



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102439146 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 02

(21) 申请号 201080022547. 1

捷克生理学研究所

(22) 申请日 2010. 03. 23

(72) 发明人 P. 塞博 A. 奥西科瓦 J. 马辛

(30) 优先权数据

09155929. 4 2009. 03. 23 EP

12/409, 324 2009. 03. 23 US

C. 法约尔 J. 克鲁塞克 M. 巴斯勒

C. 莱克勒克 R. 奥西卡

(85) PCT申请进入国家阶段日

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

2011. 11. 23

11105

代理人 刘蕾 沙捷

(86) PCT申请的申请数据

(51) Int. Cl.

PCT/EP2010/053795 2010. 03. 23

C12N 9/88 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02010/136231 EN 2010. 12. 02

(83) 生物保藏信息

CNCM I-4137 2009. 03. 18

CNCM I-4136 2009. 03. 18

(71) 申请人 巴斯德研究院

地址 法国巴黎

申请人 捷克微生物研究所

权利要求书 2 页 说明书 31 页

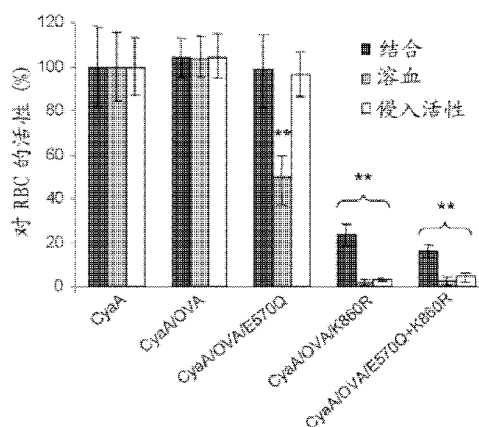
序列表 66 页 附图 22 页

(54) 发明名称

适合将免疫原性分子递送到细胞中的突变
CyaA 多肽及多肽衍生物

(57) 摘要

本发明涉及突变 CyaA/E570Q+K860 多肽, 其适合用作蛋白质载体将一种或更多种受关注的分子递送到细胞, 特别是表达 CD11b 受体的细胞中。本发明还涉及适合引发宿主中的免疫应答的多肽衍生物。本发明更具体而言涉及得自毒素或类毒素形式下的腺苷酸环化酶蛋白质 (CyaA) 的多肽, 其为突变多肽。所述突变多肽能够保留天然 CyaA 与靶细胞的结合活性, 且优选还能够保留天然 CyaA 经过其 N- 端结构域进入靶细胞中的易位活性, 并且此外其具有成孔活性, 该成孔活性与天然 CyaA 毒素的成孔活性相比是降低的或受抑制的。



1. 一种多肽, 其为腺苷酸环化酶蛋白质的突变体(突变多肽), 并且其氨基酸序列包含下述序列之一或由下述序列之一组成:

a) 百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌或欣氏博德特氏菌的腺苷酸环化酶(CyaA) 的氨基酸序列, 其中已经进行下述突变:

(i) 570 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基(E570Q) 或被保守氨基酸残基置换, 和

(ii) 860 位的赖氨酸残基被精氨酸残基(K860R) 或被保守氨基酸残基置换, 或;

b) 百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌或欣氏博德特氏菌的腺苷酸环化酶片段的氨基酸序列, 该片段具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力, 其中所述片段还含有位于所述腺苷酸环化酶的 570 位和 860 位的下述突变氨基酸残基:E570Q 和 K860R, 或

c) 氨基酸序列, 由于一个或更多个氨基酸残基置换和 / 或插入, 其不同于如在 a) 或 b) 中定义的氨基酸序列, 并且其具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力, 其中所述氨基酸序列还含有位于所述腺苷酸环化酶的 570 位和 860 位的下述突变氨基酸残基:E570Q 和 K860R, 或

d) 支气管败血性博德特氏菌的腺苷酸环化酶(CyaA) 的氨基酸序列, 其中已经进行下述突变:

(i) 569 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基(E569Q) 或被保守氨基酸残基置换, 和

(ii) 859 位的赖氨酸残基被精氨酸残基(K859R) 或被保守氨基酸残基置换, 或;

e) 支气管败血性博德特氏菌的腺苷酸环化酶片段的氨基酸序列, 该片段具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力, 其中所述片段还含有位于所述腺苷酸环化酶的 569 位和 859 位的下述突变氨基酸残基:E569Q 和 K859R, 或

f) 氨基酸序列, 由于一个或更多个氨基酸残基置换和 / 或插入, 其不同于如在 d) 或 e) 中定义的氨基酸序列, 并且其具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力, 其中所述氨基酸序列还含有位于所述腺苷酸环化酶的 569 位和 859 位的下述突变氨基酸残基:E569Q 和 K859R。

2. 根据权利要求 1 所述的多肽, 其中所述百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶的腺苷酸环化酶氨基酸序列如 SEQ ID N° 1 所公开。

3. 根据权利要求 2 所述的多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列由于 1 至 200 个氨基酸置换、缺失和 / 或插入而不同于 SEQ ID N° 1 的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的多肽, 其能够与细胞结合并使其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域易位到所述细胞中, 其中所述细胞表达 CD11b/CD18 受体并且其中与所述细胞的结合通过与所述 CD11b/CD18 受体的结合而发生。

5. 根据权利要求 1、2、3 或 4 所述的多肽, 其是腺苷酸环化酶类毒素的突变体, 其在细胞中的腺苷酸环化酶活性与百日咳博德特氏菌 CyaA 毒素的腺苷酸环化酶活性相比被部分或完全抑制。

6. 根据权利要求 5 所述的多肽,其中所述腺苷酸环化酶活性的部分或完全抑制是通过具体是在 SEQ ID N° 1 的百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶的 188 和 189 位的氨基酸残基之间插入二肽而达到的。

7. 一种多肽衍生物,其包含根据权利要求 1 至 6 任一项所述的多肽或由根据权利要求 1 至 6 任一项所述的多肽组成,并且其还与一种或更多种受关注的分子结合。

8. 根据权利要求 7 所述的多肽衍生物,其中所述一种或更多种受关注的分子中的每一种由适合引发免疫应答的氨基酸序列组成。

9. 根据权利要求 8 所述的多肽衍生物,其中所述适合引发免疫应答的分子中的每一种的氨基酸序列由 5 至 300、特别是 300 至 600 或者 400 至 500 个氨基酸残基组成。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的多肽衍生物,其中所述适合引发免疫应答的分子中的每一种的氨基酸序列包含下述的氨基酸序列或由下述的氨基酸序列组成:脊髓灰质炎病毒抗原、HIV 病毒抗原、流感病毒抗原、脉络丛脑膜炎病毒序列、肿瘤抗原,或者包含任意这些含至少一种表位的抗原的氨基酸序列的一部分或由任意这些含至少一种表位的抗原的氨基酸序列的一部分组成。

11. 根据权利要求 8 至 10 所述的多肽衍生物,其是重组多肽,其中所述适合引发免疫应答的分子中的每一种的氨基酸序列被插入到所述突变多肽的腺苷酸环化酶氨基酸序列的许可位点中,从而保留了所述突变多肽将其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域易位到靶细胞中的能力。

12. 根据权利要求 8 或 9 所述的多肽衍生物,其中每一种所述适合引发免疫应答的氨基酸序列被接枝特别是化学接枝到所述突变多肽的氨基酸残基上。

13. 在治疗中应用的根据权利要求 1 至 6 所述的多肽或根据权利要求 7 至 12 中任一项所述的多肽衍生物。

14. 在治疗中应用以在需要其的宿主中引发 T- 细胞免疫应答和 / 或 B- 细胞免疫应答的根据权利要求 1 至 6 所述的多肽或根据权利要求 7 至 12 中任一项所述的多肽衍生物。

15. 用于预防或治疗选自瘤形成、癌症和传染病的疾病的根据权利要求 7 至 14 中任一项所述的多肽衍生物,其中所述传染病选自病毒诱发疾病、逆转录病毒诱发疾病、细菌诱发疾病、寄生虫诱发疾病或真菌诱发疾病。

16. 根据权利要求 13、14 或 15 所述的多肽或多衍生物,其中所述多肽与佐剂联合和 / 或与另一种治疗活性分子联合施用。

17. 根据权利要求 13 或 14 所述的多肽或多衍生物,其中所述多肽不与佐剂联合施用。

18. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的多肽或根据权利要求 7 至 17 中任一项所述的多肽衍生物、药学上可接受的载体以及任选的佐剂和 / 或治疗活性分子。

19. 根据权利要求 7 至 12 中任一项所述的多肽衍生物在制备用于治疗选自瘤形成、癌症和传染病的疾病的治疗组合物中的应用,所述传染病选自病毒诱发疾病或逆转录病毒诱发疾病。

20. 一种用于制备适合将分子递送到细胞中的蛋白质载体的方法,所述方法包括使所述分子与根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的多肽相结合。

适合将免疫原性分子递送到细胞中的突变 CyaA 多肽及多肽衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及适合用于将一种或更多种分子递送到细胞中的多肽。

[0002] 具体而言,本发明涉及适合用于将一种或更多种能够引发免疫应答的分子,特别是通过表达 CD11b/CD18 受体的靶向细胞(在本文也称为“CD11b 表达细胞”)递送到宿主中的多肽。

[0003] 本发明更具体而言涉及得自腺苷酸环化酶蛋白质(CyaA)的多肽,腺苷酸环化酶蛋白质以毒素或解毒蛋白质或类毒素形式使用,所述多肽为突变多肽。所述突变多肽能够保留天然 CyaA 与靶细胞的结合活性,且优选还能够保留天然 CyaA 经过其 N-端结构域进入靶细胞中的易位活性,并且此外其具有成孔活性,该成孔活性与天然 CyaA 毒素的成孔活性相比是降低的或抑制的。

[0004] 本发明特别涉及所述多肽作为蛋白质载体的应用。因此,所述突变多肽进一步与非-CyaA 分子结合,从而产生多肽衍生物,其中所述分子当施用给宿主时具有预防性疫苗和/或治疗益处。

[0005] 本发明的多肽适合用作蛋白质载体,用于将分子,尤其是具有含一个或更多个表位特别是抗原的氨基酸序列的多肽分子递送到细胞中,特别是 CD11b 表达细胞中。

[0006] 本发明因此还涉及多肽衍生物(本发明的突变多肽的衍生物),其包含本发明的突变多肽或由本发明的突变多肽组成,其中所述突变多肽与一个或更多个分子,尤其是一个或更多个适合引发免疫应答的分子重组,从而构成重组多肽或融合多肽。本发明还涉及通过使所述分子与突变多肽化学接枝而获得的多肽衍生物。

[0007] 根据一个实施方式,本发明的多肽衍生物适合用在预防疗法中,并且特别适合疫苗接种以及包括免疫疗法的治疗中,特别是用于在受试对象中引发免疫应答。

[0008] 在本发明的上下文中使用的用于设计本发明多肽的天然 CyaA 是主要在博德特氏菌属(*Bordetella*)生物中,特别是在百日咳博德特氏菌(*Bordetella Pertussis*)中产生的腺苷酸环化酶,其具有下述特征和性质,其公开的目的是在本发明的上下文中表征所述蛋白质。

[0009] 双功能 RTX 腺苷酸环化酶毒素-溶血素(于此也称为腺苷酸环化酶毒素(CyaA、ACT 或 AC-Hly)是百日咳博德特氏菌的关键致病因子,其是百日咳(1)的病原体。其 1706 个残基长度的多肽是 N-端腺苷酸环化酶(AC)酶结构域或部分(~400 个残基)与构成 C-端部分或结构域(2)的~1306 个残基的成孔 RTX 溶血素(在 Toxin 溶细胞素中重复)的融合体。后者通过共价翻译后棕榈酰化 Lys⁸⁶⁰ 和 Lys⁹⁸³ 的 ϵ -氨基而包含将 proCyaA 活化为 CyaA 的位点,以及包含形成~40 个钙结合部位的众多 RTX 重复,其装载(loading)是 CyaA(3,4)的细胞毒素活性所需的。CyaA 蛋白质实际上作为无活性原毒素而被合成,其通过翻译后棕榈酰化两个内部赖氨酸残基(赖氨酸 860 和 983)而被转化为活性毒素。这种翻译后修饰要求与 cyaA 基因表达附加基因,即位于百日咳博德特氏菌染色体上的 cyaA 附近的 cyaC。

[0010] 毒素主要靶向表达 $\alpha_M\beta_2$ 整联蛋白受体的宿主骨髓吞噬细胞, $\alpha_M\beta_2$ 整联蛋白受体也称为 CD11b/CD18、CR3 或 Mac-1 (5)。所述毒素具体是通过存在于其 C-端部分的受体结合部位而与表达 CD11b/CD18 受体的细胞的 CD11b/CD18 受体结合。这些细胞因此是天然毒素的靶细胞, 且还是本发明多肽的靶细胞。CyaA 插入细胞的细胞质膜中并将 AC 酶结构域易位到所述靶细胞的胞质溶胶中 (6, 7)。在细胞内, AC 被钙调节蛋白激活并催化不受控制的细胞 ATP 向 cAMP 的转化, cAMP 是激发削弱吞噬细胞杀菌功能的关键第二信使分子 (1)。在高剂量下 ($> 100\text{ng/ml}$), CyaA-催化的 ATP 消耗成 cAMP 变成细胞毒性的, 并且促进凋亡甚或迅速的坏死性死亡以及 CD11b⁺ 单核细胞的溶解 (8, 9)。

[0011] 最近, 发明人显示, CyaA 结合其 CD11b/CD18 受体的 N 联寡糖 (10)。这表明与普遍存在的细胞表面蛋白的葡聚糖或糖脂的低特异性相互作用可解释虽然降低了大约 2 个数量级, 但是能够容易检测到 CyaA 也穿透缺乏 CD11b/CD18 的细胞。的确, 由于 AC 结构域具有极其高的特异性催化活性, 发现 CyaA 也显著升高哺乳动物和鸟类红细胞、淋巴细胞、淋巴瘤、成神经细胞瘤 CHO 或气管上皮细胞中的 cAMP (1, 11)。

[0012] 最近现有技术中已经提出提供也称为类毒素的解毒毒素, 其中腺苷酸环化酶的活性减小, 特别是基本被抑制。此类 CyaA/AC⁻ 类毒素可用于实现本发明多肽的制备。

[0013] 除提高 cAMP 之外, 所述毒素还在哺乳动物和鸟类红细胞上显示出中等溶血活性。这是由于形成估计直径为 0.6 至 0.8nm 的小阳离子选择性孔的能力, 这些孔使细胞膜透化并最终引发胶体-渗透细胞溶解 (12)。最近, 发明人及其他人已经表明, CyaA 的成孔活性与其细胞入侵 AC 酶活性协同作用并有助于 CD11b⁺ 细胞上的 CyaA 总溶细胞效力 (13, 14)。由于完整的成孔 (溶血) 能力, 在诸如血清的渗透保护剂不存在时, 无酶促活性的 CyaA/AC⁻ 类毒素 (15) 在红细胞上仍显示完整的溶血活性, 并且在 CD11b⁻ 表达单核细胞上显示残留的降低约 10 倍的溶细胞活性 (8), 这对其在治疗中的应用设定了限制。

[0014] 早期, 发现 CyaA 的溶血 (成孔) 和 AC 膜易位 (细胞入侵) 活性由于低钙浓度、低温 (16) 以及由于 CyaA 酰化的程度和性质 (4, 12, 17) 而易分离。此外, 两种活性在对疏水结构域内的位置 509、516、570 和 581 处的谷氨酸的电荷逆转或中性置换的灵敏度上有很大差异 (8, 13, 18)。CyaA 的细胞入侵和成孔活性因此被认为是相互独立的而且在靶细胞膜中平行操作。图 5A 图解的模型表明, 两种不同的 CyaA 构象体平行插入靶细胞膜中, 一个是易位前体, 负责将 AC 结构域经过具有伴随钙离子流入的细胞膜递送到细胞中, 另一个是最终形成低聚物孔的孔前体 (13, 18, 19)。

[0015] 发明人现在已经测试了这种模型并对其进行修整, 显示成孔活性不参与 AC 结构域经过靶细胞的易位。

[0016] 在本发明中, 发明人最初设计了 CyaA 突变多肽, 特别是基于百日咳博德特氏菌的腺苷酸环化酶, 其处于毒素或类毒素形式, 具有在成孔 (E570Q) 和具酰化 (K860R) 结构域内的置换组合, 并且发明人表明, 这些特异性置换组合选择性破坏 CyaA 的细胞透化活性, 因此消除了残留的 CyaA/AC⁻ 类毒素对 CD11b⁺ 细胞的溶细胞活性。同时, E570Q+K860R 构建物保留了将 AC 结构域易位到细胞胞质溶胶中以提高细胞 cAMP 的完整能力, 并且其类毒素完全能够将所述构建物内插入的含表位分子递送至树突状细胞的胞浆途径, 用于体内特异性细胞毒性 T 细胞应答的 MHC 类别 I- 限制呈递和诱导。

[0017] 由发明人设计的 CyaA/2330VA/E570Q+K860R 突变体 (如在实施例中所述, OVA 抗

原肽被插入其中),是例证 CyaA 突变体能力的第一构建物,即提供显著降低的透化细胞的能力,同时保留了越过细胞膜易位 AC 结构域的完整能力。

[0018] 发明人现在已经设计出具体的构建物,其特别以 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素为例,并且已经显示尽管其细胞透化(溶细胞)活性降低很多,但是其保留了将抗原递送到 CD11b⁺APCs 中的完整活性。发明人还表明,说明性 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素的总溶细胞活性非常低。因此,其在动物或人类宿主中没有残留毒性,并且因此非常适合用于治疗。

发明内容

[0019] 本发明因此提供新型多肽,其为类毒素且具有增强的安全特性(profile),可用作蛋白质载体,用于将目标分子,特别是免疫原性肽序列递送到需要治疗的患者的细胞,更具体而言,表达 CD11b 的细胞中。

[0020] 基于由发明人实施的实验,因此能够定义并提供一种多肽,其为腺苷酸环化酶蛋白质的突变体(突变多肽),并且其氨基酸序列包含下述序列之一或由下述序列之一组成:

[0021] a) 百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌(*Bordetella parapertussis*)或欣氏博德特氏菌(*Bordetella hinzii*)的腺苷酸环化酶(CyaA)的氨基酸序列,其中已经进行下述突变:

[0022] (i) 570 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基(E570Q)或被保守氨基酸残基置换,和

[0023] (ii) 860 位的赖氨酸残基被精氨酸残基(K860R)或被保守氨基酸残基置换,或;

[0024] b) 百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌或欣氏博德特氏菌的腺苷酸环化酶片段的氨基酸序列,该片段具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N-端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N-端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力,其中所述片段还含有位于所述腺苷酸环化酶的 570 位和 860 位的下述突变氨基酸残基:E570Q 和 K860R,或

[0025] c) 氨基酸序列,由于一个或更多个氨基酸残基置换和/或插入,其不同于如在 a) 或 b) 中定义的氨基酸序列,并且其具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N-端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N-端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力,其中所述氨基酸序列还含有位于所述腺苷酸环化酶的 570 位和 860 位的下述突变氨基酸残基:E570Q 和 K860R,或

[0026] d) 支气管败血性博德特氏菌(支气管败血性博德特氏菌)的腺苷酸环化酶(CyaA)的氨基酸序列,其中已经进行下述突变:

[0027] (i) 569 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基(E569Q)或被保守氨基酸残基置换,和

[0028] (ii) 859 位的赖氨酸残基被精氨酸残基(K859R)或被保守氨基酸残基置换,或;

[0029] e) 支气管败血性博德特氏菌的腺苷酸环化酶片段的氨基酸序列,该片段具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N-端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N-端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进入所述细胞中的能力,其中所述片段还含有位于所述腺苷酸环化酶的 569 位和 859 位的下述突变氨基酸残基:E569Q 和 K859R,或

[0030] f) 氨基酸序列,由于一个或更多个氨基酸残基置换和/或插入,其不同于如在 d) 或 e) 中定义的氨基酸序列,并且其具有百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质结合靶细胞的能力以及使其 N-端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N-端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位进

入所述细胞中的能力,其中所述氨基酸序列还含有位于所述腺苷酸环化酶的 569 位和 859 位的下述突变氨基酸残基:E569Q 和 K859R。

[0031] 为了本发明的目的,所描述的片段的 N- 端结构域是下述片段的氨基酸序列,所述片段包括天然 CyaA 蛋白质 N- 端部分的连续氨基酸残基,例如,所述片段的 N- 端部分是形成百日咳博德特氏菌 CyaA 蛋白质的 N- 端结构域的 400 个氨基酸残基序列的连续残基的全部或一部分。

[0032] 本文中,“E570Q”包括百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌或欣氏博德特氏菌的天然 CyaA 的 570 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基或被另一保守残基的置换,具体而言是这样的残基,其侧链尺寸和亲水性接近谷氨酸的侧链尺寸和亲水性。570 位的谷氨酸残基优选被选自 Gln、Asn、Met、Thr、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Leu、Cys、Ile、Asp 的氨基酸残基置换。

[0033] 本文中,“K860R”包括百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌或欣氏博德特氏菌的天然 CyaA 的 860 位的赖氨酸残基被精氨酸残基或被另一保守残基的置换,具体而言是这样的残基,其侧链尺寸和亲水性接近赖氨酸的侧链尺寸和亲水性。860 位的赖氨酸残基优选被选自 Arg、Asn、Gln、Met、Thr、Ser、Gly、Val、Leu、Cys、Ile 的氨基酸残基置换。

[0034] 本文中,“E569Q”包括支气管败血性博德特氏菌的天然 CyaA 的 569 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基或被另一保守残基的置换,具体而言是这样的残基,其侧链尺寸和亲水性接近谷氨酸的侧链尺寸和亲水性。569 位的谷氨酸残基优选被选自 Gln、Asn、Met、Thr、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Leu、Cys、Ile、Asp 的氨基酸残基置换。

[0035] 本文中,“K859R”包括支气管败血性博德特氏菌的天然 CyaA 的 859 位的赖氨酸残基被精氨酸残基或被另一保守残基的置换,具体而言是这样的残基,其侧链尺寸和亲水性接近赖氨酸的侧链尺寸和亲水性。859 位的赖氨酸残基优选被选自 Arg、Asn、Gln、Met、Thr、Ser、Gly、Val、Leu、Cys、Ile 的氨基酸残基置换。

[0036] 在下文所述的实施方式中,携带“E570Q”和“K860R”置换的突变百日咳博德特氏菌 CyaA 蛋白质或蛋白质片段可被携带等价“E570Q”和“K860R”置换的突变副百日咳博德特氏菌或欣氏博德特氏菌 CyaA 蛋白质或蛋白质片段取代,或者被携带等价“E569Q”和“K859R”置换的突变支气管败血性博德特氏菌 CyaA 蛋白质或蛋白质片段取代。

[0037] 百日咳博德特氏菌的天然 CyaA 已经被 Glaser, P. et al, 1988, 19-30 Molecular Microbiology 2(1) 以氨基酸序列和核苷酸序列进行了描述。该序列被称为 SEQ ID N° 1, 如图 6 所示。因此,当在本发明中引用百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质的氨基酸残基或序列或核苷酸或核苷酸序列时,其位置相对于在 Glaser 等 1988 的所述出版物中公开的序列来确定。

[0038] 在本发明的实施方式中,百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶的氨基序列是如 SEQ ID N° 1 公开的序列。

[0039] 当在本文提到 SEQ ID N° 1 或 SEQ ID N° 2 时,要特别指出的是,除非技术上不相关,所公开的特征将类似地应用于通过在 SEQ ID N° 1 或 SEQ ID N° 2 中插入残基以使 CyaA 蛋白质解毒而修饰的序列。在这种情况下,氨基酸残基的编号应该进行修改(特别是在天然序列的位置 570 和 860 是受关注的情况下)。

[0040] 有利地, CyaA 蛋白质或其片段是蛋白质或蛋白质片段,其是 cyaA 和 cyaC 基因在

细胞中,特别是重组细胞中共表达的结果。的确已经显示,为对靶细胞具有侵入性质,CyaA 必须经历翻译后修饰,这通过 cyaA 和 cyaC 基因二者的表达来得以实现 (WO 93/21324)。

[0041] 在本发明的具体实施方式中,CyaA 蛋白质是细菌蛋白。在优选的实施方式中,CyaA 蛋白质得自博德特氏菌属种。

[0042] 在受关注的博德特氏菌属种中,根据本发明,其中之一为百日咳博德特氏菌。其他受关注的博德特氏菌属菌株是副百日咳博德特氏菌、欣氏博德特氏菌或支气管败血性博德特氏菌的那些菌株。副百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质的序列已经具体以登记号 NC 002928.3 (为 1740 个氨基酸的序列) 并在 Parkhill J. 等 (Nat. Genet. DOI, 10 (2003)) 中公开,欣氏博德特氏菌在 Donato G. M. 等 (J. Bacteriol. 2005 Nov, 187 (22) :7579-88) 中公开,以及支气管败血性博德特氏菌在 Betsou F. 等 (Gene 1995, August 30 ;162 (1) :165-6) 中公开。副百日咳博德特氏菌的序列已经具体以登记号 CAB76450 公开,本文中称为 SEQ ID N° 7,如在图 14 中所示。欣氏博德特氏菌的序列已经具体以登记号 AAY57201 公开,本文中称为 SEQ ID N° 8,如在图 15 中所示。支气管败血性博德特氏菌的序列已经具体以登记号 CAA85481 公开,本文中称为 SEQ ID N° 9,如在图 16 中所示。因此,当在本发明中引用副百日咳博德特氏菌、欣氏博德特氏菌或支气管败血性博德特氏菌的 CyaA 蛋白质的氨基酸残基或序列时,其位置分别相对于在 SEQ ID N° 7、8 和 9 中所公开的序列来确定。

[0043] 表述“腺苷酸环化酶蛋白质的多肽突变体”不包括由博德特氏菌属所表达的天然腺苷酸环化酶。如上所述,其特征在于与天然蛋白质的主要不同在于两个特定氨基酸残基的结合置换。其可以相对于所述天然蛋白质进行进一步修饰,并且其特别可以是如此突变的蛋白质的片段,例如,诸如所述突变蛋白质的截短变体,其中在任一或两个末端的残基被缺失。具体而言,在 C-末端的残基可以被缺失直至缺失程度使之不会影响 CD11b/CD18 细胞受体的识别和结合部位。可选地或另外地,可以在 N-末端缺失残基,条件是其不会影响所得突变多肽的易位能力。其也可以是内部缺失天然突变 CyaA 蛋白质的一个或更多个残基而获得的片段。

[0044] 在本发明涉及为本文所述片段的多肽突变体的情况下,必然包含突变残基 E570Q 和 K860R (当提到百日咳博德特氏菌的 CyaA 蛋白质的氨基序列时) 的所述片段还保留突变的全长 CyaA 与细胞结合以及使其 N-端结构域易位到靶细胞,特别是 CD11b/CD18 表达细胞的胞质溶胶中的能力。

[0045] 本发明因此提供突变多肽,其适合用于设计将一种或更多种分子递送到细胞,特别是表达 CD11b/CD18 受体的靶细胞中的工具。

[0046] 具体而言,本发明提供 CyaA 蛋白质的突变多肽,其中所述蛋白质得自 CyaA 毒素或者优选得自其类毒素,特别是 CyaA/AC⁻ 类毒素。所述突变多肽能够结合细胞,特别是结合靶细胞,尤其是表达 CD11b/CD18 受体的靶细胞,所述突变多肽能够将其 N-端结构域或插入所述结构域中或在其上接枝的分子易位到所述细胞中,并且其成孔活性与 CyaA 毒素或类毒素的成孔活性相比被全部或部分抑制。

[0047] 特别地,可按照 EP 03291486.3 以及 El-Azami-El-Idrissi M. 等, J. Biol. Chem., 278 (40) 38514-21 或 WO 02/22169 中公开的方法,测定突变多肽与靶 CD11b/CD18 细胞的能力。此外,通过应用 WO 02/22169 中所述的方法,可以测定突变多肽将表位或含所述表位的多肽易位到靶细胞的胞质溶胶中的能力。

[0048] CyaA 毒素或类毒素成孔活性或细胞透化能力的全部或部分抑制应当被理解为形成孔具体是估计直径为 0.6 至 0.8nm 的阳离子选择孔使得细胞膜透化并最终引发胶体-渗透细胞溶解的能力被全部或部分抑制。成孔活性可利用如在实施例中所描述的单一全细胞膜片钳实验来测量。

[0049] CyaA 毒素的成孔活性有助于细胞上的总溶细胞或溶血活性。实际上,在本发明的上下文中,CyaA 的总溶细胞或溶血活性(或其“总细胞毒活性”)应当至少被理解为腺苷酸环化酶和 CyaA 毒素成孔活性的结果。因此,CyaA 毒素的成孔活性的全部或部分抑制允许至少部分抑制其细胞溶活性。

[0050] 在优选的实施方式中,与百日咳博德特氏菌 CyaA 毒素的总溶细胞活性相比,本发明的多肽特别是对表达 CD11b/CD18 受体的细胞的总溶细胞活性全部或部分降低。如在实施例中所描述,通过测量用测试多肽温育时细胞所释放的血红蛋白(对于红细胞而言)或乳酸脱氢酶(对于单核细胞而言)的量,可以测定本发明多肽的溶细胞活性。

[0051] 在优选的实施方式中,与百日咳博德特氏菌 CyaA 毒素,或者与腺苷酸环化酶活性被部分或全部抑制的百日咳博德特氏菌 CyaA 蛋白质(或“CyaA 类毒素”)的总溶细胞活性相比,本发明的多肽对表达 CD11b/CD18 受体的细胞的总溶细胞活性要低至少 75%,优选低至少 80%、85%、90%或 95%。在特别优选的实施方式中,本发明的多肽对表达 CD11b/CD18 受体的细胞的总溶细胞活性,相比氨基酸序列示于图 2 中的百日咳博德特氏菌 CyaA 类毒素(SEQ ID N° 2),要低至少 75%,优选低 80%或 85%。

[0052] 在优选的实施方式中,本发明涉及一种多肽,其为腺苷酸环化酶的突变体,并且其氨基酸序列包含下述氨基酸序列或由其组成:(i) 所述氨基酸序列相对于 SEQ ID N° 1 中公开的氨基酸序列进行突变,所述突变至少包含置换 E570Q 和 K860R,或(ii) 其为具有如 SEQ ID N° 1 公开的所述氨基酸序列的 CyaA 蛋白质的片段,其片段化程度直至所述片段具有包括置换 E570Q 和 K860R 的氨基酸序列,并且其中所述多肽能够与靶细胞结合而且能够将其 N-端结构域易位到所述细胞中。

[0053] 在本发明的特定实施方式中,所述片段包括 SEQ ID N° 1 的 570 位的谷氨酸残基被谷氨酰胺残基的置换(称为“E570Q”)以及 SEQ ID N° 1 的 860 位的赖氨酸残基被精氨酸残基的置换(称为“K860R”),该片段至少包括下述 CyaA 蛋白质的氨基酸序列,其始于第一 N-端残基或者从包含在 1 位与 400 位之间,优选为 1 位与 380 位之间的氨基酸残基之一延伸至形成 CD11b/CD18 细胞受体的识别和结合部位的残基,并且所述片段含有对应于突变 E570Q 和 K860R 残基的残基或者由所述氨基酸序列组成。在一个具体实施方式中,包括 E570Q 和 K860R 置换的片段不包含从 SEQ ID N° 1 的 1 位氨基酸延伸至 SEQ ID N° 1 的 372 位氨基酸的氨基酸序列。

[0054] 在优选的实施方式中,如此制备的片段基本失去了腺苷酸环化酶酶活性(AC 活性)。

[0055] 在优选的实施方式中,通过编码具有 E570Q 和 R860R 突变的 CyaA 氨基酸序列的突变基因和 cyaC 基因在重组细胞中共表达,之后回收突变体 CyaA 的选择表达片段,产生本发明的突变多肽。

[0056] 优选地,本发明的突变多肽具有赖氨酸残基,其对应于如 SEQ ID N° 1 所述的 CyaA 氨基酸序列的 983 位的赖氨酸残基,并且其被酰化,具体而言,其被棕榈酰化

(palmytoylated) 或棕榈油酰化 (palmitoleilated)。

[0057] 可选地, 本发明的突变多肽具有赖氨酸残基, 其对应于如 SEQ ID N° 1 所述的 CyaA 氨基酸序列的 983 位的赖氨酸残基, 其未被酰化。

[0058] 在一个具体实施方式中, 本发明的突变多肽具有衍生自 SEQ ID N° 1 中公开的 CyaA 氨基酸序列并由于残基突变而产生 E570Q 和 K860R 的氨基酸序列, 并且具有下述氨基酸序列, 该氨基酸序列与 SEQ ID N° 1 所述的序列共享至少 50%, 优选至少 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 的同一性。

[0059] 在另一个具体实施方式中, 本发明的突变多肽具有的氨基酸序列不同于如在 SEQ ID N° 1 中所述的 CyaA 氨基酸序列, 不同之处在于残基突变产生 E570Q 和 K860R, 以及由于进一步的突变产生 1 至 500, 具体地 1 至 400、1 至 300、1 至 200、1 至 100、1 至 50、1 至 40、1 至 30、1 至 25、1 至 20、1 至 15、1 至 10 或 1 至 5 个氨基酸残基置换、缺失和 / 或插入, 其中包括 E570Q 和 K860R 置换。

[0060] 在一个具体实施方式中, 本发明的突变多肽与百日咳博德特氏菌 CyaA 氨基酸序列相比, 不携带任何除 E570Q 和 K860R 置换外的任何氨基酸残基置换、缺失和 / 或插入。在一个具体实施方式中, 突变多肽具有 SEQ ID N° 2 的氨基酸序列, 如在图 7 中所示。在另一个具体实施方式中, 与 SEQ ID N° 2 的氨基酸序列相比, 仅有的进一步氨基酸置换、缺失和 / 或插入由全部或部分抑制 CyaA 蛋白质的腺苷酸环化酶酶促活性的氨基酸置换、缺失和 / 或插入组成, 具体而言, 诸如, 二肽的插入, 例如, 在 188 位和 189 位的氨基酸之间的“LQ”或“GS”二肽。

[0061] 在一个具体实施方式中, 除 E570Q 和 K860R 置换外, 本发明的突变多肽由于 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基置换、缺失和 / 或插入而不同于如 SEQ ID N° 1 中所述的 CyaA 氨基酸序列。

[0062] 在一个具体实施方式中, 除 E570Q 和 K860R 置换外, 百日咳博德特氏菌的天然 CyaA 蛋白质的 247 位的亮氨酸残基被谷氨酰胺残基 (L247Q) 或被另一氨基酸残基特别是保守氨基酸残基置换。

[0063] 作为如本文公开的 SEQ ID N° 1 所公开的氨基酸序列的片段的本发明突变多肽应当被理解为下述序列, 该序列包含一个或更多个片段, 所述片段至少具有 SEQ ID N° 1 氨基酸序列的约 350 个氨基酸残基及多达约 1705 个氨基酸残基, 具体而言, 该序列包含的片段含 SEQ ID N° 1 的至少 400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600 个氨基酸残基的连续部分, 包括残基 E570Q 和 K860R 在内。本发明的突变多肽还可被定义为在 SEQ ID N° 2 中公开的氨基酸序列的片段, 其包含一个或更多个片段, 所述片段至少具有 SEQ ID N° 2 氨基酸序列的约 350 个氨基酸残基及多达约 1705 个氨基酸残基, 具体而言, 其包含的片段含 SEQ ID N° 2 的至少 400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600 个氨基酸残基的连续部分, 包括残基 570 和 860 在内。所述片段优选保留与 CD11b/CD18 细胞受体结合的能力以及将其 N- 端结构域易位到靶细胞中的能力。优选地, 本发明的突变多肽是这样的片段, 该片段具有一段氨基酸残基, 其包含 SEQ ID N° 1 的氨基酸残基 570 (为 E570Q) 至 860 (为 K860R) 或者氨基酸残基 1 至 860 或 2 至 860, 直至相对于原始 SEQ ID N° 1 观察到 E570Q 和 K860R。

[0064] 在优选的实施方式中, 所述片段还包含如 CyaA 蛋白质的 SEQ ID N° 1 所述的 CyaA

氨基酸序列的氨基酸残基 1166 至 1281 或氨基酸残基 1208 至 1243, 用于与 CD11b/CD18 靶细胞相互作用。

[0065] 具体的片段因此包括全部或部分的天然蛋白质 C- 端部分, 该部分负责使本发明的多肽与靶细胞膜和 / 或 CD11b/CD18 受体结合, 以及负责随后将该多肽的 N- 端结构域递送到细胞胞质溶胶中。本发明的具体多肽是 CyaA 蛋白质的片段, 其含有 CyaA 蛋白质特别是 SEQ ID N° 1 的氨基酸残基 373 至 1706, 直至残基 570 和 860 被突变为 E570Q 和 K860R。

[0066] 在另一个优选的实施方式中, 作为此种片段的突变多肽包含:

[0067] a) 第一氨基酸序列, 其对应于一段来自 SEQ ID N° 1 的至少 100 个连续氨基酸残基, 包括为 E570Q 的氨基酸残基 570, 并且与 SEQ ID N° 1 相比还包括 0、1、2、3、4 或 5 个缺失、置换或插入, 和

[0068] b) 第二氨基酸序列, 其对应于一段来自 SEQ ID N° 1 的至少 100 个连续氨基酸残基, 包括为 K860R 的氨基酸残基 860, 并且与 SEQ ID N° 1 相比还包括 0、1、2、3、4 或 5 个缺失、置换或插入, 和优选地

[0069] c) 第三氨基酸序列, 其包含如 CyaA 蛋白质的 SEQ ID N° 1 所述的 CyaA 氨基酸序列的氨基酸残基 1166 至 1281 或氨基酸残基 1208 至 1243, 用于与 CD11b/CD18 靶细胞相互作用。

[0070] 本发明的另一个具体多肽是下述片段, 其是对应于具有 E570Q 和 K860R 突变的 CyaA 蛋白质的一个片段, 其中氨基酸残基 225 至 234 已经缺失, 因此提供了含突变蛋白质的残基 1 至 224 和 235 至 1706 的片段。

[0071] 在特别优选的实施方式中, 作为与 CD11b/CD18 受体特异性结合的结果, 根据本发明的多肽片段与表达所述受体的细胞结合。

[0072] 在优选的实施方式中, 与百日咳博德特氏菌 CyaA 毒素的腺苷酸环化酶活性相比, 所述多肽在细胞中的腺苷酸环化酶活性被部分或完全抑制。如上所述, 表述“CyaA 蛋白质”涉及蛋白质的毒素形式或优选涉及其类毒素形式。因此, 所涉及的多肽为 CyaA 蛋白质的突变体的本发明的每个实施方式适用蛋白质的每一种毒素或类毒素形式。

[0073] CyaA 腺苷酸环化酶或酶促活性的全部或部分抑制应当被理解为, 与由 cyaA 和 cyaC 基因在细胞中共表达产生的 CyaA 毒素的腺苷酸环化酶或酶促活性相比, 在细胞环境中将 ATP 转化成 cAMP 的能力被全部或部分抑制。如在实施例所述, 通过测量胞内 cAMP 水平, 可以测定将 ATP 转化成 cAMP 的能力。

[0074] 此种全部或部分抑制可以作为遗传失活的结果获得, 例如, 通过在作为部分催化部位的 CyaA 氨基酸序列的部位中, 即位于 SEQ ID N° 1 的前 400 个氨基酸内 (AC 结构域) 的部位中, 引入短氨基酸序列, 其包含例如 1 至 10 个氨基酸, 特别是二肽, 或者通过对如 SEQ ID N° 1 所述的对酶促活性必要的 CyaA 氨基酸序列的一部分进行缺失或置换。在优选的实施方式中, 通过在如 SEQ ID N° 1 所述的 CyaA 序列的 188 位和 189 位氨基酸之间插入二肽, 例如“LQ”或“GS”二肽, 获得对 CyaA 酶促活性的全部或部分抑制。这可以通过在 cyaA 基因编码相的 564 位的 EcoRV 位点插入寡核苷酸诸如“CTG CAG”或“CGATCC”完成。参见 See Ladant 等, 1992。可选地, 酶促活性的全部或部分抑制还可以通过定向突变获得, 例如, 通过用 Gln 残基取代天然 CyaA 百日咳博德特氏菌蛋白质的 58 或 65 位的赖氨酸残基 (Glaser 等, 1989)。

[0075] 根据本发明的多肽还可以定义为下述多肽,其可以通过下述从具有根据 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 的氨基酸序列的 CyaA 多肽获得:

[0076] a) 用谷氨酰胺残基或保守氨基酸残基置换 SEQ ID N° 1、7、8 的 570 位或 SEQ ID N° 9 的 569 位的谷氨酸残基,

[0077] b) 用精氨酸残基或保守氨基酸残基置换 SEQ ID N° 1、7、8 的 860 位或 SEQ ID N° 9 的 859 位的赖氨酸残基,和

[0078] c) 任选地,在除 a) 和 b) 中所述位置外的位置上进行一个或更多个氨基酸残基置换、插入和 / 或缺失,条件是如此获得的多肽具有使百日咳博德特氏菌 CyaA 蛋白质与靶细胞结合并将其 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域或所述 N- 端腺苷酸环化酶酶结构域的部分易位到所述细胞中的能力。

[0079] 优选地,在步骤 a) 中,谷氨酸残基被选自 Gln、Asn、Met、Thr、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Leu、Cys、Ile、Asp 的氨基酸残基置换,最优选被 Gln 置换。优选地,在步骤 b) 中,赖氨酸残基被选自 Arg、Asn、Gln、Met、Thr、Ser、Gly、Val、Leu、Cys、Ile 的氨基酸残基置换,最优选被 Arg 置换。

[0080] 在一个具体实施方式中,在步骤 c) 中不进行另外的氨基酸残基置换、插入和 / 或缺失。

[0081] 具体而言,步骤 c) 可包含截短任一末端或两个末端。具体而言,C- 末端的残基可以被缺失,其程度为直至其不影响 CD11b/CD18 细胞受体的识别和结合部位。可选地或另外,残基可以在 N- 末端被缺失,条件是其不影响所获得的突变多肽的易位能力。还可以进行位于除步骤 a) 和 b) 中所述那些位置外的位置的天然 CyaA 蛋白质的一个或更多个残基的内部缺失。在一个具体实施方式中,步骤 c) 包含在 CyaA 多肽的 N- 端氨基酸序列中的多达 380 或多个 400 个氨基酸的缺失,优选地,包含从 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 的 1 位氨基酸延伸至 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 的 372 位氨基酸的氨基酸段的缺失。

[0082] 优选地,在进行步骤 c) 后,所得到的多肽包括全部或部分的天然蛋白质的 C- 端部分,该部分负责使本发明多肽与靶细胞膜和 / 或 CD11b/CD18 受体结合,以及负责随后将该多肽的 N- 端结构域递送到细胞胞质溶胶中。在一个具体实施方式中,在步骤 c) 中,SEQ ID N° 1、7 或 8 的氨基酸残基 373 至 1706,或 SEQ ID N° 9 的氨基酸残基 373 至 1705 未被缺失。在优选的实施方式中,在步骤 c) 中,SEQ ID N° 1、7 或 8 的氨基酸残基 1208 至 1243,或 SEQ ID N° 9 的氨基酸残基 1207 至 1242 未被缺失。

[0083] 在优选的实施方式中,步骤 c) 包含氨基酸置换、缺失和 / 或插入,其全部或部分抑制 CyaA 蛋白质蛋白质的腺苷酸环化酶酶促活性。此种全部或部分抑制可以如下获得:通过在位于 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 的前 400 个氨基酸 (AC 结构域) 内的部位中引入短氨基酸序列,其包含例如 1 至 10 个氨基酸,特别是二肽;或者通过对如 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 所述的,对酶促活性必要的 CyaA 氨基酸序列的一部分进行缺失或置换。在优选的实施方式中,通过在如 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 所述的 CyaA 序列的 188 位和 189 位氨基酸之间插入二肽,例如“LQ”或“GS”二肽,获得对 CyaA 酶促活性的全部或部分抑制。可选地,酶促活性的全部或部分抑制还可以通过定向突变获得,例如,通过用 Gln 残基取代天然 CyaA 百日咳博德特氏菌蛋白质的 58 或 65 位的赖氨酸残基 (Glaser 等,1989)。

[0084] 优选地,在步骤 c) 中,如 SEQ ID N° 1、7、8 所述的 CyaA 氨基酸序列的 983 位的或

者 SEQ ID N° 9 中的 982 位的赖氨酸残基既未置换也未缺失。在一个实施方式中,该赖氨酸残基被酰化,具体而言,其被棕榈酰化或棕榈油酰化。可选地,该赖氨酸残基未被酰化。

[0085] 优选地,在进行步骤 c) 后,所得到的多肽具有与 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 所述的序列共享至少 50%、优选至少 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

[0086] 仍优选地,在进行步骤 c) 后,所得到的多肽具有与 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 所述的序列不同的氨基酸序列,这是由于源自步骤 a) 和 b) 的氨基酸残基置换,以及由于 1 至 500、具体而言 1 至 400、1 至 300、1 至 200、1 至 100、1 至 50、1 至 40、1 至 30、1 至 25、1 至 20、1 至 15、1 至 10 或 1 至 5 另外的氨基酸残基置换、缺失和 / 或插入。在一个具体实施方式中,在进行步骤 c) 后,所得到的多肽由于除在步骤 a) 和 b) 中进行的置换之外的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基置换、缺失和 / 或插入而不同于如 SEQ ID N° 1、7、8 或 9 所述的 CyaA 氨基酸序列。

[0087] 本发明还涉及多肽衍生物,所述多肽衍生物包含进一步与一个或更多个受关注的分子相结合的本发明的突变多肽或由其组成。在优选的实施方式中,受关注的分子当单独采用时或者当与本发明多肽结合时,是一种生物活性分子。所述分子尤其可以具有预防价值或治疗价值,即,可以具有预防或治疗活性,或者可以增强预防或治疗活性。

[0088] 在具体实施方式中,受关注的分子选自:肽、糖肽、脂肽、多糖、低聚糖、核酸、脂质和化学品。

[0089] 在一个具体实施方式中,所述一个或更多个受关注的分子 (molecules of interest) 是多肽分子或含多肽分子。其氨基酸序列可包含 2 至 1000 个氨基酸残基,优选 5-800、5 至 500、5 至 200、5 至 100、8 至 50、5 至 25、5 至 20 或 8 至 16 或 300-600、400-500 个氨基酸残基。

[0090] 在优选的实施方式中,所述一个或更多个受关注的分子是适合引发免疫应答的异源氨基酸序列 (也称为“异种抗原”),具体而言,是包含表位或由表位组成的氨基酸序列,其中所述表位包括抗原。如本文所用的,术语“异源的”指的是其本身用在载体中的除突变多肽之外的抗原。如本文所用的,术语“表位”指的是异源分子,尤其是当呈递至宿主的免疫系统时,能引发免疫应答的异源肽。具体而言,此类表位可包含或由 8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 个氨基酸残基的段组成。其可以可选地由全长抗原组成或者由抗原片段组成。

[0091] 在一个具体实施方式中,根据本发明的多肽可以由下述质粒编码,该质粒对应于以登记号 CNCM I-4137 (图 12) 保藏的 OVA-QR-AC⁻ 质粒,其中编码“OVA”抗原序列的 DNA 序列被编码包含一个或更多个表位的抗原序列的 DNA 序列取代。

[0092] 特别地,适合引发免疫应答的多肽分子是引发 T- 细胞免疫应答的多肽分子,举例而言包括 CTL 应答。适合引发免疫应答的多肽分子也可以是引发 B- 细胞免疫应答的多肽分子。

[0093] 在具体实施方式中,异种抗原选自细菌性病原体的抗原、肿瘤细胞抗原、病毒抗原、逆转录病毒抗原、真菌抗原或寄生虫细胞抗原。

[0094] 特别地,受关注的分子可以是选自下述的抗原:Chlamidia 抗原、支原体抗原、肝炎病毒抗原、HIV 病毒抗原、流感病毒抗原、脉络丛脑膜炎病毒抗原、肿瘤抗原,或者至少包含表位的任意这些抗原的一部分。

[0095] 在本发明的多肽衍生物的优选实施方式中,适合引发免疫应答的每一个所述分子的氨基酸序列包含下述的氨基酸序列或由下述的氨基酸序列组成:抗原、支原体抗原、肝炎病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、HIV 病毒抗原、流感病毒抗原、脉络丛脑膜炎病毒序列、肿瘤抗原;或者包含包括至少一个表位的任意这些抗原的氨基酸序列的一部分或由其组成。

[0096] 在特别优选的实施方式中,受关注的分子是肿瘤相关抗原(TAA)。肿瘤相关抗原已经为很多肿瘤所表征,诸如例如:黑素瘤,特别是转移性黑素瘤;肺癌;头颈癌;子宫颈癌、食道癌;膀胱癌,特别是浸润膀胱癌;前列腺癌;乳腺癌;结肠直肠癌;肾细胞癌;肉瘤;白细胞;骨髓瘤。对于这些不同的癌症组织学类型,已经发现,抗原肽在肿瘤样品上特异性表达,并被 T 细胞识别,特别是被 CD8⁺T 细胞或 CD4⁺T 细胞。

[0097] Van der Bruggen P. 等 (Immunological Reviews, 2002, vol. 188 :51-64) 对发现可作为这些类型肿瘤中的肿瘤相关抗原的肽进行了综述。特别地,所述综述表 3 中所包含的肽的公开内容在本文中被称为提供了此类肿瘤相关抗原的实例,并且所述表 3 作为参考被引入本申请。

[0098] 根据 Kawakami Y. 等 (Cancer Sci, October 2004, vol. 95, no. 10, p784-791) 的出版物,该出版物也提供了筛选这些抗原或另外一个抗原的方法,下述抗原被引用作为由 T 细胞识别的肿瘤相关抗原的实例:由各种癌症共享的抗原,包括 MAGE (特别是在黑素瘤中)、NY-ESO-1、Her2/neu、WT1、Survivin、hTERT、CEA、AFP、SART3、GnT-V,对一些特定癌症具有特异性的抗原,诸如黑素瘤的 β - 联蛋白、CDK4、MART-2、MUM3、gp100、MART-1,酪氨酸酶;非白血性白血病的 bcr-abl、TEL-AML1;前列腺癌的 PSA、PAP、PSM、PSMA;髓细胞性白血病的蛋白酶 3;乳腺癌、卵巢癌或胰腺癌的 MUC-1;淋巴瘤、ATL 或子宫颈癌的 EBV-EBNA、HTLV-1 tax;肾细胞癌的图标 HLA-A2;非白血性白血病/淋巴瘤的 HA1。也已经描述了动物中的肿瘤相关抗原,诸如影响猫或狗的肿瘤中的环化素 D1 和环化素 D2。

[0099] 由 T 细胞识别的肿瘤相关抗原也已经在 Novellino L. 等 (Immunol Immunother 2004, 54 :187-207) 中公开。

[0100] 更通常地,本发明中受关注的 TAA 是对应于突变抗原,或对应于在肿瘤细胞上过表达的抗原、对应于共享抗原、组织特异性分化抗原或对应于病毒抗原的那些。

[0101] 在本发明的具体实施方式中,肿瘤相关抗原是乳头瘤病毒属 (HPV) 的抗原或者是酪氨酸酶。

[0102] 根据本发明的另一个具体实施方式,包含表位或由表位组成的多肽分子的氨基酸序列已经相对于其天然氨基酸序列进行了修饰,例如,以便减少该序列内带负电氨基酸残基的数目。通过去除这些带负电氨基酸残基中的一些,或者还通过添加一些带正电的氨基酸残基,特别是作为表位的侧翼残基,可以获得此类修饰。因此包含较少带负电残基的多肽可能有利于将本发明的多肽衍生物的催化结构域易位到靶细胞的胞质溶胶中。

[0103] 包含表位或抗原或由其组成的多肽分子的氨基酸序列还可以以下述途径设计,当其被插入本发明的多肽衍生物中时其是展开的,这改进了根据本发明的目标分子内化进入靶细胞中的效率。在作为其氨基酸含量而经历折叠的多肽中,这种展开例如可通过去除或置换半胱氨酸残基以便避免形成二硫键获得,二硫键可参与多肽的折叠。在一些情况中,通过在还原剂的存在下制备多肽能够防止其折叠,还原剂能够避免在体内重折叠。

[0104] 在一个具体实施方式中,氨基酸序列特别是抗原可包含隐蔽表位或由隐蔽表位组

成。

[0105] 发明人实际已经确定,多肽衍生物构建物,作为其在构建物中呈递的结果,能够使所述抗原的隐蔽表位变成免疫原性的,所述多肽衍生物构建物包含:(i)本发明的多肽,其为根据本文所公开的定义的 CyaA 蛋白质的突变体(多肽突变体),和(ii)具有下述氨基酸序列的多肽分子,所述氨基酸序列含一种或数种抗原的一个或几个抗原片段。特别地,在靶细胞中加工所述构建物,其包括如在本发明中定义的突变多肽,包含得自受关注的抗原的多肽分子,特别用于预防或治疗应用,包括免疫治疗接种目的,其中作为突变多肽的 N-端结构域易位的结果,使多肽分子内化。此种加工能够通过靶细胞的 I 类 MHC 分子实施表位呈递,并且所述表位可包含抗原的隐蔽表位,其被允许变成免疫原性的,并且具体而言被允许提高宿主中的 T-细胞应答,特别是 CTL 应答。

[0106] 本发明因此还涉及多肽衍生物,特别是包含一种或几种多肽分子的重组蛋白质,所述多肽分子具有氨基酸序列,该氨基酸序列含一种或数种抗原的一个或多个表位,或含所述抗原,所述多肽分子的所述氨基酸序列被插入相同或不同的部位中,特别是根据本发明的突变多肽的不同许可位点中,所述重组蛋白质保留 CyaA 毒素靶向抗原呈递细胞(APC)的性质,其中所述表位中的至少一个是亚优势隐蔽 T-细胞表位,并且其中所述多肽衍生物,特别是所述重组蛋白质,能够引发针对所述多肽分子的抗原特异性应答。

[0107] 在根据本发明的多肽衍生物的具体实施方式中,一个或更多个氨基酸序列被插入一个或更多个位点中,特别是许可位点中。

[0108] 对于本发明,“许可位点”是 CyaA 蛋白质序列中的位点,多肽可被插入该位点,而不会实质上影响需要的 CyaA 蛋白质功能性质,特别是不会实质上影响细胞的靶向,具体是 CyaA 的抗原呈递细胞(APC)的靶向,包括不会实质上影响与 CD11b/CD18 受体的特异性结合,以及有利地不会实质上影响参与使 CyaA N-端结构域进入靶细胞中的易位过程的蛋白质的结构域。

[0109] 选择许可位点的方法呈现在例如 W093/21324(Ladant 等,1992)以及 Osicka 等,2000(Infection and Immunity,2000,68(1):247-256)中。具体而言,利用双选择的方法(抗生素抗性以及通过 α -互补在比色皿上的比色测试)使得能够在编码毒素的 N-端催化结构域的基因部分容易地鉴定寡核苷酸插入(其保存了阅读框)。可容易地分析这些突变对所述毒素的催化活性的功能结果,包括遗传学方面的(大肠杆菌 *cya*⁻菌株的功能互补)以及生物化学方面的(表征修饰腺苷酸环化酶的稳定性、其酶促活性、其与 *caM* 的相互作用等)。该方法使得能够筛选大量突变,以便鉴定对抗原决定簇的插入潜在有利的部位。

[0110] 允许 CyaA 催化结构域易位并因此允许被插入许可位点中的氨基酸序列易位的百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶的许可位点包括但不限于残基 137-138(Val-Ala)、残基 224-225(Arg-Ala)、残基 228-229(Glu-Ala)、残基 235-236(Arg-Glu)和残基 317-318(Ser-Ala)(Sebo 等,1995)。下述另外的许可位点也包括在本发明的实施方式中:残基 107-108(Gly-His)、残基 132-133(Met-Ala)、残基 232-233(Gly-Leu)和 335-336(Gly-Gln)与 336-337。然而,在本发明中可以使用其他许可位点,其可通过例如应用上面所述的方法鉴定,特别是 CyaA 蛋白质的残基 400 与 1700 之间的位点。

[0111] 对于其他博德特氏菌属种,通过序列比较并测定相应的残基,可定义相应的许可位点。

[0112] 根据另一个实施方式,所述一个或多个氨基酸序列多肽此外或可选地可被插入本发明多肽的一个和/或另一末端(端部),优选插入缺乏百日咳博德特氏菌 CyaA 蛋白质的全部或部分 N-端催化结构域且更优选缺乏残基 1-373 的突变 CyaA 多肽的 N-末端。

[0113] 根据一个具体实施方式,所述适合引发免疫应答的一个或多个氨基酸序列被接枝到所述多肽的氨基酸残基上。

[0114] 根据本发明,氨基酸序列与 CyaA 突变多肽的“结合”(或插入)以提供所谓的多肽衍生物,也称为“重组蛋白质”或“杂合蛋白质”,包括特别是通过可用的 DNA 技术进行的基因插入。可选地,“结合”还包括非基因插入,包括化学插入,例如特别是在氨基酸序列的一个末端进行的共价偶联,或者非共价偶联。当待被插入的氨基酸序列是合成或半合成时,非基因插入是特别受关注的。用于使药物与多肽偶联的方法在本领域是熟知的,并且包括例如通过使用 N-吡啶基磺酰-活化的巯基的二硫键。

[0115] 具体而言,通过化学键或基因插入能够使分子与本发明的多肽接枝,用于体内靶向 CyaA 靶细胞,诸如 APC,例如 CD11b/CD18 正细胞 (positive cells),以及特别是所述细胞的胞质溶胶。的确,当使对应于特定 CD8+T-细胞表位的分子与解毒 CyaA 的催化结构域偶联时,或者通过二硫键或者通过基因插入,已经发现,基因工程分子能够引发体内特异性 CTL 应答,从而显示所述 CD8+T-细胞表位被易位到 CD11b-表达细胞的胞质溶胶中。

[0116] 在本发明优选的实施方式中,突变 CyaA 多肽被用于制造蛋白质载体,或用于制备组合物,所述组合物具体设计为在 CD8+细胞毒 T-细胞应答 (CTL 应答) 遵循受关注的分子修饰的(特别是重组的或缀合的)突变 CyaA 多肽靶向 CD11b 表达细胞时,引发所述应答,之后使受关注的分子易位到所述 CD11b 表达细胞具体而言骨髓树枝状细胞的胞质溶胶。就此而论,受关注的分子优选为表位或抗原或包含表位或抗原。

[0117] 在本发明另一个优选实施方式中,突变 CyaA 多肽被用于制造蛋白质载体,或用于制备组合物,所述组合物具体设计为在 CD4+细胞毒 T-细胞应答 (CTL 应答) 遵循受关注的分子修饰的(特别是重组的或缀合的)腺苷酸环化酶靶向 CD11b 表达细胞具体而言骨髓树枝状细胞时,引发所述应答。就此而论,受关注的分子优选为表位或抗原或包含表位或抗原。

[0118] 突变多肽还可以用于制造用于使预防或治疗性化合物靶向 CD11b 表达细胞的蛋白质载体。就此而论,在本发明的一个具体实施方式中,所谓的受关注的分子具有预防或治疗价值,并且具体而言为药物。所述预防或治疗性化合物以及具体而言所述药物可以与突变多肽化学或基因偶联。使化合物与多肽偶联的方法在本领域是熟知的,并且包括例如通过使用 N-吡啶基磺酰活化的巯基的二硫键。在一个实施方式中,受关注的分子是消炎化合物,所述消炎化合物当与突变多肽偶联时,特异性靶向参与炎症应答的细胞的表面,诸如树枝状细胞或中性白细胞。

[0119] 更具体而言,选择性 CD8+细胞毒性细胞引发的抗原呈递主要由骨髓树枝状细胞进行。

[0120] 因此,在一个具体实施方式中,用于制造蛋白质载体的突变 CyaA 多肽是基因修饰腺苷酸环化酶,其含有一个或多个通过二硫键化学偶联于位于突变 CyaA 多肽催化结构域内的基因插入半胱氨酸残基的分子。实际上,通过与位于催化结构域内不同许可位点处的不同半胱氨酸残基的二硫键,多个分子可以与突变 CyaA 多肽化学偶联。

[0121] 本发明的突变多肽或多肽衍生物适合用于治疗或预防。

[0122] 治疗或预防效果意图指对患者的状况有益的任何效果,只要其是治疗性或或者足以限制病理状态的症状或后果,包括限制病理状态的进展。治疗或预防效果也包括预防病理状态的发作。

[0123] 本发明的突变多肽或多肽衍生物特别适合在需要其的宿主中引发细胞介导的免疫应答诸如 T- 细胞免疫应答或 B- 细胞免疫应答。其包括 CTL 和 Th,特别是 Th1 应答,包括 CD4⁺T 细胞应答和 / 或 CD8⁺T 细胞应答。

[0124] 源自 CyaA 蛋白质的多肽引发细胞介导免疫应答的能力在动物中足以预防体内肿瘤生长,甚或能够肿瘤退化。其还可通过经由 TLR 激活而激活免疫应答的先天成分以及通过使用化学治疗剂向下激活免疫应答的调节成分得以增强。本发明提供下述方法,该方法作为已经被选择的结合突变 E570Q 和 K860R 的结果,应当能够使此类结果以改进的安全状态获得。

[0125] 本发明因此还涉及治疗方法,该方法包括向动物或人类患者施用根据本发明的突变多肽或多肽衍生物,以在需要其的宿主中引发 T- 细胞免疫应答或 B- 细胞免疫应答。

[0126] 根据本发明的突变多肽或多肽衍生物可特别用于预防或治疗选自瘤形成、癌症和传染病的疾病,所述传染病选自病毒、逆转录病毒、细菌或真菌诱发的疾病。具体而言,多肽衍生物可以用于在患者中治疗 HIV 感染。

[0127] 特别提供的是,在本发明的具体实施方式中,按照公认的肿瘤分类临床标准, CyaA 突变多肽或多肽衍生物相比表面肿瘤 (superficial tumors) 更适合治疗浸润或血管化肿瘤,或者相比原发性肿瘤更适合治疗转移性肿瘤,。

[0128] 实体瘤尤其是通过使用本发明的多肽衍生物来治疗的靶标。

[0129] 在可以作为用本发明的多肽衍生物进行治疗的候选物的肿瘤中,描述了下述作为实例,其肿瘤相关抗原已被表征:

[0130] 黑素瘤,特别是转移性黑素瘤;肺癌;头颈癌;子宫颈癌、食道癌;膀胱癌,特别是浸润膀胱癌;前列腺癌;乳腺癌;结肠直肠癌;肾细胞癌;肉瘤;白血病;骨髓瘤。对于这些各种组织性类型的癌症,已经显示,抗原肽在肿瘤样品上特异性表达而且被 T 细胞识别,特别是被 CD8⁺T 细胞或 CD4⁺T 细胞识别。

[0131] 本发明还涉及根据本发明的多肽衍生物在制备用于治疗选自瘤形成、癌症和传染病(所述传染病选自病毒或逆转录病毒诱发的疾病)的疾病的组合中的应用。

[0132] 在优选的实施方式中,根据本发明的多肽或多肽衍生物可与佐剂结合和 / 或与另一治疗活性分子或药剂结合施用给患者。

[0133] 在本发明的上下文中,所述“另一治疗活性分子或药剂”是可能对其所施用的患者的状况有益的物质。其尤其是适合用于制造药物的有效成分。其可以是适合加强增加或调节治疗有效成分的效果的化合物。

[0134] 突变 CyaA 多肽或其多肽衍生物可以与治疗活性分子或药剂一起施用,特别适合在患者中引发免疫应答的治疗活性分子或药剂。

[0135] 具体而言,突变 CyaA 多肽或其多肽衍生物可以与治疗活性分子一起施用,该治疗活性分子适合特别是通过降低或阻断调节 T 细胞免疫抑制能力来调节患者中的细胞应答。

[0136] 根据本发明的具体实施方式,在调节细胞应答上的此类效应可以借助调节 T 细胞

和 / 或调节另一细胞抑制应答诸如骨髓抑制细胞应答的药剂获得,所述药剂通过下述行为靶向所述调节细胞特别是 T 细胞:排除或钝化这些细胞(诸如利用 CD25- 特异性抗体,或环磷酰胺)、更改所述细胞特别是调节 T 细胞的运输(诸如 CCL22- 特异性抗体)或更改所述细胞的分化和发信号(诸如通过阻断 FOXP3(forkhead box P3) 信号)。

[0137] 根据本发明的具体实施方式,调整调节细胞应答的药剂靶向抑制分子,特别是存在于 APCs 上的此类分子(诸如 B7-H1、B7-H4、IDO(吡啶胺 2,3- 二氧酶)或精氨酸酶)或存在于 T 细胞(诸如 CTLA4(细胞毒 T- 淋巴细胞 - 相关抗原 4) 或 PD1(程序性细胞死亡 1)) 上的此类分子,或者靶向可溶性免疫抑制分子(诸如 TGF beta(转化生长因子)、IL-10、VEGF(血管内皮生长因子)、COX2(环氧化酶 2))。

[0138] 作为对调节细胞应答具有影响的药剂的实例,提出细胞毒剂,其能杀死调节 T 细胞或其他免疫抑制细胞,或者其能阻断它们的活性和 / 或发育和 / 或积聚。

[0139] 在本发明的具体实施方式中,调整调节细胞应答特别是调节 T 细胞应答的药剂是化学治疗剂。特别地,其选自已知作为抗癌剂并用在化学治疗中的化学治疗剂。此类药剂包括有助于降低肿瘤负荷的那些药剂、通过增加肿瘤细胞对治疗的灵敏度而作用的那些药剂,或者能够杀死或钝化免疫调节细胞的那些药剂。在本发明范围内使用的化学治疗剂因此增强抗肿瘤免疫。

[0140] 在本发明的具体实施方式中,化学治疗剂是烷化剂。特别地,其为环磷酰胺 (CTX) (Sigma, Steinheim, Germany)。环磷酰胺能够排除或钝化调节 T 细胞。

[0141] 在本发明的另一个具体实施方式中,化学治疗剂是嵌入剂。

[0142] 在一个具体实施方式中,化学治疗剂是阿霉素 (DOX) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)。

[0143] 化学治疗剂有利地以低剂量施用。

[0144] 突变 CyaA 多肽或其多肽衍生物还可以与佐剂组分一起施用,该佐剂组分适合激活由患者中的肿瘤引发的先天免疫应答。

[0145] 在本发明的具体实施方式中,所述佐剂组分选自核酸、肽聚糖、糖类、肽、细胞因子、激素和小分子,其中所述佐剂组分能够经过图式识别受体 (PRR) 发信号。

[0146] 已知 PRRs 通过识别来自病原体的所谓的进化保守标记(病原体相关性分子图式、PAMPs) 而介导对病原体以及对肿瘤的先天免疫应答。PRR 存在于多种免疫细胞上,所述免疫细胞包括树枝状细胞、自然杀伤细胞、B 细胞,以及还存在于一些非免疫细胞诸如上皮细胞或内皮细胞上。PRR 及其参与先天免疫应答描述于 Pashine A. 等中 (Nature medicine supplement volume 11, N° 4, April 2005)。

[0147] 具体而言,用于激活先天免疫应答的佐剂组分可以靶向 PRR 并因此通过 PRR 激活发信号,其中所述 PRR 包括 Toll- 样受体或核苷酸结合寡聚结构域 (NOD) 或 C 型凝集素。

[0148] 在本发明的具体实施方式中,所述佐剂组分是 Toll- 样受体 (TLR) 激动剂。所述 Toll- 样受体激动剂特别被配制为有效激活患者的先天免疫系统。所述 TLR 激动剂能够结合 TLR,即,其为 TLR 的配体,并且还能够增强在所述 TLR 的控制下引发的免疫应答。

[0149] 为了说明起见,TLR 激动剂选自 TLR-9、TLR-8、TLR-3 和 TLR-7 激动剂。然而,其他 TLR 受体的激动剂可用于实施本发明,诸如 TLR2、TLR4、TLR5 受体的激动剂。

[0150] 在本发明中所用的 TLR 激动剂可以是天然或合成的激动剂。其可以是相同或不同

tol11-样受体的不同激动剂的组合。

[0151] 根据本发明的具体实施方式,所述 TLR 激动剂是免疫刺激核苷酸序列,特别是稳定的核苷酸序列,例如作为结构修饰诸如硫代磷酸修饰的结果进行的稳定化。核苷酸序列还可以被保护免于特定配制物引起的降解。特别地,其脂质体制剂,例如脂质体混悬液,对有效施用免疫刺激核苷酸序列可以是有利的。

[0152] 在本发明的具体实施方式中,免疫刺激核苷酸序列是单链 RNA。

[0153] 在本发明的具体实施方式中,免疫刺激核苷酸序列包括 CpG 基序,而且特别是 CpG 寡核苷酸 (CpG ODNs)。作为合适的 CpG 寡核苷酸的实例,本发明提供 TLR-9 配体,诸如 A 型 CpG ODN,即,具有核苷酸序列 5'-GGGGGACGATCGTCGGGGG-3' 的 CpG 2216,或 B 型 CpG ODN,即,具有核苷酸序列 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' 的 CpG 1826。

[0154] CpG 寡核苷酸可以在与 DOTAP (Roche Mannheim, Germany) 复合之后使用,以便保护其免于降解以及促进其吸收。

[0155] 根据本发明的另一个具体实施方式,所述 TLR 激动剂是小分子。适合作为 TLR 激动剂的小分子例如是咪唑并喹啉胺衍生物,诸如命名为 R848 (瑞喹莫德) 的咪唑并喹啉胺衍生物,即,4-氨基-2-乙氧甲基-a, a,二甲基-1-H-咪唑并 [4,5c] 喹啉-1-乙醇,得自 Invivogen,,其为 TLR-7 配体,或者命名为 R837 (imiqimod) 的咪唑并喹啉胺衍生物,得自 Aldara,其为 TLR-7 激动剂。

[0156] 适合作为 TLR 激动剂的其他分子是作为 TLR-3 配体的聚尿苷 (pU) 或者作为 TLR-7 配体的聚胞苷酸 (PIC)。

[0157] 这些分子可被配制成促进其吸收和 / 或保护其免于降解。这些分子还可以作为脂质体制剂制得,特别是作为脂质体混悬液,用于适用给患者。

[0158] 根据本发明的另一具体实施方式,所述佐剂组分可以是细胞类佐剂组分。其实例为树枝状细胞,该树枝状细胞抑制能够引发淋巴细胞应答,此类树枝状细胞在其施用之前能够先体外后体内进行调节,以便增加其 T 细胞应答刺激活性。树枝状细胞因此能够用与 PRR 相互作用的佐剂来刺激,包括 TLR 配体或激动剂 (Pashine A. et al Nature Medicine Supplement Volume 11, N° 4, April 2005 p S63-S68)。

[0159] 可选地,根据本发明的多肽或多肽衍生物可在无佐剂时施用给患者。

[0160] 事实上,发明人之前已经表明,在单次静脉注射重组毒素之后,可以体内引发对载体化抗原 (vectorized antigen) 特异性的 CTL,特别是无需提供异源佐剂。这些结果,特别是表位对骨髓树枝状细胞的特异性靶向实现了无需佐剂和 CD4+T 细胞协助。

[0161] 因此,本发明还涉及与分子特别是受关注的肽相重组的突变 CyaA 多肽制备组合物的应用,该组合物配制用于静脉施用并且能够体内实施 CD8+T 细胞免疫应答,所述组合物不含异源佐剂。本发明同样还涉及这种组合物。

[0162] 本发明还涉及治疗方法,包括向患有选自瘤形成、癌症和传染病的疾病的动物或人类患者施用根据本发明的突变多肽或多肽衍生物,所述传染病选自病毒、逆转录病毒、细菌或真菌诱发的疾病。

[0163] 突变多肽或多肽衍生物具体而言可以与治疗活性分子和 / 或佐剂一起施用。

[0164] 突变 CyaA 多肽或多肽衍生物、治疗活性分子和 / 或佐剂可以作为药物组合物的一部分一起施用,该药物组合物不含药学上可接受的载体或赋形剂。

[0165] 可选地,本文所述的实施本发明的各种分子类型在时间上可以同时施用(特别是对于突变 CyaA 多肽或多肽衍生物和佐剂)或者在时间上分开施用(特别是对于突变 CyaA 多肽)。

[0166] 在施用突变 CyaA 多肽或多肽衍生物和/或佐剂之前和之后,可以可选地实施治疗活性分子的施用。其在时间上可以是顺序的。

[0167] 可以采纳的具体疗法是重复施用方案,特别是这样的方案,其包括两轮或更多轮施用至少一种选自突变 CyaA 多肽或多肽衍生物、治疗活性剂和/或佐剂的化合物。

[0168] 本发明还涉及药物组合物,其包含根据本发明的突变 CyaA 多肽或多肽衍生物、药学上可接受的载体或赋形剂以及任选的佐剂和/或另一种治疗活性分子。

[0169] 本发明还涉及组分的试剂盒,其包含突变 CyaA 多肽或多肽衍生物、治疗活性分子和/或佐剂。

[0170] 本发明组分试剂盒或组合物的化合物尤其可通过静脉施用、瘤内施用或皮下施用而被给予患者。

[0171] 本发明的组分试剂盒或组合物具有下述能力:(i) 通过本申请公开的突变 CyaA 多肽或多肽衍生物靶向适应性免疫应答,(ii) 通过治疗活性剂下调调节免疫应答,以及如果佐剂存在的话,(iii) 通过经佐剂激活所述先天应答而靶向免疫应答的先天成分。

[0172] 本发明还涉及治疗需要本文所公开的组分试剂盒或组合物的组分的患者的方法,所述患者为人类或动物患者,包括施用本文所公开的组分试剂盒或组合物的组分的步骤。

[0173] 本发明具体而言还涉及新型免疫原性组合物,其被配制为在动物或人类宿主中施用,特别是静脉施用,特征在于其包含重组 CyaA 多肽衍生物,该衍生物包括插入催化结构域中的抗原。

[0174] 本发明进一步涉及用于在人类或动物中施用的药物组合物,其配制为使受关注的分子特异性靶向 CD11b 表达细胞,特征在于所述关注分子如本文所述与突变 CyaA 多肽偶联。

[0175] 在另一个具体实施方式中,所述药物或免疫原性组合物包含编码重组 CyaA 多肽衍生物的核酸构建物,所述重组 CyaA 多肽衍生物包含如本文定义的、与关注分子偶联的 CyaA 突变多肽。

[0176] 此外,本发明还涉及如上所定义的免疫原性组合物在制备用于施用给动物或人类宿主的疫苗或免疫治疗组合物方面的应用。

[0177] 如本文所用的,术语“免疫治疗组合物”涉及下述组合物,其导致免疫应答,而且其与治疗性治疗相关,诸如对抗瘤形成、癌症、病毒感染、真菌感染、寄生虫感染或细菌感染的治疗。

[0178] 本发明还涉及使动物或人类宿主免疫的方法,其中所述方法包括下述步骤:

[0179] a) 提供如上定义的免疫原性组合物;

[0180] b) 向所述宿主施用所述免疫原性组合物,优选经由静脉内途径,以便促进免疫应答。

[0181] 具体而言,本发明的免疫原性组合物能够体内或体外诱导或刺激涉及特异性树枝状细胞的免疫细胞应答。本发明的免疫原性组合物具体而言可用于对患者的预防或治疗接种。

[0182] 因此,在一个具体实施方式中,所述免疫原性或药物组合物有利地不含本领域中常用的引发助剂 (priming adjuvant),诸如氢氧化铝。

[0183] 本发明还涉及制备适合将目标分子递送到细胞中的蛋白质载体的方法,包括使目标分子与如本文定义的 CyaA 突变多肽结合。

[0184] 本发明还涉及核酸分子,具体而言 DNA 或 RNA 分子,其编码如上定义的多肽或多肽衍生物。

[0185] 本发明还涉及真核或原核细胞,其包含如上所定义的核酸分子。

[0186] 本发明也涉及真核细胞,优选哺乳动物细胞,其包含如上所定义的突变 CyaA 多肽或多肽衍生物。在优选的实施方式中,所述细胞是人类细胞。

[0187] 本发明还涉及真核细胞,优选哺乳动物细胞,其用如上所定义的蛋白质载体转化。

附图说明

[0188] 图 1. 在成孔和酰化结构域中的置换协同作用减小 CyaA 的特异性溶血活性。(A) 将 TNC 缓冲液中的绵羊红细胞 ($5 \times 10^8/\text{ml}$) 用 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 酶促活性 CyaA 蛋白质在 37°C 温育。30min 后,将等分试样的细胞悬液反复洗涤以去除未结合 CyaA,并用来测定细胞伴随和细胞浸入 AC 活性。在温育 5 小时后测量溶血活性,其为光度测定 (A_{541}) 的已释放血红蛋白的量。完整 CyaA 的活性取为 100%。(B) 如上用所示浓度的酶促活性 CyaA 衍生蛋白质温育红细胞 30 分钟,洗涤,测定细胞结合 AC 酶活性的量。(C) 具有 K860R 置换的蛋白质与细胞结合活性的降低通过使其浓度从 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 增至 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 来补偿。所存在的 CyaA/2330VA (CyaA/OVA) 的活性取值为 100%。结果表示来自重复试验进行的至少三个独立实验的平均值。星号表示来自 CyaA 活性 (图 1A) 或 CyaA/OVA (图 1C) 活性的统计学显著性差异 (**, $p < 0.001$)。

[0189] 图 2. CyaA/OVA/E570Q+K860R 结合并易位到 CD11b⁺ 单核细胞中。(A) J774A.1 细胞 ($10^6/\text{ml}$) 在 D-MEM 中在 4°C 用 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ CyaA 温育 30 分钟,反复洗涤,并在细胞溶解物中测定细胞结合 AC 活性的量。为封闭 CD11b/CD18 受体,将细胞用 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 终浓度的 CD11b- 特异性抗体 M1/70 (Exbio、Czech Republic) 温育 30 分钟,之后添加 CyaA (**, $p < 0.001$)。(B) 构建物的 AC 结构域易位能力被评价为穿透细胞并将胞质 ATP 转化为 cAMP 的能力。在 37°C , J774A.1 细胞用 CyaA 构建物温育 30 分钟,测定在细胞溶解物中累积的 cAMP 的量 (41)。作为对照,如上用抗 -CD11b 抗体 M1/70 封闭 CD11b/CD18 受体。通过使用双重突变 CyaA/E570K+E581P 变体,控制 CD11b/CD18- 结合且内吞毒素的膜穿透,所述双重突变 CyaA/E570K+E581P 变体对于受体结合而言是完整的,但是不能将 AC 结构域跨过细胞膜易位以及升高胞质 cAMP 浓度 (Vojtova-Vodolanova 等,2009)。(C) 在 Pluronic F-127 [0.05% (w/w)] 的存在下, J774A.1 细胞用 K⁺ 敏感性荧光探针 PBFI/AM 以 $9.5 \mu\text{M}$ 最终外浓度于 25°C 装载 45min。在 HBSS 中洗涤细胞,之后添加 $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ 所示毒素。每 15s 记录反映胞内 K⁺ 浓度的 PBFI 荧光强度比 (激发波长 340,发射波长 450 和 510nm)。右侧标尺显示得自校准实验的胞内 [K⁺] 值 (参见实验步骤)。在测定的时间间隔内没有观察到细胞溶解,其以乳酸脱氢酶释放评价。显示了代表重复试验进行的独立测定的结果。

[0190] 图 3. E570Q+K860R 类毒素不透化 J774A.1 细胞。(A) J774A.1 细胞的溶解测定为用 3、10 和 $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ 所示蛋白质以 37% 在无血清的 DMEM 中温育 3 小时后从 10^5 细胞释放

的乳酸脱氢酶的量。所述结果表示在以重复试验进行两个实验中获得的地平均数。(B) 如在材料和方法中所述,在室温下暴露于 1 或 10 μ g/ml CyaA/2330VA/AC⁻ 或 CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ 蛋白质的单 J774A.1 细胞上,进行全细胞膜片钳测量。所示的曲线代表 3 个独立实验中的六个测定。

[0191] 图 4. 含 E570Q+K860R 置换的类毒素递送 OVA T 细胞表位,用于呈递 MHC 类别 I 分子的呈递以及 CD8⁺CTLs 的诱导。(A) 在所示浓度 (0 至 60nM) 的、包埋 OVA 表位或具有模拟 CyaA/AC⁻ 的类毒素的存在下,温育用作 APCs 的 BMDC (3x10⁵ 细胞 / 孔)。在与 B3Z T 细胞 (1x10⁵ 细胞 / 孔) 共培养 24 小时后,通过 CTLL 增殖方法测定由刺激 B3Z 细胞引发的 IL-2 分泌。结果表达为所引入的 [³H] 胸苷的 Δ cpm (类毒素存在时的 cpm- 毒素不存在时的 cpm) $\pm$ SD, 并且其代表五个独立实验。(B) 分析通过体内杀伤测定诱导的 OVA (SIINFEKL)- 特异性 CTL 应答。在第 0 天,小鼠接受 50mg 静脉注射的模拟 AC⁻ 或 OVA/AC⁻ 类毒素,在第 7 天,对小鼠静脉注射 OVA (SIINFEKL) 肽加载的 CFSE^高 和未加载的 CFSE^低 脾细胞混合物 (1 : 1)。通过 FACS 分析,测定 20 小时后脾脏中保留的 CFSE⁻ 正细胞数目,如在上图曲线集合中一个代表性体内杀伤测定所记录的,其中指出了在出口 (gate) 中的细胞百分比。下图显示三个独立实验的体内杀伤测定的汇集结果。斯氏 t 检验测定统计学显著性 (OVA/AC⁻ 对 OVA/E570Q+K860R/AC⁻, $p = 0.75$)。

[0192] 图 5. CyaA 对膜作用的模型。(A) 所述模型预测在溶液中两种 CyaA 构象体之间的平衡,其中每一个以不同构型被插入细胞膜中。一个将产生单体 CyaA 易位前体,将 AC 结构域递送到胞质溶胶中并使钙离子伴随流入细胞中。所述构象体将作为孔前体寡聚化插入 CyaA 孔中。(B) E570Q 和 K860R 置换的协同效应将选择性阻断 CyaA 孔前体寡聚进入孔中的能力,而越过膜递送 AC 结构域的易位前体的能力保持不受影响。

[0193] 图 6. 百日咳博德特氏菌 CyaA 毒素的氨基酸序列 (SEQ ID N^o 1)。

[0194] 图 7. 百日咳博德特氏菌 CyaA/E570Q+K860R 突变体的氨基酸序列 (SEQ ID N^o 2)。

[0195] 图 8. 百日咳博德特氏菌 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的氨基酸序列 (SEQ ID N^o 3)。

[0196] 图 9. 百日咳博德特氏菌 CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的氨基酸序列 (SEQ ID N^o 4)。

[0197] 图 10. 编码 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的质粒 (QR-AC⁻)。

[0198] 图 11. 编码 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的 QR-AC⁻ 质粒的 DNA 序列 (SEQ ID N^o 5)。

[0199] 图 12. 编码 CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的质粒 (OVA-QR-AC⁻)。

[0200] 图 13. 编码 CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的 OVA-QR-AC⁻ 质粒的 DNA 序列 (SEQ ID N^o 6)。

[0201] 图 14. 副百日咳博德特氏菌 CyaA 毒素的氨基酸序列 (登记号 CAB76450、SEQ ID N^o 7)。

[0202] 图 15. 欣氏博德特氏菌 CyaA 毒素的氨基酸序列 (登记号 AAY57201、SEQ ID N^o 8)。

[0203] 图 16. 支气管败血性博德特氏菌 CyaA 毒素的氨基酸序列 (登记号 CAA85481、SEQ ID N^o 9)。

实施例

[0204] 腺苷酸腺苷酸环化酶毒素越过靶细胞膜易位而不形成孔

[0205] 材料和方法

[0206] CyaA 蛋白质的构建、生产和纯化。先前描述了产生 CyaA/AC⁻、CyaA/2330VA、CyaA/E570Q 和 CyaA/K860R 构建物的修饰 (13、20、21), 并且这些修饰被单独或组合地引入 CyaA/2330VA/AC⁻ 中。CyaA- 衍生蛋白质在大肠杆菌 XL-1 Blue 中生产并纯化接近均质, 如前所述 (29)。在疏水色谱法期间, 将带有结合毒素的树脂用 60% 异丙醇反复洗涤 (30), 以降低 CyaA 样品的内毒素含量至低于 100 IU/mg 蛋白质, 如通过 LAL assay QCL-1000 (Cambrex) 所测。

[0207] 含编码 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的 QR-AC⁻ 质粒 (图 10) 的大肠杆菌 XL1-Blue 菌株 (Stratagene) 于 2009 年 3 月 18 日以登记号 CNCM I-4136 (图 10) 保藏于 CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, France)。QR-AC⁻ 质粒的 DNA 序列 (SEQ ID N° 5) 公开在图 11 中。

[0208] 含编码 CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ 突变体的 OVA-QR-AC⁻ 质粒 (图 12) 的大肠杆菌 XL1-Blue 菌株 (Stratagene) 于 2009 年 3 月 18 日以登记号 CNCM I-4137 (图 10) 保藏于 CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, France)。OVA-QR-AC⁻ 质粒的 DNA 序列 (SEQ ID N° 6) 公开在图 13 中。

[0209] 在绵羊红细胞上的细胞结合和红外溶血活性。将在 50mM Tris pH 7.4、150mM NaCl 和 2mM CaCl₂ (TNC 缓冲液) 中的 5×10^8 已洗绵羊红细胞在 37°C 用 5 μ g/ml CyaA 蛋白质温育, 并如先前详细所述测定 CyaA 的细胞结合、细胞入侵 AC 溶血活性 (13)。利用单向方差分析法 (ANOVA) 以及 Bonferroni post-test (SigmaStat v. 3.11, Systat, San Jose, CA) 分析活性值的差异显著性。

[0210] CyaA 的巨噬细胞结合、cAMP 提高以及溶细胞能力。使 J774. A1 鼠单核细胞 / 巨噬细胞 (ATCC、编号 TIB-67) 在湿润空气 / CO₂ (19 : 1) 气氛中在补充有 10% (v/v) 热灭活胎牛血清、青霉素 (100 IU ml⁻¹)、链霉素 (100 μ g ml⁻¹) 和两性霉素 B (250 ng ml⁻¹) 的 RPMI 培养基中培养。在测定前, 用不含 FCS 的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM) (1.9mM Ca²⁺) 代替 RPMI, 并使细胞在 DMEM 中于 37°C 在湿润 5% CO₂ 气氛 (8) 中保持 1h。使 J774A. 1 巨噬细胞 (10⁶) 在 D-MEM 中用 2.5 μ g/ml CyaA 变体在 4°C 温育 30min, 之后通过在 D-MEM 洗三次去除未结合的毒素。将细胞用 0.1% Triton X-100 溶化, 测定细胞结合 AC 活性。对于胞内 cAMP 测定, 使 10⁵ 细胞用 CyaA 在含 100 μ M IBMX (3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤) 的 D-MEM 中温育 30 分钟, 通过添加在 100mM HCl 中的 0.2% Tween-20 终止反应, 使样品在 100°C 煮沸 15min, 通过添加 150mM 未缓冲咪唑中和, 并入所述测量 cAMP (29)。为封闭 CD11b/CD18 受体, 将细胞在冰上用 CD11b- 特异性封闭 MAb M1/70 (Exbio, Czech Republic) 以 10 μ g/ml 的终浓度预温育 30 分钟, 之后添加 CyaA。利用 CytoTox 96 试剂盒检验 (Promega) 测定毒素诱导的 J774A. 1 细胞, 其为用 10 μ g/ml 适宜蛋白质在 37°C 在 D-MEM 中温育 3 小时时从 10⁵ 细胞中所释放的乳酸脱氢酶的量, 如所述 (8)。如上分析活性值的差异显著性。

[0211] 膜片钳测量。在浸入 HBSS (140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 3mM MgCl₂, 10mM Hepes-Na, 50mM 葡萄糖; pH 7.4) 中的 J774A. 1 细胞上进行全细胞膜片钳测量。使外径约

3 μm 的烧边玻璃微量加液器填充 125mM 葡萄糖酸钾、15mM KCl、0.5mM CaCl_2 、1mM MgCl_2 、5mM EGTA、10mM HEPES-KOH pH 7.2 的溶液。所得到的微电极的电阻是 3 至 5M Ω 。在 -40mV 夹细胞,在 1kHz 滤过数据,在 2kHz 利用 Axopatch 200A 放大器、Digidata 1320A 数字转换器和 PClamp-9 软件包 (Axon Instruments、Foster City、CA) 使数字数据化。

[0212] 胞质 K^+ 浓度降低的测定。在 HBSS 中洗涤在盖玻片上生长的细胞,并在 0.05% (w/w) Pluronic F-127 (Sigma、St. Louis、MO) 的存在下在 25 $^{\circ}\text{C}$ 加载 9.5 μM PBF1 乙酰氧基甲酯 (PBF1/AM、Molecular Probes、Eugene、OR、USA) 30min。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 利用装备有 DataMax 软件的 FluoroMax-3 荧光分光光度计 (Jobin Yvon Horriba, France) 进行放射测量。每 15s 记录 PBF1 的荧光强度 (激发波长 340, 发射波长 450 和 510nm), 并且每个波长的积分时间是 3s。显示 450/510nm 波长比。所观察到的安装在 1cm 小池中的盖玻片面积是约 10mm², 对应于约 10⁴ 细胞。在分别含各种浓度的醋酸钾 (10、30、60 或 140mM) 和醋酸钠 (135、115、85 或 5mM) 的 50mM HEPES、pH 7.2 中,在用 3pM 真菌霉素或尼日利亚菌素透化 30 分钟的细胞上,在进行校准实验。最终的强度比 (450/510nm) 示于绘图的右侧垂直轴上。

[0213] 小鼠和细胞系。使得自 Charles River Laboratories 的雌性 C57BL/6 保持在无特异性抗原条件下并根据惯例指导处理。CTLL-2 细胞得自 ATCC B3Z, 对 K^b 限制 OVA (SIINFEKL) 表位具有特异性的 CD8⁺ 特异性 T 细胞杂交瘤由 N. Shastri (University of California, Berkeley) 提供,并在 1mg/ml G418 和 400 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 的存在下,在含 10% 热灭活 FCS、100U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素和 5x10⁻⁵M 2-ME 的完全 RPMI 1640 培养基 (Invitrogen Life Technologies) 中保存。

[0214] 抗原呈递研究。使用作 APC 的骨髓树枝状细胞 (BMDC, 3x10⁵/孔) 在携带 OVA (SIINFEKL) 表位或模拟 CyaA/AC⁻ 的各种浓度 (0 至 60nM) 的重组 CyaA/OVA/AC⁻ 的存在下温育,并与选择性识别 OVA SIINFEKL/H-2K^b MHC 类别 I 复合物的 B3Z T 细胞 (1x10⁵/孔) 共培养 24 小时。在培养 18h 之后,使上清液在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻至少 2h。然后通过 CTLL 增殖方法测定由刺激 B3Z 细胞产生的 IL-2 的量。简言之,将 10⁴ 细胞的 IL-2- 依赖性 CTLL 系/孔用 100 μl 上清液培养,终体积为 200 μl 。24 小时后,添加 [³H]-胸苷 (50 μCi /孔), 6h 后用自动化细胞收集器收集细胞。通过闪烁计数检测所引入的 [³H]-胸苷。每个点重复进行,并使实验重复 5 次。结果以所引入 [³H]-胸苷的 Δcpm 表达 (类毒素存在下的 cpm- 类毒素不存在下的 cpm)。

[0215] 体内杀伤测定。对于 CTL 引发,通过静脉注射 50 μg 携带 OVA (SIINFEKL) 表位或模拟 CyaA/AC⁻ 的重组 CyaA/OVA/AC⁻ 使小鼠免疫。免疫接种后 7 天,幼稚同源脾细胞被脉冲 OVA (SIINFEKL) 肽 (10 $\mu\text{g/ml}$) (30min、37 $^{\circ}\text{C}$),充分洗涤,并用高浓度 (1.25 μM) 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE; Molecular Probes、Eugene、OR) 标记。非脉冲对照群体用低浓度 (0.125 μM) CFSE 标记。CFSE^高- 和 CFSE^低- 标记细胞以 1 : 1 比例混合 (每个种群 5x10⁶ 个细胞),并静脉注射到小鼠中。20h 后收集脾细胞,洗涤,并再悬浮于 FACS 缓冲液 (补充有 1% BSA 和 0.1% NaN₃ 的 PBS) 中。通过 FACS 测定 20h 后保留在脾中的 CFSE⁻ 正细胞的数目。如下计算特异性溶解的百分比: 特异性溶解百分比 = 100 - [100x (% CFSE^高免疫小鼠 / % CFSE^低免疫小鼠) / (% CFSE^高初次接受试验小鼠 / % CFSE^低初次接受试验小鼠)]。

[0216] 统计学分析: 利用单向方差分析法 (ANOVA) 以及 Bonferroni post-test (SigmaStat v. 3.11、Systat、San Jose、CA) 分析值的差异显著性。

[0217] 结果

[0218] 负电荷谷氨酸 570 和酰化赖氨酸 860 的联合消除破坏了 CyaA 的细胞透化能力。CyaA 作用的工作模型预测,可对 CyaA 进行修饰,以失去其成孔(溶血)活性,同时保留其将 AC 结构域递送到靶细胞胞质溶胶中的能力。为测试这种假设,基于先前的观察,即 CyaA/AC⁻ 类毒素溶解细胞的能力可以通过在成孔结构域内的刺激而进行上调或下调,发明人寻求生产可展示尽可能低溶血和溶细胞活性的 CyaA 构建物(8、12-14、18)。同时为了能够评价 CyaA/AC⁻ 类毒素的靶细胞穿透,发明人从之前通过从卵清蛋白(OVA)插入 SIINFEKL 肽而被标记的 CyaA/2330VA 毒素得到此类突变体。选择这种 CyaA 变体是因为在残基 233 处插入报道基因 K^b- 限制 CD8⁺T- 细胞表位不影响 AC 活性,并将 OVA/AC 酶进入细胞中的易位量化为胞质 cAMP 的提高。更重要的是,OVA 表位的存在还允许评价酶促无活性 CyaA/2330VA/AC⁻ 类毒素将其 OVA/AC⁻ 结构域递送到 CD11b⁺ 抗原呈递细胞(APC)的胞质溶胶中的能力,因为能够进行蛋白酶体加工以及 OVA 表位在 MHC 类别 I 糖蛋白上的细胞表面呈递,其可被测定为对 OVA- 特异性 CD8⁺T 细胞的体外及体内刺激(20)。

[0219] 为产生可能缺乏溶细胞活性的 CyaA/AC⁻ 类毒素,发明人组合了先前所示的 E570Q 和 K860R 置换,以降低 CyaA 对绵羊红细胞的特异性溶血活性,其中已经发现 E570Q 置换也降低 CyaA/AC⁻ 对 CD11b⁺J774A.1 单核细胞的溶细胞活性(8、13)。使这些置换单独及组合地基因工程进入 CyaA/2330VA/AC⁻ 中,并比较所得到的类毒素的特异性溶血和溶细胞活性,利用绵羊红细胞作为模型 CD11b⁻ 靶以及利用 J774A.1 作为平行的模型 CD11b⁺ 靶(表 I)。与先前利用缺乏 OVA 表位的类毒素观察到的结果(4、8、13、21)一致,在所用的条件下,与 OVA/AC⁻ 相比,单独携带 E570Q 和 K860R 置换的 OVA/AC⁻ 类毒素在红细胞上分别显示降低两倍(55±8)和零(1±1)相对溶血活性,而且 E570Q 类毒素对 CD11b⁻ 表达 J774A.1 细胞的相对溶细胞活性也降低(37±10)。进而,如根据利用酶促活性 K860R 构建物所获得的结果所预期的,尽管在 CD11b⁻ 红细胞上的溶血活性低,但是 K860R 类毒素在 CD11b⁺J774A.1 细胞上仅显示稍微降低的相对溶细胞活性(72±22%),这证实由 K860R 置换引起的结构缺陷由于与 CD11b/CD18 受体相互作用而得以补救(4)。然而,当与 E570Q 组合时,K860R 置换在降低 E570Q+K860R 构建物对 J774A.1 细胞的相对溶细胞活性上显示出明确的协同效应,低至 14±7%。

[0220] 表 I :OVA/AC⁻ 和衍生物对绵羊红细胞和 J774A.1 巨噬细胞的溶细胞活性。

[0221]

蛋白质	红细胞的溶解(% AC) ^a	J774A.1细胞的溶解 (% AC) ^b
AC ⁻	100 ± 5	100 ± 10
OVA/AC ⁻	93 ± 4	93 ± 12
OVA/E570Q/AC ⁻	55 ± 8**	37 ± 10**
OVA/K860R/AC ⁻	1 ± 1**	72 ± 22**
OVA-L247Q-AC ⁻	97 ± 3	41 ± 9
OVA/E570Q+K860R/AC ⁻	1 ± 1**	14 ± 7**
OVA-E570Q-L247Q-AC ⁻	50 ± 12	40 ± 11
OVA-K860R-L247Q-AC ⁻	1 ± 1	45 ± 11
OVA-E570Q-K860R-L247 Q-AC ⁻	0 ± 1	16 ± 10

[0222] 表说明

[0223] ^{-a}4.5 小时后,测定绵羊红细胞的溶解,为 5x10⁸RBC 在 37°C 在含 5 μg/ml 给定蛋白质的 2mM Ca²⁺ 存在下温育时所释放的血红蛋白的量 (31)。CyaA/AC⁻ 的溶血活性取为 100% 活性。结果表示在四个重复进行的独立实验中获得的值的平均数 ± S. D, 其中具有两个不同的蛋白质制备物。

[0224] ^{-b}Lysis of J774A.1 细胞的溶解测定为细胞用 10 μg/ml 适宜蛋白质在 37°C 在 D-MEM 中温育 3 小时后,从 10⁵ 个细胞中释放的乳酸脱氢酶的量。由 CyaA/AC⁻ 引起的 J774A.1 细胞溶解取为 100%。结果表示在四个重复进行的单独实验中获得的值的平均数 ± S. D, 其中具有两个不同的蛋白质制备物 (*, p < 0.05 ; **, p < 0.001)。

[0225] 为了能够量化 E570Q+K860R 构建物将 AC 结构域递送到细胞胞质溶胶中的能力,将 E570Q 和 K860R 置换转移到得自 CyaA/2330VA (CyaA/OVA) 的酶促活性构建物中。这些构建物以与 AC⁻ 类毒素相似的途径产生和纯化 (未显示), 对其在绵羊红细胞上的细胞结合、溶血和 AC 易位能力进行表征。如图 1A 所示, 以及如从缺乏 OVA 表位的毒素的结果所预期 (4、13、21), E570Q 置换对 CyaA/OVA 的红细胞结合或者将 AC 结构域递送到红细胞胞质溶胶中的能力没有影响, 而且仅选择性降低其相对溶血活性。如进一步所预期的 (4), K860R 置换显著降低 CyaA/OVA 结合并穿透红细胞的能力, 引起 E570Q 和 E570Q+K860R 突变体在红细胞上的相对溶血和细胞侵入 AC 活性急剧降低。

[0226] 必须注意, CyaA 的溶血活性是细胞-缔合的 CyaA 量的高度相关函数 (Hill number > 3), 这表明 CyaA 寡聚是成孔的必要条件 (22)。因此, 为评价组合的 E570Q+K860R 置换对溶血活性的影响, 必须通过在测定中将 K860R 构建物的浓度增加至 25mg/ml (完整毒素为 5mg/ml), 以便实现所有蛋白质与红细胞的等量结合, 从而补偿 K860R 构建物的红细胞结合能力的损失, 如图 1C 所示。在这些条件下, E570Q 和 K860R 置换组合明确的协同作用, 进一步将携带单独的 E570Q (~ 50%) 和 K860R 置换 (~ 30%) 的构建物的两个已经受损的溶血活性降低两个因子, 如图 2C 所示。这表明这两个置换的组合影响 CyaA 的特异性细胞透

化能力。

[0227] CyaA 的成孔活性对 AC 结构域的膜易位不是必要的。与 K860R 置换对红细胞上的毒素活性的影响相反, 先前发现 E570Q 和 K860R 置换对 CyaA 结合并穿透表达 CD11b/CD18 受体的 J774A.1 单核细胞无影响 (4、8)。此外, 如在图 2 中所记录, 当该两种置换在同一毒素分子中组合时, CyaA/OVA/E570Q+K860R 构建物显示出与完整 CyaA 相同的结合 J774A.1 细胞 (图 2A) 以及将 AC 结构域递送到其胞质溶胶中以便提升胞质 cAMP 浓度 (图 2B) 的能力。然而, 与此同时, 双重突变的 E570Q+K860R 类毒素在这些细胞上显示出大约降低 7 倍的 ($14 \pm 7\%$) 相对溶细胞能力 (比较表 I)。如图 2C 所示, 当与完整 CyaA 比较时, 单突变 E570Q 和双重突变 E570Q+K860R 构建物在引发毒素处理的 J774A.1 细胞中的钾离子浓度 ($[K^+]_i$) 减小的能力方面严重受损。尽管通过乳酸脱氢酶释放测定在 20 分钟内未检测到细胞溶解, 但是在添加毒素之后, 暴露于 $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ 完整 CyaA 的 J774A.1 细胞的 $[K^+]_i$ 在 10 分钟内已经从 140mM 降至 30mM 之下。进而, 当使用同样量地 E570Q+K860R 构建物时 ($3 \mu\text{g ml}^{-1}$), 细胞中的 $[K^+]_i$ 水平没有降至 100mM 之下 (图 2C)。实际上, 先前已经显示钾从细胞或者的流出 CyaA 孔前体插入细胞膜中的标志 (32)。这表明 E570Q 和 K860R 置换组合选择性损害类毒素透化 J774A.1 细胞的能力, 而非损害其将 AC 结构域跨过细胞膜易位的能力。

[0228] 如上所讨论 (表 I) 已经在图 3A 中详细记录, 由于相应的 E570Q/AC⁻ 和 E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素的相对溶细胞活性大量降低, 该结论得到进一步支持。在 3h 温育中, $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ 的双重突变 E570Q+K860R 类毒素基本不能引起来自 J774A.1 细胞的任何可检测的乳酸脱氢酶释放, 而 20% 的细胞在等量完整类毒素存在下溶解。

[0229] 为对此进行测试, 发明人在单全细胞膜片钳实验中分析了 E570Q+K860R 构建物的细胞透化能力。此处同样, 必须使用 AC⁻ 类毒素, 以便避免毒素产生的 cAMP 所引起的 J774A.1 细胞的大量边缘波动 (23)。如图 3A 所示, 根据跨过暴露于 $1 \mu\text{g/ml}$ CyaA/OVA/AC⁻ 的膜片钳的单 J774A.1 细胞的离子流的代表性记录, 在最初约 3 分钟的滞后后, J774A.1 细胞渐进且大量被 CyaA/OVA/AC⁻ 透化, 跨过细胞膜的电流在 10 分钟内达到 $-3,000\text{pA}$ 。相反, 如图 3B 所示, 暴露于 CyaA/OVA/E570Q+K860R/AC⁻ 仅重复地引起短暂且最小的细胞透化, 其中跨过细胞膜的电流不超过 -200pA , 而且在添加类毒素之后 10 分钟内恢复到接近零。当类毒素浓度升至 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ 时, 这是用于比较表 I 中所总结的类毒素的相对溶细胞活性的浓度, 观察到非常类似的图像。从 1 到 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ 的 10 倍浓度增加导致跨过细胞膜由 OVA/AC⁻ 产生的电流增加约 2 倍, 然而甚至在 OVA/E570Q+K860R/AC⁻ 浓度增加时没有观察到细胞透化增加 (注意, 针对 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ 的测量结果, y-轴刻度扩大)。所示的记录代表来自 3 个独立实验的至少两个测定, 并且其证明 E570Q 和 K860R 置换组合对类毒素透化 J774A.1 细胞的能力具有较大影响。假定同一构建物的酶促活性形式完全能够将 AC 结构域易位到 J774A.1 细胞中 (比较图 2B), 这些结果有力地表明 CyaA 的细胞透化 (成孔) 活性并非是 AC 结构域跨过细胞膜易位所必需的。

[0230] CyaA 的膜透化活性对乘客抗原递送至胞质 MHC 类别 I 途径中不是必要的。因为胞质 cAMP 的测定不能被用于评价 AC⁻ 类毒素的细胞穿透能力, 因此利用替代测定, 即将受体 OVA 表位递送至 MHC 类别 I 抗原呈递途径的胞质加工部位的能力 (7、24)。为此目的, 发明人测定与类毒素一起装载的 C57BL/6 小鼠骨髓来源树枝状细胞 (BMDCs) 通过 B3Z T 细胞刺激 IL-2 释放的能力, B3Z T 细胞选择性识别 K^b MHC 类别 I 分子与 APC 上的 SIINFEKL (OVA)

肽的复合物。先前的确显示, CyaA/AC⁻ 类毒素将 AC 结构域跨过胞质膜易位到 BMDCs 胞质溶胶中的能力对类毒素促进与 H-2Kb MHC 类别 I 分子复合的已递送 OVA 表位的呈递的能力是必要的。这进而对特异性体外刺激细胞毒 T 细胞发生是必要的 (29)。然而,重要的是在此要证明递送 OVA 表位以进行蛋白体酶加工和随后的呈递是由于 AC 结构域跨过其胞质膜易位到 BMDC 的胞质溶胶中,而不是由于通过流体相摄取或内吞作用对添加抗原取样。基于该目的,使用了双重突变非易位 OVA/E570K+E581 P/AC⁻ 类毒素变体,其在 CyaA 跨膜区中具有谷氨酸 570 和 581 的电荷反向和破坏螺旋置换组合 (33)。先前发现这种构建物展示出结合 CD11b/CD18⁻ 表达细胞的完整能力 (比较图 2A),而其跨过靶细胞膜易位 AC 结构域的能力由于 E570K 和 E581P 置换组合而被去除 (比较图 2B)。

[0231] 如图 4A 所示, B3Z 杂交瘤细胞在与装载有 OVAE570Q/AC⁻ 和 OVA/E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素的 BMDC 一起共温育后被有效刺激。相反,在与装载有跨细胞膜 AC 结构域易位存在缺陷的 OVA/E570K+E581P/AC⁻ 类毒素共温育后,未观察到 B3Z 刺激。此外, OVA/E570Q/AC⁻ 和 OVA/E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素通过 APC 体外诱导 B3Z 淋巴细胞刺激,其同完整 OVA/AC⁻ 类毒素一样高效。这些结果证实, E570Q+K860R 双重突变型完全能够将其 AC 结构域易位到 BMDC 胞质溶胶中,用于 K^b MHC 类别 I 分子进行 OVA 表位的加工和呈递,而其基本不能透化 J774A.1 细胞。这些结果表明, CyaA 的细胞透化 (成孔) 活性既不是跨细胞膜 AC 结构域易位所必需的,其在 CyaA 递送乘客表位进入 APC 胞质溶胶中的能力方面也不起任何作用。

[0232] 为确认所观察到的非溶细胞类毒素体外抗原递送能力,发明人评价了其体内引发 OVA⁻ 特异性细胞毒 CD8⁺T 淋巴细胞 (CTL) 的能力。将 50mg 各种 OVA⁻ 类毒素静脉注射到 C57BL/6 小鼠中,一周后,通过体内杀伤测定评价已免疫小鼠中的 OVA⁻ 特异性 CTL 应答。C57BL/6 小鼠接受 OVA(SIINFEKL) 肽装载 CFSE^高 和未装载 CFSE^低 脾细胞混合物 (1 : 1) 静脉注射,一天后,通过 FACS 分析 CFSE⁻ 标记细胞。如在图 4B 中所示,用模拟类毒素免疫接种小鼠未诱导任何 SIINFEKL⁻ 特异性体内 CTL 活性。进而,用 E570Q+K860R 类毒素免疫接种诱导与用作阳性对照的未突变类毒素相同的 OVA⁻ 特异性 CTL 杀伤应答,其中对完整和双重突变类毒素的平均应答值的轻微差异不是统计学显著的 ($p = 0.065$)。这些结果显示, CyaA 的细胞透化活性对 CyaA/233OVA/AC⁻ 类毒素体内递送 AC⁻ 插入的乘客抗原进入 APC 胞质溶胶中的能力不是必要的。

[0233] 讨论

[0234] 发明人在此显示, CyaA 的 AC 结构域跨过 CD11b/CD18 受体表达骨髓靶细胞膜的易位不依赖所述毒素成孔以及透化细胞膜的能力。

[0235] 如在图 5 所提出的模型中所总结的,发明人先前已经报道了 CyaA 的两种活性之间的平衡可以通过 CyaA 的突变或者可选的酰化作用来转移。的确,在谷氨酸 509、516 和 581 被赖氨酸置换后 (13、18),或者 AC 易位被 3D1 单克隆抗体 (MAb) 封闭后 (25),观察到在损害递送 AC 到细胞中的能力的情况下成孔 (溶血) 活性提高。进而,与由百日咳博德特氏菌产生的天然 (C16:0) 棕榈酰化 Bp-CyaA 相比,对于在大肠杆菌中由棕榈油酰化 (C16:1) 的重组 r-Ec-CyaA,观察到相反方向的转移。发现 r-Ec-CyaA 相比 Bp-CyaA 展示出降低约 4 倍的溶血活性,以及低约 10 倍的成孔活性 (12),而两种 CyaA 形式穿透细胞膜以及易位 AC 结构域到红细胞中的活性相等 (17、26)。此外,最近发现, CyaA/E570Q 构建物展示出将 AC 结构

域递送到红细胞和 J774A.1 巨噬细胞中的完全能力,而相比完整 CyaA,其在平面脂双层中展示出降低的溶血活性和较低的特异性成孔能力,其中 CyaA/E570Q/AC⁻ 类毒素在 J774A.1 细胞上展示出降低 2 倍的溶细胞活性 (8、13)。

[0236] 尽管上述以及发明人所表征的很多突变 CyaA,问题依然是通过 CyaA 进行的膜孔形式是否是 AC 结构域跨过 CD11b⁻ 表达细胞的膜易位所必需的。值得注意的是,基于先前对完整 r-Ec-CyaA 与由百日咳博德特氏菌纯化的天然 Bp-CyaA 的溶血效力的比较,本文所述的 r-Ec-CyaA/OVA/E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素在绵羊红细胞上的特异性溶血活性会降低约 3 个数量级。因此,r-Ec-CyaA/OVA/E570Q+K860R/AC⁻ 对 CD11b⁻ 表达细胞的剩余特异性溶细胞活性估计比 Bp-CyaA 的低约 50 倍,而两种蛋白质递送 AC 结构域到这些细胞中的特异性能将是相同的(利用完整 r-Ec-CyaA 作为 100% 侵入 AC 活性表征,进行比较)。本文所述的 CyaA/2330VA/E570Q+K860R 突变体是具有显著降低的透化细胞能力的第一构建物,其保留了将 AC 结构域跨细胞膜易位的完全能力。这显示在其到达细胞的胞质溶胶的路径中,易位的 AC 结构域能够绕过由 CyaA 形成的阳离子选择性孔。

[0237] 然而,跨细胞膜的 AC 结构域易位的方式和路径依然更详细地被定义。倘若谷氨酸 509、516、570 和 581 置换对 CyaA 的成孔和 AC 递送活性的影响不同 (8、13、18),其中两种活性之间的平衡通过特定置换几乎能够在任一方向完全转移,包含这些谷氨酸残基的两性螺旋看来以可选方式参与 CyaA 的两种活性。这从组合 E509K+E516K 置换的影响得到支持,该组合 E509K+E516K 置换产生不能将 AC 结构域递送到细胞中的超溶血 CyaA (8、18),而本文所述 E570Q+K860R 组合产生相反的基本无溶细胞 CyaA,其完全能够将 AC 结构域易位到 J774A.1 细胞中 (CD11b⁺)。

[0238] 这些观察进一步证实了所提出的模型,即 CyaA 的两种膜活性将取决于插入膜中的不同构象体,一种提高毒素单体产生 AC 结构域的易位,而另一种导致低聚 CyaA 孔形成 (13、18)。提出了仅有膜插入孔前体构象体具有位于细胞外的 AC 结构域时,包含关键谷氨酸残基 509、516、570 和 581 的跨膜节段可参与低聚及阳离子选择性溶细胞孔的形成。在 AC 易位构象体中,相同的跨膜节段在膜中采用不同的构象,其被连接 AC 结构域 C-端与跨膜节段的多肽潜在挤出并且被阻止进入 CyaA 低聚物。对这种解释的支持可从及其同事所获得的结果推导出 (25)。这些作者表明,删除 AVC 结构域以及连接其与成孔结构域的节段(多达残基 489),或者结合 3D1 抗体(其阻断位于残基 373 与 399 之间的末端 AC 结构域节段的膜易位),显著增强毒素的成孔(溶血)活性。这可能是由于构象强加在 CyaA 的跨膜节段上的原因,这对于低聚孔的形成是有利的。仍然要确定的是,在成孔结构域外的哪些 CyaA 节段参与跨膜 AC 结构域易位。倘若要求其结构完整 (27),较大的 RTX 重复结构域(残基 1006 至 1706)有可能参与 AC 向细胞中的易位。其大小足以(700 个残基)在细胞膜内形成亲水易位界面,其可能允许解折叠 AC 结构域跨膜经过,而不会伴随形成真正的细胞透化孔。可选地,CyaA 可能促进反向无板(反向六角相)脂质结构的形成 (28),其可能潜在参与充分密封的蛋白质-脂质界面,AC 结构域可经过该界面滑入细胞的胞质溶胶中。

[0239] 先前的确显示了 CyaA 促进反向无板(反向六角相)脂质结构形成 (28)。这些可能潜在参与充分密封的蛋白质-脂质界面,从而允许在缺乏细胞透化的情况下 AC 结构域跨膜易位。无板脂质结构的形成胆固醇富集的脂膜筏中是有利的,而且最近的确发现 CyaA 在与其受体 CD11b/CD18 复合时移动进入筏中。此外,发明人最近显示,跨膜 AC 结构域易位

仅在 CyaA 重新安置到筏中后才完成 (L. 、Bumba、J. 、Masin、R. 、Fiser、and P. 、Sebo, 已提交)。有趣的是, 先前也发现, 当白喉毒素 (DT) 由于与截短 GPI- 锚定 DT 受体结合后的低 pH 而被脉冲到细胞中时, DT 的催化亚单位跨细胞胞质膜的易位在没有可检测的细胞透化的情况下发生 (34)。作者没有检查 GPI- 锚定 DT 受体是否定位到脂膜筏中, 但是这是非常由可能的。因此, 试图推测, 筏膜的特异性脂质组成可能支持不同蛋白质毒素易位到靶细胞中, 而无需形成透化细胞的真正的蛋白质传导孔。

[0240] 最后但不失重要性的是, 本文报告的实践发现是, 细胞透化 (溶细胞) 活性降低很多的 CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ 类毒素在抗原递送到 CD11b⁺APC 中保留完全活性。根据其作为增强的安全概况工具的潜在应用, 用于在第二代 CyaA/AC⁻ 衍生疫苗中递送肿瘤特异性抗原用以免疫治疗癌症的增强的, 这是重要的。

[0241] 参考文献

[0242] 1. Vojtova J, Kamanova J, Sebo P (2006) Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol* 9:69-75.

[0243] 2. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis. *Embo J* 7:3997-4004.

[0244] 3. Rose T, Sebo P, Bellalou J, Ladant D (1995) Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* 270:26370-26376.

[0245] 4. Masin J, et al. (2005) Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of Bordetella adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* 44:12759-12766.

[0246] 5. Guermonprez P, et al. (2001) The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193:1035-1044.

[0247] 6. Gordon VM, Leppla SH, Hewlett EL (1988) Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of Bacillus anthracis adenylate cyclase toxin but not that of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Infect Immun* 56:1066-1069.

[0248] 7. Schlecht G, Loucka J, Najar H, Sebo P, Leclerc C (2004) Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* 173:6089-6097.

[0249] 8. Basler M, Masin J, Osicka R, Sebo P (2006) Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun* 74:2207-2214.

[0250] 9. Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N (1993) Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61:4064-4071.

- [0251] 10. Morova J, Osicka R, Masin J, Sebo P (2008) RTX cytotoxins recognize β_2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [0252] 11. Paccani S R, et al. (2008) Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 76 :2822-2832.
- [0253] 12. Benz R, Maier E, Ladant D, Ullmann A, Sebo P (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269 :27231-27239.
- [0254] 13. Basler M, et al. (2007) Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* 282 :12419-12429.
- [0255] 14. Hewlett EL, Donato GM, Gray MC (2006) Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol* 59 :447-459.
- [0256] 15. Fayolle C, Sebo P, Ladant D, Ullmann A, Leclerc C (1996) In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+T cell epitopes. *J Immunol* 156 :4697-4706.
- [0257] 16. Rogel A, Hanski E (1992) Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem* 267 :22599-22605.
- [0258] 17. Havlicek V, et al. (2001) Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9. *J Mass Spectrom* 36 :384-391.
- [0259] 18. Osickova A, Osicka R, Maier E, Benz R, Sebo P (1999) An amphipathic α -helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem* 274 :37644-37650.
- [0260] 19. Fiser R, et al. (2007) Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 282 :2808-2820.
- [0261] 20. Osicka R, et al. (2000) Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 68 :247-256.
- [0262] 21. Basar T, et al. (1999) The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase is crucial

for toxin function independently of its acylation status. *J Biol Chem* 274 : 10777-10783.

[0263] 22. Szabo G, Gray MC, Hewlett EL (1994) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem* 269 : 22496-22499.

[0264] 23. Kamanova J, et al. (2008) Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol* 181 : 5587-5597.

[0265] 24. Guermonprez P, Ladant D, Karimova G, Ullmann A, Leclerc C (1999) Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* 162 : 1910-1916.

[0266] 25. Gray MC, et al. (2001) Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol* 183 : 5904-5910.

[0267] 26. Hackett M, et al. (1995) Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270 : 20250-20253.

[0268] 27. Iwaki M, Ullmann A, Sebo P (1995) Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* 17 : 1015-1024.

[0269] 28. Martin C, et al. (2004) Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J Bacteriol* 186 : 3760-3765.

[0270] 29. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 5752-5756.

[0271] 30. Franken KL, et al. (2000) Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif* 18 : 95-99.

[0272] 31. Bellalou J, Sakamoto H, Ladant D, Geoffroy C, Ullmann A (1990) Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* 58 : 3242-3247.

[0273] 32. Gray M. C., et al. (1998) Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J Biol Chem* 273 : 18260-18267

[0274] 33. Vojtova-Vodolanova J., et al. (2009) Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *FASEB J* 23 : 2331-2343

[0275] 34. Lanzrein M., et al. (1996) GPI anchored diphtheria toxin receptor allows membrane translocation of the toxin without detectable ion channel activity.

EMBO J. 15 :725-734

[0276] PCT

[0277] 原始的(用于提交)

[0278]	0-1	PCT/RO/134 表(SAFE) 与保藏的微生物或其它生物材料相关的说明(PCT 第 13 条之二)	
	0-1-1	制作所使用的软件	PCT Online Filing 版本 3.5.000.204 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
	0-2	国际申请号	
	0-3	申请人或代理人文件编号	B08142B - AD
	1	如下所做的说明涉及保藏的微生物或其它生物材料, 其在说明书中的如下位置提及	
	1-1	页	40
	1-2	行	14-17
	1-3	保藏物的鉴定	
	1-3-1	保藏机构的名称	CNCM 法国微生物保藏中心
	1-3-2	保藏机构的地址	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
[0279]	1-3-3	保藏日	2009 年 3 月 18 日(18.03.2009)
	1-3-4	登录号	CNCM I-4136
	1-4	其他说明	鉴定: QR-AC-
	1-5	做出说明的指定国	所有指定国
	2	如下所做的说明涉及保藏的微生物或其它生物材料, 其在说明书中的如下位置提及	
	2-1	页	40
	2-2	行	19-22
	2-3	保藏物的鉴定	
	2-3-1	保藏机构的名称	CNCM 法国微生物保藏中心
	2-3-2	保藏机构的地址	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
[0280]	2-3-3	保藏日	2009 年 3 月 18 日(18.03.2009)
	2-3-4	登录号	CNCM I-4137
	2-4	其他说明	鉴定: OVA-QR-AC-
	2-5	做出说明的指定国	所有指定国
	0-4	此表格与国际申请一起收到 (是或否)	是
	0-4-1	授权的官员	Vinci, Rossana
	[0282] 只用于国际局		

[0283]

0-5	国际局于何时收到此表格:	
0-5-1	授权的官员	

[0001]

序 列 表

<110> 巴斯德研究院

<120> 适合将免疫原性分子递送到细胞中的突变 CyaA 多肽及多肽衍生物

<130> B08142B

<150> EP 09155929.4

<151> 2009-03-23

<150> US 12/409324

<151> 2009-03-23

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1706

<212> PRT

<213> 百日咳博德特氏菌

<400> 1

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

Ser Leu Ile Ala Glu Gly Val Ala Thr Lys Gly Leu Gly Val His Ala
50 55 60

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
115 120 125

[0002]

Val	Thr	Gly	Met	Ala	Asp	Gly	Val	Val	Ala	Ser	Asn	His	Ala	Gly	Tyr		
130						135					140						
Glu	Gln	Phe	Glu	Phe	Arg	Val	Lys	Glu	Thr	Ser	Asp	Gly	Arg	Tyr	Ala		
145					150					155					160		
Val	Gln	Tyr	Arg	Arg	Lys	Gly	Gly	Asp	Asp	Phe	Glu	Ala	Val	Lys	Val		
				165					170					175			
Ile	Gly	Asn	Ala	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Thr	Ala	Asp	Ile	Asp	Met	Phe		
			180					185					190				
Ala	Ile	Met	Pro	His	Leu	Ser	Asn	Phe	Arg	Asp	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser		
		195					200					205					
Val	Thr	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Tyr	Leu	Ala	Arg	Thr	Arg	Arg		
210						215					220						
Ala	Ala	Ser	Glu	Ala	Thr	Gly	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Arg	Ile	Asp	Leu		
225					230				235						240		
Leu	Trp	Lys	Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	Ala	Arg	Ser	Ala	Val	Gly	Thr	Glu		
				245					250					255			
Ala	Arg	Arg	Gln	Phe	Arg	Tyr	Asp	Gly	Asp	Met	Asn	Ile	Gly	Val	Ile		
			260					265					270				
Thr	Asp	Phe	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	His		
		275					280					285					
Ala	Val	Gly	Ala	Gln	Asp	Val	Val	Gln	His	Gly	Thr	Glu	Gln	Asn	Asn		
		290				295					300						
Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Phe	Val	Val	Ser	Ala	Thr	Gly		
305					310					315					320		
Glu	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Arg	Gly	Gln	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ile	Gly	Gln		
				325					330					335			
Gln	Arg	Gly	Glu	Gly	Tyr	Val	Phe	Tyr	Glu	Asn	Arg	Ala	Tyr	Gly	Val		
			340					345					350				
Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Phe	Asp	Asp	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	Val		

[0003]

355					360					365						
Pro	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Phe	Ser	Pro	Asp	Val	Leu	Glu	Thr	Val	Pro	
370					375					380						
Ala	Ser	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Arg	Gln	
385					390					395					400	
Asp	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	Phe	Ser	
405					410					415						
Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Glu	Leu	Glu	
420					425					430						
Met	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Glu	
435					440					445						
Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	
450					455					460						
Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	Ile	Ala	
465					470					475					480	
Leu	Met	Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	Gln	Glu	
485					490					495						
Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser	
500					505					510						
Ala	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	
515					520					525						
Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	
530					535					540						
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro	
545					550					555					560	
Ala	Gly	Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	
565					570					575						
Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	
580					585					590						

[0004]

Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly
595600605															
Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr
610615620															
Gly	Leu	Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala
625630635640															
Gln	Glu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln
645650655															
Leu	Tyr	Arg	Asp	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Ser
660665670															
Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala
675680685															
Ser	Val	Val	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly
690695700															
Ala	Leu	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Gly	Val	Gln	Gln	Pro	Ile	Ile	Glu	Lys
705710715720															
Leu	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ala	Arg	Lys	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Gln
725730735															
Ala	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asn	Leu	Gln	Ala	Arg	His	Glu	Gln	Leu	Ala	Asn
740745750															
Ser	Asp	Gly	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Gly	Trp	Asn
755760765															
Ala	Ser	Ser	Val	Ile	Gly	Val	Gln	Thr	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ala
770775780															
Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	Asp	Asn	Leu	Lys	Ser	Val
785790795800															
Asp	Val	Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Val	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Gln
805810815															
Pro	Val	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ile	Ala	Ser	Arg

[0005]

820	825	830
Lys Gly Glu Arg Pro Ala Leu Thr Phe Ile Thr Pro Leu Ala Ala Pro 835	840	845
Gly Glu Glu Gln Arg Arg Arg Thr Lys Thr Gly Lys Ser Glu Phe Thr 850	855	860
Thr Phe Val Glu Ile Val Gly Lys Gln Asp Arg Trp Arg Ile Arg Asp 865	870	875
Gly Ala Ala Asp Thr Thr Ile Asp Leu Ala Lys Val Val Ser Gln Leu 885	890	895
Val Asp Ala Asn Gly Val Leu Lys His Ser Ile Lys Leu Asp Val Ile 900	905	910
Gly Gly Asp Gly Asp Asp Val Val Leu Ala Asn Ala Ser Arg Ile His 915	920	925
Tyr Asp Gly Gly Ala Gly Thr Asn Thr Val Ser Tyr Ala Ala Leu Gly 930	935	940
Arg Gln Asp Ser Ile Thr Val Ser Ala Asp Gly Glu Arg Phe Asn Val 945	950	955
Arg Lys Gln Leu Asn Asn Ala Asn Val Tyr Arg Glu Gly Val Ala Thr 965	970	975
Gln Thr Thr Ala Tyr Gly Lys Arg Thr Glu Asn Val Gln Tyr Arg His 980	985	990
Val Glu Leu Ala Arg Val Gly Gln Val Val Glu Val Asp Thr Leu Glu 995	1000	1005
His Val Gln His Ile Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asp Ser Ile Thr 1010	1015	1020
Gly Asn Ala His Asp Asn Phe Leu Ala Gly Gly Ser Gly Asp Asp 1025	1030	1035
Arg Leu Asp Gly Gly Ala Gly Asn Asp Thr Leu Val Gly Gly Glu 1040	1045	1050

[0006]

Gly Gln Asn Thr Val Ile Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Phe Leu 1055 1060 1065
Gln Asp Leu Gly Val Trp Ser Asn Gln Leu Asp Gly Gly Ala Gly 1070 1075 1080
Val Asp Thr Val Lys Tyr Asn Val His Gln Pro Ser Glu Glu Arg 1085 1090 1095
Leu Glu Arg Met Gly Asp Thr Gly Ile His Ala Asp Leu Gln Lys 1100 1105 1110
Gly Thr Val Glu Lys Trp Pro Ala Leu Asn Leu Phe Ser Val Asp 1115 1120 1125
His Val Lys Asn Ile Glu Asn Leu His Gly Ser Arg Leu Asn Asp 1130 1135 1140
Arg Ile Ala Gly Asp Asp Gln Asp Asn Glu Leu Trp Gly His Asp 1145 1150 1155
Gly Asn Asp Thr Ile Arg Gly Arg Gly Gly Asp Asp Ile Leu Arg 1160 1165 1170
Gly Gly Leu Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly Asn Asp 1175 1180 1185
Ile Phe Leu Gln Asp Asp Glu Thr Val Ser Asp Asp Ile Asp Gly 1190 1195 1200
Gly Ala Gly Leu Asp Thr Val Asp Tyr Ser Ala Met Ile His Pro 1205 1210 1215
Gly Arg Ile Val Ala Pro His Glu Tyr Gly Phe Gly Ile Glu Ala 1220 1225 1230
Asp Leu Ser Arg Glu Trp Val Arg Lys Ala Ser Ala Leu Gly Val 1235 1240 1245
Asp Tyr Tyr Asp Asn Val Arg Asn Val Glu Asn Val Ile Gly Thr 1250 1255 1260
Ser Met Lys Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Leu

[0007]

1265	1270	1275
Met Gly Gln Gly Gly Asp Asp Thr Val Arg Gly Gly Asp Gly Asp 1280 1285 1290		
Asp Leu Leu Phe Gly Gly Asp Gly Asn Asp Met Leu Tyr Gly Asp 1295 1300 1305		
Ala Gly Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Gly Leu Gly Asp Asp Thr Leu 1310 1315 1320		
Glu Gly Gly Ala Gly Asn Asp Trp Phe Gly Gln Thr Gln Ala Arg 1325 1330 1335		
Glu His Asp Val Leu Arg Gly Gly Asp Gly Val Asp Thr Val Asp 1340 1345 1350		
Tyr Ser Gln Thr Gly Ala His Ala Gly Ile Ala Ala Gly Arg Ile 1355 1360 1365		
Gly Leu Gly Ile Leu Ala Asp Leu Gly Ala Gly Arg Val Asp Lys 1370 1375 1380		
Leu Gly Glu Ala Gly Ser Ser Ala Tyr Asp Thr Val Ser Gly Ile 1385 1390 1395		
Glu Asn Val Val Gly Thr Glu Leu Ala Asp Arg Ile Thr Gly Asp 1400 1405 1410		
Ala Gln Ala Asn Val Leu Arg Gly Ala Gly Gly Ala Asp Val Leu 1415 1420 1425		
Ala Gly Gly Glu Gly Asp Asp Val Leu Leu Gly Gly Asp Gly Asp 1430 1435 1440		
Asp Gln Leu Ser Gly Asp Ala Gly Arg Asp Arg Leu Tyr Gly Glu 1445 1450 1455		
Ala Gly Asp Asp Trp Phe Phe Gln Asp Ala Ala Asn Ala Gly Asn 1460 1465 1470		
Leu Leu Asp Gly Gly Asp Gly Arg Asp Thr Val Asp Phe Ser Gly 1475 1480 1485		

[0008]

Pro Gly 1490	Arg Gly Leu Asp 1495	Ala Gly Ala Lys Gly Val 1500	Phe Leu Ser
Leu Gly 1505	Lys Gly Phe Ala Ser 1510	Leu Met Asp Glu Pro 1515	Glu Thr Ser
Asn Val 1520	Leu Arg Asn Ile Glu 1525	Asn Ala Val Gly Ser 1530	Ala Arg Asp
Asp Val 1535	Leu Ile Gly Asp Ala 1540	Gly Ala Asn Val Leu 1545	Asn Gly Leu
Ala Gly 1550	Asn Asp Val Leu Ser 1555	Gly Gly Ala Gly Asp 1560	Asp Val Leu
Leu Gly 1565	Asp Glu Gly Ser Asp 1570	Leu Leu Ser Gly Asp 1575	Ala Gly Asn
Asp Asp 1580	Leu Phe Gly Gly Gln 1585	Gly Asp Asp Thr Tyr 1590	Leu Phe Gly
Val Gly 1595	Tyr Gly His Asp Thr 1600	Ile Tyr Glu Ser Gly 1605	Gly Gly His
Asp Thr 1610	Ile Arg Ile Asn Ala 1615	Gly Ala Asp Gln Leu 1620	Trp Phe Ala
Arg Gln 1625	Gly Asn Asp Leu Glu 1630	Ile Arg Ile Leu Gly 1635	Thr Asp Asp
Ala Leu 1640	Thr Val His Asp Trp 1645	Tyr Arg Asp Ala Asp 1650	His Arg Val
Glu Ile 1655	Ile His Ala Ala Asn 1660	Gln Ala Val Asp Gln 1665	Ala Gly Ile
Glu Lys 1670	Leu Val Glu Ala Met 1675	Ala Gln Tyr Pro Asp 1680	Pro Gly Ala
Ala Ala 1685	Ala Ala Pro Pro Ala 1690	Ala Arg Val Pro Asp 1695	Thr Leu Met
Gln Ser	Leu Ala Val Asn Trp	Arg	

[0009]

1700

1705

<210> 2

<211> 1706

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CyxA/E570Q+K860R

<400> 2

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

Ser Leu Ile Ala Glu Gly Val Ala Thr Lys Gly Leu Gly Val His Ala
50 55 60

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
115 120 125

Val Thr Gly Met Ala Asp Gly Val Val Ala Ser Asn His Ala Gly Tyr
130 135 140

Glu Gln Phe Glu Phe Arg Val Lys Glu Thr Ser Asp Gly Arg Tyr Ala
145 150 155 160

Val Gln Tyr Arg Arg Lys Gly Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Lys Val
165 170 175

[0010]

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

[0011]

Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Glu	Leu	Glu	420	425	430	
Met	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Glu	435	440	445	
Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	450	455	460	
Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	Ile	Ala	465	470	475	480
Leu	Met	Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	Gln	Glu	485	490	495	
Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser	500	505	510	
Ala	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	515	520	525	
Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	530	535	540	
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro	545	550	555	560
Ala	Gly	Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	565	570	575	
Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	580	585	590	
Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly	595	600	605	
Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr	610	615	620	
Gly	Leu	Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala	625	630	635	640

[0012]

Gln	Glu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	645	650	655
Leu	Tyr	Arg	Asp	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Ser	660	665	670
Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	675	680	685
Ser	Val	Val	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly	690	695	700
Ala	Leu	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Gly	Val	Gln	Gln	Pro	Ile	Ile	Glu	Lys	705	710	715
Leu	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ala	Arg	Lys	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Gln	725	730	735
Ala	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asn	Leu	Gln	Ala	Arg	His	Glu	Gln	Leu	Ala	Asn	740	745	750
Ser	Asp	Gly	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Gly	Trp	Asn	755	760	765
Ala	Ser	Ser	Val	Ile	Gly	Val	Gln	Thr	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ala	770	775	780
Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	Asp	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	785	790	795
Asp	Val	Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Val	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Gln	805	810	815
Pro	Val	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ile	Ala	Ser	Arg	820	825	830
Lys	Gly	Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	835	840	845
Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Thr	Gly	Arg	Ser	Glu	Phe	Thr	850	855	860
Thr	Phe	Val	Glu	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Asp	Arg	Trp	Arg	Ile	Arg	Asp	865	870	875
																880		

[0013]

Gly	Ala	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu	
				885					890					895		
Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Lys	His	Ser	Ile	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	
			900					905					910			
Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Ile	His	
		915						920					925			
Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	930					935					940					
Arg	Gln	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Asn	Val	
945					950					955					960	
Arg	Lys	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Thr	
				965					970						975	
Gln	Thr	Thr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Arg	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	Arg	His	
			980					985					990			
Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Glu	
		995					1000						1005			
His	Val	Gln	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr		
	1010					1015					1020					
Gly	Asn	Ala	His	Asp	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Asp		
	1025					1030						1035				
Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Gly	Gly	Glu		
	1040					1045						1050				
Gly	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Leu		
	1055					1060					1065					
Gln	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly		
	1070					1075					1080					
Val	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Asn	Val	His	Gln	Pro	Ser	Glu	Glu	Arg		
	1085					1090					1095					

[0014]

Leu Glu 1100	Arg Met Gly Asp Thr 1105	Gly Ile His Ala Asp 1110	Leu Gln Lys
Gly Thr 1115	Val Glu Lys Trp Pro 1120	Ala Leu Asn Leu Phe 1125	Ser Val Asp
His Val 1130	Lys Asn Ile Glu Asn 1135	Leu His Gly Ser Arg 1140	Leu Asn Asp
Arg Ile 1145	Ala Gly Asp Asp Gln 1150	Asp Asn Glu Leu Trp 1155	Gly His Asp
Gly Asn 1160	Asp Thr Ile Arg Gly 1165	Arg Gly Gly Asp Asp 1170	Ile Leu Arg
Gly Gly 1175	Leu Gly Leu Asp Thr 1180	Leu Tyr Gly Glu Asp 1185	Gly Asn Asp
Ile Phe 1190	Leu Gln Asp Asp Glu 1195	Thr Val Ser Asp Asp 1200	Ile Asp Gly
Gly Ala 1205	Gly Leu Asp Thr Val 1210	Asp Tyr Ser Ala Met 1215	Ile His Pro
Gly Arg 1220	Ile Val Ala Pro His 1225	Glu Tyr Gly Phe Gly 1230	Ile Glu Ala
Asp Leu 1235	Ser Arg Glu Trp Val 1240	Arg Lys Ala Ser Ala 1245	Leu Gly Val
Asp Tyr 1250	Tyr Asp Asn Val Arg 1255	Asn Val Glu Asn Val 1260	Ile Gly Thr
Ser Met 1265	Lys Asp Val Leu Ile 1270	Gly Asp Ala Gln Ala 1275	Asn Thr Leu
Met Gly 1280	Gln Gly Gly Asp Asp 1285	Thr Val Arg Gly Gly 1290	Asp Gly Asp
Asp Leu 1295	Leu Phe Gly Gly Asp 1300	Gly Asn Asp Met Leu 1305	Tyr Gly Asp
Ala Gly 1310	Asn Asp Thr Leu Tyr 1315	Gly Gly Leu Gly Asp 1320	Asp Thr Leu

[0015]

Glu Gly 1325	Gly Ala Gly Asn Asp 1330	Trp Phe Gly Gln Thr 1335	Gln Ala Arg
Glu His 1340	Asp Val Leu Arg Gly 1345	Gly Asp Gly Val Asp 1350	Thr Val Asp
Tyr Ser 1355	Gln Thr Gly Ala His 1360	Ala Gly Ile Ala Ala 1365	Gly Arg Ile
Gly Leu 1370	Gly Ile Leu Ala Asp 1375	Leu Gly Ala Gly Arg 1380	Val Asp Lys
Leu Gly 1385	Glu Ala Gly Ser Ser 1390	Ala Tyr Asp Thr Val 1395	Ser Gly Ile
Glu Asn 1400	Val Val Gly Thr Glu 1405	Leu Ala Asp Arg Ile 1410	Thr Gly Asp
Ala Gln 1415	Ala Asn Val Leu Arg 1420	Gly Ala Gly Gly Ala 1425	Asp Val Leu
Ala Gly 1430	Gly Glu Gly Asp Asp 1435	Val Leu Leu Gly Gly 1440	Asp Gly Asp
Asp Gln 1445	Leu Ser Gly Asp Ala 1450	Gly Arg Asp Arg Leu 1455	Tyr Gly Glu
Ala Gly 1460	Asp Asp Trp Phe Phe 1465	Gln Asp Ala Ala Asn 1470	Ala Gly Asn
Leu Leu 1475	Asp Gly Gly Asp Gly 1480	Arg Asp Thr Val Asp 1485	Phe Ser Gly
Pro Gly 1490	Arg Gly Leu Asp Ala 1495	Gly Ala Lys Gly Val 1500	Phe Leu Ser
Leu Gly 1505	Lys Gly Phe Ala Ser 1510	Leu Met Asp Glu Pro 1515	Glu Thr Ser
Asn Val 1520	Leu Arg Asn Ile Glu 1525	Asn Ala Val Gly Ser 1530	Ala Arg Asp

[0016]

Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gly Ala Asn Val Leu Asn Gly Leu
1535 1540 1545

Ala Gly Asn Asp Val Leu Ser Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Leu
1550 1555 1560

Leu Gly Asp Glu Gly Ser Asp Leu Leu Ser Gly Asp Ala Gly Asn
1565 1570 1575

Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gln Gly Asp Asp Thr Tyr Leu Phe Gly
1580 1585 1590

Val Gly Tyr Gly His Asp Thr Ile Tyr Glu Ser Gly Gly Gly His
1595 1600 1605

Asp Thr Ile Arg Ile Asn Ala Gly Ala Asp Gln Leu Trp Phe Ala
1610 1615 1620

Arg Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asp Asp
1625 1630 1635

Ala Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His Arg Val
1640 1645 1650

Glu Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala Gly Ile
1655 1660 1665

Glu Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro Gly Ala
1670 1675 1680

Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr Leu Met
1685 1690 1695

Gln Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
1700 1705

<210> 3
<211> 1708
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CyaA/E570Q+K860R/AC-

<400> 3

[0017]

Met 1	Gln	Gln	Ser	His 5	Gln	Ala	Gly	Tyr	Ala 10	Asn	Ala	Ala	Asp	Arg 15	Glu
Ser	Gly	Ile	Pro 20	Ala	Ala	Val	Leu	Asp 25	Gly	Ile	Lys	Ala	Val 30	Ala	Lys
Glu	Lys	Asn 35	Ala	Thr	Leu	Met	Phe 40	Arg	Leu	Val	Asn	Pro 45	His	Ser	Thr
Ser	Leu 50	Ile	Ala	Glu	Gly	Val 55	Ala	Thr	Lys	Gly	Leu 60	Gly	Val	His	Ala
Lys 65	Ser	Ser	Asp	Trp	Gly 70	Leu	Gln	Ala	Gly	Tyr 75	Ile	Pro	Val	Asn	Pro 80
Asn	Leu	Ser	Lys	Leu 85	Phe	Gly	Arg	Ala	Pro 90	Glu	Val	Ile	Ala	Arg 95	Ala
Asp	Asn	Asp	Val 100	Asn	Ser	Ser	Leu	Ala 105	His	Gly	His	Thr	Ala 110	Val	Asp
Leu	Thr	Leu 115	Ser	Lys	Glu	Arg	Leu 120	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln 125	Ala	Gly	Leu
Val	Thr 130	Gly	Met	Ala	Asp	Gly 135	Val	Val	Ala	Ser	Asn 140	His	Ala	Gly	Tyr
Glu 145	Gln	Phe	Glu	Phe	Arg 150	Val	Lys	Glu	Thr	Ser 155	Asp	Gly	Arg	Tyr	Ala 160
Val	Gln	Tyr	Arg	Arg 165	Lys	Gly	Gly	Asp	Asp 170	Phe	Glu	Ala	Val	Lys 175	Val
Ile	Gly	Asn 180	Ala	Ala	Gly	Ile	Pro 185	Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Ser 190	Ile	Asp
Met	Phe 195	Ala	Ile	Met	Pro	His	Leu 200	Ser	Asn	Phe	Arg	Asp 205	Ser	Ala	Arg
Ser	Ser 210	Val	Thr	Ser	Gly	Asp 215	Ser	Val	Thr	Asp	Tyr 220	Leu	Ala	Arg	Thr
Arg	Arg	Ala	Ala	Ser	Glu	Ala	Thr	Gly	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Arg	Ile

[0018]

225						230						235						240
Asp	Leu	Leu	Trp	Lys	Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	Ala	Arg	Ser	Ala	Val	Gly			
				245					250					255				
Thr	Glu	Ala	Arg	Arg	Gln	Phe	Arg	Tyr	Asp	Gly	Asp	Met	Asn	Ile	Gly			
			260					265					270					
Val	Ile	Thr	Asp	Phe	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg			
		275					280						285					
Ala	His	Ala	Val	Gly	Ala	Gln	Asp	Val	Val	Gln	His	Gly	Thr	Glu	Gln			
	290					295					300							
Asn	Asn	Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Phe	Val	Val	Ser	Ala			
305					310					315					320			
Thr	Gly	Glu	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Arg	Gly	Gln	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ile			
				325					330					335				
Gly	Gln	Gln	Arg	Gly	Glu	Gly	Tyr	Val	Phe	Tyr	Glu	Asn	Arg	Ala	Tyr			
			340					345					350					
Gly	Val	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Phe	Asp	Asp	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Pro			
		355					360					365						
Gly	Val	Pro	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Phe	Ser	Pro	Asp	Val	Leu	Glu	Thr			
	370					375					380							
Val	Pro	Ala	Ser	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Glu			
385					390					395					400			
Arg	Gln	Asp	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Arg	Ser			
				405					410					415				
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Glu			
			420					425					430					
Leu	Glu	Met	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp			
		435					440						445					
Ala	Glu	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala			
	450					455					460							

[0019]

Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	
465					470					475					480	
Ile	Ala	Leu	Met	Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	
				485					490					495		
Gln	Glu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	
			500					505					510			
Ser	Ser	Ala	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	
		515					520					525				
Arg	Trp	Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	
	530					535					540					
Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	
545					550					555					560	
Ala	Pro	Ala	Gly	Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Gln	
				565					570					575		
Leu	Thr	Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	
			580					585					590			
Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	
		595					600					605				
Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	
	610					615					620					
Ile	Tyr	Gly	Leu	Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	
625					630					635					640	
Leu	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	
				645					650					655		
Ala	Gln	Leu	Tyr	Arg	Asp	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	
			660					665					670			
Val	Ser	Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	
		675					680					685				
Ala	Ala	Ser	Val	Val	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	

[0020]

[0021]

Ile	His	Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	Ala	
930						935					940					
Leu	Gly	Arg	Gln	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	
945					950					955					960	
Asn	Val	Arg	Lys	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Val	
				965					970					975		
Ala	Thr	Gln	Thr	Thr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Arg	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	
			980					985						990		
Arg	His	Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Val	Asp	Thr	
		995					1000					1005				
Leu	Glu	His	Val	Gln	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser		
1010						1015					1020					
Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	His	Asp	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly		
1025						1030					1035					
Asp	Asp	Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Gly		
1040						1045					1050					
Gly	Glu	Gly	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp	Asp	Val		
1055						1060					1065					
Phe	Leu	Gln	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Asp	Gly	Gly		
1070						1075					1080					
Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Asn	Val	His	Gln	Pro	Ser	Glu		
1085						1090					1095					
Glu	Arg	Leu	Glu	Arg	Met	Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	His	Ala	Asp	Leu		
1100						1105					1110					
Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Glu	Lys	Trp	Pro	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Ser		
1115						1120					1125					
Val	Asp	His	Val	Lys	Asn	Ile	Glu	Asn	Leu	His	Gly	Ser	Arg	Leu		
1130						1135					1140					
Asn	Asp	Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Asp	Gln	Asp	Asn	Glu	Leu	Trp	Gly		

[0022]

1145	1150	1155
His Asp Gly Asn Asp Thr Ile Arg Gly Arg Gly Gly Asp Asp Ile 1160 1165 1170		
Leu Arg Gly Gly Leu Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly 1175 1180 1185		
Asn Asp Ile Phe Leu Gln Asp Asp Glu Thr Val Ser Asp Asp Ile 1190 1195 1200		
Asp Gly Gly Ala Gly Leu Asp Thr Val Asp Tyr Ser Ala Met Ile 1205 1210 1215		
His Pro Gly Arg Ile Val Ala Pro His Glu Tyr Gly Phe Gly Ile 1220 1225 1230		
Glu Ala Asp Leu Ser Arg Glu Trp Val Arg Lys Ala Ser Ala Leu 1235 1240 1245		
Gly Val Asp Tyr Tyr Asp Asn Val Arg Asn Val Glu Asn Val Ile 1250 1255 1260		
Gly Thr Ser Met Lys Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gln Ala Asn 1265 1270 1275		
Thr Leu Met Gly Gln Gly Gly Asp Asp Thr Val Arg Gly Gly Asp 1280 1285 1290		
Gly Asp Asp Leu Leu Phe Gly Gly Asp Gly Asn Asp Met Leu Tyr 1295 1300 1305		
Gly Asp Ala Gly Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Gly Leu Gly Asp Asp 1310 1315 1320		
Thr Leu Glu Gly Gly Ala Gly Asn Asp Trp Phe Gly Gln Thr Gln 1325 1330 1335		
Ala Arg Glu His Asp Val Leu Arg Gly Gly Asp Gly Val Asp Thr 1340 1345 1350		
Val Asp Tyr Ser Gln Thr Gly Ala His Ala Gly Ile Ala Ala Gly 1355 1360 1365		

[0023]

Arg Ile 1370	Gly Leu Gly Ile 1375	Leu Ala Asp Leu Gly Ala 1380	Gly Arg Val
Asp Lys 1385	Leu Gly Glu Ala Gly 1390	Ser Ser Ala Tyr Asp 1395	Thr Val Ser
Gly Ile 1400	Glu Asn Val Val Gly 1405	Thr Glu Leu Ala Asp 1410	Arg Ile Thr
Gly Asp 1415	Ala Gln Ala Asn Val 1420	Leu Arg Gly Ala Gly 1425	Gly Ala Asp
Val Leu 1430	Ala Gly Gly Glu Gly 1435	Asp Asp Val Leu Leu 1440	Gly Gly Asp
Gly Asp 1445	Asp Gln Leu Ser Gly 1450	Asp Ala Gly Arg Asp 1455	Arg Leu Tyr
Gly Glu 1460	Ala Gly Asp Asp Trp 1465	Phe Phe Gln Asp Ala 1470	Ala Asn Ala
Gly Asn 1475	Leu Leu Asp Gly Gly 1480	Asp Gly Arg Asp Thr 1485	Val Asp Phe
Ser Gly 1490	Pro Gly Arg Gly Leu 1495	Asp Ala Gly Ala Lys 1500	Gly Val Phe
Leu Ser 1505	Leu Gly Lys Gly Phe 1510	Ala Ser Leu Met Asp 1515	Glu Pro Glu
Thr Ser 1520	Asn Val Leu Arg Asn 1525	Ile Glu Asn Ala Val 1530	Gly Ser Ala
Arg Asp 1535	Asp Val Leu Ile Gly 1540	Asp Ala Gly Ala Asn 1545	Val Leu Asn
Gly Leu 1550	Ala Gly Asn Asp Val 1555	Leu Ser Gly Gly Ala 1560	Gly Asp Asp
Val Leu 1565	Leu Gly Asp Glu Gly 1570	Ser Asp Leu Leu Ser 1575	Gly Asp Ala
Gly Asn	Asp Asp Leu Phe Gly	Gly Gln Gly Asp Asp	Thr Tyr Leu

[0024]

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

58

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

[0026]

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

[0027]

Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser	Ala	Val
		515					520					525			
Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	Ala	Gly
		530				535					540				
Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Ile	Ala
545					550					555					560
Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly
				565					570					575	
Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	Gly	Gly
			580					585					590		
Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg
		595					600					605			
Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala
	610					615					620				
Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr	Gly	Leu
625					630					635					640
Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala	Gln	Glu
				645					650					655	
Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Tyr
			660					665					670		
Arg	Asp	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Val
		675					680					685			
Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Val
	690					695					700				
Val	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Leu
705					710					715					720
Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Gly	Val	Gln	Gln	Pro	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Ala
				725					730					735	
Asn	Asp	Tyr	Ala	Arg	Lys	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	Tyr
			740					745					750		

[0028]

Phe	Glu	Lys	Asn	Leu	Gln	Ala	Arg	His	Glu	Gln	Leu	Ala	Asn	Ser	Asp	
		755					760						765			
Gly	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Gly	Trp	Asn	Ala	Ser	
		770					775					780				
Ser	Val	Ile	Gly	Val	Gln	Thr	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ala	Leu	Glu	
		785				790					795				800	
Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	Asp	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	Asp	Val	
				805						810					815	
Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Val	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Gln	Pro	Val	
			820						825					830		
Val	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ile	Ala	Ser	Arg	Lys	Gly	
		835					840						845			
Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	
		850					855					860				
Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Thr	Gly	Arg	Ser	Glu	Phe	Thr	Thr	Phe	
		865				870					875					880
Val	Glu	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Asp	Arg	Trp	Arg	Ile	Arg	Asp	Gly	Ala	
				885					890						895	
Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Asp	
				900					905						910	
Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Lys	His	Ser	Ile	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Gly	Gly	
		915						920					925			
Asp	Gly	Asp	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Ile	His	Tyr	Asp	
		930					935					940				
Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	Arg	Gln	
		945				950					955					960
Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Asn	Val	Arg	Lys	
				965						970					975	

[0029]

Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Thr	Gln	Thr
			980					985					990		
Thr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Arg	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	Arg	His	Val	Glu
		995					1000					1005			
Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Glu	His	
	1010					1015					1020				
Val	Gln	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	
	1025					1030					1035				
Asn	Ala	His	Asp	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Asp	Arg	
	1040					1045					1050				
Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Gly	Gly	Glu	Gly	
	1055					1060					1065				
Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Leu	Gln	
	1070					1075					1080				
Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	
	1085					1090					1095				
Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Asn	Val	His	Gln	Pro	Ser	Glu	Glu	Arg	Leu	
	1100					1105					1110				
Glu	Arg	Met	Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	His	Ala	Asp	Leu	Gln	Lys	Gly	
	1115					1120					1125				
Thr	Val	Glu	Lys	Trp	Pro	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Ser	Val	Asp	His	
	1130					1135					1140				
Val	Lys	Asn	Ile	Glu	Asn	Leu	His	Gly	Ser	Arg	Leu	Asn	Asp	Arg	
	1145					1150					1155				
Ile	Ala	Gly	Asp	Asp	Gln	Asp	Asn	Glu	Leu	Trp	Gly	His	Asp	Gly	
	1160					1165					1170				
Asn	Asp	Thr	Ile	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Asp	Asp	Ile	Leu	Arg	Gly	
	1175					1180					1185				
Gly	Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu	Tyr	Gly	Glu	Asp	Gly	Asn	Asp	Ile	
	1190					1195					1200				

[0030]

Phe 1205	Leu	Gln	Asp	Asp	Glu	Thr	Val	Ser	Asp	Asp	Ile 1215	Asp	Gly	Gly
Ala 1220	Gly	Leu	Asp	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Ala	Met	Ile 1230	His	Pro	Gly
Arg 1235	Ile	Val	Ala	Pro	His	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ile 1245	Glu	Ala	Asp
Leu 1250	Ser	Arg	Glu	Trp	Val	Arg	Lys	Ala	Ser	Ala	Leu 1260	Gly	Val	Asp
Tyr 1265	Tyr	Asp	Asn	Val	Arg	Asn	Val	Glu	Asn	Val	Ile 1275	Gly	Thr	Ser
Met 1280	Lys	Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Gln	Ala	Asn 1290	Thr	Leu	Met
Gly 1295	Gln	Gly	Gly	Asp	Asp	Thr	Val	Arg	Gly	Gly	Asp 1305	Gly	Asp	Asp
Leu 1310	Leu	Phe	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	Asp	Met	Leu	Tyr 1320	Gly	Asp	Ala
Gly 1325	Asn	Asp	Thr	Leu	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Asp 1335	Thr	Leu	Glu
Gly 1340	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Gly	Gln	Thr	Gln 1350	Ala	Arg	Glu
His 1355	Asp	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Thr 1365	Val	Asp	Tyr
Ser 1370	Gln	Thr	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly 1380	Arg	Ile	Gly
Leu 1385	Gly	Ile	Leu	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Val 1395	Asp	Lys	Leu
Gly 1400	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Tyr	Asp	Thr	Val	Ser 1410	Gly	Ile	Glu

[0031]

Asn Val 1415	Val Gly Thr Glu Leu 1420	Ala Asp Arg Ile Thr 1425	Gly Asp Ala
Gln Ala 1430	Asn Val Leu Arg Gly 1435	Ala Gly Gly Ala Asp 1440	Val Leu Ala
Gly Gly 1445	Glu Gly Asp Asp Val 1450	Leu Leu Gly Gly Asp 1455	Gly Asp Asp
Gln Leu 1460	Ser Gly Asp Ala Gly 1465	Arg Asp Arg Leu Tyr 1470	Gly Glu Ala
Gly Asp 1475	Asp Trp Phe Phe Gln 1480	Asp Ala Ala Asn Ala 1485	Gly Asn Leu
Leu Asp 1490	Gly Gly Asp Gly Arg 1495	Asp Thr Val Asp Phe 1500	Ser Gly Pro
Gly Arg 1505	Gly Leu Asp Ala Gly 1510	Ala Lys Gly Val Phe 1515	Leu Ser Leu
Gly Lys 1520	Gly Phe Ala Ser Leu 1525	Met Asp Glu Pro Glu 1530	Thr Ser Asn
Val Leu 1535	Arg Asn Ile Glu Asn 1540	Ala Val Gly Ser Ala 1545	Arg Asp Asp
Val Leu 1550	Ile Gly Asp Ala Gly 1555	Ala Asn Val Leu Asn 1560	Gly Leu Ala
Gly Asn 1565	Asp Val Leu Ser Gly 1570	Gly Ala Gly Asp Asp 1575	Val Leu Leu
Gly Asp 1580	Glu Gly Ser Asp Leu 1585	Leu Ser Gly Asp Ala 1590	Gly Asn Asp
Asp Leu 1595	Phe Gly Gly Gln Gly 1600	Asp Asp Thr Tyr Leu 1605	Phe Gly Val
Gly Tyr 1610	Gly His Asp Thr Ile 1615	Tyr Glu Ser Gly Gly 1620	Gly His Asp
Thr Ile 1625	Arg Ile Asn Ala Gly 1630	Ala Asp Gln Leu Trp 1635	Phe Ala Arg

[0032]

Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asp Asp Ala
1640 1645 1650

Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His Arg Val Glu
1655 1660 1665

Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala Gly Ile Glu
1670 1675 1680

Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro Gly Ala Ala
1685 1690 1695

Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr Leu Met Gln
1700 1705 1710

Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
1715 1720

<210> 5
<211> 8825
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> QR AC-

<400> 5
cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60
gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga 120
gtagctcac tcattaggca cccagggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt 180
gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgacat gattacgaat 240
ttaatacgc tcactatagg gaaagctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag 300
atatacatat gcttccgtcc gcccaagcgc cctccctcct caatcccacc gacgacttcg 360
cggcactggg caatattgcc tggtgtgga tgaactctcc catgcaccgc gactggccgg 420
tgcattctgt cgacgcgaac acgctcgcgc cgattcaact gggccaatac attctgctgc 480
gatgcaatga cgtgccggtt gcatactgca gctgggccct aatggacgcc gacaccgaac 540
tctcctatgt catggcgccc tcgtcgctgg gcgggaatgc ctggaactgc ggcgaccgac 600
tgtggatcat cgactggatc gcgccattct cgcgcgacga caatcgtgcg ctgcgccgcg 660

[0033]

cgctggccga acggcacccc gacagcgtgg gccgttcgct gcgcgttcgg cgcggcggcg	720
acaccgcgcg cgtcaaggag taccgaggcc gcgcgctgga cgcggccgcc actcgcgcgc	780
agctggaccg ctaccatgcc gaactgatcg caggactgcg cgcgagcaac ggcggatacg	840
cgccgcgagg ccggggcacc gcctaaggat cctctagagc ttgcatgcc ttggcacgaca	900
ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc	960
attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga	1020
gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatgc agcaatcgca tcaggctggt	1080
tacgcaaacg ccgccgaccg ggagtctggc atccccgcag ccgtactcga tggcatcaag	1140
gccgtggcga aggaaaaaaa cgccacattg atgttccgcc tggtaacccc ccattccacc	1200
agcctgattg ccgaaggggt ggccaccaa ggattgggcg tgcacgcaa gtcgtccgat	1260
tgggggttgc aggcgggcta cattcccgtc aaccggaatc tttccaaact gttcggccgt	1320
gcgcccgagg tgatcgcgcg ggccgacaac gacgtcaaca gcagcctggc gcatggccat	1380
accgcggtcg acctgacgct gtcgaaagag cggcttgact atctgcggca agcgggcctg	1440
gtcaccggca tggccgatgg cgtggtcgcg agcaaccacg caggctacga gcagttcgag	1500
tttcgcgtga aggaaacctc ggacggggcg tatgccgtgc agtatcgccg caagggcggc	1560
gacgatttcg aggcgggtcaa ggtgatcggc aatgccgccg gtattccact gacggcggat	1620
ggatccatcg acatgttcgc cattatgccg catctgtcca acttccgca ctcggcgcgc	1680
agttcgggtga ccagcggcga ttcggtgacc gattacctgg cgcgcacgcg gcgggccgcc	1740
agcgaggcca cgggcggtgt acacctggat cgcgaacgca tcgacttggt gtggaaaatc	1800
gctcgcgcgg gcgcccgttc cgcagtgggc accgagggcg gtcgccagtt ccgctacgac	1860
ggcgacatga atatcggcgt gatcaccgat ttcgagctgg aagtgcgcaa tgcgctgaac	1920
aggcggggcg acgccgtcgg cgcgcaggac gtggtccagc atggcactga gcagaacaat	1980
cctttcccgg aggcagatga gaagattttc gtcgtatcgg ccaccggtga aagccagatg	2040
ctcacgcgcg ggcaactgaa ggaatacatt ggccagcagc gcggcgaggg ctatgtcttc	2100
tacgagaacc gtgcatacgg cgtggcgggg aaaagcctgt tcgacgatgg gctgggagcc	2160
gcgcccggcg tgccgagcgg acgttcgaag ttctcgccgg atgtactgga aacggtgccg	2220
gcgtcacccg gattgcggcg gccgtcgctg ggcgcagtgg aacgccagga ttccggctat	2280
gacagccttg atgggggtgg atcgcgatcg ttctcgttgg gcgaggtgtc cgacatggcc	2340
gccgtggaag cggcggaact ggaaatgacc cggcaagtct tgcacgccgg ggcgcggcag	2400

[0034]

gacgatgccg agccggggcgt gagcggtgcg tcggcgact gggggcagcg ggcgctgcag	2460
ggcgcccagg cggtggcggc ggcgcagcgg ctggttcag ccattgccct gatgacgcaa	2520
ttcgggccgg ccggttccac caacacgccg caggaagcgg cctcgttgtc ggcggccgtg	2580
ttcggtttgg gcgaggccag cagcgccgtg gccgaaaccg tgagcggttt tttccgcggg	2640
tcttcgcgct gggccggcgg tttcggcgtg gctggcgggc cgatggcgct gggaggcggc	2700
atcgccgcgg ccgttggcgc cgggatgtcg ttgaccgatg acgcgcggc cggacagaag	2760
gccgcccgg gagctccgat cgcgctgcag ttaacgggtg gaacggtcga gctggcttct	2820
tccatcgctg tggcgctggc cgcggcgccg ggcgtgacca gcggcttgca ggtggccggg	2880
gcgtcgccg gggcggtgc cggcgcttg gccgcggcg tcagtcccat ggagatctac	2940
ggcctggtgc agcaatcgca ctatgcggat cagctggaca agctggcgca ggaatcgagc	3000
gcatacggtt acgagggcga cgccttgctg gccagctgt atcgcgacaa gacggccgcc	3060
gagggcgccg tcgccggcgt ctccgccgtc ctgagcacgg tggggcgggc ggtgtcgatc	3120
gccgcggcgg ccagcgtggt aggggccccg gtggcggtgg tcaactcctt gctgaccggg	3180
gctctcaacg gcatacctgc cggcgctgcag cagcccatca tcgaaaagct ggccaacgat	3240
tacgctcgca agatcgacga gctgggcggg ccgcaagcgt acttcgagaa aaacctgcag	3300
gcgcgtcacg aacaactggc caattcggac ggcctacgga aaatgctggc cgacctgcag	3360
gccggttggg acgccagcag cgtgatcggg gtgcagacga cagagatctc caagtcggcg	3420
ctcgaactgg ccgccattac cggcaacgcg gacaacctga aatccgtcga cgtgttcgtg	3480
gaccgcttcg tccagggcga gggggtggc ggccagccgg tggtcctcga cgtcgccgcc	3540
ggcgcatcg atatcgccag ccgcaagggc gagcgccgg cgctgacgtt catcacgccg	3600
ctggccgcgc caggagaaga gcagcgccg cgcacgaaaa cgggcagatc tgaattcacc	3660
acattcgtcg agatcgtggg caagcaggac cgctggcgca tccgggacgg cgcggccgac	3720
accaccatcg atctggccaa ggtggtgtcg caactggtcg acgccaatgg cgtgctcaag	3780
cacagcatca aactggatgt gatcggcgga gatggcgatg acgtcgtgct tgccaatgct	3840
tcgcgcatcc attatgacgg cggcgcgggc accaacacgg tcagctatgc cgccctgggt	3900
cgacaggatt ccattaccgt gtccgcccgc ggggaacgtt tcaacgtgcg caagcagttg	3960
aacaacgcca acgtgtatcg cgaaggcgtg gctaccaga caaccgccta cggcaagcgc	4020
acggagaatg tccaataccg ccatgtcgag ctggcccgtg tcgggcaagt ggtggaggtc	4080
gacacgctcg agcatgtgca gcacatcatc ggcggggccg gcaacgattc gatcaccggc	4140

[0035]

aatgcgcacg	acaacttcct	agccggcggg	tcgggcgacg	acaggctgga	tggcggcgcc	4200
ggcaacgaca	ccctggttgg	cggcgagggc	caaaacacgg	tcacgggcgg	cgccggcgac	4260
gacgtattcc	tgcaggacct	gggggtatgg	agcaaccagc	tcgatggcgg	cgcgggcgtc	4320
gataccgtga	agtacaacgt	gcaccagcct	tccgaggagc	gcctcgaacg	catgggcgac	4380
acgggcatcc	atgccgatct	tcaaaagggc	acggctcgaga	agtggccggc	cctgaacctg	4440
ttcagcgctg	accatgtcaa	gaatatcgag	aatctgcacg	gctccgcct	aaacgaccgc	4500
atcgccggcg	acgaccagga	caacgagctc	tggggccacg	atggcaacga	cacgatacgc	4560
ggccggggcg	gcgacgacat	cctgcgcggc	ggcctggggc	tggacacgct	gtatggcgag	4620
gacggcaacg	acatcttcct	gcaggacgac	gagaccgtca	gcgatgacat	cgacggcggc	4680
gcggggctgg	acaccgtcga	ctactccgcc	atgatccatc	caggcaggat	cgttgcgccg	4740
catgaatacg	gcttcgggat	cgaggcggac	ctgtccaggg	aatgggtgcg	caaggcgctc	4800
gcgctgggcg	tggactatta	cgataatgtc	cgcaatgtcg	aaaacgtcat	cggtacgagc	4860
atgaaggatg	tgtcatcgg	cgacgcgcaa	gccaatacc	tgatgggcca	ggcgggcgac	4920
gataccgtgc	gcggcggcga	cggcgatgat	ctgctgttcg	gcggcgacgg	caacgacatg	4980
ctgtatggcg	acgccggcaa	cgacaccctc	tacggggggc	tgggcgacga	tacccttgaa	5040
ggcggcgcgg	gcaacgattg	gttcggccag	acgcaggcgc	gcgagcatga	cgtgctgcgc	5100
ggcgagatg	gggtggatac	cgtcgattac	agccagaccg	gcgcgcatgc	cggcattgcc	5160
gcgggtcgca	tcgggctggg	catcctggct	gacctgggcg	ccggccgcgt	cgacaagctg	5220
ggcgaggccg	gcagcagcgc	ctacgatacg	gtttccggta	tcgagaacgt	ggtgggcacg	5280
gaactggccg	accgcatcac	gggcgatgcg	caggccaacg	tgctgcgcgg	cgcgggtggc	5340
gccgacgtgc	ttgcgggcgg	cgagggcgac	gatgtgctgc	tgggcggcga	cggcgacgac	5400
cagctgtcgg	gcgacgcggg	acgcgatcgc	ttgtacggcg	aagccggtga	cgactggttc	5460
ttccaggatg	ccgccaatgc	cggcaatctg	ctcgacggcg	gcgacggccg	cgataccgtg	5520
gatttcagcg	gcccgggccc	gggcctcgac	gccggcgcaa	agggcgtatt	cctgagcttg	5580
ggcaaggggt	tcgccagcct	gatggacgaa	ccgaaacca	gcaacgtgtt	gcgcaatatc	5640
gagaacgccg	tgggcagcgc	gcgtgatgac	gtgctgatcg	gcgacgcagg	cgccaacgtc	5700
ctcaatggcc	tggcgggcaa	cgacgtgctg	tccggcgggc	ctggcgacga	tgtgctgctg	5760
ggcgacgagg	gctcggacct	gctcagcggc	gatgcgggca	acgacgatct	gttcggcggg	5820
cagggcgatg	atacttatct	gttcggggtc	gggtacgggc	acgacacgat	ctacgaatcg	5880

[0036]

ggcggcggcc	atgacaccat	ccgcatcaac	gcgggggcgg	accagctgtg	gttcgcgcgc	5940
cagggcaacg	acctggagat	ccgcattctc	ggcaccgacg	atgcacttac	cgtgcacgac	6000
tggatatcgcg	acgccgatca	ccgggtggaa	atcatccatg	ccgccaacca	ggcggtagac	6060
caggcaggca	tcgaaaagct	ggtcgaggca	atggcgcagt	atccggaccc	cggcgcggcg	6120
gcggctgccc	cgccggcggc	gcgcgtgccg	gacacgctga	tgcagtcctt	ggctgtcaac	6180
tggcgtgaa	gcgccgtgaa	tcacggcccg	cctgcctcgc	gcggcggcgc	cgtctctttg	6240
cgttcttctc	cgaggatatt	cccatcatga	attcactggc	cgtcgtttta	caacgtcgtg	6300
actgggaaaa	ccctggcggt	acccaactta	atcgccttgc	agcacatccc	cctttcgcca	6360
gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	atcgcccttc	ccaacagttg	cgcagcctga	6420
atggcgaatg	ggaaattgta	aacgttaata	ttttgttaat	attttgttaa	aattcgcggt	6480
aaatttttgt	taaatcagct	cattttttta	ccaataggcc	gaaatcggca	aaatccctta	6540
taaatcaaaa	gaatagaccg	agataggggt	gagtgttggt	ccagtttgga	acaagagtcc	6600
actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	agggcgaaaa	accgtctatc	agggcgatgg	6660
cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacaag	ttttttgggg	tcgaggtgcc	gtaaagcact	6720
aaatcggaac	cctaaaggga	tgccccgatt	tagagcttga	cggggaaagc	cggcgaacgt	6780
ggcgagaaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	agcgggcgct	agggcgctgg	caagtgtagc	6840
ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacaccgcg	cgcgcttaat	gcgccgtac	agggcgcgtc	6900
aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctattt	tgtttatttt	tctaaataca	6960
ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	7020
aaggaagagt	atgagtattc	aacattttccg	tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	7080
ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	7140
gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaaact	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	7200
ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	tatgtggcgc	7260
ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggc	cgccgcatc	actattctca	7320
gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	gcatgacagt	7380
aagagaatta	tgcagtgctg	ccataaccat	gagtgataac	actgcggcca	acttacttct	7440
gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	gggatcatgt	7500
aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	acgagcgtga	7560
caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	gcgaactact	7620

[0037]

tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcgataaag ttgcaggacc	7680
acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga	7740
gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt	7800
agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga	7860
gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact	7920
ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga	7980
taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt	8040
agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca	8100
aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct	8160
ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg	8220
gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct	8280
aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc	8340
aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca	8400
gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga	8460
aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg	8520
aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt	8580
cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag	8640
cctatgga aaacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggcctttt gctggccttt	8700
tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt	8760
tgagtgagct gataaccgct gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga	8820
ggaag	8825

<210> 6

<211> 8855

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> OVA QR AC-

<400> 6

cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60

gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga 120

gtagctcac tcattaggca cccaggtt tacactttat gttccggct cgtatgttgt 180

[0038]

gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	gattacgaat	240
ttaatacgac	tcactatagg	gaaagctcta	gaaataatth	tgtttaactt	taagaaggag	300
atatacatat	gcttccgtcc	gcccagcgcc	cctccctcct	caatcccacc	gacgacttcg	360
cggcactggg	caatattgcc	tggctgtgga	tgaactctcc	catgcaccgc	gactggccgg	420
tgcactctgt	cgcacgcaac	acgctcgcgc	cgattcaact	ggccaatac	attctgtctc	480
gatgcaatga	cgtgccgggt	gcatactgca	gctggggcct	aatggacgcc	gacaccgaac	540
tctcctatgt	catggcgccc	tcgtcgtctg	gcgggaatgc	ctggaactgc	ggcgaccgac	600
tgtggatcat	cgactggatc	gcgccattct	cgcgcgacga	caatcgtgcg	ctgcgccgcg	660
cgctggccga	acggcacccc	gacagcgtgg	gccgttcgct	gcgcgttcgg	cgcgggcgcg	720
acaccgcgcg	cgtcaaggag	taccgaggcc	gcgcgctgga	cgcgcccgcc	actcgcgcgc	780
agctggaccg	ctaccatgcc	gaactgatcg	caggactgcg	cgcgagcaac	ggcggatacg	840
cgcgcgaggg	ccggggcacc	gcctaaggat	cctctagagc	ttgcatgccc	tggcacgaca	900
ggtttcccga	ctggaaagcg	ggcagtgagc	gcaacgcaat	taatgtgagt	tagctcactc	960
attaggcacc	ccaggcttta	cactttatgc	ttccggctcg	tatgttgtgt	ggaattgtga	1020
gcggataaca	atttcacaca	ggaaacagct	atgaccatgc	agcaatcgca	tcaggctggg	1080
tacgcaaacc	ccgccgaccg	ggagtctggc	atccccgcag	ccgtactcga	tggcatcaag	1140
gccgtggcga	aggaaaaaaa	cgccacattg	atgttccgcc	tggtaacccc	ccattccacc	1200
agcctgattg	ccgaaggggg	ggccaccaaa	ggattggggc	tgcacgcaa	gtcgtccgat	1260
tgggggttgc	aggcgggcta	cattcccgtc	aaccgaatc	ttccaaact	gttcggccgt	1320
gcgcccaggg	tgatcgcgcg	ggccgacaac	gacgtcaaca	gcagcctggc	gcatggccat	1380
accgcggtcg	acctgacgct	gtcgaaagag	cggcttgact	atctgcggca	agcgggcctg	1440
gtcaccggca	tggccgatgg	cgtggctcgc	agcaaccacg	caggctacga	gcagttcgag	1500
tttcgctga	aggaaacctc	ggacggggcg	tatgccgtgc	agtatcgccg	caagggcggc	1560
gacgatttcg	aggcgggtcaa	ggtgatcggc	aatgccgccg	gtattccact	gacggcggat	1620
ggatccatcg	acatgttcgc	cattatgccg	catctgtcca	acttcgcgca	ctcggcgcgcc	1680
agttcgggtga	ccagcggcga	ttcgggtgacc	gattacctgg	cgcgcacgcg	gcgggcccgc	1740
agcgaggcca	cgggcgggtgt	actctcaata	attaatttcg	aaaagcttgt	acacctggat	1800
cgcgaacgca	tcgacttggt	gtggaaaatc	gctcgcgccg	gcgcccgttc	cgcagtgggc	1860
accgaggcgc	gtcgccagtt	ccgctacgac	ggcgacatga	atatcggcgt	gatcaccgat	1920

[0039]

ttcgagctgg	aagtgcgcaa	tgcgctgaac	aggcgggccc	acgccgtcgg	cgcgcaggac	1980
gtgggtccagc	atggcactga	gcagaacaat	cctttcccg	aggcagatga	gaagattttc	2040
gtcgtatcgg	ccaccggtga	aagccagatg	ctcacgcgcg	ggcaactgaa	ggaatacatt	2100
ggccagcagc	gcggcgaggg	ctatgtcttc	tacgagaacc	gtgcatacgg	cgtggcgggg	2160
aaaagcctgt	tcgacgatgg	gctgggagcc	gcgcccggcg	tgccgagcgg	acgttcgaag	2220
ttctcgccgg	atgtactgga	aacgggtgcc	gcgtcaccgc	gattgcggcg	gccgtcgtcg	2280
ggcgagctgg	aacgccagga	ttccggctat	gacagccttg	atgggggtggg	atcgcgatcg	2340
ttctcggttg	gcgaggtgtc	cgacatggcc	gccgtggaag	cggcggaact	ggaaatgacc	2400
cggcaagtct	tgcacgccgg	ggcgcgccag	gacgatgccg	agccgggctg	gagcgggtgcg	2460
tcggcgcaact	gggggcagcg	ggcgctgcag	ggcgcccagg	cgggtggcggc	ggcgagcggg	2520
ctggttcatg	ccattgccct	gatgacgcaa	ttcggccggg	ccggttccac	caacacgccg	2580
caggaagcgg	cctcggtgtc	ggcgcccggtg	ttcggcttgg	gcgaggccag	cagcgccgtg	2640
gccgaaaccg	tgagcggttt	tttcgcggg	tcttcgcgct	gggcccggcg	tttcggcggtg	2700
gctggcgggc	cgatggcgct	gggagggcggc	atcgccgcgg	ccgttgggcg	cgggatgtcg	2760
ttgaccgatg	acgcgccggc	cggacagaag	gccgccgccg	gagctccgat	cgcgctgcag	2820
ttaacgggtg	gaacgggtcg	gctggcttct	tccatcgctg	tggcgctggc	cgcggcgcg	2880
ggcgtagacca	gcggcttgca	ggtggccggg	gcgtcggccg	gggcccgtgc	cggcgcatctg	2940
gccgcggcg	tcagtcccat	ggagatctac	ggcctggtgc	agcaatcgca	ctatgcggat	3000
cagctggaca	agctggcgca	ggaatcgagc	gcatacgggt	acgagggcga	cgccttgctg	3060
gcccagctgt	atcgcgacaa	gacggccgcc	gagggcgccg	tcgccggcgt	ctccgccgtc	3120
ctgagcacgg	tgggggcggc	ggtgtcgatc	gccgcggcgg	ccagcgtggg	aggggccccg	3180
gtggcggttg	tcacttcctt	gctgaccggg	gctctcaacg	gcatacctgcg	cggcggtgcag	3240
cagcccatca	tcgaaaagct	ggccaacgat	tacgctcgca	agatcgacga	gctgggcggg	3300
ccgcaagcgt	acttcgagaa	aaacctgcag	gcgcgtcacg	aacaactggc	caattcggac	3360
ggcctacgga	aaatgctggc	cgacctgcag	gccggttgga	acgccagcag	cgtgatcggg	3420
gtgcagacga	cagagatctc	caagtcggcg	ctcgaactgg	ccgccattac	cggcaacgcg	3480
gacaacctga	aatccgtcg	cgtgttcgtg	gaccgcttcg	tccagggcga	gcgggtggcc	3540
ggccagccgg	tggtcctcg	cgtcgccgcc	ggcgccatcg	atatcgccag	ccgcaagggc	3600
gagcggccgg	cgctgacgtt	catcacgccg	ctggccgcgc	caggagaaga	gcagcgccgg	3660

[0040]

cgcacgaaaa	cgggcagatc	tgaattcacc	acattcgtcg	agatcgtggg	caagcaggac	3720
cgctggcgca	tccgggacgg	cgcggccgac	accaccatcg	atctggccaa	ggtggtgtcg	3780
caactgggtcg	acgccaatgg	cgtgctcaag	cacagcatca	aactggatgt	gatcggcgga	3840
gatggcgatg	acgtcgtgct	tgccaatgct	tcgcgcatcc	attatgacgg	cggcgcgggc	3900
accaacacgg	tcagctatgc	cgccctgggt	cgacaggatt	ccattaccgt	gtccgccgac	3960
ggggaacgtt	tcaacgtgcg	caagcagttg	aacaacgcca	acgtgtatcg	cgaaggcgtg	4020
gctacccaga	caaccgccta	cggcaagcgc	acggagaatg	tccaataaccg	ccatgtcgag	4080
ctggcccgtg	tcgggcaagt	ggtggaggtc	gacacgctcg	agcatgtgca	gcacatcatc	4140
ggcggggccg	gcaacgattc	gatcaccggc	aatgcgcacg	acaacttcct	agccggcggg	4200
tcgggcgacg	acaggctgga	tggcgggcgc	ggcaacgaca	ccctggttgg	cggcgagggc	4260
caaaacacgg	tcatcggcgg	cgcgggcgac	gacgtattcc	tgcaggacct	gggggtatgg	4320
agcaaccagc	tcgatggcgg	cgcggggcgc	gataccgtga	agtacaacgt	gcaccagcct	4380
tccgaggagc	gcctcgaacg	catgggcgac	acgggcatcc	atgccgatct	tcaaaagggc	4440
acggtcgaga	agtggccggc	cctgaacctg	ttcagcgtcg	accatgtcaa	gaatatcgag	4500
aatctgcacg	gctccgcctt	aaacgaccgc	atcgccggcg	acgaccagga	caacgagctc	4560
tggggccacg	atggcaacga	cacgatacgc	ggccggggcg	gcgacgacat	cctgcgcggc	4620
ggcctggggc	tggacacgct	gtatggcgag	gacggcaacg	acatcttcct	gcaggacgac	4680
gagaccgtca	gcgatgacat	cgacggcggc	gcggggctgg	acaccgtcga	ctactccgcc	4740
atgatccatc	caggcaggat	cgttgcgccg	catgaatacg	gcttcgggat	cgaggcggac	4800
ctgtccaggg	aatgggtgcg	caaggcgtcc	gcgctggggc	tggactatta	cgataatgtc	4860
cgcaatgtcg	aaaacgtcat	cggtagcagc	atgaaggatg	tgctcatcgg	cgacgcgcaa	4920
gccaataccc	tgatgggcca	gggcgggcgc	gataccgtgc	gcggcggcga	cggcgatgat	4980
ctgctgttcg	gcggcgacgg	caacgacatg	ctgtatggcg	acgccggcaa	cgacaccctc	5040
tacggggggc	tgggcgacga	tacccttgaa	ggcggcgcg	gcaacgattg	gttcggccag	5100
acgcaggcgc	gcgagcatga	cgtgctgcgc	ggcgagatg	gggtggatac	cgtcgattac	5160
agccagaccg	gcgcgcatgc	cggcattgcc	gcgggtcgca	tcgggctggg	catcctggct	5220
gacctgggcg	ccggccgcgt	cgacaagctg	ggcgaggccg	gcagcagcgc	ctacgatacg	5280
gtttccggta	tcgagaacgt	ggtgggcacg	gaactggccg	accgcatac	gggcgatgcg	5340
caggccaacg	tgctgcgcgg	cgcgggtggc	gccgacgtgc	ttgcgggcgg	cgagggcgac	5400

[0041]

gatgtgctgc	tgggcggcga	cggcgacgac	cagctgtcgg	gcgacgccgg	acgcgatcgc	5460
ttgtacggcg	aagccggtga	cgactggttc	ttccaggatg	ccgccaatgc	cggcaatctg	5520
ctcgacggcg	gcgacggccg	cgataccgtg	gatttcagcg	gcccgggccg	gggcctcgac	5580
gccggcgcaa	agggcggtatt	cctgagcttg	ggcaaggggt	tcgccagcct	gatggacgaa	5640
cccgaaccca	gcaacgtggt	gcgcaatatc	gagaacgccg	tgggcagcgc	gcgtgatgac	5700
gtgctgatcg	gcgacgcagg	cgccaacgtc	ctcaatggcc	tggcgggcaa	cgacgtgctg	5760
tccggcggcg	ctggcgacga	tgtgctgctg	ggcgacgagg	gctcggacct	gctcagcggc	5820
gatgcgggca	acgacgatct	gttcggcggg	cagggcgatg	atacttatct	gttcggggtc	5880
gggtacgggc	acgacacgat	ctacgaatcg	ggcggcggcc	atgacaccat	ccgcatcaac	5940
gcggggcgcg	accagctgtg	gttcgcgcgc	cagggcaacg	acctggagat	ccgcattctc	6000
ggcaccgacg	atgcacttac	cgtgcacgac	tggtatcgcg	acgccgatca	ccgggtggaa	6060
atcatccatg	ccgccaacca	ggcggtagac	caggcaggca	tcgaaaagct	ggtcgaggca	6120
atggcgcagt	atccggaccc	cggcgcgggc	gcggctgccc	cgccggcggc	gcgcgtgccg	6180
gacacgctga	tgcagtccct	ggctgtcaac	tggcgctgaa	gcgccgtgaa	tcacggcccg	6240
cctgcctcgc	gcggcgggcg	cgtctctttg	cgttcttctc	cgaggtatct	cccatcatga	6300
attcactggc	cgctcgttta	caacgtcgctg	actgggaaaa	ccctggcggt	acccaactta	6360
atcgcccttg	agcacatccc	cctttcgcca	gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	6420
atcgcccttc	ccaacagttg	cgcagcctga	atggcgaatg	ggaaattgta	aacgttaata	6480
ttttgttaat	attttgttaa	aattcgcggt	aaatttttgt	taaatcagct	cattttttaa	6540
ccaataggcc	gaaatcgga	aaatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	agatagggtt	6600
gagtgttggt	ccagtttgga	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	6660
agggcgaaaa	accgtctatc	agggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacaag	6720
ttttttgggg	tcgaggtgcc	gtaaagcact	aaatcggaac	cctaaaggga	tgccccgatt	6780
tagagcttga	cggggaaagc	cggcgaaacgt	ggcgagaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	6840
agcgggcgct	agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacacccgc	6900
cgcgcttaat	gcgccgtac	agggcgcgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	6960
aacccttatt	tgtttatctt	tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	7020
accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	7080
tgctgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaac	7140

[0042]

gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact	7200
ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat	7260
gagcactttt aaagtctctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga	7320
gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac	7380
agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat	7440
gagtataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac	7500
cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct	7560
gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac	7620
gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga	7680
ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg	7740
gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact	7800
ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac	7860
tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgc tcactgatta agcattggta	7920
actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt	7980
taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga	8040
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc	8100
tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt	8160
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc	8220
gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc	8280
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg	8340
cgataagtgc tgtcttaccg gggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg	8400
gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga	8460
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc	8520
ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg	8580
gggaaacgcc tggatatctt atagtctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg	8640
atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt	8700
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc	8760
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg	8820
aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaag	8855

[0043]

<210> 7
<211> 1706
<212> PRT
<213> 副百日咳博德特氏菌

<400> 7

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

Ser Leu Ile Ala Glu Gly Val Ala Thr Lys Gly Leu Gly Val His Ala
50 55 60

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
115 120 125

Val Thr Gly Met Ala Asp Gly Val Val Ala Ser Asn His Ala Gly Tyr
130 135 140

Glu Gln Phe Glu Phe Arg Val Lys Glu Thr Ser Asp Gly Arg Tyr Ala
145 150 155 160

Val Gln Tyr Arg Arg Lys Gly Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Lys Val
165 170 175

Ile Gly Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Asp Ile Asp Met Phe
180 185 190

[0044]

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

[0045]

Met	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Ala	Glu	
		435					440				445				
Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln
	450					455					460				
Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	Ile	Ala
465					470					475					480
Leu	Met	Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	Gln	Glu
				485					490					495	
Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser
			500					505					510		
Ala	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp
		515					520					525			
Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly
	530					535					540				
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro
545					550					555					560
Ala	Gly	Gln	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr
				565					570					575	
Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala
			580					585					590		
Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly
		595					600					605			
Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr
	610					615					620				
Gly	Leu	Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala
625					630					635					640
Gln	Glu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln
				645					650					655	

[0046]

Leu	Tyr	Arg	Asp	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Ser	660	665	670	
Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	675	680	685	
Ser	Val	Val	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly	690	695	700	
Ala	Leu	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Gly	Val	Gln	Gln	Pro	Ile	Ile	Glu	Lys	705	710	715	720
Leu	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ala	Arg	Lys	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Gln	725	730	735	
Ala	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asn	Leu	Gln	Ala	Arg	His	Glu	Gln	Leu	Ala	Asn	740	745	750	
Ser	Asp	Gly	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Gly	Trp	Asn	755	760	765	
Ala	Ser	Ser	Val	Ile	Gly	Val	Gln	Thr	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ala	770	775	780	
Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	Asp	Asn	Leu	Lys	Ser	Ala	785	790	795	800
Asp	Val	Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Ile	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Gln	805	810	815	
Pro	Val	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ile	Ala	Ser	Arg	820	825	830	
Lys	Gly	Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	835	840	845	
Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	850	855	860	
Thr	Phe	Val	Glu	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Asp	Arg	Trp	Arg	Ile	Arg	Asp	865	870	875	880
Gly	Ala	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu	885	890	895	

[0047]

Val Asp Ala Asn Gly Val Leu Lys His Ser Ile Lys Leu Glu Val Ile		
900	905	910
Gly Gly Asp Gly Asp Asp Val Val Leu Ala Asn Ala Ser Arg Ile His		
915	920	925
Tyr Asp Gly Gly Ala Gly Thr Asn Thr Val Ser Tyr Ala Ala Leu Gly		
930	935	940
Arg Gln Asp Ser Ile Thr Val Ser Ala Asp Gly Glu Arg Phe Asn Val		
945	950	955 960
Arg Lys Gln Leu Asn Asn Ala Asn Val Tyr Arg Glu Gly Val Ala Thr		
965	970	975
Gln Lys Thr Ala Tyr Gly Lys Arg Thr Glu Asn Val Gln Tyr Arg His		
980	985	990
Val Glu Leu Ala Arg Val Gly Gln Leu Val Glu Val Asp Thr Leu Glu		
995	1000	1005
His Val Gln His Ile Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asp Ser Ile Thr		
1010	1015	1020
Gly Asn Ala His Asp Asn Phe Leu Ala Gly Gly Ala Gly Asp Asp		
1025	1030	1035
Arg Leu Asp Gly Gly Ala Gly Asn Asp Thr Leu Val Gly Gly Glu		
1040	1045	1050
Gly His Asn Thr Val Val Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Phe Leu		
1055	1060	1065
Gln Asp Leu Gly Val Trp Ser Asn Gln Leu Asp Gly Gly Ala Gly		
1070	1075	1080
Val Asp Thr Val Lys Tyr Asn Val His Gln Pro Ser Glu Glu Arg		
1085	1090	1095
Leu Glu Arg Met Gly Asp Thr Gly Ile His Ala Asp Leu Gln Lys		
1100	1105	1110

[0048]

Gly Thr 1115	Val Glu Lys Trp	Pro 1120	Ala Leu Asn Leu Phe 1125	Ser Val Asp
His Val 1130	Lys Asn Ile Glu Asn 1135	Leu His Gly Ser Ser 1140	Leu Asn Asp	
Ser Ile 1145	Ala Gly Asp Asp Arg 1150	Asp Asn Glu Leu Trp 1155	Gly Asp Asp	
Gly Asn 1160	Asp Thr Ile His Gly 1165	Arg Gly Gly Asp Asp 1170	Ile Leu Arg	
Gly Gly 1175	Leu Gly Leu Asp Thr 1180	Leu Tyr Gly Glu Asp 1185	Gly Asn Asp	
Ile Phe 1190	Leu Gln Asp Asp Glu 1195	Thr Val Ser Asp Asp 1200	Ile Asp Gly	
Gly Ala 1205	Gly Leu Asp Thr Val 1210	Asp Tyr Ser Ala Met 1215	Ile His Ala	
Gly Lys 1220	Ile Val Ala Pro His 1225	Glu Tyr Gly Phe Gly 1230	Ile Glu Ala	
Asp Leu 1235	Ser Glu Gly Trp Val 1240	Arg Lys Ala Ala Arg 1245	Arg Gly Met	
Gly Tyr 1250	Tyr Asp Ser Val Arg 1255	Ser Val Glu Asn Val 1260	Ile Gly Thr	
Ser Met 1265	Lys Asp Val Leu Ile 1270	Gly Asp Ala Gln Ala 1275	Asn Thr Leu	
Met Gly 1280	Gln Gly Gly Asp Asp 1285	Thr Val Arg Gly Gly 1290	Asp Gly Asp	
Asp Leu 1295	Leu Phe Gly Gly Asp 1300	Gly Asn Asp Met Leu 1305	Tyr Gly Asp	
Ala Gly 1310	Asn Asp Thr Leu Tyr 1315	Gly Gly Leu Gly Asp 1320	Asp Thr Leu	
Glu Gly 1325	Gly Ala Gly Asn Asp 1330	Trp Phe Gly Gln Thr 1335	Pro Ala Arg	

[0049]

Glu His 1340	Asp Val	Leu Arg	Gly 1345	Gly Ala	Gly Val	Asp 1350	Thr Val	Asp
Tyr Ser 1355	Gln Ala	Gly Ala	His 1360	Ala Gly	Val Ala	Thr 1365	Gly Arg	Ile
Gly Leu 1370	Gly Ile	Leu Ala	Asp 1375	Leu Gly	Ala Gly	Arg 1380	Val Asp	Lys
Leu Gly 1385	Glu Ala	Gly Ser	Ser 1390	Ala Tyr	Asp Thr	Val 1395	Ser Gly	Ile
Glu Asn 1400	Val Val	Gly Thr	Glu 1405	Leu Ala	Asp Arg	Ile 1410	Thr Gly	Asp
Ala Gln 1415	Ala Asn	Val Leu	Arg 1420	Gly Ala	Gly Gly	Ala 1425	Asp Val	Leu
Ala Gly 1430	Gly Glu	Gly Asp	Asp 1435	Val Leu	Leu Gly	Gly 1440	Glu Gly	Asp
Asp Gln 1445	Leu Ser	Gly Asp	Ala 1450	Gly Arg	Asp Arg	Leu 1455	Tyr Gly	Glu
Ala Gly 1460	Asp Asp	Trp Phe	Phe 1465	Gln Asp	Ala Ala	Asn 1470	Ala Gly	Asn
Leu Leu 1475	Asp Gly	Gly Asp	Gly 1480	Asn Asp	Thr Val	Asp 1485	Phe Ser	Gly
Pro Gly 1490	Arg Gly	Leu Asp	Ala 1495	Gly Ala	Lys Gly	Val 1500	Phe Leu	Ser
Leu Gly 1505	Lys Gly	Phe Ala	Ser 1510	Leu Met	Asp Glu	Pro 1515	Glu Thr	Ser
Asn Val 1520	Leu Arg	His Ile	Glu 1525	Asn Ala	Val Gly	Ser 1530	Val Arg	Asp
Asp Val 1535	Leu Ile	Gly Asp	Ala 1540	Gly Ala	Asn Val	Leu 1545	Asn Gly	Leu

[0050]

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

[0052]

Ala	Arg	Arg	Gln	Phe	Arg	Tyr	Asp	Gly	Asp	Met	Asn	Ile	Gly	Val	Ile	
			260					265					270			
Thr	Asp	Phe	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	His	
		275					280					285				
Ala	Val	Gly	Ala	Gln	Asp	Val	Val	Gln	His	Gly	Thr	Glu	Gln	Asn	Asn	
	290					295					300					
Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Phe	Val	Val	Ser	Ala	Thr	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Arg	Gly	Gln	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ile	Gly	Gln	
				325					330					335		
Gln	Arg	Gly	Glu	Gly	Tyr	Val	Phe	Tyr	Glu	Asn	Arg	Ala	Tyr	Gly	Val	
			340					345					350			
Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Phe	Asp	Asp	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	Val	
		355					360					365				
Pro	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Phe	Ser	Pro	Asp	Val	Leu	Glu	Thr	Val	Pro	
	370					375					380					
Ala	Ser	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Arg	Gln	
385					390					395					400	
Asp	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	Phe	Ser	
				405					410					415		
Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Glu	Leu	Glu	
			420					425					430			
Met	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Glu	
		435					440					445				
Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	
	450					455					460					
Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	Ile	Ala	
465					470					475					480	
Leu	Met	Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	Gln	Glu	
				485					490					495		

[0053]

Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser		
			500					505					510				
Ala	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp		
		515					520					525					
Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly		
	530					535					540						
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro		
545					550					555					560		
Ala	Gly	Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr		
				565					570					575			
Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala		
			580					585					590				
Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly		
		595					600					605					
Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr		
	610					615					620						
Gly	Leu	Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala		
625					630					635					640		
Gln	Glu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln		
				645					650					655			
Leu	Tyr	Arg	Asp	Lys	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Ser		
			660					665					670				
Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala		
		675					680					685					
Ser	Val	Val	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly		
	690					695					700						
Ala	Leu	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Gly	Val	Gln	Gln	Pro	Ile	Ile	Glu	Lys		
705					710					715					720		

[0054]

Leu	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ala	Arg	Lys	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Gln	
				725					730					735		
Ala	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asn	Leu	Gln	Ala	Arg	His	Glu	Gln	Leu	Ala	Asn	
			740					745					750			
Ser	Asp	Gly	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Gly	Trp	Asn	
		755					760					765				
Ala	Ser	Ser	Val	Ile	Gly	Val	Gln	Thr	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Ser	Ala	
	770					775					780					
Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	Asp	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	
785					790					795					800	
Asp	Val	Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Val	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Gln	
				805					810					815		
Pro	Val	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ile	Ala	Ser	Arg	
			820					825					830			
Lys	Gly	Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	
		835					840					845				
Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	
	850					855					860					
Thr	Phe	Val	Glu	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Asp	Arg	Trp	Arg	Ile	Arg	Asp	
865					870					875					880	
Gly	Ala	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu	
				885					890					895		
Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Lys	His	Ser	Ile	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	
			900					905					910			
Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Ile	His	
		915					920					925				
Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	930					935					940					
Arg	Gln	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Asn	Val	
945					950					955					960	

[0055]

Arg	Lys	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Thr	965	970	975
Gln	Thr	Thr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Arg	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	Arg	His	980	985	990
Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Gln	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Glu	995	1000	1005
His	Val	Gln	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr		1010	1015	1020
Gly	Asn	Ala	His	Asp	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Asp		1025	1030	1035
Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Gly	Gly	Glu		1040	1045	1050
Gly	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Leu		1055	1060	1065
Gln	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly		1070	1075	1080
Val	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Asn	Val	His	Gln	Pro	Ser	Glu	Glu	Arg		1085	1090	1095
Leu	Glu	Arg	Met	Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	His	Ala	Asp	Leu	Gln	Lys		1100	1105	1110
Gly	Thr	Val	Glu	Lys	Trp	Pro	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Ser	Val	Asp		1115	1120	1125
His	Val	Lys	Asn	Ile	Glu	Asn	Leu	His	Gly	Ser	Arg	Leu	Asn	Asp		1130	1135	1140
Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Asp	Gln	Asp	Asn	Glu	Leu	Trp	Gly	His	Asp		1145	1150	1155
Gly	Asn	Asp	Thr	Ile	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Asp	Asp	Ile	Leu	Arg		1160	1165	1170

[0056]

Gly 1175	Gly	Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu	Tyr	Gly	Glu	Asp 1185	Gly	Asn	Asp
Ile 1190	Phe	Leu	Gln	Asp	Asp	Glu	Thr	Val	Ser	Asp	Asp 1200	Ile	Asp	Gly
Gly 1205	Ala	Gly	Leu	Asp	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Ala	Met 1215	Ile	His	Pro
Gly 1220	Arg	Ile	Val	Ala	Pro	His	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gly 1230	Ile	Glu	Ala
Asp 1235	Leu	Ser	Arg	Glu	Trp	Val	Arg	Lys	Ala	Ser	Ala 1245	Leu	Gly	Val
Asp 1250	Tyr	Tyr	Asp	Asn	Val	Arg	Asn	Val	Glu	Asn	Val 1260	Ile	Gly	Thr
Ser 1265	Met	Lys	Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Gln	Ala 1275	Asn	Thr	Leu
Met 1280	Gly	Gln	Gly	Gly	Asp	Asp	Thr	Val	Arg	Gly	Gly 1290	Asp	Gly	Asp
Asp 1295	Leu	Leu	Phe	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	Asp	Met	Leu 1305	Tyr	Gly	Asp
Ala 1310	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp 1320	Asp	Thr	Leu
Glu 1325	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Gly	Gln	Thr 1335	Gln	Ala	Arg
Glu 1340	His	Asp	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Val	Asp 1350	Thr	Val	Asp
Tyr 1355	Ser	Gln	Thr	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala 1365	Gly	Arg	Ile
Gly 1370	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg 1380	Val	Asp	Lys
Leu 1385	Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Tyr	Asp	Thr	Val 1395	Ser	Gly	Ile

[0057]

Glu 1400	Asn	Val	Val	Gly	Thr	Glu 1405	Leu	Ala	Asp	Arg	Ile 1410	Thr	Gly	Asp
Ala 1415	Gln	Ala	Asn	Val	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala 1425	Asp	Val	Leu
Ala 1430	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Asp 1435	Val	Leu	Leu	Gly	Gly 1440	Asp	Gly	Asp
Asp 1445	Gln	Leu	Ser	Gly	Asp	Ala 1450	Gly	Arg	Asp	Arg	Leu 1455	Tyr	Gly	Glu
Ala 1460	Gly	Asp	Asp	Trp	Phe	Phe 1465	Gln	Asp	Ala	Ala	Asn 1470	Ala	Gly	Asn
Leu 1475	Leu	Asp	Gly	Gly	Asp	Gly 1480	Arg	Asp	Thr	Val	Asp 1485	Phe	Ser	Gly
Pro 1490	Gly	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala 1495	Gly	Ala	Lys	Gly	Val 1500	Phe	Leu	Ser
Leu 1505	Gly	Lys	Gly	Phe	Ala	Ser 1510	Leu	Met	Asp	Glu	Pro 1515	Glu	Thr	Ser
Asn 1520	Val	Leu	Arg	Asn	Ile	Glu 1525	Asn	Ala	Val	Gly	Ser 1530	Ala	Arg	Asp
Asp 1535	Val	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala 1540	Gly	Ala	Asn	Val	Leu 1545	Asn	Gly	Leu
Ala 1550	Gly	Asn	Asp	Val	Leu	Ser 1555	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp 1560	Asp	Val	Leu
Leu 1565	Gly	Asp	Glu	Gly	Ser	Asp 1570	Leu	Leu	Ser	Gly	Asp 1575	Ala	Gly	Asn
Asp 1580	Asp	Leu	Phe	Gly	Gly	Gln 1585	Gly	Asp	Asp	Thr	Tyr 1590	Leu	Phe	Gly
Val 1595	Gly	Tyr	Gly	His	Asp	Thr 1600	Ile	Tyr	Glu	Ser	Gly 1605	Gly	Gly	His

[0058]

Asp Thr Ile Arg Ile Asn Ala Gly Ala Asp Gln Leu Trp Phe Ala
1610 1615 1620

Arg Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asp Asp
1625 1630 1635

Ala Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His Arg Val
1640 1645 1650

Glu Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala Gly Ile
1655 1660 1665

Glu Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro Gly Ala
1670 1675 1680

Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr Leu Met
1685 1690 1695

Gln Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
1700 1705

<210> 9

<211> 1705

<212> PRT

<213> 支气管败血性博德特氏菌

<400> 9

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

Ser Leu Ile Ala Glu Gly Val Ala Thr Lys Gly Leu Gly Val His Ala
50 55 60

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
85 90 95

[0059]

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

[0060]

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

[0061]

[0062]

Glu	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Ala	Asp	Asn	Leu	Lys	Ser	Ala	Asp	785	790	795	800
Val	Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Ile	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	Gln	Pro		805	810	815
Val	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ile	Ala	Ser	Arg	Lys		820	825	830
Gly	Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	Gly		835	840	845
Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	Thr	850	855	860	
Phe	Val	Glu	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Asp	Arg	Trp	Arg	Ile	Arg	Asp	Gly	865	870	875	880
Ala	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Val		885	890	895
Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Lys	His	Ser	Ile	Lys	Leu	Glu	Val	Ile	Gly		900	905	910
Gly	Asp	Gly	Asp	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Ile	His	Tyr		915	920	925
Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	Arg	930	935	940	
Gln	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Asn	Val	Arg	945	950	955	960
Lys	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Thr	Gln		965	970	975
Lys	Thr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Arg	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	Arg	His	Val		980	985	990
Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Gln	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Glu	His	995	1000	1005	
Val	Gln	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly		1010	1015	1020	

[0063]

Asn 1025	Ala	His	Asp	Asn	Phe	Leu 1030	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly 1035	Asp	Asp	Arg
Leu 1040	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn 1045	Asp	Thr	Leu	Val	Gly 1050	Gly	Glu	Gly
His 1055	Asn	Thr	Val	Val	Gly	Gly 1060	Ala	Gly	Asp	Asp	Val 1065	Phe	Leu	Gln
Asp 1070	Leu	Gly	Val	Trp	Ser	Asn 1075	Gln	Leu	Asp	Gly	Gly 1080	Ala	Gly	Val
Asp 1085	Thr	Val	Lys	Tyr	Asn	Val 1090	His	Gln	Pro	Ser	Glu 1095	Glu	Arg	Leu
Glu 1100	Arg	Met	Gly	Asp	Thr	Gly 1105	Ile	His	Ala	Asp	Leu 1110	Gln	Lys	Gly
Thr 1115	Val	Glu	Lys	Trp	Pro	Ala 1120	Leu	Asn	Leu	Phe	Ser 1125	Val	Asp	His
Val 1130	Lys	Asn	Ile	Glu	Asn	Leu 1135	His	Gly	Ser	Ser	Leu 1140	Asn	Asp	Ser
Ile 1145	Ala	Gly	Asp	Asp	Arg	Asp 1150	Asn	Glu	Leu	Trp	Gly 1155	Asp	Asp	Gly
Asn 1160	Asp	Thr	Ile	His	Gly	Arg 1165	Gly	Gly	Asp	Asp	Ile 1170	Leu	Arg	Gly
Gly 1175	Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu 1180	Tyr	Gly	Glu	Asp	Gly 1185	Asn	Asp	Ile
Phe 1190	Leu	Gln	Asp	Asp	Glu	Thr 1195	Val	Ser	Asp	Asp	Ile 1200	Asp	Gly	Gly
Ala 1205	Gly	Leu	Asp	Thr	Val	Asp 1210	Tyr	Ser	Ala	Met	Ile 1215	His	Ala	Gly
Lys 1220	Ile	Val	Ala	Pro	His	Glu 1225	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ile 1230	Glu	Ala	Asp

[0064]

Leu Ser 1235	Glu Gly Trp Val	Arg 1240	Lys Ala Ala Arg Arg 1245	Gly Met Asp
Tyr Tyr 1250	Asp Ser Val Arg	Ser 1255	Val Glu Asn Val Ile 1260	Gly Thr Ser
Met Lys 1265	Asp Val Leu Ile	Gly 1270	Asp Ala Gln Ala Asn 1275	Thr Leu Met
Gly Gln 1280	Gly Gly Asp Asp	Thr 1285	Val Arg Gly Gly Asp 1290	Gly Asp Asp
Leu Leu 1295	Phe Gly Gly Asp	Gly 1300	Asn Asp Met Leu Tyr 1305	Gly Asp Ala
Gly Asn 1310	Asp Thr Leu Tyr	Gly 1315	Gly Leu Gly Asp Asp 1320	Thr Leu Glu
Gly Gly 1325	Ala Gly Asn Asp	Trp 1330	Phe Gly Gln Thr Pro 1335	Ala Arg Glu
His Asp 1340	Val Leu Arg Gly	Gly 1345	Ala Gly Val Asp Thr 1350	Val Asp Tyr
Ser Gln 1355	Ala Gly Ala His	Ala 1360	Gly Val Ala Thr Gly 1365	Arg Ile Gly
Leu Gly 1370	Ile Leu Ala Asp	Leu 1375	Gly Ala Gly Arg Val 1380	Asp Lys Leu
Gly Glu 1385	Ala Gly Ser Ser	Ala 1390	Tyr Asp Thr Val Ser 1395	Gly Ile Glu
Asn Val 1400	Val Gly Thr Glu	Leu 1405	Ala Asp Arg Ile Thr 1410	Gly Asp Ala
Gln Ala 1415	Asn Val Leu Arg	Gly 1420	Ala Gly Gly Ala Asp 1425	Val Leu Ala
Gly Gly 1430	Glu Gly Asp Asp	Val 1435	Leu Leu Gly Gly Asp 1440	Gly Asp Asp
Gln Leu 1445	Ser Gly Asp Ala	Gly 1450	Arg Asp Arg Leu Tyr 1455	Gly Glu Ala

[0065]

Gly Asp 1460	Asp Trp Phe Phe	Gln 1465	Asp Ala Ala Asn Ala 1470	Gly Asn Leu
Leu Asp 1475	Gly Gly Asp Gly Asn	Asp Thr Val Asp Phe 1485	Ser Gly Pro	
Gly Arg 1490	Gly Leu Asp Ala Gly	Ala Lys Gly Val Phe 1500	Leu Ser Leu	
Gly Lys 1505	Gly Phe Ala Ser Leu	Met Asp Glu Pro Glu 1515	Thr Ser Asn	
Val Leu 1520	Arg His Ile Glu Asn	Ala Val Gly Ser Val 1530	Arg Asp Asp	
Val Leu 1535	Ile Gly Asp Ala Gly	Ala Asn Val Leu Asn 1545	Gly Leu Ala	
Gly Asn 1550	Asp Val Leu Ser Gly	Gly Ala Gly Asp Asp 1560	Val Leu Leu	
Gly Asp 1565	Glu Gly Ser Asp Leu	Leu Ser Gly Asp Ala 1575	Gly Asn Asp	
Asp Leu 1580	Phe Gly Gly Gln Gly	Asp Asp Thr Tyr Leu 1590	Phe Gly Ala	
Gly Tyr 1595	Gly His Asp Thr Ile	Tyr Glu Ser Gly Gly 1605	Gly His Asp	
Thr Ile 1610	Arg Ile Asn Ala Gly	Ala Asp Gln Leu Trp 1620	Phe Ala Arg	
Gln Gly 1625	Asn Asp Leu Glu Ile	Arg Ile Leu Gly Thr 1635	Asp Asp Ala	
Leu Thr 1640	Val His Asp Trp Tyr	Arg Asp Ala Asp His 1650	Arg Val Glu	
Ala Ile 1655	His Ala Ala Asn Gln	Ala Ile Asp Pro Ala 1665	Gly Ile Glu	

[0066]

Lys	Leu	Val	Glu	Ala	Met	Ala	Gln	Tyr	Pro	Asp	Pro	Gly	Ala	Ala
1670						1675					1680			
Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Met	Gln
1685						1690					1695			
Ser	Leu	Ala	Val	Asn	Trp	Arg								
1700						1705								

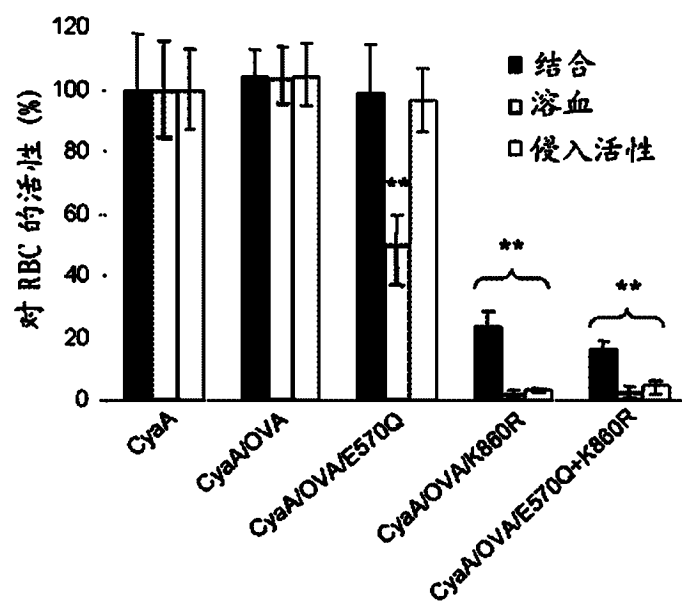


图 1A

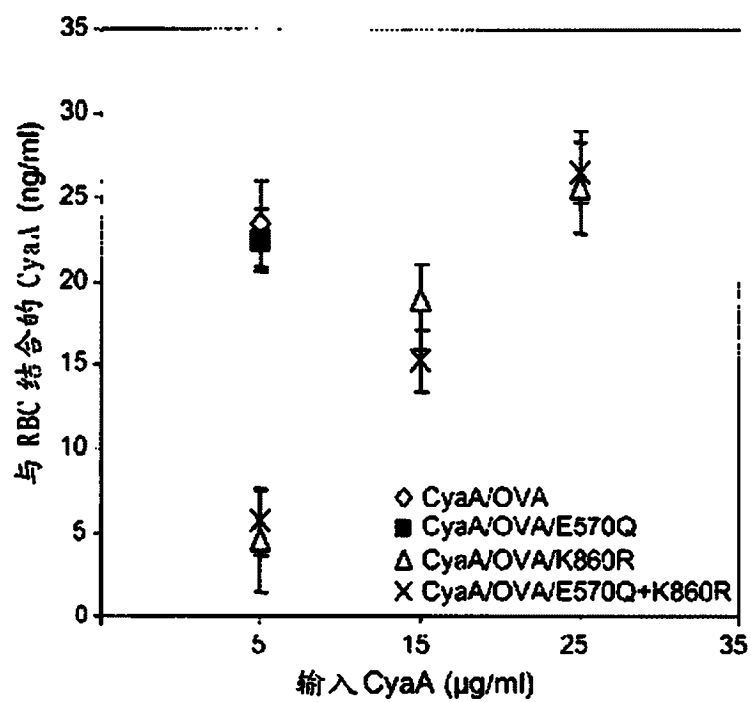


图 1B

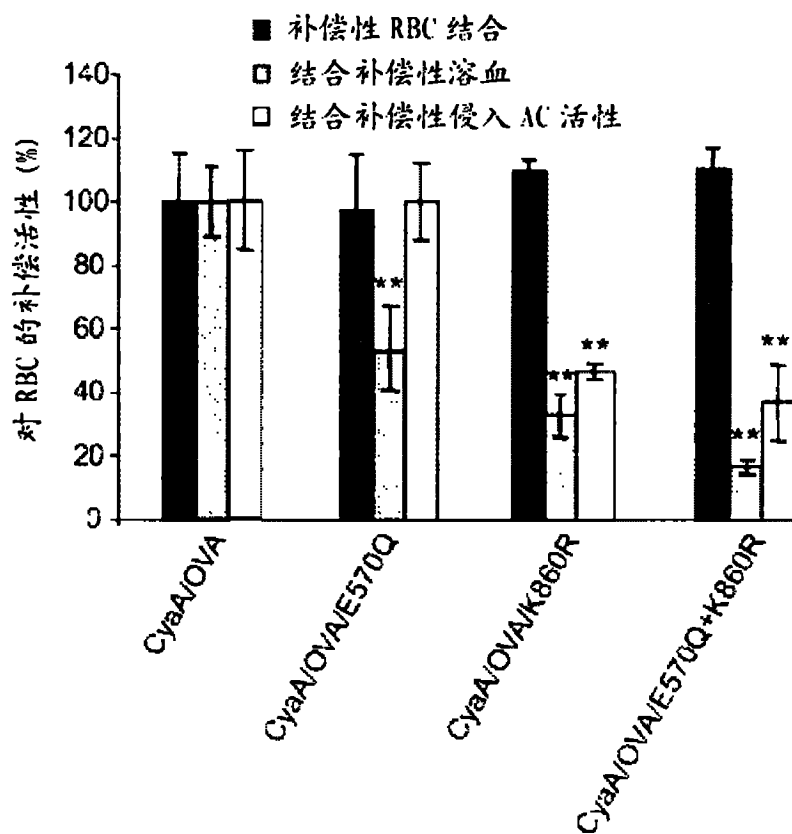


图 1C

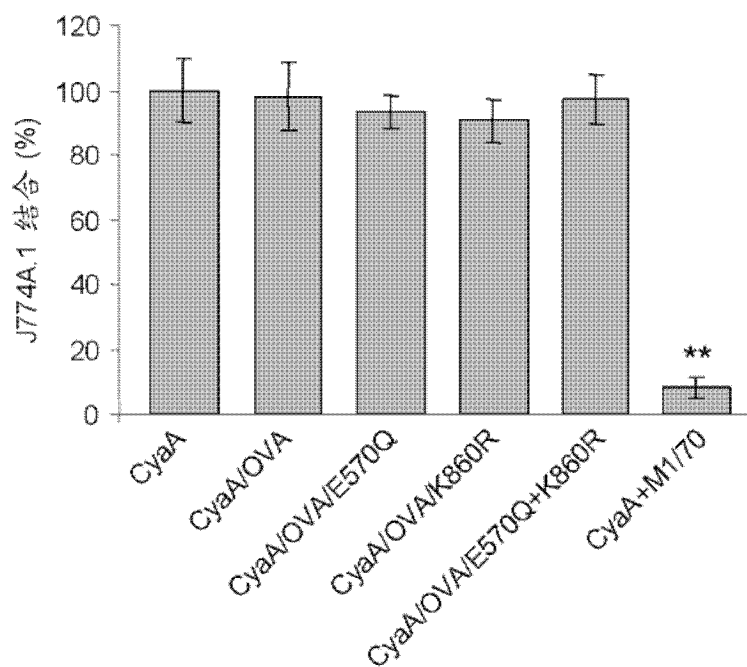


图 2A

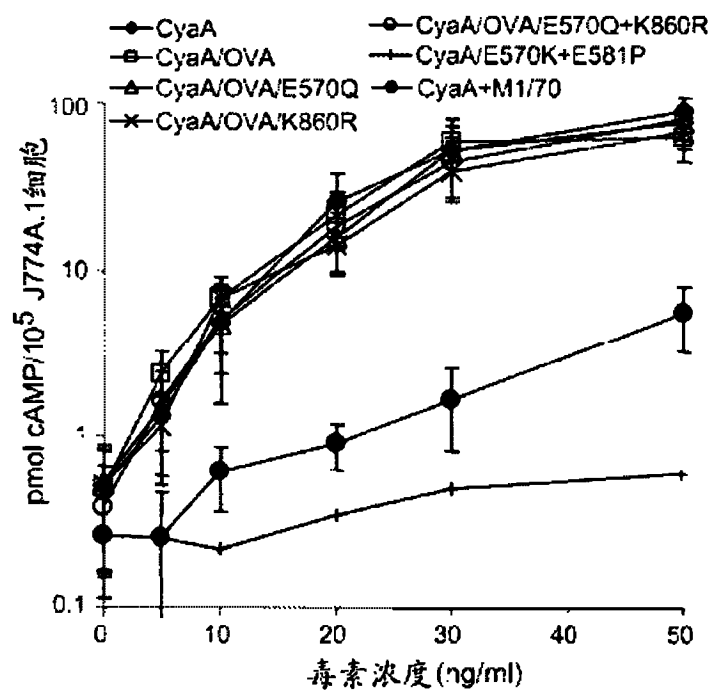


图 2B

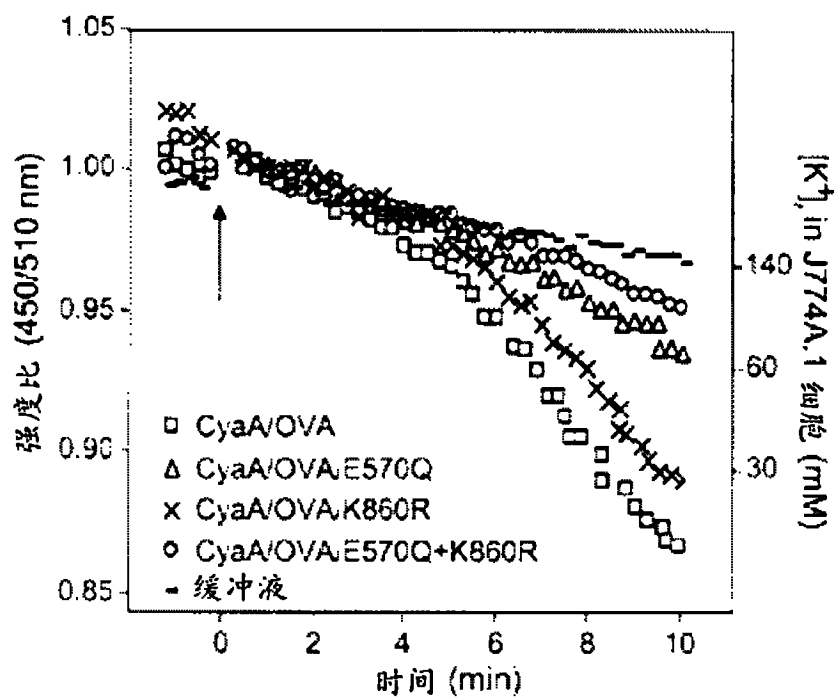


图 2C

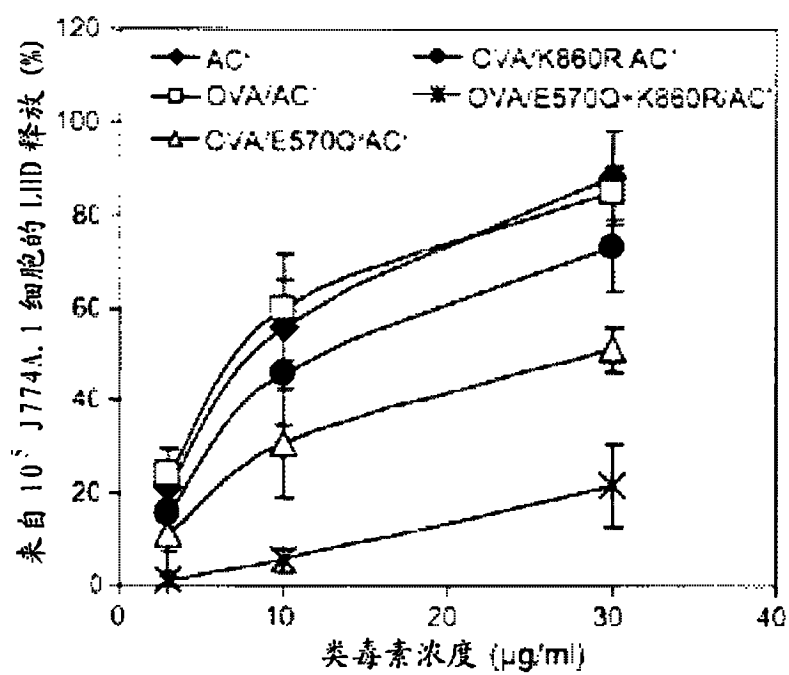


图 3A

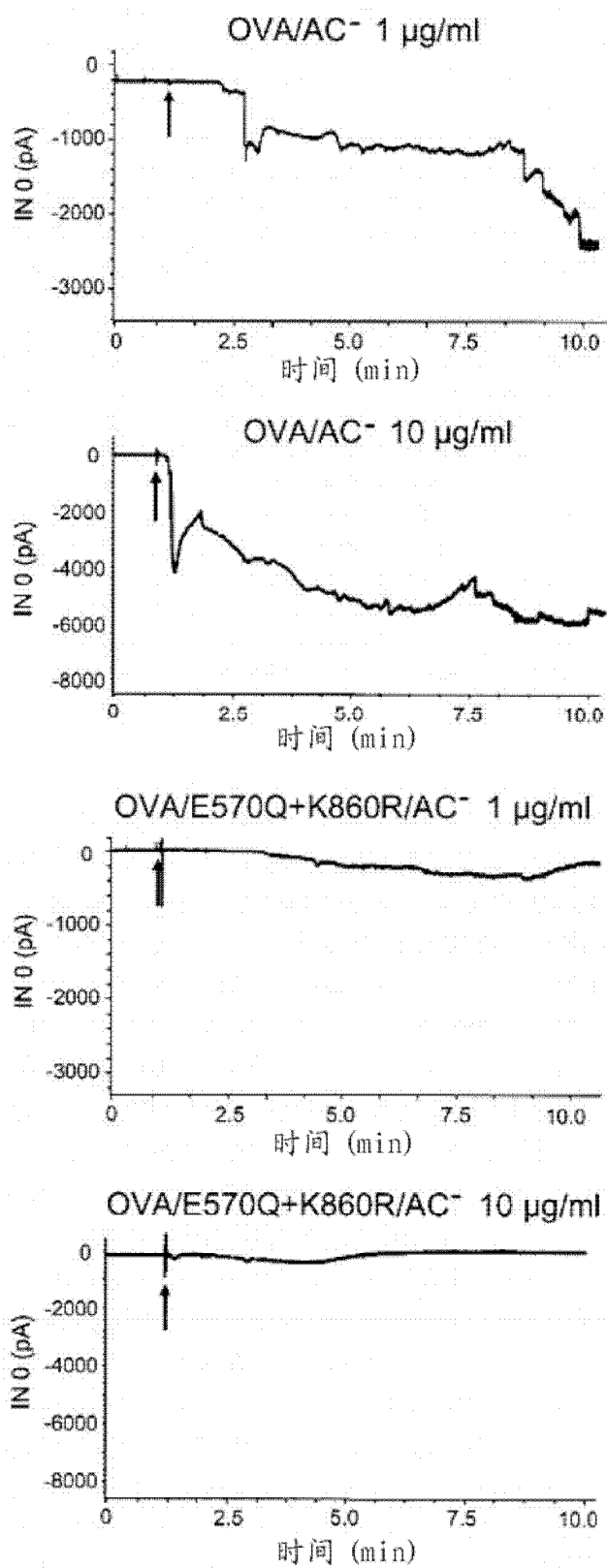


图 3B

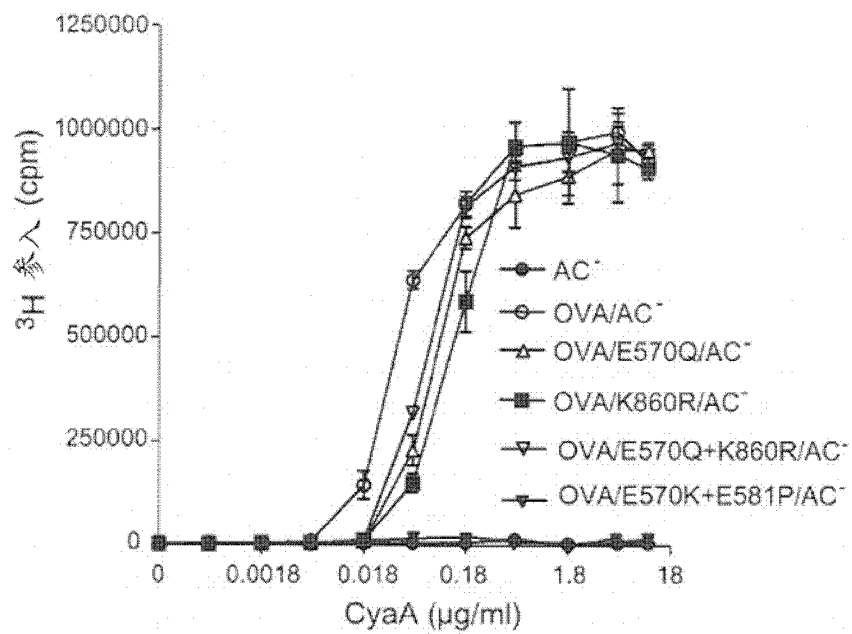


图 4A

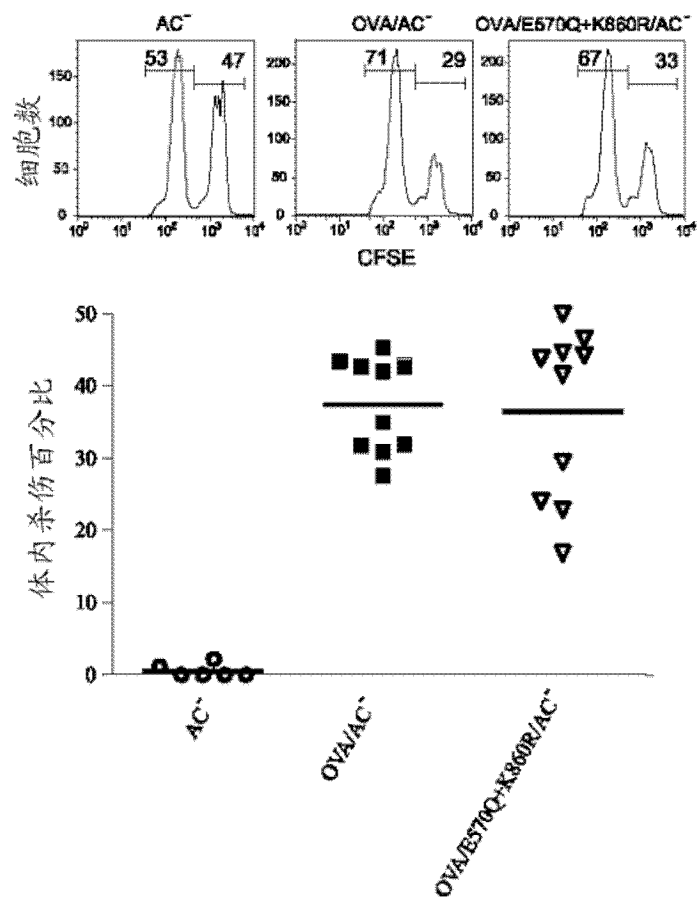


图 4B

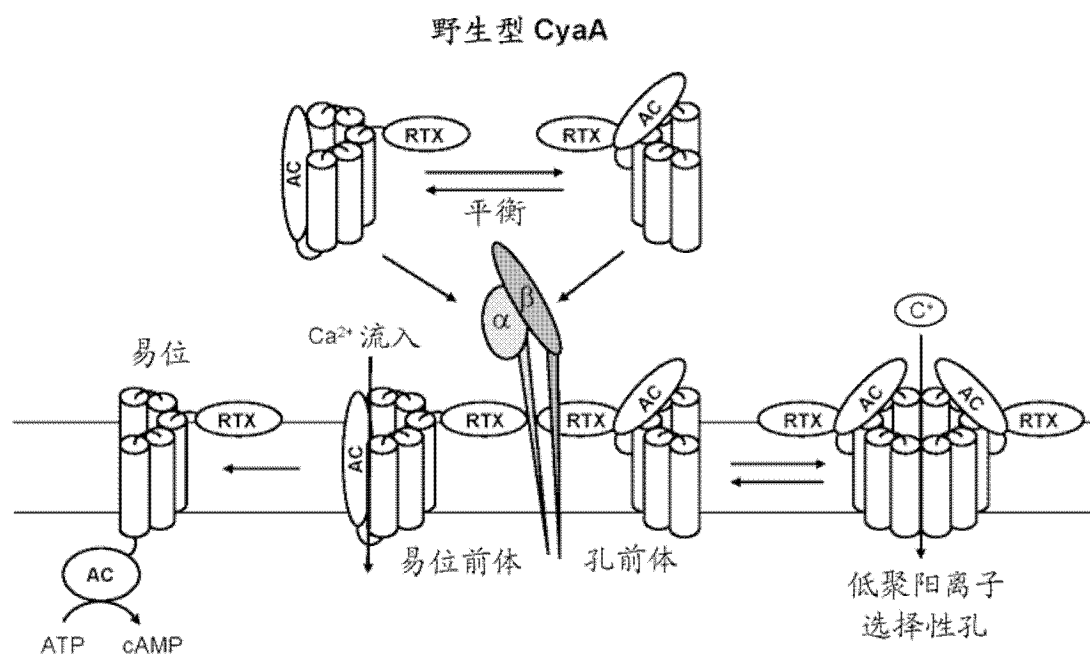


图 5A

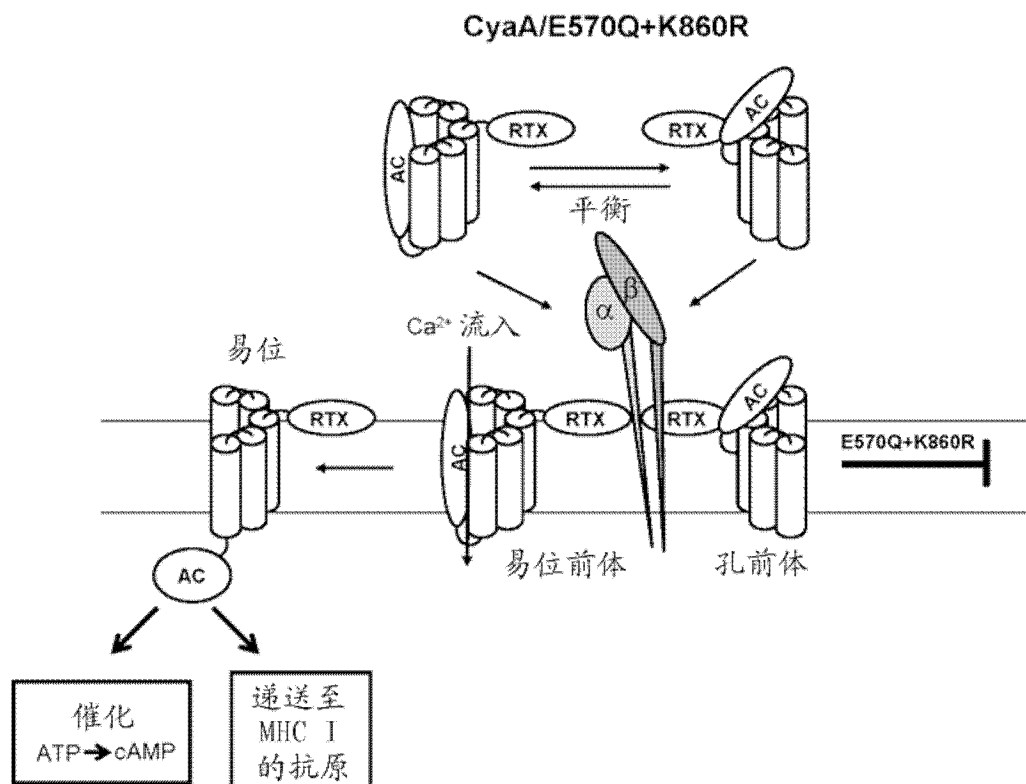


图 5B

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGMNIG VITDFELEV RALNRRRAHAV GAQDVVQHGT
301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQQRGE GYVFIENRAY GVAGKSLFDD
361 GLGAAPGVPS GRSKFSPDL ETVPASPGLR RPSLGAVERQ DSGYDSL DGV GSRSFSLGEV
421 SDMAAVEAAE LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWGQ RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
481 LMTQFGRAGS TNTPQEAAASL SAAVFGLGEA SSAVAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
541 LGGGIAAAVG AGMSLTDDAP AGQKAAAGAE IALQLTGGTV ELASSIALAL AAARGVTSGL
601 QVAGASAGAA AGALAAALSP MEIYGLVQQS HYADQLDKLA QESSAYGYEG DALLAQLYRD
661 KTAAEGAVAG VSAVLSTVGA AVSIAAAASV VGAPVAVVTS LLTGALNGIL RGVQQPIIEK
721 LANDYARKID ELGGPQAYFE KNLQARHEQL ANSDGLRKML ADLQAGWNAS SVIGVQTTEI
781 SKSALELAAI TGNADNLKSV DVFVDRFVQG ERVAGQPVVL DVAAGGIDIA SRKGERPALT
841 FITPLAAPGE EQRRRTKTGK SEFTTFVEIV GKQDRWRIRD GAADTTIDLA KVVSQLVDAN
901 GVLKHSIKLD VIGGDGDDVV LANASRIHYD GGAGTNTVSY AALGRQDSIT VSADGERFNV
961 RKQLNNANVY REGVATQTTA YGKRTEENVQY RHVELARVGQ VVEVDTLEHV QHIIGGAGND
1021 SITGNAHDNF LAGGSGDDRL DGGAGNDTLV GGEGQNTVIG GAGDDVFLQD LGVWSNQLDG
1081 GAGVDTV KYN VHQPSEERLE RMGDTGIHAD LQKGTVEKWP ALNLFSVDHV KNIE NLHGSR
1141 LNDRIAGDDQ DNELWGH DGN DTIRGRGGDD ILRGGLGLDT LYGEDGNDIF LQDDETVSDD
1201 IDGGAGLDTV DYSAMIHPGR IVAPHEYGFG IEADLSREWV RKASALGV DY YDNVRN VENV
1261 IGTS MKDVLI GDAQANTLMG QGGDDTVRGG DGDDL LFGGD GNDMLYGDAG NDTLYGGLGD
1321 DTLEGGAGND WFGQTQAREH DVLRGGDGVD TVDYSQTGAH AGIAAGRIGL GILADLGAGR
1381 VDKLGEAGSS AYDTVSGIEN VVGTELADRI TGDAQANVLR GAGGADVLAG GEGDDVLLGG
1441 DGDDQLSGDA GRDRLYGEAG DDWFFQDAAN AGNLLDGGDG RDTVDFSGPG RGLDAGAKGV
1501 FLSLGKGFAS LMDEPETSNV LRNIENAVGS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD
1561 DVLLGDEGSD LLSGDAGNDD LFGGQGGDDTY LFGVG YGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
1621 WFARQGN DLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEIIHAAN QAVDQAGIEK LVEAMAQYPD
1681 PGAAAAAPPA ARVPDTLMQS LAVNWR

图 6

```

1  MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61  GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGMNIG VITDFELEV R NALNRRHAV GAQDVVQHGT
301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQQRGE GYVFIENRAY GVAGKSLFDD
361 GLGAAPGVPS GRSKFSPDVL ETVPASPGLR RPSLGAVERQ DSGYDSL DGV GSRSFSLGEV
421 SDMAAVEAAE LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWGQ RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
481 LMTQFGRAGS TNTPQEAASL SAAVFGLGEA SSAVAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
541 LGGGIAAAVG AGMSLTDDAP AGQKAAAGAQ IALQLTGGTV ELASSIALAL AAARGVTSGL
601 QVAGASAGAA AGALAAALSP MEIYGLVQQS HYADQLDKLA QESSAYGYEG DALLAQLYRD
661 KTAAEGAVAG VSAVLSTVGA AVSIAAAASV VGAPVAVVTS LLTGALNGIL RGVQQPIIEK
721 LANDYARKID ELGGPQAYFE KNLQARHEQL ANSDGLRKML ADLQAGWNAS SVIGVQTTEI
781 SKSALELAAI TGNADNLKSV DVFVDRFVQG ERVAGQPVL DVAAGGIDIA SRKGERPALT
841 FITPLAAPGE EQRRRTKTGR SEFTTFVEIV GKQDRWRIRD GAADTTIDLA KVVSQLVDAN
901 GVLKHSIKLD VIGGDGDDVV LANASRIHYD GGAGTNTVSY AALGRQDSIT VSADGERFNV
961 RKQLNNANVY REGVATQTTA YGKRTEENVQY RHVELARVGQ VVEVDTLEHV QHIIGGAGND
1021 SITGNAHDNF LAGGSGDDRL DGGAGNDTLV GGEGQNTVIG GAGDDVFLQD LGVWSNQLDG
1081 GAGVDTV KYN VHQPSEERLE RMGDTGIHAD LQKGTVEKWP ALNLFSVDHV KNIE NLHGS R
1141 LNDRIAGDDQ DNELWGH DGN DTIRGRGGDD ILRGGLGLDT LYGEDGNDIF LQDDETVSDD
1201 IDGGAGLDTV DYSAMIHPGR IVAPHEYGFG IEADLSREWV RKASALGV D YDNVRNVENV
1261 IGTSMKDVLI GDAQANTLMG QGGDDTVRGG DGDDLLFGGD GNDMLYGDAG NDTLYGGLGD
1321 DTLEGGAGND WFGQTQAREH DVL RGGDGVD TVDYSQTGAH AGIAAGRIGL GILADLGAGR
1381 VDKLGEAGSS AYDTVSGIEN VVGTELADRI TGDAQANVLR GAGGADVLAG GEGDDVLLGG
1441 DGDDQLSGDA GRDRLYGEAG DDWFFQDAAN AGNLLDGGDG RDTVDFSGPG RGLDAGAKGV
1501 FLSLGKGFAS LMDEPETS NV LRNIENAVGS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD
1561 DVLLGDEGSD LLSGDAGNDD LFGGQGGDDTY LFGVG YGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
1621 WFA RQGNDLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEIIHAAN QAVDQAGIEK LVEAMAQYPD
1681 PGAAAAAPPA ARVPDTLMQS LAVNWR

```

图 7

```

1  MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61  GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADGS IDMFAIMPHL SNFRDSARSS VTSGDSVTDY LARTRRAASE ATGGLDRERI
241 DLLWKIARAG ARSAVGTEAR RQFRYDGMN IGVIITDFELE VRNALNRRAH AVGAQDVVQH
301 GTEQNNPFPE ADEKIFVUSA TGESQMLTRG QLKEYIGQQR GEGYVFYENR AYGVAGKSLF
361 DDGLGAAPGV PSGRSKFSPD VLETVPASPG LRRPSLGAVE RQDSGYDSL DGVGSRSFSLG
421 EVSDMAAVEA AELEMTRQVL HAGARQDDAE PGVSGASAHW GQRALQGAQA VAAAQRLVHA
481 IALMTQFGRA GSTNTPQEAA SLSAAVFGLG EASSAVAETV SGFFRGSSRW AGGFGVAGGA
541 MALGGGIAAA VGAGMSLTDD APAGQKAAAG AQIALQLTGG TVELASSIAL ALAAARGVTS
601 GLQVAGASAG AAAGALAAAL SPMEIYGLVQ QSHYADQLDK LAQESSAYGY EGDALLAQLY
661 RDKTAAEGAV AGVSAVLSTV GAAVSIAAAA SVVGAPVAVV TSLLTGALNG ILRGVQQPII
721 EKLANDYARK IDELGGPQAY FEKNLQARHE QLANS DGLRK MLADLQAGWN ASSVIGVQTT
781 EISKSALELA AITGNADNLK SVDVFVDRFV QGERVAGQPV VLDVAAGGID IASRKGERPA
841 LTFITPLAAP GEEQRRRTKT GRSEFTTFVE IVGKQDRWRI RDGAADTTID LAKVVSQLV D
901 ANGV LKHSIK LDVIGGDGDD VVLANASRIH YDGGAGTNTV SYAALGRQDS ITVSADGERF
960 NVRKQLNNAN VYREGVATQT TAYGKRTE NV QYRHVELARV GQVVEVD TLE HVQHIIGGAG
1021 NDSITGNAHD NFLAGGSGDD RLDGGAGNDT LVGGEGQNTV IGGAGDDVFL QDLGVWSNQL
1081 DGGAGVDTV K YNVHQPSEER LERMGTG I H ADLQKGTVEK WPALNLF SVD HVKN IENLHG
1141 SRLNDRIAGD DQDNELWGHD GNDTIRGRGG DDILRGGLGL DTLYGEDGND IF LQDDETVS
1201 DDIDGGAGLD TVDYSAMIHP GRIVAPHEYG FGIEADLSRE WVRKASALGV DYYDNVRNVE
1261 NVIGTSMKDV LIGDAQANTL MGQGGDDTVR GGDGDDLLFG GDGNDMLYGD AGNDTLYGGL
1321 GDDTLEGGAG NDWFGQTQAR EHDVLRGGDG VDTV DYSQTG AHAGIAAGRI GLGILADLGA
1381 GRVDKLGEAG SSAYDTVSGI ENVVGTELAD RITGDAQANV LRGAGGADVL AGGEGDDVLL
1441 GGDGDDQLSG DAGRDRLYGE AGDDWFFQDA ANAGNLLDGG DGRDTVDFSG PGRGLDAGAK
1501 GVFLSLGKGF ASLMDEPETS NVLRNIENAV GSARDDVLIG DAGANVLNGL AGNDVLSGGA
1561 GDDVLLGDEG SDLLSGDAGN DDLFGGQGD TYLFGVGYGH DTIYESGGGH DTIRINAGAD
1621 QLW FARQGND LEIRILGTDD ALT VHDWYRD ADHRVEIIHA ANQAVDQAGI EKLVEAMAQY
1681 PDPGAAAAAP PAARVPDTLM QSLAVNWR

```

图 8

```

1      MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61     GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTSLKERL
121    DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181    AGIPLTADGS IDMFAIMPHL SNFRDSARSS VTSGDSVTDY LARTTAAASE ATGGVLSIIN
241    FEKLVHLDRE RIDLLWKIAR AGARSAVGTE ARRQFRYDGD MNIGVITDFE LEVRNALNRR
301    AHAVGAQDVV QHGTEQNNPF PEADEKIFVV SATGESQMLT RGQLKEYIGQ QRGEGYVFYE
361    NRAYGVAGKS LFDDGLGAAP GVPGRSKFS PDVLETVPAS PGLRRPSLGA VERQDSGYDS
421    LDGVGSRFS LGEVSDMAAV EAAELEMTRQ VLHAGARQDD AEPGVSGASA HWGQALQGA
481    QAVAAAQRLV HAIALMTQFG RAGSTNTPQE AASLSAAVFG LGEASSAVAE TVSGFFRGSS
541    RWAGGFGVAG GAMALGGGIA AAVGAGMSLT DDAPAGQKAA AGAQIALQLT GGTVELASSI
601    ALALAAARGV TSGLQVAGAS AGAAAGALAA ALSPMEIYGL VQQSHYADQL DKLAQESSAY
661    GYEGDALLAQ LYRDKTAAEG AVAGVSAVLS TVGAAVSIAA AASVVGAPVA VVTSLLTGAL
721    NGILRGVQQP IIEKLANDYA RKIDELGGPQ AYFEKNLQAR HEQLANS DGL RKMLADLQAG
781    WNASSVIGVQ TTEISKSALE LAAITGNADN LKSVDFVDR FVQGERVAGQ PVVLDVAAGG
841    IDIASRKGER PALTFITPLA APGEEQRRRT KTGRSEFTTF VEIVGKQDRW RIRDGAADTT
901    IDLAKVVSQ LVDANGVLKHS IKLDVIGGDG DDVVLANASR IHYDGGAGTN TVSYAALGRQ
961    DSITVSADGE RFNVRKQLNN ANVYREGVAT QTTAYGKRTE NVQYRVELA RVGQVVEVDT
1021   LEHVQHIIGG AGNDSITGNA HDNFLAGGSG DDRLDGGAGN DTLVGEGGQN TVIGGAGDDV
1081   FLQDLGVWSN QLDGGAGVDT VKYNVHQPSE ERLERMGTG IHADLQKGTV EKWPALNLFS
1141   VDHVKNIENL HGSRLNDRIA GDDQDNELWG HDGNDTIRGR GGDDILRGGL GLDTLYGEDG
1201   NDIFLQDD ET VSDDIDGGAG LDTV DYSAMI HPGRIVAPHE YGFGIEADLS REWVRKASAL
1261   GVDYYDNVRN VENVIGTSMK DVLIGDAQAN TLMGQGGDDT VRGGDGGDLL FGGDGNMMLY
1321   GDAGNDTLYG GLGDDTLEGG AGNDWFGQTQ AREHDVLRGG DGVDTV DYSQ TGAHAGIAAG
1381   RIGLGILADL GAGRVDKLGE AGSSAYDTVS GIENVVGT EL ADRITGDAQA NVLRGAGGAD
1441   VLAGGEGDDV LLGGDGDDQL SGDAGRDRLY GEAGDDWFFQ DAANAGNLLD GGDGRDTVDF
1501   SGPGRGLDAG AKGVFLSLGK GFASLMDEPE TSNVLRNIEN AVGSARDDVL IGDAGANVLN
1561   GLAGNDVLSG GAGDDVLLGD EGSDLLSGDA GNDDLFGGQG DDTYLFVG VY GHDTIYESGG
1621   GHDTIRINAG ADQLWFARQG NDLEIRILGT DDALTVHDWY RDADHRVEII HAANQAVDQA
1681   GIEKLVEAMA QYPDPGAAAA APPAARVPDT LMQSLAVNWR

```

图 9

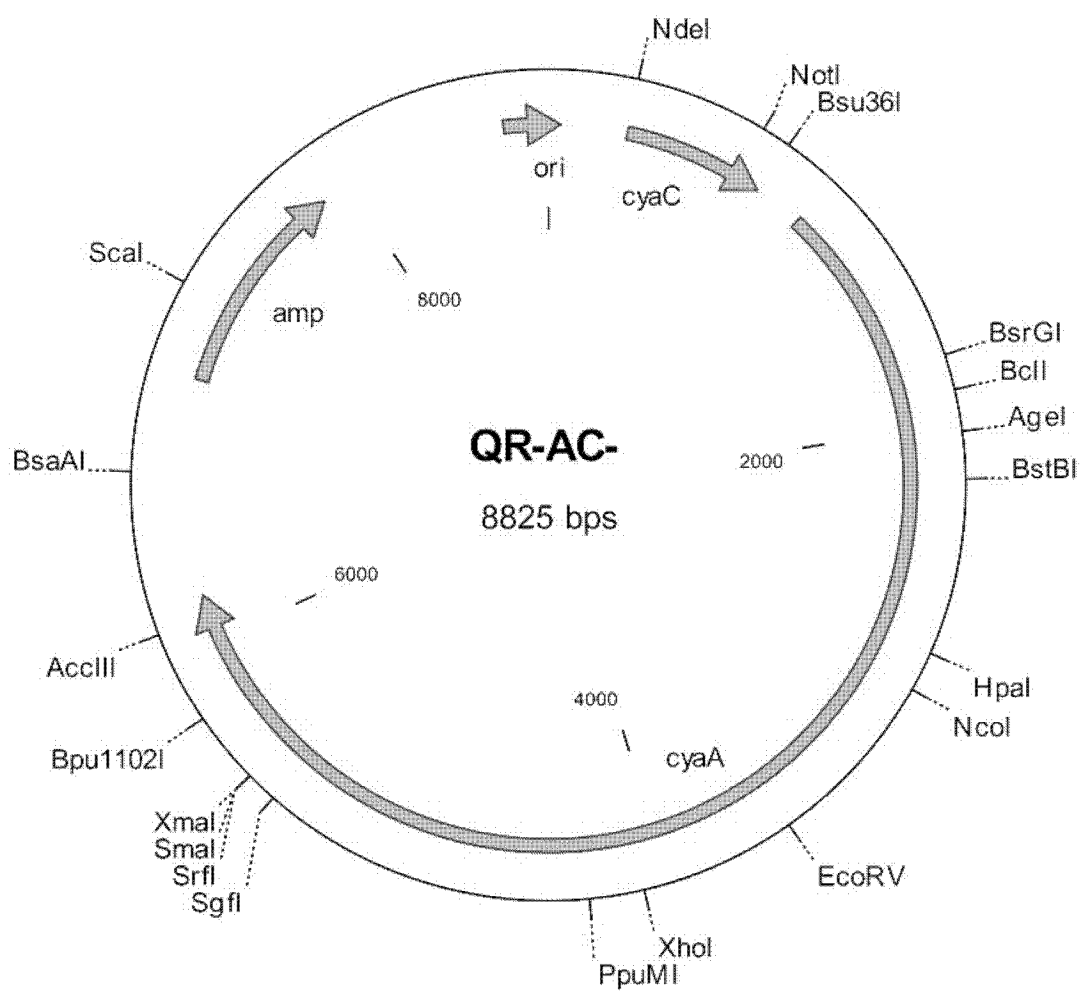


图 10

CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCA
GCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAAT
TTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
ATATACATATGCTTCCGTCCGCCCAAGCGCCCTCCCTCCTCAATCCCACCGACGACTTCG
CGGCACTGGGCAATATTGCCTGGCTGTGGATGAACTCTCCCATGCACCGCGACTGGCCGG
TGCATCTGCTCGCACGCAACACGCTCGCGCCGATTCAACTGGGCCAATACATTCTGCTGC
GATGCAATGACGTGCCGGTTGCATACTGCAGCTGGGCCCTAATGGACGCCGACACCGAAC
TCTCCTATGTTCATGGCGCCCTCGTCGCTGGGCGGGAATGCCTGGAAC TGCGGCGACCGAC
TGTGGATCATCGACTGGATCGCGCCATTCTCGCGCGACGACAATCGTGCGCTGCGCCGCG
CGCTGGCCGAACGGCACCCCGACAGCGTGGGCGGTTTCGCTGCGCGTTTCGGCGCGGCGGCG
ACACCGCGCGCGTCAAGGAGTACCGAGGCCGCGCGCTGGACGCGGCCCGCCACTCGCGCGC
AGCTGGACCGCTACCATGCCGAAC TGATCGCAGGACTGCGCGCGAGCAACGGCGGATACG
CGCCGCGAGGCCGGGGCACCGCCTAAGGATCCTCTAGAGCTTG CATGCCCTGGCACGACA
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGT
TACGCAAAACGCCGCCGACCGGGAGTCTGGCATCCCCGAGCCGTACTCGATGGCATCAAG
GCCGTGGCGAAGGAAAAAACGCCACATTGATGTTCCGCCTGGTCAACCCCCATTCCACC
AGCCTGATTGCCGAAGGGGTGGCCACCAAGGATTGGGCGTGACGCCAAGTCGTCCGAT
TGGGGGTGTCAGGCGGGCTACATTCCCGTCAACCCGAATCTTTCCAAACTGTTTCGGCCGT
GCGCCCGAGGTGATCGCGCGGGCCGACAACGACGTCAACAGCAGCCTGGCGCATGGCCAT
ACCGCGGTGACCTGACGCTGTGAAAGAGCGGCTTGACTATCTGCGGCAAGCGGGCCTG
GTCACCGCATGGCCGATGGCGTGGTTCGCGAGCAACCACGCAGGCTACGAGCAGTTTCGAG
TTTCGCGTGAAGGAAACCTCGGACGGGCGCTATGCCGTGCAGTATCGCCGCAAGGGCGGC
GACGATTTTCGAGGCGGTCAAGGTGATCGGCAATGCCGCCGTATTCCACTGACGGCGGAT
GGATCCATCGACATGTTTCGCCATTATGCCGCATCTGTCCA ACTTCGCGCACTCGGCGCGC
AGTTTCGTGACACAGCGGCGATTTCGGTGACCGATTACCTGGCGCGCACGCGGCGGGCCGCC
AGCGAGGCCACGGGCGGTGTACACCTGGATCGCGAACGCATCGACTTGTTGTGGAATAATC
GCTCGCGCCGGCGCCCGTTCCGCAGTGGGCACCGAGGCGCGTCGCCAGTTCCGCTACGAC
GGCGACATGAATATCGGCGTGATCACCGATTTTCGAGCTGGAAGTGCGCAATGCGCTGAAC
AGGCGGGCGCACGCCGTTCGGCGCGCAGGACGTGGTCCAGCATGGCACTGAGCAGAACAAAT
CCTTTTCCCGAGGCAGATGAGAAGATTTTCGTCTGATCGGCCACCGGTGAAAGCCAGATG
CTCACGCGCGGGCAACTGAAGGAATACATTGGCCAGCAGCGCGGCGAGGGCTATGTCTTC
TACGAGAACCGTGCATACGGCGTGGCGGGGAAAGCCTGTTTCGACGATGGGCTGGGAGCC
GCGCCCGCGTGCCGAGCGGACGTTTCAAGTTCTCGCCGGATGTACTGGAAACGGTGCCG
GCGTCAACCCGATTGCGGCGGCCGTTCGCTGGGCGCAGTGGAACGCCAGGATTCCGGCTAT
GACAGCCTTGATGGGGTGGGATCGCGATCGTTCTCGTTGGGCGAGGTGTCCGACATGGCC
GCCGTGGAAGCGGCGGAAC TGGAATGACCCGGCAAGTCTTGACGCCGGGGCGCGGCAG
GACGATGCCGAGCCGGCGTGAGCGGTGCGTCGGCGCACTGGGGGCAGCGGGCGCTGCAG
GGCGCCAGGCGGTGGCGGCGGCGCAGCGGCTGGTTCATGCCATTGCCCTGATGACGCAA
TTCGGCCGGGCCGGTTCCACCAACACGCCGCAGGAAGCGGCCTCGTTGTGCGGCGGCCGTG
TTCGGCTTGGGCGAGGCCAGCAGCGCCGTGGCCGAAACCGTGAGCGGTTTTTTCCGCGGG
TCTTCGCGCTGGGCCGGCGGTTTCGGCGTGGCTGGCGGCGCGATGGCGCTGGGAGGCGGC
ATCGCCGCGGCCGTTGGCGCCGGGATGTCGTTGACCGATGACGCGCCGGCCGGACAGAAG
GCCGCCGCCGAGCTCCGATCGCGCTGCAGTTAACGGGTGGAACGGTCGAGCTGGCTTCT
TCCATCGCGTTGGCGCTGGCCGCGGCGCGCGGCGTGACCAGCGGCTTG CAGGTGGCCGGG
GCGTCCGCCGGGGCGGCTGCCGGCGCATTGGCCGCGGCGCTCAGTCCCATGGAGATCTAC
GGCCTGGTGCAGCAATCGCACTATGCGGATCAGCTGGACAAGCTGGCGCAGGAATCGAGC
GCATACGGTTACGAGGGCGACGCCTTGCTGGCCCAGCTGTATCGCGACAAGACGGCCGCC
GAGGGCGCCGTGCGCGGCGTCTCCGCCGTCTGAGCACGGTGGGGCGGCGGTGTCGATC
GCCGCGGCGGCCAGCGTGGTAGGGGCCCGGTGGCGGTGGTCACTTCCTTGCTGACCGGG

图 11

GCTCTCAACGGCATCTGCGCGGCGTGACGAGCCCATCATCGAAAAGCTGGCCAACGAT
TACGCTCGCAAGATCGACGAGCTGGGCGGGCCGCAAGCGTACTTCGAGAAAAACCTGCAG
GCGCGTCACGAACAACTGGCCAATTGCGACGGCCTACGGAATGCTGGCCGACCTGCAG
GCCGGTTGGAACGCCAGCAGCGTGATCGGGGTGCAGACGACAGAGATCTCCAAGTCGGCG
CTCGAACTGGCCGCCATTACCGGCAACGCGGACAACCTGAAATCCGTGACGTGTTTCGTG
GACCGCTTCGTCCAGGGCGAGCGGGTGGCCGGCCAGCCGGTGGTCCTCGACGTGCGCGCC
GGCGGCATCGATATCGCCAGCCGCAAGGGCGAGCGGCCGGCGCTGACGTTTCATCACGCCG
CTGGCCGCGCCAGGAGAAGAGCAGCGCCGGCGCACGAAAACGGGCAGATCTGAATTCACC
ACATTCGTGAGATCGTGGGCAAGCAGGACCGCTGGCGCATCCGGGACGGCGCGGCCGAC
ACCACCATCGATCTGGCCAAGGTGGTGTGCGAACTGGTCGACGCCAATGGCGTGCTCAAG
CACAGCATCAAACCTGGATGTGATCGGCGGAGATGGCGATGACGTGCTGCTTGCCAATGCT
TCGCGCATCCATTATGACGGCGGCGCGGGCACCAACACGGTCAGCTATGCCGCCCTGGGT
CGACAGGATTCCATTACCGTGTCCGCCGACGGGAACGTTTCAACGTGCGCAAGCAGTTG
AACAACGCCAACGTGTATCGCGAAGGCGTGGCTACCCAGACAACCGCCTACGGCAAGCGC
ACGGAGAATGTCCAATACCGCCATGTGAGCTGGCCCGTGTGCGGCAAGTGGTGGAGGTC
GACACGCTCGAGCATGTGACGACATCATCGGCGGGGCGGCAACGATTTCGATCACCGGC
AATGCGCACGACAACCTTCCTAGCCGGCGGGTGGGCGACGACAGGCTGGATGGCGGCGCC
GGCAACGACACCCTGGTTGGCGGCGAGGGCCAAAAACACGGTCATCGGCGGCGCCGGCGAC
GACGTATTCCTGCAGGACCTGGGGGTATGGAGCAACCAGCTCGATGGCGGCGCGGGCGTC
GATACCGTGAAGTACAACGTGCACCAGCCTTCCGAGGAGCGCCTCGAACGCATGGGCGAC
ACGGGCATCCATGCCGATCTTCAAAGGGCACGGTCGAGAAGTGGCCGGCCCTGAACCTG
TTCAGCGTCGACCATGTCAAGAATATCGAGAATCTGCACGGCTCCCGCCTAAACGACCGC
ATCGCCGGCGACGACAGGACAACGAGCTCTGGGGCCACGATGGCAACGACACGATACGC
GGCCGGGGCGGCGACGACATCCTGCGCGGCGGCCTGGGCCTGGACACGCTGTATGGCGAG
GACGGCAACGACATCTTCTGCGAGGACGACGAGACCGTCAGCGATGACATCGACGGCGGC
GCGGGGCTGGACACCGTCGACTACTCCGCCATGATCCATCCAGGCAGGATCGTTGCGCCG
CATGAATACGGCTTCGGGATCGAGGCGGACCTGTCCAGGGAATGGGTGCGCAAGGCGTCC
GCGCTGGGCGTGGACTATTACGATAATGTCCGCAATGTGAAAACGTTCATCGGTACGAGC
ATGAAGGATGTGCTCATCGGCGACGCGCAAGCCAATACCCTGATGGGCCAGGGCGGCGAC
GATACCGTGCGCGGCGGCGACGGCGATGATCTGCTGTTGCGCGGCGACGGCAACGACATG
CTGTATGGCGACGCCGGCAACGACACCCTCTACGGGGGGCTGGGCGACGATACCCTTGAA
GGCGGCGCGGGCAACGATTGGTTGCGCCAGACGCAGGCGCGCGAGCATGACGTGCTGCGC
GGCGGAGATGGGGTGGATACCGTCGATTACAGCCAGACCGGCGCGCATGCCGGCATTGCC
GCGGGTCGCATCGGGCTGGGCATCCTGGCTGACCTGGGCGCCGGCCGCGTCGACAAGCTG
GGCGAGGCCGGCAGCAGCGCCTACGATACGGTTTCCGGTATCGAGAACGTGGTGGGCAG
GAACTGGCCGACCGCATCACGGGCGATGCGCAGGCCAACGTGCTGCGCGGCGCGGGTGGC
GCCGACGTGCTTGCGGGCGGCGAGGGCGACGATGTGCTGCTGGGCGGCGACGGCGACGAC
CAGCTGTGCGGGCGACGCCGACGCGATCGCTTGTACGGCGAAGCCGGTGACGACTGGTTT
TTCCAGGATGCCGCCAATGCCGGCAATCTGCTCGACGGCGGCGACGGCCGCGATACCCTG
GATTTTCAGCGGCCCGGGCCGGGGCCTCGACGCCGGCGCAAAGGGCGTATTCTTGAGCTTG
GGCAAGGGGTTGCCAGCCTGATGGACGAACCCGAAACCAGCAACGTGTTGCGCAATATC
GAGAACGCCGTGGGCGAGCGCGGTGATGACGTGCTGATCGGCGACGAGGCGCCAACGTC
CTCAATGGCCTGGCGGGCAACGACGTGCTGTCCGGCGGCGCTGGCGACGATGTGCTGCTG
GGCGACGAGGGCTCGGACCTGCTCAGCGGCGATGCGGGCAACGACGATCTGTTTCGGCGGG
CAGGGCGATGATACTTATCTGTTCCGGGTGCGGTACGGGCACGACACGATCTACGAATCG
GGCGGCGGCCATGACACCATCCGCATCAACGCGGGGGCGGACCAGCTGTGGTTTCGCGCGC
CAGGGCAACGACCTGGAGATCCGCATTCCTGGCACCGACGATGCATTTACCGTGCACGAC
TGGTATCGCGACGCCGATACCGGGTGGAATCATCCATGCCGCCAACCAGGCGGTAGAC
CAGGCAGGCATCGAAAAGCTGGTTCGAGGCAATGGCGCAGTATCCGGACCCCGGCGCGGGC
GCGGCTGCCCGCGGCGGCGCGCGTGCCGGACACGCTGATGCAGTCCCTGGCTGTCAAC
TGGCGCTGAAGCGCCGTGAATCACGGCCCGCCTGCCTCGCGCGGCGGCGCCGTCTCTTTG
CGTTCTTCTCCGAGGTATTTCCCATCATGAATCACTGGCCGTGTTTTACAACGTGCTG
ACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCA

图 11(续)

GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGA
ATGGCGAATGGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAATATTTTGTAAATTCGCGTT
AAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCCTTA
TAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCC
ACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG
CCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
AAATCGGAACCCTAAAGGGATGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGT
GGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGC
GGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTC
AGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATT
TTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAG
TTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC
GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCA
GAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT
GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGT
AACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
CACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACT
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACC
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGA
GCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT
TTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
AACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCT
TTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCT
AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTC
AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACA
GCCCAGCTTGAGAGCAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG
AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGT
CGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG
CCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTT
TGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTT
TGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA
GGAAG

图 11(续)

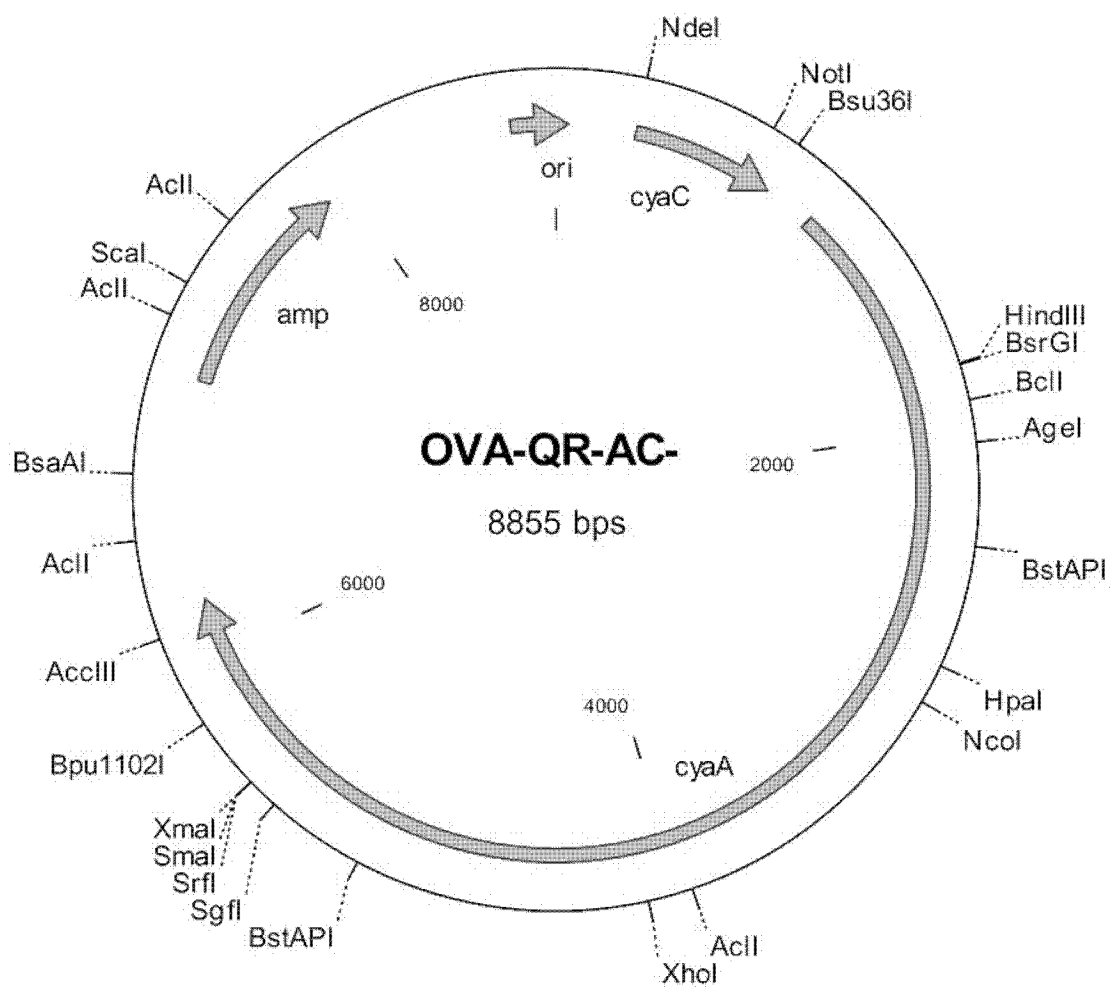


图 12

CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCA
GCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAAT
TTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
ATATACATATGCTTCCGTCCGCCAAGCGCCCTCCCTCCTCAATCCCACCGACGACTTCG
CGGCACTGGGCAATATTGCCTGGCTGTGGATGAACTCTCCCATGCACCGCGACTGGCCGG
TGCATCTGCTCGCACGCAACACGCTCGCGCCGATTCAACTGGGCCAATACATTCTGCTGC
GATGCAATGACGTGCCGGTTGCATACTGCAGCTGGGCCCTAATGGACGCCGACACCGAAC
TCTCCTATGTCATGGCGCCCTCGTCGCTGGGCGGGAATGCCTGGAACTGCGGCGACCGAC
TGTGGATCATCGACTGGATCGCGCCATTCTCGCGCGACGACAATCGTGCCTGCGCCGCG
CGCTGGCCGAACGGCACCCCGACAGCGTGGGCGGTTCCGCTGCGCGTTCGGCGCGGCGGCG
ACACCGCGCGCGTCAAGGAGTACCGAGGCCGCGCGCTGGACGCGGCCCGCCACTCGCGCGC
AGCTGGACCGCTACCATGCCGAACTGATCGCAGGACTGCGCGCGAGCAACGGCGGATACG
CGCCGCGAGGCCGGGGCACCGCCTAAGGATCCTCTAGAGCTTGATGCCCTGGCACGACA
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGT
TACGCAAACGCCGCCGACCGGGAGTCTGGCATCCCCGAGCCGTACTCGATGGCATCAAG
GCCGTGGCGAAGGAAAAAACGCCACATTGATGTTCCGCCTGGTCAACCCCCATTCCACC
AGCCTGATTGCCGAAGGGGTGGCCACCAAAGGATTGGGCGTGACGCCAAGTCGTCCGAT
TGGGGGTGTCAGGCGGGCTACATTCCCGTCAACCCGAATCTTCCAACTGTTTCGGCCGT
GCGCCCGAGGTGATCGCGCGGGCCGACAACGACGTCAACAGCAGCCTGGCGCATGGCCAT
ACCGCGGTGACCTGACGCTGTGAAAGAGCGGCTTGACTATCTGCGGCAAGCGGGCCTG
GTCACCGCATGGCCGATGGCGTGGTTCGCGAGCAACCACGCAGGCTACGAGCAGTTTCGAG
TTTCGCGTGAAGGAAACCTCGGACGGGCGCTATGCCGTGCAGTATCGCCGCAAGGGCGGC
GACGATTTTCGAGGCGGTCAAGGTGATCGGCAATGCCGCCGTATTCCACTGACGGCGGAT
GGATCCATCGACATGTTTCGCCATTATGCCGCATCTGTCCAATTCGCGCACTCGGCGCGC
AGTTCCGTGACCAGCGGCGATTCCGTGACCGATTACCTGGCGCGCACGCGGCGGGCCGCC
AGCGAGGCCACGGGCGGTGTACTCTCAATAATTAATTTGAAAAGCTTGTACACCTGGAT
CGCGAACGCATCGACTTGTGTGAAAAATCGCTCGCGCCGGCGCCCGTTCCGCAGTGGGC
ACCGAGGCGCGTCGCCAGTTCCGCTACGACGGCGACATGAATATCGGCGTGATCACCGAT
TTCGAGCTGGAAGTGCGCAATGCGCTGAACAGGCGGGCGCACGCCGTGGCGCGCAGGAC
GTGGTCCAGCATGGCACTGAGCAGAACAATCCTTCCCGGAGGCAGATGAGAAGATTTTC
GTCGTATCGGCCACCGGTGAAAGCCAGATGCTCACGCGCGGGCAACTGAAGGAATACATT
GGCCAGCAGCGCGGCGAGGGCTATGTCTTCTACGAGAACCGTGATACGGCGTGCGGGG
AAAAGCCTGTTTCGACGATGGGCTGGGAGCCGCGCCCGCGTGCCGAGCGGACGTTTCGAAG
TTCTCGCCGGATGTACTGGAACGGTGCCGGCGTCACCCGGATTGCGGCGGCCGTGCTG
GGCGCAGTGGAACGCCAGGATTCCGGCTATGACAGCCTTGATGGGGTGGGATCGCGATCG
TTCTCGTTGGGCGAGGTGTCCGACATGGCCGCCGTGGAAGCGGCGGAACCTGGAATGACC
CGGCAAGTCTTGACGCCCGGGCGCGGACGAGATGCCGAGCCGGGCGTGAGCGGTGCG
TCGGCGCACTGGGGGCGAGCGGGCGCTGCAGGGCGCCAGGCGGTGGCGGCGGCGCAGCGG
CTGGTTCATGCCATTGCCCTGATGACGCAATTCGGCCGGGCGGTTCCACCAACACGCCG
CAGGAAGCGGCCTCGTTGTGCGGCGGCCGTGTTCCGGCTTGGGCGAGGCCAGCAGCGCCGTG
GCCGAAACCGTGAGCGGTTTTTTCCGCGGCTTTCGCGCTGGGCCGGCGGTTTCGGCGTG
GCTGGCGGCGCGATGGCGCTGGGAGGCGGCATCGCCGCGGCCGTGGCGCCGGGATGTGCG
TTGACCGATGACGCGCCGGCCGGACAGAAGGCCGCCCGCGGAGCTCCGATCGCGCTGCAG
TTAACGGGTGGAACGGTCGAGCTGGCTTCTTCCATCGCGTTGGCGCTGGCCGCGGCGCGC
GGCGTGACCAGCGGCTTGACGGTGGCCGGGGCGTCGGCCGGGGCGGCTGCCGGCGCATTG
GCCGCGGCGCTCAGTCCCATGGAGATCTACGGCCTGGTGCAGCAATCGCACTATGCGGAT
CAGCTGGACAAGCTGGCGCAGGAATCGAGCGCATACGTTACGAGGGCGACGCTTGCTG
GCCAGCTGTATCGCGACAAGACGGCCGCCGAGGGCGCCGTGCGCGCGCTCTCCGCCGTG

图 13

CTGAGCACGGTGGGGGCGGCGGTGTCGATCGCCGCGGCGGCCAGCGTGGTAGGGGCCCGG
GTGGCGGTGGTCACTTCCTTGCTGACCGGGGCTCTCAACGGCATCCTGCGCGCGTGCAG
CAGCCCATCATCGAAAAGCTGGCCAACGATTACGCTCGCAAGATCGACGAGCTGGGCGGG
CCGCAAGCGTACTTCGAGAAAAACCTGCAGGCGCGTCACGAACAACCTGGCCAATTTCGGAC
GGCCTACGGAAAATGCTGGCCGACCTGCAGGCGCGTTGGAACGCCAGCAGCGTGATCGGG
GTGCAGACGACAGAGATCTCCAAGTCGGCGCTCGAACTGGCCGCCATTACCGGCAACGCG
GACAACTGAAATCCGTCGACGTGTTCTGTGGACCGCTTCGTCCAGGGCGAGCGGGTGGCC
GGCCAGCCGGTGGTCTCTGACGTGCGCCGCGGCGGCATCGATATCGCCAGCCGCAAGGGC
GAGCGGCCGGCGCTGACGTTTCATCACGCCGCTGGCCGCGCCAGGAGAAGAGCAGCGCCGG
CGCACGAAAACGGGCAGATCTGAATTCACCACATTTCGTGAGATCGTGGGCAAGCAGGAC
CGCTGGCGCATCCGGGACGGCGCGGCCGACACCACCATCGATCTGGCCAAGGTGGTGTCTG
CAACTGGTCGACGCCAATGGCGTGCTCAAGCACAGCATCAAACCTGGATGTGATCGGCGGA
GATGGCGATGACGTCTGTGCTTGCCAATGCTTCGCGCATCCATTATGACGGCGGCGCGGGC
ACCAACACGGTCAGCTATGCCGCCCTGGGTGCGACAGGATTCCATTACCGTGTCCGCCGAC
GGGGAACGTTTCAACGTGCGCAAGCAGTTGAACAACGCCAACGTGTATCGCGAAGGCGTG
GCTACCCAGACAACCGCCTACGGCAAGCGCACGGAGAATGTCCAATACCGCCATGTTCGAG
CTGGCCCCGTGTGGGCAAGTGGTGGAGGTGACACGCTCGAGCATGTGCAGCACATCATC
GGCGGGGCCGGCAACGATTCGATCACCGGCAATGCGCACGACAACCTTCCTAGCCGGCGGG
TCGGGCGACGACAGGCTGGATGGCGGCGCGGCAACGACACCCTGGTTGGCGGCGAGGGC
CAAAACACGGTCATCGGCGGCGCGGCGACGACGATATTCCTGCAGGACCTGGGGGTATGG
AGCAACCAGCTCGATGGCGGCGCGGCGTGCATACCGTGAAGTACAACGTGCACCAGCCT
TCCGAGGAGCGCCTCGAACGCATGGGCGACACGGGCATCCATGCCGATCTTCAAAGGGC
ACGGTCGAGAAGTGGCCGGCCCTGAACCTGTTACGCTCGACCATGTCAAGAATATCGAG
AATCTGCACGGCTCCCGCCTAAACGACCGCATCGCCGGCGACGACCAGGACAACGAGCTC
TGGGGCCACGATGGCAACGACACGATACGCGGCGCGGGCGGCGACGACATCTTCCTGCAGGACGAC
GGCCTGGGCCTGGACACGCTGTATGGCGAGGACGGCAACGACATCTTCCTGCAGGACGAC
GAGACCGTCAGCGATGACATCGACGGCGGCGCGGGGCTGGACACCGTCGACTACTCCGCC
ATGATCCATCCAGGCAGGATCGTTGCGCCGATGAATACGGCTTCGGGATCGAGGCGGAC
CTGTCCAGGGAATGGGTGCGCAAGGCGTCCGCGCTGGGCGTGGACTATTACGATAATGTC
CGCAATGTGCAAAACGTCATCGGTACGAGCATGAAGGATGTGCTCATCGGCGACGCGCAA
GCCAATACCCTGATGGGCCAGGGCGGCGACGATAACCGTGCAGCGGCGGCGACGGCGATGAT
CTGCTGTTTCGGCGGCGACGGCAACGACATGCTGTATGGCGACGCCGGCAACGACACCCTC
TACGGGGGGCTGGGCGACGATAACCTTGAAGGCGGCGCGGGCAACGATTGGTTTCGGCCAG
ACGCGAGGCGCGCGAGCATGACGTGCTGCGCGGCGGAGATGGGGTGGATACCGTCGATTAC
AGCCAGACCGGCGCGCATGCCGGCATTGCCGCGGGTCGCATCGGGCTGGGCATCCTGGCT
GACCTGGGCGCCGGCCGCGTGCACAAGCTGGGCGAGGCCGGCAGCAGCGCCTACGATACG
GTTTCCGGTATCGAGAACGTGGTGGGCACGGAACTGGCCGACCGCATCACGGGCGATGCG
CAGGCCAACGTGCTGCGCGGCGCGGGTGGCGCCGACGTGCTTTCGGGCGGCGAGGGCGAC
GATGTGCTGCTGGGCGGCGACGGCGACGACCAGCTGTTCGGGCGACGCCGGACCGCATCGC
TTGTACGGCGAAGCCGGTGACGACTGGTTCTTCAGGATGCCGCCAATGCCGGCAATCTG
CTCGACGGCGGCGACGGCCGCGATACCGTGGATTTACGCGGCCCGGGCCGGGGCCTCGAC
GCCGGCGCAAAGGGCGTATTCCTGAGCTTGGGCAAGGGTTTCGCCAGCCTGATGGACGAA
CCCGAAACCAGCAACGTGTTGCGCAATATCGAGAACGCCGTGGGCAGCGCGCGTGATGAC
GTGCTGATCGGCGACGCGAGGCGCAACGTCTCAATGGCCTGGCGGGCAACGACGTGCTG
TCCGGCGGCGCTGGCGACGATGTGCTGCTGGGCGACGAGGGCTCGGACCTGCTCAGCGGC
GATGCGGGCAACGACGATCTGTTTCGGCGGGCAGGGCGATGATACTTATCTGTTTCGGGGTC
GGGTACGGGCACGACACGATCTACGAATCGGGCGGCGGCCATGACACCATCCGCATCAAC
GCGGGGGCGGACCAGCTGTGGTTTCGCGCGCCAGGGCAACGACCTGGAGATCCGCATTCTC
GGCACCGACGATGCACTTACCGTGCACGACTGGTATCGCGACGCCGATCACCGGGTGGAA
ATCATCCATGCCGCCAACAGGCGGTAGACCAGGCAGGCATCGAAAAGCTGGTTCGAGGCA
ATGGCGCAGTATCCGGACCCCGGCGCGGCGGCGGCTGCCCCGCGGCGGCGCGCGTGCCG
GACACGCTGATGCAGTCCCTGGCTGTCAACTGGCGCTGAAGCGCCGTGAATCACGGCCCC
CCTGCCTCGCGCGGCGGCGCGCTCTCTTTGCGTTCTTCTCCGAGGTATTTCCCATCATGA

图 13(续)

ATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTA
ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCG
ATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGAAATTGTAAACGTTAATA
TTTTGTAAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAA
CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTT
GAGTGTGTTCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAA
AGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAG
TTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGATGCCCCGATT
TAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG
AGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGC
CGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA
ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCG
TGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAAC
GCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGA
GCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT
GAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC
CGCTTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCT
GAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGA
CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC
TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTA
ACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATT
TAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA
GTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGC
GCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTC
TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG
GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTT
TTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCC
TGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCG
AACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAG

图 13(续)

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGMNIG VITDFELEV R NALNRRHAV GAQDVVQHGT
301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQQRGE GYVIFYENRAY GVAGKSLFDD
361 GLGAAPGVPG GRSKSSPDVL ETVPASPLR RPSLGAVERQ DSGYDSL DGV GSRSFSLGEV
421 SDMAAVEAAE LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWGQ RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
481 LMTQFGRAGS TNTPQEAAASL SAAVFGLGEA SSAVAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
541 LGGGIAAAVG AGMSLTDDAP AGQKAAVGAE IALQLTGGTV ELASSIALAL AAARGVTSGL
601 QVAGASAGAA AGALAAALSP MEIYGLVQQS HYADQLDKLA QESSAYGYEG DALLAQLYRD
661 KTAAEGAVAG VSAVLSTVGA AVSIAAAASV VGAPVAVVTS LLTGALNGIL RGVQQPIIEK
721 LANDYARKID ELGGPQAYFE KNLQARHEQL ANSDGLRKML ADLQAGWNAS SVIGVQTTEI
781 SKSALELA AI TGNADNLKSA DVFVDRFIQG ERVAGQPVVL DVAAGGIDIA SRKGERPALT
841 FITPLAAPGE EQRRRTKTGK SEFTTFVEIV GKQDRWRIRD GAADTTIDLA KVVSQLVDAN
901 GVLKHSIKLE VIGGDGDDVV LANASRIHYD GGAGTNTVSY AALGRQDSIT VSADGERFNV
961 RKQLNNANVY REGVATQKTA YGKRTEENVQY RHVELARVGQ LVEVDLTLEHV QHIIGGAGND
1021 SITGNAHDNF LAGGAGDDRL DGGAGNDTLV GGEGHNTVVG GAGDDVFLQD LGVWSNQLDG
1081 GAGVDTV KYN VHQPSEERLE RMGDTGIHAD LQKGTVEKWP ALNLFSVDHV KN IENLHGSS
1141 LND SIAGDDR DNELWGDDGN DTIHGRGGDD ILRGGLGLDT LYGEDGNDIF LQDDETVSDD
1201 IDGGAGLDTV DYSAMIHAGK IVAPHEYGFG IEADLSEGWV RKAARRGMGY YDSVRSVENV
1261 IGTS MKDVLI GDAQANTLMG QGGDDTVRGG DGDDL LFGGD GNDMLYGDAG NDTLYGGLGD
1321 DTLEGGAGND WFGQTPAREH DVLRGGAGVD TVDYSQAGAH AGVATGRIGL GILADLGAGR
1381 VDKLGEAGSS AYDTVSGIEN VVGTELADRI TGDAQANVLR GAGGADVLAG GEGDDVLLGG
1441 EGDDQLSGDA GRDRLYGEAG DDWFFQDAAN AGNLLDGGDG NDTVDFSGPG RGLDAGAKGV
1501 FLSLGKGFAS LMDEPETS NV LRHIENAVGS VRDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD
1561 DVLLGDEGSD LLSGDAGNDD LFGGQGGDDTY LFGAGYGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
1621 W FARQGNLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEAIIHAAN QAIDPAGIEK LVEAMAQYPD
1681 PGAAAAAPPA ARVPDTLMQS LAVNWR

图 14

```

1  MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61  GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGMNIG VITDFELEV R NALNRRAHAV GAQDVVQHGT
301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQQRGE GYVIFYENRAY GVAGKSLFDD
361 GLGAAPGVPS GRSKFSPDVL ETVPASGLR RPSLGAVERQ DSGYDSL DGV GSRSFSLGEV
421 SDMAAVEAAE LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWGQ RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
481 LMTQFGRAGS TNTPQEAAASL SAAVFGLGEA SSAVAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
541 LGGGIAAAVG AGMSLTDDAP AGQKAAAGAE IALQLTGGTV ELASSIALAL AAARGVTSGL
601 QVAGASAGAA AGALAAALSP MEIYGLVQQS HYADQLDKLA QESSAYGYEG DALLAQLYRD
661 KTAAEGAVAG VSAVLSTVGA AVSIAAAASV VGAPVAVVTS LLTGALNGIL RGVQQPIIEK
721 LANDYARKID ELGGPQAYFE KNLQARHEQL ANSDGLRKML ADLQAGWNAS SVIGVQTTEI
781 SKSALELA AI TGNADNLKSV DVFVDRFVQG ERVAGQPVVL DVAAGGIDIA SRKGERPALT
841 FITPLAAPGE EQRRRTKTGK SEFTTFVEIV GKQDRWRIRD GAADTTIDLA KVVSQLVDAN
901 GVLKHSIKLD VIGGDGDDVV LANASRIHYD GGAGTNTVSY AALGRQDSIT VSADGERFNV
961 RKQLNNANVY REGVATQTTA YGKRTEENVQY RHVELARVGQ LVEVDLTLEHV QHIIGGAGND
1021 SITGNAHDNF LAGGSGDDRL DGGAGNDTLV GGEGQNTVIG GAGDDVFLQD LGVWSNQLDG
1081 GAGVDTV KYN VHQPSEERLE RMGDTGIHAD LQKGTVEKWP ALNLFSVDHV KN IENLHGSR
1141 LNDRIAGDDQ DNELWGH DGN DTIRGRGGDD ILRGGLGLDT LYGEDGNDIF LQDDETVSDD
1201 IDGGAGLDTV DYSAMIHPGR IVAPHEYGFG IEADLSREWV RKASALGV D YDNVRN VENV
1261 IGTSMKDVLI GDAQANTLMG QGGDDTVRGG DGDDL LFGGD GNDMLYGDAG NDTLYGGLGD
1321 DTLEGGAGND WFGQTQAREH DVL RGGDGVD TVDYSQTGAH AGIAAGRIGL GILADLGAGR
1381 VDKLGEAGSS AYDTVSGIEN VVGTELADRI TGDAQANVLR GAGGADVLAG GEGDDVLLGG
1441 DGDDQLSGDA GRDRLYGEAG DDWFFQDAAN AGNLLDGGDG RDTVDFSGPG RGLDAGAKGV
1501 FLSLGKGFAS LMDEPETS NV LRNIENAVGS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD
1561 DVLLGDEGSD LLSGDAGNDD LFGGQGDDTY LFGVG YGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
1621 W FARQGN DLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEIIHAAN QAVDQAGIEK LVEAMAQYPD
1681 PGAAAAAPPA ARVPDTLMQS LAVNWR

```

图 15

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVPNPHSTSL IAEGVATKGL
 61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
 121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
 181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
 241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGMNIG VITDFELEV RALNRRRAHAV GRQDVVQHGT
 301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQORGE GYVFIENRAY GVAGKSLFDD
 361 GLGAAPGVPG RRSKSSPDVL ETVPASPGLR RPSLGAVERQ DSGYDSLQDV GSRFSLSLGEV
 421 SDMAAVEAAB LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWQO RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
 481 LMTQFGRAGS TMTQEAASL SAAVFGLGEA SSAVAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
 541 LGGGIGAVGA GMSLTDDAPA GQKAAAGAEI ALQLTGGTVE LASSIALALA AARGVTSGLQ
 601 VAGASAGAAA GALAAALSPM EITYGLVQOSH YADQLDKLAQ ESSAYGYEGD ALLAQLYRDK
 661 TAAEGAVAGV SAVLSTVGAA VSIAAAASV GAPVAVVTS L TGALNGILR GVQQPIIEKL
 721 ANDYARKIDE LGGPQAYFEK NLQARHEQLA NSDGLRKMLA DLQAGWNASS VIGVQTTTEIS
 781 KSALELAAIT GNADNLKSAD VFVDRFIQGE RVAGQPVVLD VAAGGIDIAS RKGERPALTF
 841 ITPLAAPGER QRRRTKTGKS EFTTFVEIVG KQDRWRIRDG AADTTIDLAK VVSQLVLDANG
 901 VLKHSIKLEV IGGDGDVVVL ANASRIHYDG GAGTNTVSYA ALGRQDSITV SADGERFNV
 961 KQLNNANVYR EGVATQKTAY GKRTENVQYR HVELARVGQL VEVDLTLEHVQ HIIGGAGNDS
 1021 ITGNAHDNFI AGGAGDDRLD GGAGNDTLVG GEGHNTTVVG AGDDVFLQDL GVWSNQLDGG
 1081 AGVDTVYKYNV HOPSEERLER MGDGTGIHADL QKGTVEKWPA LNLFSVDHVK NIENLHGSSL
 1141 NDSIAGDDRD NELWGDDGND TIHGRGGDDI LRGGGLGLDTL YGEDGNDIFL QDDETVSDDI
 1201 DGGAGLDTVD YSAMIHAGKI VAPHEYGFGI EADLSEGWVR KAARRGMDYY DSVRSVENVI
 1261 GTSMKDVLIG DAQANTLMGQ GGDDTVRGGD GDDLLFGGDG NDMLYGDAGN DTLYGGGLGDD
 1321 TLEGGAGNDW FGQTPAREHD VLRGGAGVDT VDYSQAGAHA GVATGRIGLG ILADLGAGRV
 1381 DKLGEAGSSA YDTVSGIENV VGTTELADRI GDAQANVLRG AGGADVLAGG EGDDVLLGGD
 1441 GDDQLSGDAG RDRLYGEAGD DWFFQDAANA GNLLDGGDGN DTVDFSGPGR GLDAGAKGVF
 1501 LSLGKGFASL MDEPETS NVL RHIE NAVGSV RDDVLIGDAG ANVLNGLAGN DVLSCGAGDD
 1561 VLLGDEGSDL LSGDAGNDDL FGGQGGDTYL FGAGYGHDTI YESGGGHDTI RINAGADQLW
 1621 FARQGNLEI RILGTDDALT VHDWYRDADH RVEAIIHAANQ AIDPAGIEKL VEAMAQYPPD
 1681 GAAAAAPPAA RVPDTLMQSL AVNWR

图 16