



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103483421 B

(45)授权公告日 2019.10.22

(21)申请号 201310222728.4
 (22)申请日 2013.06.06
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 103483421 A
 (43)申请公布日 2014.01.01
 (66)本国优先权数据
 201210190329.X 2012.06.11 CN
 (83)生物保藏信息
 CCTCC NO:C201270 2012.06.07
 CCTCC NO:C201271 2012.06.07
 CCTCC NO:C201272 2012.06.07
 CCTCC NO:C201273 2012.06.07

(73)专利权人 厦门大学
 地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路422号
 专利权人 养生堂有限公司

(72)发明人 袁权 张天英 罗文新 陈毅歆
 张军 夏宁邵

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
 代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
 C07K 7/06(2006.01)
 C07K 14/02(2006.01)
 C07K 5/103(2006.01)
 C07K 19/00(2006.01)
 C07K 16/08(2006.01)
 C12N 15/51(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)
 C12N 15/63(2006.01)
 C12N 5/20(2006.01)
 C12P 21/02(2006.01)
 A61K 39/29(2006.01)
 A61K 48/00(2006.01)
 A61K 39/42(2006.01)
 A61P 31/20(2006.01)
 A61P 1/16(2006.01)
 G01N 33/577(2006.01)
 G01N 33/68(2006.01)
 C12R 1/91(2006.01)

(56)对比文件

WO 9739029 A2,1997.10.23,
 WO 8504103 A1,1985.09.26,
 Chen YC et al..Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library.《PNAS》.1996,第93卷(第5期),1997-2001.
 Qiu X et al..Identification and characterization of a C(K/R)TC motif as a common epitope present in all subtypes of hepatitis B surface antigen.《J Immunol.》.1996,第156卷(第9期),3350-3356.
 Cortese R et al..Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage.《Curr Opin Biotechnol.》.1995,73-80.

审查员 刘宝

权利要求书2页 说明书39页
 序列表79页 附图10页

(54)发明名称

用于治疗HBV感染及相关疾病的多肽及抗体

(57)摘要

本发明涉及可用于治疗乙型肝炎病毒感染的表位肽(或其变体),包含此类表位肽(或其变体)以及载体蛋白的重组蛋白,以及此类表位肽(或其变体)和重组蛋白的用途。本发明还涉及针

对此类表位肽的抗体,产生所述抗体的细胞株,以及它们的用途。本发明还涉及可用于治疗或减轻乙型肝炎病毒感染相关的一种或多种症状的疫苗或药物组合物,它们分别包含本发明的重组蛋白或抗体。

CN 103483421 B

1. 一种分离的表位肽在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗已感染HBV的受试者,其中,所述表位肽由HBsAg蛋白的第119-125位氨基酸残基组成,或者由HBsAg蛋白的第113-135位氨基酸残基组成,或者由HBsAg蛋白的第113-127位氨基酸残基组成,或者由HBsAg蛋白的第115-125位氨基酸残基组成,或者由HBsAg蛋白的第111-148位氨基酸残基组成;或者,所述表位肽的氨基酸序列为GCKTCT或GTCKTCT。

2. 权利要求1的用途,其中,所述表位肽具有选自SEQ ID NO:1-4和6-7的氨基酸序列。

3. 一种重组蛋白在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗已感染HBV的受试者,其中,所述重组蛋白包含权利要求1-2任一项中所定义的分选的表位肽,以及载体蛋白,并且所述重组蛋白不是天然存在的蛋白或其片段。

4. 权利要求3的用途,其中,所述表位肽任选地通过连接体与载体蛋白相连接。

5. 权利要求4的用途,其中,所述连接体为刚性连接体或柔性连接体。

6. 权利要求4的用途,其中,所述连接体为(GGGGS)₃。

7. 权利要求3的用途,其中,所述载体蛋白选自CRM197蛋白或其片段、HBcAg和WHcAg。

8. 权利要求3的用途,其中,所述载体蛋白是CRM197蛋白或其片段,并且将所述表位肽,任选地通过连接体,连接至CRM197蛋白或其片段的N末端或C末端。

9. 权利要求8的用途,其中,所述CRM197蛋白的片段包含CRM197的aa 1-190或者由CRM197的aa 1-190组成。

10. 权利要求8的用途,其中,所述CRM197蛋白的片段包含CRM197的aa 1-389或者由CRM197的aa 1-389组成。

11. 权利要求8的用途,其中,所述连接体的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示。

12. 权利要求3的用途,其中,所述重组蛋白具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:74-97。

13. 权利要求3的用途,其中,所述载体蛋白是HBcAg或其片段,并且用所述表位肽替换HBcAg的第79-81位氨基酸,

任选地,所述表位肽与HBcAg或其片段通过连接体连接。

14. 权利要求13的用途,其中,所述HBcAg的片段包含HBcAg的aa 1-149或由HBcAg的aa 1-149组成。

15. 权利要求3的用途,其中,所述重组蛋白具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:47-53,56,和58-65。

16. 权利要求3的用途,其中,所述载体蛋白是WHcAg或其片段,并且用所述表位肽替换WHcAg的第79-81位氨基酸,

任选地,所述表位肽与WHcAg或其片段通过连接体连接。

17. 权利要求16的用途,其中,所述WHcAg的片段包含WHcAg的aa 1-149或由WHcAg的aa 1-149组成。

18. 权利要求3的用途,其中,所述重组蛋白具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:66-73。

19. 一种分离的核酸分子在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗已感染HBV的受试者,其中,所述核酸分子包含编码权利要求1-2任一项中所定义的表位肽,或权利要求3-18任一项中所定义的重组蛋白的核苷酸序列。

20. 一种载体在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗已感染HBV的受试者,其中,所述载体包含权利要求19中所定义的分离的核酸分子。

21. 权利要求1-18任一项的用途,其中,所述药物组合物为蛋白疫苗,并且包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

22. 权利要求21的用途,其中,所述药学上可接受的载体和/或赋形剂为佐剂。

23. 权利要求21的用途,其中,所述蛋白疫苗包含一个或多个权利要求1-2任一项中所定义的表位肽。

24. 权利要求23的用途,其中,所述一个或多个表位肽是单独的或串联的、修饰的或未经修饰的、或偶联至其他蛋白的或不偶联至其他蛋白的。

25. 权利要求19-20任一项的用途,其中,所述药物组合物为基因疫苗,并且包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

26. 权利要求25的用途,其中,所述药学上可接受的载体和/或赋形剂为佐剂。

27. 权利要求25的用途,其中,所述基因疫苗包含DNA或RNA。

28. 权利要求27的用途,其中,所述DNA或RNA是裸露的或包裹于具有传递或/和保护功能的外壳内。

29. 权利要求28的用途,其中,所述外壳选自腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、和逆转录病毒的外壳。

30. 权利要求1-20任一项的用途,其中,所述已感染HBV的受试者患有乙肝。

31. 权利要求1-20任一项的用途,其中,所述药物组合物通过在已感染HBV的受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平来治疗所述已感染HBV的受试者。

用于治疗HBV感染及相关疾病的多肽及抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及分子病毒学和免疫学领域,特别是乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)感染治疗领域。具体而言,本发明涉及可用于治疗乙型肝炎病毒感染的表位肽(或其变体),包含此类表位肽(或其变体)以及载体蛋白的重组蛋白,以及此类表位肽(或其变体)和重组蛋白的用途。本发明还涉及针对此类表位肽的抗体,产生所述抗体的细胞株,以及它们的用途。本发明还涉及可用于治疗或减轻乙型肝炎病毒感染相关的一种或多种症状的疫苗或药物组合物,它们分别包含本发明的重组蛋白或抗体。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒感染,尤其是慢性HBV感染是全球最为重要的公共卫生问题之一(Dienstag JL.Hepatitis B virus infection.N Engl J Med 2008 Oct 2;359(14):1486-1500)。慢性HBV感染可导致慢性乙型病毒性肝炎(Chronic hepatitis B,CHB)、肝硬化(Liver cirrhosis,LC)和原发性肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)等一系列肝脏疾病(Liaw YF,Chu CM.Hepatitis B virus infection.Lancet 2009 Feb14;373(9663):582-592)。据报道,目前全球约有20亿人曾经感染过HBV,现约有3.5亿的慢性乙型肝炎病毒感染者,这些感染者最终死于HBV感染相关肝脏疾病的风险可达15%-25%,全球每年超过100万人死于此类疾病(Dienstag JL.,同上;和Liaw YF等,同上)。

[0003] 当前针对慢性HBV感染的治疗药物主要可分为干扰素类(Interferon,IFNs)和核苷/核苷酸类似物(nucleoside or nucleotide,NAs)(Dienstag JL.,同上;Kwon H,Lok AS.Hepatitis B therapy.Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011 May;8(5):275-284;和Liaw YF等,同上)。前者包括普通干扰素(IFN)和聚乙二醇干扰素(Peg-interferon,Peg-IFN,又称为长效干扰素),主要通过整体增强患者免疫能力来达到抑制HBV和治疗CHB的效果;后者主要包括拉米夫定(lamivudine,LMV)、阿德福韦酯(adefovir dipivoxil,ADV)、恩替卡韦(Entecavir,ETV)、替比夫定(Telbivudine,LdT)、替诺福韦(Tenofovir)等5种,主要通过直接抑制HBV的聚合酶活性来抑制HBV复制。对于HBV感染者(例如CHB患者)来说,上述药物的单独或联合治疗,已能较为有效地抑制体内病毒复制,大幅降低HBV DNA水平;特别地,52周或延长的此类治疗后,患者体内HBV DNA水平低于检测下限(病毒学应答)的应答率可达40-80%(Kwon H等,同上)。然而,上述药物的单独或联合治疗均不能完全清除感染者体内的HBV病毒,其导致的HBsAg阴转或HBsAg血清学转换(感染者体内HBV病毒彻底清除的标志)的应答率通常小于5%(Kwon H等,同上)。因此,针对HBV感染者发展创新的、能更为有效地清除HBV病毒、尤其是清除HBsAg的治疗方法和药物是迫切而必要的。

[0004] 基于免疫学手段发展新的治疗慢性HBV感染的药物是此领域的重要研究方向之一。慢性HBV感染的免疫治疗通常通过被动免疫治疗(其对应药物形式如抗体等)和主动免疫治疗(其对应药物形式如疫苗等)等两种方式进行。被动免疫治疗(以抗体为例)是指,向HBV感染者被动施用具治疗特性的抗体,并利用抗体介导的病毒中和作用阻断HBV感染新生肝细胞,或利用抗体介导的免疫清除作用清除体内病毒和被感染的肝细胞,从而起到治

疗的效果。目前,从预防性乙型肝炎疫苗免疫应答者或HBV感染恢复者血清/血浆中纯化获得的Anti-HBs多克隆抗体,即高效价的乙肝免疫球蛋白(HBIG)已广泛应用于阻断HBV的母婴垂直传播、预防慢性HBV感染者肝移植后的HBV再感染、以及预防意外暴露于HBV的人群的感染。然而,将HBIG直接用于HBV感染者(例如CHB患者)的治疗无明显疗效,且其存在例如高效价血浆来源较少、价格昂贵、性质不稳定、潜在的安全性问题等诸多局限性。主动免疫治疗则是指,通过施用治疗性疫苗(包括蛋白疫苗、多肽疫苗和核酸疫苗等),刺激慢性HBV感染者机体主动产生针对HBV的细胞免疫应答(CTL效应等)或/和体液免疫应答(抗体等),从而达到抑制或清除HBV的目的。目前尚无明确显著有效的、可用于治疗慢性HBV感染的主动免疫治疗药物/疫苗。

[0005] 因此,针对HBV感染者发展创新的、能更为有效地治疗HBV感染的治疗方法和药物是迫切而必要的。

发明内容

[0006] 尽管HBV病毒的各种蛋白上存在多个B细胞应答(抗体应答)表位,然而并非针对任意表位的抗体都能应用于HBV感染的治疗。因此,发展能有效地治疗HBV感染的免疫治疗药物/方法的关键在于,鉴定能诱发有效清除体内病毒和被病毒感染的细胞的抗体应答的靶标(表位),以及获得针对该靶标(表位)的抗体。

[0007] 本发明鉴定了此类靶标(表位),并基于此提供了可用于治疗乙型肝炎病毒感染的表位肽(或其变体),包含此类表位肽(或其变体)和载体蛋白的重组蛋白,以及此类表位肽(或其变体)和重组蛋白的用途。本发明还提供了针对此类表位肽/表位的抗体,产生所述抗体的细胞株,以及它们的用途。本发明还提供了可用于治疗或减轻与乙型肝炎病毒感染相关的一种或多种症状的疫苗或药物组合物,它们分别包含本发明的重组蛋白或抗体。

[0008] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0009] 如本文中所使用的,术语“HBsAg”是指,乙型肝炎病毒(HBV)的表面抗原主蛋白,其是本领域技术人员公知的(参见,例如NCBIGENBANK数据库登录号:AAF24729.1)。

[0010] 如本文中所使用的,当提及HBsAg的氨基酸序列时,其使用SEQ ID NO:39所示的序列来进行描述。例如,表述“HBsAg的第119-125位氨基酸残基”是指,SEQ ID NO:39所示的多肽的第119-125位氨基酸残基。然而,本领域技术人员理解,在HBsAg的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于,置换,缺失和/或添加,例如不同基因型或基因亚型的HBsAg),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“HBsAg”应包括所有此类序列,包括例如SEQ ID NO:39所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述HBsAg的序列片段时,其不仅包括SEQ ID NO:39的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。例如,表述“HBsAg的第119-125位氨基酸残基”包括,SEQ ID NO:39的第119-125位氨基酸残基,以及其变体(天然或人工)中的相应片段。根据本发明,表述“相应序列片段”或“相应片段”是指,当对序列进行最优比对时,即当序列进行比对以获得最高百分数同一性时,进行比较的序列中位于等同位置的片段。

[0011] 如本文中所使用的,术语“HBcAg”是指,乙型肝炎病毒(HBV)的核心抗原蛋白,其是本领域技术人员公知的(参见,例如NCBI GENBANK数据库登录号:AA063517.1)。

[0012] 如本文中所使用的,当提及HBcAg的氨基酸序列时,其使用SEQ ID NO:40所示的序列来进行描述。例如,表述“HBcAg的第79-81位氨基酸残基”是指,SEQ ID NO:40所示的多肽的第79-81位氨基酸残基。然而,本领域技术人员理解,在HBcAg的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于,置换,缺失和/或添加,例如不同基因型或基因亚型的HBcAg),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“HBcAg”应包括所有此类序列,包括例如SEQ ID NO:40所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述HBcAg的序列片段时,其不仅包括SEQ ID NO:40的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。例如,表述“HBcAg的第79-81位氨基酸残基”包括,SEQ ID NO:40的第79-81位氨基酸残基,以及其变体(天然或人工)中的相应片段。根据本发明,表述“相应序列片段”或“相应片段”是指,当对序列进行最优比对时,即当序列进行比对以获得最高百分数同一性时,进行比较的序列中位于等同位置的片段。

[0013] 如本文中所使用的,术语“WHcAg”是指,土拨鼠肝炎病毒核心蛋白,其是本领域技术人员公知的(参见,例如NCBI GENBANK数据库登录号:ADE19018.1)。

[0014] 如本文中所使用的,当提及WHcAg的氨基酸序列时,其使用SEQ ID NO:41所示的序列来进行描述。例如,表述“WHcAg的第79-81位氨基酸残基”是指,SEQ ID NO:41所示的多肽的第79-81位氨基酸残基。然而,本领域技术人员理解,在WHcAg的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于,置换,缺失和/或添加,例如不同基因型或基因亚型的WHcAg),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“WHcAg”应包括所有此类序列,包括例如SEQ ID NO:41所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述WHcAg的序列片段时,其不仅包括SEQ ID NO:41的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。例如,表述“WHcAg的第79-81位氨基酸残基”包括,SEQ ID NO:41的第79-81位氨基酸残基,以及其变体(天然或人工)中的相应片段。根据本发明,表述“相应序列片段”或“相应片段”是指,当对序列进行最优比对时,即当序列进行比对以获得最高百分数同一性时,进行比较的序列中位于等同位置的片段。

[0015] 如本文中所使用的,术语“CRM197 (Cross-Reacting Materials197)”是指,白喉毒素(DT)的一种无毒突变体,其与野生型白喉毒素相比,差异在于第52位的氨基酸残基由Gly变为Glu(G.Giannini,R.Rappuoli,G.Ratti et al.,Nucleic Acids Research.1984.12:4063-4070)。白喉毒素是本领域技术人员熟知的(参见例如,Choe S,Bennett M,Fujii G, et al.,Nature.1992.357:216-222),其氨基酸序列可见于例如GenBank登录号AAV70486.1。

[0016] 如本文中所使用的,当提及CRM197的氨基酸序列时,其使用SEQ ID NO:42所示的序列来进行描述。例如,表述“CRM197的第1-190位氨基酸残基”是指,SEQ ID NO:42所示的多肽的第1-190位氨基酸残基。然而,本领域技术人员理解,在CRM197的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于,置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“CRM197”应包括所有此类序列,包括例如SEQ ID NO:42所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述CRM197的序列片段时,其不仅包括SEQ ID NO:42的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。例如,表述“CRM197的第1-

190位氨基酸残基”包括,SEQ ID NO:42的第1-190位氨基酸残基,以及其变体(天然或人工)中的相应片段。根据本发明,表述“相应序列片段”或“相应片段”是指,当对序列进行最优比对时,即当序列进行比对以获得最高百分数同一性时,进行比较的序列中位于等同位置的片段。

[0017] 如本文中所使用的,术语“抗体”是指,通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由3个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,特别地,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0018] 如本文中所使用的,术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽,其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第2版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下,抗原结合片段包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0019] 如本文中所使用的,术语“Fd片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段;术语“Fv片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段;术语“dAb片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward等人, Nature 341:544-546 (1989));术语“Fab片段”意指由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段;术语“ $F(ab')_2$ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段。

[0020] 在一些情况下,抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv),其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见,例如, Bird等人, Science 242:423-426 (1988) 和 Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988))。此类scFv分子可具有一般结构: NH_2 - V_L -接头- V_H -COOH或 NH_2 - V_H -接头- V_L -COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列

(GGGGS)₄的接头,但也可使用其变体(Holliger等人(1993),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995),*Protein Eng.*8:725-731,Choi等人(2001),*Eur.J.Immunol.*31:94-106,Hu等人(1996),*Cancer Res.*56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),*J.Mol.Biol.*293:41-56和Roovers等人(2001),*Cancer Immunol.*描述。

[0021] 在一些情况下,抗体的抗原结合片段是双抗体,即,双价抗体,其中V_H和V_L结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如,Holliger P.等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448(1993),和Poljak R.J.等人,*Structure*2:1121-1123(1994))。

[0022] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的单克隆抗体E6F6)获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[0023] 在本文中,除非上下文明确指出,否则当提及术语“抗体”时,其不仅包括完整抗体,而且包括抗体的抗原结合片段。

[0024] 如本文中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段,也即除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(*Nature*,256:495,1975),但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S.P4,816,567)。

[0025] 如本文中所使用的,以编号提及的单克隆抗体与从相同编号的杂交瘤获得的单克隆抗体相同。例如,单克隆抗体HBs-E6F6(简称E6F6)、HBs-E7G11(简称E7G11)、HBs-G12F5(简称G12F5)和HBs-E13C5分别是与从杂交瘤细胞株HBs-E6F6(简称E6F6)或其亚克隆或后代细胞、HBs-E7G11(简称E7G11)或其亚克隆或后代细胞、HBs-G12F5(简称G12F5)或其亚克隆或后代细胞,和HBs-E13C5(简称E13C5)或其亚克隆或后代细胞获得的抗体相同的抗体。

[0026] 如本文中所使用的,术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类),且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类),但无论如何,其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.;Morrison et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,81:68516855(1984))。

[0027] 如本文中所使用的,术语“人源化抗体”是指,人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段,其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如,小鼠、大鼠或兔)抗体。此外,受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换,或被其他抗体的氨基酸残基替换,以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容,可参见例如,Jones et al.,*Nature*,321:522525(1986);Reichmann et al.,*Nature*,332:323-329(1988);Presta,*Curr.Op.Struct.Biol.*,2:593-596(1992);和

Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000)。

[0028] 如本文中所使用的,“中和抗体”是指,能清除或显著降低目标病毒的毒力(例如,感染细胞的能力)的抗体或抗体片段。

[0029] 如本文中所使用的,术语“表位”是指,抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,表位通常以独特的空间构象包括至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续或非连续的氨基酸,其可以是“线性的”或“构象的”。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

[0030] 如本文中所使用的,术语“表位肽”是指,抗原上能够用作表位的肽段。在一些情况下,单独的表位肽即能够被针对所述表位的抗体特异性识别/结合。在另一些情况下,可能需要将表位肽与载体蛋白融合,以便表位肽能够被特异性抗体识别。如本文中所使用的,术语“载体蛋白”是指这样的蛋白,其可以充当表位肽的载体,即,其可以在特定位置处(例如蛋白内部,N端或C端)插入表位肽,以便该表位肽能够呈现出来,从而该表位肽能够被抗体或免疫系统识别。此类载体蛋白是本领域技术人员熟知的,包括例如,HPV L1蛋白(可以将表位肽插入在所述蛋白的第130-131位氨基酸之间或在第426-427位氨基酸之间,参见Slupetzky,K.等Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops[J].J Gen Virol,2001,82:2799-2804;Varsani,A.等Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16[J].J Virol,2003,77:8386-8393),HBV核心抗原(可以用表位肽替换所述蛋白的第79-81位氨基酸,参见Koletzki,D.,et al.HBV core particles allow the insertion and surface exposure of the entire potentially protective region of Puumala hantavirus nucleocapsid protein[J].Biol Chem,1999,380:325-333),土拨鼠肝炎病毒核心蛋白(可以用表位肽替换所述蛋白的第79-81位氨基酸,参见Sabine **König**, Gertrud Beterams and Michael Nassal,J.Virol.1998,72(6):4997),CRM197蛋白(可以将表位肽连接至该蛋白或其片段的N末端或C末端)。任选地,可以在表位肽与载体蛋白之间使用连接体(例如柔性或刚性连接体),以促进二者各自的折叠。

[0031] 可使用本领域技术人员已知的常规技术,就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如,可进行竞争和交叉竞争研究,以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原(例如,HBsAg蛋白)的结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利申请W0 03/48731中。因此,可使用本领域技术人员已知的常规技术,获得与本发明的单克隆抗体(例如,单克隆抗体E6F6)竞争结合HBsAg蛋白上的相同表位的抗体及其抗原结合片段(即,抗原结合部分)。

[0032] 如本文中所使用的,术语“分离的”或“被分离的”指的是,从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分,那么可能是其所处的天然环境

发生了改变,或从天然环境下分离出该物质,或二者情况均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽,而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质,也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0033] 如本文中所使用的,术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌(菌株)与载体组成的表达系统,其中大肠杆菌(菌株)来源于市场上可得到的菌株,例如但不限于:GI698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3), BLR (DE3)。

[0034] 如本文中所使用的,术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件,包括但不限于,启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。

[0035] 如本文中所使用的,术语“宿主细胞”是指,可用于导入载体的细胞,其包括但不限于,如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞,或者如纤维原细胞,CHO细胞,COS细胞,NSO细胞,HeLa细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0036] 如本文中所使用的,术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如,两个DNA分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据,或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据),那么各分子在该位置上是一致的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列的10个位置中有6个匹配,那么这两个序列具有60%的同一性。例如,DNA序列CTGACT和CAGGTT共有50%的同一性(总共6个位置中有3个位置匹配)。通常,在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用,例如,可通过计算机程序例如Align程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的Needleman等人(1970) J. Mol. Biol. 48:443-453的方法来实现。还可使用已整合入ALIGN程序(版本2.0)的E. Meyers和W. Miller (Comput. Appl Biosci., 4:11-17 (1988))的算法,使用PAM120权重残基表(weight residue table)、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外,可使用已整合入GCG软件包(可在www.gcg.com上获得)的GAP程序中的Needleman和Wunsch (J Mol Biol. 48:444-453 (1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的缺口权重(gap weight)和1、2、3、4、5或6的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

[0037] 如本文中使用的,术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的必要特性的氨基酸置换。例如,可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变

和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换,例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见,例如,Brummell等人,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等人Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人Proc.Natl Acad.Set USA 94:412-417(1997),其通过引用并入本文)。

[0038] 如本文中使用的,术语“免疫原性(immunogenicity)”是指,能够刺激机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞的能力。其既指,抗原能刺激特定的免疫细胞,使免疫细胞活化、增殖、分化,最终产生免疫效应物质如抗体和致敏淋巴细胞的特性,也指抗原刺激机体后,机体免疫系统能形成抗体或致敏T淋巴细胞的特异性免疫应答。免疫原性是抗原最重要的性质,一种抗原能否成功地诱导宿主产生免疫应答取决于三方面的因素:抗原的性质、宿主的反应性和免疫方式。

[0039] 如本文中使用的,术语“特异性结合”是指,两分子间的非随机的结合反应,如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中,特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指,抗体以小于大约 10^{-5} M,例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。

[0040] 如本文中使用的,术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小,抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。通常,抗体(例如,本发明的单克隆抗体E6F6)以小于大约 10^{-5} M,例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的解离平衡常数(K_D)结合抗原(例如,HBsAg蛋白),例如,如使用表面等离子体共振术(SPR)在BIAcore仪中测定的。

[0041] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0042] 如本文中所使用的,术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用,并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如,当提及杂交瘤细胞株E6F6时,其还指杂交瘤细胞株E6F6的亚克隆和后代细胞。

[0043] 如本文中所使用的,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences.Edited by Gennaro AR,19th ed.Pennsylvania:Mack Publishing Company,1995),并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包

括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0044] 如本文中所使用的,术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂,当其与抗原一起或预先递送入机体时,其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种,包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

[0045] 如本文中所使用的,术语“蛋白疫苗”是指,基于多肽的疫苗,其任选地还包含佐剂。疫苗中的多肽可以通过基因工程技术获得的,也可以通过化学合成方法获得的。如本文中所使用的,术语“核酸疫苗”是指,基于DNA或RNA(例如质粒,如表达质粒)的疫苗,其任选地还包含佐剂。

[0046] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病(例如HBV感染或与HBV感染相关的疾病)有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病(例如HBV感染或与HBV感染相关的疾病)的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄,体重和性别,药物的施用方式,以及同时施用的其他治疗等等。

[0047] 如本文中所使用的,本发明的表位肽的生物学功能包括但不限于选自下列的一种或多种:

[0048] 1) 与抗体E6F6、E7G11、G12F5或E13C5的特异性结合;

[0049] 2) 在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平的能力(任选地,在将所述表位肽与载体蛋白融合后);

[0050] 3) 诱发有效清除体内的HBV和被HBV感染的细胞的抗体应答的能力(任选地,在将所述表位肽与载体蛋白融合后);和

[0051] 4) 治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)的能力(任选地,在将所述表位肽与载体蛋白融合后)。

[0052] 因此,在一个方面,本发明提供了一种分离的表位肽或其变体,其由HBsAg蛋白的第119-125位氨基酸残基组成,且所述变体与其所源自的表位肽相异仅在于1个或几个(例如,1个,2个,3个或4个)氨基酸残基的保守置换,且保留了其所源自的表位肽的生物学功能。在一个优选的实施方案中,所述HBsAg蛋白的第119-125位氨基酸残基如SEQ ID NO:1所示。在一个优选的实施方案中,所述变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0053] 在另一个方面,本发明提供了一种分离的表位肽或其变体,其由HBsAg蛋白的第113-135位氨基酸残基组成,且所述变体与其所源自的表位肽相异仅在于1个或几个(例如,1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个或9个)氨基酸残基的保守置换,且保留了其所源自的表位肽的生物学功能。在一个优选的实施方案中,所述HBsAg蛋白的第113-135位氨基酸残基如SEQ ID NO:6所示。

[0054] 在另一个方面,本发明提供了一种分离的表位肽或其变体,其由HBsAg蛋白的4-38个连续氨基酸残基组成,且包含HBsAg蛋白的第121-124位氨基酸残基,并且所述变体与其

所源自的表位肽相异仅在于1个或几个(例如,1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个或9个)氨基酸残基的保守置换,且保留了其所源自的表位肽的生物学功能。在一个优选的实施方案中,所述HBsAg蛋白的第121-124位氨基酸残基如SEQ ID NO:10所示。

[0055] 在一个优选的实施方案中,本发明的表位肽由HBsAg蛋白的不多于38个的连续氨基酸残基组成,例如,其由38个,37个,36个,35个,34个,33个,32个,31个,30个,29个,28个,27个,26个,25个,24个,23个,22个,21个,20个,19个,18个,17个,16个,15个,14个,13个,12个,11个,10个,9个,8个,7个,6个,5个或4个的连续氨基酸残基组成。例如,本发明的表位肽或其变体具有选自SEQ ID NO:1-7和10的氨基酸序列。

[0056] 特别地,可以将本发明的表位肽或其变体与载体蛋白融合,以增强表位肽或其变体的免疫原性,使得表位肽或其变体能够被机体的免疫系统识别,并诱发有效清除体内病毒和被病毒感染的细胞的抗体应答。

[0057] 因此,在一个方面,本发明还提供了一种重组蛋白,其包含本发明的分离的表位肽或其变体,以及载体蛋白,并且所述重组蛋白不是天然存在的蛋白或其片段。在所述重组蛋白中,所述表位肽或其变体可以连接至载体蛋白的N末端或C末端,插入载体蛋白的内部,或替换载体蛋白的部分氨基酸序列,视所使用的具体载体蛋白而定。此外,任选地,所述表位肽或其变体通过连接体(刚性或柔性连接体,例如(GGGGS)₃)与载体蛋白相连接。本发明的重组蛋白不受其产生方式的限定,例如,其可以通过基因工程方法(重组技术)产生,也可以通过化学合成方法产生。

[0058] 在一个优选的实施方案中,所述载体蛋白选自CRM197蛋白或其片段、HBcAg和WHcAg。

[0059] 在一个优选的实施方案中,所述载体蛋白是CRM197蛋白或其片段,并且将本发明的表位肽或其变体,任选地通过连接体,连接至CRM197蛋白或其片段的N末端或C末端。在一个优选实施方案中,所述CRM197蛋白的片段包含CRM197的aa1-190(aa表示氨基酸,其置于数字n前面时,表示第n位氨基酸(例如,aa1-190表示第1-190位氨基酸);置于数字n之后时,表示多肽长度为n个氨基酸(下同)),例如包含CRM197的aa 1-389。在另一个优选实施方案中,所述CRM197蛋白的片段由CRM197的aa 1-190或aa 1-389组成(其在本发明中分别被命名为CRM A和CRM 389)。

[0060] 在一个优选的实施方案中,所述连接体的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示。在一个优选的实施方案中,本发明的重组蛋白具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:74-97。

[0061] 在一个优选的实施方案中,所述载体蛋白是HBcAg或其片段,并且用本发明的表位肽替换HBcAg的第79-81位氨基酸。在一个优选的实施方案中,所述表位肽与HBcAg或其片段通过连接体连接。在一个优选的实施方案中,所述HBcAg的片段包含HBcAg的aa 1-149或由HBcAg的aa 1-149组成。在一个优选的实施方案中,本发明的重组蛋白具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:47-53,56,和58-65。

[0062] 在一个优选的实施方案中,所述载体蛋白是WHcAg或其片段,并且用本发明的表位肽替换WHcAg的第79-81位氨基酸。在一个优选的实施方案中,所述表位肽与WHcAg或其片段通过连接体连接。在一个优选的实施方案中,所述WHcAg的片段包含WHcAg的aa1-149或由WHcAg的aa 1-149组成。在一个优选的实施方案中,本发明的重组蛋白具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:66-73。

[0063] 在另一个方面,本发明还提供了一种分离的核酸分子,其包含编码本发明的表位肽或其变体或本发明的重组蛋白的核苷酸序列。在另一个方面,本发明还提供了一种载体,其包含如上所述的分离的核酸分子。本发明的载体可以是克隆载体,也可以是表达载体。在一个优选实施方案中,本发明的载体是例如质粒,粘粒,噬菌体,柯斯质粒等等。在一个优选实施方案中,所述载体能够在受试者(例如哺乳动物,例如人)体内表达本发明的表位肽或其变体或本发明的重组蛋白。

[0064] 在另一个方面,还提供了包含本发明的分离的核酸分子或载体的宿主细胞。此类宿主细胞包括但不限于,原核细胞例如大肠杆菌细胞,以及真核细胞例如酵母细胞,昆虫细胞,植物细胞和动物细胞(如哺乳动物细胞,例如小鼠细胞、人细胞等)。本发明的细胞还可以是细胞系,例如293T细胞。

[0065] 在另一个方面,还提供了制备本发明的重组蛋白的方法,其包括,在合适的条件下培养本发明的宿主细胞,和从细胞培养物中回收本发明的重组蛋白。

[0066] 在另一个方面,本发明提供了一种蛋白疫苗,其包含本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂(例如佐剂)。在一个优选实施方案中,所述蛋白疫苗包含一个或多个本发明的表位肽,且这些表位肽可以是单独的或串联的、修饰的或未经修饰的、偶联至其他蛋白的或不偶联至其他蛋白的。

[0067] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)的方法,其包括,给有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白或蛋白疫苗。

[0068] 在另一个方面,提供了本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白在制备蛋白疫苗中的用途,所述蛋白疫苗用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0069] 在另一个方面,提供了本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白,其用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0070] 在另一个方面,本发明提供了一种基因疫苗,其包含本发明的分离的核酸分子或载体,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂(例如佐剂)。在一个优选实施方案中,所述基因疫苗包含DNA或RNA。在此类实施方案中,所述DNA或RNA可以是裸露的或可以包裹于具有传递或/和保护功能的外壳内。在一个进一步优选的实施方案中,所述外壳可以是腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒等的外壳,也可以是采用化学方法合成的能行使相似功能的其他材料。

[0071] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)的方法,其包括,给有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明的基因疫苗或分离的核酸分子或载体。

[0072] 在另一个方面,提供了本发明的分离的核酸分子或载体在制备基因疫苗中的用途,所述基因疫苗用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0073] 在另一个方面,提供了本发明的分离的核酸分子或载体,其用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0074] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白或分离的核酸分子或载体,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂(例如佐剂)。在一个优选实施方案中,所述药物组合物包含一个或多个本发明的表位肽,且这些表

位肽可以是单独的或串联的、修饰的或未经修饰的、偶联至其他蛋白的或不偶联至其他蛋白的。

[0075] 在另一个方面,本发明提供了用于在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的本发明的药物组合物或表位肽(或其变体)或重组蛋白或分离的核酸分子或载体。

[0076] 在另一个方面,提供了本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白或分离的核酸分子或载体在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平。

[0077] 在另一个方面,提供了本发明的表位肽(或其变体)或重组蛋白或分离的核酸分子或载体,其用于在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平。

[0078] 在一个方面,本发明提供了一种单克隆抗体及其抗原结合片段,其中,所述单克隆抗体能够特异性结合本发明的表位肽。

[0079] 在一个优选的实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体(例如,scFv)、小鼠抗体、兔抗体、人源化抗体、全人抗体、嵌合抗体(例如,人鼠嵌合抗体)或双特异或多特异抗体。

[0080] 在一个优选的实施方案中,所述的单克隆抗体以小于大约 10^{-5} M,例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的K_D结合本发明的表位肽或HBsAg蛋白。

[0081] 在一个优选的实施方案中,所述的单克隆抗体包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体。

[0082] 在一个优选的实施方案中,所述的单克隆抗体能够在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平。

[0083] 在一个优选的实施方案中,所述的单克隆抗体衍生自选自下列的单克隆抗体,或是选自下列的抗体:

[0084] 1) 杂交瘤细胞株HBs-E6F6所产生的单克隆抗体,其中,杂交瘤细胞株HBs-E6F6保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201270;

[0085] 2) 杂交瘤细胞株HBs-E7G11所产生的单克隆抗体,其中,杂交瘤细胞株HBs-E7G11保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201271;

[0086] 3) 杂交瘤细胞株HBs-G12F5所产生的单克隆抗体,其中,杂交瘤细胞株HBs-G12F5保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201272;和

[0087] 4) 杂交瘤细胞株HBs-E13C5所产生的单克隆抗体,其中,杂交瘤细胞株HBs-E13C5保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201273。

[0088] 在另一个方面,本发明提供了一种单克隆抗体及其抗原结合片段,其能够阻断本发明的表位肽或HBsAg蛋白与由杂交瘤细胞株HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5或HBs-E13C5所产生的抗体的结合至少50%,优选至少60%,优选至少70%,优选至少80%,优选至少90%,优选至少95%或优选至少99%,其中,所述杂交瘤细胞株HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5和HBs-E13C5保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且分别具有保藏号CCTCC NO.C201270,CCTCC NO.C201271,CCTCC NO.C201272和CCTCC NO.C201273。

[0089] 此类单抗所识别的表位与单抗E6F6、E7G11、G12F5或E13C5识别的表位相同,或者在空间上存在重叠,从而此类单抗能够降低单抗E6F6、E7G11、G12F5或E13C5与本发明的表

位肽或HBsAg蛋白的结合至少50%，优选至少60%，优选至少70%，优选至少80%，优选至少90%，优选至少95%或优选至少99%。

[0090] 可以采用常规方法如Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane (1988)中描述的方法,测定某一待测单抗降低某一已知单抗结合HBsAg蛋白的能力。一个示例性的方法包括:先把抗原预包被在微孔板上,然后把系列稀释的未标记的待测抗体以及特定浓度的经标记的已知单抗共同加入上述预包被后的微孔板中进行孵育,然后在洗涤后测定在不同稀释度的待测抗体下,已知抗体结合到板上的数量。待测抗体竞争已知抗体结合抗原的能力越强,已知抗体结合抗原的能力就越弱,结合到板上的已知抗体就越少。通常,将抗原预包被在96孔微孔板上,并利用放射标记法或酶标记法测定待测单抗阻断经标记的已知单抗的能力。

[0091] 可以采用Kohler等在Nature 256:495 (1975)中报道的杂交瘤制备方法来制备单抗。首先用免疫原(必要时候添加佐剂)免疫注射小鼠或其它合适的宿主动物。免疫原或佐剂的注射方式通常为皮下多点注射或腹腔注射。将免疫原预先偶联到某些已知蛋白(如血清白蛋白)上,可能会有助于增强抗原在宿主内的免疫原性。佐剂可以利用弗氏佐剂或MPL-TDM等。动物在接受免疫后,体内会产生分泌特异性结合免疫原的抗体的淋巴细胞。收集目的淋巴细胞,并用合适的融合剂(如PEG)将其与骨髓瘤细胞融合,从而获得杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103, Academic Press, 1996)。

[0092] 将上述制备的杂交瘤细胞接种到合适的培养基中进行生长,所述培养基中含有一种或多种能够抑制未融合的、母体骨髓瘤细胞生长的物质。例如,对于缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶(HGPRT或HPRT)的母体骨髓瘤细胞,在培养基中添加次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶(HAT培养基)等物质将可以抑制HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0093] 优选的骨髓瘤细胞应该具有融合率高,抗体分泌能力稳定,对HAT培养基敏感等能力。其中,骨髓瘤细胞首选鼠源骨髓瘤,如MOP-21和MC-11小鼠肿瘤衍生株(THE Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA),以及SP-2/0或X63-Ag8-653细胞株(American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA)。另外,还可以利用人骨髓瘤和人鼠异源骨髓瘤细胞株制备人单抗(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0094] 杂交瘤细胞生长的培养基用于检测针对特异抗原的单抗的产生。可以使用下列方法来测定杂交瘤细胞产生的单抗的结合特异性:免疫沉淀或体外结合试验,如放射免疫试验(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)。例如,利用Munson等在Anal. Biochem. 107:220 (1980)中描述的Scatchard分析法可测定单抗的亲合力。

[0095] 在确定杂交瘤产生的抗体的特异性、亲和力和反应性之后,目的细胞株可以通过Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103, Academic Press, 1996描述的有限稀释法进行亚克隆化。合适的培养基可以是DMEM或RPMI-1640等。另外,杂交瘤细胞还可以腹水瘤的形式在动物体内生长。

[0096] 利用传统的免疫球蛋白纯化方法,如蛋白A琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析等,可以将亚克隆细胞分泌的单抗从细胞培养液、腹水或血清中分离出

来。

[0097] 还可以通过基因工程重组技术获得单克隆抗体。利用特异性结合单抗重链和轻链基因的核酸引物进行PCR扩增,可以从杂交瘤细胞中分离得到编码单抗重链和轻链基因的DNA分子。将所得的DNA分子插入表达载体内,然后转染宿主细胞(如E.coli细胞、COS细胞、CHO细胞、或其它不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞),并在合适的条件下进行培养,可以获得重组表达的目标抗体。

[0098] 本发明还提供了分离的核酸分子,其编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。此类核酸分子可以从杂交瘤细胞中分离得到,也可以利用基因工程重组技术或化学合成方法获得。

[0099] 在一个方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含能够编码本发明的单克隆抗体的重链可变区的核酸序列。

[0100] 在另一个方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含能够编码本发明的单克隆抗体的轻链可变区的核酸序列。

[0101] 在另一个方面,本发明提供了一种载体,其包含本发明的分离的核酸分子。本发明的载体可以是克隆载体,也可以是表达载体。

[0102] 在一个优选实施方案中,本发明的载体是例如质粒,粘粒,噬菌体,柯斯质粒等等。

[0103] 在另一个方面,还提供了包含本发明的分离的核酸分子或载体的宿主细胞。此类宿主细胞包括但不限于,原核细胞例如大肠杆菌细胞,以及真核细胞例如酵母细胞,昆虫细胞,植物细胞和动物细胞(如哺乳动物细胞,例如小鼠细胞、人细胞等)。本发明的细胞还可以是细胞系,例如293T细胞。

[0104] 在另一个方面,还提供了制备本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,其包括,在合适的条件下培养本发明的宿主细胞,和从细胞培养物中回收本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0105] 在另一个方面,本发明提供了一种杂交瘤细胞株,其选自:

[0106] 1) 杂交瘤细胞株HBs-E6F6,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201270;

[0107] 2) 杂交瘤细胞株HBs-E7G11,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201271;

[0108] 3) 杂交瘤细胞株HBs-G12F5,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201272;和

[0109] 4) 杂交瘤细胞株HBs-E13C5,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),且具有保藏号CCTCC NO.C201273。

[0110] 可通过常规方法,从单克隆抗体E6F6、E7G11、G12F5和E13C5中获得各个抗体各自所包含的重链可变区、轻链可变区、重链可变区CDR和轻链可变区CDR的氨基酸序列和/或核苷酸序列。

[0111] 在另一个方面,本发明提供了一种试剂盒,其包括本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一个优选的实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在一个优选的实施方案中,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。优选地,所述第二抗体还包括可检测的标记。此类可检测

的标记是本领域技术人员熟知的,包括但不限于,放射性同位素,荧光物质,发光物质,有色物质和酶(例如辣根过氧化物酶)等。

[0112] 在另一个方面,本发明提供了检测HBsAg蛋白在样品中的存在或其水平的方法,其包括使用本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一个优选的实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在另一个优选的实施方案中,所述方法还包括,使用携带可检测的标记的第二抗体来检测本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。所述方法可以用于诊断目的,或者非诊断目的(例如,所述样品是细胞样品,而非来自患者的样品)。

[0113] 在另一个方面,本发明提供了诊断受试者是否感染了HBV的方法,其包括:使用本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段检测HBsAg蛋白在来自所述受试者的样品中的存在。在一个优选的实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在另一个优选的实施方案中,所述方法还包括,使用携带可检测的标记的第二抗体来检测本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0114] 在另一个方面,提供了本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测HBsAg蛋白在样品中的存在或其水平,或用于诊断受试者是否感染了HBV。

[0115] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0116] 在另一个方面,本发明提供了用于预防或治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)的方法,其包括,给有此需要的受试者施用预防或治疗有效量的本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段,或者本发明的药物组合物。

[0117] 在另一个方面,提供了本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于预防或治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0118] 在另一个方面,提供了本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段,用于预防或治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0119] 在另一个方面,本发明提供了用于在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平的方法,其包括,给有此需要的受试者施用有效量的本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段接触。在另一个方面,提供了本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段用于制备药物的用途,所述药物用于在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平。

[0120] 本发明所提供的疫苗(蛋白疫苗和基因疫苗)、药物和药物组合物可以单独使用或联合使用,也可以与其他药学活性剂(例如干扰素类药物,如干扰素或聚乙二醇干扰素)联合使用。

[0121] 发明的有益效果

[0122] 与现有技术相比,本发明的表位肽和含有所述表位肽的重组蛋白具有显著的有利方面。特别地,本发明的表位肽和重组蛋白能够诱发有效清除体内的HBV和被HBV感染的细胞的抗体应答,从而能够在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平,且能够用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0123] 此外,本发明还提供了能够特异性识别/结合本发明的表位肽的单克隆抗体及其

抗原结合片段。此类单克隆抗体及其抗原结合片段能够在受试者体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平,能够有效清除体内的HBV和被HBV感染的细胞,从而能够用于治疗受试者的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)。

[0124] 本发明的表位肽的优势还在于,针对该表位肽的单克隆抗体及多克隆抗体能够在受试者(例如HBV转基因小鼠)体内显著降低HBsAg水平和HBV DNA水平,且治疗有效的持续时间显著长于针对其它表位的抗体。本发明的表位肽的优势还在于,以其为主要活性成分的疫苗在免疫受试者(例如HBV转基因小鼠)后,可持久降低受试者体内的HBsAg水平和HBV DNA水平。

[0125] 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将理解,下列附图和实施例仅用于说明本发明,而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述,本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

[0126] 图1:不同小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效评估。

[0127] 图2:HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5、0.9%NS和恩替卡韦(ETV)治疗HBV转基因小鼠的疗效评估。其中,显示的数值为各实验组4只小鼠的平均值。图2A:小鼠单克隆抗体和恩替卡韦(ETV)治疗HBV转基因小鼠后血清HBsAg的下降幅度;图2B:小鼠单克隆抗体和ETV治疗HBV转基因小鼠后血清HBV DNA的下降幅度;图2C:小鼠单克隆抗体和ETV治疗HBV转基因小鼠后血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平变化。

[0128] 图3:HBs-E6F6注射后HBV DNA和HBsAg的动力学变化。图3A:HBs-E6F6注射HBV转基因小鼠后血清HBsAg的下降幅度;图3B:HBs-E6F6注射HBV转基因小鼠后血清HBV DNA的下降幅度。

[0129] 图4:嵌合抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效评估。

[0130] 图5:9种重组蛋白的构建、表达、纯化和电镜观察。图5A:pC149-SEQ克隆的构建的示意图;图5B:9种重组蛋白的SDS-PAGE检测与电镜观察的结果。

[0131] 图6:HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5抗体的表位分析。

[0132] 图7:HBs-E6F6/HBs-E7G11对表位肽SEQ1的氨基酸突变的敏感性的分析。其中,“Ref.”表示以HBsAg作为体现抗体反应性的参照抗原,“-”表示反应性与HBsAg相同,“++”表示反应性比HBsAg低2个数量级(\log_{10}),“++++”表示反应性比HBsAg低4个数量级(\log_{10})。

[0133] 图8:5种包含表位肽的重组蛋白的制备及其免疫原性的评价。图8A:5种重组蛋白的SDS-PAGE检测与电镜观察的结果。图8B:5种重组蛋白免疫BALB/C小鼠后血清抗体滴度的变化。

[0134] 图9:小鼠血源多克隆抗体的治疗效果评估。

[0135] 图10:5种重组蛋白治疗HBV转基因小鼠的效果评估。

[0136] 图11:3种包含表位肽的重组蛋白的制备及其治疗效果的评估。

[0137] 图11A:3种重组蛋白的SDS-PAGE检测与电镜观察的结果。图11B:3种重组蛋白免疫HBV转基因小鼠后,小鼠血清HBsAg水平、血清HBV DNA水平、Anti-HBsAg抗体水平和抗-载体蛋白抗体水平的变化。

[0138] 图12:CRM197-SEQ6、CRM389-SEQ6、CRMA-SEQ6重组蛋白的示意图。Linker,连接体。

[0139] 序列信息

[0140] 本发明涉及的序列的信息提供于下面的表1中。

[0141]

SEQ ID NO	名称	序列信息
1	SEQ1	GPCKTCT
2	SEQ2	GPCRTCT
3	SEQ3	STTTSTGPCKTCTTP
4	SEQ4	TTSTGPCKTCT
5	SEQ5	CKTCTTPAQ
6	SEQ6	SSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMP
7	SEQ7	PGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMPSCCCTKPTDGNCT
8	SEQ8	STTTSTGPC
9	SEQ9	STGPCKT
10	SEQ10	CKTC
11	SEQ11	TCTTPAQGNSMFPAQ
12	S1	MENIASGLLGPLLVL
13	S2	LGPLLVLQAGFLLT

[0142]

14	S3	AGFFLLTKILTIPQS
15	S4	ILTIPQSLDSWWTSL
16	S5	DSWWTSLNFLGGTPV
17	S6	FLGGTPVCLGQNSQS
18	S7	LGQNSQSQISSHSPT
19	S8	ISSHSPTCCPPICPG
20	S9	CPPICPGYRWMCLRR
21	S10	RWMCLRRFIIFLCIL
22	S11	IIFLCILLCLIFLL
23	S12	LCLIFLLVLLDYQGM
24	S13	LLDYQGMLPVCPLIP
25	S14	PVCPLIPGSSTTSTG
26	S15	SSTTSTGPCKTCTTP
27	S16	CKTCTTPAQGTSMP
28	S17	QGTSMPSCCCTKPT
29	S18	CCCTKPTDGNCTCIP
30	S19	GNCTCIPISSWAF
31	S20	PSSWAFKYLWEWAS
32	S21	YLWEWASVRFWSLSL
33	S22	RFSWLSLLVPFVQWF
34	S23	VPFVQWFVGLSPTVW
35	S24	GLSPTVWLSVIWMMW
36	S25	SVIWMMWFWGPSLYN
37	S26	WGPSLYNILSPFMPL
38	S27	LSPFMPLLPFIFFCLWVYI
39	HBsAg	MENIASGLLGPLLVLQAGFFLLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPICPGYRWMCLRRFIIFLCILLCLIFLLVLLDYQGMPLVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWFWGPSLYNILSPFMPLLPFIFFCLWVYI
40	HBcAg	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVS YVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPP AYRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRR SQSRESQC
41	WHcAg	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSEQVRTIIVNY VNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPA PYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQS PRRRRSQSPSANC
42	CRM197	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSESPNTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIASSLMVAQAIPV VVGLVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKQPFV HDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNKSKTHISVNGRKRIMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHKTV NSKLSLFFEIKS

[0143]

43	C149/mut	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSFEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
44	C183/mut	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSFEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC
45	WHC149/mut	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGGTGSFEFGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPEHTVI
46	连接体	GGGGSGGGGSGGGGS
47	C149-SEQ1	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSGPCKTCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
48	C149-SEQ2	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSGPCRCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
49	C149-SEQ3	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSSTTTSTGPCKTCTTPEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
50	C149-SEQ4	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSTTTSTGPCKTCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
51	C149-SEQ5	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSCKTCTTPAQEFEGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
52	C149-SEQ6	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
53	C149-SEQ7	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSPGSSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFSCCCTKPTDGNCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV
54	C149-SEQ8	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGGGTGSSTTTSTGPCEFGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV

[0144]

55	C149-SEQ9	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSSTGPCKTEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKIRQLL WFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPET TVV
56	C149-SEQ10	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSCKTCEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKIRQLLWF HISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTV V
57	C149-SEQ11	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSTCTTPAQGNSMFPAQEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVN MGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPN APILSTLPETTVV
58	C183-SEQ1	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSGPCKTCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKIRQL LWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPE TTVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC
59	C183-SEQ2	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSGPCRTCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKIRQL LWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPE TTVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC
60	C183-SEQ3	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSSTTTSTGPCKTCTTPEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNM GLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNA PILSTLPETTVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQ C
61	C183-SEQ4	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSTTSTGPCKTCTEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKI RQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILST LPETTVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC
62	C183-SEQ5	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSCKTCTTPAQEFGGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKIR QLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTL PETTVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC
63	C183-SEQ6	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPEFGGGGSGGGGSRELV VSYVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTP PPAYRPPNAPILSTLPETTVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHR RRSQSRESQC
64	C183-SEQ7	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESP EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGSPGSSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFSCCCTKPTDGNCTEF GGGGSGGGGSRELVVSYNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRET VLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVRRRGRSPRR RTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC

[0145]

65	C183-SEQ10	MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREAL EHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGGSGGG GTGCKTCEFGGGGGSGGGGSRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWF HISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT VRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPHRRRSQSRESQC
66	WHC149-SEQ 1	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGSGPCKTCTEFGGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVRQSL WFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPE HTVI
67	WHC149-SEQ 2	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGSGPCRTCTEFGGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVRQSL WFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPE HTVI
68	WHC149-SEQ 3	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGSSTTTSTGPKCTCTTPEFGGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGL KVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPI LSTLPEHTVI
69	WHC149-SEQ 4	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGSTTSTGPKCTCTEFGGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVR QSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILST LPEHTVI
70	WHC149-SEQ 5	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGCKTCTTPAQEFGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVRQS LWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLP EHTVI
71	WHC149-SEQ 6	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGSSSTTSTGPKCTCTTPAQGTSMFPEFGGGGGSGGGGSRTIIVN YVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTP APYRPPNAPILSTLPEHTVI
72	WHC149-SEQ 7	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGSPGSSTTSTGPKCTCTTPAQGTSMFSPCCCTKPTDGNCTEFG GGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHT VQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVI
73	WHC149-SEQ 10	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTG REHCSPHHTTIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSGGGGSGGGG TGCKTCEFGGGGGSGGGGSRTIIVNYVNDTWGLKVRQSLWFH LSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVI
74	CRM197-SEQ 1	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGT EEFIKRFG DGASRVVLSLPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKT VSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKT VGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL

[0146]

		HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGPCKTCT
75	CRM197-SEQ 2	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIP VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGPCTCT
76	CRM197-SEQ 3	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIP VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGSTTTSTGPCKTCTTP
77	CRM197-SEQ 4	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIP VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGSTTTSTGPCKTCT
78	CRM197-SEQ 5	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIP VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGCKTCTTPAQ

[0147]

79	CRM197-SEQ 6	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSSSTTSTGPCKTCTTPAQ GTSMPF
80	CRM197-SEQ 7	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSPGSSTTSTGPCKTCTTP AQTSMFPSCCCTKPTDGNCT
81	CRM197-SEQ 10	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNSKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYV GNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKV NSKLSLFFEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCCTC
82	CRM389-SEQ 1	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIASSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSGGPKCTCT
83	CRM389-SEQ 2	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT

[0148]

		AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSGPCRTCT
84	CRM389-SEQ 3	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSSSTTTSTGPKCTCTTP
85	CRM389-SEQ 4	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSSSTTTSTGPKCTCT
86	CRM389-SEQ 5	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSSCTCTTPAQ
87	CRM389-SEQ 6	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSSSTTTSTGPKCTCTTPAQGTSMPF
88	CRM389-SEQ 7	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVAFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF GGGSGGGGSGGGGSPGSSTTTSTGPKCTCTTPAQGTSMPSCC TKPTDGNCT

[0149]

89	CRM389-SEQ 10	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCLNDWDVIRDKTK TKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHP ELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTT AALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIALSSLMVAQAIPL VGELVDIGFAAYNFVESIHLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFQ GGGSGGGSGGGGSCKTC
90	CRMA-SEQ1	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGSGPCKTCT
91	CRMA-SEQ2	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGSGPCTCT
92	CRMA-SEQ3	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGSSTTTSTGP CKTCTTP
93	CRMA-SEQ4	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGSTTSTGPCK TCT
94	CRMA-SEQ5	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGGSCKTCTTPA Q
95	CRMA-SEQ6	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGSSTTTSTGP CKTCTTPAQGTSMP
96	CRMA-SEQ7	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGSPGSSTTST GPCKTCTTPAQGTSMPSCCTKPTDGNCT
97	CRMA-SEQ10	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTY PGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFG DGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRKG RGQDAMYEYMAQACAGNRGGGGSGGGSGGGSGGGGSCKTC

[0150] 关于生物材料保藏的说明

[0151] 本发明涉及下列已在中国典型培养物保藏中心(CCTCC,中国,武汉,武汉大学)进行保藏的生物材料:

[0152] 1) 杂交瘤细胞株HBs-E6F6,其具有保藏号CCTCC NO.C201270,且保藏时间为2012年6月7日;

[0153] 2) 杂交瘤细胞株HBs-E7G11,其具有保藏号CCTCC NO.C201271,且保藏时间为2012年6月7日;

[0154] 3) 杂交瘤细胞株HBs-G12F5,其具有保藏号CCTCC NO.C201272,且保藏时间为2012年6月7日;和

[0155] 4) 杂交瘤细胞株HBs-E13C5,其具有保藏号CCTCC NO.C201273,且保藏时间为2012年6月7日。

具体实施方式

[0156] 现参照下列意在举例说明本发明(而非限定本发明)的实施例来描述本发明。

[0157] 除非特别指明,本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法,基本上参照J.Sambrook等人,分子克隆:实验室手册,第2版,冷泉港实验室出版社,1989,以及F.M.Ausubel等人,精编分子生物学实验指南,第3版,John Wiley & Sons,Inc.,1995中所述的方法进行;限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。实施例中未注明来源的试剂均是本领域的常规试剂或市售可得的试剂。本领域技术人员知晓,实施例以举例方式描述本发明,且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

[0158] 实施例1:小鼠单克隆抗体的制备及性质分析

[0159] 目的:获得对HBsAg具有特异性的小鼠单克隆抗体。

[0160] 1.1Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体的制备

[0161] 1.1.1小鼠免疫

[0162] 1.1.1.1免疫原的准备:免疫原为CHO表达的重组乙型肝炎病毒表面抗原主蛋白(HBsAg,购自北京万泰生物药业股份有限公司)。取重组蛋白稀释至0.4mg/mL,与弗氏佐剂等体积混合,使其成油包水状乳剂(判断混合液是否乳化完全的方法:可将一小滴混合液滴在清水的液面上,若混合液凝聚不散,则可认为已基本上混匀)。初次免疫使用弗氏完全佐剂,后续加强免疫使用弗氏不完全佐剂,并且融合前72h的最后一次加强免疫不加佐剂。

[0163] 1.1.1.2小鼠的基础免疫:使用上述免疫原对6-8周龄BALB/c雌鼠进行皮下多点注射免疫,注射剂量为400 μ L/只/次,每次免疫前采集200 μ L眼球静脉血以备滴度测定。每隔2周加强免疫一次。用间接ELISA测定血清滴度,当小鼠血清滴度达到平台期后,小鼠停止免疫并休息两个月后进行融合。

[0164] 1.1.1.3融合前72小时的免疫加强(Final boost):小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合前72h进行脾脏免疫加强,此次加强的免疫原不含佐剂,取100 μ L 0.5mg/mL的重组蛋白进行注射。其中脾脏免疫前,需先用乙醚麻醉小鼠,剖开腹腔外皮取出脾脏,沿脾脏纵向注射100 μ L抗原,迅速手术缝合肚皮切口。

[0165] 1.1.2融合杂交瘤的制备与筛选

[0166] 融合前72h加强免疫后,取小鼠脾脏制成细胞悬液与小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0进行细胞融合,以获得杂交瘤细胞。在此之前先制备饲养细胞。在杂交瘤细胞的培养过程中,融合

后的大量骨髓瘤细胞和脾细胞在1640-HAT培养液中相继死亡,单个细胞或少数分散的细胞不易存活,必须加入其他细胞方能使之生存,这种被加入的活细胞称为饲养细胞。本实验室使用小鼠腹腔巨噬细胞或13天龄的小鼠胸腺细胞作为饲养细胞。

[0167] 1.1.2.1小鼠巨噬细胞的制备:分如下步骤进行:(i)将一只6周龄左右的BALB/c小鼠引颈处死,自来水冲洗,浸泡于75%乙醇溶液中5min;放入超净工作台,使小鼠腹部朝上;用镊子提起小鼠腹部皮肤,剪一小口,用大镊子向上下方向撕拉开皮肤,充分暴露腹部。(ii)用无菌眼科镊子提起腹膜,换一把剪刀将腹膜中央处剪一小口,然后用1mL吸管通过小口向腹腔内注入适量培养液,用吸、管小心在腹腔内搅动,最后吸出培养液于离心管中。(iii)将腹腔细胞液溶解于HAT培养液或HT培养液中,使成浓度为 2×10^5 /mL的巨噬饲养细胞。(iv)加入96孔细胞培养板,每孔0.1mL,置培养箱培养;也可直接与融合细胞混合后添加到96孔细胞培养板中。

[0168] 1.1.2.2小鼠胸腺细胞的制备:分如下步骤进行(i)将一只13天龄左右的BALB/c小鼠引颈处死,自来水冲洗,浸泡于75%乙醇溶液中5min;放入超净工作台,使小鼠腹部朝上;(ii)用镊子提起小鼠腹部皮肤,将腹部和胸部的外皮剪开。(iii)用另一把干净的剪刀剪开胸腔,用镊子取出乳白色的胸腺,经研磨后通过200目细胞筛,得到胸腺饲养细胞液。

[0169] 1.1.2.3小鼠骨髓瘤细胞的制备:分如下步骤进行。(i)小鼠骨髓瘤细胞株Sp2/0-Ag14(Sp2/0)易培养,融合率高,是目前最理想的融合细胞,但Sp2/0杂交瘤细胞系对培养条件的变化比NS-1敏感,过度稀释(密度低于 3×10^5 /mL)和pH碱性(pH高于7.3)时生长不良。(ii)选择对数生长期的细胞进行融合。(iii)融合前从培养瓶移出骨髓瘤细胞于离心管,用RPMI-1640培养液洗3次(1000rpm \times 5min)。用RPMI-1640培养液重悬细胞,计数。(iv)一般融合前5天开始复苏小鼠骨髓瘤细胞,每次融合约需6瓶35cm²Sp2/0细胞。

[0170] 1.1.2.4免疫脾细胞的制备:分如下步骤进行。(i)取待融合的BALB/C小鼠,摘除眼球放血致小鼠死亡,收集的血液制成抗血清,可作抗体检测的阳性对照。自来水冲洗,浸泡于75%乙醇溶液中5min,随即放入超净台内小鼠解剖板上,右侧卧位。(ii)无菌手术打开腹腔取出脾脏,用剪刀剪成小块放于200目细胞筛网上,再用研磨棒(注射器内芯)挤压研磨,同时用吹管滴加RPMI-1640培养液。(iii)补加适量RPMI-1640培养液,静置3-5min,取上2/3部分悬液移入50mL塑料离心管中。上述过程反复2-3次。(iv)用RPMI-1640培养液洗细胞3次(1000rpm \times 10min)。(v)用RPMI-1640培养液重悬细胞,计数。

[0171] 1.1.2.5使用PEG促融剂融合制备杂交瘤:分如下步骤进行。(1)融合前先将1mL的PEG-1500和10mL的RPMI-1640无血清培养基和200mL完全培养基预温至37 $^{\circ}$ C。(ii)将制备的骨髓瘤细胞与脾细胞混合于50mL离心管内(1×10^8 脾细胞+ 1×10^7 骨髓瘤细胞,约10:1),离心1500rpm \times 8min,离心后,轻轻弹击管底,使细胞疏松成糊状。(iii)1mL吸管吸取0.8mL(按 1×10^8 脾细胞+0.8mL PEG)加入离心管内,边加边轻轻搅拌,PEG平均在60s内加完,随即加入10mL预温至37 $^{\circ}$ C的RPMI-1640完全培养液,搅拌要温和。最后补加RPMI-1640培养液至40mL,离心1000rpm \times 5min。(iv)弃上清液,取少量HT培养液将细胞小心吹散,将细胞移入准备好的HT培养液中,加入96孔细胞培养板,每孔0.1mL,放入CO₂孵育箱中培养。(v)12h后,配置适量的HAT完全培养基,每个孔中滴加0.1mL;5天后,用HT完全培养基给孔中的细胞上清进行50-100%的换液;大约9-14天后,吸取上清检测。

[0172] 1.1.2.6杂交瘤的筛选:间接ELISA筛选,包被重组抗原HBsAg 100ng/well,加入细

胞上清50uL检测,并挑选出阳性克隆孔。

[0173] 1.1.2.7杂交瘤细胞的克隆化:采用有限稀释法,先把细胞按一定浓度进行梯度稀释,然后接种到96孔细胞培养板的每个孔中,尽可能使孔内只有一个细胞生长。杂交瘤单克隆阳性细胞株一般需要重复克隆2-3次,直到100%阳性后确认为稳定克隆株。

[0174] 1.1.3单抗腹水的生产

[0175] 取BALB/c小鼠2-3只,经腹腔注入0.5mL液体石蜡油。1周后,将对数生长期的杂交瘤细胞以1000rpm离心5min,弃上清液。杂交瘤细胞用无血清培养液悬浮,并将细胞数调至 $(1-2) \times 10^6$ /mL,每只小鼠腹腔注射0.5mL。7-10d后,小鼠腹部明显膨大后,引颈处死小鼠,自来水冲洗,浸洗,浸泡于75%乙醇中5min,使小鼠腹部朝上用注射针头固定四肢于小鼠解剖台板。用镊子提起小鼠腹部皮肤,剪一小口,然后从两边向小鼠背部方向剪开,用大镊子向上下方向撕开皮肤,充分暴露腹部。用无菌眼科镊子提取腹膜,将腹膜中央处剪一小口,然后用1mL吸管通过小口吸出腹腔内全部腹水。收集的腹水可以混合,置离心管离心,3000rpm,20min。离心后收集上清。

[0176] 1.1.4单抗腹水的纯化

[0177] 经硫酸铵沉淀和Protein A亲和层析纯化(购自美国GE公司),获得纯化的单克隆抗体。

[0178] 1.2Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体的性质分析

[0179] 1.2.1多肽合成

[0180] 以HBV序列GenBank ID:AAF24729.1作为参考序列,合成27条多肽(委托厦门精聚生物科技有限公司合成)。这27条多肽(S1-S27)一起覆盖了HBsAg的全长226个氨基酸。S1-S27的多肽信息如表2所示,HBsAg的全长氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示。

[0181] 表2:S1-S27的多肽信息

名称	氨基酸位置	氨基酸序列
S1	HBsAg-aa1-aa15	MENIASGLLGPLLVL
S2	HBsAg-aa9-aa23	LGPLLVLQAGFFLLT
S3	HBsAg-aa17-aa31	AGFFLLTKILTIPQS
S4	HBsAg-aa25-aa39	ILTIPQSLDSWWTSL
S5	HBsAg-aa33-aa47	DSWWTSLNFLGGTPV
S6	HBsAg-aa41-aa55	FLGGTPVCLGQNSQS
S7	HBsAg-aa49-aa63	LGQNSQSQISSHSPT
S8	HBsAg-aa57-aa71	ISSHSPTCCPPICPG
S9	HBsAg-aa65-aa79	CPPICPGYRWMCLRR
[0182] S10	HBsAg-aa73-aa87	RWMCLRRFIIFLCIL
S11	HBsAg-aa81-aa95	IIFLCILLLCLIFLL
S12	HBsAg-aa89-aa103	LCLIFLLVLLDYQGM
S13	HBsAg-aa97-aa111	LLDYQGMLPVCPLIP
S14	HBsAg-aa105-aa119	PVCPLIPGSSTTSTG
S15	HBsAg-aa113-aa127	SSTTSTGPCKTCTTP
S16	HBsAg-aa121-aa135	CKTCTTPAQGTSMPF
S17	HBsAg-aa129-aa143	QGTSMPFSCCCTKPT
S18	HBsAg-aa137-aa151	CCCTKPTDGNCTCIP
S19	HBsAg-aa145-aa159	GNCTCIPISSWAF
S20	HBsAg-aa153-aa167	PSSWAFAYLWEWAS
S21	HBsAg-aa161-aa175	YLWEWASVRFWSLSL
S22	HBsAg-aa169-aa183	RFSWLSLLVPFVQWF
S23	HBsAg-aa177-aa191	VPFVQWFVGLSPTVW
[0183] S24	HBsAg-aa185-aa199	GLSPTVWLSVIWMMW
S25	HBsAg-aa193-aa207	SVIWMMWFWGPSLYN
S26	HBsAg-aa201-aa215	WGPSLYNILSPFMPL
S27	HBsAg-aa209-aa226	LSPFMPLLPFIFFCLWVYI

[0184] 1.2.2 Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体与多肽S1-S27的反应性分析

[0185] (1.2.2.1) 反应板的制备。

[0186] 将多肽用pH9.6的50mM CB缓冲液(NaHCO₃/Na₂CO₃缓冲液,终浓度为50mM,pH值为9.6)稀释,终浓度为1μg/mL;在96孔酶标板每孔中加入100μL的包被液,2~8℃包被16~24小时后再37℃包被2小时;用PBST洗涤液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤1次;然后每孔加入200μL的封闭液(含有20%小牛血清及1%酪蛋白的pH值为7.4的20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄缓冲液溶液),放入37℃封闭2小时;弃去封闭液。干燥后装入铝箔袋2-8℃保存备用。

[0187] (1.2.2.2) Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体的ELISA检测

[0188] 取1.1中获得的25株Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体以含20%新生牛血清的PBS溶液稀

释至1 μ g/mL,进行定性ELISA检测。

[0189] 样品反应:取27种已包被多肽的酶标板,每孔加入100 μ L已稀释的样品,置于37 $^{\circ}$ C温箱反应30分钟。

[0190] 酶标记物反应:完成样品反应步骤后,将酶标板用PBST洗液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤5遍,每孔加入100 μ L HRP标记的羊抗鼠IgG(GAM)反应液,置于37 $^{\circ}$ C温箱反应30分钟。

[0191] 显色反应:完成酶标记物反应步骤后,将酶标板用PBST洗液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤5遍,每孔加入TMB显色剂(购自北京万泰生物药业股份有限公司)各50 μ L,置于37 $^{\circ}$ C温箱反应15分钟。

[0192] 终止反应及读值测量:完成显色反应步骤后,在反应完的酶标板中每孔加入终止液(购自北京万泰生物药业股份有限公司)50 μ L,并于酶标仪上检测各孔的OD450/630值。

[0193] Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体与27种多肽的反应性判定:根据反应后的读值进行判定。若检测值/本底值大于5,则判定为阳性。

[0194] (1.2.2.3)Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体的识别性质分析

[0195] 结果如表3所示。所获得的25株Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体的识别类型可分为5组(根据其识别性质),分别为:sA、sB、sC、sD、sE,其中sA组抗体识别的多肽为S15和S16;sB组抗体识别的多肽为S16;sC组抗体与27条多肽的反应均为阴性;sD组抗体识别的多肽为S18;和,sE组抗体识别的多肽为S8。

[0196] 表3:Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体的性质分析

分组	识别的多肽	抗体名称	抗体亚型
	S15, S16	HBs-E7G11	IgG1
	S15, S16	HBs-G12F5	IgG1
	S15, S16	HBs-E6F6	IgG1
	S15, S16	HBs-E13C5	IgG1
	S15, S16	HBs-3E9	IgG1
	S15, S16	HBs-77D1	IgG2a
	S15, S16	HBs-86H6	IgG2b
	S15, S16	HBs-4D12	IgG2b
[0197]	S15, S16	HBs-32H10	IgG1
	S15, S16	HBs-70A6	IgG1
	S15, S16	HBs-6C10	IgM
	S15, S16	HBs-61B1	IgG1
	S15, S16	HBs-37E12	IgG2b
	S15, S16	HBs-85D12	IgG1
	S15, S16	HBs-H8D9	IgG1
	S15, S16	HBs-E11E4	IgG2a
	S15, S16	HBs-83H12	IgG1
	S16	HBs-127D7	IgG1
	无	HBs-2C1	IgG1
	无	HBs-S1A	IgG2a
	无	HBs-5F11	IgG2a
[0198]	无	HBs-20A2	IgG2b
	S18	HBs-42B6	IgG1
	S18	HBs-A13A2	IgG2b
	S8	HBs-45E9	IgG3

[0199] 实施例2:Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效的评估

[0200] 目的:评估Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效。

[0201] 2.1HBsAg变性-化学发光检测方法的建立

[0202] 由于治疗后血清中存在大量的抗体,在HBsAg的检测过程中可能受到抗原抗体复合物的干扰,因此,需建立一个不受抗体干扰的定量检测HBsAg的方法。本发明的研究者采用变性的方法将样品中的抗原抗体复合物裂解,从而可排除抗体的干扰,进行准确的HBsAg定量检测。

[0203] 2.1.1反应板的制备

[0204] 将小鼠单克隆抗体HBs-45E9用pH7.4的20mM PB缓冲液($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,终浓度为50mM,pH值为7.4)稀释,终浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$;在96孔酶标板每孔加入 $100\mu\text{l}$ 的包被液,2~8℃包被16~24小时后再37℃包被2小时;用PBST洗涤液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1% Tween20)洗涤1次;然后每孔加入 $200\mu\text{l}$ 的封闭液(含有20%小牛血清及1%酪蛋白的pH值为7.4的20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液溶液),放入37℃封闭2小时;弃去封闭液。干燥后装入铝箔袋2-8℃保存备用。

[0205] 2.1.2HBsAg的变性-化学发光定量检测

[0206] 样品稀释:将小鼠血清以含20%新生牛血清的PBS溶液稀释成1:30、1:150共2个梯度进行定量检测。

[0207] 样品变性处理:将上述已稀释的样品 $15\mu\text{L}$ 与变性缓冲液 $7.5\mu\text{L}$ (15%SDS,溶于20mM PB7.4)混合均匀,放入37℃温育1小时。后往混合液中加入 $90\mu\text{L}$ 中和缓冲液(4% CHAPS,溶于20mM PB7.4),混合均匀。

[0208] 样品反应:将上述变性处理获得的混合液样品 $100\mu\text{L}$ 加入反应板。置于37℃温箱反应60分钟。

[0209] 酶标记物反应:完成样品反应步骤后,将化学发光反应板用PBST洗液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤5遍,每孔加入 $100\mu\text{L}$ HBs-A6A7-HRP反应液(由北京万泰生物药业股份有限公司提供),置于37℃温箱反应60分钟。

[0210] 发光反应和测量:完成上述酶标记物反应步骤后,将化学发光反应板用PBST洗液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤5遍,后加入发光液(由北京万泰生物药业股份有限公司提供),进行光强检测。

[0211] 待检样品HBsAg浓度的获得:使用标准品进行同样的实验,并基于标准品的测定结果绘制标准曲线(光强测量值与浓度值的线性回归);根据标准曲线,计算出待检样品的HBsAg浓度。

[0212] 2.2HBV DNA的实时荧光定量检测

[0213] HBV DNA的实时荧光定量检测试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司,按试剂盒说明书进行HBV DNA的实时荧光定量检测。

[0214] 2.3Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效

[0215] 将实施例1中获得的25株抗体以 $20\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量单剂尾静脉注射的方式注入HBV转基因小鼠体内。以生理盐水(0.9%NS)注射作为对照组。每组4只HBV转基因小鼠,雄性和雌性各2只。通过眼眶后静脉丛取血的方式采集小鼠血,监测小鼠血清中的HBsAg水平和HBV DNA水平的变化。

[0216] 检测结果示于图1。结果显示,用5组针对不同表位的Anti-HBsAg小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠后,其中sA、sD两组抗体显示出明显的病毒清除效果:使用这两组抗体的治疗组中的小鼠血清HBsAg和HBV DNA的水平均出现明显下降;用其它三组抗体治疗后,小鼠血清HBsAg和HBV DNA的水平未显示出明显下降。在sA、sD两组抗体中,用sA组抗体治疗后,HBsAg和HBV DNA的血清水平的下降幅度大于sD组抗体,且持续抑制时间最长的四株抗体均为sA组抗体,分别是HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5。

[0217] 实施例3:sA组小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效和副作用

[0218] 目的:评估sA组小鼠单克隆抗体治疗HBV转基因小鼠的疗效和副作用,监测单剂抗

体治疗后有效抑制病毒的持续时间,并监测ALT。

[0219] 挑选出实施例2筛选得到的治疗效果最优的四株抗体HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5进行实验。以20mg/kg的剂量单剂尾静脉注射的方式注入HBV转基因小鼠体内。以生理盐水(0.9%NS)作为阴性对照组,并且以通过灌胃的方式给以3.2mg/kg/d恩替卡韦(ETV)治疗的HBV转基因小鼠作为有效药物对照组。每组4只HBV转基因小鼠,雄性和雌性各2只。通过眼眶后静脉丛取血的方式采集小鼠血,监测小鼠血清中的HBsAg、HBV DNA、ALT的水平。

[0220] 按实施例2中所述方法检测HBsAg和HBV DNA的水平,并且利用北京万泰生物药业股份有限公司提供的丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒进行ALT的检测。

[0221] 用HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5、0.9%NS或恩替卡韦(ETV)治疗HBV转基因小鼠的结果示于图2中(显示的数值为各实验组4只小鼠的平均值)。结果显示,单抗HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5或HBs-E13C5的单剂治疗后,HBV转基因小鼠血清中HBsAg和HBV DNA的水平均出现明显下降,其中HBV DNA的下降幅度与ETV治疗组相当。相比之下,ETV治疗组小鼠血清中的HBsAg水平未出现明显下降,而抗体治疗组的HBsAg血清水平则显著降低。此外,在任一抗体的治疗过程中,均未观察到ALT的升高。

[0222] 实施例4:HBs-E6F6注射后小鼠血清中HBV DNA和HBsAg的动力学变化过程

[0223] 目的:探索单克隆抗体治疗发挥最大疗效所需的最短时间。

[0224] 从实施例3的四株抗体中挑选出治疗效果最好的小鼠单克隆抗体HBs-E6F6,以20mg/kg的剂量单剂尾静脉注射的方式注入HBV转基因小鼠体内。本组实验取用4只雄性小鼠,监测小鼠血清中HBV DNA和HBsAg的动力学变化过程。

[0225] 按实施例2中所述方法检测HBsAg、HBV DNA的血清水平。

[0226] 检测结果示于图3。结果显示,小鼠血清中的HBsAg和HBV DNA的水平均可在注射后1至24小时内降低至最大抑制水平。

[0227] 实施例5:人鼠嵌合HBs-E6F6和HBs-E7G11抗体的治疗效果评估

[0228] 目的:评价嵌合抗体的治疗效果。

[0229] 将HBs-E6F6和HBs-E7G11抗体的Igv基因与编码人抗体恒定区的Igc基因连接,在CHO细胞中重组表达并纯化获得嵌合抗体HBs-E6F6和嵌合抗体HBs-E7G11。将嵌合抗体以10mg/kg的剂量单剂尾静脉注射的方式注入HBV转基因小鼠体内,监测小鼠血清中HBV DNA和HBsAg的动力学变化过程。检测结果示于图4。结果显示,嵌合抗体HBs-E6F6和嵌合抗体HBs-E7G11均能够有效清除小鼠体内的HBsAg和HBV DNA。

[0230] 实施例6:sA组抗体识别的表位的鉴定

[0231] 目的:鉴定sA组抗体识别的表位,确定其识别的核心氨基酸序列。

[0232] 6.1构建pC149-SEQ克隆

[0233] 将HBcAg用作载体蛋白时,可以使用全长HBcAg蛋白或其片段(例如,HBcAg蛋白的N端aa1-149)(参见,杨海杰等人,基于乙型肝炎病毒核心蛋白的颗粒性肽展示载体的构建,厦门大学学报(自然科学版)2004.05 Vol.43.No.4)。在本实验中,以HBcAg蛋白的片段(aa1-149)为载体蛋白,构建了一系列克隆。

[0234] 用定点突变的方法将编码HBcAg蛋白片段(aa 1-149)的核苷酸序列中编码HBcAg aa79-81的序列缺失,并在缺失两端各引入一个连接体,并且在2个连接体之间设计BamH I/

EcoR I酶切位点,从而获得载体蛋白C149/mut的编码序列(C149/mut的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示,其结构为HBc(1-78)-G₄SG₄T-GS-G₄SG₄-HBc(82-149);在C149/mut中,HBcAg的3个氨基酸(aa 79-81)被富含甘氨酸的柔性连接体G₄SG₄T-GS-G₄SG₄替代);将C149/mut的编码序列克隆入pT0-T7原核表达载体(罗文新等,生物工程学报,2000,16:53-57),获得重组质粒pC149/mut,其编码蛋白C149/mut。之后,利用将BamH I/EcoR I酶切位点,将目的多肽的编码序列(图5A中以SEQ表示)克隆入柔性连接体之间,从而获得重组载体pC149-SEQ,其编码重组蛋白C149-SEQ(包含载体蛋白C149/mut和目的多肽SEQ)。重组载体pC149-SEQ的克隆设计和结构如图5A所示。

[0235] 将表4中所列的9段多肽的基因序列分别连接入重组质粒pC149/mut,从而获得9个pC149-SEQ重组载体(pC149-SEQ1,3,4,5,6,8,9,10,11),其分别编码重组蛋白C149-SEQ1,3,4,5,6,8,9,10,11。

[0236] 表4:用C149/mut展示的目的多肽

[0237]

多肽名称	多肽位置	氨基酸序列
SEQ1	HBsAg-aa119-aa125	GPCKTCT
SEQ3	HBsAg-aa113-aa127	STTTSTGPCKTCTTP
SEQ4	HBsAg-aa115-aa125	TTSTGPCKTCT
SEQ5	HBsAg-aa121-aa129	CKTCTTPAQ
SEQ6	HBsAg-aa113-aa135	STTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFP
SEQ8	HBsAg-aa113-aa121	STTTSTGPC
SEQ9	HBsAg-aa117-aa123	STGPCKT
SEQ10	HBsAg-aa121-aa124	CKTC

[0238]

SEQ11	HBsAg-aa123-aa137	TCTTPAQGNSMFPAQ
-------	-------------------	-----------------

[0239] 6.2表达并纯化C149-SEQ蛋白

[0240] 下面以C149-SEQ6为例,阐述重组蛋白的表达和纯化过程。

[0241] (6.2.1) 高效表达菌株的获得:按6.1中所述方法构建目的载体pC149-SEQ6,经DNA测序鉴定正确后,将目的载体转化入大肠杆菌ER2566菌株(E.coli,ER2566),获得表达菌株。

[0242] (6.2.2) C149-SEQ6蛋白的表达:将表达菌株接种至500mL三角瓶,于37摄氏度定温摇床培养至OD=1.0左右,加入异丙基-beta-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度0.5mM,于25摄氏度摇晃诱导表达6小时。

[0243] (6.2.3) C149-SEQ6蛋白的纯化:

[0244] (6.2.3.1) 菌体超声破碎:离心收取6.2.2中的菌体,超声破碎菌体,超声缓冲液成

分为:20mM磷酸盐缓冲液(PH6.0)+300mM NaCl。

[0245] (6.2.3.2) 目的蛋白的初步纯化:由于目的蛋白具有耐热的性质,因此,将超声破碎后的混合物于65摄氏度水浴30分钟,离心收取上清;按体积比1:1向上清中加入饱和硫酸铵,离心收取沉淀;加入适当体积的缓冲液将沉淀重悬,缓冲液成分为:20mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)+150mM NaCl,获得初步纯化的目的蛋白。

[0246] (6.2.3.3) 目的蛋白的层析纯化:利用Sepharose 4FF(GE)分子筛柱层析进一步纯化6.2.3.2中获得的蛋白,从而获得经纯化的目的蛋白。对经纯化的目的蛋白进行SDS-PAGE检测,并用透射电镜鉴定目的蛋白颗粒的组装状态。

[0247] 图5B显示了9种重组蛋白的SDS-PAGE检测结果和透射电镜观察结果。结果显示,所获得的9种重组蛋白的纯度均大于95%,并且均能够组装成大小均一的蛋白颗粒。

[0248] 6.2评价sA组抗体与9种重组蛋白的反应性

[0249] 6.2.1反应板的制备

[0250] 按实施例1-1.2节中的方法制备反应板,包被抗原为展示目的多肽的9种重组蛋白。

[0251] 6.2.2HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5与各重组蛋白的反应性的ELISA检测

[0252] 按实施例1-1.2节中的方法检测HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5与各重组蛋白的反应性。

[0253] 6.2.3HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5所识别的表位的分析

[0254] 6.2.2的ELISA检测结果如图6所示。结果显示,HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5与展示多肽SEQ1、SEQ3、SEQ4、SEQ5、SEQ6、SEQ10的重组蛋白具有良好反应性,而与展示多肽SEQ8、SEQ9、SEQ11的重组蛋白无反应。这些多肽的序列分析显示,多肽SEQ1、SEQ3、SEQ4、SEQ5、SEQ6、SEQ10的共同特征是包含HBsAg aa121-aa124,多肽SEQ8、SEQ9、SEQ11的共同特征是不包含完整的HBsAg aa121-124。因此,可确定HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5识别相同的表位,并且它们所识别的最小表位的氨基酸序列为HBsAg aa121-124,即CKTC。ELISA检测结果还显示,重组蛋白C149-SEQ1和3-6具有相当的与抗体的反应活性,且它们的反应活性均比C149-SEQ10更高。因此,多肽SEQ1和3-6是抗体HBs-E6F6、HBs-E7G11、HBs-G12F5、HBs-E13C5识别的优选表位肽。此外,由于SEQ1的序列比SEQ3-6更短,因此,SEQ1被认为是优选的核心表位。

[0255] 实施例7:HBs-E6F6和HBs-E7G11对表位肽SEQ1的氨基酸突变的敏感性的分析

[0256] 对SEQ1(GPCKTCT)进行氨基酸点突变,共制备了7种突变体。这7种突变体多肽的氨基酸序列如表5所示。按实施例6所述的方法制备包含突变体多肽和C149/mut的重组蛋白,并评价HBs-E6F6和 HBs-E7G11与这7种突变体多肽的反应性。

[0257] 表5:突变体多肽的氨基酸序列

名称	突变氨基酸	氨基酸序列
M1	P120S	GSCKTCT
M2	P120T	GTCKTCT
M3	C121S	GPSKTCT
[0258] M4	K122R	GPCRTCT
M5	T123I	GPCKICT
M6	C124S	GPCKTST
M7	C121S/C124S	GPSKTST
SEQ1	HBsAg aa119-aa125	GPCKTCT

[0259] 检测结果如图7所示。结果显示,突变体M1 (P120S)、突变体M2 (P120T)、突变体M4 (K122R) 对抗体HBs-E6F6和HBs-E7G11的结合与表位肽SEQ1相当,而其他突变体与抗体的结合则显著下降。这表明,P120S、P120T、K122R突变不影响HBs-E6F6和HBs-E7G11与表位肽SEQ1的反应性,而C121S、C124S、C121S/C124S、T123I突变则显著降低了HBs-E6F6和HBs-E7G11与表位肽SEQ1的反应性。

[0260] 实施例8:包含表位肽的重组蛋白的制备及其免疫原性评价

[0261] 8.1包含表位肽的重组蛋白的制备

[0262] 按实施例6中的方法,用C149/mut作为蛋白载体来展示表位肽SEQ1、SEQ3、SEQ4、SEQ6、SEQ7,其中SEQ3、SEQ4、SEQ6、SEQ7均为在优选核心表位SEQ1的N和/或C端延伸后获得的多肽(即,包含核心表位表位SEQ1),由此制备5种可以形成核壳样颗粒(CLP)的重组蛋白(用作免疫用的抗原)。

[0263] 如实施例6所述,制备5种重组蛋白C149-SEQ1、SEQ3、SEQ4、SEQ6、SEQ7,并对这5种重组蛋白进行SDS-PAGE检测和透射电镜观察。检测结果如图8A所示。结果显示,所获得的5种重组蛋白的纯度均大于95%,并且都能够组装成大小均一的蛋白颗粒。

[0264] 8.2包含表位肽的重组蛋白的免疫原性的评价

[0265] 8.2.1小鼠免疫

[0266] 用上述5种重组蛋白以及载体蛋白C149/mut(用作对照)分别免疫BALB/C小鼠,免疫佐剂选用氢氧化铝佐剂,免疫剂量为3ug/dose,采用后肢大腿外侧肌肉注射的免疫方式,免疫程序为初次免疫后每隔2周加强免疫,共免疫4次。

[0267] 8.2.2血清Anti-HBs抗体滴度的检测

[0268] 8.2.2.1反应板的制备

[0269] 按实施例1-1.2节中的方法制备反应板,包被抗原为CHO细胞重组表达的乙型肝炎病毒表面抗原主蛋白(HBsAg)。

[0270] 8.2.2.2血清Anti-HBs抗体滴度的ELISA检测

[0271] 样品稀释:将小鼠血清以含20%新生牛血清的PBS溶液稀释成1:100、1:500、1:2500、1:12500、1:62500、1:312500、1:1562500共7个稀释梯度。

[0272] 样品反应:取出已包被的反应板,每孔加入100 μ L已稀释的样品,置于37 $^{\circ}$ C温箱反应30分钟。

[0273] 酶标记物反应:完成样品反应步骤后,将酶标板用PBST洗液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤5遍,每孔加入100 μ L GAM-HRP反应液,置于37 $^{\circ}$ C温箱反应30分钟。

[0274] 显色反应:完成酶标记物反应步骤后,将酶标板用PBST洗液(20mM PB7.4,150mM NaCl,0.1%Tween20)洗涤5遍,每孔加入TMB显色剂(由北京万泰生物药业股份有限公司提供)各50 μ L,置于37 $^{\circ}$ C温箱反应15分钟。

[0275] 终止反应及读值测量:完成显色反应步骤后,在反应完的酶标板中每孔加入终止液(由北京万泰生物药业股份有限公司提供)50 μ L,并于酶标仪上检测各孔的OD450/630值。

[0276] 血清Anti-HBsAg抗体滴度的计算:取读值范围在0.2-2.0之间的样品稀释倍数与读值作出回归曲线,计算出读值等于2倍本底值时的样品稀释倍数,并将该样品稀释倍数作为血清Anti-HBsAg抗体滴度。

[0277] 8.2.3血清Anti-C149/mut抗体滴度的检测

[0278] 8.2.3.1反应板的制备

[0279] 按实施例1-1.2节中的方法制备反应板,包被抗原为融合载体蛋白C149/mut。

[0280] 8.2.3.2血清Anti-C149/mut抗体滴度的ELISA检测

[0281] 按本实施例8.2.2.2中的方法进行样品稀释、样品反应、酶标记物反应、显色反应、终止反应及读值测量,并计算血清Anti-C149/mut抗体滴度。

[0282] 8.2.4包含表位肽的重组蛋白的免疫原性分析

[0283] 通过上述步骤获得免疫后的血清Anti-HBsAg抗体滴度和血清Anti-C149/mut抗体滴度,结果如图8B所示。结果显示,包含表位肽SEQ1、SEQ3、SEQ4、SEQ6、SEQ7的重组蛋白均能在BALB/C小鼠中诱导产生高滴度的Anti-HBsAg,而单独的C149/mut不能诱导产生高滴度的Anti-HBsAg。

[0284] 实施例9:小鼠血源Anti-SEQ6多克隆抗体的治疗效果评价

[0285] 9.1小鼠血源Anti-SEQ6多克隆抗体的制备

[0286] 9.1.1小鼠免疫

[0287] 用实施例8-8.2.1中所述的方法免疫BALB/C小鼠,免疫原为包含SEQ6的重组蛋白(C149-SEQ6)。

[0288] 9.1.2小鼠血源Anti-SEQ6多克隆抗体的纯化

[0289] 完成免疫程序后,小鼠血清Anti-HBsAg抗体滴度达到较高水平,多次采集眼眶后静脉丛血。经硫酸铵沉淀和Protein A亲和层析纯化获得纯化后多克隆抗体。

[0290] 9.2小鼠血源Anti-SEQ6多克隆抗体的治疗效果评价

[0291] 将小鼠血源Anti-SEQ6多克隆抗体以尾静脉注射的方式注入HBV转基因小鼠体内,监测其血清中HBV DNA和HBsAg的变化。检测结果如图9所示。结果显示,用C149-SEQ6免疫小鼠后获得的多克隆抗体在HBV转基因小鼠体内能够显著降低HBV DNA和HBsAg的水平,具有很好的清除HBV的效果。

[0292] 实施例10:重组蛋白治疗HBV转基因小鼠的效果

[0293] 10.1小鼠免疫

[0294] 利用HBV转基因小鼠模型评价实施例8中获得的5种重组蛋白(C149-SEQ1、C149-SEQ3、C149-SEQ4、C149-SEQ6、C149-SEQ7)的治疗效果,以载体蛋白C149/mut作为对照组;免疫佐剂为氢氧化铝佐剂,免疫剂量为12 μ g/dose,采用后肢大腿外侧肌肉注射的免疫方式,免疫程序为初次免疫后2周加强免疫,之后每周加强免疫一次,即0、2、3、4、5周各免疫一次,共免疫5次。

[0295] 10.2血清抗体滴度的检测

[0296] 按实施例8-8.2.2和8.2.3中描述的方法进行血清Anti-HBsAg、Anti-C149/mut抗体滴度的检测,并监测小鼠血清中的病毒学指标,HBV DNA和HBsAg的水平。

[0297] 10.3重组蛋白的治疗效果分析

[0298] 检测结果如图10所示。结果显示,在用重组蛋白进行免疫治疗的组中,小鼠血清中均可检出Anti-HBsAg和Anti-C149/mut,并且小鼠血清中HBV DNA和HBsAg的水平均出现了不同程度的下降。相比之下,对照组的小鼠血清中没有产生Anti-HBsAg,并且血清中HBV DNA和HBsAg的水平均未出现下降。本实施例表明,本发明所鉴定的表位和表位肽是HBV感染的有效治疗靶标。基于这些表位和表位肽所获得的重组蛋白具有治疗慢性HBV感染的潜力。特别地,包含表位肽SEQ1-SEQ7的重组蛋白可用作蛋白疫苗,用于打破HBV转基因小鼠对于HBV的免疫耐受状态,诱发有效的、特异的、治疗性的抗HBV免疫应答。

[0299] 实施例11:基于不同载体蛋白和SEQ6的重组蛋白的构建和评价

[0300] 11.1构建3种融合表达载体

[0301] 按实施例6中描述的方法构建3种载体蛋白,分别为C149/mut(SEQ ID NO:43)、C183/mut(SEQ ID NO:44)、WHC149/mut(SEQ ID NO:45),C149/mut是由乙型肝炎病毒核心蛋白N端的149个氨基酸残基改造而来,C183/mut是由乙型肝炎病毒核心蛋白全长183个氨基酸残基改造而来,WHC149/mut是由土拨鼠肝炎病毒核心蛋白N端的149个氨基酸残基改造而来,改造方法如6.1所述。将SEQ6分别连接入三种载体中,获得重组蛋白C149-SEQ6、C183-SEQ6、WHC149-SEQ6。

[0302] 11.2表达并纯化3种不同载体重组SEQ6疫苗

[0303] 按6.2中所述方法表达并纯化3种重组蛋白(C149-SEQ6、C183-SEQ6、WHC149-SEQ6)。对获得的目的蛋白进行SDS-PAGE检测,并用透射电镜鉴定目的蛋白颗粒的组装状态。结果如图11A所示。结果显示,所获得的3种重组蛋白的纯度均大于95%,并且均能够组装成大小均一的蛋白颗粒。

[0304] 11.3三种重组蛋白用于治疗HBV转基因小鼠的效果

[0305] 利用HBV转基因小鼠模型评价11.2中获得的3种重组蛋白用作蛋白疫苗的治疗效果。免疫佐剂为氢氧化铝佐剂,免疫剂量为12 μ g/dose,免疫程序为初次免疫后2周加强免疫,之后每周加强免疫一次,即0、2、3、4、5周各免疫一次,共免疫5次。

[0306] 按实施例8-8.2.2和8.2.3中描述的方法进行血清Anti-HBsAg、抗-载体的抗体滴度检测,并监测小鼠血清中的病毒学指标,HBV DNA和HBsAg的水平。

[0307] 检测结果如图10所示。结果显示,在用重组蛋白进行免疫治疗的组中,小鼠血清中均可检出Anti-HBsAg和抗-载体抗体,并且小鼠血清中HBV DNA和HBsAg的水平均出现了不同程度的下降。相比之下,对照组的小鼠血清中没有产生Anti-HBsAg,并且血清中HBV DNA和HBsAg的水平均未出现下降。本实施例表明,可以利用不同的载体蛋白来呈现本发明所

鉴定的表位和表位肽,并且由此所制备的重组蛋白具有治疗慢性HBV感染的潜力。此类重组蛋白可用作蛋白疫苗,用于打破HBV转基因小鼠对于HBV的免疫耐受状态,诱发有效的、特异的、治疗性的抗HBV免疫应答。

[0308] 类似地,还以C149/mut (SEQ ID NO:43)、C183/mut (SEQ ID NO:44)或WHC149/mut (SEQ ID NO:45)以及SEQ1-5,7和10为基础,设计并构建了重组蛋白C149-SEQ1-5,7,10; C183-SEQ1-5,7,10;和WHC149-SEQ1-5,7,10。这些重组蛋白的氨基酸序列参见表1。

[0309] 实施例12:以CRM197或其片段为基础的重组蛋白的构建和表达

[0310] 本实施例以CRM197或其片段和SEQ6为基础,设计并构建了一系列重组蛋白。

[0311] CRM197的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,其由535个氨基酸组成。CRM197的一个示例性片段是CRM 389,其由CRM197的N端389个氨基酸组成。CRM197的另一个示例性片段是CRM A,其由CRM197的N端190个氨基酸组成。

[0312] 如图12所示,将SEQ6经由连接体连接至CRM197,CRM389或CRMA的C末端,其中所述连接体的氨基酸序列为GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:46)。连接体的主要功能是,促进其所连接的2个肽相对独立地折叠,以获得较高的生物学活性。所获得的重组蛋白分别命名为CRM197-SEQ6,CRM389-SEQ6和CRMA-SEQ6。

[0313] 构建编码CRM197-SEQ6,CRM389-SEQ6和CRMA-SEQ6的目的基因,然后将目的基因分别与pT0-T7原核表达载体(罗文新等,生物工程学报,2000,16:53-57)相连接,并转入ER2566细菌;提取质粒,经NdeI/SalI酶切鉴定得到含有目的基因片段的阳性表达克隆。

[0314] 按实施例6-6.2中的方法表达并纯化3种重组蛋白CRM197-SEQ6,CRM389-SEQ6和CRMA-SEQ6,并用实施例11中描述的方法对这3种重组蛋白的治疗效果进行评价。

[0315] 类似地,还以CRM197或其片段以及SEQ1-5,7和10为基础,设计并构建了重组蛋白CRM197-SEQ1-5,7,10;CRM389-SEQ1-5,7,10;和CRMA-SEQ1-5,7,10。这些重组蛋白的氨基酸序列参见表1。

[0316] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,但本领域技术人员将理解:根据已经公开的所有教导,可以对细节进行各种修改和变动,并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

序列表

<110> 厦门大学
 <120> 用于治疗 HBV 感染及相关疾病的多肽及抗体
 <130> IDC130078
 <160> 97
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SEQ1
 <400> 1

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr
1 5

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SEQ2

[0001] <400> 2

Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr
1 5

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SEQ3

<400> 3

Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro
1 5 10 15

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ4

<400> 4

Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr
1 5 10

<210> 5

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ5

<400> 5

Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln
 1 5

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ6

<400> 6

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
 1 5 10 15

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro
 20

[0002]

<210> 7
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ7

<400> 7

Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr
 1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro
 20 25 30

Thr Asp Gly Asn Cys Thr
 35

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ8

<400> 8

Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys
 1 5

<210> 9
 <211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ9

<400> 9

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr
1 5

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ10

<400> 10

Cys Lys Thr Cys
1

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ11

[0003] <400> 11

Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ala Gln
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S1

<400> 12

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

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S2

<400> 13

Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S3

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S4

<400> 15

Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0004]

<220>
 <223> S5

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S6

<400> 17

Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S7

<400> 18

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S8

<400> 19

Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S9

<400> 20

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0005]

<220>
 <223> S10

<400> 21

Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S11

<400> 22

Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S12

<400> 23

Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S13

<400> 24

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S14

<400> 25

Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0006] <220>
 <223> S15

<400> 26

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S16

<400> 27

Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S17

<400> 28

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S18

<400> 29

Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S19

<400> 30

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0007]

<220>
 <223> S20

<400> 31

Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S21

<400> 32

Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S22

<400> 33

Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe

	1		5						10						15
	<210>	34													
	<211>	15													
	<212>	PRT													
	<213>	人工序列													
	<220>														
	<223>	S23													
	<400>	34													
	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp
	1			5						10					15
	<210>	35													
	<211>	15													
	<212>	PRT													
	<213>	人工序列													
	<220>														
	<223>	S24													
	<400>	35													
	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp
	1				5					10					15
	<210>	36													
	<211>	15													
	<212>	PRT													
[0008]	<213>	人工序列													
	<220>														
	<223>	S25													
	<400>	36													
	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Phe	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn
	1				5					10					15
	<210>	37													
	<211>	15													
	<212>	PRT													
	<213>	人工序列													
	<220>														
	<223>	S26													
	<400>	37													
	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Pro	Leu
	1				5					10					15
	<210>	38													
	<211>	18													
	<212>	PRT													
	<213>	人工序列													
	<220>														
	<223>	S27													
	<400>	38													

Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
1 5 10 15

Tyr Ile

<210> 39
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HBsAg

<400> 39

Met Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys
35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys
50 55 60

[0009]

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
145 150 155 160

Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Phe Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 40
<211> 183
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg

<400> 40

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

[0010]

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
145 150 155 160

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser
165 170 175

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180

<210> 41
<211> 188

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> WHcAg

 <400> 41
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10 15

 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
 20 25 30

 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

 Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
 50 55 60

 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln
 65 70 75 80

 Val Arg Thr Ile Ile Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
 85 90 95

 Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln
 100 105 110

 His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

 Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

 Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser
 145 150 155 160

 Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
 165 170 175

 Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys
 180 185

[0011]

<210> 42
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> CRM197

 <400> 42
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 [0012] Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 [0013] 420 425 430
 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510
 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535
 <210> 43
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C149/mut
 <400> 43
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Phe Glu Phe Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn
 100 105 110
 Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser
 115 120 125
 Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe
 130 135 140
 Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro
 145 150 155 160
 Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
 165 170

[0014]

<210> 44
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> C183/mut
 <400> 44
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Phe Glu Phe Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn
 100 105 110

Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser
 115 120 125

Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe
 130 135 140

Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg
 165 170 175

Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser
 180 185 190

Pro His Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 195 200 205

<210> 45
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> WHC149/mut

<400> 45

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
 50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly

	65			70					75				80			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Phe	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly
				85						90				95		
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Ile	Ile	Val	Asn	Tyr	Val	Asn
				100					105					110		
	Asp	Thr	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gln	Ser	Leu	Trp	Phe	His	Leu	Ser
			115					120					125			
	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Phe
		130					135					140				
	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Ala	Pro	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro
	145					150					155					160
	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val	Ile					
					165					170						
	<210>	46														
	<211>	15														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	连接体														
[0016]	<400>	46														
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	1				5					10					15	
	<210>	47														
	<211>	177														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	C149-SEQ1														
	<400>	47														
	Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Leu
	1				5					10					15	
	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp
				20					25					30		
	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys
			35					40					45			
	Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu
		50					55					60				
	Leu	Met	Asn	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly
	65					70					75					80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Pro Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
100 105 110

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu
115 120 125

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu
130 135 140

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
145 150 155 160

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
165 170 175

Val

<210> 48
<211> 177
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017]

<220>
<223> C149-SEQ2

<400> 48

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Pro Cys Arg Thr Cys
85 90 95

Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
100 105 110

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu

	115	120	125															
	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Leu		
	130						135					140						
	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr		
	145					150					155					160		
	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Thr	Val		
				165						170					175			
	Val																	
	<210>	49																
	<211>	185																
	<212>	PRT																
	<213>	人工序列																
	<220>																	
	<223>	C149-SEQ3																
	<400>	49																
	Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Leu		
	1				5					10					15			
[0018]	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp		
				20					25					30				
	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys		
			35					40					45					
	Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu		
		50					55					60						
	Leu	Met	Asn	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly		
	65					70					75				80			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr		
				85						90					95			
	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
				100					105					110				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Val	Asn		
			115					120					125					
	Met	Gly	Leu	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu		
	130						135					140						
	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val		
	145					150					155				160			

Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
165 170 175

Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
180 185

<210> 50
<211> 181
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C149-SEQ4

<400> 50

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

[0019] Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro
85 90 95

Cys Lys Thr Cys Thr Glu Phe Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
115 120 125

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
130 135 140

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
145 150 155 160

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
165 170 175

Glu Thr Thr Val Val
180

<210> 51
<211> 179
<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> C149-SEQ5
 <400> 51
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Cys Lys Thr Cys Thr Thr
 85 90 95
 Pro Ala Gln Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg
 100 105 110
 [0020]
 Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg
 115 120 125
 Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr
 130 135 140
 Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro
 145 150 155 160
 Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr
 165 170 175
 Thr Val Val

<210> 52
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> C149-SEQ6
 <400> 52
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe
 100 105 110
 Pro Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
 115 120 125
 Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu
 130 135 140
 Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu
 145 150 155 160
 Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
 165 170 175
 Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
 180 185 190

[0021]

Val

<210> 53
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C149-SEQ7

<400> 53

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Thr
85 90 95

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
115 120 125

Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val
130 135 140

Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu
145 150 155 160

Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu
165 170 175

Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
180 185 190

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
195 200 205

<210> 54

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C149-SEQ8

<400> 54

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

[0022]

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Thr
 85 90 95

Gly Pro Cys Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg
 100 105 110

Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg
 115 120 125

Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr
 130 135 140

Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr
 165 170 175

Thr Val Val

<210> 55
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0023]

<220>
 <223> C149-SEQ9
 <400> 55

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Cys Lys
 85 90 95

Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
 100 105 110

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu

	115		120		125													
	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Leu		
	130						135					140						
	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr		
	145					150					155					160		
	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Thr	Val		
				165						170					175			
	Val																	
	<210>	56																
	<211>	174																
	<212>	PRT																
	<213>	人工序列																
	<220>																	
	<223>	C149-SEQ10																
	<400>	56																
	Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Leu		
	1				5					10					15			
[0024]	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp		
				20					25					30				
	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys		
			35					40					45					
	Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu		
		50					55					60						
	Leu	Met	Asn	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly		
	65					70					75				80			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Cys	Lys	Thr	Cys	Glu	Phe		
				85						90					95			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Glu	Leu	Val	Val	Ser		
				100						105				110				
	Tyr	Val	Asn	Val	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp	Phe		
			115					120					125					
	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu		
		130					135					140						
	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro		
	145					150					155				160			

Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
165 170

<210> 57
<211> 185
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C149-SEQ11

<400> 57

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

[0025] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Thr Cys Thr Thr Pro Ala
85 90 95

Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ala Gln Glu Phe Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn
115 120 125

Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu
130 135 140

Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
165 170 175

Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
180 185

<210> 58
<211> 211
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C183-SEQ1

<400> 58

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Pro Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
100 105 110

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu
115 120 125

[0026]

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu
130 135 140

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
145 150 155 160

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
165 170 175

Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg
180 185 190

Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu
195 200 205

Ser Gln Cys
210

<210> 59

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C183-SEQ2

<400> 59

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Pro Cys Arg Thr Cys
 85 90 95

Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
 100 105 110

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu
 115 120 125

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu
 130 135 140

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
 145 150 155 160

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
 165 170 175

Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg
 180 185 190

Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu
 195 200 205

Ser Gln Cys
 210

[0027]

<210> 60
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C183-SEQ3

<400> 60

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Thr
85 90 95

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn
115 120 125

Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu
130 135 140

[0028]

Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
165 170 175

Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro
180 185 190

Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro His
195 200 205

Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
210 215

<210> 61

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C183-SEQ4

<400> 61

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro
 85 90 95

Cys Lys Thr Cys Thr Glu Phe Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
 115 120 125

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 130 135 140

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 145 150 155 160

[0029] Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 165 170 175

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Thr
 180 185 190

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser
 195 200 205

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 210 215

<210> 62
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C183-SEQ5

<400> 62

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

	35		40		45													
	Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu		
	50						55					60						
	Leu	Met	Asn	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly		
	65					70					75					80		
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr		
					85					90					95			
	Pro	Ala	Gln	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg		
				100					105						110			
	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Val	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Ile	Arg		
			115					120					125					
	Gln	Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr		
		130					135						140					
	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro		
	145					150					155					160		
	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr		
					165					170					175			
[0030]	Thr	Val	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Ser		
				180					185					190				
	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser		
			195					200					205					
	Arg	Glu	Ser	Gln	Cys													
			210															
	<210>	63																
	<211>	227																
	<212>	PRT																
	<213>	人工序列																
	<220>																	
	<223>	C183-SEQ6																
	<400>	63																
	Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Leu		
	1				5					10					15			
	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp		
				20					25					30				
	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys		
				35				40					45					

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr
 85 90 95

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe
 100 105 110

Pro Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu
 115 120 125

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu
 130 135 140

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu
 145 150 155 160

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
 165 170 175

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
 180 185 190

Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg
 195 200 205

Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu
 210 215 220

Ser Gln Cys
 225

<210> 64
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C183-SEQ7

<400> 64

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

[0031]

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Thr
85 90 95

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
115 120 125

Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val
130 135 140

Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu
145 150 155 160

Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu
165 170 175

Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
180 185 190

[0032]

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
195 200 205

Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg
210 215 220

Arg Arg Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser
225 230 235 240

Gln Cys

<210> 65

<211> 208

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C183-SEQ10

<400> 65

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Cys Lys Thr Cys Glu Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Ser
 100 105 110

Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe
 115 120 125

His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu
 130 135 140

Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro
 145 150 155 160

[0033] Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg
 165 170 175

Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg
 180 185 190

Ser Gln Ser Pro His Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 195 200 205

<210> 66
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> WHC149-SEQ1

<400> 66

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu

	50				55					60					
Leu	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Trp	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly
65					70					75					80
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys
				85					90					95	
Thr	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Ile
			100					105					110		
Ile	Val	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Thr	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gln	Ser
			115				120						125		
Leu	Trp	Phe	His	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Thr	Val	Gln
	130					135					140				
Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Ala	Pro	Tyr
145					150					155					160
Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val
				165					170						175

Ile

[0034]

<210> 67
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> WHC149-SEQ2

 <400> 67

Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Leu
1				5					10					15	
Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Leu	Val	Asp
			20					25					30		
Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Glu	His	Cys
		35					40					45			
Ser	Pro	His	His	Thr	Thr	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu	Val	Cys	Trp	Asp	Glu
	50					55					60				
Leu	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Trp	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly
65					70					75					80
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys
				85					90					95	

Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Ile
100 105 110

Ile Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser
115 120 125

Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln
130 135 140

Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr
145 150 155 160

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val
165 170 175

Ile

<210> 68
<211> 185
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WHC149-SEQ3

<400> 68

[0035]

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Thr
85 90 95

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Ile Ile Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr
115 120 125

Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu
130 135 140

Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
165 170 175

Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile
180 185

<210> 69

<211> 181

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WHC149-SEQ4

<400> 69

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
35 40 45

[0036]

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro
85 90 95

Cys Lys Thr Cys Thr Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Arg Thr Ile Ile Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
115 120 125

Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln
130 135 140

His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
165 170 175

Glu His Thr Val Ile
180

<210> 70
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> WHC149-SEQ5

<400> 70

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
 50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Cys Lys Thr Cys Thr Thr
 85 90 95

[0037]

Pro Ala Gln Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg
 100 105 110

Thr Ile Ile Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg
 115 120 125

Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr
 130 135 140

Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala
 145 150 155 160

Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His
 165 170 175

Thr Val Ile

<210> 71
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> WHC149-SEQ6

<400> 71

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr
85 90 95

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe
100 105 110

Pro Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Ile
115 120 125

[0038]

Ile Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser
130 135 140

Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln
145 150 155 160

Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr
165 170 175

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val
180 185 190

Ile

<210> 72

<211> 208

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WHC149-SEQ7

<400> 72

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
 50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 85 90 95

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
 115 120 125

Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Ile Ile
 130 135 140

Val Asn Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu
 145 150 155 160

[0039] Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu
 165 170 175

Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg
 180 185 190

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile
 195 200 205

<210> 73
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> WHC149-SEQ10

<400> 73

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Thr Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu

50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Cys Lys Thr Cys Glu Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Ile Ile Val Asn
 100 105 110

Tyr Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe
 115 120 125

His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu
 130 135 140

Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro
 145 150 155 160

Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile
 165 170

<210> 74
 <211> 557
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0040]

<220>
 <223> CRM197-SEQ1

<400> 74

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

[0041]

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr

385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
530 535 540

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr
545 550 555

<210> 75
<211> 557
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRM197-SEQ2

<400> 75

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

[0042]

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp

[0043]

	340		345		350
	Ile Gly Phe 355	Ala Ala Tyr	Asn Phe 360	Val Glu Ser	Ile Ile Asn Leu Phe 365
	Gln Val Val 370	His Asn Ser	Tyr Asn 375	Arg Pro Ala	Tyr Ser Pro Gly His 380
	Lys Thr Gln 385	Pro Phe Leu	His Asp 390	Gly Tyr Ala	Val Ser Trp Asn Thr 400
	Val Glu Asp	Ser Ile Ile	Arg Thr	Gly Phe Gln	Gly Glu Ser Gly His 415
	Asp Ile Lys	Ile Thr Ala	Glu Asn	Thr Pro Leu	Pro Ile Ala Gly Val 430
	Leu Leu Pro 435	Thr Ile Pro	Gly Lys 440	Leu Asp Val	Asn Lys Ser Lys Thr 445
	His Ile Ser 450	Val Asn Gly	Arg Lys 455	Ile Arg Met	Arg Cys Arg Ala Ile 460
[0044]	Asp Gly Asp 465	Val Thr Phe	Cys Arg 470	Pro Lys Ser	Pro Val Tyr Val Gly 480
	Asn Gly Val	His Ala Asn	Leu His	Val Ala Phe	His Arg Ser Ser Ser 495
	Glu Lys Ile	His Ser Asn	Glu Ile	Ser Ser Asp	Ser Ile Gly Val Leu 510
	Gly Tyr Gln 515	Lys Thr Val	Asp His	Thr Lys Val	Asn Ser Lys Leu Ser 525
	Leu Phe Phe 530	Glu Ile Lys	Ser Gly	Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly 540
	Ser Gly Gly 545	Gly Gly Ser	Gly Pro	Cys Arg Thr	Cys Thr
	<210>	76			
	<211>	565			
	<212>	PRT			
	<213>	人工序列			
	<220>				
	<223>	CRM197-SEQ3			
	<400>	76			
	Gly Ala Asp 1	Asp Val Val	Asp Ser	Ser Ser Lys	Ser Phe Val Met Glu Asn 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

[0045]

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu

290	295	300
Ser Ile Leu Pro Gly	Ile Gly Ser Val Met	Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305	310	315 320
Val His His Asn Thr	Glu Glu Ile Val Ala	Gln Ser Ile Ala Leu Ser
	325	330 335
Ser Leu Met Val Ala	Gln Ala Ile Pro Leu	Val Gly Glu Leu Val Asp
	340	345 350
Ile Gly Phe Ala Ala	Tyr Asn Phe Val Glu	Ser Ile Ile Asn Leu Phe
	355	360 365
Gln Val Val His Asn	Ser Tyr Asn Arg Pro	Ala Tyr Ser Pro Gly His
	370	375 380
Lys Thr Gln Pro Phe	Leu His Asp Gly Tyr	Ala Val Ser Trp Asn Thr
385	390	395 400
Val Glu Asp Ser Ile	Ile Arg Thr Gly Phe	Gln Gly Glu Ser Gly His
	405	410 415
Asp Ile Lys Ile Thr	Ala Glu Asn Thr Pro	Leu Pro Ile Ala Gly Val
	420	425 430
[0046] Leu Leu Pro Thr Ile	Pro Gly Lys Leu Asp	Val Asn Lys Ser Lys Thr
	435	440 445
His Ile Ser Val Asn	Gly Arg Lys Ile Arg	Met Arg Cys Arg Ala Ile
	450	455 460
Asp Gly Asp Val Thr	Phe Cys Arg Pro Lys	Ser Pro Val Tyr Val Gly
465	470	475 480
Asn Gly Val His Ala	Asn Leu His Val Ala	Phe His Arg Ser Ser Ser
	485	490 495
Glu Lys Ile His Ser	Asn Glu Ile Ser Ser	Asp Ser Ile Gly Val Leu
	500	505 510
Gly Tyr Gln Lys Thr	Val Asp His Thr Lys	Val Asn Ser Lys Leu Ser
	515	520 525
Leu Phe Phe Glu Ile	Lys Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly Gly
	530	535 540
Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Ser Thr Thr Thr	Ser Thr Gly Pro Cys Lys
545	550	555 560
Thr Cys Thr Thr Pro		
	565	

<210> 77
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> CRM197-SEQ4

 <400> 77

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

 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

 [0047]
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu

225		230		235		240
Glu Lys Ala Lys	Gln Tyr Leu Glu Glu	Phe His Gln Thr Ala	Leu Glu			
	245	250	255			
His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys	Thr Val Thr Gly Thr	Asn Pro Val				
	260	265	270			
Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val						
	275	280	285			
Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu						
	290	295	300			
Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala						
	305	310	315			320
Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser						
		325	330			335
Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp						
		340	345			350
Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe						
		355	360			365
[0048] Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His						
		370	375			380
Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr						
		385	390			395
Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His						
		405	410			415
Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val						
		420	425			430
Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr						
		435	440			445
His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile						
		450	455			460
Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly						
		465	470			475
Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser						
		485	490			495
Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu						
		500	505			510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
530 535 540

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys
545 550 555 560

Thr

<210> 78
<211> 559
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRM197-SEQ5

<400> 78

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

[0049]

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp

				165					170					175		
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg	
			180					185					190			
Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val	
		195					200					205				
Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly	
	210					215					220					
Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	
225					230					235					240	
Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu	
				245					250					255		
His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val	
			260					265					270			
Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val	
		275					280					285				
Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu	
	290					295					300					
[0050]	Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala
	305					310					315					320
Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	
				325					330					335		
Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp	
			340					345					350			
Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe	
		355					360					365				
Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His	
	370					375					380					
Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Ser	Trp	Asn	Thr	
385					390					395					400	
Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Ile	Arg	Thr	Gly	Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	His	
				405					410					415		
Asp	Ile	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Asn	Thr	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Val	
			420					425					430			
Leu	Leu	Pro	Thr	Ile	Pro	Gly	Lys	Leu	Asp	Val	Asn	Lys	Ser	Lys	Thr	
		435					440					445				

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 530 535 540

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln
 545 550 555

<210> 79
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0051] <220>
 <223> CRM197-SEQ6

<400> 79

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly

115					120					125						
Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	
	130					135					140					
Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	
145					150					155					160	
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp	
				165					170					175		
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg	
			180					185					190			
Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val	
		195					200					205				
Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly	
	210					215					220					
Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	
225					230					235					240	
Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu	
				245					250					255		
[0052]	His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val
				260					265					270		
Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val	
		275					280					285				
Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu	
	290					295					300					
Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala	
305					310					315					320	
Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	
				325					330					335		
Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp	
			340					345					350			
Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe	
		355					360					365				
Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His	
	370					375					380					
Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Ser	Trp	Asn	Thr	
385					390					395					400	

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

[0053] Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 530 535 540

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys
 545 550 555 560

Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro
 565 570

<210> 80
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CRM197-SEQ7

<400> 80

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly

	50					55										60
	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val
	65					70					75					80
	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Val
					85					90					95	
	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu
				100					105						110	
	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe	Gly
			115					120						125		
	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser
		130					135					140				
	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser
	145					150					155					160
	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp
					165					170					175	
	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg
				180					185					190		
[0054]	Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val
			195					200					205			
	Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly
		210					215						220			
	Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu
		225				230					235					240
	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu
					245					250					255	
	His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val
				260					265					270		
	Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val
			275					280					285			
	Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu
		290					295					300				
	Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala
		305				310					315					320
	Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser
					325					330					335	

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

[0055] Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 530 535 540

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro
 545 550 555 560

Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser
 565 570 575

Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
 580 585

<210> 81
 <211> 554
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CRM197-SEQ10

<400> 81

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

[0056]

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

[0057] Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
530 535 540

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Lys Thr Cys
545 550

<210> 82
<211> 411
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRM389-SEQ1

<400> 82

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

[0058]

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 [0059] 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr
 405 410

<210> 83
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CRM389-SEQ2

<400> 83

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln

	20		25			30												
Lys Gly Ile	Gln Lys Pro Lys	Ser Gly Thr Gln Gly	Asn Tyr Asp Asp	35	40	45												
Asp Trp Lys	Glu Phe Tyr Ser Thr	Asp Asn Lys Tyr Asp	Ala Ala Gly	50	55	60												
Tyr Ser Val	Asp Asn Glu Asn Pro	Leu Ser Gly Lys Ala	Gly Gly Val	65	70	75												
Val Lys Val	Thr Tyr Pro Gly Leu	Thr Lys Val Leu Ala	Leu Lys Val	85	90	95												
Asp Asn Ala	Glu Thr Ile Lys Lys	Glu Leu Gly Leu Ser	Leu Thr Glu	100	105	110												
Pro Leu Met	Glu Gln Val Gly Thr	Glu Glu Phe Ile Lys	Arg Phe Gly	115	120	125												
Asp Gly Ala	Ser Arg Val Val Leu	Ser Leu Pro Phe Ala	Glu Gly Ser	130	135	140												
Ser Ser Val	Glu Tyr Ile Asn Asn	Trp Glu Gln Ala Lys	Ala Leu Ser	145	150	155												
[0060] Val Glu Leu	Glu Ile Asn Phe Glu	Thr Arg Gly Lys Arg	Gly Gln Asp	165	170	175												
Ala Met Tyr	Glu Tyr Met Ala Gln	Ala Cys Ala Gly Asn	Arg Val Arg	180	185	190												
Arg Ser Val	Gly Ser Ser Leu Ser	Cys Ile Asn Leu Asp	Trp Asp Val	195	200	205												
Ile Arg Asp	Lys Thr Lys Thr Lys	Ile Glu Ser Leu Lys	Glu His Gly	210	215	220												
Pro Ile Lys	Asn Lys Met Ser Glu	Ser Pro Asn Lys Thr	Val Ser Glu	225	230	235												
Glu Lys Ala	Lys Gln Tyr Leu Glu	Glu Phe His Gln Thr	Ala Leu Glu	245	250	255												
His Pro Glu	Leu Ser Glu Leu Lys	Thr Val Thr Gly Thr	Asn Pro Val	260	265	270												
Phe Ala Gly	Ala Asn Tyr Ala Ala	Trp Ala Val Asn Val	Ala Gln Val	275	280	285												
Ile Asp Ser	Glu Thr Ala Asp Asn	Leu Glu Lys Thr Thr	Ala Ala Leu	290	295	300												

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr
405 410

<210> 84

<211> 419

<212> PRT

<213> 人工序列

[0061]

<220>

<223> CRM389-SEQ3

<400> 84

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly

115					120					125					
Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser
	130					135					140				
Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser
145					150					155					160
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp
				165					170					175	
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg
			180					185					190		
Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val
		195					200					205			
Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly
	210					215					220				
Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu
225					230					235					240
Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu
				245					250					255	
His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val
			260					265					270		
Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val
		275					280					285			
Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu
	290					295					300				
Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala
305					310					315					320
Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser
				325					330					335	
Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp
			340					345					350		
Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe
		355					360					365			
Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His
	370					375					380				
Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
385					390					395					400

[0062]

Gly Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys
405 410 415

Thr Thr Pro

<210> 85
<211> 415
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRM389-SEQ4

<400> 85

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

[0063]

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val

	195		200		205															
	Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly				
	210						215					220								
	Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu				
	225					230					235					240				
	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu				
					245					250					255					
	His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val				
				260					265					270						
	Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val				
			275					280					285							
	Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu				
	290						295					300								
	Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala				
	305					310					315				320					
	Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser				
					325					330					335					
[0064]	Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp				
				340					345					350						
	Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe				
			355					360					365							
	Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His				
	370						375					380								
	Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
	385					390					395				400					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr					
					405					410					415					
	<210>	86																		
	<211>	413																		
	<212>	PRT																		
	<213>	人工序列																		
	<220>																			
	<223>	CRM389-SEQ5																		
	<400>	86																		
	Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu	Asn				
	1				5					10					15					

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

[0065]

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu

290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Ser Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln
 405 410
 <210> 87
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CRM389-SEQ6
 <400> 87
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

[0066]

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

[0067]

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385	390	395	400
Gly Gly Gly Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys	405	410	415
Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro	420	425	
<210>	88		
<211>	442		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CRM389-SEQ7		
<400>	88		
Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn	5	10	15
Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln	20	25	30
Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp	35	40	45
[0068] Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly	50	55	60
Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val	65	70	75
Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val	85	90	95
Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu	100	105	110
Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly	115	120	125
Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser	130	135	140
Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser	145	150	155
Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp	165	170	175
Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg	180	185	190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys
 405 410 415
 Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys
 420 425 430
 Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
 435 440

[0069]

<210> 89
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CRM389-SEQ10
 <400> 89
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 [0070] Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 [0071]
 Gly Gly Gly Ser Cys Lys Thr Cys
 405

<210> 90
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CRMA-SEQ1

<400> 90

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Cys
195 200 205

Lys Thr Cys Thr
210

[0072]

<210> 91
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRMA-SEQ2

<400> 91

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Cys
 195 200 205
 Arg Thr Cys Thr
 210
 [0073] <210> 92
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CRMA-SEQ3
 <400> 92
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu

	100		105		110										
Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe	Gly
		115					120					125			
Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser
	130					135					140				
Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser
145					150					155				160	
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp
				165					170					175	
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Gly	Gly
			180					185					190		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr
		195					200					205			
Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro				
	210					215					220				
<210>	93														
<211>	216														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	CRMA-SEQ4														
<400>	93														
Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu	Asn
1				5					10					15	
Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln
			20					25					30		
Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp	Asp
		35					40					45			
Asp	Trp	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gly
	50					55					60				
Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val
65				70						75					80
Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Val
				85					90					95	
Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu
			100					105						110	

[0074]

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Ser
 195 200 205

Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr
 210 215

<210> 94
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0075]

<220>
 <223> CRMA-SEQ5

<400> 94

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Lys Thr
195 200 205

Cys Thr Thr Pro Ala Gln
210

<210> 95
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRMA-SEQ6

<400> 95

[0076]

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Thr
195 200 205

Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
210 215 220

Ser Met Phe Pro
225

<210> 96
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CRMA-SEQ7

<400> 96

[0077]

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser

130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Ser
 195 200 205
 Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln
 210 215 220
 Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly
 225 230 235 240
 Asn Cys Thr

 [0078] <210> 97
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> CRMA-SEQ10

 <400> 97
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

[0079] Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Lys Thr
 195 200 205

Cys

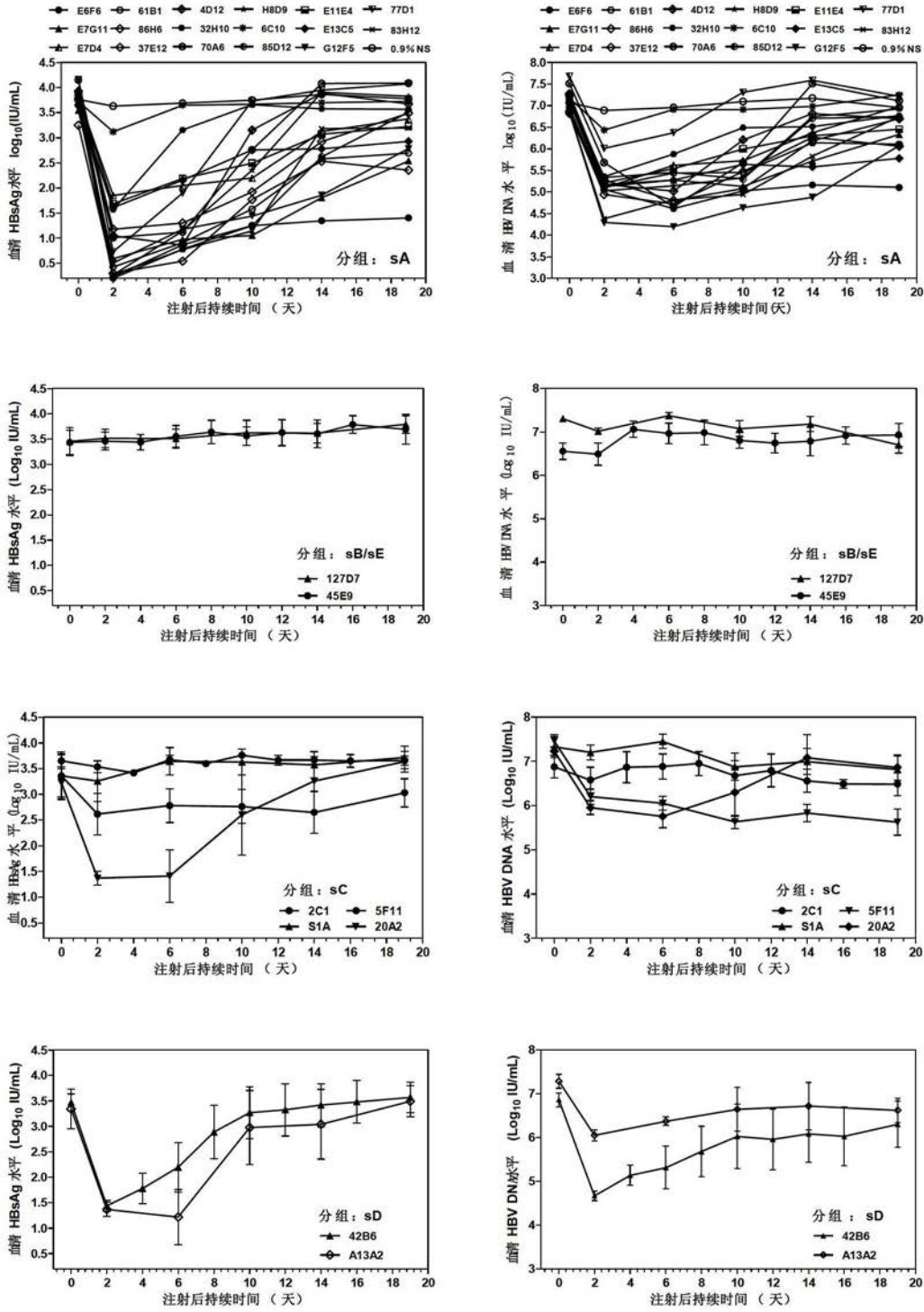


图1

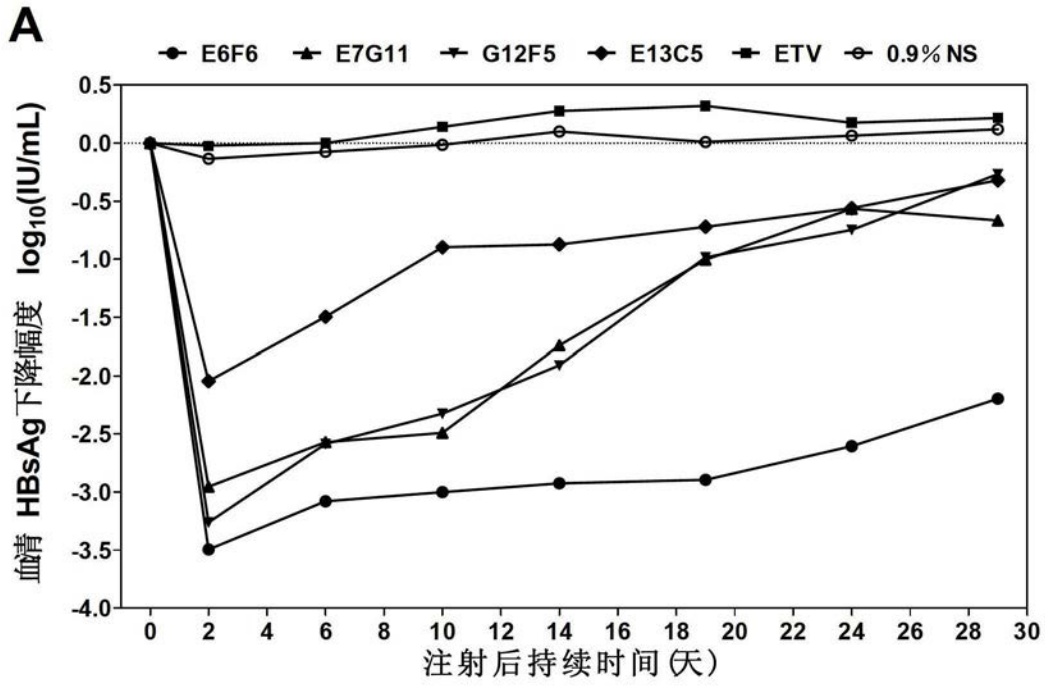


图2A

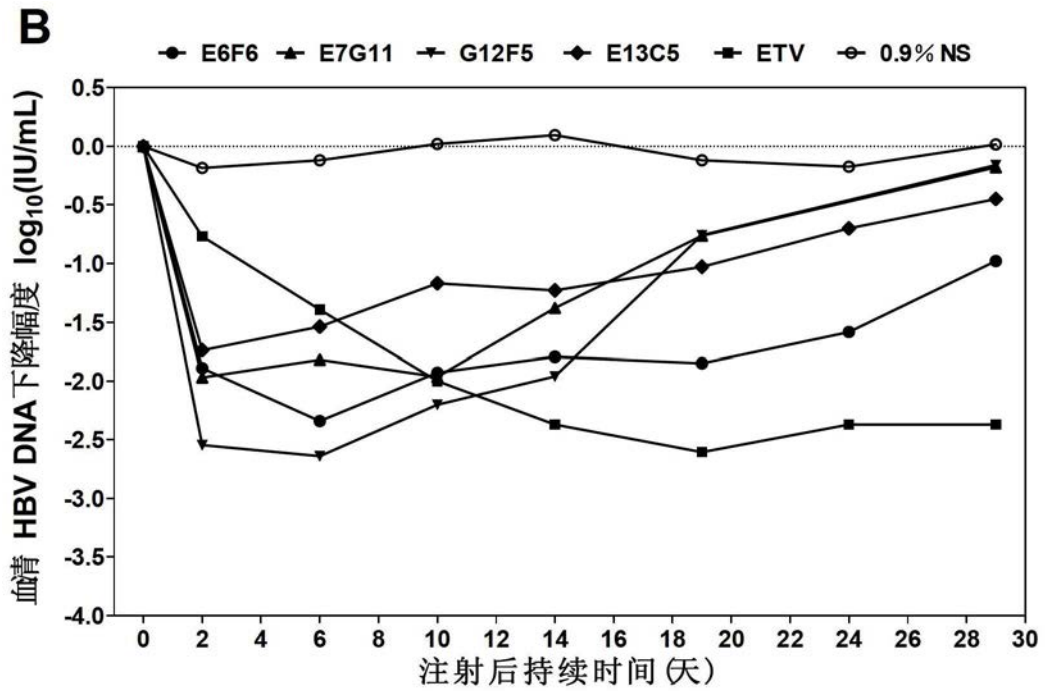


图2B

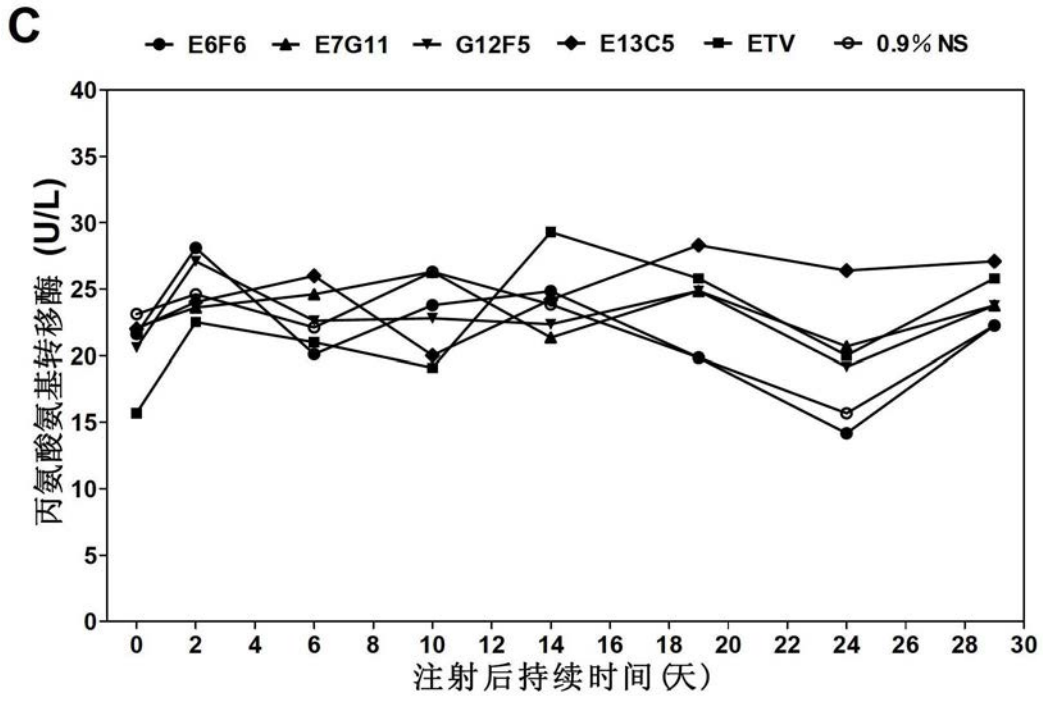


图2C

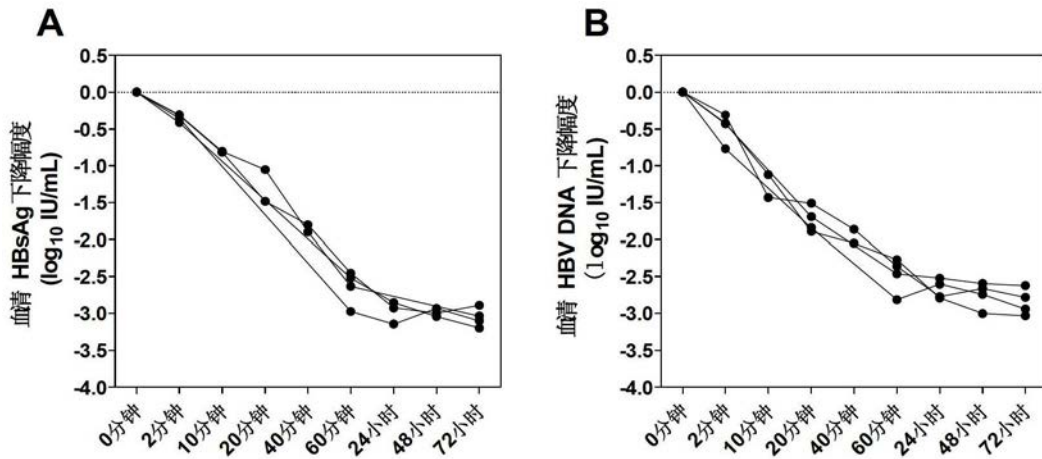


图3

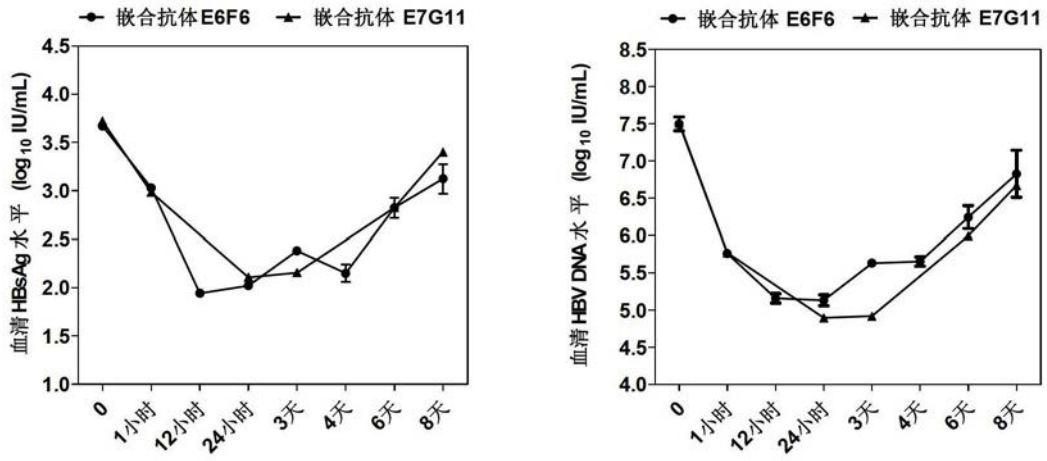


图4

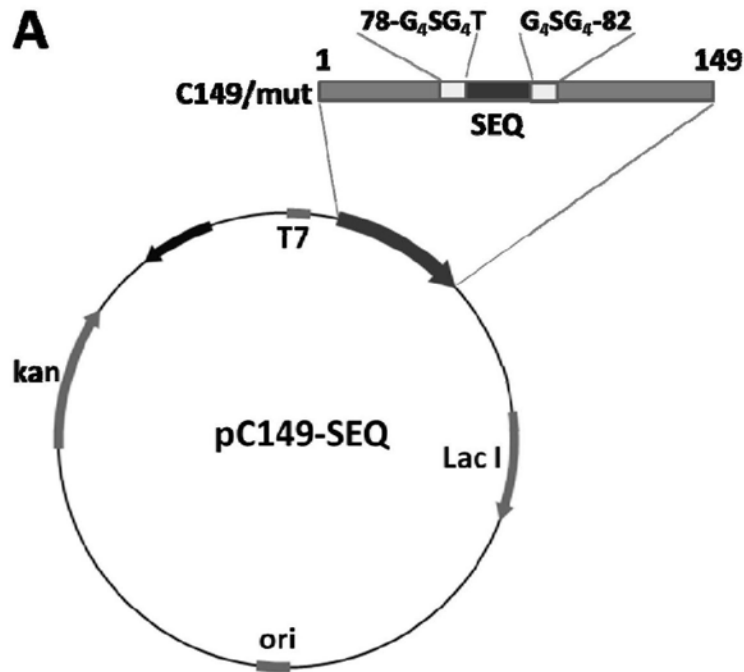


图5A

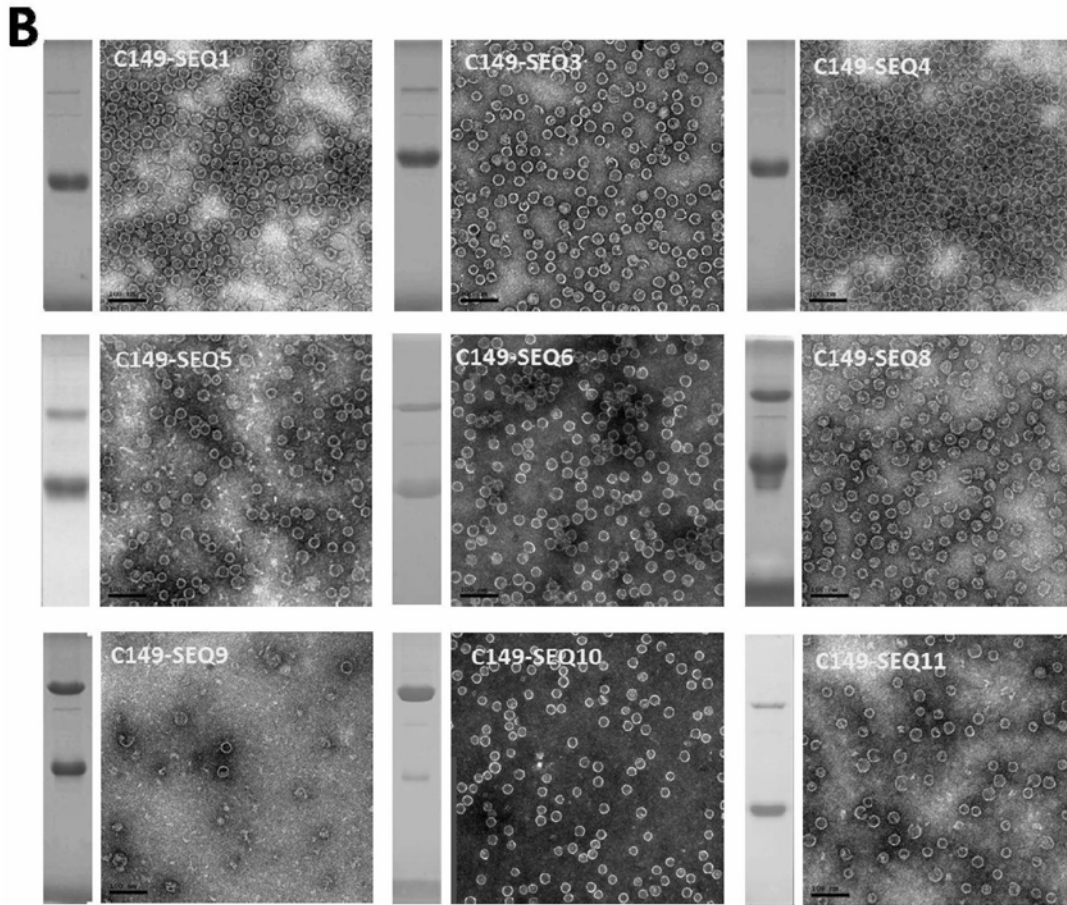


图5B

SA组抗体表位分析

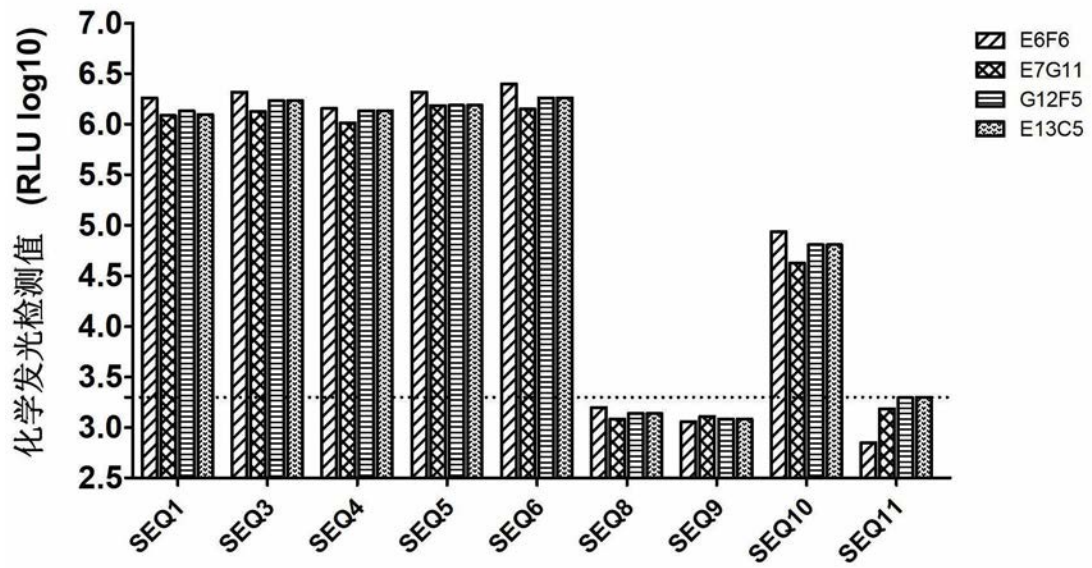


图6

E6F6/E7G11对表位氨基酸突变敏感性分析

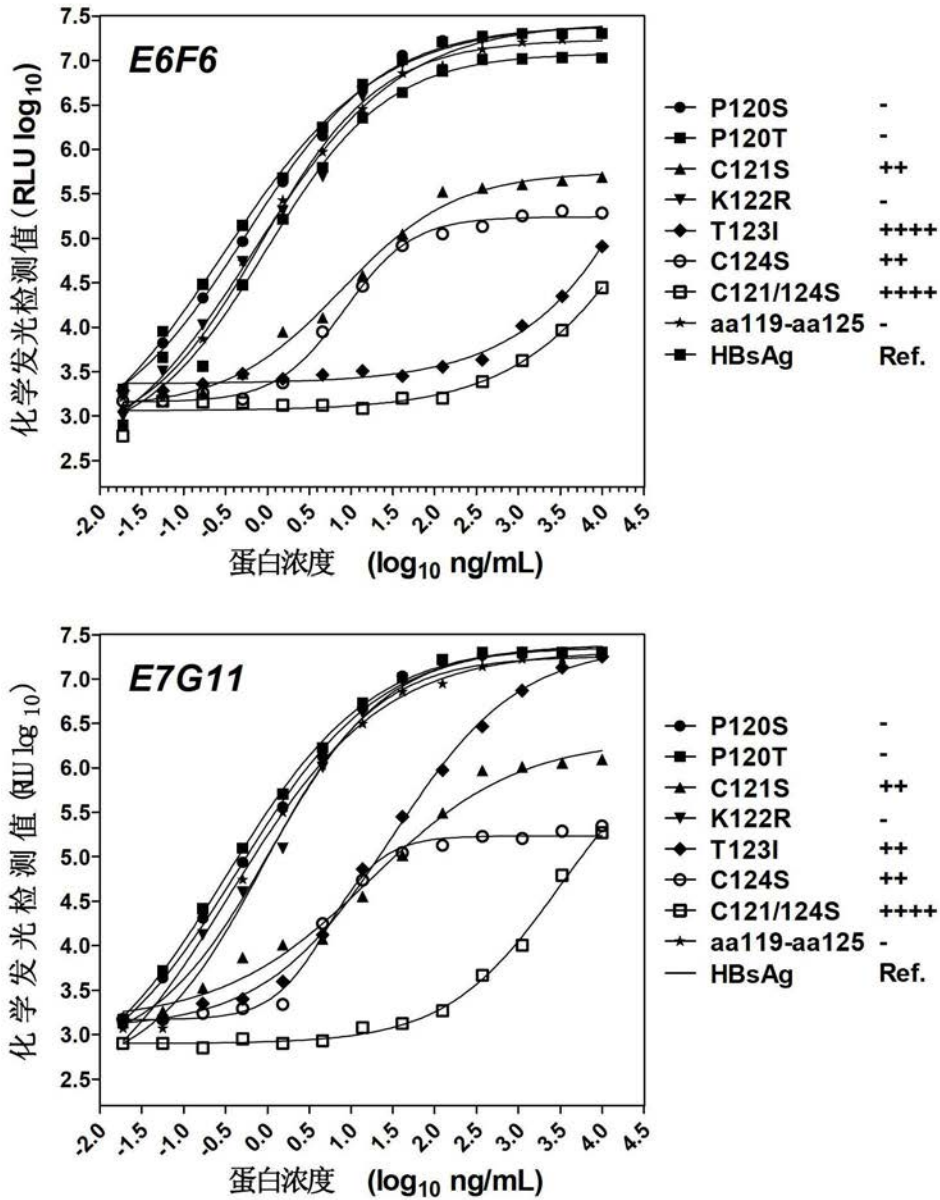


图7

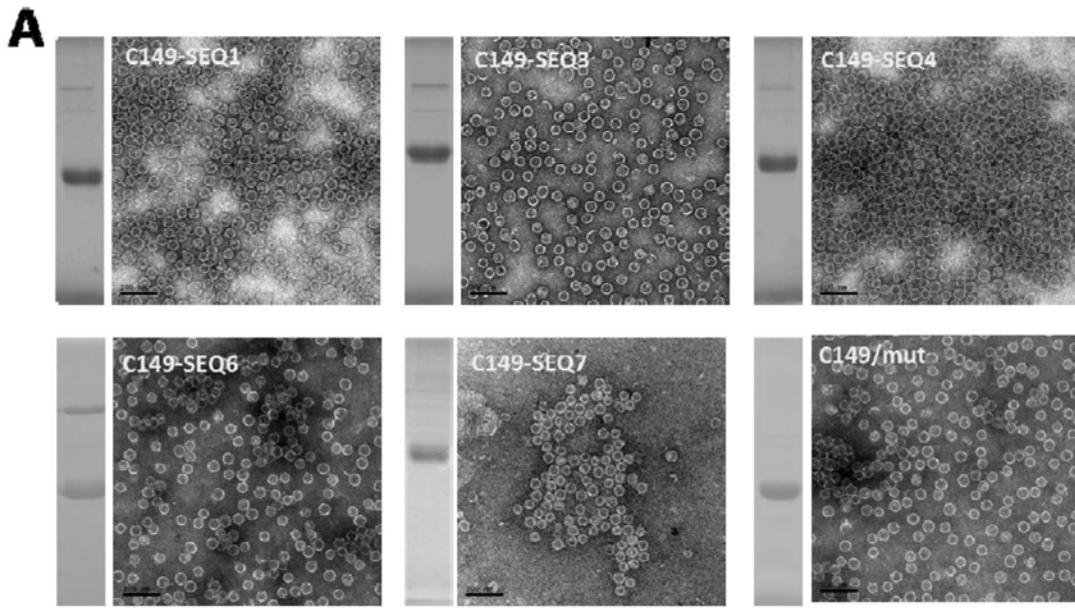


图8A

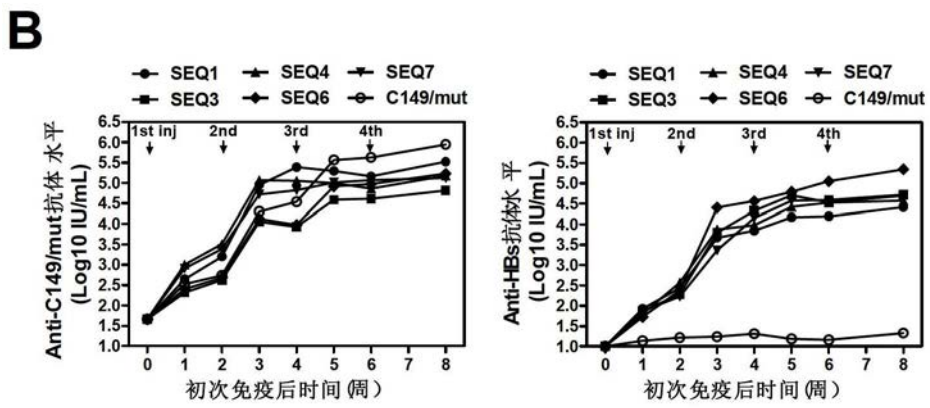


图8B

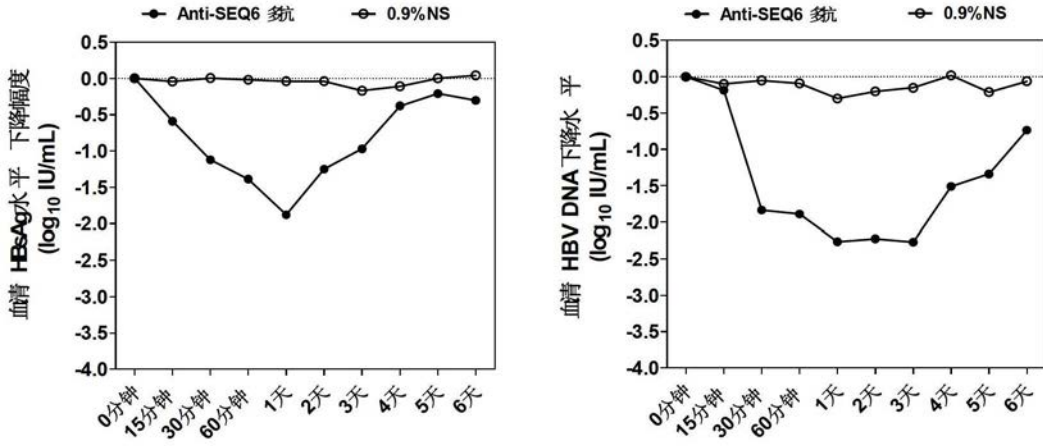


图9

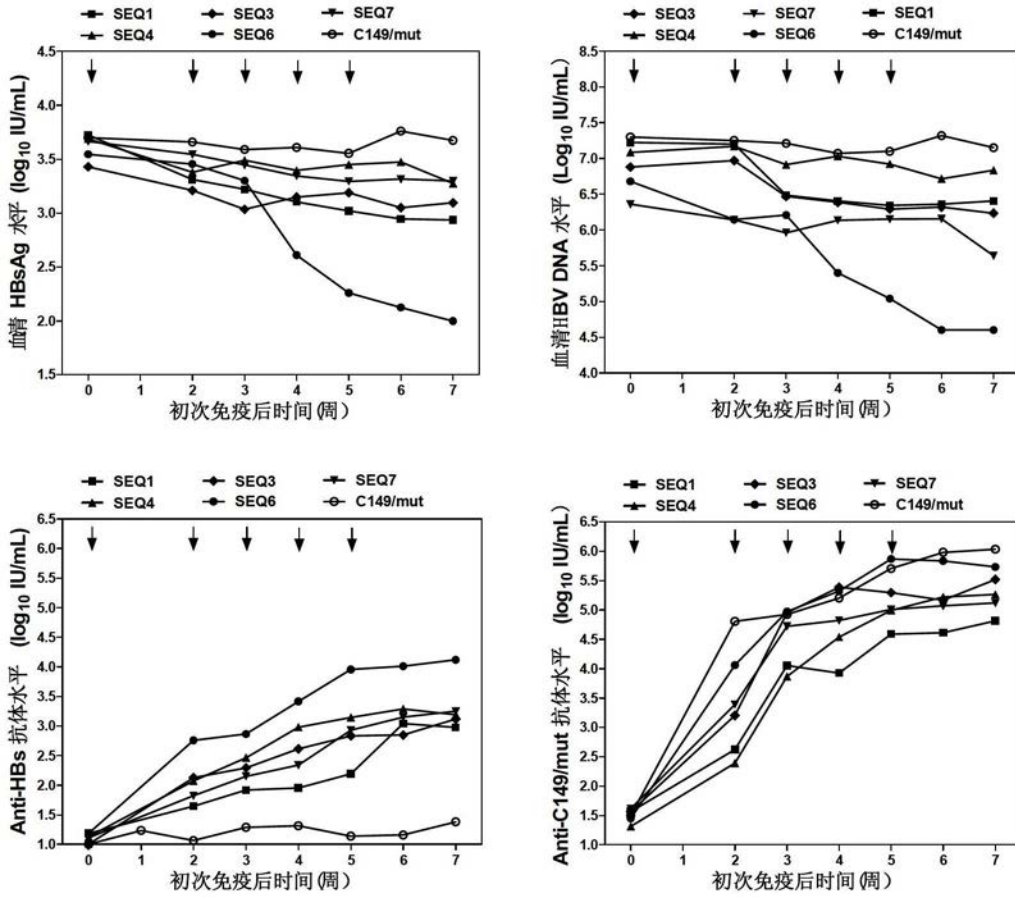


图10

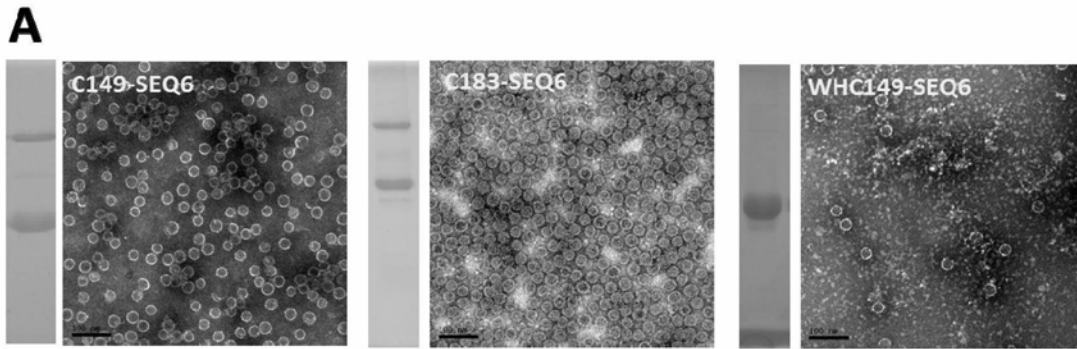


图11A

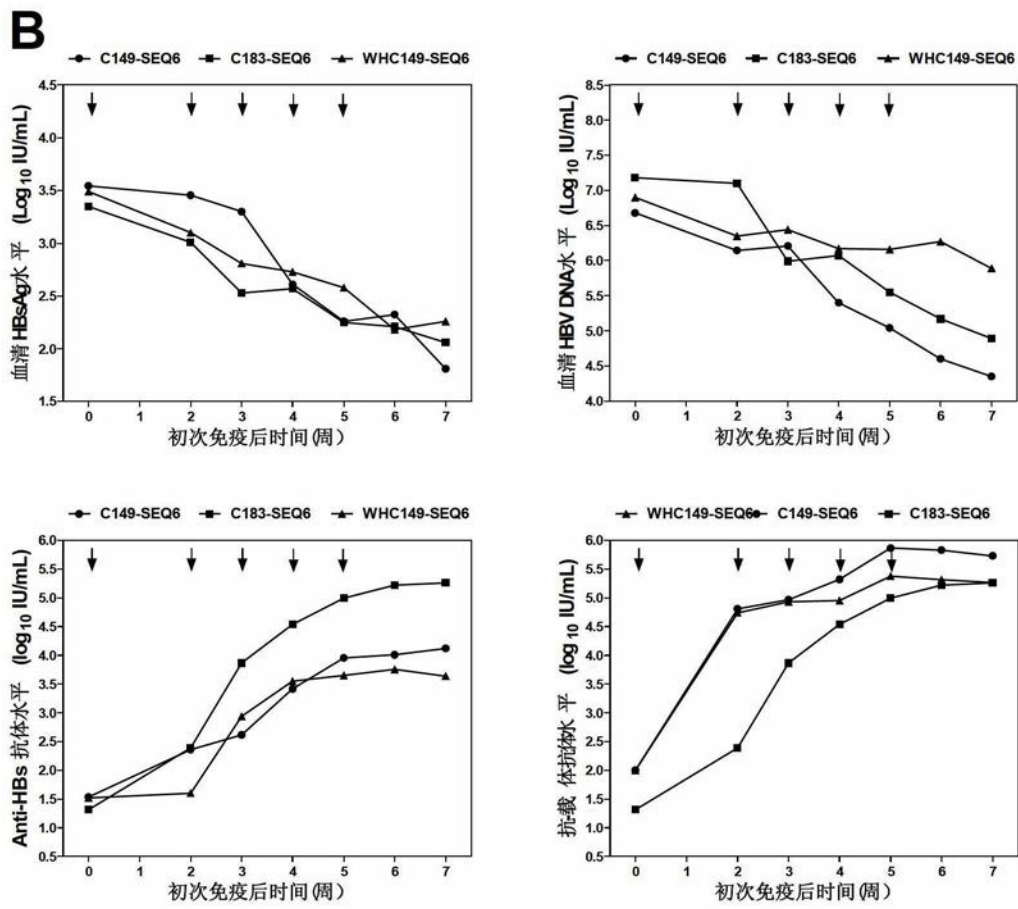


图11B

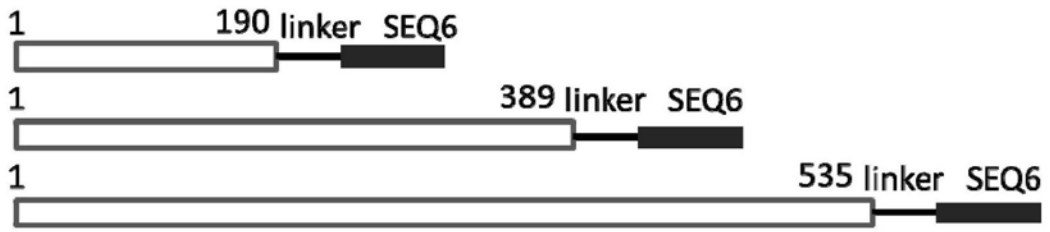


图12