoviridae)的成员,包括PIV-1、PIV-2和PIV-3;疱疹病毒科(Herpesviridae),如1和2型单纯性疱疹病毒,6、7或8型人单纯性疱疹病毒,巨细胞病毒和EB病毒;腺病毒科(Adenoviridae),例如腺病毒,包括人、猿、和鸟腺病毒,如鸟腺病毒1;鸟圆环病毒;鸟呼肠病毒科,特别是正呼肠病毒,如鸟呼肠孤病毒;乳头状瘤病毒科(Papillomaviridae)的成员,包括人乳头状瘤病毒;黄病毒科(Flaviviridae)的成员,如西尼罗河病毒;以及双核糖核酸病毒科(Birnaviridae),例如传染性法式囊病毒(也已知为甘布罗病毒);和细菌,例如衣原体(Chlamydia)细菌,包括沙眼衣原体(*C. trachomatis*)、肺炎衣原体(*C. pneumoniae*)和鹦鹉热衣原体(*C. psittaci*);以及支原体(*Mycoplasma*)。

[0096] 通过应用根据本发明的方法,组合中外来或偶然性物质的存在可分别以有效、迅捷和可靠的方式被测试。这种待测组合物可以是任何满足某些质量要求的组合物或其上游样品。此种组合物可用于测试试剂盒中,例如用于在任何人或动物的体液或样品中检测疾病或感染性物质。根据本发明的方法还适合于测试用于任何实验室用途(如分析或制备目的)的组合物。在本发明意义中的其它待测组合物可以例如是从中产生活性物质的细胞培养物样品,或者其分离或纯化产品或任何其中间产物。这些样品可在任何方法步骤中获取。所述组合物还可以是源自此细胞培养物的产物。同样,此产物可以在任何阶段源自细胞培养物的产物,这意味着此产物可为终产物的前体或终产物本身,或之间的任何产物。此外,备选地,待测组合物有可能分别为种病毒,或含有种病毒的组合物。种病毒在本发明的意义内为意欲用于生产抗原或疫苗的病毒。

[0097] 本发明意义之内的其它组合物为药物组合物。优选地,所述组合物为药物组合物。药物组合物可用在身体之内或之上,以预防、诊断、减轻、治疗或治愈人或动物的疾病。优选地,此类药物组合物为疫苗制备物或其中间产品。在药物组合物为疫苗制备物的情况下,也可能测试疫苗批次的某些样品。其它待测组合物为例如任何来自最终产生药物或疫苗产品的方法阶段的任何样品,例如,来自活性物质所源自的细胞培养物的样品或任何中间产物。

[0098] 由于偶然性物质的污染可在制造过程中的任何时间发生或被合适地测试,根据本发明的方法可在所述组合物制造中的任何阶段进行。

[0099] 待测组合物包含至少一种活性物质。活性物质在本发明的意义内指的是任何化学或生物学材料或化合物,其为组合物中的有效成分。在药物组合物的情况下,活性物质可以

为药物化合物,如生物制药药物,尤其是经表达的多肽。优选地,活性物质为抗原,优选地所述抗原为灭活或减毒的病毒,更优选地所述抗原为病毒抗原。这些病毒抗原的实例为例如病毒颗粒,如被部分破坏的病毒颗粒如裂解病毒抗原、纯化的包膜抗原(如亚单位病毒抗原)或病毒体。病毒体为具有合适的平均直径的单层磷脂双层囊泡,所述直径例如在大约70nm至大约150nm的范围内。基本上,病毒体代表重构的空病毒包膜,其没有包括病毒来源的遗传物质的核壳体。病毒体不能够复制但是是纯的融合活性的囊泡,其含有插入磷脂双层膜之中的功能性病毒包膜糖蛋白(如流感病毒血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA))。还优选地,活性物质包含病毒或病毒颗粒的至少一种组分,优选活性物质为流感病毒颗粒。

[0100] 由于根据本发明的方法在生产流行性疫苗领域中尤其有用,根据优选的实施方式,活性物质是源自可在流感疫苗中存在的流感病毒颗粒的抗原或疫苗组分。这些流感疫苗可基于任何合适的流感病毒株。流感疫苗典型地包括来自流感A、B和C病毒中的至少一种病毒株的抗原,优选来自流感A或B中的至少一种病毒株。建议用于疫苗的病毒株可随季节变化。还有可能疫苗是基于超过一种合适的流感病毒株。例如,流感疫苗可包括两种流感A株及一种流感B株。还有可能的是,疫苗不仅可以是单价,也可以是双价,三价或多价疫苗,优选疫苗为三价疫苗。包含活性物质(优选源自流感病毒颗粒的抗原或疫苗组分)的流感疫苗可通过本领域技术人员已知的任何技术制造。例如,疫苗可通过使用编码活性物质或活性物质的部分的多核苷酸构建体,或通过用活的病毒制备物感染卵或细胞而制造。优选地,通过用活的病毒制备物感染卵或细胞来制造疫苗。在疫苗的制造是基于细胞的情况下,所使用的细胞能够宿寄(hosting)生长的病毒,例如哺乳动物细胞,如MDCK(马丁达比狗肾细胞)、CHO(中国仓鼠卵巢细胞)、BHK(幼仓鼠肾细胞)、Vero(源自非洲绿猴肾上皮细胞的细胞)、MRC-5(次级人肺成纤维细胞)、PER.C6(源自人胚胎视网膜细胞的细胞)、WI-38(源自人胎儿肺组织的细胞)等。通常,将病毒或活病毒制备物分别注射到其扩增的细胞中。然后,移除、收集、纯化并灭活细胞外壁。在基于卵的制造中,通常病毒或活病毒制备物被分别注射到卵中并在胚胎周围的液体中累积。胚胎被感染,从而病毒可扩增。在一段时间后,收集、纯化并化学地灭活病毒。此病毒或病毒的部分被用于生产疫苗。

[0101] 如本文使用的,术语“多核苷酸”应被理解为指双链或单链核酸分子,例如,DNA,cDNA,基因组DNA、RNA和/或mRNA分子等。核酸分子可作为编码链或互补链存在。多核苷酸可以是天然来源的、或通过基因技术或化学方法以及合成方法产生的,或可能是从其源自的。优选地,多核苷酸序列编码作为活性物质的抗原。

[0102] 根据本发明的方法,在步骤a)中,使针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中抗体特异性结合于活性物质,例如,通过形成抗原-抗体复合物。

[0103] 在下文中,详细描述了本发明中所使用的抗体。其源自多核苷酸构建体或载体。术语“多核苷酸构建体”或“载体”分别指用于将外来多核苷酸(或插入物,分别地)引入宿主细胞或宿主生物体中的分子。多核苷酸构建体包含如上文所描述的多核苷酸,优选地,多核苷酸构建体或载体是DNA或RNA序列,更优选地是DNA序列。多核苷酸构建体分别包含多核苷酸序列,或插入物,其编码一种或多种(多)肽或蛋白质。此多核苷酸或插入物分别可为双链或单链核酸分子,例如,DNA、cDNA、基因组DNA、RNA和/或mRNA分子等。核酸分子可以作为编码链或互补链存在。多核苷酸可以是天然来源的、或通过基因技术或化学方法以及合成方法

产生的,或可能是源自其的。优选地,多核苷酸序列编码代表活性物质的至少一部分的(多)肽或蛋白质。

[0104] 在本发明的意义中,表述“针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体”指的是该抗体是通过用多核苷酸构建体免疫合适的生物体或通过细胞或细胞系统中产生抗体而获得的。所生成的获自此特定免疫的抗体,任选地为分离的抗体,(任选特异性地)结合于(多)肽,所述(多)肽由多核苷酸构建体所包含的序列编码,其中(多)肽代表活性物质的至少一部分。

[0105] 优选地,根据本发明,多核苷酸构建体或载体分别包含a)启动子区域,b)多核苷酸或插入物,分别地,如本文公开的,其可操作性地连接至启动子区域,以及c)任选地,可操作性连接于其上的调控序列,其可作为转录、终止和/或聚腺苷酸化信号、增强子序列和/或编码先导信号的序列,和/或确保有效的核糖体结合的序列(例如Kozak共有序列)。合适的启动子和/或调控序列是分子生物学领域的技术人员所熟知的。无论如何,本领域技术人员可在文献中(例如在相关科学杂志和基因数据库中)找到合适的启动子和/或调控序列,或可使用标准的方法(如在Sambrook等人的Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Press,(2000)中所描述的)将其从任何希望的生物体中分离出来。

[0106] 适合于根据本发明所使用的多核苷酸构建体的多核苷酸序列或插入物,分别可由本领域技术人员基于编码形成活性物质的至少一部分的多肽的序列而确定。在病毒抗原作为活性物质的情况下,编码此病毒抗原的核苷酸序列通常是已知的,例如病毒或疫苗是在通过“逆向遗传学”手段(见例如Neumann等人,“Reverse Genetics of Influenza Virus”, Minireview,Virology 287,243-250,2001,其中引用的参考文献以及之后的逆向遗传学技术)而制备的情况下。编码合适的多肽的完整多核苷酸序列或其部分可由本领域技术人员选择并引入多核苷酸构建体中。合适的多肽是能够在被免疫的受试者中引起有效的抗体应答的多肽。合适的多肽可在例如本领域技术人员已知数据库中找到,如PubMed数据库(例如<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/145284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence-ResultsPanel.Sequence-RVDocSum>及<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>)。优选地,多肽包含一种或多种抗原决定簇(表位)。还可能的是多核苷酸构建体含有的多肽不仅编码一种活性物质或活性物质的一部分,还编码一种或多种其它活性物质或其它活性物质的部分。还有可能的是,使用分别包含不同多核苷酸或插入物的不同多核苷酸构建体。然而,这可能取决于组合物中存在的不同活性物质的存在和数量。因此,如果存在不同类型的活性物质,则制造不同类型的多核苷酸构建体,每种类型包含编码代表一种活性物质的至少一部分的多肽的序列。

[0107] 优选地,用于本发明的多核苷酸构建体或载体是表达载体。表达载体是能够控制其含有的基因的表达(即,转录和翻译)的载体。甚至更优选地,载体是哺乳动物质粒表达载体。这种载体的实例为质粒(p)pCMV。优选地,用于本发明中的载体具有以下特征:a)巨细胞病毒(CMV)启动子,b)Kozak共有序列,其被置于ATG起始密码子之前以确保有效的核糖体结合和因此蛋白质翻译的最高水平,以及c)转录终止信号、poly(A)信号,其置于编码代表活性物质的至少一部分的(多)肽或蛋白质的序列末端以确保合适的转录终止。编码序列(即,

多核苷酸)可在合适的限制性位点被亚克隆到载体中。然后可将所产生的质粒(多核苷酸构建体或载体,分别地,优选为DNA构建体或载体)用于转化合适的宿主细胞(如细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、藻类细胞、植物细胞或昆虫细胞,优选为细菌细胞如大肠杆菌细胞)。将经转化的宿主细胞在合适的培养基中培养然后收集、裂解所述细胞,并回收质粒。对于之前提到的程序合适的方案可例如在Sambrook等人的Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, (2000), Davis等人的Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986), 及Ausubel等人的Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience (1988)中找到。

[0108] 为表征所产生的质粒多核苷酸,在一般的限制性分析中,可使用凝胶电泳和其它生化及分子生物学方法作为分析方法。这些方法以及用于产生上文描述的多核苷酸构建体的方法都是熟知的,已经发表了许多关于重组多核苷酸方法的论述,包括Sambrook等人的Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition, Cold Spring Harbor Press, (2000), Davis等人的Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986), 以及Ausubel等人的Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience (1988)。

[0109] 宿主细胞的转化可用于扩增表达载体。然后,此经扩增的表达载体可转而用于例如免疫受试者,如下文所述。

[0110] 为了产生特异性结合于存在于待测组合物中的活性物质的抗体或抗血清,在本发明的优选实施方式中,用分别包含多核苷酸或插入物的多核苷酸构建体免疫受试者,所述多核苷酸或插入物编码活性物质的至少一部分。用所述多核苷酸构建体直接免疫合适的受试者引起针对表达产物的抗体更迅速的产生,例如,可避免在用活性物质(例如,(多)肽)本身实施免疫的情况下可能必需的方法步骤。此类否则所需的方法步骤可以例如是费力的(多)肽纯化。根据本发明的节省时间、迅捷的方法在活性物质为病毒抗原、病毒颗粒、病毒体或前面提到的任何部分的情况中尤其有利,因为可更迅速地提供对安全、高质量疫苗的测试。这在流感的流行性或季节性爆发的情况下尤其有利,因为需要将流行性或季节性疫苗快速投放市场。通过应用根据本发明的方法,针对并同源于这些流感抗原的当前流行的或季节性病毒株的特异性抗体可被迅速地生成并用于生成流感疫苗制备物。类似的情况可应用于其它疫苗制备物。此外,由于免疫可用合成的多核苷酸构建体实施,实质上降低了免疫合适的动物而带有污染的风险。因此,产生针对这些污染的抗体的风险可被避免或至少被降低,从而避免例如假阴性外来物质测试结果。这会显著地增强所测试的组合物的安全性和质量。

[0111] 还可用两种或更多种不同类型的多核苷酸构建体免疫受试者,每种类型携带不同的多核苷酸。被免疫的受试者为非人受试者,如合适的动物,例如绵羊、山羊、兔子、大鼠、小鼠、狗或豚鼠,优选为兔子、小鼠、豚鼠或大鼠,更优选为兔子。合适的动物的免疫可依照熟知的标准程序实施。通常,任选地纯化的多核苷酸构建体优选通过许多递送方法被引入动物组织中,如使用标准皮下注射针注射盐水中的多核苷酸构建体、基因枪递送或气动注射(pneumatic injection)。此外,递送可通过局部应用的手段实施,或者可实施细胞转染剂介导的递送。经免疫的动物之后产生特异于至少部分或完整的所表达的(多)肽或蛋白质的抗体。所产生的抗体存在于被免疫的受试者的血液中,并可通过技术人员所熟知的标准过程被回收。还可能的是,从被免疫的受试者中所收集的血液中制备血清样品。抗体可以是单

克隆的或多克隆的,这取决于表达的(多)肽或蛋白质的性质。术语“单克隆抗体”在本发明的意义中指的是具有相同的抗原特异性的抗体,即,均对于相同的表位(抗原决定簇)特异的抗体。这是指,如果所表达的(多)肽对应于单个表位,那么抗体为本发明的术语中的“单克隆抗体”。在所表达的(多)肽或蛋白质包含超过一种表位的情况下,由被免疫的动物产生的特异性抗体在本发明的术语中为“多克隆抗体”。

[0112] 在一段时间之后,例如在免疫后直至100天,通常直至70天或直至50天,优选70天左右,可根据本领域技术人员熟知的方法而获得由被免疫的动物生成的抗体。优选地,对动物进行抽血并获得含有抗体的血清样品。在优选的实施方式中,要用于步骤a)的抗体简单地由获自被免疫的动物的血清样品来表示。

[0113] 在步骤b)之前,活性物质优选通过抗体结合而被中和或灭活。优选地,此结合为特异性的。

[0114] 在本发明的意义中,术语“特异性结合”指的是根据本发明的抗体显示出对于存在于待测组合物中的活性物质的特异性,并且,因此选择性地结合于所述活性物质但不结合于潜在地存在于待测组合物中的外来物质。在本发明的优选实施方式中,根据本发明的抗体排他地结合于所述活性物质而完全不结合于潜在存在的外来物质。在活性物质为如上文描述的抗原的情况下,抗体对活性物质的特异性结合还可能为交叉反应,这意味着根据本发明的抗体显示出交叉反应性。在本发明的意义中,术语“交叉反应性”指的是特定抗体与两种或更多种具有共同或高度同源的表位的抗原反应的能力。例如在两种或更多种活性物质,或两种或更多种抗原,分别存在于待测组合物中的情形中,可以是这种情况。

[0115] 在本发明意义中,被中和的活性物质是与特异性抗体相互作用的活性物质,例如,与特异性抗体形成复合物,从而其基本上不能再有为有效的。在优选的实施方式中,被中和的活性物质是完全失效的。在本发明的意义中,失效的活性物质为例如不能再实施其功能,如其药学功能的。还可能的是,当与活性物质-敏感性检测细胞系接触时或当施用于测试动物时,失效的活性物质不再能够引起病原性效应。通过以上提到的测量的每一种,都确保了偶然性物质测试至少主要地不响应于活性物质本身。

[0116] 在本发明的优选实施方式中,特异性抗体与病毒抗原或病毒颗粒、或者病毒抗原或病毒颗粒的所述至少一个组分反应,并因此破坏或抑制其病原性,例如,其感染性和/或毒力。所述特异性抗体的中和效力任选地可在进行步骤b)之前进行测试。可进行本领域技术人员熟知的中和测试。此类中和测试的一个实例为将所获得的特异性抗体或含有特异抗体的血清与和所述特异性抗体交叉反应的参照株混合。然后,可将经反应的参照株接种于对参照株的感染敏感的检测细胞系上,如Vero、MRC-5或MDCK细胞系。然后观察这些检测细胞系一段合适的时间,例如大约14天,并就病原性效应的存在进行检查。另一个测试抗体中和效力的可能性是通过测试卵模型中的感染性而测试被中和的制备物的感染性(此测试在例如欧洲药典2.6.16章中有所描述)。病原性效应是对于细胞的生长或维持的不利影响,特别是与微生物和/或病毒感染相关的影响。病原性效应包括但不限于致细胞病变效应(CPE)、细胞破裂、生长抑制、蛋白质合成抑制或凋亡。CPE是细胞结构的可观察的变化,其可随细胞类型而变化并引起死亡,而且能根据本领域已建立的知识进行确定。例如,病毒感染的一些最常见的效应为形态学变化,如细胞变圆及脱离基质、细胞裂解、合胞体形成以及包涵体形成。中和活性被表征为CPE减少和血细胞凝集抑制,或减少的红细胞向被感染的细胞

的血球吸附。中和活性还可通过对细胞上清液进行血细胞凝集测试而表征。

[0117] 然而,此类中和测试为参照测试。这意味着如果对于给定的所开发的系统可显示一次抗体的中和效力,此中和测试不必对此系统持续实施。

[0118] 如果未发现测试的血清或抗体分别地具有足够的中和活性,可以关于载体设计、用于免疫的物种、DNA构建体或载体分别的施用剂量和途径、免疫和血液收集方案以及中和效力测试的形式进行进一步的优化。在本发明的意义中,“足够的中和活性”指的是抗体/活性物质复合物在实施合适的中和测试时不能引起可检测的效应。

[0119] 根据本发明的方法,步骤b)中分别确定外来或偶然性物质的存在与否。这些测试可在成年小鼠、乳小鼠和豚鼠中根据监管要求实施,例如根据欧洲药典2005,2.6.16章(病毒种批)的要求。对于在鸟类组织中繁殖的病毒,鸟类病毒的测试如欧洲药典2005,2.6.16章中所描述的(病毒种批和病毒收集)。

[0120] 此外,构建体还可用于用待测组合物接种之前对动物测试系统的主动免疫,如欧洲药典,2005,2.6.16章(2.6.16.)中所描述的。这将使得不再需要对种病毒进行预先中和,而不改变动物测试模型响应污染物质的能力。这会进一步增加测试系统的稳健性,减少根据2.6.16在测试框架中使用的动物的数目,并显著地减少显示符合2.6.16所需的时间。

[0121] 优选地,在本发明的上述实施方式中,抗体和活性物质不是源自使用相同的多核苷酸(优选DNA)构建体。多核苷酸构建体可用于不同的目的:生成针对活性物质的抗体用于根据本发明的偶然性物质测试,或生产制备规模的活性物质,这意味着用于生产活性物质(例如病毒抗原或病毒颗粒)的多核苷酸构建体不是用于生成中和或灭活此活性物质的特异性抗体的。

[0122] 在本发明之内,表述“不是源自使用相同的多核苷酸构建体”指的是多核苷酸构建体在至少一种结构和/或功能性组分上有差异,例如,关于完整构建体的某些部分或是在不同的系统中制备的。例如,技术人员已知,多核苷酸构建体或载体,分别可关于其所含有的功能性元件而不同,取决于其意欲为何种用途。如果载体例如,仅用于在合适的宿主细胞中分别扩增多核苷酸或插入物,其应当至少包含允许载体和所包含的插入物在宿主细胞中半独立复制的复制起始点(ori)。此外,此类载体可含有其它的功能性元件,如多克隆位点(MCS),其包括用于插入物的插入的核苷酸突出部分,或多个允许多核苷酸插入的限制性酶共有位点。如果需要插入物的转录,那么载体还应当含有启动子序列。然而,这些载体通常缺乏多核苷酸表达所必须的功能性序列。在需要多核苷酸的表达以引起增强的针对所表达的多肽的抗体生成的情况下,载体还包含聚腺苷酸化序列,其在经转录的前mRNA末端产生聚腺苷酸尾巴,这保护mRNA不受核酸外切酶作用并确保转录及翻译终止。此外,此聚腺苷酸尾巴已稳定mRNA的生产。此外,有利的只是最短长度的不翻译区(UTR)或完全没有UTR,因为UTR含有可能有碍转录或翻译的特定特征。此外,这些载体还应当在mRNA中包含Kozak序列,其组装核糖体用于mRNA的翻译。

[0123] 在存在于待测组合物中的活性物质为通过使用多核苷酸构建体产生的病毒抗原或病毒颗粒的情况下,病毒抗原或病毒颗粒因而如下产生:通过使用优选不同于用于免疫合适的动物(即用于步骤a)的抗体产生,其中所述抗体优选特异性地结合于用于免疫的多核苷酸构建体所包含的多核苷酸序列的表达产物)的多核苷酸构建体的多核苷酸构建体。例如,这些多核苷酸构建体可关于聚腺苷酸序列、不翻译区或启动子区的存在有差异,并且

更优选地关于聚腺苷酸序列的存在有差异。

[0124] 如果否则,用于生产活性物质的多核苷酸构建体不仅编码此活性物质的序列,还编码污染物的序列,那么在用此多核苷酸构建体免疫受试者后,除了活性物质的编码序列,此污染物编码序列将在所述受试者中表达。作为结果,经免疫的受试者将生成不仅对活性物质,而且对污染性(多)肽有特异性的抗体。因此,这些污染物特异性抗体能够中和污染物,从而导致假阴性测试结果。

[0125] 然而,通过使用不同的多核苷酸构建体,在外来物质测试中避免了假阴性测试结果,因为没有产生针对此污染性多肽的抗体。如上文描述的,所述多核苷酸构建体可在结构和/或功能性元件上有差异,取决于其意欲为何种用途:根据本发明,在多核苷酸构建体用于生成特异性抗体的情况下,优选使用表达载体,因为需要在经免疫的受试者中表达编码活性物质的至少一部分的多核苷酸。备选地,还可能是多核苷酸构建体在其各自编码的多核苷酸方面有差异:通过应用本发明,例如,用于免疫受试者的表达载体携带编码完整活性物质的多核苷酸序列不是必需的。为了在经免疫的受试者中产生特异性抗体,表达载体只携带编码活性物质的一部分(例如编码活性物质的一个或多个保守区域)的多核苷酸序列也可以是合适的。

[0126] 此外,在本发明的优选实施方式中,编码活性物质的至少一部分的多核苷酸序列可以是密码子优化的,特别是对用于用多核苷酸构建体免疫的受试者密码子优化的(见下文)。通过实施上文概述的修饰——使用不同的结构和/或功能性元件、表达编码例如活性物质的仅仅一部分的多核苷酸序列和多核苷酸序列的密码子优化——额外地表达编码污染物的序列的风险几乎不存在。如果待测组合物应满足高质量要求,例如用于药物组合物如疫苗,这是特别有利的。此外,上文提到的多核苷酸的修饰可能额外地引起显著改善的表达速率,从而产生增强的抗体生产,以及增强的中和能力。

[0127] 在其它的优选实施方式中,包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体是密码子优化的,尤其是通过对用于用多核苷酸构建体免疫的受试者进行的密码子优化。如本领域技术人员已知的,每个特定的氨基酸都是由最少一个密码子、最多六个密码子编码的。之前的研究显示了,编码细胞的多肽的基因中密码子的使用在物种之间是有偏向的(Kanaya, S, Y. Yamada, Y. Kudo和T. Ikemura(1999), “Studies of codon usage and tRNA genes at 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis.”, *Gene* 238:143-155)。遗传密码的简并性为本领域技术人员特别提供了根据靶宿主细胞的密码子偏好调整多核苷酸序列的可能性,从而优化本发明的所需抗原结合多肽的表达。本领域技术人员已知如何根据用多核苷酸构建体免疫的靶宿主细胞或生物体的密码子偏好调整多核苷酸序列。例如,如果被免疫的生物体为合适的动物(如兔子、绵羊、山羊、大鼠或小鼠),可根据各动物的密码子偏好调整多核苷酸序列。存在一些用于针对生物体特异性密码子使用和生物体特异性密码子对使用而优化各基因设计的软件工具(算法),例如CODA基因组学的“Protein Translation Engineering® technologies”。

[0128] 在本发明的其它优选实施方式中,抗体用于中和或灭活给定的活性物质,随后测试作为外来物质的病毒和/或细菌。这些经测试的病毒和/或细菌可例如选自:肺病毒亚科,

例如肺病毒属,包括呼吸道合胞体病毒(RSV);副黏液病毒科的麻疹病毒属,例如麻疹病毒;小核糖核酸病毒科的肠道病毒属,如柯萨奇病毒(例如柯萨奇B5,埃柯病毒,A-D型肠道病毒和鼻病毒);哺乳动物呼肠病毒科,特别是正呼肠病毒(例如哺乳动物呼肠病毒如1、2和3型呼肠病毒)和轮状病毒;逆转录病毒科的成员,例如正逆转录病毒(如逆转录酶病毒),副黏液病毒科的偏肺病毒如人偏肺病毒(HMPV)或1、2、3和4型副流感病毒;副黏液病毒科的腮腺炎病毒属,如腮腺炎病毒;披膜病毒科,如风疹病毒;冠状病毒科,如SARS冠状病毒及其它人冠状病毒,如冠状病毒OC43、229E、NL63和HKU1;小核糖核酸病毒科的鼻病毒,例如鼻病毒M-株;水痘带状疱疹病毒(VZV),也已知为人疱疹病毒2(HHV3);多瘤病毒科,如SV-40多瘤病毒、BK多瘤病毒和JC多瘤病毒;猪圆环病毒;猪小核糖核酸病毒,如猪水疱病病毒(SVDV)和捷申-泰法病毒;微小病毒科的成员,例如犬微小病毒(CPV),博卡病毒或猪微小病毒;副流感病毒(PIV);正黏液病毒科的成员,包括A和B型流感病毒;副黏液病毒科的成员,包括PIV-1、PIV-2和PIV-3;疱疹病毒科,如1和2型单纯性疱疹病毒,6、7或8型人单纯性疱疹病毒,巨细胞病毒和EB病毒;腺病毒科,例如腺病毒,包括人、猿、和鸟腺病毒,如鸟腺病毒1;鸟圆环病毒;鸟呼肠病毒科,特别是正呼肠病毒,如鸟呼肠孤病毒;乳头状瘤病毒科的成员,包括人乳头状瘤病毒;黄病毒科的成员,如西尼罗河病毒;以及双核糖核酸病毒科,例如传染性法式囊病毒(也已知为甘布罗病毒);衣原体细菌,包括沙眼衣原体、肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体;以及支原体。

[0129] 在根据本发明的其它优选实施方式中,包含在多核苷酸构建体中的多肽含有血凝素(HA)和/或神经氨酸酶(NA)编码序列。血凝素可在例如流感病毒的表面上找到。它是抗原性糖蛋白,促成病毒与被感染的细胞结合。迄今,已知至少16种不同的流感HA抗原。这些亚型被命名为H1至H16。NA是切割神经氨酸的糖苷连接的酶。迄今,已知至少9种流感神经氨酸酶亚型。这些亚型可在例如本领域技术人员已知的数据库,如PubMed数据库中找到(例如<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/145284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence-ResultsPanel.Sequence-RVDocSum>)。在优选的实施方式中,多核苷酸构建体包含单独地或相互组合地任意所述HA和/或NA编码序列。也有可能的是,多核苷酸构建体只含有这些序列的部分。优选地,多核苷酸构建体包含单独地或相互组合地编码H1、H2、H3、H5、H6、H7、N1、N2、N3或N7的完整序列或部分序列,优选是H5。在其它的优选实施方式中,多核苷酸构建体包含编码H1N1、H2N2、H3N2、H6N1、H7N3或H7N7的序列或部分序列,优选包含编码H5N1的序列或部分序列。

[0130] 在根据本发明的其它优选实施方式中,活性物质包含流感抗原且多核苷酸构建体包含与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有例如至少90%,优选例如至少95%,最优选例如100%的序列同一性的多核苷酸序列。这些多核苷酸序列经密码子优化用于有效的表达,并因此用于哺乳动物受试者中基于DNA载体的流感抗原的免疫概念,优选是对于流感的HA和NA编码序列中的任何一种或二者,更优选是分别与H5和N1相关的那些。多核苷酸构建体可例如还包括与上文提到的核苷酸序列(SEQ ID NO:1或2中显示的核酸)的互补链杂交的多核苷酸序列,或是上文提到的核苷酸序列的简并物。术语“相杂交”或“杂交”描述了这样的过程,其中单链多核苷酸与互补多核苷酸链进行碱基配对。在本发明的情境中,术语“杂交”

指的是在常规杂交条件下,优选在严紧条件下,如Sambrook等人(2000)的Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY中所描述的条件下的杂交。合适的严紧条件包括温度为35摄氏度至65摄氏度,大约0.9摩尔的盐溶液。严紧的杂交条件可包括以下条件:

杂交缓冲液: 7% SDS
250 mM NaCl
250 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.0
1 mM EDTA

[0131] **杂交温度:** 58 摄氏度至 60 摄氏度
杂交时间: 过夜
洗涤缓冲液: (I) 2 × SSC, 0.1% SDS
(II) 0.2 × SSC, 0.1% SDS
洗涤温度和时间: 在 55 摄氏度至 60 摄氏度下各自 2 × 30min

[0132] 上文提及的与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有例如至少90%,优选例如至少95%,和最优选例如100%的序列同一性的多核苷酸还包括此多核苷酸序列的片段、衍生物、类似物或部分。所述片段、衍生物、类似物或部分也可以是天然发生的变异或突变,其中这些突变可能是天然发生的或例如通过靶向诱变而引入的。此外,这些变异可以进一步包括合成的序列。

[0133] 术语“片段”将被理解为多核苷酸序列的部分,其足够长以编码所描述的多肽之一。术语“衍生物”在本语境中指的是与上文描述的多核苷酸序列在一个或数个位置不同的序列,但与这些序列有高度同源性。此处的同源性指的是至少40%的序列同一性,特别是至少60%或70%的同一性,优选至少80%、82%、84%、86%或88%的同一性,特别优选至少90%、92%、94%、96%或98%的同一性。上文描述的核苷酸序列的变异是例如通过缺失、置换、插入或重组引起的。

[0134] 为了确定两个氨基酸或核苷酸序列之间的同源性(=同一性)百分比,比对这两个序列,并比较每个位置上的氨基酸或核苷酸。如果序列中的一个位置被相同的氨基酸或相同的核苷酸所占据,则分子在此位置是同源的(=同一的)。两个序列之间的同源性百分比为同一的共同位置的数目的函数(即,同源性=同一的位置的数目/位置的总数×100)。

[0135] 同源性是在总氨基酸或核苷酸序列区域中计算的。为了比较不同的序列,本领域技术人员可获得各种基于不同算法的程序。Needleman和Wunsch或Smith和Waterman的算法提供特别可靠的结果。对于序列比对和比较,可使用程序“PileUp”(J.Mol.Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins等人, CABIOS, 5:1989:151-153)或“Gap”和“BestFit”[Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol. 48:443-453(1970)以及Smith和Waterman(Adv. Appl. Math. 2:482-489(1981))], 其包括在GCG软件包中[Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711(1991)]。上文提到的序列同源性值作为百分比可介由“Gap”程序在总的序列区域上确定,伴有以下调整:缺口加权:50,长度加权:3,平均匹配:10.000,平均错配:0.000。这些调整能用作序列同源性分析的标准调整。

[0136] 本发明还涉及包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体用于产

生特异性针对所述活性物质的抗体以测试任意以下杂件的用途：

[0137] i)待测组合中活性物质的存在与否，

[0138] ii)组合中任何外来或感染性物质的存在与否，

[0139] 其中通过用所述多核苷酸构建体免疫受试者而提供抗体，且其中活性物质被所述抗体中和或灭活。

[0140] 使用根据本发明的多核苷酸构建体允许提供对含有活性物质的组合物进行快速、有效且可靠的测试。通过使用由用多核苷酸构建体免疫受试者而提供的抗体，避免了用活性物质本身免疫受试者时可能发生的污染。因此，使用本发明的多核苷酸构建体调免了假阴性测试结果。此外，加快了在各个测试中使用的抗体的生成。因此，测试更快了。如果待测组合物中的活性物质由病毒颗粒构成或源自病毒颗粒，这可以是特别有利的，因为疫苗释放前置时间可被显著地减少。这对基于细胞培养技术生产的疫苗尤其重要。

[0141] 通常，通过使用包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体来产生特异性针对所述活性物质的抗体，组合物没有任何活性表示抗体灭活或中和了活性物质，且没有其它抗原存在于待测组合物中。

[0142] 对待测组合物中的给定活性物质没有任何活性响应意味着组合物中存在的活性物质已经通过抗体与活性物质的特异性结合而被中和或灭活了。被中和的活性物质与特异性抗体相互作用，例如，与抗体形成复合物，并因此基本上不能够再有效，优选地，被中和的活性物质为完全失效的。在本发明的意义中，失效的活性物质为例如不再能够实施其功能，例如其药学或免疫学功能。还可能是失效的活性物质在与活性物质-敏感检测细胞系接触时不再能够引起病原性效应。抗体的中和效力可如上文所述的进行测试。然而，被发现有活性的组合物仍然含有活性物质，并因此是有效的。

[0143] 上文描述了多核苷酸构建体、活性物质、待测组合物和外来或感染性物质，以及对合适的受试者的免疫及活性物质的中和。优选地，活性物质为抗原，更优选为病毒抗原或病毒颗粒，或者，活性物质包含病毒或病毒颗粒的至少一种组分，优选地，活性物质为流感病毒颗粒。优选地，待测组合物为来自其中产生活性物质的细胞培养物的样品，或源自此细胞培养物的产物，还优选的是待测组合物为药物组合物，优选疫苗制备物或其中间产物。还优选地，待测组合物分别为种病毒或含有种病毒的组合物。

[0144] 还优选地，外来或感染性物质为如上文所述的病毒。

[0145] 通过使用包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体来产生特异性地针对所述活性物质的抗体，例如可实施(阴性或阳性)对照测试。在此类对照测试中，应特别地关于组合物中是否存在活性物质(抗体所针对的部分)而测试组合物。为此目的，使通过用多核苷酸构建体免疫合适的受试者而提供的抗体与待测组合物相接触。在加入特异性抗体后测试的组合物不显示任何活性的情况下，此活性物质存在于该组合物中。任选地，在使待测组合物与特异性抗体接触之前，可如上文所述测试抗体的中和效力。

[0146] 在其它的优选实施方式中，通过使用包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体来产生特异性针对所述活性物质的抗体，例如可实施外来物质的测试。可如上文所述实施外来物质测试。

[0147] 本发明还涉及生产药物组合物特别是疫苗的方法，其中在生产过程中的至少一个时间点实施如上文所述的用于测试组合物中外来物质的方法。外来物质测试可分别在药物

组合物的生产或制造过程的任何阶段实施。优选地,测试可在种批次或病毒收获物上实施,且更优选地,测试可在种批次上实施。此外,其还可被实施一次或重复实施,例如,在细胞培养的开始和/或结束时或二者之间实施。也可在现成的疫苗制备物上实施外来物质测试,包括例如测试生产批次中的一个或多个样品。

[0148] 任选地,实施了处理药物组合物,特别是疫苗或其中间产物,和/或药物组合物或疫苗从其中源自的细胞培养物的步骤,其中移除和/或灭活了外来物质。适合从各组合物或细胞培养物中移除外来物质的方法是本领域技术人员已知的,且包括化学和/或物理灭活或移除方法,例如,过滤方法、吸附方法、化学处理通过例如甲醛或 β -丙内酯、物理处理如加热和/或电磁辐射(例如UV-C处理或 γ 辐射照射),等等。本发明的有用的方法的其它益处在于,一旦表明了外来物质的存在,可特异地调整外来物质移除步骤以移除和/或灭活所述外来物质。例如,如果(任选地)鉴别了存在于待测组合物中的外来物质,可使用已知特别地移除和/或灭活所述外来物质的特异性的移除和/或灭活方法。通过移除和/或灭活所述外来物质,例如可避免丢弃整个组合物批次,从而节约时间和金钱。

[0149] 此外,本发明涉及针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体用于纯化活性物质的用途,所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列,其中所述抗体特异性地结合活性物质,并且其中所述抗体和活性物质不是源自使用相同的多核苷酸构建体。术语“针对多核苷酸构建体的表达产物而产生的抗体”和“抗体和活性物质不是源自使用相同的多核苷酸构建体”在上文中有所描述。如本文所使用的,术语“纯化”包括但不限于亲和纯化和分离(例如不同抗原的分离),其中亲和纯化用于通过蛋白质与已经固定在固体支持物(例如柱子)上的其它蛋白质(如抗体,如本文所述而产生的)的亲和力而使所述蛋白质保留在柱子上而纯化所述蛋白质。优选地,活性物质为病毒抗原,特别是流感抗原。使用根据本发明的抗体允许快速、高特异性地纯化源自或代表需要纯化的病毒株的病毒颗粒,因为用于纯化的抗体是针对此病毒株的表达产物特异性地产生的。

[0150] 优选地,用于纯化活性物质的抗体是如上文所定义的抗体。还优选地,用于纯化目的的抗体还包含用于结合固相的亲标签。

[0151] 此外,本发明涉及包含与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有例如至少90%,优选例如至少95%的序列同一性的序列的多核苷酸。最优选地,所述多核苷酸具有如SEQ ID NO:1或2所示的核酸。关于所述多核苷酸,参考上文的描述。

[0152] 本发明还涉及包含含有与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有例如至少90%,优选例如至少95%的序列同一性的序列的多核苷酸的多核苷酸构建体。最优选地,所述多核苷酸构建体具有如SEQ ID NO:1或2中所描述的序列。关于所述的多核苷酸,参考上文的描述。多核苷酸构建体也在上文有所描述。

[0153] 本发明的另一个方面是提供原核或真核宿主细胞,其包含如上文所述的根据本发明的多核苷酸或包含所述多核苷酸的多核苷酸构建体。优选地,宿主细胞是用上文所描述的本发明的多核苷酸构建体稳定或瞬时转化的。关于转化程序,注意到转化可根据标准方案实施。然而,参考的是Sambrook等人(2000),的Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY。本发明的另一个方面是提供非人生物体、转基因动物及转基因微生物,其分别含有本发明的上述多核苷酸或上述载体或多核苷酸构建体。

[0154] 优选地,本发明的宿主细胞或动物或微生物表达并合成本发明的抗原结合多肽。

[0155] 这些宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,优选微生物细胞,更优选细菌、酵母、真菌和藻类细胞。在微生物细胞中特别优选的是大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞、链霉菌属(*Streptomyces*)细胞、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞或裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)细胞,最优选大肠杆菌细胞。

[0156] 此外,本发明提供特异于由根据本发明的多核苷酸编码的多肽的抗体,以及生产所述抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0157] a)提供本发明的多核苷酸构建体,以及

[0158] b)用所述多核苷酸构建体免疫合适的受试者,优选合适的非人动物如小鼠、大鼠、山羊、绵羊、豚鼠或兔子,更优选兔子。

[0159] 多核苷酸构建体及对合适受试者的免疫在上文中进行了描述。这些抗体可通过技术人员已知的任何标准程序被回收。这些抗体可例如用于中和或纯化特定的抗原。

[0160] 此外,本发明还涉及用于测试组合物中外来物质的分部试剂盒的用途,所述试剂盒包括

[0161] a)包含编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体,以及

[0162] c)宿主细胞。

[0163] 关于术语外来物质、多核苷酸构建体、活性物质和宿主细胞,以及关于用于测试外来物质的方法,参考上文的描述。

[0164] 在进一步的方面,本发明还涉及分部试剂盒,包括

[0165] a)包含与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的、编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体,或包含如SEQ ID NO:1或2中描述的序列的多核苷酸构建体,以及

[0166] b)宿主细胞。

[0167] 关于术语活性物质、多核苷酸构建体和宿主细胞,参考上文的描述。

[0168] 包含与SEQ ID NO:1或2所示的核酸具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的、编码活性物质的至少一部分的序列的多核苷酸构建体,或包含如SEQ ID NO:1或2中描述的序列的多核苷酸构建体被用于转化合适的宿主细胞,如细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、藻类细胞、植物细胞或昆虫细胞,优选为细菌细胞如大肠杆菌细胞。在合适的培养基中培养经转化的宿主细胞,然后收集并裂解所述细胞,并且回收多核苷酸构建体。然后,如上文所述,将扩增的多核苷酸构建体用于免疫受试者。此经免疫的受试者转而产生针对多核苷酸构建体的表达产物的抗体,例如在这种情况下是针对为活性物质的至少一部分的蛋白质。然后,所述抗体可用于测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质,其中活性物质至少部分地由与SEQ ID NO:1或2所示核酸具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的序列编码,或其中活性物质至少部分地由如SEQ ID NO:1或2中所描述的序列编码。

[0169] 关于测试组合物中的所述外来物质的方法,参考上文的描述。

[0170] 以下附图及实施例更详细地阐述了本发明,然而其只为阐述性目的而呈递,不应被理解为以任何方式限制本发明的范围。

附图说明

[0171] 图1显示了密码子优化的血凝素抗原(HA;SEQ ID NO:1)的核苷酸序列。前三个和最后三个核苷酸(加下划线的)分别代表起始和终止密码子。

[0172] 图2显示了密码子优化的神经氨酸酶抗原(NA;SEQ ID NO:2)的核苷酸序列。前三个和最后三个核苷酸(加下划线的)分别代表起始和终止密码子。

[0173] 图3显示了pCMV-HA的DNA构建体图谱,包含编码HA的密码子优化的序列。

[0174] 图4显示了pCMV-NA的DNA构建体图谱,包含编码NA的密码子优化的序列。

[0175] 图5显示了pCMV-HA的完整质粒DNA序列。用于质粒构建的限制性酶是加下划线的,且经CODA算法优化的HA基因序列是粗体的。

[0176] 图6显示了pCMV-NA的完整质粒DNA序列。用于质粒构建的限制性酶是加下划线的,经CODA算法优化的NA基因序列是粗体的。

实施例

[0177] 1. 编码HA和NA的多核苷酸及DNA构建体的制备

[0178] 分别从流感病毒A/Viet Nam/1194/2004(H5N1)的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)蛋白质的已知序列制备了DNA载体(分别编码HA和NA的序列在PubMed数据库中公开,见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284463?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum,和http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284406?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum)

[0179] 按例如Roth,D.A.等人的“Translational Engineering and Synthetic Biology”,Landes Bioscience,2007中所描述的,对HA和NA编码序列进行计算优化。特别地,HA和NA编码序列的密码子使用和密码子对使用是根据家兔(*Oryctolagus cuniculus*)进行优化的。在上文的描述中所述的合理同源性变异范围内,同样可对其它要通过所提供的HA和NA编码序列免疫的受试者实施密码子优化。上游5'非翻译区也被优化以避免可能阻碍翻译起始的不希望的二级RNA结构。组装经CODA算法优化的HA和NA基因并将其克隆到pCMV载体中,其中所述载体可商业上地获得自一系列供应商,如Clontech Laboratories, Inc.。两种pCMV构建体都含有以下特征:

[0180] -巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的哺乳动物表达载体,其用于生产高水平的RNA转录物,

[0181] -置于ATG起始密码子前的Kozak共有序列,以确保有效的核糖体结合,并因此最高水平的蛋白质翻译,

[0182] -转录终止信号,poly(A)信号被置于基因末端以确保合适的转录终止。

[0183] 使用限制性酶(Nhe I和Xba I)将经CODA算法优化的HA和NA基因亚克隆至CMV启动子驱动的载体中,并分别命名为pCMV-HA和pCMV-NA。通过限制性酶消化和DNA测序证实正确的序列。载体图谱和DNA序列列于图3-6中。

[0184] 将DNA构建体分别地转染到大肠杆菌细胞中,由其制备主细胞库(Master Cell

Bank, MCB)。根据技术人员已知的标准方法,就无菌性、噬菌体、质粒标志物保持以及质粒鉴别测试MCB。

[0185] 2. 质粒生产

[0186] 由大肠杆菌培养物进行大批量质粒生产,随后进行质粒分离、纯化和鉴定。根据技术人员已知的标准方法,就DNA完整性、OD 260/280比率、琼脂糖凝胶分析、限制性分析、DNA序列、污染性蛋白质和内毒素测试经纯化的大批量质粒。

[0187] 3. 动物的免疫和抗血清的生成

[0188] 随后,通过免疫2组(每组各6只)兔子来生成抗血清。在研究的第0、28和56天用0.5mI DNA材料(即质粒)接种每只兔子。每个剂量由1.0mg的总DNA组成。一组兔子用单价HA DNA免疫,另一组兔子用HA和NA DNA的二价1:1混合物免疫。在第0、28、35、42和56天从所有动物中收集免疫前以及免疫后的血液样品。在研究的第70天,通过放血处死所有动物。所有的兔子在整个观察期间都是健康、活跃的并且没有任何显示剂量或测试项目相关问题的临床症状。所有的兔子都是健康的,并在整个研究时期中存活,并且没有显示任何对抗原的不良反应。

[0189] 获得的含有所产生的抗体的血液可被激发(worked up),例如用于获得含有特异性中和抗体的血清样品,或用于获得特异于质粒/载体表达产物的分离的抗体。

[0190] 4. 中和测试

[0191] 可以由所收集的血液制备血清样品,并可实施针对流行性参照株NIBRG-14的工作种病毒(Working Seed Virus, WSV)的中和效力测试。NIBRG-14为用于疫苗制造的重组A/Viet Nam/1194/2004样株系;此株系可获自NIBSC(参见<http://www.nibsc.ac.uk/>和http://www.nibsc.ac.uk/flU_site/pandemic.html)。这些血清中和测试可如下进行:

[0192] 可将2倍稀释的WSV与一系列12个最终兔血的四个3倍稀释液混合。这些血清稀释液可在单独的烧瓶中制备,而均质化和对边缘的包被可通过在烧瓶中轻轻转动溶液而进行。可将WSV直接吸移到血清稀释液中,然后可使所产生的稀释液轻柔地均质化。然后,可将稀释液转移到新的干净的烧瓶中,并通过在转动板上轻柔地转动而在37℃孵育2小时。

[0193] 接种细胞的前一天,可准备每种细胞系的75cm²烧瓶:6个烧瓶用于中和的WSV,一个烧瓶用于阳性和抑制对照,一个烧瓶用于阴性对照。

[0194] 阳性对照

[0195] 阳性对照对应于接种大约1000 TCID₅₀(“组织培养感染剂量”;会在50%的细胞培养物中产生病理学变化的病原性物质的量)的人副流感3病毒。可在第0天接种一个阳性对照并将其用作第14天的血细胞吸附和/或血细胞凝集测试的阳性对照。

[0196] 抑制对照

[0197] 可用待测样品接种靶标细胞,所述待测样品之前掺入了大约1000 TCID₅₀的人副流感3病毒。

[0198] 阴性对照

[0199] 对于阴性对照,每个烧瓶可接种特异于每个细胞系的稀释液培养基。可在与待测样品相同的条件下处理此对照。

[0200] 接种

[0201] 然后,经反应的(即潜在地被中和的)WSV稀释液可被接种到三个检测细胞系上

(Vero细胞(获自美国典型培养物保藏中心(ATTC)CCL-81; Yasumunra Y. 等人, 1962), MRC-5细胞(获自ATCC CCL-171; Jacobs J.P. 等人, 1970)和MDCK细胞(ECACC 84121903; S.H. Darby, 1958))。可将3mI的每种溶液(稀释培养基, 待测样品)接种到潜在被中和的WSV和对照的每个烧瓶中。在37℃+/-2℃下70分钟+/-10分钟后, 可移除接种物。然后可加入存活培养基以获得20mI的终体积。可在5+/-0.5%CO₂的存在下, 将培养瓶置于37℃+/-2℃。

[0202] 可在倒置显微镜下定期观察所接种的细胞14天, 并就细胞病变效应(CPE)的存在和血细胞凝集活性进行检查。可通过观察CPE, 通过血细胞吸附测试以及通过血细胞凝集测试检测中和效力。

[0203] 4.1 CPE的观察

[0204] 在测试期间可在倒置显微镜下定期观察细胞。

[0205] 4.2 血细胞吸附测试

[0206] 可在测试期末(第14天)进行血细胞吸附测试。可用PBS缓冲液冲洗单层细胞一次或两次。然后, 可将于PBS中制备的含有0.4%的三种类型(人、Hartley豚鼠和公鸡)红细胞的溶液加入每个孔中。血细胞吸附是病毒感染特异性的, 并且当一种红细胞固定于细胞上时为阳性。在5℃+/-3℃下孵育大约30分钟之后, 可对细胞进行显微镜检查。然后, 在第二次观察之前, 可将平板在37℃+/-2℃下再孵育大约30分钟。

[0207] 4.3 血细胞凝集测试

[0208] 在第14天, 可在来自用于血细胞吸附测试的烧瓶中的细胞培养物的上清液上进行血细胞凝集测试。可通过低速离心回收并澄清所述上清液。然后, 可将澄清的上清液置于6孔板中。然后, 可将于PBS中制备的含有0.25%的三种(人、Hartley豚鼠和公鸡)红细胞的溶液加入每个孔中。在5℃+/-3℃下孵育大约30分钟之后, 可对上清液进行显微镜检查。然后, 在第二次观察之前, 可将6孔板在37℃+/-2℃下再孵育大约30分钟。

[0209] 使用特定的细胞系, 通过观察到不存在病毒CPE且不存在特异性血细胞吸附和/或血细胞凝集活性, 认为测试样品没有病毒污染物。

[0210] 此外, 可根据相同的程序测试48份中间时期血液, 除了只使用一种细胞系(MDCK)。结果可与那些使用灭活重组A/Viet Nam/1203/2004样病毒(一种已知在雪貂中诱导针对A/Viet Nam/1194/2004的交叉反应抗体的病毒株)接种兔子之后制备的血清获得的结果进行比较。

[0211] 4.4 鸡胚蛋

[0212] 根据欧洲药典第6版, 2.6.16章, 可使用鸡胚蛋实施血细胞凝集测试。

[0213] 简要地, 可使用SPF(无特定病原体)蛋(蛋的来源: Couvoir de CerveIoup, 400, domaine de CerveIoup 38210 Vourey, 法国), 所述蛋从接收直至可被孵育一直被保存在12℃+/-3℃下。孵育可在37℃+/-2℃下、70%湿度的气氛中进行。

[0214] 样品制备

[0215] 可用兔或绵羊抗血清中和WSV。可加入水性溶液中的1%的抗生素以避免蛋的细菌污染。然后, 可用适当的注射针将样品注射到蛋中。

[0216] 蛋的预孵育

[0217] 在收到时和预孵育之前, 可大致观察蛋, 并丢弃损坏的蛋。然后, 可在37℃下将蛋预孵育9-11天。在预孵育期末, 可在冷光下观察这些蛋以避免加热, 并丢弃未受精的蛋或没

有活的胚胎的蛋。

[0218] 接种

[0219] 为了分析待测样品(潜在被中和的WSV),可在孵育9-11天后经尿囊途径接种30枚蛋,而为了测试对照,可接种25枚蛋。

[0220] 作为阴性对照,可用下述接种蛋:补充了抗生素的PBS(例如10枚蛋),单独地用未稀释的兔抗血清(例如5枚蛋),和单独地两种绵羊抗血清(例如每种5枚蛋)。

[0221] 作为血细胞凝集测试的阳性对照,可使用仙台病毒(未稀释的)。

[0222] 可如下进行接种:

[0223] 在对蛋壳消毒之后,可在壳中打孔,并可通过尿囊途径在55枚蛋中接种0.5mI待测样品。可填充蛋壳中的孔,并且可在37°C+/-2°C下孵育所述蛋7天。

[0224] 在孵育期末,可在观察后从活胚胎收集尿囊液。在观察到死亡胚胎的情况下,可将各胚胎的液体分别储存于<-70°C和5°C+/-3°C(在细菌污染的情况下)用于进一步研究。

[0225] 血细胞凝集测试

[0226] 在孵育期末,可如下实施血细胞凝集测试:

[0227] 可通过离心(2500g,10分钟)来澄清液体,并将200μI液体分配到四个96孔板中(每孔50μI)以进行血细胞凝集测试。简要地,可在两块96孔板的孔中加入50μI含有0.5%红细胞(豚鼠;购自Charles River Laboratory,法国)的溶液,在另外两块96孔板的孔中加入50μI含有0.5%红细胞(母鸡)的溶液。可将一半的平板在5°C+/-3°C下孵育,将另一半在室温下孵育。孵育两小时后,就血细胞凝集活性检查平板。

[0228] 如果在从经接种的蛋中收集的液体中没能观察到特异性血细胞凝集活性,则认为待测样品没有病毒污染。

[0229] 5. 测试偶然/外来物质

[0230] 然后可将中和血清用于偶然物质测试。这些测试可根据监管要求(欧洲药典2.6.16章)实施。这些测试可在成年小鼠、乳小鼠和豚鼠中根据监管要求(例如根据欧洲药典,2005,2.6.16章(病毒种批))而实施。关于可在乳小鼠中实施的测试,注意到乳小鼠也可以在1-2日龄时用待测组合物进行接种。对于在鸟组织中繁殖的病毒,可如欧洲药典2005,2.6.16章(病毒种批和病毒收集)中所描述的実施鸟病毒测试。

[0231] 5.1 成年小鼠:CD1小鼠

[0232] 可使三组例如10只的成年CD1小鼠(15-20g,例如购自Charles River Laboratory)适应新环境至少48小时。一组可以接受中和的血清(脑内(Ic)注射30μI,腹膜内(IP)注射500μI),一组可保留以防观察期内发生死亡,一组可用作阴性对照。

[0233] 可在测试期中定期观察小鼠(一天一次或两次)。

[0234] 如果在观察期末(21天)80%来自接受了中和的样品的组的成年小鼠存活,则待测样品中不存在病毒。

[0235] 5.2 CD1乳小鼠

[0236] 可用中和的血清接种30只1-2日龄的小鼠(购自例如Charles River Laboratory),10只小鼠可用作阴性对照。每只乳小鼠接受10μI Ic.和100μI IP的待测血清。可在测试期内定期观察小鼠(一天一次或两次)。

[0237] 如果在观察期末(14天)80%来自接受了中和的样品的组的成年小鼠存活,则待测

样品中不存在病毒。

[0238] 5.3 Hartley豚鼠

[0239] 在9只豚鼠(350-450g,购自例如Charles River Laboratory,法国)中,可向5只动物的组IP注射5000 μ I待测样品。4只动物可作为阴性对照在42天的测试期中被观察。

[0240] 如果在测试期中没有检测到病毒感染的迹象(即,死亡或肉眼可见的损害),则待测样品中不存在病毒。

序列表

- <110> Solvay Pharmaceuticals B.V.
- <120> 外来物质测试
- <130> WK 1280
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1698
- <212> DNA
- <213> 人工
- <220>
- <223> 密码子优化的血凝素(HA)抗原

[0001]

```

<400> 1
atggagaaaa ttgtgctgct gttcgccatt gtgtccctgg tgaagtcgga ccagatctgc      60
atcggctatc acgccaacaa ctccaccgag caggtcgaca ccattatgga aaagaatgtg      120
accgtgacce atgeacaaga catcctggaa aagaccaca acggcaaaact gtgcgacctg      180
gacggcgtga agcccctgat cctgcgcgac tgctccgtgg ctgggtggct gctgggaaac      240
cctatgtgcg acgagttcat caatgtgccc gagtggctct acatcgttga gaaagccaac      300
cccgtcaacg acctgtgtta ccccggtgac ttcaacgact acgaggagct caagcacctg      360
ctctcccgga tcaaccactt cgagaaaatc cagatcatcc ccaaactcctc ctggtccagc      420
cacgaagcct ccctcggcgt gtectceget tgteccctacc agggcaagtc ctccttcttc      480
cgcaacgtcg tgtggctgat caaaaagaac tccacctacc ccaccattaa gcggtectac      540
aacaacacca accggaaga cctgctggtg ctgtggggca tccaccatcc caacgacgcc      600
gctgagcaga ccaagctgta ccagaaccct accacctaca tctccgtcgg gacatccaca      660
ctgaaccagc gcctcgtgcc ccgcattgcc accccgcagca aggtgaatgg gcagtccggc      720
cgcatggagt tcttctggac aatcctgaag cccaacgacg ctatcaactt cgagtccaac      780
ggcaacttca tcgtcccga gtatgcctac aagatcgtta aaaagggcga ctccacaatc      840
atgaagtccg agttggagta cggcaactgc aacaccaagt gccagacacc catgggcgct      900
atcaactcct ccatgccctt ccacaacatc catcccctga ccattggcga gtgccccaaag      960
tacgtcaagt ccaaccggct ggtcctggct accggcctcc gcaactcccc tcaaagggaa      1020
cgcaggcgca aaaagagagg cctggtcggg gccatagctg ggttcattga gggaggggtg      1080
cagggcattg tggatgggtg gtacggctac catcactcca acgagcaggg ctccgggtat      1140
gccgccgaca aggagtccac ccagaaggcc attgacggcg tgaccaacaa ggtgaacagc      1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gctggtggcc gggagttcaa caacttgag      1260
cgccgcacg agaacctgaa caaaaagatg gaggacggct tcttgatgt gtggacctac      1320
aacgctgagc tcttgggtgct gatggagaac gagcggacce tggacttcca cgactccaac      1380
gtcaagaacc tgtacgaaa agtgccctc cagctgcggg acaacgcaa ggagctcggg      1440
aatggctgct tcgagtctta ccacaagtgc gacaacgagt gtatggagtc cgtgcgcaat      1500
ggcaactacg actatcccca gtactccgaa gaggcccgcc tgaagcgcga agagatctcc      1560
ggggtgaagt tggagtccat tggcatctac cagatcctga gcactctctc caccgtggct      1620
tcctccctcg ccctcgccat tatggtggct ggcctgtccc tgtggatgtg ctccaacggc      1680

```

	tccctgcaat gtcgctaa	1698
	<210> 2	
	<211> 1350	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 密码子优化的神经氨酸酶(NA)抗原	
	<400> 2	
	atgaacccca accagaagat catcaccatt ggcagcatct gcatggtgac cgggatcggt	60
	agcctgatgc tgcagatcgg caacatgata agcatctggg tgtcccacag catccatacc	120
	ggcaaccagc accagtcgga gccatctcc aacaccaacc tgctgaccga gaaagctgac	180
	gcctccgtga agctggctgg caactcctcc ctgtgtccta tcaatgggtg ggctgtgtac	240
	tccaaggaca actccattcg catcggcagc aaaggggatg tcttcgtgat ccgcgagcct	300
	ttcatctcct gtagccacct cgaatgccgg accttcttcc tgacacaagg agccctgctg	360
	aacgacaagc actccaacgg caccgtgaag gaccgctctc cccaccgcac cctgatgtcc	420
	tgccccgtcg gcgaagcccc tagcccctac aactcccggg tcgagtcctg cgccctggagc	480
	gcctctgcct gtcattgatg gacctcttgg ctgaccattg gcatctccgg ccctgataat	540
	ggagcagtgg ctgtgtgaa gtacaacggc atcatcaccg ataccattaa gtcttgccgc	600
	aacaacatcc tccgcaccca ggagtcggag tgtgcctgtg tcaatggctc gtgctttacc	660
	gtgatgaccg atgggccaag caatggacaa gcctcccaca agatcttcaa gatggaaaag	720
	ggcaaggtgg tgaagtccgt cgagttggac gcccttaatt accactacga ggagtgacgc	780
[0002]	tgttaccctg acgctgggga gatcacctgt gtgtgcaggg acaactggca cgggagcaac	840
	aggccttggg tctccttcaa ccagaacttg gattaccaga tcggctacat ctgttccggg	900
	gtgttcgggg ataatcccag gcctaacgat ggcaccgggt cctgtggccc tgtgagctcc	960
	aacggcgcag gcggggtcaa gggtctctcg ttcaaatatg gcaatggcgt gtggatcggg	1020
	cgcaccaagt ccacaaactc ccggtccggc ttcgagatga tctgggacct caatggatgg	1080
	accgagacag acagctcctt ctccgtcaag caggacattg tggtatcac cgactggagc	1140
	gggtacagcg gcagcttctg gcagcaccgc gagctcacag gcctcgactg cttcggccc	1200
	tgcttttggg tggaactgat ccggggacgg cctaaggaga gcacaatctg gacctccggc	1260
	tccagatctt ccttctgagg cgtgaactcc gacacagtgg ggtggtcctg gcctgacgga	1320
	gctgaactgc ccttccat tgacaagtaa	1350
	<210> 3	
	<211> 5687	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> pCMV-HA的完整质粒DNA序列	
	<400> 3	
	tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
	ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
	aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg	180
	gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240

	gcctggctga cgcgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
	agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
	ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga	420
	cggtaaatgg cccgcctggc attatgceca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
	gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacac	540
	caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
	caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc	660
	cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc	720
	tcgtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtatgtttac acagttaaat	780
	tgctaacgca gtcagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc	840
	gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa	900
	actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaceta ttggtcttac	960
	tgacatccac tttgccttc tctccacagg tctccactcc cagtccaatt acagctctta	1020
	aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagegce accatggaga aaattgtgct	1080
	gctgttcgcc atttgttccc tgggtgaagtc cgaccagatc tgcacggct atcacgcaa	1140
	caactccacc gagcaggtcg acaccattat ggaaaagaat gtgaccgtga cccatgcaca	1200
	agacatcctg gaaaagacc acaacggcaa actgtgcgac ctggacggcg tgaagcccct	1260
	gatcctgcgc gactgctccg tggctgggtg gctgctggga aaccctatgt gcgacgagtt	1320
[0003]	catcaatgtg cccgagtggg cctacatcgt tgagaaagcc aaccccgtca acgacctgtg	1380
	ttaccccggt gacttcaacg actacgagga gctcaagcac ctgctctccc ggatcaacca	1440
	cttcagaaaa atccagatca tccccaaatc ctctgtgccc agccacgaag cctccctcgg	1500
	cgtgtctccc gcttgtccct accagggcaa gtcctccttc ttccgcaac tcgtgtggct	1560
	gatcaaaaag aactccacct accccacct taagcggccc tacaacaaca ccaaccagga	1620
	agacctgctg gtgctgtggg gcatccacca tccaacgac gccgctgagc agaccaagct	1680
	gtaccagaac cctaccacct acatctcctg cgggacatcc aactgaacc agcgcctcgt	1740
	gccccgatt gccaccgca gcaaggtgaa tgggcagtcc ggccgcatgg agttctctg	1800
	gacaatcctg aagccaacg acgctatcaa cttcgagctc aacggcaact tcatcgctcc	1860
	cgagtatgcc tacaagatcg ttaaaaaggc cgactccaca atcatgaagt ccgagttgga	1920
	gtacggcaac tgcaacacca agtgccagac acccatgggc gctatcaact cctccatgcc	1980
	cttcacaac atccatcccc tgaccattgg cgagtgeccc aagtacgtca agtccaaccg	2040
	gctggctctg gctaccggcc tcogcaactc ccctcaaagg gaacgcaggc gcaaaaagag	2100
	aggcctgttc ggagccatag ctgggttcat tgagggaggg tggcagggca tgggtgatgg	2160
	gtggtacggc taccatcact ccaacgagca gggctccggg tatgccgccg acaaggagtc	2220
	caccagaag gccattgacg gcgtgaccaa caaggtgaac agcatcatcg acaagatgaa	2280
	caccagttc gaggctgttg gccgggagtt caacaacttg gagcgcgca tcgagaacct	2340
	gaacaaaaag atggaggacg gcttcctgga tgtgtggacc tacaacgctg agctcctggt	2400
	gctgatggag aacgagcgga ccctggactt ccacgactcc aacgtcaaga acctgtacga	2460
	caaagtgcgc ctccagctgc gggacaacgc caaggagctc gggaatggct gcttcgagtt	2520

ctaccacaag tgcgacaacg agtgtatgga gtccgtgcgc aatggcacct acgactatcc 2580
 ccagtactcc gaagaggccc gcctgaagcg cgaagagatc tccggggtga agttggagtc 2640
 cattggcatc taccagatcc tgagcatcta ctccaccgtg gcttcctccc tcgccctcgc 2700
 cattatggtg gctggcctgt ccctgtggat gtgctccaac ggctccctgc aatgtcgcga 2760
 atctagagtc gacctgggcg gccgcttcga gcagacatga taagatacat tgatgagttt 2820
 ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct 2880
 attgctttat ttgtaacct tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt 2940
 cattttatgt ttcaggttca gggggagatg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaacctc 3000
 tacaatgtg gtaaaatcga taagtatccg ggctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc 3060
 gatcgcctt cccaacagtt ggcagcctg aatggcgaat ggacgcgcc tgtagcggcg 3120
 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgc 3180
 tagcgcgcc tcctttcgtt ttcttcctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc 3240
 gtaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt tagtgcctta cggcacctcg 3300
 acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatgcgcc tgatagacgg 3360
 tttttcgccc tttgacgtt gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg 3420
 gaacaacact caacctatc tcggtctatt cttttgattt ataaggatt ttgccgattt 3480
 cggcctattg gttaaaaat gagctgattt acaaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa 3540
 tattaacgt tacaatttc tgatcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 3600
 acaccgcata tgglgcactc tcagtacaat ctgctctgat gcccatagt taagccagcc 3660
 [0004] ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacggct tgcctgctcc cggcatccgc 3720
 ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcacc 3780
 accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatagccta tttttatagg ttaatgtcat 3840
 gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaatgtgc gcggaacccc 3900
 tatttgitta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 3960
 ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 4020
 ccttattccc tttttgagg cattttgcct tctgttttt gctcaccag aaacgctggt 4080
 gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacagatg ggttacatcg aactggatct 4140
 caacagcggg aagatcctg agagttttc cccgaagaa cgttttcaa tgatgagcac 4200
 ttttaaagtt ctgctatgt ggcgggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact 4260
 cggtcgcgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 4320
 gcactttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgcataa ccatgagtga 4380
 taactctgag gccacttac tctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 4440
 tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 4500
 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 4560
 caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 4620
 ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 4680
 tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag cactggggcc 4740
 agatggtaag ccttcccgtc tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 4800

tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 4860
 agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 4920
 gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaaa atcccttaac gtgagttttc 4980
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 5040
 tctgcgctga atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 5100
 gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 5160
 accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 5220
 accgcctaca tacctcgcctc tgctaatect gtaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 5280
 gtcgtgtcct accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 5340
 ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag ctgggagcga acgacctaca ccgaactgag 5400
 atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag 5460
 gtatccgcta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 5520
 cgcctggat ctttatagtc ctgctgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 5580
 gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 5640
 gttcctggcc tttgctggc cttttgctca catggctcga cagatct 5687

<210> 4
 <211> 5339
 <212> DNA
 <213> 人工

[0005] <220>
 <223> pCMV-NA的完整质粒DNA序列

<400> 4
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
 ttggccattg catacgttgt atctataca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgcccacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttccat 300
 agtaaccca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
 ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga 420
 cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcaatcac 540
 caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt caaaatgct gtaataacc 660
 cggcccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
 tegttagtg aaccgtcaga tcaactagaag ctttattgcg gtagtttate acagttaaat 780
 tgctaacgca gtcagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
 actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg gtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcgc accatgaacc ccaaccagaa 1080

gatcatcacc attggcagca tctgcatggt gaccgggac gttagcctga tgctgcagat	1140
cggaacatg atcagcatct ggggtgccca cagcatccat accggcaacc agcaccagtc	1200
cgagcccatc tccaacacca acctgctgac cgagaaagct gtcgcctccg tgaagctggc	1260
tggcaactcc tccctgtgtc ctatcaatgg gigggtgtg tactccaagg acaactccat	1320
tcgcatcggc agcaaagggg atgtcttctg gatccgcgag ccttcatct cctgtagcca	1380
cctcgaatgc cggaccttct tcttgacaca aggagccctg ctgaacgaca agcactccaa	1440
cggcaccgtg aaggaccgt ctccccaccg caccctgatg tctgccccg tcggcgaagc	1500
ccctagcccc tacaactccc ggttcgagtc cgtcgcctgg agcgcctctg cctgtcatga	1560
tgggacctct tggtgacca ttggcatctc cggccctgat aatggagcag tggctgtgct	1620
gaagtacaac ggcatcatca ccgataccat taagtctgg cgcaacaaca tctccgcac	1680
ccaggagtcc gagtgtgct gtgtcaatgg ctgctgcttt accgtgatga ccgatgggcc	1740
aagcaatgga caagcctccc acaagatctt caagatggaa aagggaagg tggtagagtc	1800
cgtcgagttg gacccccca attaccacta cgaggagtgc agctgttacc ctgacgctgg	1860
ggagatcacc tgtgtgtgca gggacaactg gcacgggagc aacaggcctt gggctctctt	1920
caaccagaac ttggagtacc agatcggcta catctgttcc ggggtgttcg gggataatcc	1980
caggcctaac gatggcaccg ggtcctgtgg ccctgtgagc tccaacggcg caggcggggt	2040
caagggttc tcgttcaaat atggcaatgg cgtgtggatc gggcgacca agtcacaaa	2100
ctcccggtcc ggcttcgaga tgatctggga cccaatgga tggaccgaga cagacagtc	2160
cttctccgtc aagcaggaca ttgtggctat caccgactgg agcgggtaca gcggcagctt	2220
cgtgcagcac cccgagctca caggcctcga ctgcattcgg ccctgctttt gggtagaact	2280
gatccgggga cggcctaagg agagcacaat ctggacctcc ggctccagca tctcctctg	2340
cggcgtgaac tccgacacag tgggtggte ctggcctgac ggagctgaac tgccttcac	2400
cattgacaag taatctagag tcgacctggg cggccgcttc gagcagacat gataagatac	2460
attgatgagt ttgacaaa cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa	2520
atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac	2580
aacaattgca ttcatTTTT gtttcaggt cagggggaga tgtgggaggt tttttaaagc	2640
aagtaaaacc tctacaatg tggtaaaac gataagtac cggctggcg taatagcgaa	2700
gaggccccga ccgatgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggacgcgc	2760
cctgtagcgg cgcattaagc gggcgggtg tgggtgttac gccagcgtg accgctacac	2820
ttgccagcgc cctagcgcgc gctccttctg ctctctccc ttcctttctc gccacgttcg	2880
ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatcggg ggtcccttt agggttccga tttagtctt	2940
tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt agggatgatg ttcacgtagt gggccatcgc	3000
cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct	3060
tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcgtctta tcttttgat ttataaggga	3120
ttttccgat ttcggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaa ttaacgcga	3180
attttaaca aatattaacg cttaaatct cctgatcggg tattttctcc ttacgatct	3240
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata	3300
gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc cgtgacgcg ccctgacggg ctgtctgct	3360

[0006]

cccggcatcc gettacagac aagetgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt 3420
 ttcaccgtca tcecegaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata 3480
 ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 3540
 gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag 3600
 acaataaccg tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca 3660
 tttccgtgic gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc 3720
 agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 3780
 cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 3840
 aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtta ttgacgccgg 3900
 gcaagagcaa ctccgtgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 3960
 agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 4020
 aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 4080
 gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 4140
 ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc 4200
 aacaacgtg cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt 4260
 aatagactgg atggagggcg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc 4320
 [0007] tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc 4380
 agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca 4440
 ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 4500
 ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 4560
 ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta 4620
 acgtgagttt tcgttccact gagegtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 4680
 agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgtaccagc 4740
 ggtggtttgt ttccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag 4800
 cagagcgagc ataccaata ctgttcttct agttagcgg tagttaggcc accacttcaa 4860
 gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc 4920
 cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 4980
 gcagcggctg ggctgaacgg ggggttctgt cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 5040
 caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag 5100
 aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct 5160
 tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcggcacc tctgacttga 5220
 gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 5280
 ggcttttcta cggttcctgg ccttttctg gccttttct cacatggctc gacagatct 5339

ATGGAGAAAATTGTGCTGCTGTTTCGCCATTGTGTCCCTGGTGAAGTCCGACCAGATCTGCATCGGCTA
TCACGCCAACAACTCCACCGAGCAGGTGACACCATTATGGAAAAGAATGTGACCGTGACCCATGCAC
AAGACATCCTGGAAAAGACCCACAACGGCAAACCTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCTGATCCTG
CGCGACTGCTCCGTGGCTGGGTGGCTGCTGGGAAACCCTATGTGCGACGAGTTCATCAATGTGCCCGA
GTGGTCCCTACATCGTTGAGAAAGCCAACCCCGTCAACGACCTGTGTTACCCCGGTGACTTCAACGACT
ACGAGGAGCTCAAGCACCTGCTCTCCCGGATCAACCCTTCGAGAAAATCCAGATCATCCCCAAATCC
TCCTGGTCCAGCCACGAAGCCTCCCTCGGCGTGTCTCCGCTTGTCCCTACCAGGGCAAGTCTCTCTT
CTTCCGCAACGTCGTGTGGCTGATCAAAAAGAACTCCACCTACCCACCATTAAGCGGTCTCTACAACA
ACACCAACCAGGAAGACCTGCTGGTGTGTGGGGCATCCACCATCCAACGACGCCGCTGAGCAGACC
AAGCTGTACCAGAACCCTACCACCTACATCTCCGTCGGGACATCCACACTGAACCAGCGCCTCGTGCC
CCGCATTGCCACCCGAGCAAGGTGAATGGGCAGTCCGGCCGCATGGAGTTCTTCTGGACAATCCTGA
AGCCCAACGACGCTATCAACTTCGAGTCCAACGGCAAACCTTCATCGCTCCCGAGTATGCCTACAAGATC
GTTAAAAAGGGCGACTCCACAATCATGAAGTCCGAGTTGGAGTACGGCAAACCTGCAACACCAAGTGCCA
GACACCCATGGGCGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCATCCCCTGACCATTGGCGAGT
GCCCCAAGTACGTCAAGTCCAACCGGCTGGTCTGGCTACCGGCCTCCGCAAACCTCCCCTCAAAGGGAA
CGCAGGGCGAAAAAGAGAGGCCTGTTCGGAGCCATAGCTGGGTTCAATTGAGGGAGGGTGGCAGGGCAT
GGTGGATGGGTGGTACGGCTACCATCACTCCAACGAGCAGGGCTCCGGGTATGCCGCCGACAAGGAGT
CCACCCAGAAGGCCATTGACGGCGTGACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAG
TTCGAGGCTGTTGGCCGGGAGTTCAACAACCTGGAGCGCCGCATCGAGAACCTGAACAAAAAGATGGA
GGACGGCTTCTGGATGTGTGGACCTACAACGCTGAGCTCCTGGTGTGATGGAGAACGAGCGGACCC
TGGACTTCCACGACTCCAACGTCAAGAACCTGTACGACAAAGTGCGCCTCCAGCTGCGGGACAACGCC
AAGGAGCTCGGGAATGGCTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCGACAACGAGTGTATGGAGTCCGTGCG
CAATGGCACCTACGACTATCCCCAGTACTCCGAAGAGGCCCGCCTGAAGCGCGAAGAGATCTCCGGGG
TGAAGTTGGAGTCCATTGGCATCTACCAGATCCTGAGCATCTACTCCACCGTGGCTTCTCCCTCGCC
CTCGCCATTATGGTGGCTGGCCTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGCTCCCTGCAATGTGCTAA

图1

ATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATTGGCAGCATCTGCATGGTGACCGGGATCGTTAGCCTGAT
 GCTGCAGATCGGCAACATGATCAGCATCTGGGTGTCCCACAGCATCCATACCGGCAACCAGCACCAGT
 CCGAGCCCATCTCCAACACCAACCTGCTGACCGAGAAAGCTGTGCCTCCGTGAAGCTGGCTGGCAAC
 TCCTCCCTGTGTCTTATCAATGGGTGGGCTGTGTACTCCAAGGACAACCTCCATTTCGCATCGGCAGCAA
 AGGGGATGTCTTCGTGATCCGCGAGCCTTTCATCTCCTGTAGCCACCTCGAATGCCGGACCTTCTTCC
 TGACACAAGGAGCCCTGCTGAACGACAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGCTCTCCCCACCGC
 ACCCTGATGTCTGCCCCGTGCGGAAGCCCTAGCCCCCTACAACCTCCCGGTTTCGAGTCCGTGCGCTG
 GAGCGCCTCTGCCTGTGATGATGGGACCTCTTGGCTGACCATTGGCATCTCCGGCCCTGATAATGGAG
 CAGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCAGTACCATTAAAGTCTGGCGCAACAACATCCTC
 CGCACCAGGAGTCCGAGTGTGCTGTGCAATGGCTCGTGTCTTACCCTGATGACCGATGGGCCAAG
 CAATGGACAAGCCTCCCACAAGATCTTCAAGATGGAAAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGAGTTGG
 ACGCCCCTAATTACCACTACGAGGAGTGCAGCTGTTACCCTGACGCTGGGGAGATCACCTGTGTGTGC
 AGGGACAACCTGGCACGGGAGCAACAGGCCTTGGGTCTCCTTCAACCAGAACTTGGAGTACCAGATCGG
 CTACATCTGTTCCGGGGTGTTCGGGGATAATCCCAGGCCTAACGATGGCACCGGGTCTCTGTGGCCCTG
 TGAGCTCCAACGGCGCAGGCGGGGTCAAGGGCTTCTCGTTCAAATATGGCAATGGCGTGTGGATCGGG
 CGCACCAAGTCCACAACTCCCGGTCCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAATGGATGGACCGAGAC
 AGACAGCTCCTTCTCCGTCAAGCAGGACATTGTGGCTATCACCAGTGGAGCGGGTACAGCGGCAGCT
 TCGTGCAGCACCCCGAGCTCACAGGCCTCGACTGCATTTCGGCCCTGCTTTTGGGTGGAAGTATCCGG
 GGACGGCCTAAGGAGAGCACAATCTGGACCTCCGGCTCCAGCATCTCCTTCTGCGGCGTGAAGTCCGA
 CACAGTGGGGTGGTCTGTCCTGACCGGAGCTGAACTGCCCTTACCATTGACAAGTAA

图2

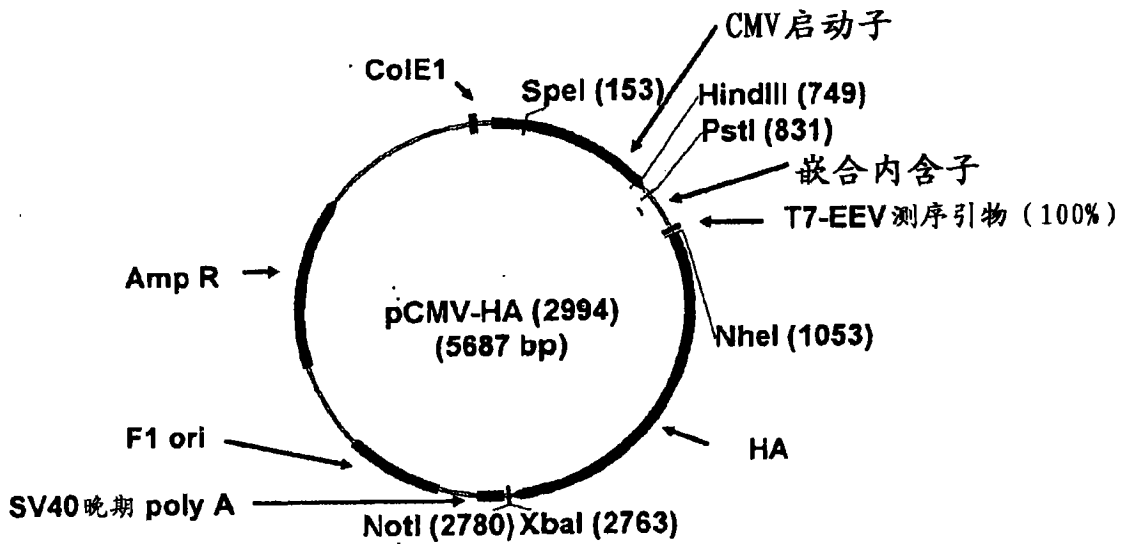


图3

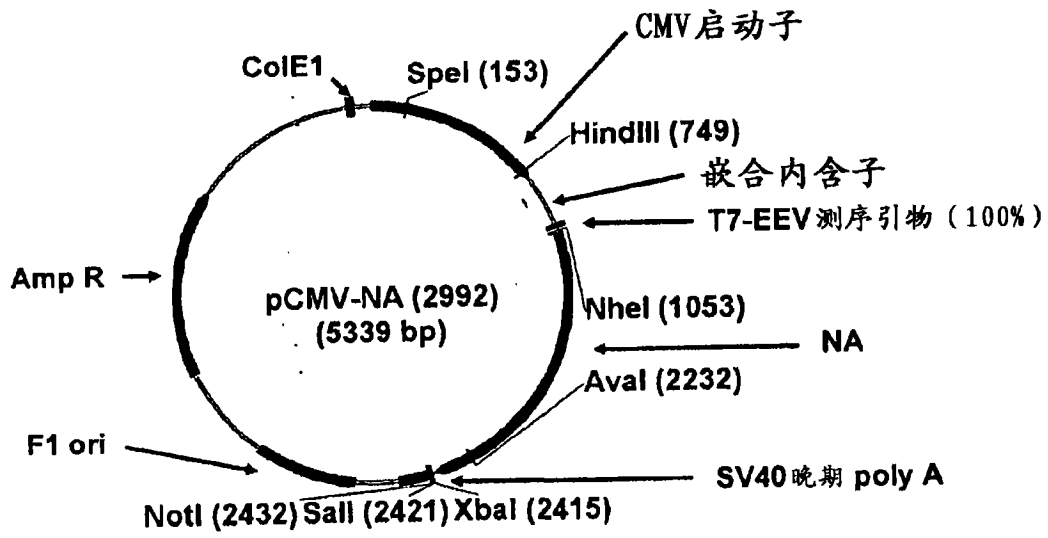


图4

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT
TGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGT
GGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
TGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTG
GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTAT
TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTA
CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCTGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAATGG
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGA
AGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATGCTAACGCAGTCAGTGCCTCTGACACAACAGTCTC
GAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCTGAGGCACTGGGCAGGTAAAGTATCAAGTTACAAGACAGCTT
AAGGAGACCAATAGAAAATGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTCTGATAGGACCTATT
GGTCTTACTGACATCCACTTTCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTA
AGGCTAGAGTACTTAATACGACTACTATAGGCTAGCGCCACCATGGAGAAAATTGTGCTGCTGTTCCG
CATTGTGTCCCTGGTGAAGTCCGACCAAGATCTGCACTCGGCTATCACGCCAACAACTCCACCGAGCAG
GTCGACACCATTATGGAAAAGAAATGTGACCGGTGACCCATGCACAAGACATCCTGGAAAAGACCCCAA
CGGCAAACTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCGATCCCTGCGCGACTGCTCCGTGGCTGGGTGGC
TGCTGGGAAACCCATGTGCGACGAGTTCATCAATGTGCCCGAGTGGTCCCTACATCGTTGAGAAAGCC
AACCCCGTCAACGACCTGTGTACCCCGGTGACTTCAACGACTACGAGGAGCTCAAGCACCTGCTCTC
CCGGATCAACCACTTCGAGAAAATCCAGATCATCCCCAAATCCTCCTGGTCCAGCCACGAAGCCTCCC
TCGGCGTGTCTCCGCTGTCCCTACCAGGGCAAGTCCCTCCTTCTCCGCAACGTGCTGTGGCTGATC
AAAAGAATCCACCTACCCACCATTAAAGCGGTCTACAACAACACCAACCAGGAAGACCTGCTGGT
GCTGTGGGGCATCCACCATCCCAACGACGCCGTGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCTACCACCT
ACATCTCCGTCGGGACATCCACACTGAACCAGCGCCCTGCTGCCCGCATTTGCCACCCGAGCAAGGTG
AATGGGCAGTCCGGCCGATGGAGTCTCTGTGCAACTCTGAAAGCCCAACGACGCTATCAACTTCGA
GTCCAACGGCAACTTCATCGTCCCGAGTATGACCTACAAGATCGTTAAAAGGGCGACTCCACAATCA
TGAAGTCCGCAACTTGGAGTACGGCAACTGCAACACCAAGTGCCAGACACCCATGGGCGCTATCAACTCC
TCCATGCCCTTCCACAACATCCATCCCCTGACCATTGGCGAGTGCCCAAGTACGTCAAGTCCAACCG
GCTGGTCTTGGCTACCGCCCTCCGCAACTCCCCTCAAAGGGAACGCAGGCGCAAAAAGAGAGGCCTGT
TCGGAGCCATAGCTGGGTTCAATTGAGGGAGGGTGGCAGGGCATGGTGGATGGGTGGTACGGCTACCAT
CACTCCAACGAGCAGGGCTCCGGGTATGCCGCGACAAGGAGTCCACCAGAAGGCCATTGACGGCGT
GACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTTCGAGGCTGTTGGCCGGGAGTCA
ACAACTTGGAGCGCCGCATCGAGAACCCTGAACAAAAGATGGAGGACGGCTTCTGGATGTGTGGACC
TACAACGCTGAGCTCCTGGTGTGATGGAGAACGAGCGGACCCTGGACTTCCACGACTCCAACGTCAA
GAACCTGTACGACAAAGTGGCCCTCCAGCTGCGGGACAACGCCAAGGAGCTCGGGAATGGCTGCTTCG
AGTTCACCAAGTGGCACAACGAGTGTATGGAGTCCGTGCGCAATGGCACCTACGACTATCCCCAG
TACTCCGAAGAGGCCCGCTGAAGCGCGAAGAGATCTCCGGGGTGAAGTTGGAGTCCATTGGCATCTA
CCAGATCTGAGCATCTACTCCACCGTGGCTTCTCCCTCGCCCTCGCCATTATGGTGGCTGGCCTGT
CCCTGTGGATGTGCTCCAACGGCTCCCTGCAATGTGCTAATCTAGAGTGCACCTGGGCGGCCGCTTC
GAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGC
TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAA
CAACAACAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTACGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGT
AAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGTATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCCACC
GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCCATTAAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
CTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATGATTAGGGTGTGGTTCA
CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTGGAGTCCACGTTCTTTAATAG
TGGACTCTTGTTCAAAATGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGA
TTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAAC
AAAATATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACAC
CGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCC

AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCG
TCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTC
GTGATACGCCCTATTTTTATAGGTTAATGTGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTT
TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA
TGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTC
CGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTGCTACCCAGAAACGCTGGT
GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACTACTATTCTCA
GAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAT
TATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
CCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACC
GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
TGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
GCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATC
TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
AAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCC
CTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
CCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTT
GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATAACCAATA
CTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC
GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTC
AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCT
TGGAGCGAACGACTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCCGCCCTCTGACTTGAGCGTCGAT
TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTC
CTGGCCTTTTGTGCGCCTTTTGTCTACATGGCTCGACAGATCT

图5

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT
TGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGT
TGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTG
GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTAT
TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTA
CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
GGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAAATGG
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGA
AGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTC
GAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
AAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATT
GGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTA
AGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCCACCATGAACCCCAACCAGAAGATCATCA
CCATTGGCAGCATCTGCATGGTGACCGGGATCGTTAGCCTGATGCTGCAGATCGGCAACATGATCAGC
ATCTGGGTGTCCACAGCATCCATACCGGCAACCAGCACCAGTCCGAGCCCATCTCCAACACCAACCT
GCTGACCGAGAAAGCTGTGCGCTCCGTGAAGCTGGCTGGCAACTCCTCCCTGTGTCTATCAATGGGT
GGGCTGTGTACTCCAAGGACAACCTCCATTTCGCATCGGCAGCAAAGGGGATGTCTTCGTGATCCGCGAG
CCTTTTCATCTCCTGTAGCCACCTCGAATGCCGGACCTTCTTCCTGACACAAGGAGCCCTGCTGAACGA
CAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGCTCTCCCCACCGCACCTGATGTCTGCCCCGTCGGCG
AAGCCCTAGCCCTACAACCTCCCGTTTCGAGTCCGTGCGCTGGAGCGCTCTGCCTGTGATGATGGG
ACCTCTTGGCTGACCATTGGCATCTCCGGCCCTGATAATGGAGCAGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGG
CATCATCACCGATAACCATTAAGTCTTGGCGCAACAACATCCTCCGCACCAGGAGTCCGAGTGTGCCT
GTGTCAATGGCTCGTGCTTTACCGTGATGACCGATGGGCAAGCAATGGACAAGCCTCCACAAGATC
TTCAAGATGGAAAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGAGTTGGACGCCCTAATTACCACTACGAGGA
GTGCAGCTGTTACCTGACGCTGGGGAGATCACCTGTGTGTGCAGGGACAACCTGGCACGGGAGCAACA
GGCCTTGGGTCTCCTTCAACCAGAACTTGGAGTACCAGATCGGCTACATCTGTTCCGGGGTGTTCGGG
GATAATCCCAGGCCTAACGATGGCACCGGTCTGTGGCCCTGTGAGCTCCAACGGCGCAGGCGGGGT
CAAGGGCTTCTCGTTCAAATATGGCAATGGCGTGTGGATCGGGCGCACCAAGTCCACAAACTCCCGGT
CCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAATGGATGGACCAGACAGACAGCTCCTTCTCCGTCAAGCAG
GACATTGTGGCTATCACCGACTGGAGCGGGTACAGCGGCAGCTTCGTGCAGCACCCCGAGCTCACAGG
CCTCGACTGCATTCGGCCCTGCTTTTGGGTGGAAGTATCCGGGGACGGCCTAAGGAGAGCACAATCT
GGACCTCCGGCTCCAGCATCTCCTTCTGCGGCGTGAAGTCCGACACAGTGGGGTGGTCTGGCCTGAC
GGAGCTGAAGTGCCTTACCATTGACAAGTAATCTAGAGTCGACCTGGGCGGCCGCTTCGAGCAGAC

ATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTG
TGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA
ATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTT CAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTC
TACAAATGTGGTAAAATCGATAAGTATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC
TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGG
TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTCT
TCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG
TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAA ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG
GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG
ATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATT
AACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGCATATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG
AGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCAACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACG
CCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA
ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAA
TAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG
CCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
CTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC
GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTATTCTCAGAATGACT
TGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
GCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
GCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA
CTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAA
AGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG
GTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTT
ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTC
ATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT
TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATC
AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTTCTT
CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC ACTTCAAGA ACTCTGTAGCACC GCTACATACCTCGCTCTGCT
AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA

ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGA
TGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCT

图6

专利名称(译)	外来物质测试		
公开(公告)号	CN103298486B	公开(公告)日	2016-10-05
申请号	CN201080023595.2	申请日	2010-05-26
申请(专利权)人(译)	雅培生物学有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培生物学有限责任公司		
[标]发明人	PJ肖恩 AJ科斯坦 JK米德玛 JLG瑟斯		
发明人	P·J·肖恩 A·J·科斯坦 J·K·米德玛 J·L·G·瑟斯		
IPC分类号	A61K39/12 A61K39/145 C07K14/11 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K39/145 A61K2039/53 C12N2760/16134 G01N33/53 G01N2500/04 G01N33/569		
审查员(译)	刘东吉		
优先权	2009161368 2009-05-28 EP 61/181835 2009-05-28 US		
其他公开文献	CN103298486A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于制药工业领域且详细说明了用于测试包含至少一种活性物质的组合物中的外来物质的方法，所述方法包括步骤：a)使针对多核苷酸构建体的表达产物产生的抗体与包含至少一种活性物质的组合物接触，所述多核苷酸构建体包含编码活性物质的至少一部分的序列，其中抗体结合于活性物质，以及b)在步骤a)之后确定组合物中外来物质存在与否。此外，本发明详细说明了通过实施所述方法来生产药物组合物的方法、多核苷酸构建体用于测试待测组合物中活性物质或任何外来或感染性物质存在与否的用途。本发明还涉及在流感疫苗领域中作为有用的物质的具体的多核苷酸和多核苷酸构建体，以及包含所述多核苷酸和/或多核苷酸构建体的非人生物体、转基因动物或微生物。本发明还针对分部试剂盒。

杂交缓冲液: 7% SDS
250 mM NaCl
250 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.0
1 mM EDTA
杂交温度: 58 摄氏度至 60 摄氏度
杂交时间: 过夜
洗涤缓冲液: (I) 2×SSC, 0.1% SDS
(II) 0.2×SSC, 0.1% SDS
洗涤温度和时间: 在 55 摄氏度至 60 摄氏度下各自 2×30min