

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/02

A61K 39/29

G01N 33/576 C12N 15/51

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95191963.6

[45]授权公告日 2000 年 10 月 25 日

[11]授权公告号 CN 1057774C

[22]申请日 1995.2.2 [24]颁证日 2000.7.28

[21]申请号 95191963.6

[30]优先权

[32]1994.2.2 [33]GB [31]9401987.4

[86]国际申请 PCT/GB95/00208 1995.2.2

[87]国际公布 WO95/21189 英 1995.8.10

[85]进入国家阶段日期 1996.9.4

[73]专利权人 科技医药皇家学院

地址 英国伦敦

[72]发明人 P·卡拉伊安尼斯 H·C·托马斯

[56]参考文献

EP0511855 1992.11.4 C12N15/51

WO94/26904 1994.11.24 C12N15/51

审查员 黄 赤

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 乙型肝炎疫苗

[57]摘要

本发明公开了表现出乙型肝炎病毒表面抗原抗原性的变体和所谓的“逃逸突变体”HBsAg 蛋白质或其片段,中所述的突变体蛋白质或其片段(mHBs Ag)包含修饰的“a”决定簇,在该决定簇中至少有两个氨基酸插入到野生型 HBsAg 序列的下游位置(122)。本发明也提供了一种包含 mHBsA g 的疫苗,一种用于诊断性体外检测抗 - mHBsAg 抗体的试剂盒和包含抗 - mHBsAg 抗体的抗体制剂。

ISSN 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种修饰的乙型肝炎表面抗原蛋白质 (mHBsAg), 其中所说的 mHBsAg 具有 HBV 表面抗原 (HBsAg) 的抗原性并且其中所说的 mHBsAg 包括抗原修饰的包膜区, 在该区中精氨酸和丙氨酸, 分别地, 或者精氨酸、甘氨酸和丙氨酸, 分别地插入在 HBsAg 序列的位置 122 和 124 之间。

2. 如权利要求 1 中所要求的 mHBsAg, 除了在 HBsAg 序列的密码子位置 122 和 124 之间分别插入精氨酸和丙氨酸之外, 该 mHBsAg 与野生型 HBsAg 相同。

3. 如权利要求 1 中所要求的 mHBsAg, 除了在 HBsAg 序列的密码子位置 122 和 124 之间分别插入精氨酸、甘氨酸和丙氨酸之外, 该 mHBsAg 与野生型 HBsAg 相同。

4. 如权利要求 1 中所要求的 mHBsAg, 其中所说的 mHBsAg 包括前 - S 序列。

5. 一种表达载体, 该载体包含编码按照权利要求 1 到 4 之任一项目的 mHBsAg 的 DNA 序列。

6. 用权利要求 5 的载体转化的宿主。

7. 一种用于在人体中刺激针对变异乙型肝炎病毒的抗体产生的疫苗组合物, 该组合物包含与合适的载体或佐剂混合的有效量的权利要求 1 - 4 之任一项中要求的 mHBsAg。

8. 一种制备权利要求 1 到 4 要求的 mHBsAg 的方法, 该方法包括以下步骤: 在合适的培养基中培养按照权利要求 6 的宿主, 将产生的 mHBsAg 纯化至所需的纯度。

9. 按照权利要求 1 - 4 之任一项目的 mHBsAg 在制造用于保护人体免除与变体 HBV 感染相关的疾病的疫苗上的用途。

10. 一种用于在生物介质中诊断性体外检测抗 mHBsAg 抗体的试剂盒, 其特征在于该试剂盒包含:

(a) 按照权利要求 1 - 4 之任一项目的 mHBsAg; 和

(b) 适于检测抗原 - 抗体反应的工具。

11. 一种用于诊断、预防或治疗人体中乙型肝炎感染的抗体制剂，该制剂包含针对权利要求 1 到 4 之任一项所限定的 mHBsAg 的抗体。

乙型肝炎疫苗

本发明涉及编码对乙型肝炎病毒抗原有特异性的多肽的重组 DNA 分子。

更具体地说，本发明涉及用于在人体中刺激针对变异乙型肝炎病毒的抗体产生的疫苗组合物。

乙型肝炎病毒粒子不同血清型基因组的克隆方法是本领域熟知的 (Miller et al.)。丹氏粒是乙型肝炎病毒粒子，可以从被感染的病人分离，它具有约 42nm 的直径。各个粒子由包含乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的色膜、衣壳 (HBcAg)、内源性聚合酶和 DNA 基因组组成。第三种多肽“e”抗原 (HBeAg) 由乙型肝炎病毒产生，以溶解的形式在血清中发现。

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是一个严重的广泛存在的问题，但用于公众免疫接种的疫苗目前是可广泛获得的。市售的抗 HBV 疫苗包括天然或重组形式的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)。真正的 (或野生型) 乙型肝炎表面抗原可以从感染个体的血浆中以包含两种蛋白质的约 22nm 粒子回收，所述的蛋白质称作 P24 和其糖基化衍生物 GP28，它们两者都被 HBV 基因组上的 226 个氨基酸编码序列编码，所述编码序列称作 S 蛋白质编码序列或 HBV S - 基因 (Tiollais et al., (1985))。Valenzuela et al., Nature 280 815 (1979) 中给出了 HBsAg 的完整氨基酸序列和编码核苷酸序列。本文中采用 Tiollais et al. 使用的指定核苷酸和氨基酸位置的编号系统。

Harford et al., Develop. Biol. Standard 54 125 (1983)、Valenzuela et al., Nature 298 347 (1982) 和 Bitter et al., J. Med. Virol. 25 123 (1988) 已描述了在表达载体上在酵母启动子控制下插入 HBV S - 基因编码序列以便能够在啤酒糖酵母中表达用于制备疫苗的 HBsAg 的方法。Gregg et al., Biotechnology 5 479 (1987) 已描述了在巴斯德毕赤氏酵母中的表达方

法（也参见欧洲专利出版物 0226846），其 在多形汉逊氏酵母中也有表达（欧洲专利出版物 0299108）。

也已从包含 HBsAg 蛋白质的杂种免疫原性粒子（欧洲专利出版物 0278940 描述）制备疫苗。这些免疫原性粒子可以含有，例如，HBsAg 前体蛋白的全体或部分，所述前体蛋白被 HBV 基因组上紧靠在 HBV - S 基因前边的编码序列（本文称作前 - S 编码序列）编码。该前 - S 编码序列通常编码 163 个氨基酸（在 ay HBV 亚型的情况下），并且包含前 - S1 编码序列和前 - S2 编码序列。后者编码 55 个氨基酸，并且紧靠在 S 蛋白质编码序列的前边（欧洲专利出版物 0278940）。

HBV - DNA 的表面抗原（S 抗原）开放读框分成三个区：前 - S1、前 - S2 和 S。它编码 HBV 的三种包膜蛋白质，称作大的、中等的和主要的蛋白质。主要的蛋白质 HBsAg 由 226 个氨基酸组成，并由 S 基因编码（Tiollais et al., (1981); Tiollais et al., (1987) 和 Leu et al.）。所有三种包膜蛋白质都含有 HBsAg 抗原位点，并且易于由常规的 HBsAg 免疫测定方法检测。这些免疫测定方法广泛用于诊断 HBV 感染和筛选全球供血者。HBsAg 反应性取决于氨基酸 124 - 147 亲水区（定义为“a”决定族（Ashton-Rickardt et al. 和 Brown et al.））的结构构象。这一点对所有 HBV 亚型是共同的，其抗体赋予针对任何亚型再感染的保护作用。

在高度严格条件下与 HBV 探针杂交的 HBV - DNA 序列已表现在血清 HBsAg 阴性受试者的肝脏、血清和血单核细胞中（Brechot et al. (1985) 和 Thier et al.）。来自不同实验室的最近的研究成果（使用斑点印迹杂交或聚合酶链反应（PCR））证实了 HBV DNA 序列在 HBsAg 阴性受试者血清中的存在。PCR 技术的发展已使得可以检测许多病人中 HBV 复制的非常低的水平，并可以对许多分离物（已在某些病毒分离物中识别遗传变异）测序（Carman et al., (1990); Brechot et al., (1991) Blum et al.）。在 HBV 高流行的台湾和撒丁岛，1.7% 和 0.3% 的 HBsAg 阴性健康供血者在他们的血清中具有斑点杂交印迹杂交可检测的 HBV DNA（Lai et al., (1989) 和 Sun et al.）。在中国大陆在抗 - HB - 阳性个体中使用 PCR 的分子流行病学研究表明具有不可检测 HBsAg 的 HBV 载体的存在，总共占中国总人口的 3 %（Luo et al.）。

HBV 的抗原亚型由血清学定义，已显示出由基因组 HBsAg 编码区中单个碱基的变化引起 (Okamoto et al.)。然而，所有目前已知的抗原亚型含有由 HBsAg 的氨基酸 124 到 147 组成的“a”决定簇。“a”决定簇的抗体赋予针对所有亚型的保护作用。体外突变已表明在 147 位的半胱氨酸和在 142 位的脯氨酸对显示“a”决定簇的全抗原性是重要的 (Ashton-Rickardt et al.)。

此外，Howard Thomas 和 William Carman 在 WO 91/14703 中详细描述了在 HBV 感染母亲生下的接种儿童中的 HBsAg 片段变体。测序揭示了导致 HBsAg “a”决定簇中 145 位上甘氨酸到精氨酸的氨基酸变化的在核苷酸位置 587 上的鸟苷到腺苷的点突变 (也参见 Carman et al.,(1990))。已报道了类似的 HBV 突变体在体液免疫压下被主动 (疫苗) 或被动 (超免疫球蛋白) 诱导的在宿主中的复制 (Okamoto et al.,(1992) 和 McMahon et al.)。然而，在某些这类病人的血清中用常规的免疫测定方法检测的 HBsAg 和抗 HBs (疫苗诱导的) 两者的持续存在说明突变不引起抗原性的完全丧失 (Carman et al.,(1990), Okamoto et al.,(1992) 和 McMahon et al.)。

从治疗学和流行病学的观点看，研究来源于在标准测定试验中无任何 HBsAg 反应的受试者的 HBV 的分子特征更重要。从 HBeAg、HBV - DNA 以及抗 HBs 阳性的日本病人获得的测序结果表明，前 - S2 区氨基酸 9 到 22 被缺失，而前 S2 的 3 和 8 位上的氨基酸以及 HBs “a”决定簇的第一环的 126、131 和 133 位上的氨基酸被取代 (Moriyaa et al.)。从另一种分离物推定的氨基酸序列的分析揭示了主要 HBs 蛋白质的 3、53 和 210 位上的取代，所有这些都在普通“a”决定簇之外，且不能真正地解释在血清中缺少 HBsAg (Liang et al.)。

在过去的十年中，已描述了几种推定的乙型肝炎病毒的变体或突变体。例如，McMahon 等已描述了在用抗 HBsAg 单克隆抗体治疗的肝移植病人的推定的单克隆抗体结合域 (由 DNA 序列分析推断) 中精氨酸对甘氨酸的取代 (Cold Spring Harbor Symposium on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, September, 1989)。

在 Carman et al. 的研究和专利申请 WO 94/26904 的主题中，突变

体乙型肝炎病毒具有修饰的“a”决定簇，其中两种特异性氨基酸（天冬酰胺和苏氨酸）被插入到 HBsAg 序列的 122 位上。此外，145 位上的突变（由甘氨酸取代野生型精氨酸）也详细列在氨基酸序列表中。

在另一份报告中，尽管在用两种许可使用的乙型肝炎疫苗之一免疫接种后存在特异性抗体（抗-HBs），儿童和成年人中还是发现带有循环乙型肝炎表面抗原（表明病毒复制）（Zanetti et al.）。用单克隆抗体对 HBsAg 的分析揭示所述循环抗原不携带“a”决定簇或者这一决定簇被隐蔽起来。由此得出结论，已检测到乙型肝炎病毒变体的出现，可能由于与感染流行区免疫接种有关的流行病学压力。然而，没有进一步确定所述变体的特征。

从 Zanetti 等的工作可以清楚地看出，目前所能获得的乙型肝炎疫苗的最大的缺点是它们可以（至少在具有素因性免疫遗传特性的宿主中）引起出现“逃逸突变体”，即复制已突变而不受中和性免疫反应影响的感染性病毒。这样一种变体病毒明显具有引起发生疾病的能力，并且可以认为是可以传递的。因为它不被基于普通 HBsAg 的疫苗产生的抗体有效地中和，所以该变体病毒可以引起严重的免疫问题。已描述了 HBV 的其它突变，但有关其改变的抗原性的意义并不清楚（Moriyama et al. 和 Lai et al., (1990)）。

使用 PCR 在中国 HBV 感染高流行区最近的研究表明，30 - 40 % 的具有不明原因肝硬化、慢性活动性肝炎（CAH）或慢性迁延性肝炎（CPH）的 HBsAg 阴性病人在其血清或肝组织中具有复制的 HBV - DNA（Zhang et al.）。这些研究表明，在中国人群中存在一种 HBV 变体，以血清中不可检测的 HBsAg 为特征。令人惊奇的是，这样一种推定的突变体从来没有在分子水平上确定特征。

从我们的中国病人（即无任何可检测的 HBsAg 的病人）获得的分离物是一些插入突变体，其中额外氨基酸插入到就在“a”决定簇之前的密码子 122 和 124 之间。这一序列变异在任何已知的 HBV 亚型中以前没有描述，并且在相同区的 30 个 HBsAg 阳性中国病人中没有发现。有趣的是注意到发生插入的区是重要的 HBsAg 表位区。发现插入序列就在决定亚型决定簇（d）的密码子 122 的下游，并且就在“a”决定簇的

上游。所有在密码子位置 122 之前和之后的核苷酸和氨基酸序列详细描述在野生型 HBV 中(图 6 和 7)。在不能与有关的理论联系上的情况下,我们相信这一突变引起影响“a”决定簇和“d”亚型表位的构象变化。一种很大的可能性是氨基酸的插入通过影响“a”决定簇的两环的空间结构改变表位。另一种可能性是由单克隆抗体限定(Waters *et al.*)的“a”决定簇的第一环可以包括(比原来认为的)更上游的氨基酸。我们认为这些氨基酸被按以前提出的(Waters *et al.*和 Ashton-Richardt *et al.*) 122 而不是 124 上游的二硫键形成。所述插入的氨基酸会增加环从 14 到 16 或 17 氨基酸的长度,从而改变这一环的构象,阻止中和抗体结合。

在本发明中,我们描述了从中国病人分离的 HBV 的新变体或“逃逸突变体”,所述中国病人的血清在用斑点印迹杂交分析时为 HBV - DNA 阳性,而用市售多克隆抗体进行免疫试验时为 HBsAg 阴性。此外,本发明克服了或至少减少了与已知 HBV 疫苗相关的缺点(这些疫苗对这些新发现的突变体无效)。

本发明给出了新查明的 HBV 突变体的特征,所述突变体在 HBV 包膜区紧靠位置 122 下游至少有两个氨基酸插入。本发明提供了在试验样品中测定突变 HBV 存在的方法,以及在这些方法中有用的试剂。本发明的各方面提供了“a”决定簇的修饰,其中在 HBsAg 序列 122 位下游有至少 2 个氨基酸插入,相应于 HBsAg 基因组核苷酸 519 下游至少 6 个核苷酸的插入。

得自突变 HBV 的核苷酸序列或其部分作为测定试验样品中突变 HBV 存在的探针是有用的。所述序列也使得可获得在这种突变 HBV 基因组内编码的突变 HBV 抗原的多肽序列,并允许产生作为诊断试验中的标准或试剂和/或作为疫苗组分有用的多肽。针对包含在这些多肽序列内的表位的单克隆和多克隆抗体对诊断试验以及治疗剂,筛选抗病毒剂和分离突变 HBV(所述核酸序列从其获得)也是有用的。

将要理解的是,如果需要,这一突变 HBsAg 也可以包括前-S 序列。

按照本发明的变体 HBsAg 蛋白质或其片段此后缩写为

“mHBsAg”。

将意识到，这些 mHBsAg 突变体不是“天然产生”的形式，而是合成的和高度纯化的物质，不含血产物。

本发明中描述的较好的这些突变体相当于全长 HBsAg，并且除了在 122 位下游插入至少两个氨基酸残基外，与野生型 HBsAg 相同。

优选的 HBsAg 突变体为高度纯化的形式，比如为纯度大于 75%，更优选的大于 90%，最优选的为 95 - 100 % 的状态。

本发明另一方面提供了包含免疫保护量的这些 HBsAg “逃逸突变体”以及合适载体的疫苗组合物。

此后描述本发明的其它方面。

本发明的 mHBsAg 和疫苗可以用于克服由出现以上定义的“逃逸突变体（其中，紧靠病毒 HBsAg "a" 决定簇上游的区（包膜区）已进行修饰）产生的问题。特别是，本发明的疫苗具有可以用于抵抗和阻止变体 HBV 的出现或传播，所述变体 HBV 被定义为在 HBsAg 氨基酸序列中具有修饰的 HBV 包膜区，其中至少有两个插入到 122 位下游的氨基酸。

因此，本发明也提供了一种保护人体使其免受与所说变体 HBV 感染相关的病症折磨的方法，该方法包括给人体施用安全有效量的按照本发明的疫苗。

本发明另一方面提供了用于治疗，尤其是预防的 mHBsAg。

本发明也提供了 mHBsAg 在制造疫苗组合物上的用途，所说疫苗组合物用于保护人体抵抗与所说变体 HBV 感染相关的病症。

当用于抗存在的变体 HBV 病毒的人体免疫时，疫苗中的 mHBsAg 序列通常比得上或抗原性等同于变体 HBV 病毒中 mHBsAg 序列是合意的。

在本发明的 mHBsAg 中 122 位后插入的优选的氨基酸残基是可以由插入六个或更多个核苷酸衍生的那些。编码额外氨基酸的插入核苷酸可以影响普通 HBsAg 中密码子 123 的 3 个核苷酸的任何一个。

从理论上说，改变包膜蛋白亲水性的任何突变都能引起改变的抗原性和出现变体 HBV。野生型的亲水性和突变体的亲水性在这一区是很不相同。这里所述的亲水性降低常常与抗原性丧失相关联。所述突变体在

第一环中的增加的疏水性也可以产生在包膜脂质中主要蛋白质的改变的蛋白质，从而对构象具有很大的影响。

在本发明的一个优选的实施方案中，普通 HBsAg 122 位之后的残基可以降低“a”决定簇的亲水性。

在本发明的另一个优选的实施方案中，所述 mHBsAg 除了在 122 位下游插入至少两个氨基酸残基外，与普通（野生型）HBsAg S-蛋白质相同。

在本发明的一个特别优选的实施方案中，122 位下游的修饰是分别插入精氨酸，然后是丙氨酸。另一种优选的是，可以以那种顺序在 122 位下游插入精氨酸、甘氨酸和丙氨酸。

本发明各方面优选的特征在细节上作必要的修改后是本发明的其它各方面。

现在，本发明将由下列实施例说明。所述实施例涉及附图，其中：

图 1 说明 1 号病人的系列血清转氨酶（ALT）水平。正常水平在 $40 \text{ i } \mu/\text{L}$ 以下。在各时间点测定血清 HBV 标记。1992 年 8 月由 PCR 发现 HBV DNA，而未测得 HBsAg 和其它 HBV 标记。

图 2 说明 2 号病人的系列血清 ALT 水平以及血清乙型肝炎病毒标记。缩写 W 表示野生型，M 表示突变体。

图 3 是表面基因开放读框（PCR 和测序引物的位置）和重叠聚合酶开放读框（PORF）的图示说明。黑圈代表起始和终止密码子，而有阴影的方块表示与“a”决定簇相关的插入热点（522 - 593 位）。核苷酸编号从如出版的 HBV DNA 序列中的假拟的 EcoRI 位点开始，因为本发明的分离物不具有 EcoRI 位点。

图 4 表示在 PCR 产物的直接测序后与野生型（中间）比较在分离物 1 和 2（左边和右边）中核苷酸插入的放射自显影。箭头表示插入点。

图 5 表示与野生型（adw）比较的分离物 1 和 2 的核苷酸和氨基酸序列。插入序列的下面划线。

图 6 说明 mHBsAg 分离物 1 的完整的核苷酸序列。上面的序列代表突变 HBsAg 分离物表面基因和“a”决定簇的序列，下面的序列代表野生型序列。（…）代表氨基酸插入位点。

图 7 说明 mHBsAg 分离物 2 的完整的核苷酸序列。上面的序列代表突变 HBsAg 分离物表面基因和“a”决定簇的序列，下面的序列代表野生型序列。（…）代表氨基酸插入位点。

表 1 描绘了用于聚合酶链反应和测序反应的合成寡核苷酸引物。

表 2 说明以 adw 野生型为对照，1 号和 2 号病人血清 HBsAg 与单克隆抗体的阳性/阴性结合率。

表 3 给出了与以前出版过的野生型序列（adw）和来源于与野生型相同区的中国分离物比较的突变 S 基因的核苷酸和氨基酸序列同源性。

HBV 突变更普遍地在以连续的碱基为特征的序列的特别区域中发现。在研究中，所述的插入与连续四个腺嘌呤相关。这一区域看来是在某些来源于中国 HBsAg 阴性 HBV 携带者的分离物中插入的“热点”。

本发明另一方面提供了制备 mHBsAg 和由此获得的疫苗组合物的方法。

mHBsAg 优选地由合成法（经肽合成或更优选地经重组 DNA 技术）获得。

构建、操作和检定重组 DNA 分子和序列的方法是本领域公知的。为了修饰 HBsAg 的 HBV S 蛋白质并获得本发明的 mHBsAg，将密码子 CGG 和 GCA，或分别编码精氨酸和丙氨酸的其它三联密码子组合插入到 122 位下游是合乎需要的。也可以将密码子 CAC、GGG 或 GCG，或者分别编码精氨酸、甘氨酸和丙氨酸的其它三联密码子组合插入到 122 和 124 位核苷酸之间。

可以获得引起序列合适变化的几种方法。一种合适的方法是经亚磷酸酯或亚磷酰胺化学，利用病毒或酵母密码子频率完全从头合成所需编码序列。

合成 DNA 可以经商业途径从几个公司获得。这种基因合成的一个例子由 Hayden 和 Mandecki 在 DNA 7: 571 (1988) 中描述，此文作为参考。

第二种方法是如 Botstein and Shortle, Science 229 1193(1982)所述的在单链载体上从已包含 HBV 基因组的载体克隆合适的限制片段，然后进行位点特异性体外诱变。大肠杆菌 K12 菌株 C600 按照布达佩斯条约

于 1982 年 6 月 2 日保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号为 ATCC 39132。该菌株含有重组质粒 pRIT 10601 所述质粒包含克隆在 pBR 322 上的 ay 亚型的 HBV 基因组。可以用标准的重组 DNA 技术从这种克隆切下编码 S - 基因指定的 226 个氨基酸 HBsAg 蛋白质的序列或编码前 S 多肽的更长的序列。

一种合适的限制片段是来源于 pRIT 10601 S - 基因编码区内的 575bp XbaI-AccI 片段。体外诱变有用的载体系统是商业上可获得的。由此获得的突变基因片段被再插入到 S - 基因中。

第三种方法是如 Ho et al., Gene 77 51 (1989) 描述的用聚合酶链反应 (PCR) 技术进行所需的突变性改变。

在各种情况下 mHBsAg 编码序列可以在任何合适宿主中合适启动子的控制下表达。

包含编码 mHBsAg 的 DNA 序列的表达载体是新的，并且构成本发明的另一方面。用所述表达载体转化的宿主构成本发明的另一方面。

在优选的一面，啤酒糖酵母、巴斯德毕赤氏酵母或多形汉逊氏酵母可以用作宿主，并且在母启动子，例如酵母 TDH3 启动子 (3 - 磷酸甘油醛脱氢酶基因，参见 Valenzuela et al., 1982; Bitter et al., 1988) 或 PH05 (Miyanohara et al., 1983)、MOX、FMDH (参见 EP - A - 0 299 108) 和 AOX (参见 EP - A - 0 22 6846) 控制下表达。

可用常规方法培养或发酵转化的宿主以及提取和纯化 mHBsAg。从 mHBsAg 酵母细胞纯化 HBsAg 的方法是本领域公知的，可以按照美国专利 4, 649, 192、4, 683, 294、4, 694, 074 或 4, 738, 926 的任何方法进行。本发明的 mHBsAg 的纯化用类似的方式进行。

用常规技术制备包含 mHBsAg 的疫苗，该疫苗含有免疫保护量的 mHBsAg，mHBsAg 最好在缓冲生理盐水中，并且用任何各种已知的佐剂 (包括氢氧化铝和磷酸铝) 搀混或吸附。“免疫保护的”一词指施用足量的 mHBsAg，使得产生足量的保护性抗体或细胞介导的免疫反应，给出针对感染因子的保护作用，而无严重的副作用。待施用的 mHBsAg 的量取决于疫苗是否含佐剂，一般包含 1 ~ 100mcg 的蛋白质。优选的是使用 1 ~ 200mcg 的蛋白质，更优选的是 5 ~ 40mcg 的蛋白质。待施用

的剂量可以由涉及观察受治疗者中抗体滴度和其它应答的标准剂量范围研究确定。

所述 mHBsAg 也可以与其它 HBsAg (例如, 普通的 HBsAg 或同源的或复合的 HBsAg 包含用于疫苗配方的全部或部分前 S1 或前 S2 多肽的颗粒混合。它也可以与携带有其它生物体蛋白质表位的杂交 HBsAg 颗粒, 和与其它免疫原混合, 以形成二价或多价疫苗。"Vaccines", edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, MD, U.S.A., 1978 中一般性地描述了疫苗制备方法。

所述 mHBsAg 作为免疫学试剂包含在用于变体 HBV 病毒感染等的检测试剂盒中是有用的。它也可以用于用已知方法产生多克隆和单克隆抗体, 该单克隆抗体中的某些可能是对变体抗原特异性的, 并且不识别普通 HBsAg。

在本发明的另一个实施方案中, 与包含突变 HBV 抗体和其复合物发生免疫反应的多肽和产生的针对这些多肽中的突变 HBV 特异性表位的抗体在检测生物试验样品中突变 HBV 抗体存在或病毒和/或病毒抗原存在的免疫测定中是有用的。可以变化这些免疫测定的方案, 这些变化是本领域公知的, 其中一种变化已在本文中描述。所述免疫测定可以使用一种病毒抗原, 例如, 得自含有突变 HBV 核酸序列的任何克隆的多肽, 或得自这些克隆中突变 HBV 核酸序列的复合核酸序列的多肽, 或得自衍生这些克隆中核酸序列的突变 HBV 基因组的多肽。或者, 所述免疫测定可以使用这些来源的病毒抗原的组合。可以使用例如针对相同病毒抗原的单克隆抗体, 或者针对不同病毒抗原的多克隆抗体。测定可以包括但不限于基于竞争、直接反应或夹心面包型测定的那些测定。测定可以使用固相或者可以经免疫沉淀或不采用固相的任何其它方法完成。本文描述了使用作为信号产生化合物的标记的测定的例子和那些标记。也可以用如未决美国专利申请 608, 849, 070, 647, 418, 981 和 687, 785 中描述的生物素和抗生物素蛋白、酶标记或生物素抗生物素系统扩增信号。包括突变 HBV 免疫显性区表位的重组多肽在感染病人的生物试验样品中检测病毒抗体上是有用的。也期望抗体在辨别急性和非急性感染中是有用的。通过包装合适的材料与进行测定所需的其它试剂和

材料，以及合适的测定说明构建适用于免疫诊断并含有合适的反应剂的试剂盒，所述材料包括本发明的含有突变 HBV 表位的多肽或在合适容器中的针对突变 HBV 表位的抗体。

本发明优选的一面提供了用于接种后体外诊断检测生物介质中抗 mHBsAg 抗体，特别是中和抗体的试剂盒，其特征在于它包括：

- a) 本文所限定的 mHBsAg，和
- b) 用于检测抗原 - 抗体反应的方法。

本发明另一方面提供了用于诊断、预防或治疗人乙型肝炎感染的包含抗 - mHBsAg 抗体的抗体制剂。也提供了用有效量的这种抗 - mHBsAg 抗体处理人以预防或治疗乙型肝炎感染的方法。

本发明将由下列实施例说明。

实施例

1 号病人是一名 58 岁男性，患非甲非乙型慢性肝炎 6 年。1992 年 8 月，在不存在 HBsAg 和其它 HBV 标记下用 PCR 发现 HBV - DNA(图 1)。在这一阶段，病人已肝硬化。

2 号病人是一名中国南方 23 岁女性，在 1993 年 3 月的常规化验中她具有稍微升高的血清转氨酶(ALT)水平，HBsAg 和 HBeAg 阳性，但免疫球蛋白 (Ig) M 和 IgG 抗 - HBs 阴性。此后在 1994 年元月，她继续发展为 HBV - DNA 阳性，现在抗 - HB 也是阳性，但 HBsAg、HBeAg 和抗 - HBs 阴性 (图 2)。

两个病人都是丙型肝炎病毒 (HCV) 和 HCV - RNA 阴性。研究了相同地区的 30 个慢性肝脏疾病或肝细胞癌的 HBsAg 阳性中国病人。血清学研究。

用商业上可获得的酶免疫测定法 (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, U.S.A) 试验 HBsAg、HBeAg、总抗 - HBc、IgM 抗 - HBs 和抗 - HBs。在英国证实了 HBsAg 和抗 - Hbs 结果。

单克隆抗体结合

将一组已知结合到 “a” 决定簇的抗 - HBs 单克隆抗体用于确定在 “a” 决定簇表位中更特异性的变化。用抗体 RFHBS - 1、RFHBS - 2 和 RFHBS - 7 涂覆聚苯乙烯珠 (Northumbria Biologicals,

Northumberland,UK), 然后与血清样品一起温育, 所述血清样品是在磷酸盐缓冲盐水 (pH7.2) 中的 50 % 新生小牛血清 1: 2 稀释的。用 “AusRIA II” 试剂盒 (Abbott Diagnostics) 的 ^{125}I - 抗 - HBs 检测结合的 HBsAg。RFHBs - 1 和 RFHBs - 2 结合到含有序列氨基酸 124 - 137 的环状肽, RFHBs - 7 结合到 HBsAg 的氨基酸 139 - 147 环状肽上。

肝炎标记

用酶免疫测定法 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) 试验 HBsAg、HBeAg、总抗 - HBc、IgM 抗 - HBs 和抗 Hbs。

斑点印迹杂交

用改进的 Weller et al. *J. Med. Virol* 9 273-280(1982) 中详细描述的方法经斑点印迹杂交测定 HBV - DNA。

HBV - DNA 的抽提、PCR 和直接测序

在 0.5% 十二烷基硫酸钠、25mM 乙酸钠、25mM MEDTA 1mg/ml 蛋白酶 K (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) 存在下在 200 μl 体积中于 68 $^{\circ}\text{C}$ 消化 50 μl 血清 2 小时。在两次苯酚 - 氯仿提取后进行两次氯仿提取, HBV - DNA 用乙醇沉淀、用 70 % 乙醇洗涤两次后, 将 DNA 沉淀重新悬浮到 10 μl 水中。

将 5 μl 抽提的 HBV - DNA 用作 PCR 扩增的模板。一组引物 (adw 亚型)、PO5' (5' - TGCGGGTCACCATAT, 2818 - 2833 位) 和 POL3 (5' - AAGGATCCAGTTGGC, 1409 - 1395 位) (表 2) 用于获得包括前 - S1、前 - S2 和 S 基因的 1800bp 片段 (图 3)。另一组引物 M3 (5' - CTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTT, 1781 - 1755 位) 和 3C (5' - CTAACATTGAGATTCCCGAGA, 2460 - 2439 位) 用于扩增前 - C 和 C 区。用不同组引物独立地在中国和英国分析相同的血清样品。

用 “fmol” 测序试剂盒 (Promega Co, Southampton, England) 进行 PCR 产物的直接测序。用 25 μCi ^{32}P - 腺苷三磷酸酶 (Amersham International, Amersham, UK) 在 10 μl 体积中用 10 单位的多核苷酸激酶 (Boehringer Mannheim) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 末端标记测序引

物（表 1）10 分钟。将 $1.5 \mu\text{l}$ 反应混合物直接用于测序反应中。用等体积的 4mol/l 乙酸钠和 α 体积的异丙醇在室温下沉淀 $90 \mu\text{l}$ PCR 产物 10 分钟，将沉淀离心 10 分钟，然后用 70 % 乙醇洗涤两次。在重新悬浮到 $20 \mu\text{l}$ 水中后，将 $9.5 \mu\text{l}$ DNA 和 5 单位的 Taq 酶（Promega Co.）加入到具有末端标记的引物的反应缓冲液中。按照制造商的说明进行双脱氧核苷酸终止测序。将循环测序进行 30 圈。分别进行变性、退火和抽提步骤 30 秒、30 秒和 1 分钟。

S 基因的克隆和测序

直接测序结果表明 2 号病人的第一血清（1993 年 2 月）具有野生型和突变病毒混合物的迹象。将这一血清样品的 PCR 产物和 2 号病人的后续产物克隆到 pUC19 载体以证实直接测序结果。用测序酶 DNA 测序试剂盒（2.0 型，USB，Cambridge, England）测定扩增 HBV - DNA 的核苷酸序列。

疏水性图

分别用 Prosis 软件（Pharmacia, St. Albans, England）分析野生型和变体病毒分离物 HBsAg 的“a”决定簇的氨基酸 122 到 137 和 122 到 139 或 140（包括插入的氨基酸）。

斑点印迹杂交

在两种单独的情况下 PCR 扩增后，1 号病人血清中的 HBV - DNA 是可检测的。在 2 号病人中，1993 年 3 月和 1993 年 9 月在 $10 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ 血清时，HBV - DNA 是可以斑点印迹杂交检测的。假如 $1.0 \mu\text{g}$ HBV - DNA 相当于 2.3×10^6 HBV 基因组，则估计这一病人血清每 ml 含有约 4.6×10^7 个病毒粒子。HBsAg 在第一个样品中是可检测，但在第二个样品中是不可检测的。在 1994 年元月，HBV - DNA 仅可用 PCR 检测，而 HBsAg 仍是不可检测的。

单克隆抗体结合研究

以 HBsAg 阳性病人为对照（adw）的 1 号和 2 号病人的结合研究表明，在 2 号病人中，血清中 HBsAg 结合到所有三种单克隆抗体上，并且可以用 AusRIAII 试剂盒多克隆抗 - HBs 检测（表 2）。

前 S - S 基因和前 C/C 区的测序

分离物 1 和分离物 2 中前 S 基因分别由 687bp 和 690bp 组成, 野生型中由 681bp 组成。将突变体的 S 核苷酸和氨基酸序列与公开的相同亚型 (adw) 的序列比较, 也与相同地区的 HBeAg 阳性携带者的野生型株比较 (如表 3 所示) 。

测序结果揭示出 S 基因中的插入 (图 4) 。分离物 1 中密码子 122 和 123 之间的插入序列编码两个额外的氨基酸 (Arg-Ala) , 分离物 2 中密码子 123 和 124 之间的插入序列编码三个额外的氨基酸 (Arg-Gly-Ala) (图 5) 。这些插入刚好出现在 HBsAg “ a ” 决定簇之前。这种插入在公开的已知 HBV 亚型的序列中还未见描述, 它不在从中国相同地区的 30 个中国 HBsAg 阳性病人获得的共有序列中。

直接测序结果被克隆测序证实。在从 2 号病人取得的第一血清的 10 个克隆中, 8 个具有以上描述的同相插入, 其中的 2 个是野生型, 而第二和第三血清样品中的所有 15 个克隆都是变体的。因此, 2 号病人的第一血清具有野生型和突变病毒混合的迹象, 表明突变体的逐渐出现, 所述突变体在随后的血清中成为占优势的物种。以前没有有关前 - S1、前 - S2 基因中氨基酸缺失或取代的描述。

疏水图

按照 Kyte 和 Doolittle 的方法进行, 给出下列平均疏水性指数: 野生型 “ a ” 决定簇的氨基酸 122 - 137, - 0.48; 分离物 1 的氨基酸 122 - 139, - 0; 分离物 2 的氨基酸 122 - 140, - 0.89。因此突变体 “ a ” 决定簇比野生型病毒的同相区疏水性更强。

参考文献

- Ashton-Rickardt et al., *J. Med. Virol.* 29 196 (1989)
- Blum et al., *J. Virol* 65 1836-42 (1991)
- Botstein and Shortle, *Science* 229 1193 (1982)
- Brechot et al., *N. Engl. J. Med.* 312 270-276 (1985)
- Brechot et al., *J. Hepatol.* 13 (supplement) S49-55 (1991)
- Brown et al., *Lancet* 2 184-187 (1984)
- Carman et al., *Lancet* i 325-329 (1990)
- Carman et al., *Lancet* 341 349-353 (1993)
- Gregg et al., *Biotechnology* 5 479 (1987)
- Harford et al., *Develop. Biol. Standard* 54 125 (1983)
- Hayden and Mandecki, *DNA* 7 571 (1988)

Ho et al., *Gene* 77 51 (1989)
 Lai et al., *Blood* 73 17-19 (1989)
 Lai et al., *Hepatology* 12 1335-1340 (1990)
 Lau et al., *Lancet* 342 1335-1340 (1993)
 Liang et al., *Hepatology* 12 204-212 (1990)
 Luo et al., *J. Med. Virol* 35 55-59 (1991)
 McMahon et al., Cold Spring Harbor Symposium on Molecular
 Biology of Hepatitis B Viruses, September 1989
 McMahon et al., *Hepatology* 15 757-766 (1992)
 Michel et al., *Hepatology* 7 (Supplement) 61-63 (1987)
 Miller et al., *Hepatology* 9 322 (1989)
 Miyahara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 1 (1983)
 Moriyama et al., *Lancet* 337 125 (1991)
 Okamoto et al., *J. Virol.* 74 5463-67 (1987)
 Okamoto et al., *Pediatric Research* 32 264-268 (1992)
 Sun et al., *J. Clin. Microbiol* 26 1848-52 (1988)
 Thier et al., *Lancet* ii 1273-76 (1987)
 Tiollais et al., *Science* 213 406-411 (1981)
 Tiollais et al., *Nature* 317 489 (1985)
 Tiollais et al., *Hepatology* 7 (Supplement) 361-363 (1987)
 Valenzuela et al., *Nature* 280 815 (1979)
 Valenzuela et al., *Nature* 298 347 (1982)
 Waters et al. *Virus Research* 22 1-12 (1991)
 Waters et al., *J. Clin. Invest.* 90 2543-2547 (1992)
 Weller et al., *J. Med. Virol* 9 273-280 (1982)
 Zanetti et al., *Lancet*, page 1132 November 1988
 Zhang et al., *Hepatology* 17 538-544 (1993)

专利

欧洲专利 0226846
 欧洲专利 0278940
 欧洲专利 0299108
 PCT 申请 91/14703
 PCT 申请 94/26904
 U.S.专利 4,649,192
 U.S.专利 4,683,294
 U.S.专利 4,694,074
 U.S.专利 4,738,926

表 1

名称			序列	核苷酸位置
前-S1	PO5 ¹	反义	5'-TGC GGGTCACCATAT	(2818-2833)
前-S2	POL5	反义	5'-CAATCGGCAGTCAGG	(3125-3139)
S	POL4	有义	5'-AGGCATAGCAGCAGG	(428-414)
	BCS3	有义	5'-GGCACTAGTAAACTGAGCCA	(687-660) ¹
	POL1	有义	5'-GCAAAGTTCCCCAACTTC	(912-895)
	POL3	有义	5'-AAGGATCCAGTTGGC	(1409-1395)

¹CARMAN et al., 1990

表 2

	日期	RFHBs1	RFHBs2	RFHBs7	AusRIA
1号病人	1993年2月	-1	-	-	-
2号病人	1993年9月	31	23	2	-
对照		19	176	3	74

1 阴性

表 3

	野生型 adw		中国 adw	
	nt%	aa%	nt%	aa%
分离物 1	94.0	91.2	93.7	90.8
分离物 2	93.6	90.8	93.3	90.4

16

图 1

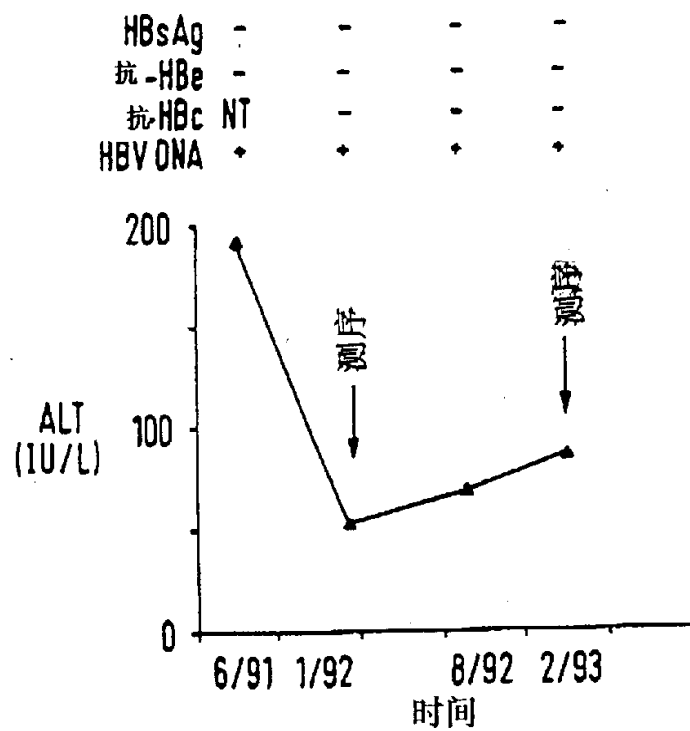


图 2

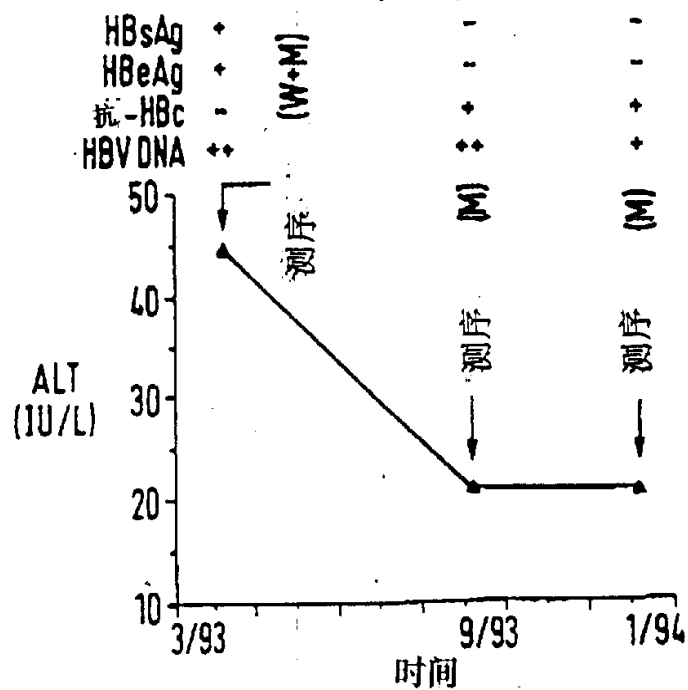


图 3

P ORF

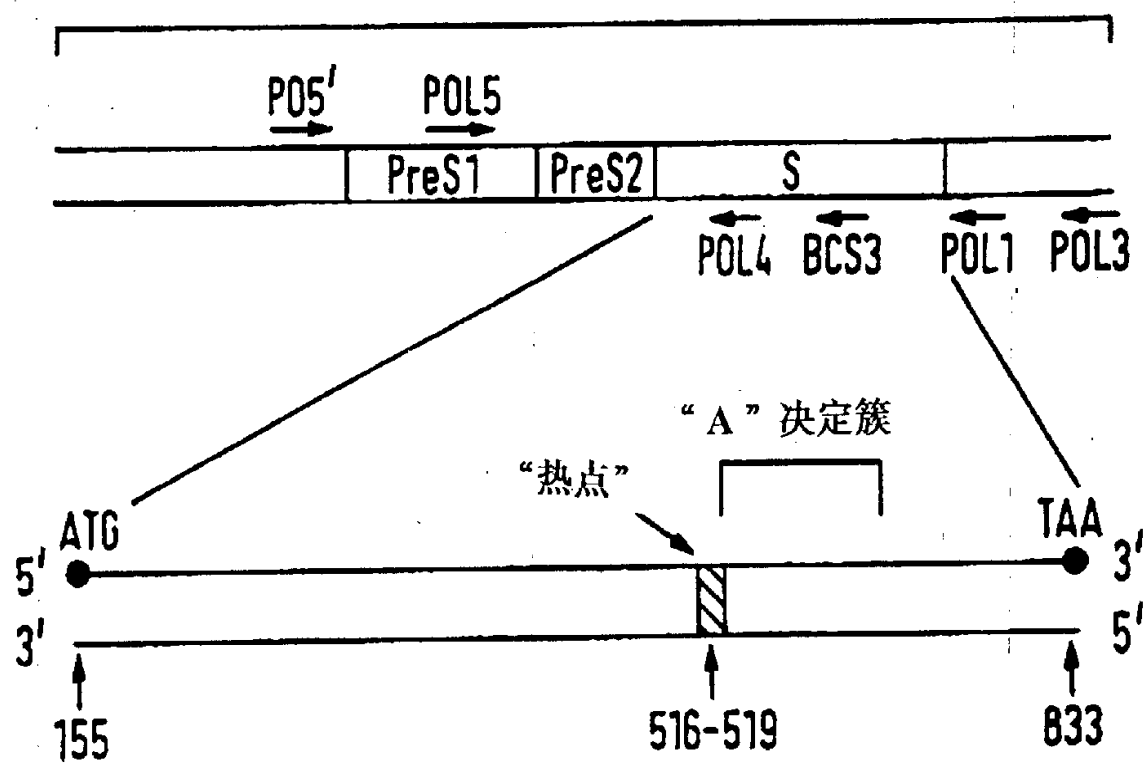


图 4

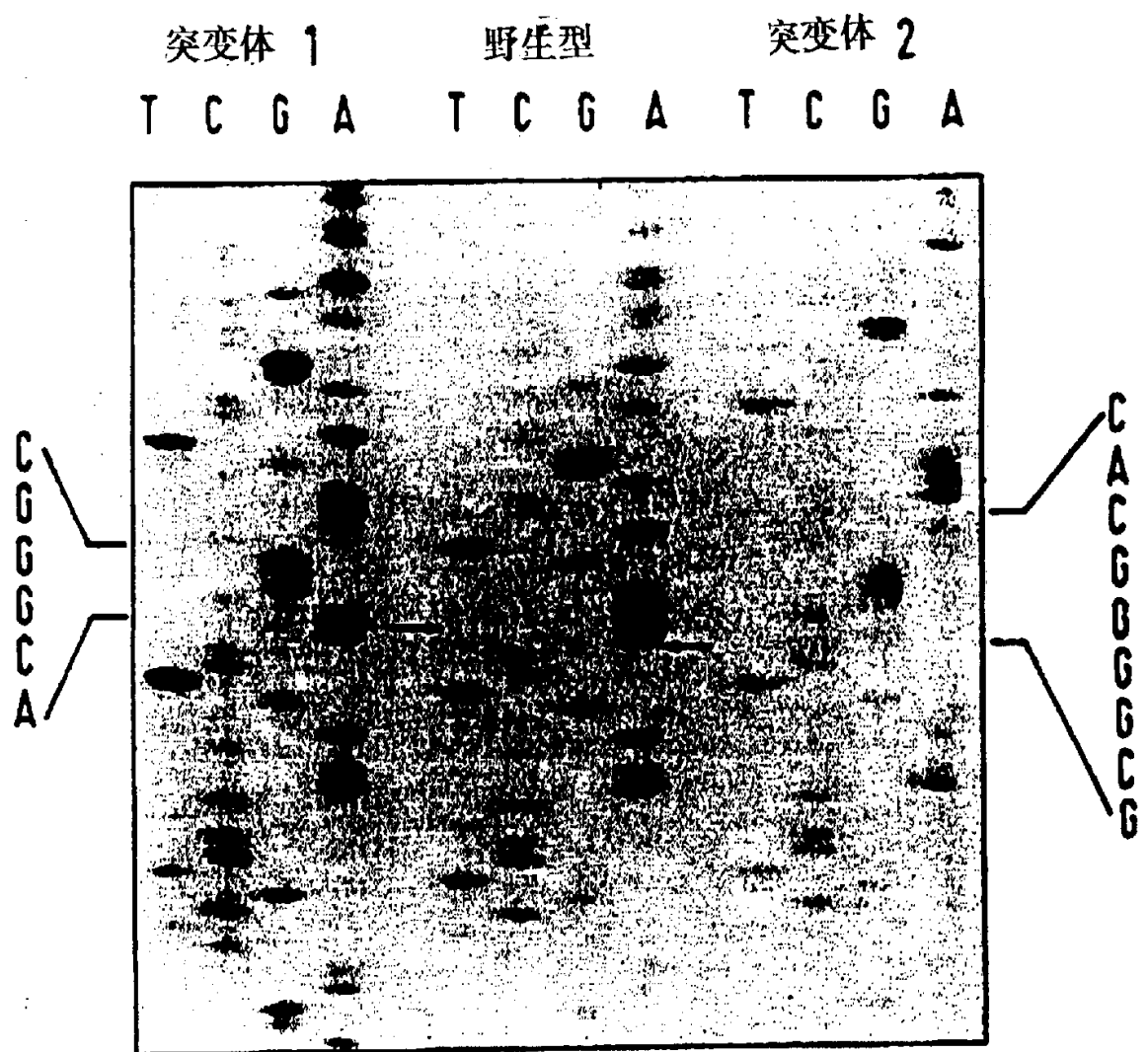


图 6

```

10      20      30      40      50      60
ATGGAGAACATCACATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
X::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
160    170    180    190    200    210
70      80      90      100     110     120
TTGTTGACAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTGTTGACAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
220    230    240    250    260    270
130     140     150     160     170     180
TTTCTAGGGGGAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTTCTAGGGGGAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
280    290    300    310    320    330
190     200     210     220     230     240
TCACCAACCTGTTGTCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TCACCAACTTGTGTCCTCCGATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
340    350    360    370    380    390
250     260     270     280     290     300
ATCATCTTCCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATCATCTTCCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
400    410    420    430    440    450
310     320     330     340     350     360
CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATCAACAACCAGCACCGGACCA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATCAACCACCAGCACCGGACCA
460    470    480    490    500    510
370     380     390     400     410     420
TGCAAACGGGCAACCTGCACAACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGC
:::::X::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGCAA-----ACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGC
520    530    540    550    560
430     440     450     460     470     480
TGTACAAAACCTACGGACGGAACCTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGCGTTTC
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGTACAAAACCTACGGACGGAACCTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTC
570    580    590    600    610    620
490     500     510     520     530     540
GCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCA
630    640    650    660    670    680
550     560     570     580     590     600
TTTGTTTCACTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATG
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTTGTTTCACTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATG
690    700    710    720    730    740
610     620     630     640     650     660
TGGTTTTGGGGGCAAGTCTGATCAACATCTTGAGTCCCTTTATGCCGCTGTTACCAATT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGGTTTTGGGGGCAAGTCTGATCAACATCTTGAGTCCCTTTATGCCGCTGTTACCAATT
750    760    770    780    790    800
670     680
TTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAA
810    820    830

```

图 7

```

10      20      30      40      50      60
ATGGAGAACATCACATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
X::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
10      20      30      40      50      60
70      80      90      100     110     120
TTGTTGACAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTGTTGACAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
70      80      90      100     110     120
130     140     150     160     170     180
TTTCTAGGGGGAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTGCGAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTTCTAGGGGGAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTGCGAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
130     140     150     160     170     180
190     200     210     220     230     240
TCACCAACCTGTTGTCTCCAATTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TCACCAACTTGTGTCTCCGATTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
190     200     210     220     230     240
250     260     270     280     290     300
ATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
250     260     270     280     290     300
310     320     330     340     350     360
CAAGGTATGTTGCCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATCAACAACCAGCACCGGACCA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CAAGGTATGTTGCCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATCAACAACCAGCACCGGACCA
310     320     330     340     350     360
370     380     390     400     410     420
TGCAAAACACGGGGCGCCTGCACAACCTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGCAAAA-----CCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGT
370     380     390     400     410     420
430     440     450     460     470     480
TGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAACTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAACTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCT
420     430     440     450     460     470
480     490     500     510     520     530     540
TTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTG
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTG
480     490     500     510     520     530
540     550     560     570     580     590     600
CCATTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATG
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CCATTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATG
540     550     560     570     580     590
600     610     620     630     640     650     660
ATGTGGTTTTTGGGGGCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATGCCGCTGTTACCA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATGTGGTTTTTGGGGGCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATGCCGCTGTTACCA
600     610     620     630     640     650
660     670     680     690
ATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::v
ATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAA
660     670     680

```