(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119562826 A
(43)申请公布日 2025.03.04

(21)申请号 202380053513.6
(22)申请日 2023.05.11
(30)优先权数据
22173131.8 2022.05.12 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/062652 2023.05.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/217988 EN 2023.11.16
(71)申请人 MSD国际商务股份有限公司
地址 瑞士卢塞恩
(72)发明人 J·P·M·兰格迪克
M·J·G·巴克斯 T·里切尔
J·尤拉泽克
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 任晓华 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)

权利要求书3页 说明书121页 附图44页

(54)发明名称

稳定的融合前HMPV融合蛋白

(57)摘要

本发明涉及稳定的融合前人肺病毒(HMPV)F蛋白、编码所述HMPV F蛋白的核酸分子以及其用途。

CN 119562826 A

1.融合前人肺病毒(HMPV)F前体(F0)蛋白质,其包含F1和F2结构域,并且包含F1和/或F2结构域的氨基酸序列中的至少一种修饰。

2.根据权利要求1所述的蛋白质,其中所述至少一种修饰使融合前构象稳定和/或增加三聚体的形成。

3.根据权利要求1或2所述的蛋白质,其中所述至少一种修饰是至少一个非天然切割位点的引入。

4.根据权利要求3所述的蛋白质,其中所述蛋白质进一步包含置于第一切割位点N末端的F2结构域中的第二个非天然切割位点,其中在所述第一个非天然切割位点和第二个非天然切割位点之间存在间隔区序列。

5.根据权利要求3或4所述的蛋白质,其中所述第一个非天然切割位点和/或第二个非天然切割位点包含氨基酸序列RXXR。

6.根据权利要求3、4或5所述的蛋白质,其中所述第一个非天然切割和/或第二个非天然切割包含序列RX[K/R]R。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的蛋白质,其包含在F1和F2结构域之间的RSV F蛋白的p27肽。

8.根据权利要求7所述的蛋白质,其中所述p27肽包含氨基酸序列ELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR(SEQ ID NO:2),或与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

9.根据权利要求7所述的蛋白质,其中所述p27肽包含RSV B p27肽的氨基酸序列,所述RSV B p27肽包含氨基酸序列EAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRR(SEQ ID NO:150),或与SEQ ID NO:150具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

10.根据权利要求7-9中任一项所述的蛋白质,其中所述p27肽序列中的一个或多个糖基化位点已被缺失。

11.根据权利要求10所述的蛋白质,其中所述p27序列中的所有糖基化位点都已被缺失。

12.根据权利要求7-11中任一项所述的蛋白质,其中所述p27肽序列包含来自p27肽序列的1-11氨基酸序列的缺失。

13.根据权利要求7-12中任一项所述的蛋白质,其中所述p27肽包含选自SEQ ID NO:185和SEQ ID NO:186的氨基酸序列。

14.根据前述权利要求1-13中任一项所述的蛋白质,其包含C末端截短的F2结构域。

15.根据权利要求14所述的蛋白质,其中所述F2结构域在位置89处的氨基酸后进行截短。

16.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其包含C末端截短的F1结构域。

17.根据权利要求16所述的蛋白质,其中所述F1结构域在HMPV F前体(F0)蛋白质的位置489处的氨基酸残基后进行截短。

18.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其包含在HR2结构域中的一个或多个稳定氨基酸残基,所述HR2结构域包含HMPV F前体(F0)蛋白质的氨基酸453至484。

19.根据权利要求18所述的蛋白质,其中所述一个或多个稳定氨基酸优化了不同HMPVF原体的HR2结构域中的一个或多个氨基酸残基之间的原体间相互作用。

20.根据权利要求18或19所述的蛋白质,其中在位置477处的氨基酸为I、V、L或F或M。

21.根据权利要求18、19或20所述的蛋白质,其中此外,在位置473处的氨基酸残基为I、F或W,和/或在位置474处的氨基酸残基为或I,和/或在位置475处的氨基酸残基为R,和/或在位置476处的氨基酸残基为K,和/或在位置478处的氨基酸残基为D,和/或在位置479处的氨基酸残基为E,和/或在位置480处的氨基酸残基为L,和/或在位置484处的氨基酸残基为I,和/或在位置488处的氨基酸残基为I。

22.根据权利要求18-21中任一项所述的蛋白质,其中在位置473处的氨基酸残基为W,在位置477处的氨基酸残基为I,并且在位置484处的氨基酸残基为I。

23.根据权利要求18-21中任一项所述的蛋白质,其中在位置473处的氨基酸残基为W,在位置476处的氨基酸残基为K,在位置477处的氨基酸残基为F,并且在位置484处的氨基酸残基为I。

24.根据权利要求18-21中任一项所述的蛋白质,其中在位置473处的氨基酸残基为W,在位置475处的氨基酸残基为R,在位置476处的氨基酸残基为K,在位置477处的氨基酸为I,在位置478处的氨基酸残基为D,在位置479处的氨基酸残基为E,在位置484处的氨基酸残基为I。

25.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其中在位置112处的氨基酸残基为R,和/或在位置209处的氨基酸残基为E,和/或在位置453处的氨基酸残基为P或Q。

26.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其中在位置149处的氨基酸残基为Y,和/或在位置313处的氨基酸残基为W,和/或在位置445处的氨基酸残基为Y。

27.根据权利要求26所述的蛋白质,其中在位置112处的氨基酸残基为R,在位置209处的氨基酸残基为E,并且在位置453处的氨基酸残基为P或Q。

28.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其中在位置231处的氨基酸残基为I。

29.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其中在位置404处的氨基酸残基为P。

30.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其中在位置368处的氨基酸残基为N。

31.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其中在位置69处的氨基酸残基为Y或W,和/或在位置73处的氨基酸残基为W,和/或在位置185处的氨基酸残基为P,和/或在位置191处的氨基酸残基为I,和/或在位置116处的氨基酸残基为H,和/或在位置342处的氨基酸残基为P。

32.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其进一步包含一个或多个非天然的原体内或原体间二硫键。

33.根据权利要求32所述的蛋白质,其中所述一个或多个二硫键选自在氨基酸残基140和147之间的原体内二硫键、和/或在氨基酸残基141或161之间的原体内二硫键、和/或在氨基酸残基360和459之间的原体内二硫键。

34.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质,其包含选自SEQ ID NO:4-135、SEQ ID NO:151-159、SEQ ID NO:161-182和SEQ ID NO:184的氨基酸序列或其片段。

35.根据权利要求34所述的蛋白质,其包含SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:180或SEQ ID NO:184的氨基酸序列或其片段。

36.根据权利要求1-35中任一项所述的蛋白质,其中所述蛋白质已在一个或多个切割位点处进行切割,导致通过一个或多个天然二硫桥共价连接的F2和F1结构域,并且其中所

述蛋白质是三聚体的。

37.根据权利要求36所述的蛋白质,其中所述F1结构域包含HMPV F0蛋白的氨基酸103-489,并且所述F2结构域包含HMPV F0蛋白的氨基酸19-88。

38.核酸分子,其编码根据前述权利要求1-37中任一项所述的蛋白质。

39.根据权利要求38所述的核酸,其中所述核酸分子是DNA或RNA。

40.根据权利要求38或39所述的核酸,其编码包含选自SEQ ID NO:4-135、SEQ ID NO:151-159、SEQ ID NO:161-182和SEQ ID NO:184的氨基酸序列或其片段的蛋白质。

41.根据权利要求40所述的核酸,其编码包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列、SEQ ID NO:159的氨基酸序列、SEQ ID NO:180的氨基酸序列或SEQ ID NO:184的氨基酸序列的蛋白质。

42.载体,其包含根据权利要求38-41中任一项所述的核酸。

43.药物组合物,其包含根据权利要求1-37中任一项所述的蛋白质、根据权利要求38-41中任一项所述的核酸和/或根据权利要求42所述的载体。

44.一种用于针对HMPV对受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求43所述的药物组合物。

45.一种用于预防受试者中的HMPV感染和/或复制的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求43所述的药物组合物。

46.一种分离的宿主细胞,其包含根据权利要求38-41中任一项所述的核酸。

稳定的融合前HMPV融合蛋白

[0001] 本发明涉及医学领域。本发明特别涉及重组融合前HMPV F蛋白及其片段、以及编码HMPV F蛋白及其片段的核酸分子及其例如在疫苗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 人偏肺病毒(HMPV)属于肺炎病毒亚科(Pneumovirinae),其还包括RSV。HMPV分离株的遗传分析已揭示了主要基于附着蛋白(G)和融合蛋白(F)的多样性的两个主要组A和B以及四个次要组(A1、A2、B1和B2)(van Hoogen等人,Emerg.Infect Dis.10(4):658-666,2004)。最近,Noa等人(Microorganisms.2020年8月21日;8(9):1280.)描述了A2细分成A2a和A2b,其中后者目前正在传播。

[0004] 为了感染宿主细胞,如同其它有包膜病毒例如流感病毒、RSV和HIV,HMPV需要病毒膜与宿主细胞膜的融合。对于HMPV,保守的融合蛋白(HMPV F蛋白)使病毒和宿主细胞的细胞膜融合。HMPV F蛋白最初折叠成“融合前”构象。这种亚稳态结构最近已得到解决(Battles等人,Nat Commun.Nov 16;8(1):1528,2017.)在细胞进入期间,融合前构象经历重折叠和构象变化为其“融合后”构象(McLellan,J.Virol.85(15):7788-7796,2010;Swanson,PNAS108(23):9619-9624,2011)。因此,HMPV F蛋白是一种亚稳态蛋白,其通过最初折叠成亚稳态形式(融合前构象),所述亚稳态形式随后经历离散/逐步构象变化为较低能量构象(融合后构象),通过将不可逆蛋白质重折叠与膜并置偶联来驱动膜融合。

[0005] HMPV于2001年首次在来自患有与人呼吸道合胞病毒(RSV)相似的疾病的儿科患者的临床样品中鉴定,但在来自无法鉴定RSV的样品中无法鉴定(van den Hoogen等人,Nat.Med.7(6):719-724,2001)。后续研究显示了,HMPV是婴儿、幼儿、老年人以及免疫功能低下的人或患有潜在慢性医学状况的那些人中的上呼吸道感染和下呼吸道感染两者的主要原因。HMPV感染的临床表现类似于由RSV引起的,范围从轻微的呼吸道病到细支气管炎和肺炎。HPMV感染似乎无处不在,因为几乎所有儿童到5岁时都是血清阳性的。先前的流行病学研究已提示了,HMPV感染在5-15%其它方面健康的婴儿中引起下呼吸道感染(Falsey等人,J.Infect.Dis.187:785-790,2003)。在因急性呼吸道感染或发烧而住院的5岁以下的儿童中,在4.9%的儿童中检测到HMPV,其人群与流感的人群相似且高于副流感病毒3型(PIV-3)的人群(Williams等人,J Infect Dis.201(12):1890-1898,2010)。疾病的发生率对于0-6个月以下的儿童是最高的。还已描述了HMPV的复发性感染。

[0006] 迄今为止,大多数感染数据都衍生自儿童中的研究,然而,HMPV还可以引起成人中的严重病的证据累积。与流感和RSV一样,成人中的感染在老年人和患有慢性潜在医学状况的患者中最严重。成年人群中的症状性感染的发生率在大多数研究中通常低于5%(Falsey,Pediatr.Infect.Dis.J.27:S80-83,2008)。它已通过Gaunt等人进行定量:甲型流感、乙型流感和RSV是老年人(>65岁)中的呼吸道疾病的主要病毒病因,随后为HMPV,其促成2.1伤残调整生命年(DALY)/1000个住院人口(Gaunt等人,J.Clin.Virol.52(3):215-221,2011)。

[0007] 目前不存在用于管理HMPV感染的批准的治疗性或预防性治疗。由于HPMV代表继RSV之后的急性病毒性呼吸道感染的主要原因,因此需要针对HMPV的有效疗法或疫苗。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了重组稳定的三聚体融合前人肺病毒(HMPV)融合(F)蛋白,即在融合前构象中得到稳定的重组HMPV F蛋白。本发明的HMPV F蛋白包含对于F蛋白的融合前构象特异性的至少一个表位。本发明提供了全长HMPV F蛋白和可溶性HMPV F蛋白。在某些实施方案中,融合前hMPV F蛋白是可溶性蛋白(即并非膜结合的且缺乏跨膜区和胞质区)。本发明还提供了编码根据本发明的融合前HMPV F蛋白的核酸分子和包含此类核酸分子的载体。本发明还涉及包含根据本发明的一种或多种HMPV F蛋白、核酸分子和/或载体的药物组合物,优选疫苗组合物,以及其在诱导针对HMPV F蛋白的免疫应答中的用途,特别是其作为疫苗的用途。本发明还涉及用于在受试者中诱导抗人肺病毒(HMPV)免疫应答的方法,其包括向受试者施用有效量的融合前HMPV F蛋白、编码所述HMPV F蛋白的核酸分子和/或包含所述核酸分子的载体。优选地,诱导的免疫应答的特征在于针对HMPV F的中和抗体、T细胞和/或针对HMPV的保护性免疫。在特定方面,本发明涉及用于在受试者中诱导中和性抗人肺病毒(HMPV)F蛋白抗体的方法,其包括向受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含融合前HMPV F蛋白、编码所述HMPV F蛋白的核酸分子和/或包含所述核酸分子的载体。

[0010] 附图简述

[0011] 当与附图结合阅读时,前述概述以及本发明的下述详细描述将得到更好理解。应当理解,本发明并不限于附图中所示的精确实施方案。

[0012] 图1.(a)具有指示残基数目的全长HMPV F的简化示意图和(b)基于与折叠子结构域融合的F胞外域的可溶性HMPV F。未成熟的F0从位置103处开始,在F1结构域中的残基102和融合肽(FP)的N末端之间,通过TMPRSS2或其它/相关蛋白酶在F2和F1片段中进行加工。指示了信号肽(SP)、HR1结构域(HR1)、HR2结构域(HR2)、跨膜(TM)和细胞质部分(CM)。

[0013] 图2.(A)对于非稳定的HMPV F变体(MPV201285)和稳定的变体(MPV210531、MPV210502、MPV210500、MPV210507和MPV210509),HMPV F的区段在F2(斜体)和F1(粗体)的边界处的比对。稳定的变体含有T69Y、A116H、A140C/A147C、D185P、H468N、E453Q取代)。稳定的变体具有F2的C末端截短和/或另外的弗林蛋白酶位点。(B)还原型SDS-PAGE随后为用来自HEK293细胞的上清液的抗hMPV多克隆血清的蛋白质印迹,所述HEK293细胞用对应于根据(A)具有F2-F1边界的稳定的可溶性HMPV F胞外域的质粒进行转染。观察到不完全加工并用F0进行标记。(C)细胞培养上清液的分析型SEC分析显示了具有在4.2至4.4分钟之间的保留时间的三聚体峰(左)和在热处理30分钟后的三聚体稳定性(右)。(D)使用Octet对上清液的生物层干涉法显示了与融合前特异性抗体ADI-14448和融合后特异性抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合(转染用n＝2执行。在分析型SEC上分析池。在Octet上分析了各个转染,并且报告了平均值/设计,其中误差条指示标准差)。右图中的虚线指示了定量下限。

[0014] 图3.(A)HMPV F序列在F2(斜体)和F1(粗体)的边界处的比对,其中插入了RSV p27结构域(加双下划线的)和对于F2 C末端的另外弗林蛋白酶位点(加下划线的)。(B)还原型SDS-PAGE随后为用来自HEK293细胞的上清液的抗hMPV多克隆血清的蛋白质印迹,所述HEK293细胞用对应于根据(A)具有F2-F1边界的稳定可溶性HMPV F胞外域的质粒进行转染。完全加工由F1指示,不完全加工由残留F0指示。(C)细胞培养上清液的分析型SEC分析显示了三聚体水平(左)和在热处理30分钟后的三聚体稳定性(右)。(D)使用Octet对上清液的生

物层干涉法显示了与融合前特异性抗体ADI-14448和融合后特异性抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合。右图中的虚线指示了定量下限。

[0015] 图4.具有野生型HR2区域和折叠子的HMPV F(MPV210751)与没有折叠子或HR2修饰的变体(MPV211241),以及在残基489处截短的具有HR2位置的修饰的变体(MPV21142-MPV211292)进行比较。具有在残基89处截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和具有指示HR2区域的RSV p27的HMPV F变体在Expi-HEK细胞中进行表达。在收获后和在4℃下贮存6-8周后相对于MPV210751的三聚体含量(左)。与4℃对照样品相比,在热应激后的相对三聚体含量(右)。用n=2执行转染。报告了平均值/设计,其中误差条指示标准差。

[0016] 图5.(A)具有野生型HR2区域和折叠子的HMPV F(MPV210751)与没有折叠子或HR2修饰的变体(MPV211241),以及在残基489处截短的具有HR2位置的修饰的变体(MPV211247、MPV211287、MPV211917和MPV211918)进行比较。具有在残基89处截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和具有指示HR2区域的RSV p27的HMPV F变体在Expi-HEK细胞中进行表达。对于F三聚体的量(中图)和热稳定性(右图)测试上清液。(B)使用Octet上的生物层干涉法,对于与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面结合剂MPV458和抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合进一步评估上清液。右图中的虚线指示了定量下限。

[0017] 图6.(A)具有截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和RSV p27结构域,稳定的HR2(I473W、S477I和A484I)和另外的稳定取代(E453Q或E453P、V112R、D209E),以及天然变异V231I的HMPV F变体的比较。左侧直方图显示了如通过分析型SEC测量的,在用指示的F变体转染后,HEK293细胞的上清液中的三聚体量。右图显示了在58或63℃下温育30分钟后,相对于4℃的三聚体的热稳定性。(B)使用Octet上的生物层干涉法,通过与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面抗体MPV458和抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合进一步评估上清液。右图中的虚线指示了定量下限。

[0018] 图7.(A)具有截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和RSV p27结构域,稳定的HR2(L473W、D475R、Q476K、S477F、N478D、R479E、A484I)和另外的稳定取代(E453Q或E453P、V112R、D209E)以及基于天然HMPV F变体的稳定取代(V231I)的HMPV F变体的比较。左侧直方图显示了如通过分析型SEC测量的,在用指示的F变体转染后,HEK293细胞的上清液中的三聚体量。右图显示了在58或63℃下温育30分钟后,相对于4℃的三聚体的热稳定性。(B)使用Octet上的生物层干涉法,关于与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面抗体MPV458和抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合进一步评估上清液。右图中的虚线指示了定量下限。

[0019] 图8.(A)具有截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和RSV p27结构域,稳定的HR2(L473W、D475R、Q476K、S477F、N478D、R479E、A484I)伴随另外的稳定取代(E453Q、V112R、T69Y、S149Y、N313W和S445Y)以及基于天然HMPV F变体的稳定取代(N404P)的HMPV F变体的比较。直方图显示了如通过分析型SEC测量的,在用指示的F变体转染后,HEK293细胞的上清液中的三聚体量。(B)使用Octet上的生物层干涉法,关于与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面抗体MPV458和抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合进一步评估上清液。右图中的虚线指示了定量下限。(C)通过DSF的T_{m50}作为HEK293细胞的上清液中三聚体的热稳定性的指示。

[0020] 图9.(A)具有截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和RSV p27结构域,稳定取代(E453P、V112R、D209E)和基于天然变异V231I的取代,以及HR2稳定突变(位置473、474、477、484和

485)的HMPV F变体的比较。直方图显示了如通过分析型SEC测量的,在用指示的F变体转染后,HEK293细胞的上清液中的三聚体量。(B)使用Octet上的生物层干涉法,关于与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面抗体MPV458和抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合进一步评估上清液。右图中的虚线指示了定量下限。(C)通过DSF的T_{m50}作为HEK293细胞的上清液中三聚体的热稳定性的指示。垂直线指示Tm50的检测。对于每个样品绘制导数,并且以℃指示分配的解链温度。对于MPV220123,无法分配Tm50。

[0021] 图10.(A)具有截短的F2、弗林蛋白酶切割位点和RSV p27结构域,稳定取代(E453P、V112R、D209E),天然变异V231I,以及HR2稳定突变S477I和A484I以及进一步的稳定突变T69W、S149Y、N313W、S445Y和N404P的HMPV F变体的比较。直方图显示了如通过分析型SEC测量的,在用指示的F变体转染后,HEK293细胞的上清液中的三聚体量。(B)使用Octet上的生物层干涉法,关于与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面抗体MPV458和抗体DS7(与非preF构象的结合)的结合进一步评估上清液。右图中的虚线指示了定量下限。(C)通过DSF的T_{m50}作为HEK293细胞的上清液中三聚体的热稳定性的指示。垂直线指示Tm50的检测。对于每个样品绘制导数,并且以℃指示分配的解链温度。

[0022] 图11.(A).纯化的HMPV F蛋白的还原型SDS-PAGE考马斯染色。(B)在纯化和贮存于4℃下的三聚体纯化HMPV F蛋白的分析型SEC-MALS(小于三聚体的种类用D进行指示)。(C)在37℃下2和/或8周的热应激(聚集体用A进行指示)。(D)在一个、五个或十个速冻循环后的分析型SEC。(E)通过DSF测量的HMPV-F蛋白的解链温度。对于每个样品绘制导数,并且以℃指示分配的解链温度。(F)使用Octet上的生物层干涉法,测量与融合前特异性抗体ADI-14448、顶点界面抗体MPV458和MPV465、preF和postF结合抗体ADI-18992和非preF特异性抗体DS7的结合。(G)MPV212047的负染色EM图像的2D类平均值。

[0023] 图12.不含折叠子三聚化结构域的融合前HMPV F MPV212047的Cryo EM结构。一个原体(protomer)描绘为卡通表示,而两个原体描绘为表面表示。

[0024] 图13.首次用于实验的棉鼠在第0天和第21天用指示剂量的AS01B佐剂化融合前(PreF:MPV212047)或融合后(PostF:MPV190470)HMPV F蛋白进行免疫,随后为在第42天时用10^5PFU HMPV A2的攻击和在第46天时的处死。阴性对照用PBS免疫两次,阳性对照在第0天时用10^4PFU HMPV A2攻击一次。(A)在ELISA中在第42天的HMPV融合前F结合抗体滴度。(B)在HMPV A2-GFP VNA中在第42天的HMPV A2中和抗体滴度。(C)如通过蚀斑减少中和测试(PRNT)测量的,在第46天的鼻病毒载量。每一个点描绘了各个动物的值,而水平线指示了组的中值应答。虚线指示了检测下限(LLoD)。

[0025] 图14.(A)纯化的HMPV F三聚体的分析型尺寸排阻层析(SEC)概况。(B)使用定量Octet,与融合前(ADI-14448)和顶点界面(MPV458和MPV465)HMPV F抗体结合的纯化的HMPV F三聚体。绘制了初始结合率。(C)Balb/c小鼠在第0天和第28天用指示剂量的AS01B佐剂化融合前开放式(MPV220215)或闭合式(MPV212047)HMPV F蛋白进行免疫。阴性对照用PBS免疫两次。(C)在ELISA中在第42天的HMPV融合前F结合抗体滴度。(D)在HMPV A2-GFP VNA中在第42天的HMPV A2中和抗体滴度。每一个点描绘了各个动物的值,而水平线指示了组的中值应答。虚线水平线指示了检测下限(LLoD)。在组上方指示了跨越剂量的显著差异,如通过Tobit模型伴随用于多重比较的Bonferroni校正确定的。

[0026] 图15.Balb/c小鼠在第0天用至少$1x10^3$直至$3x10^5$ PFU HMPV A2进行预暴露,随后

为在第12周用15μg非佐剂化融合前HMPV F蛋白(MPV212047)的免疫。在ELISA中在第14周和第16周的HMPV融合前F结合抗体滴度。每一个点描绘了各个动物的值,而水平线指示了组的中值应答。虚线指示了检测下限(LLoD)。

[0027] 图16.(A)如分别通过分析型SEC和差示扫描荧光法(DSF)确定的,表达HMPV A2 F蛋白的细胞培养上清液的三聚体峰高(黑色条)和解链温度(Tm50)(灰色条)。条描绘了n=2次重复测量的平均值+SD。(B)表格描述了HMPV F变体的亚型、毒株标识符和Genbank ID。(C)来自(B)的表达HMPV A2、B1和B2 F蛋白的细胞培养上清液的分析型SEC。三聚体用'T'进行指示,单体用'M'进行指示。(D)如通过DSF确定的,来自(C)的细胞培养上清液的Tm50。条描绘了n=3次重复测量的平均值+SD。(E)使用定量Octet,来自(C)的细胞培养上清液中的融合前(ADI-61026)、顶点界面(MPV458)和非融合前(DS7)HMPV F抗体结合。绘制了初始结合率。

[0028] 图17.(A)如通过分析型SEC确定的,细胞培养上清液中的HMPV F MPV220759和MPV221190三聚体的表达水平。(B)纯化的HMPV F三聚体的分析型SEC概况。(C)基于MALS信号的HMPV F三聚体的表征。(D)如通过DSF确定的,纯化的HMPV F三聚体的解链温度(Tm50)。N=3次重复测量,并且各个值和平均值分别作为灰色实线和黑色实线报告。(E)使用定量Octet,纯化的HMPV F三聚体与融合前(ADI-14448和ADI-61026)、顶点界面(MPV458)和非融合前(DS7)HMPV F抗体的结合。初始结合率绘制为n=3-6次测量的平均值+SD。(F)如通过分析型SEC确定的,经受液氮中的1-10次速冻(SF)循环和过冷应激至-20℃的HMPV F三聚体的标准化三聚体峰。未处理的三聚体设定为100%。条描绘了n=5个过冷样品的平均值±SD或描绘了n=1个SF样品。空心圆圈描绘了各个测量。(G)Balb/c小鼠在第0天和第28天用1.5、5或15μg AS01B佐剂化融合前HMPV F蛋白或者PBS进行肌内免疫。在第43天的HMPV融合前F结合抗体滴度ELISA。每一个点描绘了各个动物的值,而水平线指示了组的中值应答。

[0029] 图18.(A)如通过分析型SEC确定的,细胞培养上清液中的HMPV F MPV221190和MPV220552三聚体的表达水平。三聚体峰对于MPV221190用黑色箭头进行指示,并且对于MPV220552用灰色箭头进行指示。(B)基于MALS信号的MPV220552三聚体的表征。(C)如通过DSF确定的,MPV220552三聚体的解链温度(Tm50)。N=3次重复测量,并且各个值和平均值分别作为灰色实线和黑色实线报告。(D)使用定量Octet,HMPV F三聚体与融合前(ADI-14448和ADI-61026)、顶点界面(MPV458)和非融合前(DS7)HMPV F抗体的结合。绘制了初始结合率。(E)在纯化后(t=0)、在4℃下贮存2周后或在37℃下贮存2周后,纯化的MPV221190和MPV220552三聚体的分析型SEC概况。

[0030] 图19.(A)表达骨架MPV220847和在位置477处携带取代的变体的细胞培养上清液的分析型SEC。(B)如通过DSF确定的,来自(A)的细胞培养上清液的解链温度(Tm50)。N=3次重复测量,并且各个值和平均值分别作为灰色实线和黑色实线报告。(C)使用定量Octet,来自(A)的细胞培养上清液中的融合前(ADI-14448)和非融合前(DS7)HMPV F抗体结合。绘制了初始结合率。

[0031] 图20.表达骨架MPV211241和在位置477处携带取代的变体的细胞培养上清液的分析型SEC。黑线描绘了在收获(4℃)时的上清液,并且灰线描绘了在58℃下的30分钟温育后的上清液。HMPV F三聚体的保留时间用'T'进行指示,单体用'M'进行指示。

[0032] 图21.如通过流式细胞术确定的,融合前(ADI-61026)和非融合前(DS7)抗体与细

胞表面表达的全长HMPV F蛋白结合的中值荧光强度。

[0033] 图22.(A)HMPV F p27变体的比对。糖基化位点是加下划线的,N至Q的突变为粗体。缺失通过虚线指示。(B)来自连同(灰色)或不连同(黑色)20％弗林蛋白酶共转染的(A),表达HMPV F蛋白的细胞培养上清液的分析型SEC。(C)还原型SDS-PAGE,随后为用来自(B)的选定上清液的抗hMPV多克隆血清的蛋白质印迹。

[0034] 发明详述

[0035] 人肺病毒(HMPV或hMPV)的融合蛋白(F)是涉及病毒膜与宿主细胞膜的融合的三聚体I类融合蛋白,其是感染所需的。HPMV F mRNA被翻译成指定为F0的539氨基酸的前体蛋白质,其含有在N末端处的信号肽序列(即SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-18)(Ulbrandt等人,Journal of General Virology(2008),89,3113-3118),所述信号肽序列通过内质网中的信号肽酶去除。

[0036] 为了变得激活,前体形式F0通过细胞蛋白酶进行蛋白酶解切割(加工),生成在亚稳态二硫键连接的异二聚体(F1+F2)中的两个结构域(F1和F2)。F1的新近形成的N末端被认为是融合肽。三个F2-F1二聚体结合,以形成采用亚稳态促融前(prefusogenic)(“融合前”)构象的成熟F蛋白,所述促融前构象在与靶细胞膜接触时被触发以经历构象变化。这种构象变化暴露了融合肽,其与宿主细胞膜结合并促进病毒或受感染细胞的膜与靶细胞膜的融合。紧邻融合肽和跨膜结构域(参见图1)的是两个七肽重复(HR)区,分别为HR1和HR2。一旦切割,HMPV F就可以被触发,以经历从融合前形式到融合后状态的本质上不可逆且能量上有利的构象变化,其中释放的势能驱动膜融合。

[0037] F1结构域(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基103-539)含有在其N末端处的23疏水性融合肽(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基103-126),重折叠区2(RR2)(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸426-491),其中HR2包含氨基酸453至484,而C末端含有跨膜区(TM)(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基492-513)和胞质区(对应于氨基酸残基514-539)(Ulbrandt等人,Journal of General Virology(2008),89,3113-3118)。

[0038] 在切割后,F2结构域(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-102)通过两个二硫桥共价连接到F1(Ulbrandt等人,Journal of General Virology(2008),89,3113-3118)。F1-F2异二聚体在病毒粒子中组装为同三聚体。

[0039] 针对HMPV感染的疫苗是目前无法获得但期望的。生产疫苗的一种潜在方法是基于纯化的HMPV F蛋白的亚单位疫苗。然而,对于这种方法,期望的是纯化的HMPV F蛋白处于的构象类似HMPV F蛋白的融合前状态的构象,并且在一段时间内是稳定的,并且可以以足够的数量进行生产。另外,对于基于亚单位的疫苗,HMPV F蛋白需要通过跨膜(TM)区和胞质区的缺失进行截短,以产生可溶性分泌的F蛋白(F或sF)。因为TM区负责膜锚定和三聚化,所以无锚定的可溶性F蛋白明显比全长蛋白质更不稳定,并且将容易地重折叠成融合后的终态。为了获得显示高表达水平和高稳定性的处于稳定的融合前构象的可溶性F蛋白,融合前构象因此需要进行稳定。因为全长(膜结合的)HMPV F蛋白也是亚稳态的,所以融合前构象的稳定对于全长HMPV F蛋白(即包括TM区和胞质区),例如对于任何基于载体的减毒活疫苗方法或RNA疫苗也是期望的。

[0040] 本发明提供了三聚体重组融合前HMPV F蛋白,即在融合前构象中稳定的HMPV F蛋白。在导致本发明的研究中,引入了与野生型HMPV F蛋白的氨基酸序列(特别是SEQ ID NO:

1的氨基酸序列)相比的几种修饰,例如氨基酸的突变、缺失、插入和/或融合,以便获得所述稳定的融合前HMPV F蛋白。本发明的稳定的融合前HMPV F蛋白处于融合前构象,即它们包含(展示)对于融合前构象F蛋白特异性的至少一个表位。对于融合前构象F蛋白特异性的表位是在融合后构象中不存在的表位。不希望受任何特定理论的束缚,认为HMPV F蛋白的融合前构象可能含有与天然HMPV病毒粒子上表达的HMPV F蛋白上存在的那些相同的表位,并且因此可能提供了关于引发保护性中和抗体的优点。在某些实施方案中,本发明的蛋白质包含由融合前特异性抗HMPV单克隆抗体识别的至少一个表位。此类融合前HMPV抗体的实例是MPE8(Corti等人,Nature 50(7467):439-443,2013)和ADI-14448(Gilman等人,Sci Immunol.2016Dec 16;1(6):eaaj1879.doi:10.1126/SciImmunol.aaj1879.Epub 2016年12月9日)。在某些实施方案中,重组融合前HMPV F蛋白包含如上文所述的,由至少一种融合前特异性单克隆抗体识别的至少一个表位,并且是三聚体的。在某些实施方案中,根据本发明的稳定的融合前HMPV F蛋白是可溶的,并且因此包含截短的F1结构域(即跨膜区和胞质区已被(部分)缺失)。

[0041] 本发明特别提供了融合前人肺病毒(HMPV)F前体F0蛋白,其包含F1和F2结构域,并且包含F1和/或F2结构域的氨基酸序列中的至少一种修饰。

[0042] 在某些实施方案中,至少一种修饰使融合前构象稳定和/或增加三聚体的形成和/或HMPV F蛋白的(热)稳定性。

[0043] 关于HMPV F0蛋白的一级氨基酸序列,利用下述术语来描述F蛋白的结构特征。术语F0是指全长翻译的HMPV F蛋白前体。在成熟过程中,F0多肽经历在位于F2和F1之间(即在位置102和103的氨基酸之间)的切割位点处的蛋白酶解切割。

[0044] 如本文所用,F2结构域包括氨基酸19-102的至少一部分,而F1结构域包括氨基酸103-539的至少一部分。可溶性F蛋白包括HMPV F蛋白的F2结构域和F1结构域,而不包括HMPV F蛋白的跨膜结构域。F1结构域的可溶性部分包括F0蛋白的氨基酸103-491的至少一部分以及直至全部。如上文指示的,这些氨基酸位置(以及本文指定的所有后续氨基酸位置)参考SEQ ID NO:1的示例性HMPV F蛋白前体多肽(F0)而给出。

[0045] 根据本发明,HMPV F蛋白包括使F蛋白的融合前构象稳定的至少一种修饰,使得HMPV F蛋白保留F蛋白的融合前构象的至少一个免疫显性表位和/或增加三聚体的形成和/或HMPV F蛋白的(热)稳定性。

[0046] 在某些实施方案中,至少一种修饰是至少一个非天然切割位点的引入。因此,在某些实施方案中,本发明提供了稳定的融合前人肺病毒(HMPV)F前体(F0)蛋白质,其包含F1和F2结构域,并且包含例如在F2结构域的C末端端部处、在F1和F2结构域之间的第一个非天然切割位点。

[0047] 另外或可替代地,F2结构域可以是C末端截短的。因此,在某些实施方案中,第一个非天然切割位点置于截短的F2结构域的C末端端部处,例如,F2结构域可以在位置89后进行C末端截短,并且第一个非天然切割位点置于位置89处的C末端氨基酸残基后。在导致本发明的研究中,已显示了切割位点在残基92-93之间。因此,如果例如在残基89后添加含有4个残基的弗林蛋白酶位点,则末端的位置为~92,但在C末端处的最后一个残基不是天然的。

[0048] 根据本发明,已显示了通过在F1和F2结构域之间引入非天然切割位点,与具有天然切割位点的HMPV F蛋白相比,HMPV F0蛋白的加工(切割)得到改善。根据本发明,显示了

改善的加工增加HMPV F蛋白的稳定性和抗原性。

[0049] 根据本发明,术语非天然切割位点是指天然存在的HMPV的F蛋白中不存在的切割位点。

[0050] 切割位点是由细胞蛋白酶利用的蛋白酶解位点,所述细胞蛋白酶激活广泛范围的前体蛋白质,包括I类型病毒融合蛋白,例如HMPV F。因此,已知催化蛋白酶解活化过程的各种细胞蛋白酶(例如弗林蛋白酶、TMPRSS2、组织蛋白酶和其它跨膜丝氨酸蛋白酶)切割各种病毒细胞表面蛋白质,其是病毒进入宿主细胞所必需的。切割位点通常包含由细胞蛋白酶识别的特异性氨基酸序列或由其组成。因此,蛋白酶经由沿着多肽链的特异性氨基酸序列识别关于它在其中切割的位点。例如,弗林蛋白酶样蛋白酶优选正好在碱性氨基酸靶序列(规范地,Arg-X-(Arg/Lys)-Arg)后切割蛋白质。根据本发明,非天然切割位点可以从天然切割位点的N末端引入,即除天然切割位点之外。在一个优选实施方案中,第一个非天然切割位点替换天然切割位点。

[0051] 在某些实施方案中,本发明的蛋白质进一步包含F2结构域中的第二个非天然切割位点。根据本发明,第二个非天然切割位点被引入置于第一个非天然切割位点N末端的F2结构域中,其中在第一个非天然切割位点和第二个非天然切割位点之间存在间隔区序列。因此,第二个非天然切割位点被引入置于第一个天然或非天然切割位点N末端的F2结构域内,并且间隔区序列存在于第一个非天然切割位点和第二个非天然切割位点之间,即第一个切割位点和第二个切割位点由间隔区序列分开,而不直接相邻。间隔区序列可以是F2结构域的天然序列的部分,或可以是将第一个非天然切割位点和第二个非天然切割位点分开的异源序列。

[0052] 在某些实施方案中,第二个非天然切割位点置于F2结构域的氨基酸残基88后、或氨基酸残基89后、或F2结构域的氨基酸残基90后,并且第一个非天然切割位点置于F2结构域的C末端位置处。在优选实施方案中,第二个非天然切割位点置于F2结构域的氨基酸88或89后。在优选实施方案中,第二个非天然切割位点置于F2结构域的氨基酸88或89后,使得它在残基92或93后被切割。

[0053] 在某些实施方案中,第一个非天然切割位点包含氨基酸序列RX_1X_2R,其中X_1和X_2可以是任何氨基酸。

[0054] 在优选实施方案中,第一个非天然切割是包含序列RX_1[K/R]R的弗林蛋白酶切割位点。

[0055] 在某些优选实施方案中,F0蛋白包含在F1和(截短的)F2结构域之间的RSV F蛋白的p27肽,其中所述p27肽包含在其C末端端部处的第一个切割位点。在这种情况下,间隔区序列因此是p27肽序列(的部分)。p27肽可以是任何RSV F蛋白的任何p27肽,或其变体。在一个特定实施方案中,p27肽来自RSV A,并且包含氨基酸序列ELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR(SEQ ID NO:2,切割位点加下划线),或与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,p27肽具有与SEQ ID NO:2具有至少90%、优选至少95%、更优选至少97%、甚至更优选至少98%、最优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。在这些实施方案中,p27肽包含在其C末端处的第一个非天然切割位点,并且第二个非天然切割位点置于p27肽的N末端。再次,F2结构域可以在其C末端侧处进行截短。F结构域可以在位置88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或101处的氨基酸残基后进行截短。在优选实施方案中,

F2结构域在位置89处的氨基酸残基后进行截短,随后为切割位点,其导致在F2 C末端的位置91处的Arg包括。

[0056] 在其它实施方案中,p27肽来自RSVB,并且包含氨基酸序列EAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRR(SEQ ID NO:150),或与SEQ ID NO:150具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,p27肽具有与SEQ ID NO:150具有至少90%、优选至少95%、更优选至少97%、甚至更优选至少98%、最优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0057] 在某些实施方案中,F0蛋白包含定位于F1和(截短的)F2结构域之间的RSV F蛋白的p27肽的优化变体,其中所述p27肽包含在其C末端端部处的第一个切割位点。

[0058] 在某些实施方案中,p27肽已通过缺失p27肽序列中的一个或多个糖基化位点进行修饰。p27肽通常具有2或3个N联糖基化位点。糖基化位点通常是允许哺乳动物细胞中的N联糖基化的'NXS/T'基序。该基序的侧面可能是或可能不是短接头(Gly/Ser)。优选地,p27序列中的所有糖基化位点都已被缺失。糖基化位点的缺失可以通过NXS/T基序中的某些氨基酸的突变来完成,使得糖基化位点不再存在,或者通过缺失一个或多个氨基酸来完成,使得糖基化位点不再存在。

[0059] 根据本发明,已显示了使用p27肽的去糖基化变体,切割无需添加弗林蛋白酶而得到改善。

[0060] 在其它实施方案中,p27肽已通过从p27序列中缺失1-11个氨基酸、优选9或11个氨基酸进行修饰。

[0061] 在某些优选实施方案中,p27肽包含选自SEQ ID NO:185和186的氨基酸序列。

[0062] 在某些实施方案中,第二个非天然切割位点包含序列RX_1X_2R,其中X_1和X_2可以是任何氨基酸(https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054290)。

[0063] 在优选实施方案中,第二个非天然切割是包含序列RX_1[K/R]R、优选RRRR的弗林蛋白酶切割位点。

[0064] 另外或可替代地,蛋白质可以包含C末端截短的F1结构域。因此,为了获得可溶性F蛋白,可以去除TM和胞质区以便提供HMPV F胞外域。因此,在某些实施方案中,蛋白质包含截短的F1结构域。在特定实施方案中,截短的F1结构域并不包含跨膜区和胞质区。F1结构域可以在位置481、482、483、484、485、486、487、488或489处的氨基酸后进行截短。在某些实施方案中,F1结构域在位置481或489处的氨基酸残基后进行截短。优选地,F1结构域在位置489处的氨基酸残基后进行截短。在优选实施方案中,截短的F1结构域因此包含HMPV F蛋白的氨基酸103-481或103-489,优选HMPV F蛋白的氨基酸103-489或由其组成。

[0065] 如本申请自始至终使用的,氨基酸残基的位置(或氨基酸位置)参考SEQ ID NO:1的HMPV F蛋白的序列而给出。如本发明中使用的,措辞"在HMPV F蛋白的位置例如88处的氨基酸残基"因此意指与SEQ ID NO:1的HMPV F蛋白中的位置88处的氨基酸相对应的氨基酸。应注意的是,在本申请自始至终使用的编号系统中,1是指未成熟F0蛋白(SEQ ID NO:1)的N末端氨基酸,即包括信号肽。当使用除SEQ ID NO:1的毒株TN/00/3-14外的HMPV毒株时,通过将其它HMPV毒株的序列与SEQ ID NO:1的F蛋白进行比对,伴随需要时空位的插入,F蛋白的氨基酸位置参考SEQ ID NO:1的毒株的F蛋白的编号进行编号。序列比对可以使用本领域众所周知的方法,例如通过CLUSTALW、Bioedit或CLC Workbench来完成。

[0066] 根据本发明的氨基酸可以是二十种天然存在的(或‘标准’氨基酸)中的任一种或其变体,例如D-氨基酸(具有手性中心的氨基酸的D-对映体),或蛋白质中并未天然发现的任何变体,例如如正亮氨酸。标准氨基酸可以基于其性质分成几组。重要的因素是电荷、亲水性或疏水性、大小和官能团。这些性质对于蛋白质结构和蛋白质-蛋白质相互作用是重要的。一些氨基酸具有特殊性质,例如可以与其它半胱氨酸残基形成共价二硫键(或二硫桥)的半胱氨酸,可以诱导蛋白质骨架的转动的脯氨酸,以及比其它氨基酸更柔性的甘氨酸。表2显示了标准氨基酸的缩写和性质。技术人员应了解,可以通过常规分子生物学程序对蛋白质进行突变。

[0067] 如上文所述,在某些实施方案中(例如在可溶性F蛋白的情况下),本发明的蛋白质包含截短的F1结构域。如本文所用,“截短的”F1结构域是指并非全长F1结构域的F1结构域,即其中C端的一个或多个氨基酸残基已被缺失。在某些实施方案中,至少跨膜结构域和胞质结构域已被缺失,以允许作为可溶性胞外域表达。因为TM区负责膜锚定和三聚化,所以“无锚定的”(即不含TM和胞质结构域)可溶性F蛋白是单体的并且显示了低表达。为了获得处于稳定的融合前构象的可溶性三聚体F蛋白,融合前构象因此需要进行稳定。为了促进三聚化,已知用异源三聚化结构域例如折叠子结构域替换TM/CT区。

[0068] 根据本发明,提供了不含异源三聚化结构域的可溶性三聚体HMPV融合前F蛋白。因此,在某些实施方案中,根据本发明的蛋白质包含在HR2结构域中的一个或多个稳定氨基酸残基,所述HR2结构域包含HMPV F前体(F0)蛋白质的氨基酸453至484。根据本发明,已惊讶地发现了,与不含HR2结构域中的一个或多个稳定突变的HMPV F蛋白相比,通过HR2结构域中的一个或多个稳定突变的存在,即使不存在异源三聚化结构域,三聚体含量也是增加的。

[0069] 如上文指示的,HMPV F蛋白通常是同三聚体,即由三个通常非共价结合的蛋白质单体(或原体)形成的大分子复合物。在特定实施方案中,HR2结构域中的一个或多个稳定氨基酸优化了三聚体中的不同HMPV F原体的HR2结构域中的一个或多个氨基酸残基之间的原体间相互作用。

[0070] 在一个优选实施方案中,在位置477处的氨基酸为I、V、L或F或M。

[0071] 在某些实施方案中,此外,在位置473处的氨基酸残基为I、F或W,和/或在位置474处的氨基酸残基为或I,和/或在位置475处的氨基酸残基为R,和/或在位置476处的氨基酸残基为K,和/或在位置478处的氨基酸残基为D,和/或在位置479处的氨基酸残基为E,和/或在位置480处的氨基酸残基为L,和/或在位置484处的氨基酸残基为I,和/或在位置488处的氨基酸残基为I。

[0072] 在一个优选实施方案中,在位置473处的氨基酸残基为W,在位置477处的氨基酸残基为I,并且在位置484处的氨基酸残基为I。

[0073] 在另一个优选实施方案中,在位置473处的氨基酸残基为W,在位置476处的氨基酸残基为K,在位置477处的氨基酸残基为F,并且在位置484处的氨基酸残基为I。

[0074] 在又一个特定实施方案中,在位置477处的氨基酸残基为I、V、L或F或M,在位置473处的氨基酸残基为I、F或W,在位置475处的氨基酸残基为R,在位置476处的氨基酸残基为K,在位置478处的氨基酸残基为D,在位置479处的氨基酸残基为E,并且在位置484处的氨基酸残基为I。

[0075] 为了进一步稳定三聚体融合前HMPV F蛋白,在某些实施方案中,在位置112处的氨

基酸残基为R,和/或在位置209处的氨基酸残基为E,和/或在位置453处的氨基酸残基为P或Q。

[0076] 在进一步的实施方案中,在位置149处的氨基酸残基为Y,和/或在位置313处的氨基酸残基为W,和/或在位置445处的氨基酸残基为Y。

[0077] 在一个优选实施方案中,在位置112处的氨基酸残基为R,在位置209处的氨基酸残基为E,并且在位置453处的氨基酸残基为P或Q。

[0078] 根据本发明,通过引入一种或多种修饰,例如一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代,使HMPV F蛋白稳定(在三聚体融合前构象中)。一种此类稳定修饰是在HMPV F0蛋白的氨基酸序列中添加至少一个非天然切割位点。

[0079] 另一种稳定修饰是在HR2结构域中引入一种或多种稳定氨基酸。

[0080] 根据本发明,因此提供了处于融合前构象的稳定的三聚体HMPV蛋白。与并不包含这些修饰的HMPV F蛋白相比,根据本发明的修饰优选导致HMPV F三聚体的融合前构象的稳定性增加。与并不含有修饰的HMPV F蛋白相比,根据本发明的修饰优选导致稳定的"闭合式"融合前F三聚体,具有与针对融合后构象的抗体(例如DS7)的降低结合和/或与顶点界面结合抗体MPV458和MPV465的降低结合。另外或可替代地,与并不包含这些修饰的HMPV F蛋白相比,根据本发明的修饰导致在4℃和/或37℃下贮存两周后或者在速冻循环后增加的三聚体含量、解链温度和/或三聚体稳定性。特别地,与并不包含这些修饰的HMPV F蛋白相比,根据本发明的修饰导致在4℃下贮存至少6个月后增加的三聚体含量和三聚体稳定性。

[0081] 另外或可替代地,与并不包含这些修饰的HMPV F蛋白相比,本发明的修饰导致融合前HMPV F三聚体的表达水平增加。

[0082] 根据本发明,因此已证实了在所指示的位置处的特异性氨基酸的存在增加处于融合前构象的三聚体蛋白质的稳定性。根据本发明,特异性氨基酸可能已经存在于所指示的位置处(例如,在HMPV F蛋白的天然存在的变体中),或者可以根据本发明通过在该位置处的氨基酸取代(突变)成特异性氨基酸残基而引入。根据本发明,蛋白质包含在其氨基酸序列中的一个或多个突变,即,在所指示的位置处的一个或多个天然存在的氨基酸已被另一种氨基酸取代。

[0083] 天然存在的HMPV F蛋白中出现的某些稳定氨基酸残基包括231I、404P和368N。因此,在某些实施方案中,在位置231处的氨基酸残基为I,在位置404处的氨基酸残基为P,和/或在位置368处的氨基酸残基为N。

[0084] 根据本发明的蛋白质可以进一步包含一个或多个另外的稳定突变,例如,在共同未决的专利申请EP21215259中已描述的一个或多个稳定突变。因此,在某些实施方案中,在位置69处的氨基酸残基为Y或W,和/或在位置73处的氨基酸残基为W,和/或在位置185处的氨基酸残基为P,和/或在位置191处的氨基酸残基为I,和/或在位置116处的氨基酸残基为H,和/或在位置342处的氨基酸残基为P。

[0085] 另外或可替代地,蛋白质可以进一步包含一个或多个非天然的原体内或原体间二硫键,如EP21215259中所述的。在某些实施方案中,一个或多个二硫键选自在氨基酸残基140和147之间的原体内二硫键、和/或在氨基酸残基141或161之间的原体内二硫键、和/或在氨基酸残基360和459之间的原体内二硫键。

[0086] 任何和/或所有稳定修饰都可以个别地使用和/或与本文公开的任何其它稳定修

饰组合使用,以产生根据本发明的HMPV F蛋白。在示例性实施方案中,HMPV F蛋白包含至少一个非天然切割位点。另外或可替代地,HMPV F蛋白包含HR2结构域中的一个或多个稳定突变。另外或可替代地,HMPV F蛋白包含这样的氨基酸序列,其中在位置112处的氨基酸残基为R,和/或在位置209处的氨基酸残基为E,和/或在位置453处的氨基酸残基为P或Q,和/或在位置149处的氨基酸残基为Y,和/或在位置313处的氨基酸残基为W,和/或在位置445处的氨基酸残基为Y。

[0087] 再次注意到,关于氨基酸残基的位置参考SEQ ID NO:1。技术人员将能够确定其它HMPV毒株的F蛋白中的相应氨基酸残基。

[0088] 如上文所述,在某些实施方案中(例如在可溶性F蛋白的情况下),本发明的蛋白质包含截短的F1结构域。如本文所用,“截短的”F1结构域是指并非全长F1结构域的F1结构域,即其中C端的一个或多个氨基酸残基已被缺失。在某些实施方案中,至少跨膜结构域和胞质结构域已被缺失,以允许作为可溶性胞外域表达。在某些实施方案中,F1结构域在氨基酸残基481、482、483、484、485、486、487、488或489后进行截短。

[0089] 在一个优选实施方案中,截短的F1结构域包含HMPV F蛋白的氨基酸103-489或由其组成。

[0090] 在优选实施方案中,根据本发明的可溶性蛋白质并不含有异源三聚化结构域。然而,根据本发明,异源三聚化结构域可以连接到截短的F1结构域,需要时,任选地通过连接序列。在某些其它实施方案中,异源三聚化结构域是包含氨基酸序列GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL(SEQ ID NO:136)的折叠子结构域。

[0091] 在优选实施方案中,HMPV F0蛋白包含选自SEQ ID NO:4-135、SEQ ID NO:151-159、SEQ ID NO:161-182和SEQ ID NO:184的氨基酸序列或其片段。在一个特别优选的实施方案中,HMPV F0蛋白包含SEQ ID NO:30、70、81、82、83、96、111、119、131、132、133、134、135、155、156、159、170、180和184的氨基酸序列或其片段。在一个特别优选的实施方案中,HMPV F0序列包含SEQ ID NO:111、159、180或184的氨基酸序列或其片段。在一个优选实施方案中,HMPV F0序列包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列或其片段。在一个优选实施方案中,HMPV F0序列包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列或其片段。在另一个优选实施方案中,HMPV F0序列包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列或其片段。在另一个优选实施方案中,HMPV F0序列包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列或其片段。在一个优选实施方案中,氨基酸序列并不包含任何异源C末端标签序列。

[0092] 本发明另外提供了包含在F1和/或F2结构域的氨基酸序列中的至少一种修饰的HMPV F蛋白,其中所述蛋白质已在一个或多个切割位点处进行切割,导致通过一个或多个天然二硫桥共价连接的F2和F1结构域,并且其中所述蛋白质是三聚体的。如上文所述,本发明提供了未成熟(或无活性)的HMPV F0蛋白。在表达后,为了被激活,蛋白质通常通过蛋白酶进行切割(或加工)。本发明还涵盖了加工的HMPV F蛋白,即切割(或加工)后的HMPV F蛋白。因此,本发明还提供了基于如上文描述的HMPV F0蛋白的加工的HMPV F蛋白,其中所述加工的蛋白质已在一个或多个切割位点处进行切割,导致包含(截短的)F2结构域和(截短的)F1结构域的HMPV F蛋白,所述结构域通过一个或多个二硫桥进行共价连接,因此形成F1-F2二聚体。然后,三个F1-F2二聚体(每个F1-F2二聚体都是原体)形成同三聚体。应理解,在其中无活性F0蛋白包含第二个非天然切割位点的实施方案中,第一个非天然位点和第二

个非天然位点之间的间隔区序列通过切割被去除。

[0093] 还应理解,成熟的HMPV F蛋白将不包含信号序列。

[0094] 在一个优选实施方案中,根据本发明的加工的HMPV F蛋白包括包含HMPV F0蛋白的氨基酸103-481,优选氨基酸103-489的F1结构域,以及包含HMPV F0蛋白的氨基酸19-88的F2结构域。在一个特别优选的实施方案中,根据本发明的加工的HMPV F蛋白包括包含HMPV F0蛋白的氨基酸103-489的F1结构域、以及包含HMPV F0蛋白的氨基酸19-89的F2结构域。

[0095] 在一个特定实施方案中,F1结构域由HMPV F0蛋白的氨基酸103-489组成,而F2结构域由HMPV F0蛋白的氨基酸19-89组成。根据本发明,与野生型HMPV F蛋白的F1和/或F2结构域的氨基酸序列相比,F1和/或F2结构域的氨基酸序列含有一种或多种修饰。

[0096] 根据本发明,已发现当F2结构域含有氨基酸19-89时,优选(在切割后)在位置91处的氨基酸为R(如同它在天然序列中一样)。因此,在某些实施方案中,在位置89+2处的氨基酸为R:F2结构域已在位置89处的氨基酸后进行截短,但非天然切割位点(如RRRR)的添加优选导致在位置91处的R的保留。

[0097] 在某些实施方案中,加工的HMPV F蛋白衍生自选自SEQ ID NO:4-135、SEQ ID NO:151-159、SEQ ID NO:161-182和SEQ ID NO:184的HMPV F0序列,即包含选自SEQ ID NO:4-135、SEQ ID NO:151-159、SEQ ID NO:161-182和SEQ ID NO:184的F0序列的F1和F2结构域。

[0098] 在一个特别优选的实施方案中,加工的HMPV F蛋白包括包含选自SEQ ID NO:30、70、81、82、83、96、111、119、131、132、133、134、135、155、156、159、170、180和184的氨基酸序列的氨基酸121-507的F1结构域,以及包含氨基酸1-89、优选氨基酸19-89的F2结构域。在一个特别优选的实施方案中,HMPV F蛋白包括包含SEQ ID NO:111、159、180或184的氨基酸序列的氨基酸121-507的F1结构域,以及包含氨基酸1-89、优选19-89的F2结构域。

[0099] 如本申请自始至终使用的,核苷酸序列从5’到3’方向提供,并且按照本领域的惯例,氨基酸序列从N末端到C末端提供。技术人员应了解,可以通过常规分子生物学程序对蛋白质进行突变。

[0100] 如上文所述,根据本发明,HMPV F蛋白在融合前构象中是稳定的,如通过例如与不含本发明的修饰的HMPV F蛋白相比,与融合后特异性HMPV F抗体例如DS7的结合减少和/或开放式顶点界面结合剂例如MPV458和MPV465的结合减少所测量的。

[0101] 另外或可替代地,与不含本发明的修饰的HMPV F蛋白相比,根据本发明的HMPV F蛋白的三聚体含量增加,如通过例如经由分析型SEC检测到的上清液中的三聚体含量增加或纯化蛋白质的三聚体产率所测量的。

[0102] 另外或可替代地,与不含本发明的修饰的HMPV F蛋白相比,HMPV F蛋白的热稳定性增加,如通过例如热应激后的三聚体含量或上清液中的解链温度或纯化蛋白质的解链温度所测量的。

[0103] 本发明进一步提供了编码根据本发明的HMPV F蛋白的核酸分子。核酸分子可以是DNA或RNA多核苷酸。在优选的实施方案中,编码根据本发明的蛋白质的核酸分子对于哺乳动物细胞,优选人细胞中的表达进行密码子优化。密码子优化的方法是已知的并且先前已得到描述(例如WO 96/09378)。如果与野生型序列相比至少一个非优选密码子被更优选的密码子替换,则序列被视为密码子优化的。在本文中,非优选密码子是在生物中比编码相同

氨基酸的另一个密码子更不频繁使用的密码子,而更优选的密码子是在生物中比非优选密码子更频繁使用的密码子。关于特异性生物的密码子使用频率可以在密码子频率表,例如http://www.kazusa.or.jp/codon中找到。优选地多于一个非优选密码子,优选地大多数或所有非优选密码子由更优选的密码子替换。优选地,生物中最频繁使用的密码子用于密码子优化序列中。由优选密码子的替换一般导致更高的表达。

[0104] 技术人员应理解,由于遗传密码的简并性,众多不同的多核苷酸和核酸分子可以编码相同的蛋白质。还应理解,技术人员可以使用常规技术进行核苷酸取代,其并不影响由核酸分子编码的蛋白质序列,以反映蛋白质待在其中表达的任何特定宿主生物的密码子使用。因此,除非另有说明,否则"编码氨基酸序列的核苷酸序列或核酸分子"包括其为彼此的简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列或核酸分子。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可以包括或不包括内含子。

[0105] 在某些实施方案中,根据本发明的核酸分子编码包含选自SEQ ID NO:4-135、SEQ ID NO:151-159、SEQ ID NO:161-182和SEQ ID NO:184的氨基酸序列的蛋白质,或者由其衍生的加工的HMPV F蛋白或其片段。在一个特别优选的实施方案中,核酸分子编码包含SEQ ID NO:30、70、81、82、83、96、111、119、131、132、133、134、135、155、156、159、170、180和184的氨基酸序列的蛋白质,或者由其衍生的加工的HMPV F蛋白或其片段。在一个特别优选的实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:111、159、180或184的氨基酸序列的蛋白质,或由其衍生的加工的HMPV F蛋白。在一个优选实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的蛋白质或由其衍生的加工的HMPV F蛋白。在一个优选实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列的蛋白质或由其衍生的加工的HMPV F蛋白。在另一个优选实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列的蛋白质或由其衍生的加工的HMPV F蛋白。在另一个优选实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列的蛋白质或由其衍生的加工的HMPV F蛋白。

[0106] 核酸序列可以使用常规分子生物学技术进行克隆,或通过DNA合成从头生成,这可以通过在DNA合成和/或分子克隆领域开展业务的服务公司(例如GeneArt、GenScripts、Invitrogen、Eurofins)使用常规程序来执行。

[0107] 如上文所述,如本文所述的核酸分子可以是RNA多核苷酸(或RNA)。RNA可以是mRNA、修饰的mRNA、自复制RNA或环状mRNA。

[0108] 优选的RNA是自复制的。当递送至即使不含任何蛋白质的脊椎动物细胞时,自复制的RNA分子(复制子)也可以导致通过来自自身的转录(经由它由自身生成的反义拷贝)的多重子RNA产生。自复制的RNA分子通常是+链分子,其可以在递送至细胞后直接翻译,并且这种翻译提供了RNA依赖性RNA聚合酶,其随后由递送的RNA产生反义转录物和有义转录物两者。因此,所递送的RNA导致多重子RNA的产生。这些子RNA以及共线性亚基因组转录物可以自身翻译以提供编码免疫原的原位表达,或者可以转录以提供与所递送的RNA具有相同意义的进一步转录物,其被翻译以提供免疫原的原位表达。该转录序列的总体结果是所引入的复制子RNA数目的大幅扩增,并且因此所编码的免疫原变成细胞的主要多肽产物。

[0109] 用于实现自复制的一个合适系统是使用基于甲病毒的RNA复制子。这些+链复制子在递送到细胞后被翻译,以给出复制酶(或复制酶-转录酶)。复制酶被翻译为自切割以提供复制复合物的多聚蛋白,所述复制复合物产生+链递送RNA的基因组-链拷贝。这些-链转录

物自身可以转录以给出+链亲本RNA的更多拷贝,并且还给出编码免疫原的亚基因组转录物。因此,亚基因组转录物的翻译导致通过受感染细胞的免疫原的原位表达。合适的甲病毒复制子可以使用来自辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒、东方马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒等的复制酶。可以使用突变型或野生型病毒序列,例如,VEEV的减毒TC83突变体已用于复制子中。

[0110] 因此,优选的自复制RNA分子编码(i)RNA依赖性RNA聚合酶,其可以从自复制RNA分子转录RNA,以及(ii)根据本发明的HPMV F蛋白。聚合酶可以是甲病毒复制酶,例如包含甲病毒蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4中的一种或多种。

[0111] 尽管天然甲病毒基因组除非结构复制酶多聚蛋白之外还编码结构病毒粒子蛋白,但优选的是本发明的自复制RNA分子并不编码甲病毒结构蛋白。因此,优选的自复制RNA可以导致在细胞中产生自身的基因组RNA拷贝,但不产生含RNA的病毒粒子。无法产生这些病毒粒子意味着,与野生型甲病毒不同,自复制RNA分子不能以传染性形式延续自身。野生型病毒中对于延续所需的甲病毒结构蛋白不存在于本发明的自复制RNA中,并且它们的位置由编码感兴趣的免疫原的基因取代,使得亚基因组转录物编码免疫原而不是结构甲病毒病毒粒子蛋白。

[0112] 因此,对于本发明有用的自复制RNA分子可以具有两个开放读码框。第一个(5')开放读码框编码复制酶;第二个(3')开放读码框编码免疫原。在一些实施方案中,RNA可以具有另外的(例如下游)开放读码框,例如编码进一步的免疫原(参见下文)或编码附加多肽。

[0113] 自复制RNA分子可以具有与编码的复制酶相容的5'序列。自复制RNA分子可以具有各种长度,但它们通常为5000-25000个核苷酸长,例如8000-15000个核苷酸,或9000-12000个核苷酸。

[0114] 对于本发明有用的RNA分子可以具有5'帽(例如7-甲基鸟苷)。该帽可以增强RNA的体内翻译。对于本发明有用的RNA分子的5'核苷酸可以具有5'三磷酸基团。在加帽的RNA中,这可以经由5′-5'桥连接到7-甲基鸟苷。

[0115] RNA分子可以具有3'多聚腺苷酸尾。它还可以包括在其3'端附近的多聚腺苷酸聚合酶识别序列(例如AAUAAA)。对于本发明有用的RNA分子通常是单链的。单链RNA一般可以通过与TLR7、TLR8、RNA解旋酶和/或PKR结合来启动佐剂效应。以双链形式递送的RNA(dsRNA)可以与TLR3结合,并且该受体也可以由在单链RNA的复制期间或在单链RNA的二级结构内形成的dsRNA触发。

[0116] 对于本发明有用的RNA分子可以方便地通过体外转录(IVT)进行制备。IVT可以使用在细菌中以质粒形式产生且传播的(cDNA)模板,或者(例如通过基因合成和/或聚合酶链反应改造方法)合成产生的(cDNA)模板。例如,DNA依赖性RNA聚合酶(例如细菌噬菌体T7、T3或SP6 RNA聚合酶)可以用于从DNA模板转录RNA。可以根据需要使用适当的封端和多聚腺苷酸加成反应(尽管复制子的多聚腺苷酸通常在DNA模板内编码)。这些RNA聚合酶可以对于转录的5'核苷酸具有严格的要求,并且在一些实施方案中,这些要求必须与编码的复制酶的要求相匹配,以确保IVT转录的RNA可以有效地充当其自编码复制酶的底物。

[0117] 自复制RNA可以包括(除任何5'帽结构之外)具有修饰的核碱基的一个或多个核苷酸。因此,RNA可以包含m5C(5-甲基胞苷)、m5U(5-甲基尿苷)、m6A(N6-甲基腺苷)、s2U(2-硫代尿苷)、Um(2'-O-甲基尿苷)、m1A(1-甲基腺苷);m2A(2-甲基腺苷);Am(2'-O-甲基腺苷);

ms2m6A(2-甲硫基-N6-甲基腺苷);i6A(N6-异戊烯基腺苷);ms2i6A(2-甲硫基-N6异戊烯基腺苷);io6A(N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷);ms2io6A(2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷);g6A(N6-甘氨酰氨基甲酰腺苷);t6A(N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷);ms2t6A(2-甲硫基-N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷);m6t6A(N6-甲基-N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷);hn6A(N6.-羟基正缬氨酰氨基甲酰腺苷);ms2hn6A(2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰氨基甲酰腺苷);Ar(p)(2'-O-核糖基腺苷(磷酸盐));I(肌苷);mil(1-甲基肌苷);m'lm(1,2'-O-二甲基肌苷);m3C(3-甲基胞苷);Cm(2T-O-甲基胞苷);s2C(2-硫代胞苷);ac4C(N4-乙酰胞苷);f5C(5-甲酰基胞苷);m5Cm(5,2-O-二甲基胞苷);ac4Cm(N4乙酰2TO甲基胞苷);k2C(赖胞苷);m1G(1-甲基鸟苷);m2G(N2-甲基鸟苷);m7G(7-甲基鸟苷);Gm(2'-O-甲基鸟苷);m22G(N2,N2-二甲基鸟苷);m2Gm(N2,2'-O-二甲基鸟苷);m22Gm(N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷);Gr(p)(2'-O-核糖基鸟苷(磷酸盐));yW(怀丁苷);o2yW(过氧怀丁苷);OHyW(羟基怀丁苷);OHyW*(未修饰的羟基怀丁苷);imG(怀俄苷);mimG(甲基鸟苷);Q(辫苷);oQ(环氧辫苷);galQ(半乳糖基辫苷);manQ(甘露糖基辫苷);preQo(7-氰基-7-脱氮鸟苷);preQi(7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷);G*(古嘌苷);D(二氢尿苷);m5Um(5,2'-O-二甲基尿苷);s4U(4-硫代尿苷);m5s2U(5-甲基-2-硫代尿苷);s2Um(2-硫代-2'-O-甲基尿苷);acp3U(3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷);ho5U(5-羟基尿苷);mo5U(5-甲氧基尿苷);cmo5U(尿苷5-氧基乙酸);mcmo5U(尿苷5-氧基乙酸甲酯);chm5U(5-(羧基羟甲基)尿苷));mchm5U(5-(羧基羟甲基)尿苷甲酯);mcm5U(5-甲氧羰基甲基尿苷);mcm5Um(S-甲氧羰基甲基-2-O-甲基尿苷);mcm5s2U(5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷);nm5s2U(5-氨基甲基-2-硫代尿苷);mnm5U(5-甲基氨基甲基尿苷);mnm5s2U(5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷);mnm5se2U(5-甲基氨基甲基-2-硒代尿苷);ncm5U(5-氨基甲酰甲基尿苷);ncm5Um(5-氨基甲酰甲基-2'-O-甲基尿苷);cmnm5U(5-羧甲基氨基甲基尿苷);cnmm5Um(5-羧甲基氨基甲基-2-L-O甲基尿苷);cmnm5s2U(5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷);m62A(N6,N6-二甲基腺苷);Tm(2'-O-甲基肌苷);m4C(N4-甲基胞苷);m4Cm(N4,2-O-二甲基胞苷);hm5C(5-羟甲基胞苷);m3U(3-甲基尿苷);cm5U(5-羧甲基尿苷);m6Am(N6,T-O-二甲基腺苷);rn62Am(N6,N6,0-2-三甲基腺苷);m2'7G(N2,7-二甲基鸟苷);m2'2'7G(N2,N2,7-三甲基鸟苷);m3Um(3,2T-O-二甲基尿苷);m5D(5-甲基二氢尿苷);f5Cm(5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷);m1Gm(1,2'-O-二甲基鸟苷);m'Am(1,2-O-二甲基腺苷)irinomethyluridine);tm5s2U(S-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷));imG-14(4-脱甲基鸟苷);imG2(异鸟苷);或ac6A(N6-乙酰腺苷)、次黄嘌呤、肌苷、8-氧代腺嘌呤、其7-取代衍生物、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5-(C1-C6)-烷基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(C2-C6)-烯基尿嘧啶、5-(C2-C6)-炔基尿嘧啶、5-(羟甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-(C1-C6)-烷基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-(C2-C6)-烯基胞嘧啶、5-(C2-C6)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶,5-溴胞嘧啶、N2-二甲基鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、8-氮鸟嘌呤、7-脱氮-7-取代的鸟嘌呤、7-脱氮-7-(C2-C6)炔基鸟嘌呤、7-脱氮-8-取代的鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、6-硫鸟嘌呤、8-氧鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,4-二氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、8-氮嘌呤、取代的7-脱氮嘌呤、7-脱氮-7-取代的嘌呤、7-脱氮-8-取代的嘌呤或脱碱基核苷酸。例如,自复制RNA可以包括一个或多个修饰的嘧啶核碱基,例如假尿苷和/或5-甲基胞嘧啶残基。然而,在一些实施方案中,RNA并不包括修饰的核碱基,并且可能并不包括修饰的核苷酸,即RNA中的所有核苷酸都是标准的A、C、G和U核糖核苷酸(除了

可能包括7'-甲基鸟苷的任何5'帽结构之外)。在其它实施方案中,RNA可以包括包含7'-甲基鸟苷的5'帽,并且前1、2或3个5'核糖核苷酸可以在核糖的2'位置处甲基化。与本发明一起使用的RNA理想地仅包括核苷之间的磷酸二酯键合,但在一些实施方案中,它可以含有氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和/或甲基膦酸酯键合。理想地,脂质体包括少于10个不同的RNA种类,例如5、4、3或2个不同的种类;最优选地,脂质体包括单一RNA种类,即脂质体中的所有RNA分子具有相同的序列和相同的长度。

[0118] 在某些实施方案中,核酸分子是具有编码根据本发明的HPMV F蛋白或其片段的开放读码框的RNA多核苷酸,并且可以配制成阳离子脂质纳米颗粒、阳离子纳米乳剂或基于聚合物的制剂或任何组合或替代制剂,其适合于将saRNA在不同物种包括人中在体外或体内带入人或动物细胞中。

[0119] 在一些实施方案中,本公开的RNA复制子可以使用一种或多种脂质体、脂质复合物和/或脂质纳米颗粒进行配制。在一些实施方案中,本文描述的脂质体或脂质纳米颗粒制剂可以包含聚阳离子组合物。在一些实施方案中,包含聚阳离子组合物的制剂可以用于本文描述的RNA复制子的体内和/或离体递送。

[0120] 本发明因此进一步提供了编码重组融合前HMPV F蛋白或其片段的RNA复制子,其中所述HMPV F蛋白包含选自SEQ ID NO:180或184的氨基酸序列或其片段或变体。

[0121] 在某些方面,RNA复制子从5'端到3'端包含:

[0122] (1)非结构蛋白介导的RNA病毒扩增所需的5'非翻译区(5'-UTR);

[0123] (2)编码RNA病毒的至少一种、优选所有非结构蛋白的多核苷酸序列;

[0124] (3)RNA病毒的亚基因组启动子;

[0125] (4)编码重组融合前HMPV F蛋白或其片段或变体的多核苷酸序列;和

[0126] (5)非结构蛋白介导的RNA病毒扩增所需的3'非翻译区(3'-UTR)。

[0127] 在某些方面,RNA复制子从5'端到3'端包含:

[0128] (1)甲病毒5'非翻译区(5'-UTR),

[0129] (2)甲病毒非结构基因nsp1的5'复制序列,

[0130] (3)病毒物种的下游环(DLP)基序,

[0131] (4)编码自蛋白酶(autoprotease)肽的多核苷酸序列,

[0132] (5)编码甲病毒非结构蛋白nsp1、nsp2、nsp3和nsp4的多核苷酸序列,

[0133] (6)甲病毒亚基因组启动子,

[0134] (7)编码重组融合前HMPV F蛋白或其片段的多核苷酸序列,

[0135] (8)甲病毒3'非翻译区(3'UTR),和

[0136] (9)任选的多聚腺苷酸序列。

[0137] 在某些方面,本文提供了RNA复制子,其从5'端到3'端包含:

[0138] (1)具有SEQ ID NO:136的多核苷酸序列的5'-UTR,

[0139] (2)具有SEQ ID NO:137的多核苷酸序列的5'复制序列,

[0140] (3)包含SEQ ID NO:138的多核苷酸序列的DLP基序,

[0141] (4)编码SEQ ID NO:139的P2A序列的多核苷酸序列,

[0142] (5)编码分别具有SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:143的核酸序列的甲病毒非结构蛋白nsp1、nsp2、nsp3和nsp4的多核苷酸序列,

[0143] (6)具有SEQ ID NO:144的多核苷酸序列的亚基因组启动子,

[0144] (7)编码具有选自SEQ ID NO:180和SEQ ID NO:184的氨基酸序列的融合前HMPV F蛋白或其片段或变体的多核苷酸序列,和

[0145] (8)具有SEQ ID NO:145的多核苷酸序列的3'UTR。

[0146] 在某些方面,(a)编码P2A序列的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:146,并且RNA复制子进一步包含多聚腺苷酸序列,优选地,多聚腺苷酸序列在复制子的3'端处具有SEQ ID NO:147。

[0147] 在某些方面,RNA复制子包含SEQ ID NO:187或188的多核苷酸序列。在一个优选实施方案中,SEQ ID NO:187的多核苷酸序列7972-9649是HMPV F蛋白(包括终止密码子),特别是SEQ ID NO:184的HMPV蛋白的编码序列。在另一个优选实施方案中,SEQ ID NO:188的多核苷酸序列7972-9500是HMPV F蛋白(包括终止密码子),特别是SEQ ID NO:184的HMPV蛋白的编码序列。

[0148] 还提供了包含编码本文描述的RNA复制子的DNA序列的核酸,优选地,核酸进一步包含可操作地连接到DNA序列的5'端的T7启动子,更优选地,T7启动子包含SEQ ID NO:148的核苷酸序列。

[0149] 如本文所用,术语"片段"是指这样的蛋白质或(多)肽,其具有氨基末端和/或羧基末端和/或内部缺失,但其中剩余的氨基酸序列与HMPV F蛋白的序列,例如HMPV F蛋白的全长序列中的相应位置相同。应了解,为了诱导免疫应答和一般而言为了疫苗接种目的,蛋白质无需是全长的,也无需具有其所有野生型功能,并且蛋白质的片段同样有用。

[0150] 根据本发明的片段是免疫活性片段,并且通常包含HMPV F蛋白的至少15个氨基酸或至少30个氨基酸。在某些实施方案中,它包含HMPV F蛋白的至少50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500或550个氨基酸。

[0151] 本领域技术人员还应了解,例如,通过氨基酸取代、缺失、添加等,例如,使用常规分子生物学程序,可以对蛋白质进行改变。一般地,可以应用保守的氨基酸取代而无多肽的功能或免疫原性丧失。这可以根据技术人员众所周知的常规程序容易地进行检查。

[0152] 技术人员应理解,由于遗传密码的简并性,众多不同的核酸可以编码相同的多肽或蛋白质。还应理解,技术人员可以使用常规技术进行核苷酸取代,其并不影响由核酸编码的氨基酸序列,以反映多肽待在其中表达的任何特定宿主生物的密码子使用。因此,除非另有规定,否则"编码氨基酸序列的核苷酸序列"包括彼此的简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可以包括内含子。

[0153] 核酸序列可以使用常规分子生物学技术进行克隆,或通过DNA合成从头生成,这可以通过在DNA合成和/或分子克隆领域开展业务的服务公司(例如GeneArt、GenScript、Invitrogen、Eurofins)使用常规程序来执行。

[0154] 本发明还提供了包含如上所述的核酸分子的载体。在某些实施方案中,因此,根据本发明的核酸分子是载体的部分。此类载体可以通过本领域技术人员众所周知的方法容易地操作,并且可以例如设计为能够在原核细胞和/或真核细胞中复制。另外,许多载体可以用于转化真核细胞,并且将整体或部分整合到此类细胞的基因组内,导致在其基因组中包含所需核酸的稳定宿主细胞。所用的载体可以是适合于克隆DNA并且可以用于转录感兴趣核酸的任何载体。

[0155] 优选地,载体是自复制RNA复制子。

[0156] 如本文所用,可与“自扩增RNA分子”或“RNA复制子”或“复制子RNA”或“saRNA”互换使用的“自复制RNA分子”,是指从正链RNA病毒的基因组改造的RNA分子,其含有在允许细胞内指导其自身扩增或自复制所需的所有遗传信息。自复制RNA分子类似于mRNA。它是单链、5′加帽和3′多聚腺苷酸化的且具有正向性。为了指导其自身复制,RNA分子1)编码聚合酶、复制酶或其它蛋白质,所述蛋白质可以与病毒或宿主细胞衍生的蛋白质、核酸或核糖核蛋白相互作用,以催化RNA扩增过程;并且2)含有亚基因组复制子编码RNA的复制和转录所需的顺式作用RNA序列。因此,所递送的RNA导致产生多重子RNA。这些子RNA以及共线性亚基因组转录物可以自行翻译以提供感兴趣的基因的原位表达,或者可以转录以提供与递送的RNA具有相同意义的进一步转录物,其被翻译以提供感兴趣的基因的原位表达。该转录序列的总体结果是所引入的复制子RNA数目的大幅扩增,并且因此所编码的感兴趣基因变成细胞的主要多肽产物。

[0157] 在某一实施方案中,本申请的RNA复制子从5’端到3’端依次包含:(1)非结构蛋白介导的RNA病毒扩增所需的5’非翻译区(5’-UTR);(2)编码RNA病毒的至少一种、优选所有非结构蛋白的多核苷酸序列;(3)RNA病毒的亚基因组启动子;(4)编码重组融合前HMPV F蛋白或其片段或变体的多核苷酸序列;以及(5)非结构蛋白介导的RNA病毒扩增所需的3’非翻译区(3’-UTR)。

[0158] 在某些实施方案中,自复制RNA分子编码用于自扩增的酶复合物(复制酶多聚蛋白),其包含RNA依赖性RNA聚合酶功能、解旋酶、加帽和多聚腺苷酸化活性。处于亚基因组启动子的控制下的复制酶下游的病毒结构基因可以被本文描述的融合前HMPV F蛋白或其片段或变体替换。转染后,复制酶立即翻译,与基因组RNA的5’和3’末端相互作用,并且合成互补的基因组RNA拷贝。它们充当合成新型正链、加帽和多聚腺苷酸化的基因组拷贝以及亚基因组转录物的模板。扩增最终导致高达2×105个拷贝/细胞的极高RNA拷贝数。因此,与常规mRNA相比,量少得多的saRNA足以实现有效的基因转移和保护性疫苗接种(Beissert等人,Hum Gene Ther.2017,28(12):1138-1146)。

[0159] 亚基因组RNA是长度或大小小于它由其衍生的基因组RNA的RNA分子。病毒亚基因组RNA可以由内部启动子转录,其序列位于基因组RNA或其互补体内。亚基因组RNA的转录可以由与宿主细胞编码的蛋白质、核糖核蛋白或其组合相关的病毒编码聚合酶介导。众多RNA病毒生成亚基因组mRNA(sgRNA)用于表达其3’-近端基因。

[0160] 在本公开的一些实施方案中,本文描述的融合前HMPV F蛋白或其片段在亚基因组启动子的控制下表达。在某些实施方案中,代替天然亚基因组启动子,亚基因组RNA可以置于衍生自脑心肌炎病毒(EMCV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、脊髓灰质炎病毒、口蹄疫病毒(FMD)、肠道病毒71或丙型肝炎病毒的内部核糖体进入位点(IRES)的控制下。亚基因组启动子的范围从24个核苷酸(辛德毕斯病毒)到超过100个核苷酸(甜菜坏死黄脉病毒),并且通常在转录起始的上游发现。

[0161] 在一些实施方案中,RNA复制子包括关于至少一种、至少两种、至少三种或至少四种非结构病毒蛋白(例如,nsP1、nsP2、nsP3、nsP4)的编码序列。甲病毒基因组编码非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4,其作为单一多聚蛋白前体产生,有时称为P1234(或nsP1-4或nsP1234),并且通过蛋白酶解加工切割为成熟蛋白质。nsP1的大小可以为约60kDa,并且可

能具有甲基转移酶活性并涉及病毒加帽反应。nsP2具有约90kDa的大小,并且可能具有解旋酶和蛋白酶活性,而nsP3为约60kDa,并且含有三个结构域:宏结构域、中心(或甲病毒独有的)结构域和高变结构域(HVD)。nsP4的大小为约70kDa,并且含有核心RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)催化结构域。在感染后,甲病毒基因组RNA被翻译以产生P1234多聚蛋白,其被切割成各个蛋白质。在公开本文的核酸或多肽序列,例如nsP1、nsP2、nsP3、nsP4的序列时,还公开了被视为基于或衍生自原始序列的序列。

[0162] 在一些实施方案中,RNA复制子包括关于至少一种非结构病毒蛋白的一部分的编码序列。例如,RNA复制子可以包括关于至少一种非结构病毒蛋白的编码序列的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%或这些值中的任何两个之间的范围。在一些实施方案中,RNA复制子可以包括关于至少一种非结构病毒蛋白的基本部分的编码序列。如本文所用,编码非结构病毒蛋白的核酸序列的"基本部分"包含足够的编码非结构病毒蛋白的核酸序列,以提供该蛋白或通过序列经由本领域技术人员的手动评估,或通过使用算法例如BLAST的计算机自动化序列比较和鉴定(参见,例如,在"基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)"中;Altschul S F等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1993)的推定鉴定。在一些实施方案中,RNA复制子可以包括关于至少一种非结构蛋白的整个编码序列。在一些实施方案中,RNA复制子包含关于天然病毒非结构蛋白的基本上所有编码序列。在某些实施方案中,一种或多种非结构病毒蛋白衍生自相同的病毒。在其它实施方案中,一种或多种非结构蛋白衍生自不同的病毒。

[0163] RNA复制子可以衍生自任何合适的正链RNA病毒,例如甲病毒或黄病毒。优选地,RNA复制子衍生自甲病毒。术语"甲病毒"描述了披膜病毒科(Togaviridae)的有包膜单链正义RNA病毒。甲病毒属含有大约30个成员,其可以感染人以及其它动物。甲病毒颗粒通常具有70nm的直径,趋于球形或略微多形,并且具有40nm等距核衣壳。甲病毒的总基因组长度范围为11,000至12,000个核苷酸,并且具有5'帽和3'多聚腺苷酸尾。基因组中存在两个开放读码框(ORF),非结构的(ns)和结构的。ns ORF编码病毒RNA转录和复制所需的蛋白质(nsP1-nsP4)。结构ORF编码三种结构蛋白:核心核衣壳蛋白C,以及作为异二聚体结合的包膜蛋白P62和E1。病毒膜锚定的表面糖蛋白负责受体识别并通过膜融合进入靶细胞内。四种ns蛋白基因由基因组5′三分之二的基因编码,而三种结构蛋白由与基因组3′三分之一共线性的亚基因组mRNA翻译。

[0164] 在一些实施方案中,可用于本发明的自复制RNA是衍生自甲病毒物种的RNA复制子。在一些实施方案中,甲病毒RNA复制子是属于VEEV/EEEV组、或SF组或SIN组的甲病毒。SF组甲病毒的非限制性实例包括塞姆利基森林病毒、奥尼翁尼翁病毒(O'Nyong-Nyong virus)、罗斯河病毒、米德尔堡病毒、基孔肯雅病毒、巴马森林病毒、盖塔病毒、马亚罗病毒、鹭山病毒、贝巴鲁病毒和乌纳病毒。SIN组甲病毒的非限制性实例包括辛德比斯病毒、Girdwood S.A.病毒、南非虫媒病毒No.86、Ockelbo病毒、奥拉病毒、巴班肯病毒、沃达罗河病毒(Whataroa virus)和Kyz病毒(Kyzylagach virus)。VEEV/EEEV组甲病毒的非限制性实例包括东方马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、大沼泽地病毒(Everglades virus)(EVEV)、穆坎布病毒(MUCV)、皮克孙纳病毒(Pixuna virus)(PIXV)、米德尔堡病毒(MIDV)、基孔肯雅病毒(CHIKV)、奥尼翁尼翁病毒(ONNV)、罗斯河病毒(RRV)、巴马森林病毒(BF)、盖塔病毒(GET)、鹭山病毒(SAGV)、贝巴鲁病毒(BEBV)、马亚罗病毒(MAYV)和乌纳病毒

(UNAV)。

[0165] 甲病毒属物种的非限制性实例包括东方马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、大沼泽地病毒(EVEV)、穆坎布病毒(MUCV)、塞姆利基森林病毒(SFV)、皮克孙纳病毒(PIXV)、米德尔堡病毒(MIDV)、基孔肯雅病毒(CHIKV)、奥尼翁尼翁病毒(ONNV)、罗斯河病毒(RRV)、巴马森林病毒(BF)、盖塔病毒(GET)、鹭山病毒(SAGV)、贝巴鲁病毒(BEBV)、马亚罗病毒(MAYV)、乌纳病毒(UNAV)、辛德比斯病毒(SINV)、奥拉病毒(AURAV)、沃达罗河病毒(WHAV)、巴班肯病毒(BABV)、Kyz病毒(KYZV)、西方马脑炎病毒(WEEV)、高地J病毒(HJV)、摩根堡病毒(Fort Morgan virus)(FMV)、Ndumu(NDUV)和Buggy Creek病毒。强毒和无毒甲病毒株均是合适的。在一些实施方案中,甲病毒RNA复制子是辛德毕斯病毒(SIN)、塞姆利基森林病毒(SFV)、罗斯河病毒(RRV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)或东方马脑炎病毒(EEEV)的复制子。在一些实施方案中,甲病毒RNA复制子是委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)。

[0166] 在某些实施方案中,自复制RNA分子包含编码一种或多种非结构蛋白nsp1-4的多核苷酸、亚基因组启动子例如26S亚基因组启动子、以及编码本文描述的融合前HMPV F蛋白或其片段的感兴趣基因。

[0167] 自复制RNA分子可以具有5'帽(例如,7-甲基鸟苷)。该帽可以增强RNA的体内翻译。

[0168] 对于本发明有用的自复制RNA分子的5'核苷酸可以具有5'三磷酸基团。在加帽RNA中,这可以经由5'-至-5'桥与7-甲基鸟苷连接。5'三磷酸可以增强RIG-I结合。

[0169] 自复制RNA分子可以具有3'多聚腺苷酸尾。它还可以包括在其3'端附近的多聚腺苷酸聚合酶识别序列(例如,AAUAAA)。

[0170] 在本公开的任何实施方案中,RNA复制子可以缺少(或不含)至少一种(或所有)结构病毒蛋白(例如,核衣壳蛋白C以及包膜蛋白P62、6K和E1)的编码序列。在这些实施方案中,编码一个或多个结构基因的序列可以被一个或多个异源序列,例如如本文描述的融合前HMPV F蛋白或其片段的编码序列取代。在一个优选实施方案中,RNA复制子缺乏(或不含)关于结构病毒蛋白的所有编码序列。

[0171] 在某些实施方案中,本申请的自复制RNA载体包含一个或多个特征,以赋予对通过先天免疫系统的翻译抑制的抗性或以其它方式增加GOI(例如,本文描述的融合前HMPV F蛋白或其片段或变体)的表达。

[0172] 在某些实施方案中,RNA序列可以进行密码子优化以改善翻译效率。鉴于本公开,RNA分子可以通过本领域已知的任何方法进行修饰,以增强稳定性和/或翻译,例如通过添加例如至少30个腺苷残基的多聚腺苷酸尾;和/或用修饰的核苷酸例如7-甲基鸟苷帽对5端进行加帽,其可以在RNA合成过程中掺入或在RNA转录后进行酶促改造。

[0173] 在某些实施方案中,本申请的RNA复制子从5'端到3'端依次包含:(1)甲病毒5'非翻译区(5'-UTR),(2)甲病毒非结构基因nsp1的5'复制序列,(3)病毒物种的下游环(DLP)基序,(4)编码自蛋白酶肽的多核苷酸序列,(5)编码甲病毒非结构蛋白nsp1、nsp2、nsp3和nsp4的多核苷酸序列,(6)甲病毒亚基因组启动子,(7)编码重组融合前HMPV F蛋白或其片段或变体的多核苷酸序列,(8)甲病毒3′非翻译区(3′UTR),以及(9)任选的多聚腺苷酸序列。

[0174] 在某些实施方案中,本申请的自复制RNA载体包含病毒物种的下游环(DLP)基序。如本文所用,“下游环”或“DLP基序”是指包含至少一个RNA茎环的多核苷酸序列,当置于开

放读码框(ORF)的起始密码子下游时,与不含DLP基序的在其它方面相同的构建体相比,所述多核苷酸序列提供了ORF的增加翻译。例如,甲病毒属的成员可以借助于病毒26S转录物内存在的占优势RNA结构抵抗抗病毒RNA活化蛋白激酶(PKR)的激活,其允许这些mRNA的eIF2不依赖性翻译起始。该结构称为下游环(DLP),定位于SINV 26S mRNA中AUG的下游。DLP也在塞姆利基森林病毒(SFV)中检测到。已报道了类似的DLP结构存在于甲病毒属的至少14个其它成员中,包括新世界(例如,MAYV、UNAV、EEEV(NA)、EEEV(SA)、AURAV)和旧世界(SV、SFV、BEBV、RRV、SAG、GETV、MIDV、CHIKV和ONNV)成员。这些甲病毒26S mRNA的预测结构基于SHAPE(选择性2'-羟基酰化和引物延伸)数据进行构建(Toribio等人,Nucleic Acids Res.May 19;44(9):4368-80,2016),其内容在此通过引用并入)。除了CHIKV和ONNV之外,在所有情况下都检测到稳定的茎环结构,而MAYV和EEEV显示了稳定性较低的DLP(Toribio等人,2016同上)。在辛德毕斯病毒的情况下,DLP基序在辛德毕斯亚基因组RNA的前150个nt中发现。发夹定位于辛德毕斯衣壳AUG起始密码子的下游(AUG位于辛德毕斯亚基因组RNA的nt 50处)。序列比较和结构RNA分析的先前研究揭示了SINV中DLP的进化保守性,并且预测了甲病毒属的许多成员中存在等价的DLP结构(参见,例如,Ventoso,J.Virol.9484-9494,第86卷,2012年9月)。包含DLP基序的自复制RNA载体的实例在美国专利申请公开US2018/0171340和国际专利申请公开WO2018106615中进行描述,所述专利申请公开的内容通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中,本申请的复制子RNA包含与SEQ ID NO:138中所示的序列显示出至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的DLP基序。

[0175] 在一个实施方案中,自复制RNA分子还含有关于可操作地连接在DLP基序下游和非结构蛋白(例如,nsp1-4中的一种或多种)或感兴趣基因(例如,本文描述的融合前HMPV F蛋白或其片段)的编码序列上游的自蛋白酶肽的编码序列。自蛋白酶肽的实例包括但不限于选自以下的肽序列:猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)、马鼻炎病毒A(ERAV)2A(E2A)、明脉扁刺蛾病毒(Thosea asigna virus)2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒(Flacherie Virus)2A(BmIFV2A)及其组合。在一些实施方案中,本申请的复制子RNA包含具有SEQ ID NO:139的氨基酸序列的P2A的编码序列。优选地,编码序列与SEQ ID NO:146中所示的序列显示出至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0176] 本发明的任何复制子还可以包含5'和3'非翻译区(UTR)。UTR可以是野生型新世界或旧世界甲病毒UTR序列,或衍生自其中任何的序列。在各个实施方案中,5'UTR可以具有任何合适的长度,例如约60nt或50-70nt或40-80nt。在一些实施方案中,5'UTR还可以具有保守的一级结构或二级结构(例如,一个或多个茎环),并且可以参与甲病毒或复制子RNA的复制。在一些实施方案中,3'UTR可以多达几百个核苷酸,例如,它可以是50-900或100-900或50-800或100-700或200nt-700nt。3'UTR还可以具有二级结构,例如茎环(step loop),并且随后可以为多聚腺苷酸束或多聚腺苷酸尾。在本发明的任何实施方案中,5'和3'非翻译区可以可操作地连接到由复制子编码的任何其它序列。UTR可以通过提供其它编码序列的识别和转录所需的序列和间隔而可操作地连接到启动子和/或编码异源蛋白质或肽的序列。鉴于本公开,可以使用本领域技术人员已知的任何多聚腺苷酸化信号。例如,多聚腺苷酸化信号可以是SV40多聚腺苷酸化信号、LTR多聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸

化信号、人生长激素(hGH)多聚腺苷酸化信号或人β-珠蛋白多聚腺苷酸化信号。

[0177] 在另一个实施方案中,本申请的自复制RNA复制子包含修饰的5'非翻译区(5'-UTR),优选地,RNA复制子缺乏编码病毒结构蛋白的核酸序列的至少一部分。例如,修饰的5′-UTR可以包含在位置1、2、4或其组合处的一个或多个核苷酸取代。优选地,修饰的5′-UTR包含在位置2处的核苷酸取代,更优选地,修饰的5′-UTR具有在位置2处的U->G或U->A取代。此类自复制RNA分子的实例在美国专利申请公开US2018/0104359和国际专利申请公开WO2018075235中进行描述,所述专利申请公开的内容通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中,本申请的复制子RNA包含与SEQ ID NO:136中所示的序列显示出至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的5′-UTR。

[0178] 在一些实施方案中,本申请的RNA复制子包含编码信号肽序列的多核苷酸序列。优选地,编码信号肽序列的多核苷酸序列定位于编码融合前HMPV F蛋白或其片段的多核苷酸序列的上游或5′端处。信号肽通常指导蛋白质的定位,促进蛋白质从它在其中产生的细胞中的分泌,和/或改善抗原表达以及对抗原呈递细胞的交叉呈递。当从复制子表达时,信号肽可以存在于融合前HMPV F蛋白或其片段的N末端处,但例如在从细胞中分泌时,被信号肽酶切割掉。其中信号肽已被切割的表达蛋白质经常被称为"成熟蛋白质"。鉴于本公开,可以使用本领域已知的任何信号肽。例如,信号肽可以是胱抑素S信号肽;免疫球蛋白(Ig)分泌信号,例如Ig重链γ信号肽SPIgG、Ig重链ε信号肽SPIgE或HMPV的短前导肽序列。编码信号肽的示例性核酸序列显示于SEQ ID NO:149中。

[0179] 在各个实施方案中,本文公开的RNA复制子可以是改造的、合成的或重组的RNA复制子。作为非限制性实例,RNA复制子可以是下述中的一种或多种:1)例如使用化学或酶促技术在体外合成或修饰,例如通过使用化学核酸合成,或通过使用酶用于核酸分子的复制、聚合、核酸外切酶消化、核酸内切酶消化、连接、逆转录、转录、碱基修饰(包括例如甲基化)或重组(包括同源和位点特异性重组);2)自然界中并不相连的相连核苷酸序列;3)使用分子克隆技术进行改造,使得它相对于天然存在的核苷酸序列缺少一个或多个核苷酸;以及4)使用分子克隆技术进行操作,使得它相对于天然存在的核苷酸序列具有一种或多种序列变化或重排。

[0180] RNA复制子的任何组分或序列都可以可操作地连接到任何其它组分或序列。RNA复制子的组分或序列可以可操作地连接,用于在宿主细胞或处理的生物中表达感兴趣基因和/或复制子自复制的能力。如本文所用,术语"可操作地连接"应在其最广泛的合理语境中理解,并且是指多核苷酸元素以功能关系的连接。当多核苷酸与另一个多核苷酸置于功能关系内时,它是"可操作地连接的"。例如,当存在适当的酶时,可操作地连接到编码序列的启动子或UTR能够影响编码序列的转录和表达。启动子不必与编码序列邻接,只要它发挥功能以指导其表达。因此,编码异源蛋白质或肽的RNA序列与调控序列(例如,启动子或UTR)之间的可操作连接是允许感兴趣多核苷酸表达的功能性连接。可操作连接还可以指序列例如编码RdRp(例如,nsP4)、nsP1-4、UTR、启动子和RNA复制子中的其它编码序列这样连接,使得它们允许融合前HMPV F蛋白的转录和翻译和/或复制子的复制。UTR可以通过提供经由其它编码序列的核糖体识别和翻译所需的序列和间隔进行可操作地连接。

[0181] 鉴于本公开,可以通过普通技术人员已知的多种测定来确定由RNA复制子表达的融合前HMPV F蛋白或其片段或变体的免疫原性。

[0182] 本申请的另一个一般方面涉及包含编码本申请的RNA复制子的DNA序列的核酸。核酸可以是例如DNA质粒或线性化DNA质粒的片段。优选地,核酸进一步包含可操作地连接到DNA序列的5'端的启动子,例如T7启动子。更优选地,T7启动子包含SEQ ID NO:148的核苷酸序列。鉴于本公开,核酸可以使用本领域已知的方法用于生产本申请的RNA复制子。例如,可以通过核酸的体内或体外转录来获得RNA复制子。

[0183] 包含RNA复制子或编码本申请的RNA复制子的核酸的宿主细胞也构成本发明的部分。HMPV F蛋白或其片段或变体可以通过重组DNA技术进行生产,所述重组DNA技术涉及在宿主细胞、或者转基因动物或植物中表达分子,所述宿主细胞例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、肿瘤细胞系、BHK细胞、人细胞系例如HEK293细胞、PER.C6细胞或酵母、真菌、昆虫细胞等等。在某些实施方案中,细胞来自多细胞生物,在某些实施方案中,它们具有脊椎动物或无脊椎动物起源。在某些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞例如人细胞或昆虫细胞。一般而言,在宿主细胞中产生重组蛋白质例如本发明的HMPV F蛋白或其片段或变体包含将编码以可表达形式的蛋白质的异源核酸分子引入宿主细胞内,在有助于核酸分子表达的条件下培养细胞,并且允许蛋白质或其片段或变体在所述细胞中的表达。编码以可表达形式的蛋白质的核酸分子可以是表达盒的形式,并且通常需要能够达到核酸表达的序列,例如增强子、启动子、多聚腺苷酸化信号等等。本领域技术人员知道,各种启动子可以用于获得基因在宿主细胞中的表达。启动子可以是组成型的或受调控的,并且可以得自各种来源,包括病毒、原核生物或真核生物来源,或者是人工设计的。

[0184] 在本发明的某些实施方案中,载体是腺病毒载体。根据本发明的腺病毒属于腺病毒科,并且优选地是属于哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus)的腺病毒。它可以是人腺病毒,也可以是感染其它物种的腺病毒,包括但不限于牛腺病毒(例如,牛腺病毒3,BAdV3)、犬腺病毒(例如,CAdV2)、猪腺病毒(例如,PAdV3或5)、或猿猴腺病毒(其包括猴腺病毒和猿腺病毒,例如黑猩猩腺病毒或大猩猩腺病毒)。优选地,腺病毒是人腺病毒(HAdV或AdHu),或猿猴腺病毒例如黑猩猩或大猩猩腺病毒(ChAd、AdCh或SAdV),或恒河猴腺病毒(RhAd)。在本发明中,如果没有指示物种而被称为Ad,则意指人腺病毒,例如,简要记号"Ad26"意味着与HAdV26相同,所述HAdV26是人腺病毒血清型26。另外,如本文所用,记号"rAd"意指重组腺病毒,例如,"rAd26"是指重组人腺病毒26。

[0185] 最先进的研究已使用人腺病毒执行,并且人腺病毒根据本发明的某些方面是优选的。在某些优选实施方案中,根据本发明的重组腺病毒基于人腺病毒。在优选实施方案中,重组腺病毒基于人腺病毒血清型5、11、26、34、35、48、49、50、52等。根据本发明的一个特别优选的实施方案,腺病毒是具有血清型26的人腺病毒。这些血清型的优点包括人群中的低血清流行率和/或预先存在的低中和抗体滴度,以及在临床试验中用于人受试者的经验。在一些实施方案中,腺病毒是复制缺陷型的,例如,因为它含有在基因组的E1区域中的缺失。对于衍生自非C组腺病毒的腺病毒,例如Ad26或Ad35,通常将腺病毒的E4-orf6编码序列与人C亚组的腺病毒例如Ad5的E4-orf6交换。这允许此类腺病毒在表达Ad5的E1基因的众所周知的补充(或包装)细胞系中繁殖,所述细胞例如如293细胞、PER.C6细胞等等(参见,例如,Havenga,等人,2006,J Gen Virol 87:2135-43;WO 03/104467)。然而,此类腺病毒不能在并不表达Ad5的E1基因的非补充细胞中复制。

[0186] 包含编码融合前HMPV F蛋白的核酸分子的宿主细胞也构成本发明的部分。融合前

HMPV F蛋白可以通过重组DNA技术进行生产,所述重组DNA技术涉及在宿主细胞、或者转基因动物或植物中表达分子,所述宿主细胞例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、肿瘤细胞系、BHK细胞、人细胞系例如HEK293细胞、PER.C6细胞或酵母、真菌、昆虫细胞等等。在某些实施方案中,细胞来自多细胞生物,在某些实施方案中,它们具有脊椎动物或无脊椎动物起源。在某些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方案中,细胞是人细胞。一般而言,在宿主细胞中产生重组蛋白质例如本发明的融合前HMPV F蛋白包含将编码以可表达形式的蛋白质的异源核酸分子引入宿主细胞内,在有助于核酸分子表达的条件下培养细胞,并且允许蛋白质在所述细胞中的表达。编码以可表达形式的蛋白质的核酸分子可以是表达盒的形式,并且通常需要能够达到核酸表达的序列,例如增强子、启动子、多聚腺苷酸化信号等等。本领域技术人员知道,各种启动子可以用于获得基因在宿主细胞中的表达。启动子可以是组成型的或受调控的,并且可以得自各种来源,包括病毒、原核生物或真核生物来源,或者是人工设计的。

[0187] 细胞培养基可从各种供应商获得,并且合适的培养基可以照常规选择用于宿主细胞,以表达感兴趣的蛋白质,此处融合前的HMPV F蛋白。合适的培养基可以含有或可以不含血清。

[0188] “异源核酸分子”(在本文中也被称为“转基因”)是宿主细胞中并非天然存在的核酸分子。它通过标准分子生物学技术引入例如载体内。转基因一般可操作地连接到表达控制序列。这可以例如通过将编码转基因的核酸置于启动子的控制下来完成。可以添加进一步的调控序列。许多启动子可以用于转基因的表达,并且是技术人员已知的,例如,这些启动子可以包含病毒、哺乳动物、合成启动子等等。用于在真核细胞中获得表达的合适启动子的非限制性实例是CMV启动子(US 5,385,839),例如CMV立即早期启动子,例如包含来自CMV立即早期基因增强子/启动子的nt.-735至+95。多聚腺苷酸化信号,例如牛生长激素多聚腺苷酸信号(US 5,122,458),可以存在于转基因之后。可替代地,几种广泛使用的表达载体是本领域可获得的且可得自商业来源,例如Invitrogen的pcDNA和pEF载体系列、来自BD Sciences的pMSCV和pTK-Hyg、来自Stratagene的pCMV-Script等,其可以用于重组表达感兴趣的蛋白质,或获得合适的启动子和/或转录终止子序列、多聚腺苷酸序列等等。

[0189] 细胞培养可以是任何类型的细胞培养,包括贴壁细胞培养,例如附着到培养容器的表面或微载体的细胞,以及悬浮培养。大多数大规模悬浮培养作为分批或补料分批工艺操作,因为它们最易于操作且扩大规模。如今,基于灌注原理的连续工艺变得更常见,并且也是合适的。合适的培养基也是技术人员众所周知的,并且一般可以以大数量从商业来源获得,或根据标准方案定制。培养可以例如在培养皿、滚瓶或生物反应器中,使用分批、补料分批、连续系统等等来完成。用于培养细胞的合适条件是已知的(参见例如Tissue Culture,Academic Press,Kruse and Paterson,编(1973),以及R.I.Freshney,Culture of animal cells:Amanual of basic technique,第四版(Wiley-Liss Inc.,2000,ISBN 0-471-34889-9))。

[0190] 本发明进一步提供了包含如本文所述的融合前HMPV F蛋白、和/或其片段、和/或核酸分子和/或载体的药物组合物。因此,本发明提供了包含融合前HMPV F蛋白或其片段的组合物,所述融合前HMPV F蛋白或其片段展示了在HMPV F蛋白的融合前构象中存在,但在融合后构象中不存在的表位。本发明还提供了包含编码此类融合前HMPV F蛋白或片段的核

酸分子和/或载体的组合物。本发明特别提供了药物组合物,例如疫苗组合物,其包含如上所述的融合前HMPV F蛋白、HMPV F蛋白片段、和/或核酸分子和/或载体以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0191] 本发明还提供了根据本发明的稳定的融合前HMPV F蛋白(片段)、核酸分子和/或载体用于针对HMPV对受试者接种疫苗的用途。

[0192] 本发明还提供了根据本发明的稳定的融合前HMPV F蛋白(片段)、核酸分子和/或载体在受试者中诱导针对HMPV F蛋白的免疫应答的用途。进一步提供了用于在受试者中诱导针对HMPV F蛋白的免疫应答的方法,其包括向受试者施用根据本发明的融合前HMPV F蛋白(片段)、和/或核酸分子和/或载体。进一步提供了根据本发明的融合前HMPV F蛋白(片段)、和/或核酸分子和/或载体用于制造药剂的用途,所述药剂用于在受试者中诱导针对HMPV F蛋白的免疫应答。本发明特别提供了用于用作疫苗的根据本发明的融合前HMPV F蛋白(片段)、和/或核酸分子和/或载体。

[0193] 本发明的融合前HMPV F蛋白(片段)、核酸分子或载体可以用于HMPV感染的预防(防止)和/或治疗。在某些实施方案中,预防和/或治疗可以靶向易受HMPV感染影响的患者群。此类患者群包括但不限于例如老年人(例如≥50岁、≥60岁且优选≥65岁)、年轻人(例如≤5岁、≤1岁)、孕妇(用于母体免疫)、以及住院患者和已用抗病毒化合物治疗,但已显示抗病毒应答不足的患者。

[0194] 根据本发明的融合前HMPV F蛋白、片段、核酸分子和/或载体可以用于由HMPV引起的疾病或状况的单独治疗和/或防止中,或者与其它预防和/或治疗性治疗例如(现有或未来的)疫苗、抗病毒剂和/或单克隆抗体组合。

[0195] 本发明进一步提供了利用根据本发明的融合前HMPV F蛋白或其片段、核酸分子和/或载体用于预防和/或治疗受试者中的HMPV感染的方法。在一个具体实施方案中,用于预防和/或治疗受试者中的HMPV感染的方法包括向有此需要的受试者施用有效量的如上所述的融合前HMPV F蛋白(片段)、核酸分子和/或载体。治疗有效量是指有效预防、改善和/或治疗起因于通过HMPV的感染的疾病或状况的蛋白质、核酸分子或载体的量。预防涵盖了抑制或降低HMPV的扩散或者抑制或降低与通过HMPV的感染相关的一种或多种症状的发生、发展或进展。如本文所用,改善可以指可见或可察觉的疾病症状、病毒血症、或HMPV感染的任何其它可测量表现的降低。

[0196] 为了施用于受试者例如人,本发明可以采用包含如本文所述的融合前HMPV F蛋白(片段)、核酸分子和/或载体,以及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在本上下文中,术语“药学上可接受的”意指载体或赋形剂在所采用的剂量和浓度下,并不在它们施用于其的受试者中造成任何不需要的或有害的效应。此类药学上可接受的载体和赋形剂是本领域众所周知的(参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro,编,Mack Publishing Company[1990];Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins,S.Frokjaer和L.Hovgaard,编,Taylor&Francis[2000];以及Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,A.Kibbe,编,Pharmaceutical Press[2000])。HMPV F蛋白或核酸分子优选作为无菌溶液进行配制且施用,尽管还可能利用冻干制剂。无菌溶液通过无菌过滤或本领域本身已知的其它方法进行制备。然后将溶液冻干或填充到药物剂量容器内。溶液的pH一般在pH 3.0至9.5,例如pH 5.0至7.5的范围内。HMPV F

蛋白通常在具有合适的药学上可接受的缓冲液的溶液中,并且组合物还可以含有盐。任选地,可以存在稳定剂,例如白蛋白。在某些实施方案中,添加去污剂。在某些实施方案中,HMPV F蛋白可以配制成可注射制剂。

[0197] 在某些实施方案中,根据本发明的组合物进一步包含一种或多种佐剂。本领域已知佐剂进一步增加针对所施加的抗原决定簇的免疫应答。术语“佐剂”和“免疫刺激剂”在本文中可互换使用,并且定义为引起免疫系统的刺激的一种或多种物质。在此上下文中,佐剂用于增强针对本发明的HMPV F蛋白的免疫应答。合适佐剂的实例包括铝盐,例如氢氧化铝和/或磷酸铝;油乳剂组合物(或水包油型组合物),包括角鲨烯-水乳剂,例如MF59(参见例如WO 90/14837);皂苷制剂,例如如QS21和免疫刺激复合物(ISCOMS)(参见例如US 5,057,540;WO 90/03184、WO 96/11711、WO 2004/004762、WO 2005/002620);细菌或微生物衍生物,其实例是单磷酰脂质A(MPL)、3-O-脱乙酰基MPL(3dMPL)、含CpG基序的寡核苷酸、ADP-核糖基化细菌毒素或其突变体,例如大肠杆菌不耐热肠毒素LT、霍乱毒素CT等等;真核蛋白质(例如抗体或其片段(例如针对抗原本身或CD1a、CD3、CD7、CD80)和针对受体的配体(例如CD40L、GMCSF、GCSF等),其在与受体细胞相互作用时刺激免疫应答。在某些实施方案中,本发明的组合物包含铝作为佐剂,例如以氢氧化铝、磷酸铝、磷酸铝钾或其组合的形式,浓度为0.05-5mg,例如0.075-1.0mg的铝含量/剂量。

[0198] 在其它实施方案中,组合物并不包含佐剂。

[0199] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备针对呼吸道合胞病毒(HMPV)的疫苗的方法,其包括提供根据本发明的HMPV F蛋白(片段)、核酸或载体,并且将其配制成药学上可接受的组合物。术语“疫苗”是指含有在受试者中有效诱导针对某种病原体或疾病的一定程度的免疫的活性组分的药剂或组合物,其将导致至少减少(直至完全消除)与通过病原体的感染或疾病相关的症状的严重程度、持续时间或其它表现。在本发明中,疫苗包含有效量的融合前HMPV F蛋白(片段)和/或编码融合前HMPV F蛋白的核酸分子,和/或包含所述核酸分子的载体,其导致针对HMPV的有效免疫应答。这提供了预防导致住院治疗的严重下呼吸道疾病的方法,以及受试者中由于HMPV感染和复制的并发症例如肺炎和细支气管炎的频率减少。根据本发明的术语“疫苗”暗示它是一种药物组合物,并且因此通常包括药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。它可能包含或可能不包含进一步的活性成分。在某些实施方案中,它可能是进一步包含其它组分的组合疫苗,所述其它组分诱导例如针对HMPV的其它蛋白质和/或其它传染原,例如针对RSV、HMPV和/或流感的免疫应答。进一步的活性组分的施用可以例如通过分开施用或通过施用本发明的疫苗和进一步的活性组分的组合产物来完成。

[0200] 根据本发明的组合物的施用可以使用标准施用途径来执行。非限制性实施方案包括肌内注射。

[0201] 如本文所用,受试者优选为哺乳动物,例如啮齿类动物,例如小鼠、棉鼠或非人灵长类动物,或人。优选地,受试者是人受试者。

[0202] 另外,本发明的蛋白质可以用作诊断工具,例如通过确定此类个体的血清中是否存在能够结合本发明的蛋白质的抗体来测试个体的免疫状态。因此,本发明还涉及用于检测患者中HMPV感染的存在的体外诊断方法,所述方法包括以下步骤:a)使从所述患者获得的生物样品与根据本发明的蛋白质接触;并且b)检测抗体-蛋白质复合物的存在。

[0203] 本发明在下述实施例中进行进一步说明。实施例并不以任何方式限制本发明。它们仅作用于阐明本发明。

实施例

[0204] 实施例1:引入非天然F2-F1切割位点

[0205] 全长和可溶性HMPV F(HMPV F胞外域)的示意性结构分别显示于图1a和b中(关于编号参见SEQ ID NO:1)。可溶性变体中的F1结构域是C末端截短的,并且(任选地)具有与F胞外域融合的折叠子三聚化结构域(GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL;SEQ ID NO:2),类似于许多其它可溶性三聚体病毒融合蛋白。

[0206] 基于野生型HMPV毒株TN/00/3-14(SEQ ID NO:1)的F蛋白,合成(Genscript,Piscataway,NJ)编码hMPV蛋白的DNA片段,并且克隆到pcDNA2004表达载体(具有增强型CMV启动子的修饰的pcDNA3质粒)中。

[0207] HEK293细胞用质粒进行转染,所述质粒对应于毒株TN/00/3-14的HMPV F胞外域,其具有C末端折叠子结构域和4个稳定突变以及一个非天然二硫桥(T69Y、A116H、A140C、A147C、D185P和E453Q),如共同未决申请EP21215259中所述的,以及具有如图2A中定义的F2C末端的天然变体H368N(如TN/85/6-3中发现的;Genbank ID ACJ53577.1)。应用将天然TMPRSS2切割位点(RQSR)改变为非天然多碱基弗林蛋白酶位点(RRRR),以及F2 C末端的截短(在位置90后),以增加HMPV F0蛋白的切割效率。另外,在一些蛋白质中,在F2结构域中引入第二个非天然多碱基弗林蛋白酶位点(RRRR)切割位点,置于第一个切割位点的N末端,并且通过一个或多个氨基酸残基的间隔区序列与F2结构域分开。

[0208] 所使用的表达平台是以96孔格式的Expi293F表达系统(Thermo Fisher Scientific,Waltham,USA)。HMPV F编码质粒与编码弗林蛋白酶的质粒以5:1的HMPV F-弗林蛋白酶DNA比率进行共转染。构建体以一式两份或一式四份进行转染。

[0209] 在3天后,收获上清液,并且通过在还原条件下的SDS-PAGE 4-12%(w/v)Bis-Tris NuPAGE凝胶、1x MOPS(Life Technologies)进行分析,随后为蛋白质印迹以检测切割的功效(图2B)。蛋白质印迹分析如下执行:根据制造商的建议,使用iBlot2:程序P0执行半干印迹。在Odyssey封闭缓冲液中封闭1小时,第一抗体(抗hMPV-F A2/B2多克隆血清,如在Genscript,Piscataway,NJ处兔的肽免疫后生成)在Odyssey封闭缓冲液中以1:10.000温育1小时,第二抗体(α-Rabbit IRDYE CW800(Rockland Immunochemicals,Inc.,Limerick,PA,US)在Odyssey封闭缓冲液中以1:5000温育1小时。所有温育都在室温下在滚筒平台上执行。在第一抗体和第二抗体后,印迹使用50ml TBS/0.05% Tween20洗涤3x,每次洗涤5分钟,随后为使用50ml 1xPBS的最终洗涤。使用700CW和800CW通道两者,通过在Odyssey扫描仪上的扫描使印迹显现。

[0210] 还使用具有Sepax Unix-C SEC-300 4.6X150mm 1.8μm柱(Sepax(231300-4615),注射体积20μL,流量0.35mL/分钟)的Vanquish系统(ThermoFisher Scientific,Waltham,USA),在超高效液相层析(UHPLC)系统中的分析型尺寸排阻层析(SEC)上,就热应激后的三聚体含量和三聚体稳定性分析收获的粗制细胞上清液。热稳定性报告为相对于4℃对照,在热应激后的三聚体百分比。将以二重或四重转染的构建体合并用于SEC分析。通过UV检测器监测洗脱。通过Chromeleon软件版本(版本7.2.7,Thermo Fisher Scientific)分析SEC概

况。在GraphPad Prism(版本9.0.0,GraphPad Software)中绘制图表。(图2C)。

[0211] 还使用在Octet(ForteBio,Portsmouth,UK)上的生物层干涉法,并且使用单克隆抗体ADI-14448(Gilman等人,Sci Immunol.2016年12月16日;1(6):eaaj1879.doi:10.1126/sciimmunol.aaj1879.Epub 2016年12月9日.)和DS7(Wen等人,Nat Struct Mol Biol.2012年3月4日;19(4):461-3.doi:10.1038/nsmb.2250.)),来评价粗制细胞上清液中HMPV F蛋白的抗原性(图2D)。ADI-14448已被描述为针对RSV和HMPV的交叉中和抗体,它是融合前特异性的并与RSV preF的抗原位点III结合。因此,ADI-14448结合指示融合前构象。与HMPV融合蛋白复合的Mab DS7的X射线结构已得到描述(Wen等人,Nat Struct Mol Biol.2012年3月4日;19(4):461-3.doi:10.1038/nsmb.2250.)。HMPV F+DS7的复合物显示了,其为重折叠区2(RR2)的部分的七肽重复2(HR2)处于非preF构象,因为β片层22被移开,这更像融合后构象而非融合前构象。因此,DS7结合指示非融合前或融合后构象。

[0212] 对于根据本发明的优选的融合前HPMV F蛋白,DS7结合因此是不期望的。对于Octet测定,将抗体固定到抗人Fc生物传感器(ForteBio,Portsmouth,UK)上。在动力学缓冲液(ForteBio,Portsmouth,UK)中平衡传感器600秒后,将传感器转移到具有5ug/ml所需抗体的动力学缓冲液中。随后,在模拟细胞培养基中包括另一个平衡步骤。最后,将传感器转移到含有融合前HMPV F蛋白的细胞培养上清液的溶液中。报告了初始斜率(也被称为结合阶段;在初始300秒时执行曲线拟合)和在300秒时以nm计的结合。数据分析使用ForteBio Data Analysis 8.2软件(ForteBio,Portsmouth,UK)完成。条形图在GraphPad Prism(版本9.0.0,GraphPad Software)中进行绘制。

[0213] 根据分析型SEC,所有蛋白质都显示了表达(图2B)并且是三聚体的(图2C)。如通过蛋白质印迹检测到的,所有蛋白质的加工都是不完全的(图2B)。

[0214] 伴随稳定突变的引入以及天然TMPRSS2样切割位点通过将QS取代为RR改变成非天然弗林蛋白酶切割位点,与不含稳定突变的MPV201285相比,MPV210531的表达水平(图2C,左侧直方图小图)和热稳定性(图2C,右侧直方图小图)是增加的。与MPV210531相比,具有较短(截短的)F2-C末端的蛋白质(MPV210502、MPV210500、MPV210507和MPV210509)的表达水平是降低的。与具有长F2 C末端的MPV210531相比,具有短F2 C末端的MPV210500、MPV210507和MPV210509在60℃下的热稳定性是增加的。

[0215] 在octet中,蛋白质显示了抗pre-F(与ADI-14448结合)和抗非pre-F结合(与DS7结合)两者,指示了蛋白质并非完全处于融合前三聚体构象(图2D)。对于具有截短的F2 C末端和两个非天然切割位点的设计(MPV210500、MPV210507和MPV210509),抗非pre-F结合是降低的。

[0216] 具有截短F2 C末端和另外的弗林蛋白酶切割位点的稳定HMPV设计显示了改善的F0切割(图2B),改善的热稳定性(图2C)以及与postF特异性Mab DS7的更低结合(图2D)。

[0217] 实施例2:F0的优化加工

[0218] 由于改善的F2 C末端加工和截短增加了HMPV融合前F蛋白的稳定性和质量(例如,改善的F0切割、改善的热稳定性、与post-F特异性抗体DS7的更低结合),因此将F2 C末端从位置102系统地截短到88。另外,在(截短的)F2结构域和F1结构域之间引入p27肽(包含第一个非天然切割位点)和第二个非天然切割位点。

[0219] 显示了使用RSV F的p27区域,即氨基酸序列ELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR(SEQ

ID NO:2;切割位点加下划线)改善了F0的加工。已知RSV F的p27肽通过弗林样蛋白酶非常有效地进行切割(Krarup等人Nat Commun.2015年9月3日;6:8143.doi:10.1038/ncomms9143.;Gonzales-Reyes等人2001,Proc Natl Acad Sci USA 98:9859-9864)。

[0220] 根据本发明,根据图3A中列出的设计,将弗林蛋白酶位点RRRR和RSV F p27结构域引入(截短的)F2结构域和F1结构域之间。HEK293细胞用对应于如实施例1中所述的HMPV F胞外域且具有根据图3A的F2截短的质粒进行转染。根据还原型SDS-PAGE后的蛋白质印迹,将RSV p27结构域C末端添加到所引入的弗林蛋白酶位点显示了非常有效的HMPV F切割增加(图3B)。根据分析型SEC,MPV210498和MPV210751在60℃下的热稳定性是最高的,如通过热应激后剩余的三聚体含量所测量的(图3C右),并且关于这两种变体的抗原质量(即融合前构象)也是最高的,因为它们在Octet中显示了与postF特异性Mab DS7的最低结合(图3D)。

[0221] 结论:在F1和F2之间引入第二个弗林蛋白酶切割位点和RSV-p27结构域(包含第一个非天然切割位点)导致成功的完全加工。另外,F2 C末端在残基89或90后的截短(除4个精氨酸(R)的第二个弗林蛋白酶切割位点和RSV-p27结构域之外)导致具有最高融合前质量的最稳定的HMPV preF蛋白,如通过低DS7结合所指示的。

[0222] 实施例3:稳定HR2区域

[0223] 已知使可溶性HMPV融合前F胞外域与异源三聚化结构域例如折叠子三聚化。然而,添加折叠子引入另外的异源蛋白质结构域,除了F三聚化之外,对于疫苗免疫原没有另外的益处。因为其它疫苗或其它疫苗组分中的免疫原也可能使用折叠子用于三聚化,所以优选的疫苗组分仅基于病毒蛋白质,并且不含任何另外的异源非病毒蛋白结构域。通过F蛋白的融合前茎的HR2区域中的相互作用优化,本发明提供了不含折叠子的可溶性HMPV蛋白的三聚体构象。在具有优化的F2截短(在氨基酸残基89后)、在截短的F2末端处引入的弗林蛋白酶切割位点和用于最佳切割的RSV F p27结构域的变体中,评估了通过HR2茎区的稳定的preF三聚体稳定。进一步地,F1 C末端在位置481或489后进行截短。蛋白质还具有接头和C-标签用于纯化目的。当折叠子结构域被缺失(MPV211241)时,在分析型SEC中几乎检测不到任何三聚体(图4A左侧直方图小图,5A左侧直方图小图)。然而,HR2中的几种不同稳定策略(根据图4和5A中的突变)恢复且甚至改善不含折叠子的三聚体表达。不含折叠子的三聚体在4℃下贮存6至8周(图4左侧直方图小图)和在58℃下加热30分钟(图4右侧直方图小图和图5A右侧直方图小图)后保持相对稳定。

[0224] 为了测量抗原质量,使用Octet测试上清液,使用抗preF(ADI-14448)、抗postF(DS7)和针对融合前F顶点的界面的MAb,所述界面只有在三聚体开放或能够'呼吸'(暂时开放或部分开放)时才能识别(MPV458;Huang等人,PLoS Pathog.2020年10月9日;16(10):e1008942.doi:10.1371/journal.ppat.1008942.eCollection 2020年10月)。具有稳定HR2的HMPV F变体显示了抗pre-F、抗顶点界面(MPV458)和少量抗非pre-F结合(与DS7结合)(图5B)。

[0225] 结论:HR2稳定突变增加不含折叠子的三聚化且甚至增加三聚体表达。

[0226] 实施例4:稳定HMPV融合前构象的取代

[0227] 在该实施例中,在与MPV211287和MPV211918的设计相对应,但不含稳定取代T69Y、A116H、二硫键A140C+A147C和D185P(突变如共同未决申请EP21215259中所述的)的骨架中,

评估了可替代稳定突变。骨架具有在氨基酸位置89后的F2截短、所引入的弗林蛋白酶切割位点和也包含弗林蛋白酶切割位点的RSV的p27。蛋白质进一步包含H368N、稳定突变E453Q和HR2稳定取代(L473W、D475R、Q476K、S477F、N478D、R479E、A484I)或HR2稳定取代(L473W、S477I、A484I)、接头和C-标签。从毒株B2/3817/04获得一种稳定取代(V231I)(Genbank ID AGL74059.1)。一种新型稳定取代(E453P)替换了稳定取代E453Q(较早在共同未决申请EP21215259中描述)。另外两种新型稳定取代是V112R和D209E。当在位置69、116、140、147和185处的先前稳定取代(在共同未决申请EP21215259中描述)突变回野生型(图6A中的MPV211940和MPV211942(图7A)时,preF三聚体的表达丧失。除了Q453P之外的所有单一稳定取代都增加了三聚体表达,尤其是V112R。取代的组合进一步增加表达并改善热稳定性(图6A、7A),尤其是D209E取代的添加。Octet分析显示了,与参考MPV211940和MPV211942相比,具有新型稳定取代的变体具有改善的抗原质量,伴随与DS7的相对较低结合(图6B、7B)。根据本发明,改善的抗原质量是指融合前质量,如通过pre-F特异性抗体(例如ADI-14448)的增加结合以及post-F结合抗体(例如DS7)和抗界面抗体(例如MPV458)的减少结合所测量的。这最后两种抗体具有极低的中和活性。

[0228] 由于与DS7或MPV458的一些结合也可能由细胞培养上清液中的杂质引起,因此几种HMPV F蛋白以更大规模进行生产并进行纯化用于进一步的彻底分析(参见实施例8)。

[0229] 实施例5:稳定HMPV融合前构象的另外取代

[0230] 通过在仅含有稳定突变V112R的MPV212033骨架中引入在氨基酸位置89后的F2截短、弗林蛋白酶位点+RSV的p27、野生型变体H368N、稳定突变E453Q、HR2稳定(L473W、D475R、Q476K、S477F、N478D、R479E、A484I)、以及接头和C-标签,评估了另外的稳定突变T69W、S149Y、N313W和S445Y以及天然变体N404P。取代的组合进一步增加表达并改善热稳定性(图8A和C)(关于方法参见实施例1)。细胞培养上清液的差示扫描荧光法(DSF)显示了,除了N404P之外的所有另外取代都增加了HMPV F的解链温度(Tm50),如通过DSF测量的(关于方法细节参见实施例4)。Octet分析显示了,与参考MPV212033相比,具有另外取代S149Y、T69W、S445Y和N313W的变体具有改善的抗原质量,伴随与DS7的相对较低结合(图8B)。

[0231] 由于与DS7的一些结合也可能由细胞培养上清液中的杂质引起,因此几种HMPV F蛋白以更大规模进行生产并进行纯化用于进一步的分析(参见实施例8)。

[0232] 实施例6:具有V112R、D209E、V231I和E453P的骨架中的HR2变异

[0233] 在具有氨基酸位置89后的F2截短、所引入的弗林蛋白酶切割位点、RSV的p27、氨基酸位置489后的F1截短且无折叠子的骨架中,评估了进一步的HR2变体。蛋白质进一步包含H368N、V112R、D209E、V231I和E453P突变。

[0234] 与MPV210571相比,所有测试的变体都显示了三聚体表达增加(图9A)(关于方法参见实施例1)。与具有HR2稳定突变L473W、D475R、Q476K、S477F、N478D、R479E、A484I的MPV212047相比(参见实施例3),MPV212032(L473W、S477I、A484I)、MPV220115(S477I)、MPV220120(L473Y、S477I、A484I)和MPV220121(L473I、S477I、A484I)的三聚体含量处于相似范围内。octet中的结合概况与MPV210751和MPV212047可比较(图9B)。细胞培养上清液的差示扫描荧光法(DSF)显示了,与MPV210571相比,所有HR2设计(除了其中由于低信号无法定义Tm50的MPV220123之外)都具有改善的热稳定性,其描述为上清液中的DSF(关于方法细节参见实施例4)中的解链温度。

[0235] 结论:

[0236] 与MPV210751相比,MPV212032(L473W、S477I、A484I)、MPV220115(S477I)、MPV220120(L473Y、S477I、A484I)和MPV220121(L473I、S477I、A484I)中的HR2稳定突变改善了三聚体含量和热稳定性。由于与DS7的一些结合也可能由细胞培养上清液中的杂质引起,因此几种HMPV F蛋白以更大规模进行生产并进行纯化用于进一步的分析(参见实施例8。

[0237] 实施例7:HR2变体用S477I和A484I的进一步稳定

[0238] 选择具有HR2稳定突变S477I、A484I和氨基酸位置89后的F2截短,所引入的弗林蛋白酶切割位点,RSV的p27,无折叠子以及突变H368N、V112R、D209E、V231I和E453P(+接头和C-标签)的MPV220116,以测试另外的稳定突变T69W、S149Y、N313W和S445Y以及天然变体N404P。

[0239] 取代的组合进一步增加表达(图10A)(关于方法参见实施例1)。Octet分析显示了,与参考MPV220116相比,具有另外取代S149Y、T69W、S445Y和N313W的变体具有改善的抗原质量,伴随与DS7的相对较低结合(图10B)。细胞培养上清液的差示扫描荧光法(DSF)显示了,所有另外的取代都改善了HMPV F的解链温度(Tm50)热稳定性,其描述为上清液中的DSF(关于方法细节参见实施例4)中的解链温度(图10C)。

[0240] 结论:

[0241] 另外的取代S149Y、T69W、S445Y和N313W改善了三聚体含量、抗原质量和热稳定性。由于与DS7的一些结合也可能由细胞培养上清液中的杂质引起,因此几种HMPV F蛋白以更大规模进行生产并进行纯化用于进一步的分析(参见实施例8)。

[0242] 实施例8:所选蛋白质的生产和纯化

[0243] 生产和纯化

[0244] 根据表1的几种HMPV蛋白质进行生产且纯化。大多数所选HMPV F蛋白质在先前的实施例中进行描述:MPV210530(图3)、MPV210751(图4)、MPV211918(图4)、MPV212017、MPV212047(图6)、MPV212043(图6)、MPV212044(图6)、MPV212045(图6)、MPV212046(图6)、MPV220087和MPV220092。

[0245] 在300ml规模下,根据制造商的说明,使用ExpiFectamine 293(Thermo Fisher Scientific,Waltham,USA)对细胞进行瞬时转染,并且在37℃和10% CO2下在振荡培养箱中培养5天。将培养上清液收获,以600rpm离心10分钟,并且在0.22μm PVDF过滤器上过滤,以去除细胞和细胞碎片。

[0246] 蛋白质借助于两步或三步方案进行纯化。首先,将收获且澄清的培养上清液加载到预包装的C-tagXL 5-ml柱(Thermo Fisher Scientific,目录#494307205,Waltham,USA)上。该柱预装有亲和树脂(Capture Select),其由固定到基于琼脂糖的珠上的C-标签特异性单结构域抗体组成。这种树脂对于结合具有C-标签的蛋白质是高度特异性的。使用含有2MMgCl2的TRIS缓冲液执行加上C-标签的蛋白质的洗脱。基于UV信号(A280),将洗脱的级分合并,并且使用Amicon Ultracel 50kDa MWCO离心过滤装置(Merck Millipore,目录#UFC805024,Darmstadt,德国)进行浓缩。蛋白质借助于两步或三步方案进行纯化。首先,将收获且澄清的培养上清液加载到预包装的CaptureSelect C-tagXL 5-ml柱(Thermo Fisher Scientific,目录#494307205,Waltham,USA)。该柱预装有亲和树脂(Capture Select),其由固定到基于琼脂糖的珠上的C-标签特异性单结构域抗体组成。这种树脂对于

结合具有C-标签的蛋白质是高度特异性的。使用含有2M MgCl2的TRIS缓冲液执行加上C-标签的蛋白质的洗脱。基于UV信号(A280),将洗脱的级分合并,并且使用Amicon Ultracel 50kDa MWCO离心过滤装置(Merck Millipore,目录#UFC805024,Darmstadt,德国)进行浓缩。随后,将浓缩的收集的洗脱峰施加到Superdex200 Increase 10/300柱(Cytiva,目录#28-9909-44,Marlborough,Massachusetts,美国)上,所述柱在运行缓冲液(20mM Tris、150mM NaCl,pH7.4)中平衡用于精制目的,即去除最少量的多聚蛋白和单体蛋白。三步方案包括在Superdex200之前、在Superose 6Increase10/300柱(Cytiva,目录#29-0915-96,Marlborough,Massachusetts,美国)上、在C-标签池上(仅适用于MPV210751、MPV211918、MPV212017和MPV212047)的另外运行。在设计纯化后的质量指示了由于缺乏较大的聚集体,此步骤不是必需的,并且因此不适用于其它纯化。

[0247] 另外,还生产并纯化了如通过Mas等人,PLoS Pathog.2016年9月9日;12(9):e1005859.doi:10.1371/journal.ppat.1005859.eCollection2016年9月)中描述的postFhMPV蛋白(SEQ ID NO:3)。编码重组融合后hMPV F蛋白的表达质粒如实施例2中所述的进行制备。在300ml规模上,细胞进行瞬时转染,随后借助于两步方案进行纯化(参见上文细节)。随后,执行TEV切割以去除折叠子和c-标签。对于15μg蛋白质,使用1μL TEV(10 000单位/mL)。使蛋白质-TEV混合物在4℃下温育过夜。通过Ni Sepharose excel珠(GE Healthcare,17-3712-03)下拉,从蛋白质样品中去除TEV-His蛋白酶。将Ni Sepharose excel珠加入蛋白质-TEV混合物中,并且在室温下温育2小时。经由微型bio-spin柱(Bio Rad,7326204)收集流通物。使切割的蛋白质样品在45℃下热应激30分钟(Hsieh等人,Nat Commun 2022年3月14日;13(1):1299.doi:10.1038/s41467-022-28931-3.)。随后,将蛋白质样品施加到Superose 6Increase 10/300柱(GE Healthcare,Chicago,USA)上,所述柱在运行缓冲液(20mM Tris、150mM NaCl,pH7.4)中平衡用于精制目的,即去除最少量的多聚蛋白和单体蛋白。

[0248] 随后在还原条件下在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上分析蛋白质(图11A)。在用Instant Blue染色后,在凝胶上显现蛋白质。

[0249] 结果和结论

[0250] 不同变体的产率显示于表1中。F2 C末端的截短降低产率,HR2稳定和折叠子的缺失增加产率。通过引入V112R、D209E、V231I和E453P(MPV212047)获得表达的改善。引入进一步的S149Y、N404P(MPV220087)以及随后的S445P、N313W(MPV220092),导致关于MPV220092的表达增加。还原型SDS-PAGE上的主要条带对应于F1结构域,没有残留F0(图11A),指示了完全加工的蛋白质。

[0251] 表1:实施例8的纯化蛋白质

[0252]

		氨基酸位置																										相对三聚体含量(%)						Tm50(°C)
		69	116	112	140	147	149	185	209	231	313	368	404	445	453	473	475	476	477	478	479	484												
		野生型氨基酸																																
ID	*F2 边界	T	A	V	A	A	S	D	D	V	N	H	N	S	E	L	D	Q	S	N	R	A	折叠子	产率 mg/L	MW (kDa)	三聚体 (%)	4°C	37°C		速冻				
																											7w	2w	8w	1x	5x	10x		
MPV210530	98	Y	H		C	C		P				N			Q								+	46	150	100	100**	56	NA	90	65	35	60.4	
MPV210751	89	Y	H		C	C		P				N			Q								+	14	153	100	96	100	96	98	87	64	65.1	
MPV211918	89	Y	H		C	C		P				N			Q	W	R	K	F	D	E	I	-	20	151	100	101	103	89	100	93	75	61.7	
MPV212017	89	Y	H	R	C	C		P	E	I		N			P	W	R	K	F	D	E	I	-	63	148	100	101	102	96	103	98	96	71.7	
MPV212047	89			R					E	I		N			P	W	R	K	F	D	E	I	-	43	147	100	101	101	95	103	91	86	71.8	
MPV212043	89			R					E	I		N			Q	W	R	K	F	D	E	I	-	30	150	100	90	104	NA	100	85	73	70.4	
MPV212044	89			R						I		N			P	W	R	K	F	D	E	I	-	24	150	100	~107#	114	NA	99	71	29	66.8	
MPV212045	89			R					E			N			P	W	R	K	F	D	E	I	-	27	150	100	99	102	NA	98	80	65	71.7	
MPV212046	89								E	I		N			P	W	R	K	F	D	E	I	-	14	148	100	106	101	NA	97	79	60	71.5	
MPV220087	89			R			Y		E	I		N	P		P	W	R	K	F	D	E	I	-	41	145	100	98	103	NA	99	88	71	73.7	
MPV220092	89			R			Y		E	I	W	N	P	Y	P	W	R	K	F	D	E	I	-	54	147	100	89	102	NA	101	90	78	78.3	

[0253] *在F2 C末端处的残基定位于弗林蛋白酶位点的N末端;NA＝不可用;**在3周后,#还含有分子量较小的种类

[0254] 三聚体含量

[0255] 纯化的蛋白质在纯化后和在4℃下贮存后通过分析型尺寸排阻层析(SEC)进行评价,以研究纯化后的三聚体含量(图11B)。使用具有Sepax Unix-C SEC-300 4.6X150mm 1.8μm柱(Sepax(231300-4615),注射体积20μL,流量0.3mL/分钟)的Vanquish系统(ThermoFisher Scientific),用超高效液相层析(UHPLC)来执行SEC。通过UV检测器(Thermo Fisher Scientific)、μDawn光散射(LS)检测器(Wyatt Technologies)、μT-rEx折射率(RI)检测器(Wyatt Technologies)和Nanostar动态光散射(DLS)检测器(Wyatt Technologies)监测洗脱。SEC概况通过Astra 7.3.2.19软件包(Wyatt Technology)进行分析。层析图在Graph Pad Prism(版本9.0.0,GraphPad Software)中进行绘制。

[0256] 结果和结论

[0257] 在分析型SEC上,所有纯化的蛋白质在纯化后都是高度三聚的(图11B),并且具有三聚体蛋白质的预计分子量(表1)。在贮存7周后,高三聚体含量对于所有蛋白质都得到保留。MPV212044在37℃下7周后显示了紧靠三聚体的一个峰,关于分子量小于三聚体的种类的峰。

[0258] 总的来说,所有纯化的蛋白质都是三聚体的(图11B和表1),并且MPV212047在4℃下7周后显示了高三聚体含量。

[0259] 在37℃下的稳定性

[0260] 纯化的蛋白质进行等分,并且使等分试样在37℃下温育(所有蛋白质和时间点的对照样品都保持在4℃下),并且随后用SEC-MALS进行分析(关于方法参见上文节段)。与对照样品相比,在37℃下贮存的样品的相对三聚体含量在表1中列出。层析图在Graph Pad Prism(版本9.0.0,GraphPad Software)中进行绘制。

[0261] 结果和结论

[0262] 对照样品和在37℃下贮存2周的样品的层析图对于每种纯化的蛋白质进行叠加(图11C)。与具有在89后截短的F2的设计相比,MPV210530在37℃下2周后显示了减少的三聚

体稳定性,这由降低的三聚体峰和反映聚集体的另外峰指示。与对照相比,具有在位置89后截短的F2 C末端的所有蛋白质在37℃下贮存后都显示了相同的三聚体含量。所有蛋白质在37℃下稳定至少2周。

[0263] 冷冻稳定性

[0264] 蛋白质进行一次、五次或十次速冻。在解冻后,通过SEC-MALS(关于方法参见上文节段)将三聚体含量与非冷冻样品进行比较。表1中列出了关于受应激样品与对照样品的相对三聚体含量。层析图在Graph Pad Prism(版本9.0.0,GraphPad Software)中进行绘制。

[0265] 结果和结论

[0266] 蛋白质在不含冷冻保护剂的缓冲液(缓冲液组成:20mMTris、150mM NaCl,pH7.4)中进行测试,并且在一次速冻后,所有蛋白质都保持高度三聚的。在十次快速冻融循环后(图11D),可以观察到冷冻稳定性中的差异。增加冻/融稳定性的突变可以按以下次序排列:D209E>V112R>V321I>Q453P。对于MPV212044,检测到一些聚集体。总的来说,本发明的HMPV F蛋白显示了高冷冻稳定性。

[0267] 蛋白质的热稳定性

[0268] 通过差示扫描荧光法(DSF),通过监测96孔光学qPCR板中Sypro Orange Dye(ThermoFisher Scientific)的荧光发射来确定纯化的融合前HMPV F蛋白的热稳定性。每孔使用15μl 66.67μg/ml蛋白质溶液(缓冲液如实施例2中所述的)(图11E)。向每个孔中加入5μl 20x Sypro orange溶液。在温度从25℃逐渐升高到95℃(0.015℃/s)后,蛋白质解折叠,并且荧光染料与暴露的疏水残基结合,导致发射中的特征性变化。使用ViiA7实时PCR仪(Applied BioSystems)测量解链曲线。使用Graphpad Prism软件(Dan Diego,CA,US)绘制三个个别样品(技术一式三份)的荧光信号(a.u.)相对于温度(℃)的一阶导数以及平均解链曲线。从平均解链曲线中扣除Tm50(曲线上的最低点)。Tm50值表示在其下50%的蛋白质解折叠的温度,并且因此是蛋白质的温度稳定性的量度。

[0269] 结果和结论

[0270] 与具有长F2 C末端MPV210530的设计相比,具有在89处截短的F2 C末端(MPV210751)的设计(其进一步包含弗林蛋白酶位点和RSV p27,以及T69Y、A116H、A140C、A147C、D185P、H368N、E453Q)分别显示了~5℃的解链温度升高(图11E)。与MPV210751相比,MPV211918中折叠子的去除和HR2稳定突变的引入使解链温度降低了约3℃。与MPV211918相比,稳定取代V112R、D209E、V231I和453P(MPV212017)的引入使解链温度增加了约10℃。二硫桥140-147以及稳定取代T69Y、A116H和D185P没有另外的稳定效应,并且去除并不降低解链温度(比较MPV212047与MPV212017)。

[0271] 结论:与HR2的稳定和新型稳定突变的添加组合的具有截短的F2C末端的HMPV F,在不存在折叠子结构域的情况下导致高产率的高度稳定的三聚体。

[0272] 体外抗原性

[0273] 使用由octet的生物层干涉技术测试了所选纯化蛋白质的体外抗原质量(图11F)。除实施例2中描述的抗体之外,还使用了抗顶点界面结合剂MPV465(Huang等人,PLoS Pathog.2020年10月9日;16(10):e1008942.doi:10.1371/journal.ppat.1008942.eCollection 2020年10月)、以及识别preF和postF构象并描述为与位点IV结合的抗体ADI-18992(Gilman等人Sci Immunol.2016年12月16日;1(6):eaaj1879.doi:10.1126/

sciimmunol.aaj1879.Epub 2016年12月9日)。抗体如实施例2中所述的进行固定。在动力学缓冲液(ForteBio)中平衡传感器600秒后,将传感器转移到具有5ug/ml所需抗体的动力学缓冲液中。随后,在动力学缓冲液中包括另一个平衡步骤。最后,将传感器转移到蛋白质溶液(1xKB中的20μg/mL)中。分析如实施例2中所述的执行。

[0274] 结果和结论

[0275] 对于其中F2 C末端并未截短(MPV210530)的HMPV F变体,与具有F2截短的纯化蛋白质相比,与非preF抗体和抗界面抗体的结合更高。具有新型稳定突变MPV212017和MPV212047的稳定的融合前F蛋白显示了最有利的结合,并且仅结合preF特异性抗体,这确认了关于图5B中观察到的例如MPV212047的上清液中较低的抗原质量由杂质引起。

[0276] 通过nsTEM的结构表征

[0277] 纯化的蛋白质通过负染色透射电子显微镜检查(nsTEM)进行分析(图11G)。

[0278] 连续碳网格(铜,EMS)在easiglow等离子清洗机中辉光放电30秒。将稀释(20mM Tris、150mM NaCl,pH7.4)至浓度范围为5至25μg/ml的4微升样品施加于辉光放电网格,并且温育1分钟。通过温和的侧印迹将样品溶液部分吸收,然后通过将其沉积到40μl滴2%(w/v)乙酸铀溶液之上总共1分钟,将网格立即染色。在染色后,将网格吸干并且在成像之前贮存于室温下。制备的网格在配备Ceta相机的Talos L120CTEM(Thermo Fisher Scientific)中进行成像。取决于成像条件,所得到的像素范围为2.4至2.8ang/像素。使用CTFFIND4在每张显微照片上估计对比度传递函数(CTF)的参数,并且加工(挑选和2D分类)的剩余部分在RELION(版本3或4)中完成。

[0279] 结果和结论

[0280] 使用纯化的MPV212047的酸性染色剂,通过负染色样品的电子显微镜检查(EM)分析获得的二维(2D)类别平均值揭示了规则的同质闭合式三聚体(图11G)

[0281] MPV212047通过低温电子显微镜检查的结构表征

[0282] 对HMPV F设计MPV212047的低温电子显微镜检查(Cryo-EM)结构进行解析,以确认该蛋白质的正确三聚体融合前构象(图12)。为此,将3.5μL 0.8-1.0mg/ml纯化的preF蛋白(MPV212047)复合物施加于等离子清洁的(Gatan Solarus)Quantifoil 1.2/1.3多孔金网格,随后使用Vitrobot Mark IV(FEI Company)进行玻璃化。将低温网格加载到在200keV下在具有Falcon IV直接电子探测器的纳米探针中操作的Glacios透射电子显微镜(ThermoFisher Scientific)内。使用EPU在计数模式下记录图像,具有0.948 Å的像素大小和-1.8至-1.2μm的标称散焦范围。图像以EER格式用5.7秒曝光进行记录,对应于为~40个电子/Å^{2}的总剂量。使电影经受光束诱导运动校正,对比度传递函数(CTF)参数估计,自动化参考颗粒挑选,具有280像素的盒大小的颗粒提取,以及在数据采集期间在CryoSPARC live中的二维(2D)分类。将具有清晰HA特征的颗粒图像合并并且经受从头3D重建,并且随后为在CryoSPARC中具有C3对称性的3D异质细化。然后使用具有C3对称性的CryoSPARC内的非均匀(UN)细化,对颗粒进行细化。在显现之前,所有密度图都通过使用自动化程序应用不同的负温度因子进行锐化,连同半图用于模型构建。使用ResMap确定局部分辨率。HMPV F三聚体的初始模板衍生自SWISS-MODEL。使用Chimera将模型对接到EM密度图内,并且随后为使用COOT的手动调整。使用Rosetta进一步改善模型几何形状。在COOT中并且使用MolProbity和EMRinger验证了最终模型的几何参数。这些细化是迭代执行的,直到没有观

察到进一步的改善。通过其针对一个cryo-EM半图的细化来评估模型过度拟合。计算所得到的模型与工作半图之间以及所得到的模型与自由半图和全图之间的FSC曲线,用于交叉验证。使用PyMOL产生图(图12)。一个原体被描绘为卡通表示,而两个原体被描绘为表面表示。

[0283] 由较早的SEC-MALS、BLI和nsTEM数据(图11)确证,MPV212047设计的Cryo-EM分析确认了融合前三聚体的存在,其顶点(HR2远端)以闭合构象存在。

[0284] 实施例9:闭合式融合前HMPV F蛋白MPV212047的免疫原性。

[0285] 佐剂化的HMPV融合前F蛋白在首次用于实验的棉鼠中比融合后HMPVF更具免疫原性和有效。

[0286] 通过用16、3或0.6μg preF或者由50μL AS01B/动物(n=8/剂量)佐剂化的10μg postF蛋白对首次用于实验的棉鼠进行肌内免疫,将融合前HMPV F(preF)MPV212047的免疫原性与融合后HMPV F(postF)MPV190470进行比较。蛋白质如实施例8中所述的进行纯化。作为对照,棉鼠用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照,n=8)或10^4蚀斑形成单位(PFU)HMPV A2(阳性对照,n=6)进行肌内注射。在第0天和第21天,动物用指示剂量进行两次免疫。阳性对照组在第0天进行一次免疫。动物在第42天时用10^5PFU HMPV A2进行攻击,并且在第46天时处死。在第42天分离的血清中针对HMPV preF(位点特异性生物素化的MPV212047:MPV220554)确定ELISA结合抗体滴度(图13A)。滴度展示为相对效力的log10。该测定是探索性的,LLoD基于使用所有预计阴性样品的99%分位数限制。每一个点描绘了各个动物的值,而水平线指示了组的中值应答。通过蚀斑减少中和测试(PRNT),在第42天分离的血清中针对HMPV A2(TN/94-49)确定中和抗体滴度(图13B)。滴度展示为50%抑制浓度(IC50)的log2。每一个点描绘了各个动物的值,而水平线指示了组的中值应答。感染后第4天(第46天)的HMPV A2病毒载量通过蚀斑测定在鼻匀浆物中进行测量,并且表示为log10 pfu/克组织(图13C)。每一个点描绘了各个动物,并且用水平线指示了每组的中值应答。空心符号指示了在第42天血清中没有可检测水平的preF结合抗体的动物。

[0287] 与10μg postF蛋白组相比,HMPV preF结合抗体水平在用3μgpreF蛋白免疫的动物中明显更高,对应于明显更高水平的中和抗体(图13A、B)。另外,与PreF蛋白相比,如果动物用postF蛋白进行免疫,则鼻中针对HMPV A2病毒的保护明显更低(图13C)。

[0288] 总之,佐剂化的HMPV preF蛋白在首次用于实验的棉鼠中比HMPVpostF蛋白更具免疫原性和有效。

[0289] 佐剂化的闭合式融合前HMPV F蛋白比开放式融合前HMPV F蛋白更具免疫原性。

[0290] 闭合式融合前HMPV FMPV212047(闭合式F)的体内免疫原性与具有开放式构象的HMPV F蛋白(MPV220215;开放式F)进行比较。为此,MPV220215HMPV F三聚体通过C-标签亲和纯化和SEC进行纯化,并且HMPV F三聚体如实施例8中描述的进行表征。MPV220215被设计为携带折叠子三聚化结构域以及稳定取代V112R、S149Y、V231I和E453P的单链构建体。通过SEC-MALS分析确认了三聚体构象,在大约4分钟的保留时间时洗脱,具有161kDa的大小(图14A)。通过检测ADI-14448融合前特异性抗体结合以及与闭合式MPV212047HMPV F相比增强的MPV458和MPV465顶点界面结合,在BLI中确认了MPV220215的开放式融合前构象(图14B)。

[0291] 纯化的开放式MPV220215和闭合式MPV212047HMPV融合前F三聚体的免疫原性通过在第0天和第28天用由10μL AS01B/动物佐剂化的1.5、5或15μg蛋白对雌性Balb/C小鼠(n=5)的肌内免疫,或PBS免疫的阴性对照组(n=3)进行评价。在第二次免疫后2周(第42天)分

离的血清中,如上文所述的确定针对HMPV preF的ELISA结合抗体滴度(图14C)。在用两种蛋白质免疫后观察到HMPV preF结合抗体水平的剂量依赖性增加,并且与开放式MPV220215变体相比,达到对于闭合式MPV212047蛋白明显更高的水平。此外,与开放式MPV220215相比,在用闭合式融合前HMPV F免疫后,检测到明显更高的HMPV A2中和滴度(图14D)。

[0292] 这些结果证实了,与处于开放式构象的HMPV F蛋白相比,闭合式融合前HMPV F构象在小鼠中诱导更有力的中和抗体。

[0293] HMPV融合前F在预暴露小鼠中的免疫原性。

[0294] 通过用15μg未佐剂化的MPV212047蛋白(如实施例8中所述的进行纯化)对雌性Balb/C小鼠(n=7)的肌内免疫,在HMPV A2预暴露背景下评价HMPV融合前F(MPV212047)的免疫原性。小鼠在第0天时用至少$1x10^3$直到$3x10^5$ PFU HMPV HMPV A2进行预暴露,并且在第12周用MPV212047进行免疫。在免疫后2周和4周(第14周和第16周)分离的血清中,如上文实施例9中所述的确定针对HMPV preF的ELISA结合抗体滴度(图15)。HMPV preF结合抗体的水平通过用MPV212047的免疫得到急剧增强,具有186倍的滴度几何平均值增加,证实了未佐剂化的HMPV融合前F在预暴露背景下的体内免疫原性。

[0295] 实施例10:将稳定取代转移到HMPV F A2、B1和B2毒株变体。

[0296] 具有最少氨基酸取代的融合前HMPV亚型A2(2000)F蛋白。

[0297] 为了产生具有最少HR2稳定取代的HMPV融合前F蛋白,几种HR2氨基酸在稳定骨架MPV212047中恢复为野生型。所得到的构建体MPV220558确实携带HR2取代L473W、Q476K、S477F和A484I,但具有野生型氨基酸D475、N478和R479。另外,从变体MPV220558开始,表面暴露的H368N取代恢复为野生型,产生MPV220647。总之,MPV220647基于HMPV A2毒株TN/00/3-14(A22000),携带p27肽,F2结构域在氨基酸89处进行截短,并且含有与四个稳定HR2突变L473W、Q476K、S477F和A484I组合的以下一组稳定突变:V112R、D209E、V231I和E453P。

[0298] 如实施例1中所述的,在MPV212047、MPV220558和MPV220647的瞬时表达后评价HMPV F三聚体的表达。通过差示扫描荧光法(DSF)确定上清液中的HMPV F三聚体的解链温度(Tm50)。为此,监测加入溶液中的HMPV F蛋白中的Sypro Orange Dye(ThermoFisher Scientific)的荧光发射。测量用25℃的起始温度和95℃的最终温度执行(54℃增加/小时)。使用ViiA7实时PCR仪(Applied Biosystems)测量解链曲线,并且Tm50值衍生自负一阶导数,如先前所述的(Rutten等人(2020)Cell Rep 30:4540-4550)。

[0299] 通过三个HR2稳定取代的后续恢复和H368N恢复为野生型,观察到对三聚体峰高的影响(图16A,黑色条)。然而,三种HMPV F蛋白的解链温度并未受到负面影响,如通过关于MPV212047、MPV220558和MPV220647分别为72.3℃、73.2℃和73.5℃的平均Tm50证实的(图16A,灰色条)。

[0300] 将稳定取代转移到HMPV F毒株变体。

[0301] 接下来,如上所述评估了MPV220647中的稳定取代转移到最近以来的A2毒株以及最近的亚型B1和B2毒株(图16B)。通过野生型B2(MPV23362)与稳定的B2变体MPV220641的比较,证实了这些突变的稳定影响。野生型HMPV F B2在分析型SEC中在预计的单体保留时间洗脱(图16C,灰线),而稳定的HMPV F B2 MPV220641以显然更高的水平表达,并且作为三聚体在大约4.5分钟的保留时间左右洗脱(图16C,黑线)。与此一致,如通过DSF确定的,野生型HMPV FB2的平均解链温度从57.9℃升高到关于稳定的MPV220641的72.7℃(图16D)。最后,

使用定量Octet,使用HMPV F融合前(ADI-61026)、顶点界面(MPV458)和非融合前(DS7)抗体,在生物层干涉法(BLI)测量中确认了融合前HMPV F的稳定,如实施例1中所述的。

[0302] 与野生型HMPV F B2相比,稳定的HMPV F B2 MPV220641显示了与融合前特异性ADI-61026的改善结合,以及与顶点界面MPV458和非融合前DS7抗体的降低结合(图16E)。

[0303] 对于稳定的HMPV F A2 2019(MPV220639)和HMPV F B1 2020(MPV220640)还观察到三聚体表达模式,尽管处于与A2 2000(MPV220647)相比略微降低的表达水平下。最近的HMPV F A2和B1毒株的解链温度与MPV220639可比较或更高(对于MPV220640和MPV22647分别为73.6℃和75.8℃)(图16D)。所有稳定的HMPV F蛋白都以融合前构象表达,如通过与Octet中的低MPV458和DS7结合组合的ADI-61026融合前抗体结合确认的(图16E)。

[0304] 总的来说,在HMPV A2(2000)骨架中发现的稳定HMPV F取代成功地转移到其它最近以来的HMPV亚型,得到稳定的三聚体融合前HMPV F蛋白。

[0305] 实施例11.HMPV亚型A2(2019)融合前F蛋白的稳定、纯化和免疫原性。

[0306] 进一步稳定的无标签HMPV F变体MPV221190的三聚体表达改善。

[0307] 来自实施例10的稳定的HMPV亚型A2(2019)融合前F变体MPV220639不含C-标签纯化标签而产生,得到变体MPV220759。在该骨架中,引入了另外的取代S149Y和N404P,得到变体MPV221190,并且如实施例1中描述的,在Expi293F细胞中的瞬时转染之后评估其对三聚体表达的作用。细胞培养上清液的分析型SEC证实了,关于携带S149Y和N404P两者的MPV221190超过骨架MPV220759的三聚体表达增加(图17A)。

[0308] 无标签MPV220759和MPV221190HMPVF三聚体的纯化和表征。

[0309] 接下来,根据制造商的说明,使用ExpiFectamine(Life Technologies),将MPV220759和MPV221190HMPV F变体两者瞬时转染到Expi293F细胞中,并且在37℃和10%CO2下培养5天。将培养上清液收获并且在600g下旋转10分钟以去除细胞和细胞碎片,然后使用0.22μm真空过滤器进行无菌过滤。使用两步纯化方案纯化HMPV F蛋白,所述两步纯化方案包括在pH 5.0下的离子交换(Cation)纯化,以及经由使用Superdex 200 16/600pg柱的尺寸排阻层析的精制。将三聚体级分合并,并且通过使用在线Nanostar DLS阅读器(Wyatt)组合,与OptilabμT-rEX折射率检测器(Wyatt)联接的超高效液相层析系统(Vanquish,Thermo Scientific)和μDAWN TREOS仪器(Wyatt)的分析型SEC-MALS进行进一步表征。将蛋白质加载到Unix-C SEC-300 15cm柱(Sepax Technologies)上,具有在以0.35mL/分钟的运行缓冲液(150mM磷酸钠、50mM NaCl,pH 7.0)中平衡的相应保护柱(Sepax Technologies)。分析型SEC数据使用Chromeleon 7.2.8.0软件包进行分析,并且HMPV F三聚体的分子量通过Astra软件进行计算并与计算的重量进行比较,确认了三聚体构象(图17B、C)。

[0310] 纯化的HMPV F三聚体的解链温度(Tm50)如实施例10中所述的通过DSF进行确定。与不含这些取代的MPV220759为73.5℃的Tm50相比,携带取代S149Y和N404P的MPV221190具有75.5℃的更高解链温度(图17D)。

[0311] 使用定量Octet,使用HMPV F融合前(ADI-14448和ADI-61026)、顶点界面(MPV458)和非融合前(DS7)抗体,在生物层干涉法(BLI)测量中确认了纯化的HMPV F蛋白的融合前构象。抗体以5μg/ml的浓度固定到抗人IgG传感器,并且HMPV F以20μg/ml共300秒结合的初始结合率绘制为3-6次个别测量的平均值+SD(图17E)。确认了两种HMPV F蛋白与融合前特异

性ADI-14448和ADI-61026抗体的结合,以及与顶点界面结合抗体MPV458和非融合前DS7的结合的不存在。

[0312] 通过在分析型SEC中测量与未处理蛋白质相比的相对三聚体含量,评价了两种纯化的HMPV F蛋白MPV220759和MPV221190对液氮中的反复速冻(SF)循环以及朝向-20℃的过冷应激的应激弹性(图17F)。SF应激增量降低了两种蛋白质的三聚体含量,但对于MPV221190较不显著(图17F,实心条)。与此一致,五次过冷应激测量的三聚体含量的平均降低对于MPV220759为23%,并且对于MPV221190为11%(图17F,空心条)。

[0313] 总的来说,产生了不含三聚化结构域或纯化标签,基于A2(2019)序列的两种稳定的三聚体HMPV融合前F蛋白。与MPV220759相比,具有另外稳定取代S149Y和N404P的变体MPV221190展示了更高的三聚体表达和改善的温度应激弹性。

[0314] HMPV融合前F MPV220759和MPV221190的免疫原性。

[0315] 纯化的MPV220759和MPV221190HMPV融合前F三聚体的体内免疫原性通过在第0天和第28天用由10μL AS01B/动物佐剂化的1.5、5或15μg蛋白对雌性Balb/C小鼠(n=8)的肌内免疫进行评价,并且与15μg AS01B佐剂化的MPV212047(n=8)或PBS免疫的对照组(n=3)进行比较。在第二次免疫后2周(第43天)分离的血清中,如实施例9中所述的确定针对HMPV preF的ELISA结合抗体滴度(图17G)。在用MPV220759和MPV221190免疫后观察到HMPV preF结合抗体水平的剂量依赖性增加,并且在15-μg蛋白剂量下达到与MPV212047可比较的水平,说明了这些HMPV融合前F蛋白在小鼠中的免疫原性。

[0316] 实施例12.差异稳定的HMPV融合前F蛋白的体外比较。

[0317] 一种融合前稳定的HMPV F蛋白通过Hsieh等人(Nat Commun.2022年3月14日;13(1):1299)进行描述。如实施例1中所述的,在Expi293F细胞中的瞬时转染之后,这种所谓的DS-CavEs2设计(MPV220552)的表达与MPV221190进行比较。DS-CavEs2(MPV220552)具有折叠子三聚化结构域,并且在大约4分钟的保留时间后洗脱,而无折叠子的MPV221190在大约4.5分钟的保留时间后洗脱,并且证实了强烈增加的三聚体表达(图18A)。

[0318] 接下来,通过使用StrepTag亲和层析(GE Healthcare,28-9075),随后为经由使用Superose 6(GE Healthcare)柱的尺寸排阻层析的精制,如实施例11所述的在Expi293F细胞中的瞬时表达之后纯化MPV220552三聚体。将三聚体级分合并,并且通过SEC-MALS、DSF和Octet进行进一步表征,如实施例11中所述的。DS-CavEs2设计的三聚体构象得到确认,具有71.1℃的解链温度,与较早的报告(Hsieh等人,2022)可比较,但低于可替代地稳定的HMPV F MPV221190(图17D,18B、C)。两种蛋白质均结合ADI-14448和ADI-61026融合前抗体,但并不结合非融合前DS7。然而,MPV220552证实了与顶点界面抗体MPV458的高结合,指示与MPV221190相比更开放的顶点结构(图18D)。

[0319] 通过在4℃或37℃下的延长温育,随后为分析型SEC,评价了两种纯化蛋白质的稳定性。HMPV F洗脱模式的检查证实了关于MPV221190的稳定三聚体峰,同时对于MPV220552观察到降低的三聚体峰,伴随在37℃下的2周贮存后,在4.5-5分钟的保留时间之间出现的较小种类洗脱(图18E)。

[0320] 总之,与先前公开的DS-CavEs2(MPV220552)HMPV融合前F相比,MPV221190HMPV融合前F稳定的三聚体具有更高的表达水平、如通过BLI确定的更闭合的三聚体结构、以及如通过DSF和应激弹性确定的稳定性增强。

[0321] 实施例13.不含异源三聚化结构域且不含HR2区域的稳定的HMPV融合前F三聚体的稳定。

[0322] 在不含异源三聚化结构域且不含HR2区域中的稳定取代的骨架中评估了HMPV融合前F蛋白的三聚体表达,以调查在头部结构域中的多重可替代稳定取代的存在下HR2稳定的要求。除了七种HR2取代的引入之外,该骨架与MPV212047可比较。简言之,骨架MPV220847具有在氨基酸位置89后的F2截短、所引入的弗林蛋白酶切割位点和也包含弗林蛋白酶切割位点的RSV的p27、以及在位置489处的C末端截短。该变体进一步包含取代V112R、D209E、V231I、H368N、E453P、接头和C-标签。

[0323] MPV220847的三聚体表达与在HR2区域携带S477I(MPV220115)或S477L(MPV220851)取代的两种变体进行比较,所述两种变体先前显示了改善HMPV F的三聚体含量(图4)。如实施例1中所述的,在Expi293F细胞中的瞬时表达后,所有三种HMPV F变体都显示了在大约4.5分钟的保留时间洗脱的三聚峰(图19A),指示了当引入足够的替代取代时,不需要HR2稳定。然而,尽管在大约70℃左右测量到关于所有三种HMPV F变体的单个解链事件,但与DSF中的骨架MPV220847相比,S447I和S477L取代的稳定效应通过MPV220115和MPV220851的解链温度升高仍是显而易见的(图19B)。通过融合前特异性抗体ADI-14448的结合以及与非融合前抗体DS7的结合的不存在,在BLI中确认了所有三种HMPV F变体的融合前构象(图19C)(DSF和BLI如实施例11中所述的进行)。

[0324] 总的来说,三聚体HMPV融合前F蛋白可以无需异源三聚化结构域和无需稳定HR2区域的稳定得到稳定,尽管后者在HMPV F蛋白的温度稳定性方面提供了明确的益处。

[0325] 实施例14.通过HR2区域在位置477处的稳定来稳定不含异源三聚化结构域的HMPV融合前F三聚体。

[0326] 融合前HMPV F通过HR2茎区优化的稳定将位置S477鉴定为用于稳定的合适靶标(图4)。在骨架MPV211241中系统地评估了疏水性氨基酸取代的影响,所述MPV211241先前证实几乎不表达三聚体HMPV F(图4A左侧直方图小图,5A左侧直方图小图)。为此,携带野生型S477,或者S477I、S477L、S477F、S477V、S477M、S477Y或S477W的HMPV F变体在Expi293F细胞中进行表达,并且如实施例1所述的进行分析。为了评价HMPV F三聚体表达的稳定性,使培养上清液经受在58℃下的30分钟温育,并且在分析型SEC中进行评估。如先前证实的,携带野生型S477的骨架MPV211241并不表达HMPV F三聚体,但伴随在4.5-5分钟之间的保留时间洗脱,对应于HMPV F单体(图20,黑线)。在热应激下,出现保留时间为大约3分钟的聚集体(图20,灰线)。取代S477I、S477L、S477F、S477V、S477M(分别为MPV211247、MPV211249、MPV23278、MPV211248、MPV23279)成功恢复了HMPV F三聚体的表达,而取代S477Y和S477W(MPV23280和MPV23281)部分恢复了HMPV F三聚体的表达,作为三聚体和单体的混合物表达(图20,黑线)。在58℃热应激下,由携带S477I或S477L取代的变体表达的HMPV F三聚体保持三聚体的(MPV211247和MPV211249,图20,灰线;图4A),而所有其它S477变体都受到影响,具有降低的三聚体含量并显示聚集体的存在(图20,灰线)。

[0327] 总之,在HMPV F的HR2区域中的位置477处引入疏水性氨基酸残基证实增强三聚体的表达,其中S477I和S477L取代得到最稳定的三聚体。

[0328] 实施例15.全长HMPV融合前F三聚体的稳定。

[0329] 通过流式细胞术评价了全长HMPV F的头部结构域(其中‘头部结构域’在此处定义

为成熟、加工的蛋白质的部分,其为HR2茎区的N末端)和HR2区域中的稳定取代的影响。为此,设计了全长野生型HMPV A2(2019)F,其具有在氨基酸位置89后的F2截短,所引入的弗林蛋白酶切割位点和也包含弗林蛋白酶切割位点的RSV的p27(MPV221364)。该野生型骨架与MPV221376进行比较,后者另外携带了四个HR2取代:L473W、Q476K、S477F和A484I。同样地,野生型骨架与MPV221371进行比较,所述MPV221371携带头部结构域取代V112R、D209E、V231I和E453P,但没有HR2稳定。最后,变体MPV221377携带如上所述的头部和HR2稳定两者。

[0330] HMPV F编码质粒以3:2:5比率的HMPV F:弗林蛋白酶:GFP质粒DNA共转染到Expi293F细胞中。转染两天后,将细胞收集、洗涤、染色且固定,然后经受流式细胞术(FACS Canto II,Becton Dickinson)。染色步骤包括活/死紫色染剂(Thermo Fisher)以及HMPV F抗体AD-61026和DS7,随后为用Alexa Fluor 647标记的抗人IgG检测抗体的染色。通过应用单细胞、活的、GFP阳性细胞门来确定HMPV F抗体信号的中值荧光强度(MFI)。HMPV融合前F特异性抗体ADI-61026对于所有四种HMPV F变体都以可比较的水平检测到,证实了全长膜表达的加工的HMPV F以融合前构象存在于转染的Expi293F细胞的表面上(图21)。然而,在这些细胞中也确认了HMPV非融合前F的存在,其中对于野生型骨架MPV221364检测到最高的DS7结合。HR2取代的引入降低DS7结合,头部结构域取代的引入也是如此。头部结构域和HR2区域取代两者的组合得到DS7结合的最强降低,确认了全长HMPV F中的两个HMPV F蛋白区域中的取代的稳定效应(图21)。

[0331] 实施例16.可替代p27序列无需外源弗林蛋白酶共表达改善了HMPV F加工。

[0332] 在HMPV的F1和F2之间引入第二个弗林蛋白酶切割位点和RSV p27结构域,导致在与弗林蛋白酶共转染时F0的完全加工(实施例2)。为了实现完全加工,同时消除对于外源弗林蛋白酶共转染的要求,对RSV p27序列进行优化。

[0333] RSV p27的变异包括基于代表性RSV A(MPV23259)或B(MPV23260)序列的序列,所述序列被引入稳定骨架MPV221190中(图22A)。HMPV F编码质粒如实施例1中所述的与编码弗林蛋白酶的质粒以5:1的HMPV F:弗林蛋白酶DNA比率(20%弗林蛋白酶)或与编码载体质粒的质粒以5:1的HMPV F:载体DNA比率(0%弗林蛋白酶)进行共转染,并且如实施例1中所述的,通过分析型SEC评估三聚体表达。当与20%弗林蛋白酶共转染时,骨架MPV221190以及p27 RSV A和RSV B变体(分别为MPV23259和MPV232660)在大约4.5分钟的保留时间作为三聚体洗脱(图22B,灰线)。然而,如果没有弗林蛋白酶共转染,洗脱模式转变为较短的保留时间(图22B,黑线),指示不完全加工的HMPV F。后者通过在还原条件下细胞裂解物的蛋白质印迹分析检测到HMPV F1和F2得到确认,如实施例1中所述的。如果没有弗林蛋白酶共转染,在F1和F2片段之间检测到另外的条带,其很可能对应于附着p27片段的F2。在与20%弗林蛋白酶共转染的HMPV F细胞裂解物中不存在这个另外的条带(图22C)。

[0334] 关于RSV p27片段的另外变异基于具有p27 RSV A序列的骨架MPV23259,并且包括p27序列中的糖基化位点的系统性缺失(MPV23261-MPV23267)和p27序列缺失(MPV23268、MPV23269),如图22A中所指示的。这些变体如上文所述的进行评估,当与20%弗林蛋白酶共转染时显示了可比较的三聚体洗脱模式(图22B,灰线),但当没有另外的弗林蛋白酶进行转染时,显示了不同的洗脱概况(图22C,黑线)。没有弗林蛋白酶共转染的p27变体表达导致HMPV F对于具有一个或两个聚糖缺失的变体(MPV23261-MPV23266)的不完全加工(图22B、C)。然而,无论该变体是否与弗林蛋白酶共转染,MPV23267中的所有三个糖基化位点的去除

都得到相同的三聚体保留时间(图22B),并且在蛋白质印迹上显示完全的HMPV F加工(图22C),而无需外源弗林蛋白酶表达。通过从变体MPV23269中的p27序列中去除'NNTKNTNVTLS'观察到可比较的效应,而MPV23268中的'LPRFMNYTL'的去除是不成功的。

[0335] 总的来说,通过优化插入HMPV F的F1和F2之间的RSV p27序列,可以无需外源弗林蛋白酶表达而实现完全的HMPV F加工。

[0336] 表2.标准氨基酸、缩写和性质

[0337]

氨基酸	3-字母	1-字母	侧链极性	侧链电荷(pH 7.4)
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性
精氨酸	Arg	R	极性	阳性
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性
天冬氨酸	Asp	D	极性	阴性
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性
谷氨酸	Glu	E	极性	阴性
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性
组氨酸	His	H	极性	阳性(10%)中性(90%)
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性
赖氨酸	Lys	K	极性	阳性
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性
丝氨酸	Ser	S	极性	中性
苏氨酸	Thr	T	极性	中性
色氨酸	Trp	W	非极性	中性
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性
缬氨酸	Val	V	非极性	中性

[0338]

[0339] 序列

[0340] SEQ ID NO:1hMPV A2融合蛋白(TN/00/3-14)全长(信号肽粗体;野生型切割位点区域斜体,F2结构域加下划线)

[0341] **MSWKVVIIFSLLITPQHG**LKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRE LKTVSADQLAREEQIENP*RQSR*FVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVL ATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNM PTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWY CQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYK GVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQFNVALDQVF ENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHS

[0342] SEQ ID NO:2:p27 RSVF

[0343] ELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR

[0344] SEQ ID NO:3MPV190470(postF);优化的弗林蛋白酶切割位点粗体;接头斜体;TEVCS粗体斜体;折叠子粗体加下划线;Strep标签加下划线斜体;C-标签加下划线

[0345] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE LRTVSADQLAREEQIENPRQS**KKRKRR**VATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNGVRVLATA VRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTS AGQIKLMLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKENYACLLREDQGWYCQN AGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSC SIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIE NSQALVDQSNRILSSAEKGNT*GG****RENLYFQ****GGGGS***GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTF**AA*WSHPQFEKGA *A*EPEA

[0346] SEQ ID NO 4:MPV201285(F1在481后截短,接头斜体;折叠子加下划线;C-标签粗体)

[0347] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL KTVSADQLAREEQIENPRRRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLA TAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMP TSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYC QNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKG VSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQFNVALDQVFE NIENSQALVDQSNRIL*SGGG*GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL*GGS***EPEA**

[0348] SEQ ID NO 5:MPV210498

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLARARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKN

CLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPA

[0349] ISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCS

EKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRN

PISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSF

DPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0350] SEQ ID NO 6:MPV210500

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLARRRREEQIENPRRRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVR

VLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSN

[0351] MPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGW

YCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYK

GVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQV

FENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0352] SEQ ID NO7:MPV210502

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLARRRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKD

FVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKL

[0353] MLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTV

YYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSN

RVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQA

LVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0354] SEQ ID NO8: MPV210505

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLARRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNC

LKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI

[0355] SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCS

EKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRN

PISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSF

DPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0356] SEQ ID NO9: MPV210507

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLARRRRIENPRRRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLA

TAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMP

[0357] TSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYC

QNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKG

VSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFE

NIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0358] SEQ ID NO 10:MPV210509

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQRRRREQIENPRRRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLA

TAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMP

[0359] TSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYC

QNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKG

VSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFE

NIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0360] SEQ ID NO11:MPV210530

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLAREEQIENPRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLE

SEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFS

DNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWI

[0361]

VKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP

CKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIK

GRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGG

SEPEA

[0362] SEQ ID NO12:MPV210531

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLAREEQIENPRRRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLA

[0363] TAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMP

TSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYC

QNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKG

VSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFE

[0364]

NIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0365] SEQDNO13:MP210742

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLAREEQIENPRQSRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTI

RLESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVR

QFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTP

[0366]

CWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTT

NYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQ

HVIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLST

FLGGSEPEA

[0367] SEQ ID NO14:MPV210743

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLAREEQIENPRQRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIR

LESEVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQ

FSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPC

[0368]

WIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTN

YPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQH

VIKGRPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

GGSEPEA

[0369] SEQ ID NO15:MPV210744

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

[0370] KTVSADQLAREEQIENPRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLES

EVTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSD

NAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIV

KAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPC

[0371] KVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKG

RPVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGS

EPEA

[0372] SEQ ID NO16:MPV210745

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLAREEQIENRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESE

VTAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDN

AGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVK

[0373]

AAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCK

VSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGR

PVSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSE

PEA

[0374] SEQ ID NO17:MPV210746

[0375]
MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL
KTVSADQLAREEQIERRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEV
TAIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNA
GITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKA
APSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVS
TGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRP
VSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEP
EA

[0376] SEQ ID NO 18:MPV210/47

[0377]
MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL
KTVSADQLAREEQIRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVT
AIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNA
GITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKA
APSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVS
TGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRP
VSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEP
EA

[0378] SEQ ID NO19:MPV210748

[0379]
MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL
KTVSADQLAREEQRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVT
AIKNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNA
GITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKA
APSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVS
TGRNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRP
VSSSFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEP
EA

[0380] SEO ID NO 20:MPV210749

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLAREERRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAI

[0381] KNCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGIT

PAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPS

CSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTG

RNPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSS

[0382] SFDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0383] SEQ ID NO21:MPV210750

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLARERRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIK

NCLKTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITP

[0384] AISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSC

SEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGR

NPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSS

FDPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0385] SEQ ID NO22:MPV210751

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0386] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0387] SEQ ID NO23:MPV210752

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCLK

[0388] TTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL

DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0389] KFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0390] SEQ ID NO 24: MPV211241(F1在489后切割,斜体接头,C-标签粗体)

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0391] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNT*GGS***EPEA**

[0392] SEQ ID NO25:MPV211242

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0393] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIVDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0394] SEQ ID NO26:MPV211243

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0395] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0396]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0397] SEQ ID NO27:MPV211244

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0398] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALIDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0399] SEQ ID NO28:MPV211245

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0400] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALLDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0401] SEQ ID NO29:MPV211246

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0402] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0403]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALFDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0404] SEQ ID NO30:MPV211247

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0405] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0406] SEQ ID NO31:MPV211248

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0407] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQVNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0408] SEQ ID NO32:MPV211249

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0409] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0410]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQLNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0411] SEQ ID NO33:MPV211250

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0412] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRVLSSAEKGNTGGSEPEA

[0413] SEQ ID NO34:MPV211251

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0414] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRLLSSAEKGNTGGSEPEA

[0415] SEQ ID NO35:MPV211252

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0416] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0417]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0418] SEQ ID NO36:MPV211253

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0419] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSVEKGNTGGSEPEA

[0420] SEQ ID NO37:MPV211254

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0421] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSLEKGNTGGSEPEA

[0422] SEQ ID NO38:MPV211255

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0423] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0424]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGITGGSEPEA

[0425] SEQ ID NO39:MPV211256

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0426] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGVTGGSEPEA

[0427] SEQ ID NO40:MPV211257

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0428] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGLTGGSEPEA

[0429] SEQ ID NO41:MPV211258

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0430] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0431] PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0432] SEQ ID NO42:MPV211259

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0433] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIVDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0434] SEQ ID NO43:MPV211260

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0435] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIVDQSNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0436] SEQ ID NO44: MPV211261

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0437] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0438]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIVDQSNRILSSAEKGITGGSEPEA

[0439] SEQ ID NO45:MPV211262

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0440] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALIDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0441] SEQ ID NO46:MPV211263

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0442] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALIDQSNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0443] SEQ ID NO47:MPV211264

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0444] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0445]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALIDQSNRILSSAEKGITGGSEPEA

[0446] SEQ ID NO48:MPV211265

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0447] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0448] SEQ ID NO49:MPV211266

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0449] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSAEKGITGGSEPEA

[0450] SEQ ID NO50:MPV211267

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0451] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0452]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSIEKGITGGSEPEA

[0453] SEQ ID NO51:MPV211268

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0454] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0455] SEQ ID NO52:MPV211269

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0456] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQSNRILSSIEKGTGGSEPEA

[0457] SEQ ID NO53:MPV211270

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0458] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0459]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQSNRILSSAEKGITGGSEPEA

[0460] SEQ ID NO54:MPV211271

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0461] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALIDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0462] SEQ ID NO55:MPV211272

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0463] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALIDQINRILSSAEKGITGGSEPEA

[0464] SEQ ID NO56:MPV211273

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0465] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0466]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0467] SEQ ID NO57:MPV211274

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0468] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0469] SEQ ID NO58:MPV211275

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0470] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQINRILSSAEKGITGGSEPEA

[0471] SEQ ID NO59:MPV211276

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0472] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0473]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0474] SEQ ID NO60:MPV211277

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0475] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0476] SEQ ID NO61:MPV211278

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0477] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRLLSSAEKGNTGGSEPEA

[0478] SEQ ID NO62:MPV211279

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0479] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0480]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRLLSSIEKGNTGGSEPEA

[0481] SEQ ID NO63:MPV211280

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0482] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRLLSSIEKGITGGSEPEA

[0483] SEQ ID NO64:MPV211281

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0484] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWIDQINRLLSSIEKGITGGSEPEA

[0485] SEQ ID NO65:MPV211282

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0486] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0487]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0488] SEQ ID NO66:MPV211283

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0489] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQINRLLSSAEKGNTGGSEPEA

[0490] SEQ ID NO67:MPV211284

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0491] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQINRLLSSIEKGNTGGSEPEA

[0492] SEQ ID NO68:MPV211285

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0493] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0494]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQINRLLSSIEKGITGGSEPEA

[0495] SEQ ID NO69:MPV211286

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0496] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFIDQINRLLSSIEKGITGGSEPEA

[0497] SEQ ID NO70:MPV211287

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0498] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0499] SEQ ID NO71:MPV211288

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0500] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0501]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0502] SEQ ID NO72:MPV211289

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0503] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWIDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0504] SEQ ID NO73:MPV211290

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0505] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0506] SEQ ID NO 74:MPV211291

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0507] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0508]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFVDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0509] SEQ ID NO75:MPV211292

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0510] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAFIDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0511] SEQ ID NO76:MPV211917

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0512] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0513] SEQ ID NO77:MPV211918

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

[0514] KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0515]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0516] SEQ ID NO78:MPV211919

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0517] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILGGSEPEA

[0518] SEQ ID NO79:MPV211940

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0519] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0520] SEQ ID NO80:MPV211942

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0521] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0522]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0523] SEQ ID NO81:MPV212017

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAISL

[0524] DLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKK

GNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0525] SEQ ID NO82:MPV212018

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0526] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0527] SEQDNO83:MPV212019

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0528] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0529]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0530] SEQ ID NO84:MPV212020

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0531] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0532] SEQ ID NO85:MPV212021

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0533] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0534] SEQ ID NO86:MPV212022

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0535] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0536] PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0537] SEQ ID NO87:MPV212023

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0538] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0539] SEQ ID NO88:MPV212024

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0540] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0541] SEQ ID NO89:MPV212025

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0542] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0543]

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0544] SEQ ID NO90:MPV212026

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0545] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0546] SEQ ID NO91:MPV212027

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0547] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0548] 5EQ ID NO92:MPV212028

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0549] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0550] KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0551] SEQ ID NO93:MPV212029

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0552] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0553] SEQ ID NO94:MPV212030

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0554] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0555] SEQ ID NO95:MPV212031

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0556] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0557]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0558] SEQ ID NO96:MPV212032

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0559] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0560] SEQ ID NO97:MPV212033

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0561] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0562] SEQ ID NO98:MPV212034

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0563] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0564] PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0565] SEQ ID NO99:MPV212035

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0566] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0567] SEQ ID NO100:MPV212036

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0568] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0569] SEQ ID NO101:MPV212037

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0570] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0571]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0572] SEQ ID NO102:MPV212038

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0573] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0574] SEQ ID NO103:MPV212039

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0575] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0576] SEQ ID NO104:MPV212040

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0577] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0578]

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0579] SEQ ID NO105:MPV212041

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0580] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0581] SEQ ID NO106:MPV212042

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0582] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0583] SEQ ID NO107:MPV212043

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0584] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0585]

KFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0586] SEQ ID NO108:MPV212044

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0587] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0588] SEQ ID NO109:MPV212045

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0589] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0590] SEQ ID NO110:MPV212046

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0591] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0592]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0593] SEQ ID NO111:MPV212047

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0594] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0595] SEQ ID NO112:MPV220078

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0596] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0597] SEQ ID NO113:MPV220079

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0598] KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

[0599]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0600] SEQ ID NO114:MPV220081

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKWELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI

[0601] SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCS

EKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRN

PISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSF

DPIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0602] SEQ ID NO115:MPV220083

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0603] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSYFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0604] SEQ ID NO116:MPV220084

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0605] KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQWAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSYFD

[0606]

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0607] SEQ ID NO117:MPV220087

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0608] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0609] SEQ ID NO118:MPV220092

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0610] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQWAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSYFDP

IKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTGGSEPEA

[0611] SEQ ID NO119:MPV220115

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0612] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0613]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0614] SEQ ID NO120:MPV220116

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0615] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0616] SEQ ID NO121:MPV220117

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0617] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALIDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0618] SEQ ID NO122:MPV220118

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0619] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0620]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0621] SEQ ID NO123:MPV220119

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0622] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAIVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0623] SEQ ID NO124:MPV220120

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0624] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAYVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0625] SEQ ID NO125:MPV220121

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0626] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0627]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQSNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0628] SEQ ID NO126:MPV220122

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0629] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0630] SEQ ID NO127:MPV220123

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0631] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAIIDQINRILSSIEKGITGGSEPEA

[0632] SEQ ID NO128:MPV220124

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0633] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0634]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQLNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0635] SEQ ID NO129:MPV220125

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0636] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSLEKGNTGGSEPEA

[0637] SEQ ID NO130:MPV220126

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0638] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQLNRILSSLEKGNTGGSEPEA

[0639] SEQ ID NO131:MPV220127

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0640] KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

[0641]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0642] SEQ ID NO132:MPV220128

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0643] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0644] SEQ ID NO133:MPV220129

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKWELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0645] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0646] SEQ ID NO134:MPV220130

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

[0647] KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSYFDPI

[0648]

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0649] SEQ ID NO135:MPV220131

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0650] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQWAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSYFDP

IKFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0651] SEQ ID NO:136:5'UTR

[0652] ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAA

[0653] SEQ ID NO:137:来自nsP1的α5′复制序列

TAGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAG

TTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAA

AACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGA

[0654] SEQ ID NO:138:Gdlp

ATAGTCAGCATAGTACATTTCATCTGACTAATACTACAACACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGC

[0655]

TCGGCCGCCGCCCCTTCCCGGCCCCCACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCCG

[0656] SEQ ID NO:139:P2A

[0657] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0658] SEQ ID NO:140:nsp1编码序列

GAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTG

AGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACT

GATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTC

TAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACT

AAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGT

CATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCA

AGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTT

AGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATA

CTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAG

CGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGG

CTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGC

AAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCA

GTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGT

GACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAA

ATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGT

ATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGG

CATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGA

CAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCC

AAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGAT

CGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGG

ACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCT

[0659]

CTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTG

GGGCC

[0660] SEQ ID NO:141:nsp2编码序列

GGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTAC

GCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCAT

AGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGA

GGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGA

GTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAA

ACTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGA

ACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTG

AGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCT

GGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATT

ATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGA

TGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCAT

AGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGC

CTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATC

TGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATT

GTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGA

AGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAG

GTGTGTATGCCGTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCTGAACATGTGAACGTCCT

ACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGC

CAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACAT

CTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCC

GGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAA

AGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTA

TTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGG

GCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAG

AGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGA

CTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAG

[0661]

GGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGG

CCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTG

TTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTG

ACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGG

CCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACT

TGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTT

TCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGT

[0662] SEQ ID NO:142:nsp3编码序列

GCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAAC

AGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACA

GCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAA

CTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTC

AACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGAC

TAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGA

CAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCG

ACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGA

AGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGG

ATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCG

GAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGC

TGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAAT

TACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTA

TATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGA

GACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGA

TGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTC

[0663] AGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCC

TGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGT

GACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGT

GCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCC

AGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAG

CTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAG

GCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGG

GTGCA

[0664] SEQ ID NO:143:nsp4编码序列

TACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAG

TGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTAC

GCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGA

AAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCT

ACCGAACCCTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTG

GAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGC

CTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCT

TTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCA

GAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTC

GGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAAC

CCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTT

TGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGA

CGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCC

GCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAA

CATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATT

GTGTTCTGGAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGAT

[0665] TCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCATCAATA

CATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAA

CACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTC

ATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTG

AATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGT

GTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCT

GGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAG

TGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTAT

GGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGC

[0666] SEQ ID NO:144:26S最小启动子CTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA

[0667] SEQ ID NO:145:3’-UTR

[0668] ATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAATTTTTATTTTA

TTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTC

[0669] SEQ ID NO:146:P2A

[0670] GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT

[0671] SEQ ID NO:147:多聚腺苷酸位点AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0672] SEQ ID NO:148:T7启动子TAATACGACTCACTATAG

[0673] SEQ ID NO:149:信号肽HMPV

[0674] MSWKVVIIFSLLITPQHG

[0675] SEQ ID NO:150:来自RSVB的p27肽的序列EAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRR

[0676] SEQ ID NO:151:MPV220554

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0677] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTAAALPETGGGSEPEA

[0678] SEQ ID NO:152:MPV220558

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0679] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0680] SEQ ID NO:153:MPV220647

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0681] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0682] SEQ ID NO:154:MPV220639

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0683] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0684] SEQ ID NO:155:MPV220640

MSWKVMIIISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCTDGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGIAIAKTIRLESEVNAIKGA

LKQTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKEFVSKNLTSAINRNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0685] SLDLMTDAELARAISYMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIIKAAPSCSEK

NGNYACLLREDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSRECNINISTTNYPCKVSTGRHPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

RFPPDQFNVALDQVFESIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0686] SEQ ID NO:156:MPV220641

MSWKVMIIISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCTDGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGIAIAKTIRLESEVNAIKGA

LKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKEFVSKNLTSAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0687] LDLMNDAELARAISYMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVINTPCWIIKAAPSCSEK

DGNYACLLREDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSRECNINISTTNYPCKVSTGRHPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSTGSNQVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSNSFDP

IRFPPDQFNVALDQVFESIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGGSEPEA

[0688] SEQ ID NO:157:MPV23362(野生型B)

MSWKVMIIISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCTDGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGIAIAKTIRLESEVNAIKGALKTTNEAVSTLGNGVRVL

ATAVRELKEFVSKNLTSAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMNDAELARAVSYM

[0689] PTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVINTPCWIIKAAPSCSEKDGNYACLLREDQGWYC

KNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSRECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKG

VSCSTGSNQVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSNSFDPIRFPEDQFNVALDQVF

ESIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0690] SEQ ID NO:158:MPV220759

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0691] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0692] SEQ ID NO:159:MPV221190

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0693] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0694] SEQ ID NO:160:MPV220552

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0695] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVRKFDEILSSIEKGNTAAALPETGGGSEPEA

[0696] SEQ ID NO:161:MPV220847

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0697] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0698] SEQ ID NO:162:MPV220115

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0699] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQINRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0700] SEQ ID NO:163:MPV220851

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0701] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPI

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQLNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0702] SEID NO:164:IPV23278

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0703] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQFNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0704] SEQ ID NO:165:MPV23279

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0705] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQMNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0706] SEQ ID NO:166:MPV23280

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0707] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQYNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0708] SEQ ID NO:167:MPV23281

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKYELDLTKSALREL

KTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAHAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNCL

KTTNECVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS

[0709] LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNP

ISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFD

PIKFPQDQFNVALDQVFENIENSQALVDQWNRILSSAEKGNTGGSEPEA

[0710] SEQ ID NO:168:MPV221364

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI

SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCS

[0711] EKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRH

PISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSF

DPVKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTRKPTGAPPELS

GVTNNGFIPHS

[0712] SEQ ID NO:169:MPV221376

[0713] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE
LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA
LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI
SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCS
EKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRH
PISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSF

[0714] DPVKFPEDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTRKPTGAPPELS
GVTNNGFIPHS

[0715] SEQ ID NO:170:MPV221371

[0716] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE
LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA
LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI
SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE
KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI
SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP
VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTRKPTGAPPELSGV
TNNGFIPHS

[0717] SEQ ID NO:171:MPV221377

[0718] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE
LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA
LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI
SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE
KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI
SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP
VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTRKPTGAPPELSGV
TNNGFIPHS

[0719] SEQ ID NO:172:MPV23259

[0720] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE
LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNTKNTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

[0721] KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0722] SEQ ID NO:173:MPV23260

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNAL

KKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAIS

[0723] LDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPIS

MVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPV

KFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0724] SEQ ID NO:174:MPV23261

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMQYTLNNTKNTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0725] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0726] SEQ ID NO:175:MPV23262

[0727] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLQNTKNTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

[0728] KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0729] SEQ ID NO:176:MPV23263

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLNNTKNTQVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0730] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0731] SEQ ID NO:177:MPV23264

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMQYTLQNTKNTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0732] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0733] SEQ ID NO:178:MPV23265

[0734] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLQNTKNTQVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

[0735] KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0736] SEQ ID NO:179:MPV23266

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMQYTLNNTKNTQVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0737] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0738] SEQ ID NO:180:MPV23267

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMQYTLQNTKNTQVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVYTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

[0739] SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0740] SEQ ID NO:181:MPV23268

[0741] MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRENNTKNTNVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVY

TLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAISLDLMTDAE

LARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLL

[0742] REDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPL

GALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPPDQF

NVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0743] SEQ ID NO:182:MPV23269

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

LKTVSADQLRRRRELPRFMNYTLKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVYTL

GNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAISLDLMTDAEL

[0744] ARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLR

EDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLG

ALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPPDQFN

VALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNT

[0745] SEQ ID NO:183:MPV220215

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALREL

KTVSADQLAREEQIENPRQSQSVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVYTLGNGVRVLA

TAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAISNMPT

[0746] SAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQ

NAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRNPISMVALSPLGALVACYKGVS

CSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPPDQFNVALDQVFENI

ENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGGGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

[0747] SEQ ID NO:184:MPV23324

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALRE

[0748] LKTVSADQLRRRRELPRFMQYTLQNTKNTQVTLSKKRKRRFVLGAIALGRATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA

LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSENAGITPAI

SLDLMTDAELARAISNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSE

KKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPI

[0749] SMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDP

VKFPPDQFNVALDQVFENIENSQAWVDKFNRILSSIEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTRKPTGAPPELSGV

TNNGFIPHS

[0750] SEQ ID NO:185:优化的RSVAP27序列

[0751] ELPRFMQYTLQNTKNTQVTLSKKRKRR

[0752] SEQ ID NO:186:优化的RSVB P27序列

[0753] EAPQYMQYTIQTTKNLQVSISKKRKRR

[0754] SEQ ID NO:187:pSMARRT_MPV23324_RNA限制性克隆连接产物

AUAGGCGGCGCAUGAGAGAAGCCCAGACCAAUUACCUACCCAAAUAGGAGAAAGUUCACG

UUGACAUCGAGGAAGACAGCCCAUUCCUCAGAGCUUUGCAGCGGAGCUUCCCGCAGUUUG

AGGUAGAAGCCAAGCAGGUCACUGAUAAUGACCAUGCUAAUGCCAGAGCGUUUUCGCAUC

UGGCUUCAAAACUGAUCGAAACGGAGGUGGACCCAUCCGACACGAUCCUUGACAUUGGAA

UAGUCAGCAUAGUACAUUUCAUCUGACUAAUACUACAACACCACCACCAUGAAUAGAGGA

UUCUUUAACAUGCUCGGCCGCCGCCCCUUCCCGGCCCCCACUGCCAUGUGGAGGCCGCGG

AGAAGGAGGCAGGCGGCCCCGGGAAGCGGAGCUACUAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCU

GGAGACGUGGAGGAGAACCCUGGACCUGAGAAAGUUCACGUUGACAUCGAGGAAGACAGC

CCAUUCCUCAGAGCUUUGCAGCGGAGCUUCCCGCAGUUUGAGGUAGAAGCCAAGCAGGUC

ACUGAUAAUGACCAUGCUAAUGCCAGAGCGUUUUCGCAUCUGGCUUCAAAACUGAUCGAA

ACGGAGGUGGACCCAUCCGACACGAUCCUUGACAUUGGAAGUGCGCCCGCCCGCAGAAUG

UAUUCUAAGCACAAGUAUCAUUGUAUCUGUCCGAUGAGAUGUGCGGAAGAUCCGGACAGA

UUGUAUAAGUAUGCAACUAAGCUGAAGAAAAACUGUAAGGAAAUAACUGAUAAGGAAUUG

GACAAGAAAAUGAAGGAGCUCGCCGCCGUCAUGAGCGACCCUGACCUGGAAACUGAGACU

AUGUGCCUCCACGACGACGAGUCGUGUCGCUACGAAGGGCAAGUCGCUGUUUACCAGGAU

GUAUACGCGGUUGACGGACCGACAAGUCUCUAUCACCAAGCCAAUAAGGGAGUUAGAGUC

GCCUACUGGAUAGGCUUUGACACCACCCCUUUUAUGUUUAAGAACUUGGCUGGAGCAUAU

CCAUCAUACUCUACCAACUGGGCCGACGAAACCGUGUUAACGGCUCGUAACAUAGGCCUA

UGCAGCUCUGACGUUAUGGAGCGGUCACGUAGAGGGAUGUCCAUUCUUAGAAAGAAGUAU

UUGAAACCAUCCAACAAUGUUCUAUUCUCUGUUGGCUCGACCAUCUACCACGAGAAGAGG

[0755]

GACUUACUGAGGAGCUGGCACCUGCCGUCUGUAUUUCACUUACGUGGCAAGCAAAAUUAC

ACAUGUCGGUGUGAGACUAUAGUUAGUUGCGACGGGUACGUCGUUAAAAGAAUAGCUAUC

AGUCCAGGCCUGUAUGGGAAGCCUUCAGGCUAUGCUGCUACGAUGCACCGCGAGGGAUUC

UUGUGCUGCAAAGUGACAGACACAUUGAACGGGGAGAGGGUCUCUUUUCCCGUGUGCACG

UAUGUGCCAGCUACAUUGUGUGACCAAAUGACUGGCAUACUGGCAACAGAUGUCAGUGCG

GACGACGCGCAAAAACUGCUGGUUGGGCUCAACCAGCGUAUAGUCGUCAACGGUCGCACC

CAGAGAAACACCAAUACCAUGAAAAAUUACCUUUUGCCCGUAGUGGCCCAGGCAUUUGCU

AGGUGGGCAAAGGAAUAUAAGGAAGAUCAAGAAGAUGAAAGGCCACUAGGACUACGAGAU

AGACAGUUAGUCAUGGGGUGUUGUUGGGCUUUUAGAAGGCACAAGAUAACAUCUAUUUAU

AAGCGCCCGGAUACCCAAACCAUCAUCAAAGUGAACAGCGAUUUCCACUCAUUCGUGCUG

CCCAGGAUAGGCAGUAACACAUUGGAGAUCGGGCUGAGAACAAGAAUCAGGAAAAUGUUA

GAGGAGCACAAGGAGCCGUCACCUCUCAUUACCGCCGAGGACGUACAAGAAGCUAAGUGC

GCAGCCGAUGAGGCUAAGGAGGUGCGUGAAGCCGAGGAGUUGCGCGCAGCUCUACCACCU

UUGGCAGCUGAUGUUGAGGAGCCCACUCUGGAAGCCGAUGUCGACUUGAUGUUACAAGAG

GCUGGGGCCGGCUCAGUGGAGACACCUCGUGGCUUGAUAAAGGUUACCAGCUACGAUGGC

GAGGACAAGAUCGGCUCUUACGCUGUGCUUUCUCCGCAGGCUGUACUCAAGAGUGAAAAA

UUAUCUUGCAUCCACCCUCUCGCUGAACAAGUCAUAGUGAUAACACACUCUGGCCGAAAA

GGGCGUUAUGCCGUGGAACCAUACCAUGGUAAAGUAGUGGUGCCAGAGGGACAUGCAAUA

CCCGUCCAGGACUUUCAAGCUCUGAGUGAAAGUGCCACCAUUGUGUACAACGAACGUGAG

UUCGUAAACAGGUACCUGCACCAUAUUGCCACACAUGGAGGAGCGCUGAACACUGAUGAA

[0756]

GAAUAUUACAAAACUGUCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAAUACCUGUACGACAUCGAC

AGGAAACAGUGCGUCAAGAAAGAACUAGUCACUGGGCUAGGGCUCACAGGCGAGCUGGUG

GAUCCUCCCUUCCAUGAAUUCGCCUACGAGAGUCUGAGAACACGACCAGCCGCUCCUUAC

CAAGUACCAACCAUAGGGGUGUAUGGCGUGCCAGGAUCAGGCAAGUCUGGCAUCAUUAAA

AGCGCAGUCACCAAAAAAGAUCUAGUGGUGAGCGCCAAGAAAGAAAACUGUGCAGAAAUU

AUAAGGGACGUCAAGAAAAUGAAAGGGCUGGACGUCAAUGCCAGAACUGUGGACUCAGUG

CUCUUGAAUGGAUGCAAACACCCCGUAGAGACCCUGUAUAUUGACGAAGCUUUUGCUUGU

CAUGCAGGUACUCUCAGAGCGCUCAUAGCCAUUAUAAGACCUAAAAAGGCAGUGCUCUGC

GGGGAUCCCAAACAGUGCGGUUUUUUUAACAUGAUGUGCCUGAAAGUGCAUUUUAACCAC

GAGAUUUGCACACAAGUCUUCCACAAAAGCAUCUCUCGCCGUUGCACUAAAUCUGUGACU

UCGGUCGUCUCAACCUUGUUUUACGACAAAAAAAUGAGAACGACGAAUCCGAAAGAGACU

AAGAUUGUGAUUGACACUACCGGCAGUACCAAACCUAAGCAGGACGAUCUCAUUCUCACU

UGUUUCAGAGGGUGGGUGAAGCAGUUGCAAAUAGAUUACAAAGGCAACGAAAUAAUGACG

GCAGCUGCCUCUCAAGGGCUGACCCGUAAAGGUGUGUAUGCCGUUCGGUACAAGGUGAAU

GAAAAUCCUCUGUACGCACCCACCUCUGAACAUGUGAACGUCCUACUGACCCGCACGGAG

GACCGCAUCGUGUGGAAAACACUAGCCGGCGACCCAUGGAUAAAAACACUGACUGCCAAG

UACCCUGGGAAUUUCACUGCCACGAUAGAGGAGUGGCAAGCAGAGCAUGAUGCCAUCAUG

AGGCACAUCUUGGAGAGACCGGACCCUACCGACGUCUUCCAGAAUAAGGCAAACGUGUGU

UGGGCCAAGGCUUUAGUGCCGGUGCUGAAGACCGCUGGCAUAGACAUGACCACUGAACAA

UGGAACACUGUGGAUUAUUUUGAAACGGACAAAGCUCACUCAGCAGAGAUAGUAUUGAAC

[0757]

CAACUAUGCGUGAGGUUCUUUGGACUCGAUCUGGACUCCGGUCUAUUUUCUGCACCCACU

GUUCCGUUAUCCAUUAGGAAUAAUCACUGGGAUAACUCCCCGUCGCCUAACAUGUACGGG

CUGAAUAAAGAAGUGGUCCGUCAGCUCUCUCGCAGGUACCCACAACUGCCUCGGGCAGUU

GCCACUGGAAGAGUCUAUGACAUGAACACUGGUACACUGCGCAAUUAUGAUCCGCGCAUA

AACCUAGUACCUGUAAACAGAAGACUGCCUCAUGCUUUAGUCCUCCACCAUAAUGAACAC

CCACAGAGUGACUUUUCUUCAUUCGUCAGCAAAUUGAAGGGCAGAACUGUCCUGGUGGUC

GGGGAAAAGUUGUCCGUCCCAGGCAAAAUGGUUGACUGGUUGUCAGACCGGCCUGAGGCU

ACCUUCAGAGCUCGGCUGGAUUUAGGCAUCCCAGGUGAUGUGCCCAAAUAUGACAUAAUA

UUUGUUAAUGUGAGGACCCCAUAUAAAUACCAUCACUAUCAGCAGUGUGAAGACCAUGCC

AUUAAGCUUAGCAUGUUGACCAAGAAAGCUUGUCUGCAUCUGAAUCCCGGCGGAACCUGU

GUCAGCAUAGGUUAUGGUUACGCUGACAGGGCCAGCGAAAGCAUCAUUGGUGCUAUAGCG

CGGCAGUUCAAGUUUUCCCGGGUAUGCAAACCGAAAUCCUCACUUGAAGAGACGGAAGUU

CUGUUUGUAUUCAUUGGGUACGAUCGCAAGGCCCGUACGCACAAUCCUUACAAGCUUUCA

UCAACCUUGACCAACAUUUAUACAGGUUCCAGACUCCACGAAGCCGGAUGUGCACCCUCA

UAUCAUGUGGUGCGAGGGGAUAUUGCCACGGCCACCGAAGGAGUGAUUAUAAAUGCUGCU

AACAGCAAAGGACAACCUGGCGGAGGGGUGUGCGGAGCGCUGUAUAAGAAAUUCCCGGAA

AGCUUCGAUUUACAGCCGAUCGAAGUAGGAAAAGCGCGACUGGUCAAAGGUGCAGCUAAA

CAUAUCAUUCAUGCCGUAGGACCAAACUUCAACAAAGUUUCGGAGGUUGAAGGUGACAAA

CAGUUGGCAGAGGCUUAUGAGUCCAUCGCUAAGAUUGUCAACGAUAACAAUUACAAGUCA

GUAGCGAUUCCACUGUUGUCCACCGGCAUCUUUUCCGGGAACAAAGAUCGACUAACCCAA

[0758]

UCAUUGAACCAUUUGCUGACAGCUUUAGACACCACUGAUGCAGAUGUAGCCAUAUACUGC

AGGGACAAGAAAUGGGAAAUGACUCUCAAGGAAGCAGUGGCUAGGAGAGAAGCAGUGGAG

GAGAUAUGCAUAUCCGACGACUCUUCAGUGACAGAACCUGAUGCAGAGCUGGUGAGGGUG

CAUCCGAAGAGUUCUUUGGCUGGAAGGAAGGGCUACAGCACAAGCGAUGGCAAAACUUUC

UCAUAUUUGGAAGGGACCAAGUUUCACCAGGCGGCCAAGGAUAUAGCAGAAAUUAAUGCC

AUGUGGCCCGUUGCAACGGAGGCCAAUGAGCAGGUAUGCAUGUAUAUCCUCGGAGAAAGC

AUGAGCAGUAUUAGGUCGAAAUGCCCCGUCGAAGAGUCGGAAGCCUCCACACCACCUAGC

ACGCUGCCUUGCUUGUGCAUCCAUGCCAUGACUCCAGAAAGAGUACAGCGCCUAAAAGCC

UCACGUCCAGAACAAAUUACUGUGUGCUCAUCCUUUCCAUUGCCGAAGUAUAGAAUCACU

GGUGUGCAGAAGAUCCAAUGCUCCCAGCCUAUAUUGUUCUCACCGAAAGUGCCUGCGUAU

AUUCAUCCAAGGAAGUAUCUCGUGGAAACACCACCGGUAGACGAGACUCCGGAGCCAUCG

GCAGAGAACCAAUCCACAGAGGGGACACCUGAACAACCACCACUUAUAACCGAGGAUGAG

ACCAGGACUAGAACGCCUGAGCCGAUCAUCAUCGAAGAGGAAGAAGAGGAUAGCAUAAGU

UUGCUGUCAGAUGGCCCGACCCACCAGGUGCUGCAAGUCGAGGCAGACAUUCACGGGCCG

CCCUCUGUAUCUAGCUCAUCCUGGUCCAUUCCUCAUGCAUCCGACUUUGAUGUGGACAGU

UUAUCCAUACUUGACACCCUGGAGGGAGCUAGCGUGACCAGCGGGGCAACGUCAGCCGAG

ACUAACUCUUACUUCGCAAAGAGUAUGGAGUUUCUGGCGCGACCGGUGCCUGCGCCUCGA

ACAGUAUUCAGGAACCCUCCACAUCCCGCUCCGCGCACAAGAACACCGUCACUUGCACCC

AGCAGGGCCUGCUCGAGAACCAGCCUAGUUUCCACCCCGCCAGGCGUGAAUAGGGUGAUC

ACUAGAGAGGAGCUCGAGGCGCUUACCCCGUCACGCACUCCUAGCAGGUCGGUCUCGAGA

[0759]

ACCAGCCUGGUCUCCAACCCGCCAGGCGUAAAUAGGGUGAUUACAAGAGAGGAGUUUGAG

GCGUUCGUAGCACAACAACAAUGACGGUUUGAUGCGGGUGCAUACAUCUUUUCCUCCGAC

ACCGGUCAAGGGCAUUUACAACAAAAAUCAGUAAGGCAAACGGUGCUAUCCGAAGUGGUG

UUGGAGAGGACCGAAUUGGAGAUUUCGUAUGCCCCGCGCCUCGACCAAGAAAAAGAAGAA

UUACUACGCAAGAAAUUACAGUUAAAUCCCACACCUGCUAACAGAAGCAGAUACCAGUCC

AGGAAGGUGGAGAACAUGAAAGCCAUAACAGCUAGACGUAUUCUGCAAGGCCUAGGGCAU

UAUUUGAAGGCAGAAGGAAAAGUGGAGUGCUACCGAACCCUGCAUCCUGUUCCUUUGUAU

UCAUCUAGUGUGAACCGUGCCUUUUCAAGCCCCAAGGUCGCAGUGGAAGCCUGUAACGCC

AUGUUGAAAGAGAACUUUCCGACUGUGGCUUCUUACUGUAUUAUUCCAGAGUACGAUGCC

UAUUUGGACAUGGUUGACGGAGCUUCAUGCUGCUUAGACACUGCCAGUUUUUGCCCUGCA

AAGCUGCGCAGCUUUCCAAAGAAACACUCCUAUUUGGAACCCACAAUACGAUCGGCAGUG

CCUUCAGCGAUCCAGAACACGCUCCAGAACGUCCUGGCAGCUGCCACAAAAAGAAAUUGC

AAUGUCACGCAAAUGAGAGAAUUGCCCGUAUUGGAUUCGGCGGCCUUUAAUGUGGAAUGC

UUCAAGAAAUAUGCGUGUAAUAAUGAAUAUUGGGAAACGUUUAAAGAAAACCCCAUCAGG

CUUACUGAAGAAAACGUGGUAAAUUACAUUACCAAAUUAAAAGGACCAAAAGCUGCUGCU

CUUUUUGCGAAGACACAUAAUUUGAAUAUGUUGCAGGACAUACCAAUGGACAGGUUUGUA

AUGGACUUAAAGAGAGACGUGAAAGUGACUCCAGGAACAAAACAUACUGAAGAACGGCCC

AAGGUACAGGUGAUCCAGGCUGCCGAUCCGCUAGCAACAGCGUAUCUGUGCGGAAUCCAC

CGAGAGCUGGUUAGGAGAUUAAAUGCGGUCCUGCUUCCGAACAUUCAUACACUGUUUGAU

AUGUCGGCUGAAGACUUUGACGCUAUUAUAGCCGAGCACUUCCAGCCUGGGGAUUGUGUU

[0760]

CUGGAAACUGACAUCGCGUCGUUUGAUAAAAGUGAGGACGACGCCAUGGCUCUGACCGCG

UUAAUGAUUCUGGAAGACUUAGGUGUGGACGCAGAGCUGUUGACGCUGAUUGAGGCGGCU

UUCGGCGAAAUUUCAUCAAUACAUUUGCCCACUAAAACUAAAUUUAAAUUCGGAGCCAUG

AUGAAAUCUGGAAUGUUCCUCACACUGUUUGUGAACACAGUCAUUAACAUUGUAAUCGCA

AGCAGAGUGUUGAGAGAACGGCUAACCGGAUCACCAUGUGCAGCAUUCAUUGGAGAUGAC

AAUAUCGUGAAAGGAGUCAAAUCGGACAAAUUAAUGGCAGACAGGUGCGCCACCUGGUUG

AAUAUGGAAGUCAAGAUUAUAGAUGCUGUGGUGGGCGAGAAAGCGCCUUAUUUCUGUGGA

GGGUUUAUUUUGUGUGACUCCGUGACCGGCACAGCGUGCCGUGUGGCAGACCCCCUAAAA

AGGCUGUUUAAGCUUGGCAAACCUCUGGCAGCAGACGAUGAACAUGAUGAUGACAGGAGA

AGGGCAUUGCAUGAAGAGUCAACACGCUGGAACCGAGUGGGUAUUCUUUCAGAGCUGUGC

AAGGCAGUAGAAUCAAGGUAUGAAACCGUAGGAACUUCCAUCAUAGUUAUGGCCAUGACU

ACUCUAGCUAGCAGUGUUAAAUCAUUCAGCUACCUGAGAGGGGCCCCUAUAACUCUCUAC

GGCUAACCUGAAUGGACUACGACAUAGUCUAGUCCGCCAAGAUAUCGCCACCAUGAGCUG

GAAGGUCGUGAUCAUCUUCAGCCUGCUGAUUACCCCUCAGCAUGGCCUGAAGGAGAGCUA

CCUGGAAGAAAGCUGUUCCACAAUCACAGAGGGUUAUCUGAGCGUGCUGAGAACCGGCUG

GUAUACCAACGUUUUCACCCUGGAGGUGGGCGAUGUGGAAAACCUGACAUGCGCCGAUGG

GCCAAGCCUGAUCAAGACAGAGCUGGACCUGACCAAGAGCGCCCUGCGGGAGCUGAAGAC

CGUGUCUGCCGACCAGCUGAGACGGCGGAGAGAGCUGCCAAGAUUCAUGCAGUACACACU

GCAGAAUACCAAGAACACCCAGGUGACCCUGAGCAAGAAGCGGAAGAGAAGAUUCGUGCU

GGGCGCUAUUGCCUUGGGCAGAGCAACCGCCGCCGCCGUGACCGCCGGCGUGGCCAUCGC

[0761]

CAAGACCAUCCGGCUGGAAUCUGAGGUGACAGCCAUCAAGAACGCCCUGAAAAAGACGAA

CGAGGCCGUUAGCACCCUCGGCAAUGGAGUCCGAGUGCUGGCCACCGCCGUGCGGGAACU

GAAAGACUUCGUGUCCAAGAACCUGACCAGAGCAAUCAACAAGAACAAAUGCGACAUCGA

CGACCUGAAGAUGGCCGUGAGCUUUAGCCAAUUUAACAGAAGAUUCCUGAAUGUGGUGCG

GCAGUUUUCUGAGAACGCCGGAAUCACACCUGCUAUCAGCCUGGAUCUGAUGACCGACGC

CGAGCUCGCCAGAGCCAUCAGCAAUAUGCCUACAAGCGCCGGCCAGAUCAAGCUGAUGCU

GGAAAAUCGGGCUAUGGUGCGGAGAAAAGGCUUUGGUAUUCUGAUCGGCGUGUACGGCAG

CAGCGUGAUCUACAUGGUCCAGCUGCCUAUUUUCGGCGUGAUCGACACCCCUUGUUGGAU

CGUGAAGGCCGCCCCUAGCUGCUCUGAAAAGAAAGGCAACUACGCCUGCCUGCUGAGAGA

AGAUCAAGGCUGGUACUGCCAGAACGCCGGAUCUACAGUGUACUACCCCAACGAGAAGGA

CUGUGAAACAAGAGGCGACCACGUGUUCUGCGACACCGCCGCUGGCAUCAACGUCGCCGA

GCAGAGCAAAGAGUGCAACAUCAAUAUCUCCACCACCAACUACCCUUGCAAAGUUUCUAC

UGGCAGACACCCCAUCUCCAUGGUGGCACUUAGCCCACUGGGCGCCCUGGUGGCCUGUUA

CAAGGGCGUGAGCUGCAGCAUCGGAUCUAACAGAGUGGGAAUCAUCAAACAGCUGAACAA

GGGCUGCAGUUACAUCACCAACCAGGACGCUGAUACCGUGACCAUCGACAAUACCGUGUA

CCAGCUGAGCAAGGUGGAGGGCGAGCAGCACGUGAUCAAGGGCCGCCCCGUGUCCAGCAG

CUUCGAUCCCGUGAAGUUCCCUCCCGACCAGUUCAACGUGGCCCUGGACCAAGUGUUCGA

[0762]

GAAUAUCGAGAACAGCCAGGCCUGGGUCGACAAGUUCAACCGGAUCCUGUCUUCUAUCGA

AAAGGGCAACACAGGAUUCAUCAUCGUGAUCAUCCUGAUCGCCGUGCUGGGCAGCAGCAU

GAUCCUGGUGUCCAUCUUCAUCAUCAUUAAGAAAACCCGGAAGCCUACCGGAGCUCCUCC

UGAGCUGAGCGGCGUGACAAACAACGGCUUCAUCCCCCACAGCUGAUAAAUCGGGCGCGC

CAUACAGCAGCAAUUGGCAAGCUGCUUACAUAGAACUCGCGGCGAUUGGCAUGCCGCUUU

AAAAUUUUUAUUUUAUUUUUCUUUUCUUUUCCGAAUCGGAUUUUGUUUUUAAUAUUUCAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0763] SEQ ID NO:188:pSMARRT_MPV23267(可溶性)-RNA限制克隆连接产物。

AUAGGCGGCGCAUGAGAGAAGCCCAGACCAAUUACCUACCCAAAUAGGAGAAAGUUCACG

UUGACAUCGAGGAAGACAGCCCAUUCCUCAGAGCUUUGCAGCGGAGCUUCCCGCAGUUUG

[0764]

AGGUAGAAGCCAAGCAGGUCACUGAUAAUGACCAUGCUAAUGCCAGAGCGUUUUCGCAUC

UGGCUUCAAAACUGAUCGAAACGGAGGUGGACCCAUCCGACACGAUCCUUGACAUUGGAA

UAGUCAGCAUAGUACAUUUCAUCUGACUAAUACUACAACACCACCACCAUGAAUAGAGGA

UUCUUUAACAUGCUCGGCCGCCGCCCCUUCCCGGCCCCCACUGCCAUGUGGAGGCCGCGG

AGAAGGAGGCAGGCGGCCCCGGGAAGCGGAGCUACUAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCU

GGAGACGUGGAGGAGAACCCUGGACCUGAGAAAGUUCACGUUGACAUCGAGGAAGACAGC

CCAUUCCUCAGAGCUUUGCAGCGGAGCUUCCCGCAGUUUGAGGUAGAAGCCAAGCAGGUC

ACUGAUAAUGACCAUGCUAAUGCCAGAGCGUUUUCGCAUCUGGCUUCAAAACUGAUCGAA

ACGGAGGUGGACCCAUCCGACACGAUCCUUGACAUUGGAAGUGCGCCCGCCCGCAGAAUG

UAUUCUAAGCACAAGUAUCAUUGUAUCUGUCCGAUGAGAUGUGCGGAAGAUCCGGACAGA

UUGUAUAAGUAUGCAACUAAGCUGAAGAAAAACUGUAAGGAAAUAACUGAUAAGGAAUUG

GACAAGAAAAUGAAGGAGCUCGCCGCCGUCAUGAGCGACCCUGACCUGGAAACUGAGACU

[0765]

AUGUGCCUCCACGACGACGAGUCGUGUCGCUACGAAGGGCAAGUCGCUGUUUACCAGGAU

GUAUACGCGGUUGACGGACCGACAAGUCUCUAUCACCAAGCCAAUAAGGGAGUUAGAGUC

GCCUACUGGAUAGGCUUUGACACCACCCCUUUUAUGUUUAAGAACUUGGCUGGAGCAUAU

CCAUCAUACUCUACCAACUGGGCCGACGAAACCGUGUUAACGGCUCGUAACAUAGGCCUA

UGCAGCUCUGACGUUAUGGAGCGGUCACGUAGAGGGAUGUCCAUUCUUAGAAAGAAGUAU

UUGAAACCAUCCAACAAUGUUCUAUUCUCUGUUGGCUCGACCAUCUACCACGAGAAGAGG

GACUUACUGAGGAGCUGGCACCUGCCGUCUGUAUUUCACUUACGUGGCAAGCAAAAUUAC

ACAUGUCGGUGUGAGACUAUAGUUAGUUGCGACGGGUACGUCGUUAAAAGAAUAGCUAUC

AGUCCAGGCCUGUAUGGGAAGCCUUCAGGCUAUGCUGCUACGAUGCACCGCGAGGGAUUC

UUGUGCUGCAAAGUGACAGACACAUUGAACGGGGAGAGGGUCUCUUUUCCCGUGUGCACG

UAUGUGCCAGCUACAUUGUGUGACCAAAUGACUGGCAUACUGGCAACAGAUGUCAGUGCG

GACGACGCGCAAAAACUGCUGGUUGGGCUCAACCAGCGUAUAGUCGUCAACGGUCGCACC

CAGAGAAACACCAAUACCAUGAAAAAUUACCUUUUGCCCGUAGUGGCCCAGGCAUUUGCU

AGGUGGGCAAAGGAAUAUAAGGAAGAUCAAGAAGAUGAAAGGCCACUAGGACUACGAGAU

AGACAGUUAGUCAUGGGGUGUUGUUGGGCUUUUAGAAGGCACAAGAUAACAUCUAUUUAU

AAGCGCCCGGAUACCCAAACCAUCAUCAAAGUGAACAGCGAUUUCCACUCAUUCGUGCUG

CCCAGGAUAGGCAGUAACACAUUGGAGAUCGGGCUGAGAACAAGAAUCAGGAAAAUGUUA

GAGGAGCACAAGGAGCCGUCACCUCUCAUUACCGCCGAGGACGUACAAGAAGCUAAGUGC

GCAGCCGAUGAGGCUAAGGAGGUGCGUGAAGCCGAGGAGUUGCGCGCAGCUCUACCACCU

UUGGCAGCUGAUGUUGAGGAGCCCACUCUGGAAGCCGAUGUCGACUUGAUGUUACAAGAG

[0766]

GCUGGGGCCGGCUCAGUGGAGACACCUCGUGGCUUGAUAAAGGUUACCAGCUACGAUGGC

GAGGACAAGAUCGGCUCUUACGCUGUGCUUUCUCCGCAGGCUGUACUCAAGAGUGAAAAA

UUAUCUUGCAUCCACCCUCUCGCUGAACAAGUCAUAGUGAUAACACACUCUGGCCGAAAA

GGGCGUUAUGCCGUGGAACCAUACCAUGGUAAAGUAGUGGUGCCAGAGGGACAUGCAAUA

CCCGUCCAGGACUUUCAAGCUCUGAGUGAAAGUGCCACCAUUGUGUACAACGAACGUGAG

UUCGUAAACAGGUACCUGCACCAUAUUGCCACACAUGGAGGAGCGCUGAACACUGAUGAA

GAAUAUUACAAAACUGUCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAAUACCUGUACGACAUCGAC

AGGAAACAGUGCGUCAAGAAAGAACUAGUCACUGGGCUAGGGCUCACAGGCGAGCUGGUG

GAUCCUCCCUUCCAUGAAUUCGCCUACGAGAGUCUGAGAACACGACCAGCCGCUCCUUAC

CAAGUACCAACCAUAGGGGUGUAUGGCGUGCCAGGAUCAGGCAAGUCUGGCAUCAUUAAA

AGCGCAGUCACCAAAAAAGAUCUAGUGGUGAGCGCCAAGAAAGAAAACUGUGCAGAAAUU

AUAAGGGACGUCAAGAAAAUGAAAGGGCUGGACGUCAAUGCCAGAACUGUGGACUCAGUG

CUCUUGAAUGGAUGCAAACACCCCGUAGAGACCCUGUAUAUUGACGAAGCUUUUGCUUGU

CAUGCAGGUACUCUCAGAGCGCUCAUAGCCAUUAUAAGACCUAAAAAGGCAGUGCUCUGC

GGGGAUCCCAAACAGUGCGGUUUUUUUAACAUGAUGUGCCUGAAAGUGCAUUUUAACCAC

GAGAUUUGCACACAAGUCUUCCACAAAAGCAUCUCUCGCCGUUGCACUAAAUCUGUGACU

UCGGUCGUCUCAACCUUGUUUUACGACAAAAAAAUGAGAACGACGAAUCCGAAAGAGACU

AAGAUUGUGAUUGACACUACCGGCAGUACCAAACCUAAGCAGGACGAUCUCAUUCUCACU

UGUUUCAGAGGGUGGGUGAAGCAGUUGCAAAUAGAUUACAAAGGCAACGAAAUAAUGACG

GCAGCUGCCUCUCAAGGGCUGACCCGUAAAGGUGUGUAUGCCGUUCGGUACAAGGUGAAU

[0767]

GAAAAUCCUCUGUACGCACCCACCUCUGAACAUGUGAACGUCCUACUGACCCGCACGGAG

GACCGCAUCGUGUGGAAAACACUAGCCGGCGACCCAUGGAUAAAAACACUGACUGCCAAG

UACCCUGGGAAUUUCACUGCCACGAUAGAGGAGUGGCAAGCAGAGCAUGAUGCCAUCAUG

AGGCACAUCUUGGAGAGACCGGACCCUACCGACGUCUUCCAGAAUAAGGCAAACGUGUGU

UGGGCCAAGGCUUUAGUGCCGGUGCUGAAGACCGCUGGCAUAGACAUGACCACUGAACAA

UGGAACACUGUGGAUUAUUUUGAAACGGACAAAGCUCACUCAGCAGAGAUAGUAUUGAAC

CAACUAUGCGUGAGGUUCUUUGGACUCGAUCUGGACUCCGGUCUAUUUUCUGCACCCACU

GUUCCGUUAUCCAUUAGGAAUAAUCACUGGGAUAACUCCCCGUCGCCUAACAUGUACGGG

CUGAAUAAAGAAGUGGUCCGUCAGCUCUCUCGCAGGUACCCACAACUGCCUCGGGCAGUU

GCCACUGGAAGAGUCUAUGACAUGAACACUGGUACACUGCGCAAUUAUGAUCCGCGCAUA

AACCUAGUACCUGUAAACAGAAGACUGCCUCAUGCUUUAGUCCUCCACCAUAAUGAACAC

CCACAGAGUGACUUUUCUUCAUUCGUCAGCAAAUUGAAGGGCAGAACUGUCCUGGUGGUC

GGGGAAAAGUUGUCCGUCCCAGGCAAAAUGGUUGACUGGUUGUCAGACCGGCCUGAGGCU

ACCUUCAGAGCUCGGCUGGAUUUAGGCAUCCCAGGUGAUGUGCCCAAAUAUGACAUAAUA

UUUGUUAAUGUGAGGACCCCAUAUAAAUACCAUCACUAUCAGCAGUGUGAAGACCAUGCC

AUUAAGCUUAGCAUGUUGACCAAGAAAGCUUGUCUGCAUCUGAAUCCCGGCGGAACCUGU

GUCAGCAUAGGUUAUGGUUACGCUGACAGGGCCAGCGAAAGCAUCAUUGGUGCUAUAGCG

CGGCAGUUCAAGUUUUCCCGGGUAUGCAAACCGAAAUCCUCACUUGAAGAGACGGAAGUU

CUGUUUGUAUUCAUUGGGUACGAUCGCAAGGCCCGUACGCACAAUCCUUACAAGCUUUCA

UCAACCUUGACCAACAUUUAUACAGGUUCCAGACUCCACGAAGCCGGAUGUGCACCCUCA

[0768]

UAUCAUGUGGUGCGAGGGGAUAUUGCCACGGCCACCGAAGGAGUGAUUAUAAAUGCUGCU

AACAGCAAAGGACAACCUGGCGGAGGGGUGUGCGGAGCGCUGUAUAAGAAAUUCCCGGAA

AGCUUCGAUUUACAGCCGAUCGAAGUAGGAAAAGCGCGACUGGUCAAAGGUGCAGCUAAA

CAUAUCAUUCAUGCCGUAGGACCAAACUUCAACAAAGUUUCGGAGGUUGAAGGUGACAAA

CAGUUGGCAGAGGCUUAUGAGUCCAUCGCUAAGAUUGUCAACGAUAACAAUUACAAGUCA

GUAGCGAUUCCACUGUUGUCCACCGGCAUCUUUUCCGGGAACAAAGAUCGACUAACCCAA

UCAUUGAACCAUUUGCUGACAGCUUUAGACACCACUGAUGCAGAUGUAGCCAUAUACUGC

AGGGACAAGAAAUGGGAAAUGACUCUCAAGGAAGCAGUGGCUAGGAGAGAAGCAGUGGAG

GAGAUAUGCAUAUCCGACGACUCUUCAGUGACAGAACCUGAUGCAGAGCUGGUGAGGGUG

CAUCCGAAGAGUUCUUUGGCUGGAAGGAAGGGCUACAGCACAAGCGAUGGCAAAACUUUC

UCAUAUUUGGAAGGGACCAAGUUUCACCAGGCGGCCAAGGAUAUAGCAGAAAUUAAUGCC

AUGUGGCCCGUUGCAACGGAGGCCAAUGAGCAGGUAUGCAUGUAUAUCCUCGGAGAAAGC

AUGAGCAGUAUUAGGUCGAAAUGCCCCGUCGAAGAGUCGGAAGCCUCCACACCACCUAGC

ACGCUGCCUUGCUUGUGCAUCCAUGCCAUGACUCCAGAAAGAGUACAGCGCCUAAAAGCC

UCACGUCCAGAACAAAUUACUGUGUGCUCAUCCUUUCCAUUGCCGAAGUAUAGAAUCACU

GGUGUGCAGAAGAUCCAAUGCUCCCAGCCUAUAUUGUUCUCACCGAAAGUGCCUGCGUAU

AUUCAUCCAAGGAAGUAUCUCGUGGAAACACCACCGGUAGACGAGACUCCGGAGCCAUCG

GCAGAGAACCAAUCCACAGAGGGGACACCUGAACAACCACCACUUAUAACCGAGGAUGAG

ACCAGGACUAGAACGCCUGAGCCGAUCAUCAUCGAAGAGGAAGAAGAGGAUAGCAUAAGU

UUGCUGUCAGAUGGCCCGACCCACCAGGUGCUGCAAGUCGAGGCAGACAUUCACGGGCCG

[0769]

CCCUCUGUAUCUAGCUCAUCCUGGUCCAUUCCUCAUGCAUCCGACUUUGAUGUGGACAGU

UUAUCCAUACUUGACACCCUGGAGGGAGCUAGCGUGACCAGCGGGGCAACGUCAGCCGAG

ACUAACUCUUACUUCGCAAAGAGUAUGGAGUUUCUGGCGCGACCGGUGCCUGCGCCUCGA

ACAGUAUUCAGGAACCCUCCACAUCCCGCUCCGCGCACAAGAACACCGUCACUUGCACCC

AGCAGGGCCUGCUCGAGAACCAGCCUAGUUUCCACCCCGCCAGGCGUGAAUAGGGUGAUC

ACUAGAGAGGAGCUCGAGGCGCUUACCCCGUCACGCACUCCUAGCAGGUCGGUCUCGAGA

ACCAGCCUGGUCUCCAACCCGCCAGGCGUAAAUAGGGUGAUUACAAGAGAGGAGUUUGAG

GCGUUCGUAGCACAACAACAAUGACGGUUUGAUGCGGGUGCAUACAUCUUUUCCUCCGAC

ACCGGUCAAGGGCAUUUACAACAAAAAUCAGUAAGGCAAACGGUGCUAUCCGAAGUGGUG

UUGGAGAGGACCGAAUUGGAGAUUUCGUAUGCCCCGCGCCUCGACCAAGAAAAAGAAGAA

UUACUACGCAAGAAAUUACAGUUAAAUCCCACACCUGCUAACAGAAGCAGAUACCAGUCC

AGGAAGGUGGAGAACAUGAAAGCCAUAACAGCUAGACGUAUUCUGCAAGGCCUAGGGCAU

UAUUUGAAGGCAGAAGGAAAAGUGGAGUGCUACCGAACCCUGCAUCCUGUUCCUUUGUAU

UCAUCUAGUGUGAACCGUGCCUUUUCAAGCCCCAAGGUCGCAGUGGAAGCCUGUAACGCC

AUGUUGAAAGAGAACUUUCCGACUGUGGCUUCUUACUGUAUUAUUCCAGAGUACGAUGCC

UAUUUGGACAUGGUUGACGGAGCUUCAUGCUGCUUAGACACUGCCAGUUUUUGCCCUGCA

AAGCUGCGCAGCUUUCCAAAGAAACACUCCUAUUUGGAACCCACAAUACGAUCGGCAGUG

CCUUCAGCGAUCCAGAACACGCUCCAGAACGUCCUGGCAGCUGCCACAAAAAGAAAUUGC

AAUGUCACGCAAAUGAGAGAAUUGCCCGUAUUGGAUUCGGCGGCCUUUAAUGUGGAAUGC

UUCAAGAAAUAUGCGUGUAAUAAUGAAUAUUGGGAAACGUUUAAAGAAAACCCCAUCAGG

[0770]

CUUACUGAAGAAAACGUGGUAAAUUACAUUACCAAAUUAAAAGGACCAAAAGCUGCUGCU

CUUUUUGCGAAGACACAUAAUUUGAAUAUGUUGCAGGACAUACCAAUGGACAGGUUUGUA

AUGGACUUAAAGAGAGACGUGAAAGUGACUCCAGGAACAAAACAUACUGAAGAACGGCCC

AAGGUACAGGUGAUCCAGGCUGCCGAUCCGCUAGCAACAGCGUAUCUGUGCGGAAUCCAC

CGAGAGCUGGUUAGGAGAUUAAAUGCGGUCCUGCUUCCGAACAUUCAUACACUGUUUGAU

AUGUCGGCUGAAGACUUUGACGCUAUUAUAGCCGAGCACUUCCAGCCUGGGGAUUGUGUU

CUGGAAACUGACAUCGCGUCGUUUGAUAAAAGUGAGGACGACGCCAUGGCUCUGACCGCG

UUAAUGAUUCUGGAAGACUUAGGUGUGGACGCAGAGCUGUUGACGCUGAUUGAGGCGGCU

UUCGGCGAAAUUUCAUCAAUACAUUUGCCCACUAAAACUAAAUUUAAAUUCGGAGCCAUG

AUGAAAUCUGGAAUGUUCCUCACACUGUUUGUGAACACAGUCAUUAACAUUGUAAUCGCA

AGCAGAGUGUUGAGAGAACGGCUAACCGGAUCACCAUGUGCAGCAUUCAUUGGAGAUGAC

AAUAUCGUGAAAGGAGUCAAAUCGGACAAAUUAAUGGCAGACAGGUGCGCCACCUGGUUG

AAUAUGGAAGUCAAGAUUAUAGAUGCUGUGGUGGGCGAGAAAGCGCCUUAUUUCUGUGGA

GGGUUUAUUUUGUGUGACUCCGUGACCGGCACAGCGUGCCGUGUGGCAGACCCCCUAAAA

AGGCUGUUUAAGCUUGGCAAACCUCUGGCAGCAGACGAUGAACAUGAUGAUGACAGGAGA

AGGGCAUUGCAUGAAGAGUCAACACGCUGGAACCGAGUGGGUAUUCUUUCAGAGCUGUGC

AAGGCAGUAGAAUCAAGGUAUGAAACCGUAGGAACUUCCAUCAUAGUUAUGGCCAUGACU

ACUCUAGCUAGCAGUGUUAAAUCAUUCAGCUACCUGAGAGGGGCCCCUAUAACUCUCUAC

GGCUAACCUGAAUGGACUACGACAUAGUCUAGUCCGCCAAGAUAUCGCCACCAUGUCCUG

GAAGGUGGUCAUCAUCUUUUCUCUGCUGAUCACACCCCAGCACGGCCUGAAGGAGUCUUA

[0771]

CCUGGAGGAGUCCUGUUCUACCAUCACAGAGGGCUACCUGAGCGUGCUGAGGACCGGCUG

GUAUACAAACGUGUUCACCCUGGAGGUCGGCGAUGUGGAGAAUCUGACCUGCGCCGACGG

CCCAUCCCUGAUCAAGACAGAGCUGGAUCUGACCAAGUCUGCCCUGAGGGAGCUGAAGAC

AGUGAGCGCCGACCAGCUGCGGAGAAGGCGCGAGCUGCCCCGCUUUAUGAACUAUACCCU

GAACAAUGCCAAGAAGACCAAUGUGACACUGAGCAAGAAGCGGAAGCGGAGAUUCGUGCU

GGGCGCCAUCGCCCUGGGCAGAGCAACAGCAGCAGCAGUGACCGCAGGAGUGGCCAUCGC

CAAGACAAUCCGGCUGGAGUCCGAGGUGACCGCCAUCAAGAACGCCCUGAAGAAGACAAA

UGAGGCCGUGUACACCCUGGGAAACGGCGUGAGGGUGCUGGCAACAGCCGUGCGCGAGCU

GAAGGAUUUCGUGAGCAAGAAUCUGACCAGGGCCAUCAACAAGAAUAAGUGUGACAUCGA

CGAUCUGAAGAUGGCCGUGAGCUUCUCCCAGUUUAACAGGCGCUUUCUGAAUGUGGUGCG

CCAGUUCUCCGAGAACGCCGGCAUCACACCCGCCAUCUCUCUGGACCUGAUGACCGAUGC

AGAGCUGGCAAGGGCCAUCAGCAACAUGCCUACCUCCGCCGGCCAGAUCAAGCUGAUGCU

GGAGAAUAGAGCCAUGGUGCGGAGAAAGGGCUUUGGCAUCCUGAUCGGCGUGUACGGCAG

CUCCGUGAUCUAUAUGGUGCAGCUGCCUAUCUUCGGCGUGAUCGAUACACCAUGCUGGAU

CGUGAAGGCCGCCCCCUCUUGUAGCGAGAAGAAGGGCAAUUACGCCUGCCUGCUGAGGGA

GGAUCAGGGCUGGUAUUGUCAGAACGCCGGCUCUACCGUGUACUAUCCUAAUGAGAAGGA

CUGUGAGACACGCGGCGACCACGUGUUCUGCGAUACCGCAGCAGGCAUCAACGUGGCAGA

GCAGAGCAAGGAGUGUAACAUCAAUAUCUCCACCACAAAUUACCCAUGCAAGGUGAGCAC

CGGCCGGCACCCUAUCUCUAUGGUGGCCCUGAGCCCACUGGGCGCCCUGGUGGCCUGCUA

[0772]

UAAGGGCGUGUCCUGUUCUAUCGGCAGCAACAGAGUGGGCAUCAUCAAGCAGCUGCCCAA

GGGCUGCUCCUACAUCACAAAUCAGGACGCCGAUACCGUGACAAUCGAUAAUACCGUGUA

UCAGCUGAGCAAGGUGGAGGGAGAGCAGCACGUGAUCAAGGGCCGGCCAGUGUCUAGCUC

CUUCGACCCCGUGAAGUUUCCCCCUGAUCAGUUCAACGUGGCCCUGGACCAGGUGUUUGA

GAACAUCGAGAAUAGCCAGGCCUGGGUGGACAAGUUCAACAGAAUCCUGUCUAGCAUCGA

GAAGGGCAAUACCUGAUAAAUCGGGCGCGCCAUACAGCAGCAAUUGGCAAGCUGCUUACA

UAGAACUCGCGGCGAUUGGCAUGCCGCUUUAAAAUUUUUAUUUUAUUUUUCUUUUCUUUU

CCGAAUCGGAUUUUGUUUUUAAUAUUUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

AAAAAAAAAAA

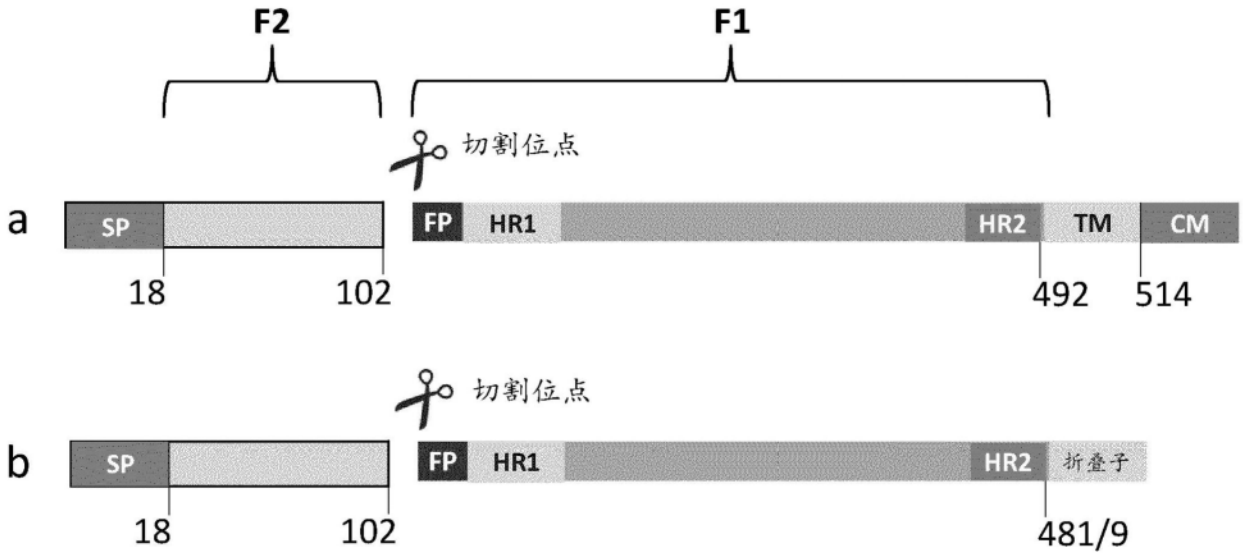

F2
F1
切割位点
a
SP
FP
HR1
HR2
TM
CM
18
102
492
514
切割位点
b
SP
FP
HR1
HR2
折叠子
18
102
481/9

图1

A

MPV201285	DQLARE	EQIENP$_{98}$RRRR$_{102}$	F$_{103}$V
MPV210531	DQLARE	EQIENP$_{98}$RRRR	F$_{103}$V
MPV210502	DQLA$_{90}$--	------RRRR	F$_{103}$V
MPV210500	DQLA$_{90}$RRRR	-I$_{95}$ENP$_{98}$RRRR	F$_{103}$V
MPV210507	DQ$_{88}$RRRR	E$_{93}$QIENP$_{98}$RRRR	F$_{103}$V
MPV210509	DQLA$_{90}$RRRR	E$_{92}$EQIENPRRRR	F$_{103}$V

F2 结构域 F1 结构域

B

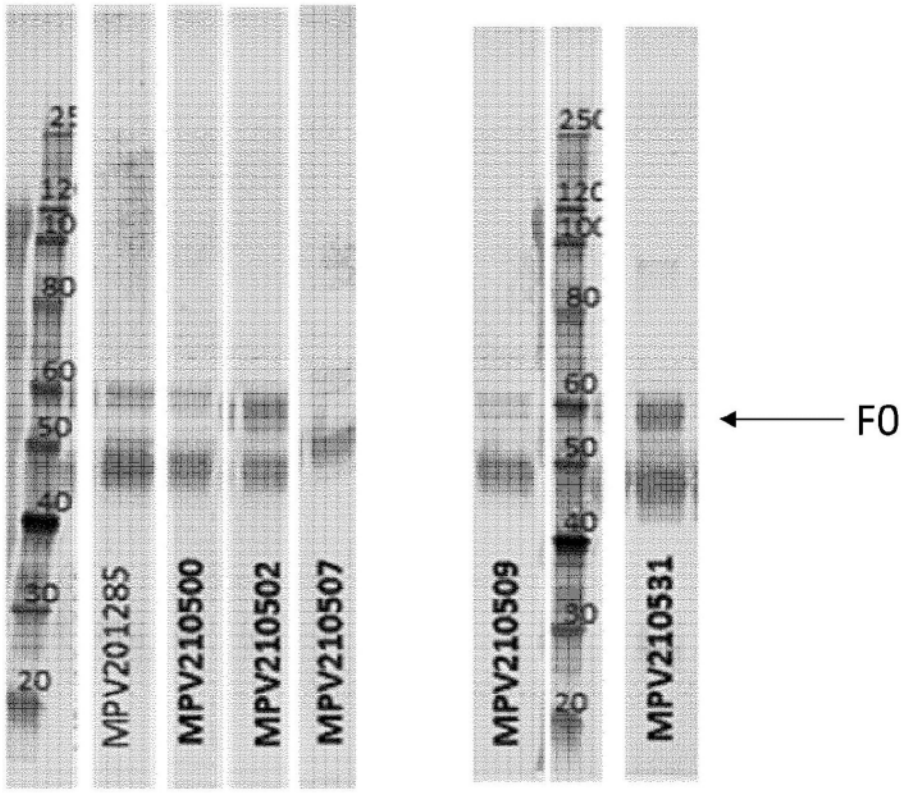


图2

C

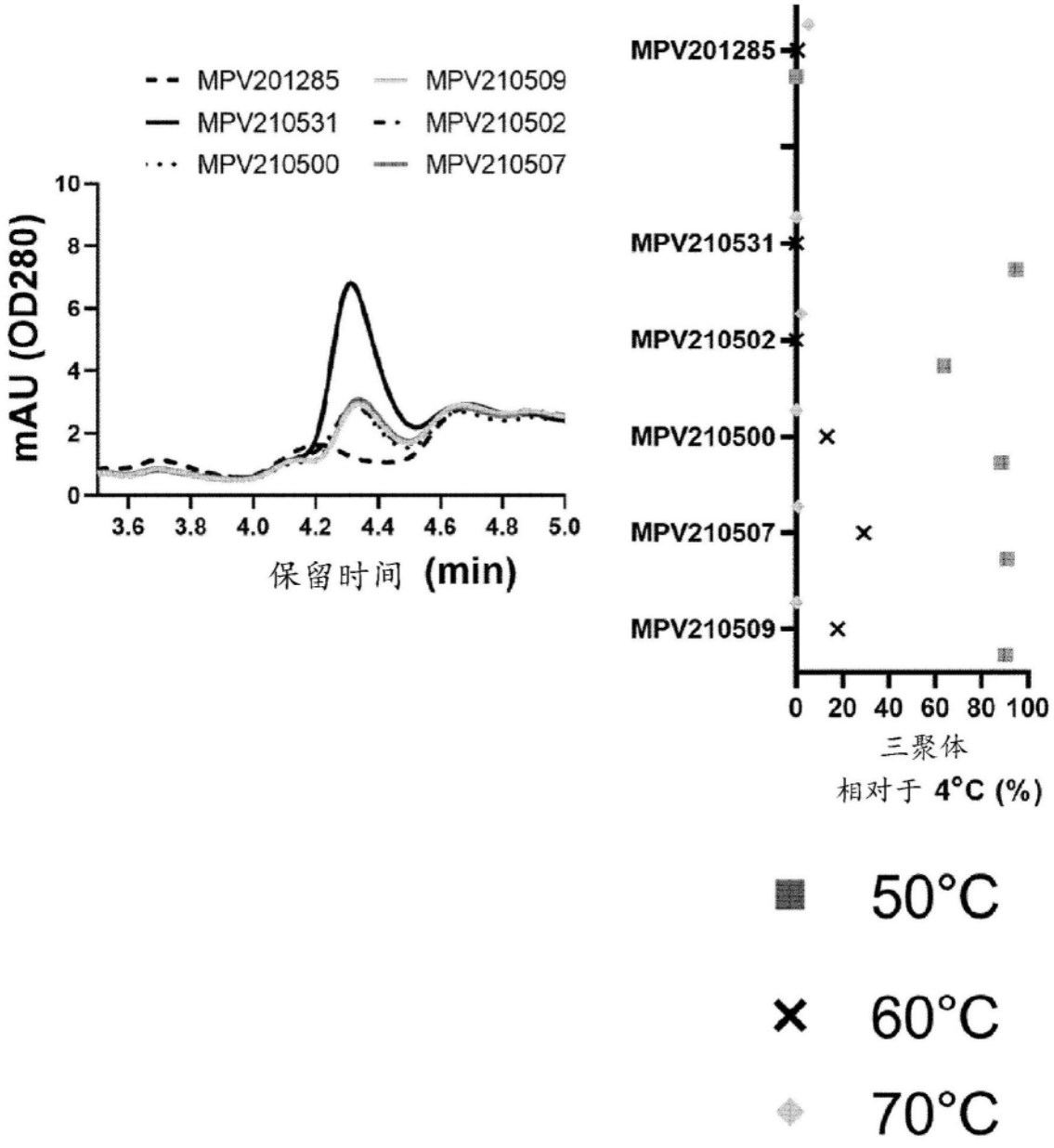

MPV201285
MPV210509
MPV210531
MPV210502
MPV210500
MPV210507
mAU (OD280)
10
8
6
4
2
0
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
保留时间 (min)
MPV201285
MPV210531
MPV210502
MPV210500
MPV210507
MPV210509
0
20
40
60
80
100
三聚体
相对于 4°C (%)
50°C
60°C
70°C

图2续

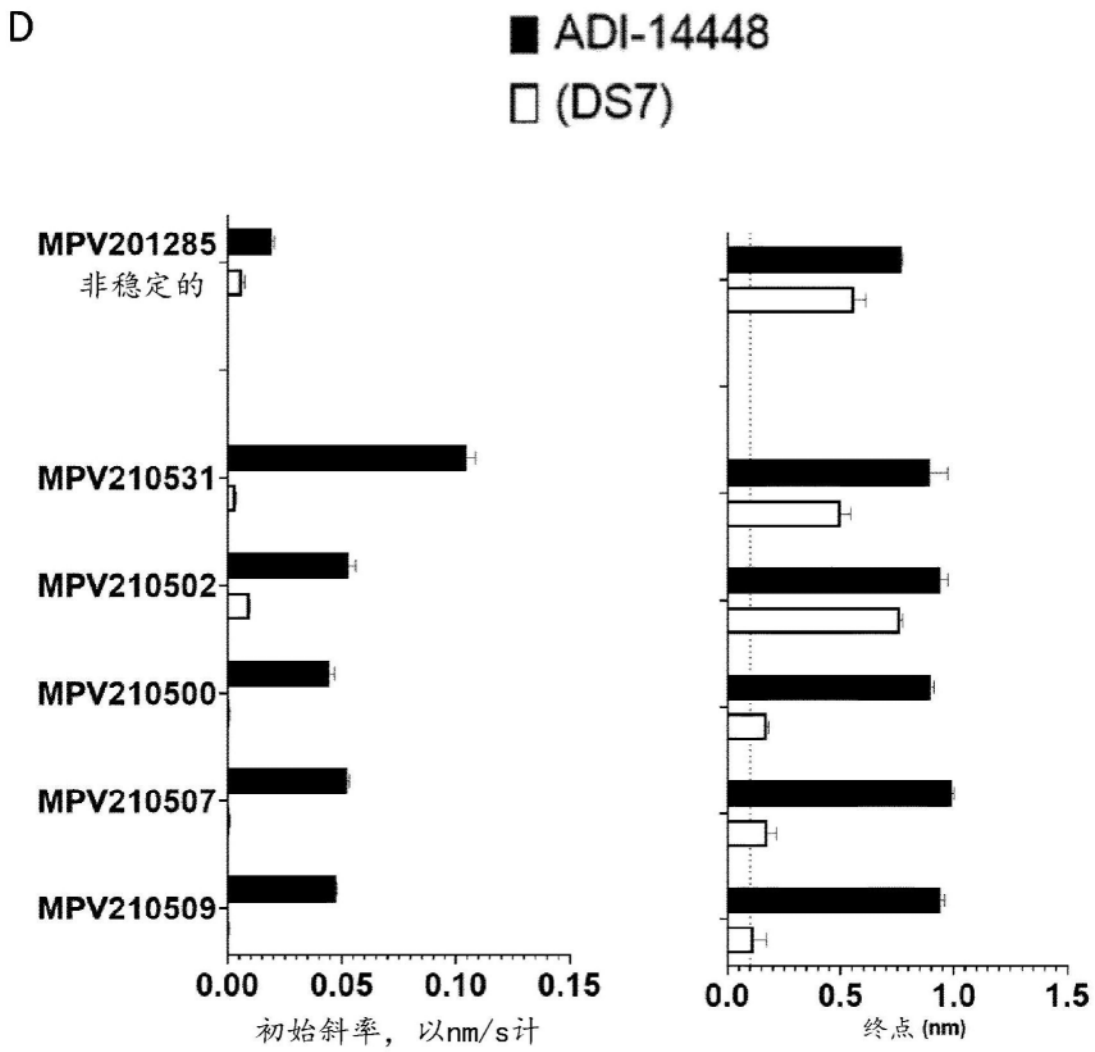

D
ADI-14448
(DS7)
MPV201285
非稳定的
MPV210531
MPV210502
MPV210500
MPV210507
MPV210509
0.00
0.05
0.10
0.15
初始斜率，以nm/s计
0.0
0.5
1.0
1.5
终点 (nm)

图2续

A

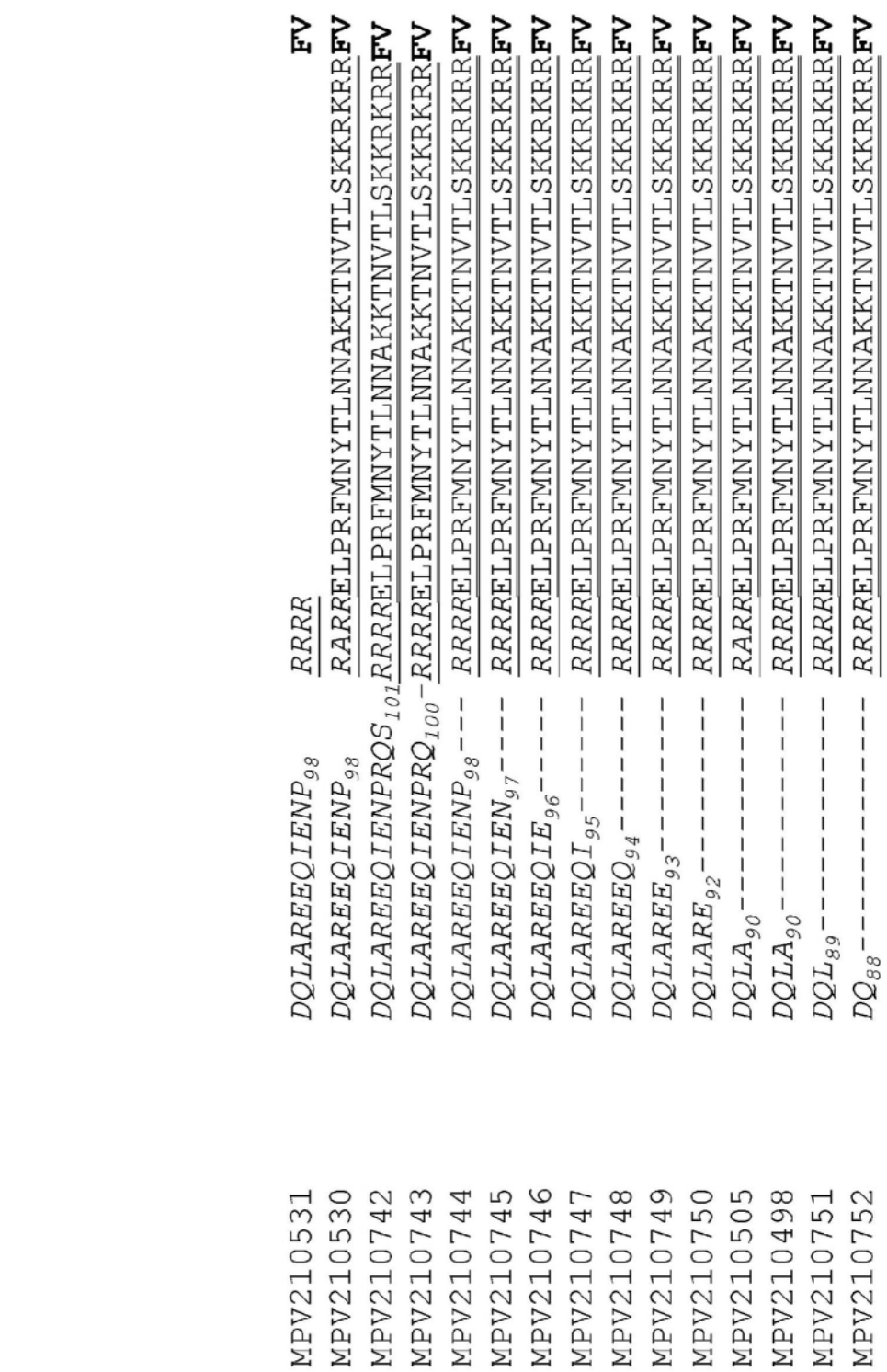

MPV210531 DQLAREEQIENP98 RRRR FV
MPV210530 DQLAREEQIENP98 RARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210742 DQLAREEQIENPRQS101 RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210743 DQLAREEQIENPRQ100 -RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210744 DQLAREEQIENP98 --- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210745 DQLAREEQIEN97 ---- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210746 DQLAREEQIE96 ----- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210747 DQLAREEQI95 ------ RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210748 DQLAREEQ94 ------- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210749 DQLAREE93 -------- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210750 DQLARE92 --------- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210505 DQLA90 ---------- RARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210498 DQLA90 ---------- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210751 DQL89 ----------- RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV
MPV210752 DQ88 ------------ RRRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRFV

图3

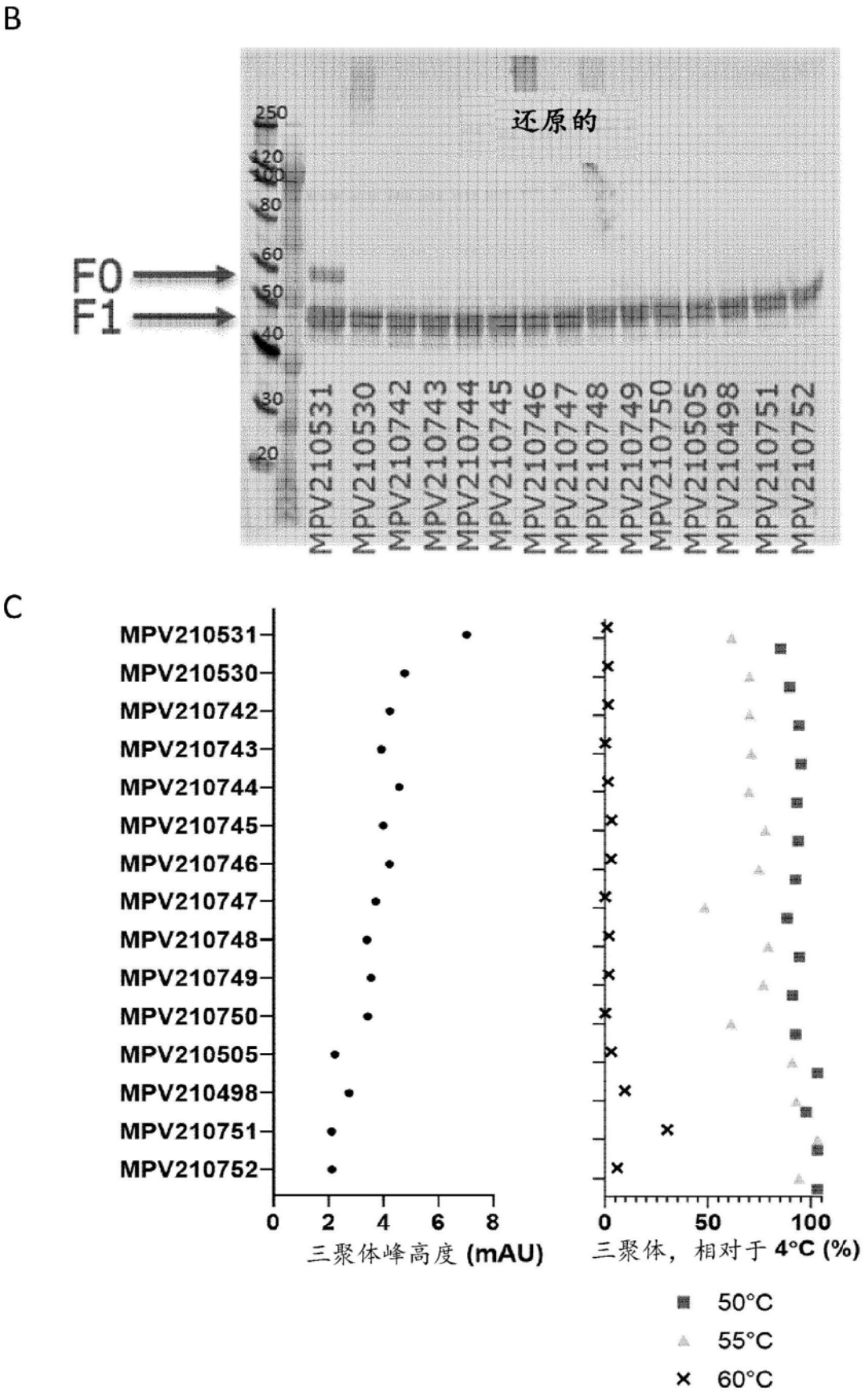

B
还原的
250
120
100
80
60
50
40
30
20
F0
F1
MPV210531
MPV210530
MPV210742
MPV210743
MPV210744
MPV210745
MPV210746
MPV210747
MPV210748
MPV210749
MPV210750
MPV210505
MPV210498
MPV210751
MPV210752
C
MPV210531
MPV210530
MPV210742
MPV210743
MPV210744
MPV210745
MPV210746
MPV210747
MPV210748
MPV210749
MPV210750
MPV210505
MPV210498
MPV210751
MPV210752
0 2 4 6 8
三聚体峰高度 (mAU)
0 50 100
三聚体，相对于 4°C (%)
50°C
55°C
60°C

图3续

D

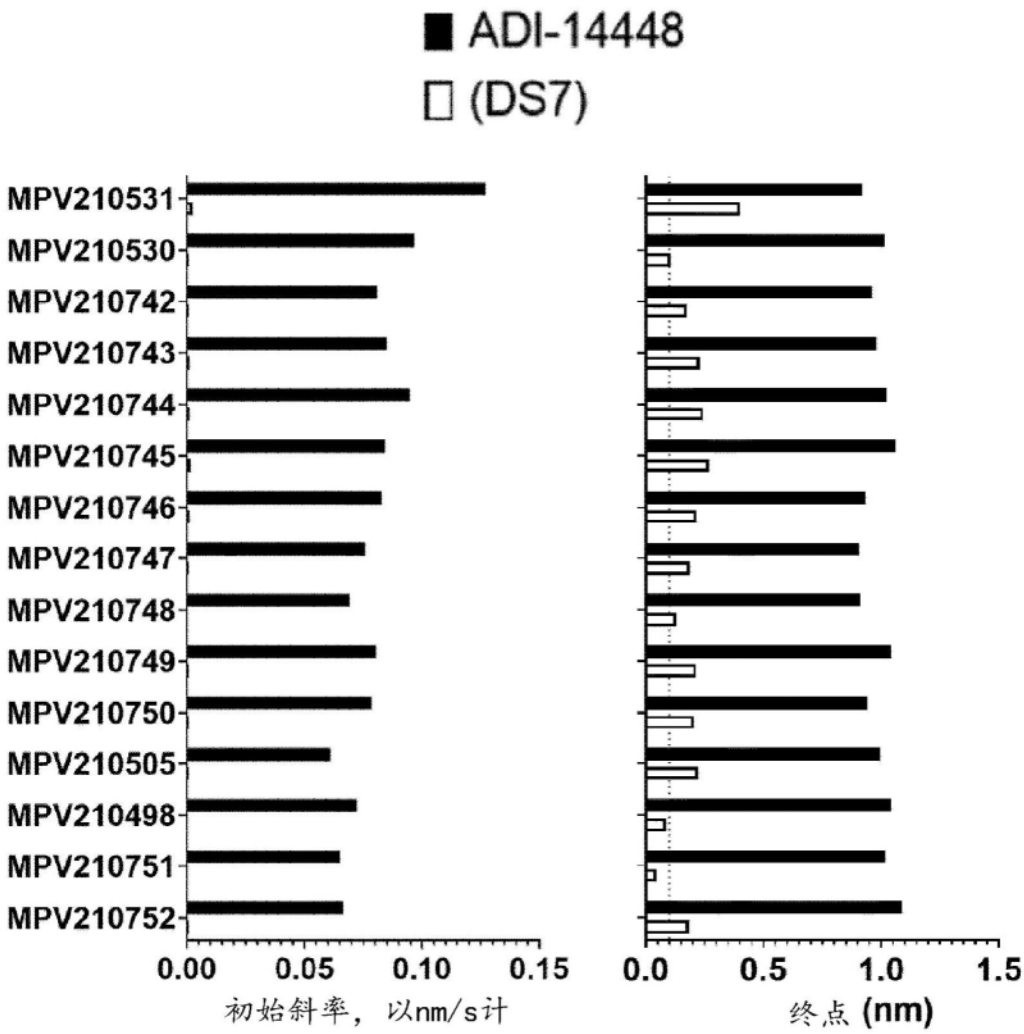
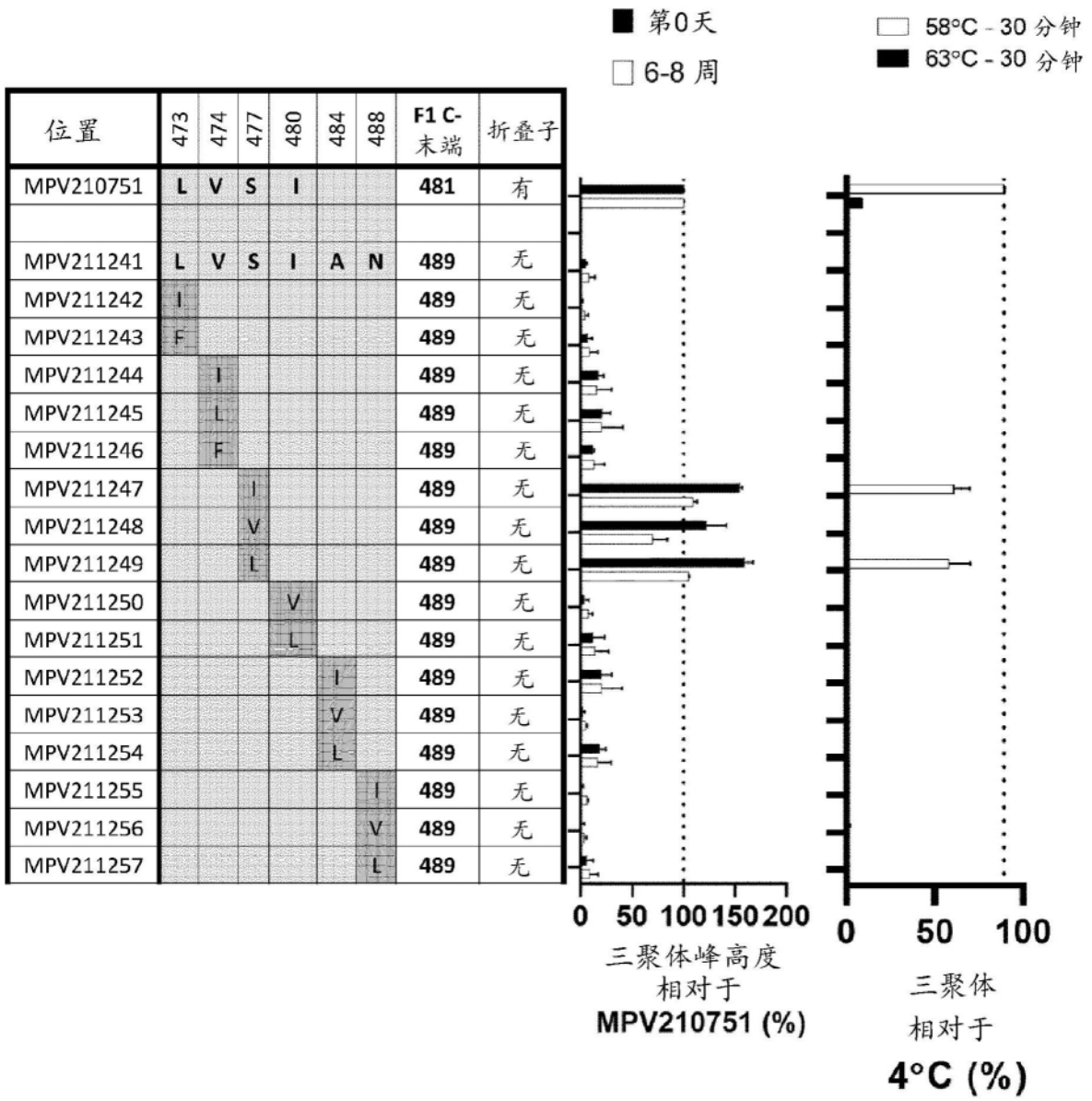

ADI-14448
(DS7)
MPV210531
MPV210530
MPV210742
MPV210743
MPV210744
MPV210745
MPV210746
MPV210747
MPV210748
MPV210749
MPV210750
MPV210505
MPV210498
MPV210751
MPV210752
0.00
0.05
0.10
0.15
初始斜率，以nm/s计
0.0
0.5
1.0
1.5
终点 (nm)

图3续



位置	473	474	477	480	484	488	F1 C-末端	折叠子
MPV210751	L	V	S	I			481	有
MPV211241	L	V	S	I	A	N	489	无
MPV211242	I						489	无
MPV211243	F						489	无
MPV211244		I					489	无
MPV211245		L					489	无
MPV211246		F					489	无
MPV211247			I				489	无
MPV211248			V				489	无
MPV211249			L				489	无
MPV211250				V			489	无
MPV211251				L			489	无
MPV211252					I		489	无
MPV211253					V		489	无
MPV211254					L		489	无
MPV211255						I	489	无
MPV211256						V	489	无
MPV211257						L	489	无

图4

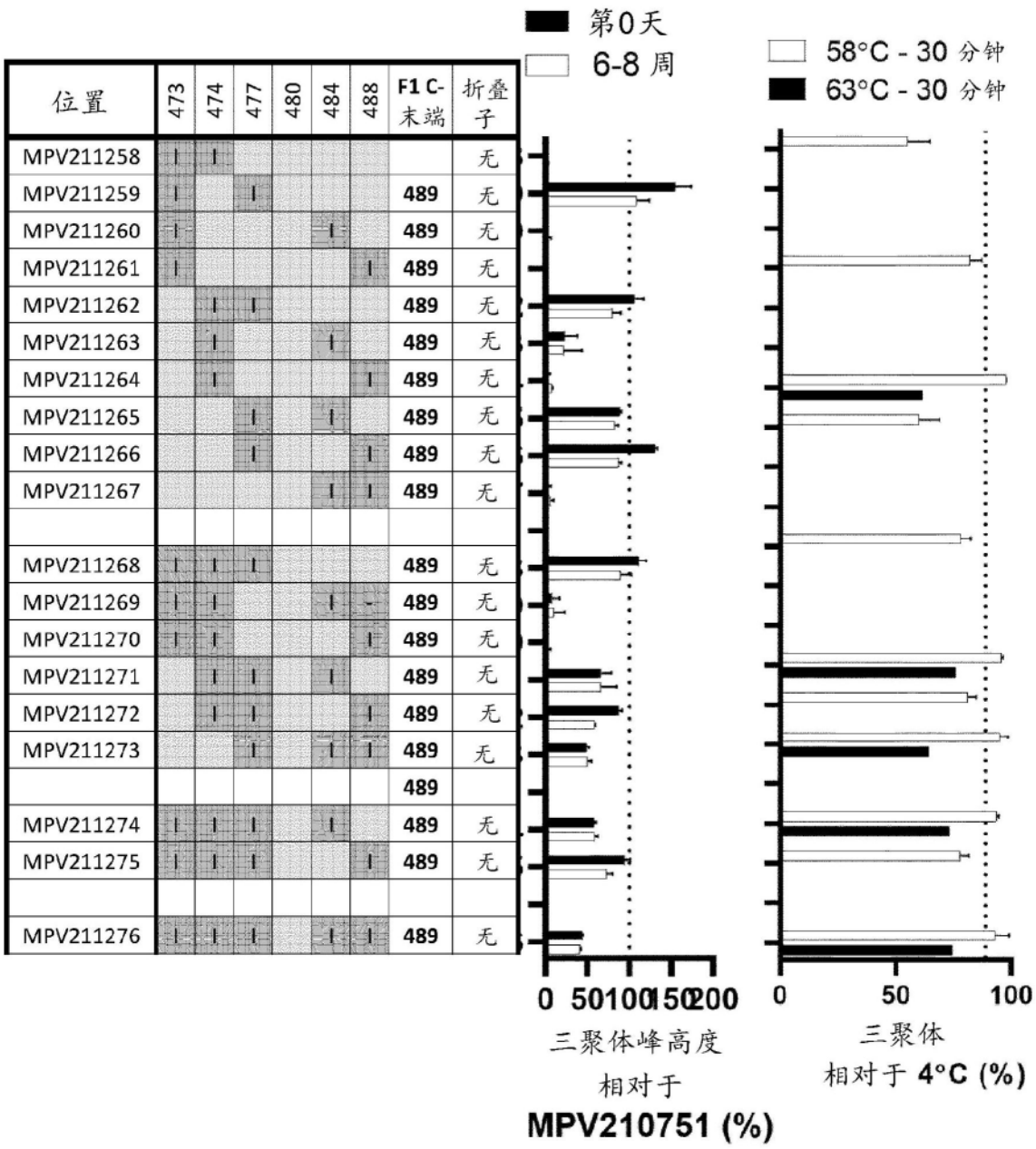

第0天
6-8 周
58°C - 30 分钟
63°C - 30 分钟
位置
473
474
477
480
484
488
F1 C-末端
折叠子
MPV211258 无
MPV211259 489 无
MPV211260 489 无
MPV211261 489 无
MPV211262 489 无
MPV211263 489 无
MPV211264 489 无
MPV211265 489 无
MPV211266 489 无
MPV211267 489 无
MPV211268 489 无
MPV211269 489 无
MPV211270 489 无
MPV211271 489 无
MPV211272 489 无
MPV211273 489 无
489
MPV211274 489 无
MPV211275 489 无
MPV211276 489 无
0 50 100 150 200
三聚体峰高度
相对于
MPV210751 (%)
0 50 100
三聚体
相对于 4°C (%)

图4续

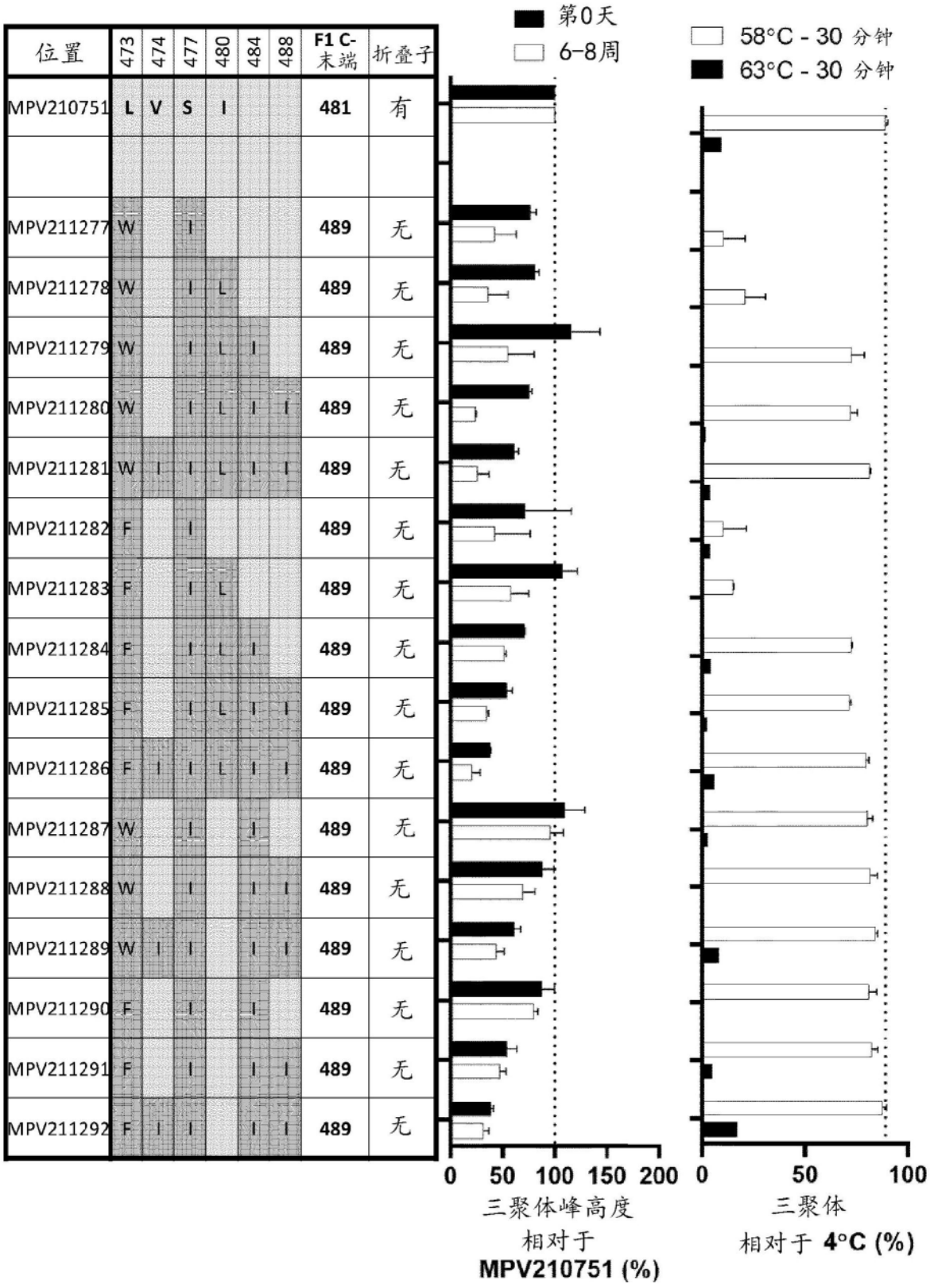
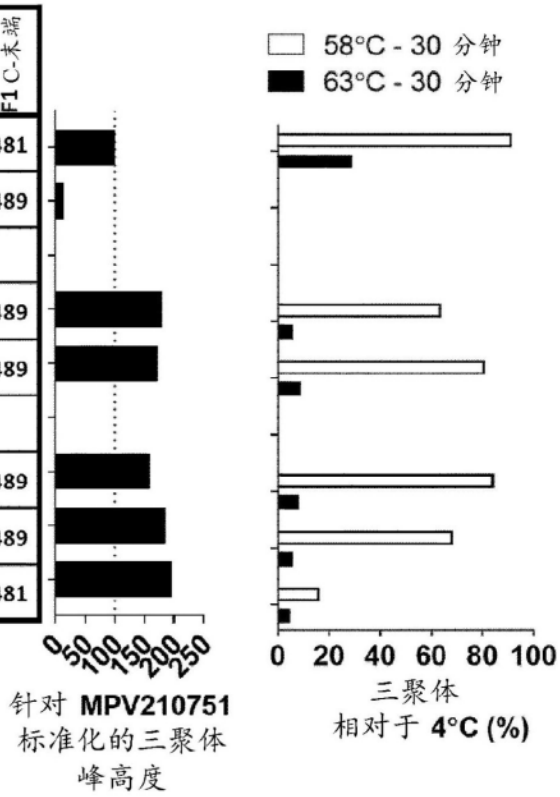

位置
473
474
477
480
484
488
F1 C-末端
折叠子
MPV210751 L V S I 481 有
MPV211277 W I 489 无
MPV211278 W I L 489 无
MPV211279 W I L I 489 无
MPV211280 W I L I I 489 无
MPV211281 W I I L I I 489 无
MPV211282 F I 489 无
MPV211283 F I L 489 无
MPV211284 F I L I 489 无
MPV211285 F I L I I 489 无
MPV211286 F I I L I I 489 无
MPV211287 W I I 489 无
MPV211288 W I I I 489 无
MPV211289 W I I I I 489 无
MPV211290 F I I 489 无
MPV211291 F I I I 489 无
MPV211292 F I I I I 489 无
第0天
6-8周
0 50 100 150 200
三聚体峰高度
相对于
MPV210751 (%)
58°C - 30 分钟
63°C - 30 分钟
0 50 100
三聚体
相对于 4°C (%)

图4续

A

位置	473	475	476	477	478	479	484	折叠子	F1 C-末端
MPV210751	L	D	Q	S	N	R		有	481
MPV211241	L	D	Q	S	N	R	A	无	489
MPV211247				I				无	489
MPV211287	W			I			I	无	489
MPV211917	W		K	F			I	无	489
MPV211918	W	R	K	F	D	E	I	无	489
MPV211919	W		K	F				无	481



B

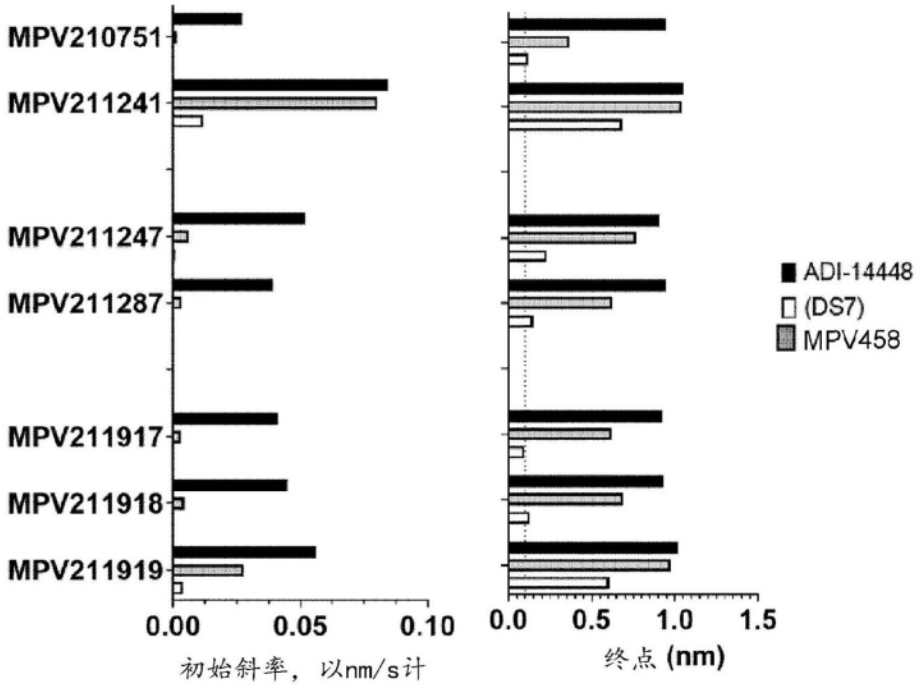


图5

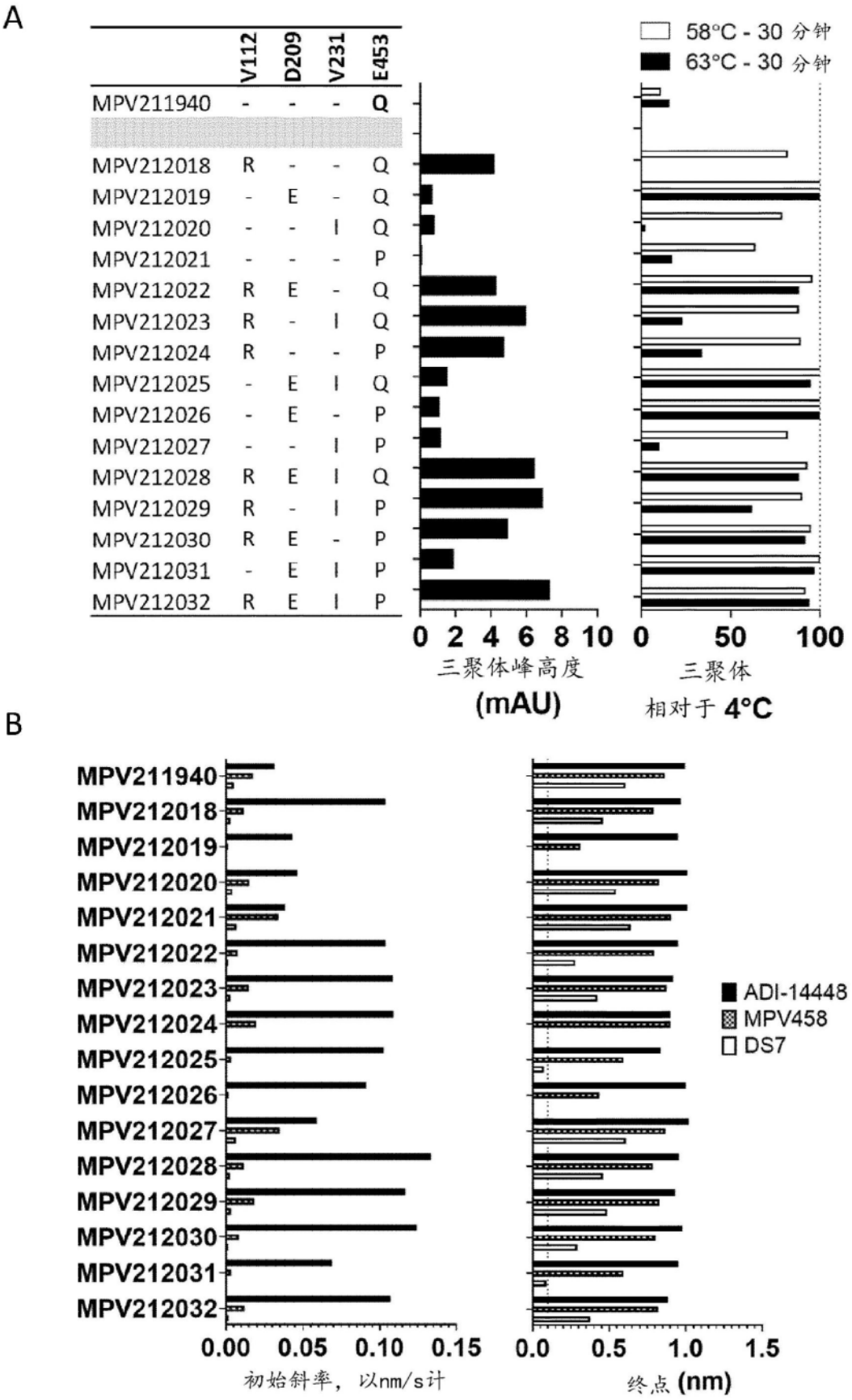

A
V112
D209
V231
E453
MPV211940 - - - Q
MPV212018 R - - Q
MPV212019 - E - Q
MPV212020 - - I Q
MPV212021 - - - P
MPV212022 R E - Q
MPV212023 R - I Q
MPV212024 R - - P
MPV212025 - E I Q
MPV212026 - E - P
MPV212027 - - I P
MPV212028 R E I Q
MPV212029 R - I P
MPV212030 R E - P
MPV212031 - E I P
MPV212032 R E I P
58°C - 30 分钟
63°C - 30 分钟
0 2 4 6 8 10
三聚体峰高度
(mAU)
0 50 100
三聚体
相对于 4°C
B
MPV211940
MPV212018
MPV212019
MPV212020
MPV212021
MPV212022
MPV212023
MPV212024
MPV212025
MPV212026
MPV212027
MPV212028
MPV212029
MPV212030
MPV212031
MPV212032
ADI-14448
MPV458
DS7
0.00 0.05 0.10 0.15
初始斜率，以nm/s计
0.0 0.5 1.0 1.5
终点 (nm)

图6

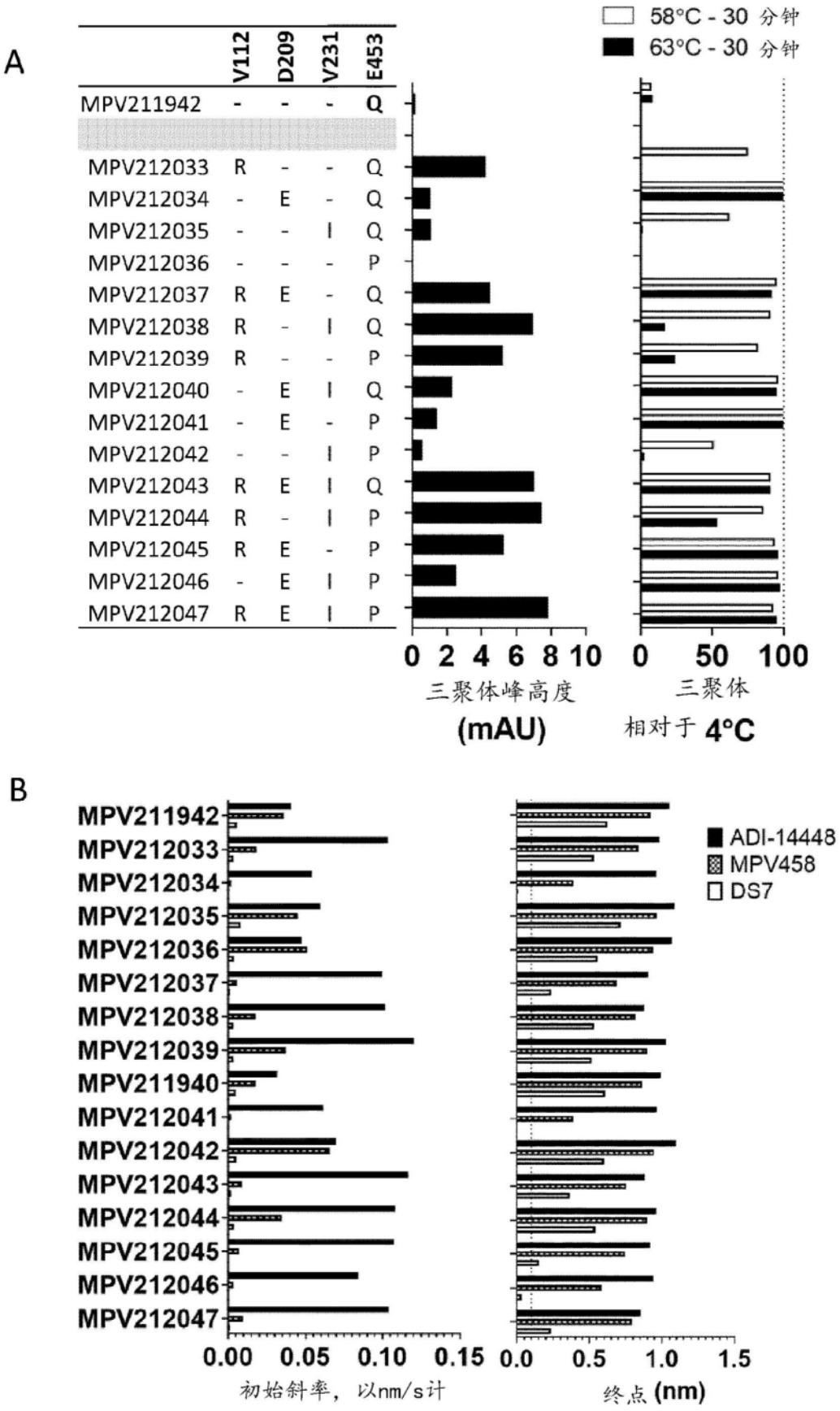

A
V112
D209
V231
E453
MPV211942 - - - Q
MPV212033 R - - Q
MPV212034 - E - Q
MPV212035 - - I Q
MPV212036 - - - P
MPV212037 R E - Q
MPV212038 R - I Q
MPV212039 R - - P
MPV212040 - E I Q
MPV212041 - E - P
MPV212042 - - I P
MPV212043 R E I Q
MPV212044 R - I P
MPV212045 R E - P
MPV212046 - E I P
MPV212047 R E I P
58°C - 30 分钟
63°C - 30 分钟
0 2 4 6 8 10
三聚体峰高度
(mAU)
0 50 100
三聚体
相对于 4°C
B
MPV211942
MPV212033
MPV212034
MPV212035
MPV212036
MPV212037
MPV212038
MPV212039
MPV211940
MPV212041
MPV212042
MPV212043
MPV212044
MPV212045
MPV212046
MPV212047
ADI-14448
MPV458
DS7
0.00 0.05 0.10 0.15
初始斜率，以nm/s计
0.0 0.5 1.0 1.5
终点 (nm)

图7

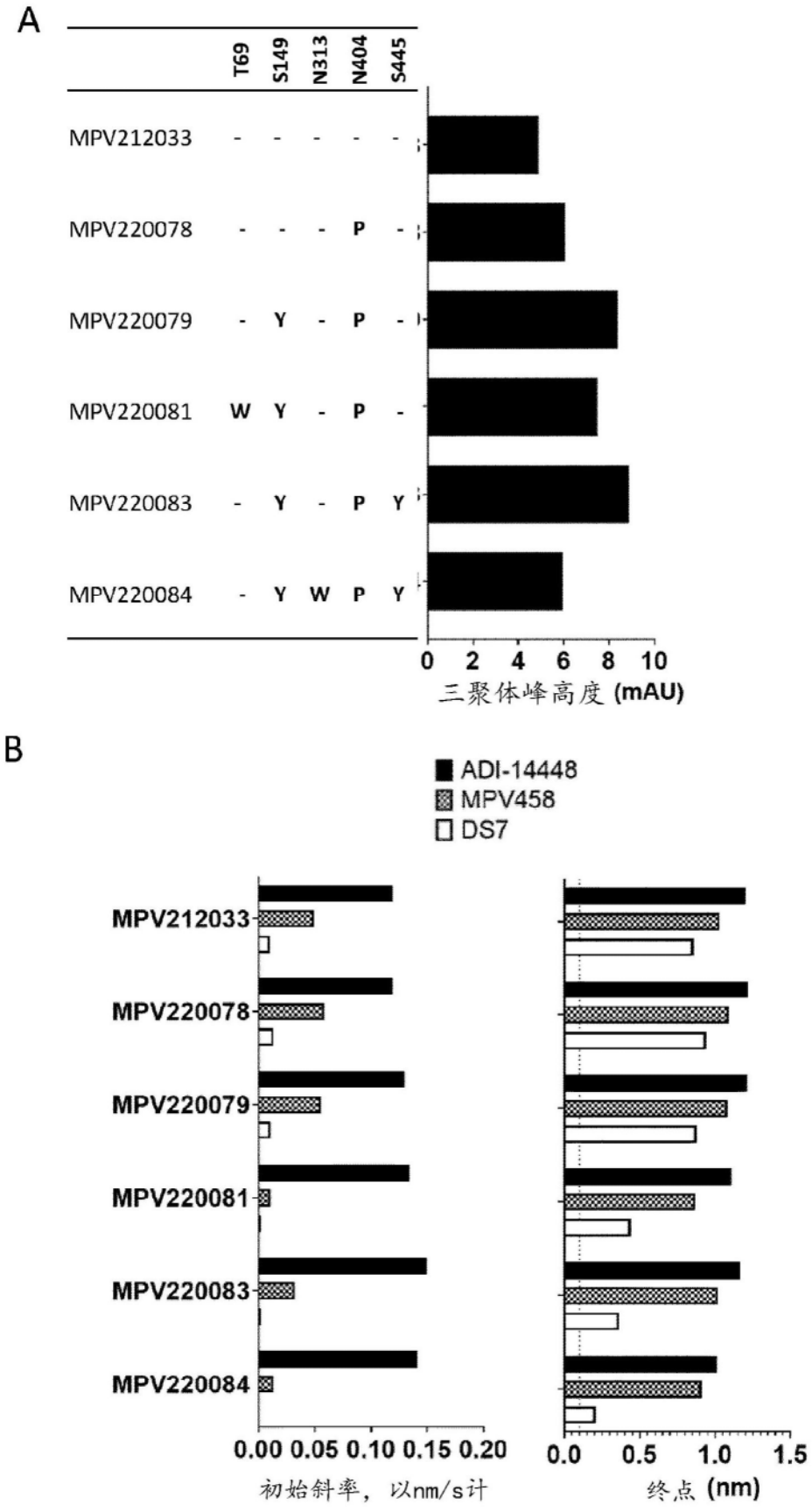

A
T69
S149
N313
N404
S445
MPV212033 - - - - -
MPV220078 - - - P -
MPV220079 - Y - P -
MPV220081 W Y - P -
MPV220083 - Y - P Y
MPV220084 - Y W P Y
0 2 4 6 8 10
三聚体峰高度 (mAU)
B
ADI-14448
MPV458
DS7
MPV212033
MPV220078
MPV220079
MPV220081
MPV220083
MPV220084
0.00 0.05 0.10 0.15 0.20
初始斜率，以nm/s计
0.0 0.5 1.0 1.5
终点 (nm)

图8

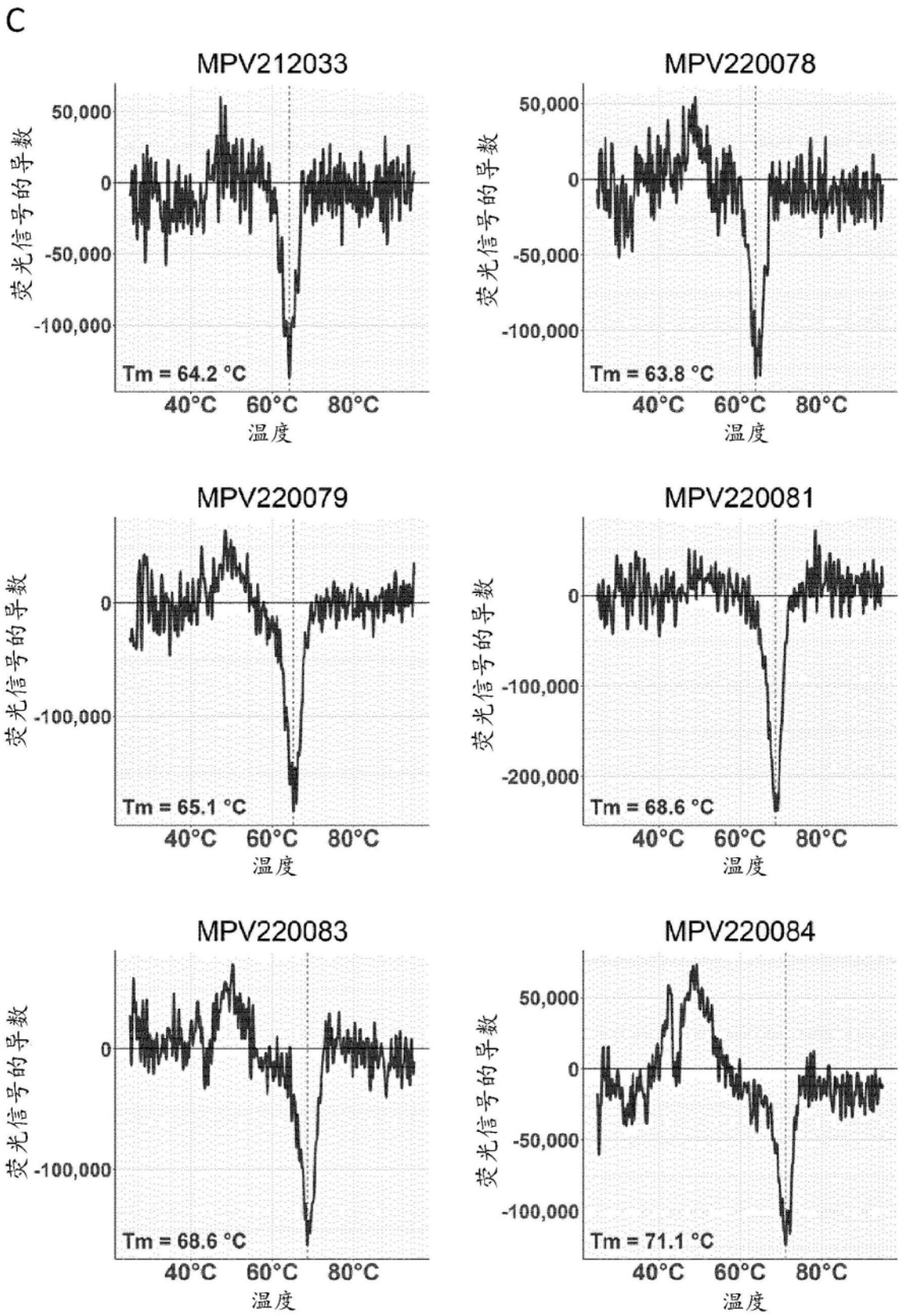
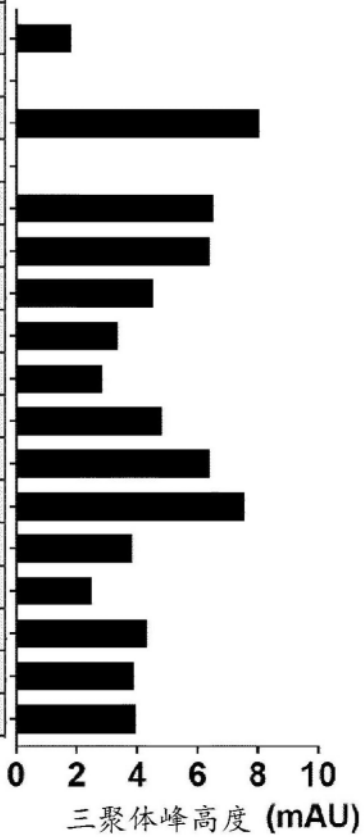

C
MPV212033
MPV220078
MPV220079
MPV220081
MPV220083
MPV220084
荧光信号的导数
温度
Tm = 64.2 °C
Tm = 63.8 °C
Tm = 65.1 °C
Tm = 68.6 °C
Tm = 68.6 °C
Tm = 71.1 °C
40°C
60°C
80°C
50,000
0
-50,000
-100,000
-200,000

图8续

A

	473	474	477	484	485	F1 C-C-末端	折叠子
	L	V	S	A	N		
MPV210751						481	有
MPV212047			*			489	无
MPV212032	W		I	I		489	无
MPV220115			I			489	无
MPV220116			I	I		489	无
MPV220117		I	I	I		489	无
MPV220118			I	I	I	489	无
MPV220119	I		I	I		489	无
MPV220120	Y		I	I		489	无
MPV220121	I	I		I		489	无
MPV220122	I	I	I	I		489	无
MPV220123	I	I	I	I	I	489	无
MPV220124			L	I		489	无
MPV220125			I	L		489	无
MPV220126			L	L		489	无

*L473W, D475R, Q476K, S477F, N478D, R479E, A484I



B

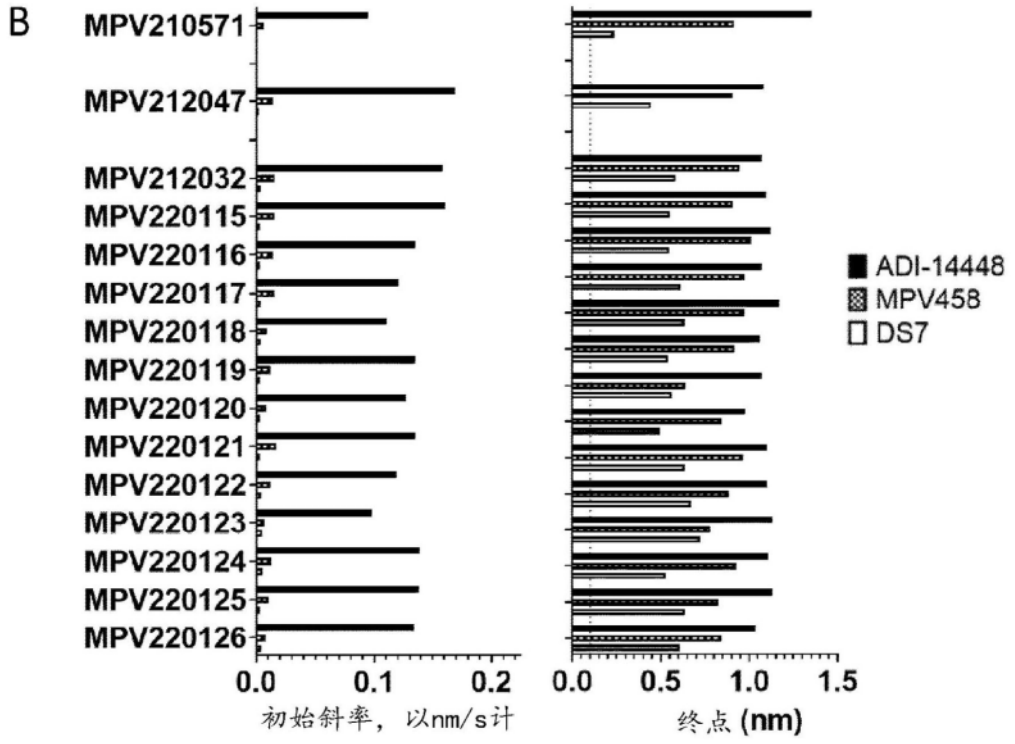


图9

C

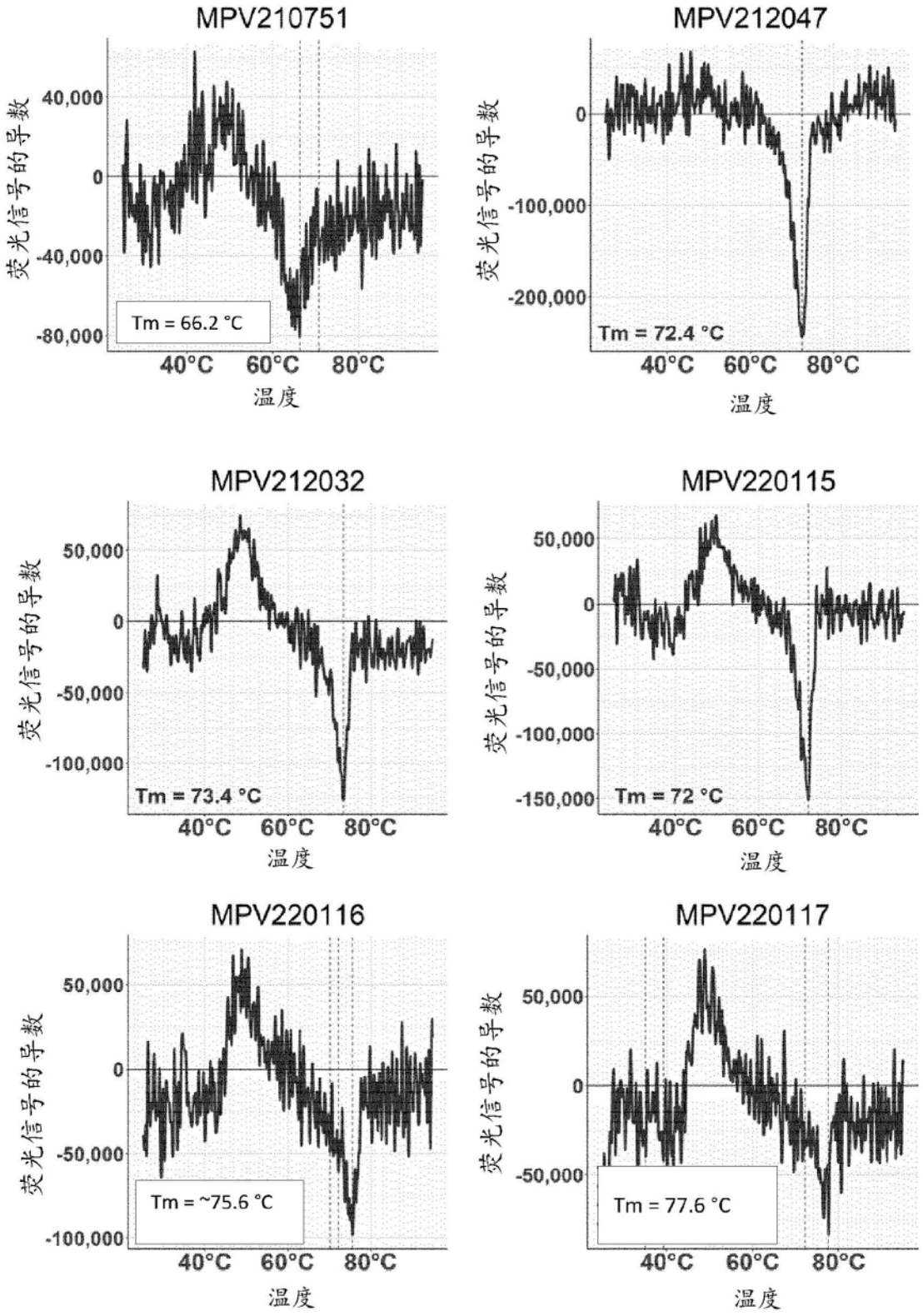

MPV210751
荧光信号的导数
40,000
0
-40,000
-80,000
Tm = 66.2 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV212047
荧光信号的导数
0
-100,000
-200,000
Tm = 72.4 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV212032
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
-100,000
Tm = 73.4 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220115
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
-100,000
-150,000
Tm = 72 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220116
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
-100,000
Tm = ~75.6 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220117
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
Tm = 77.6 °C
40°C 60°C 80°C
温度

图9续

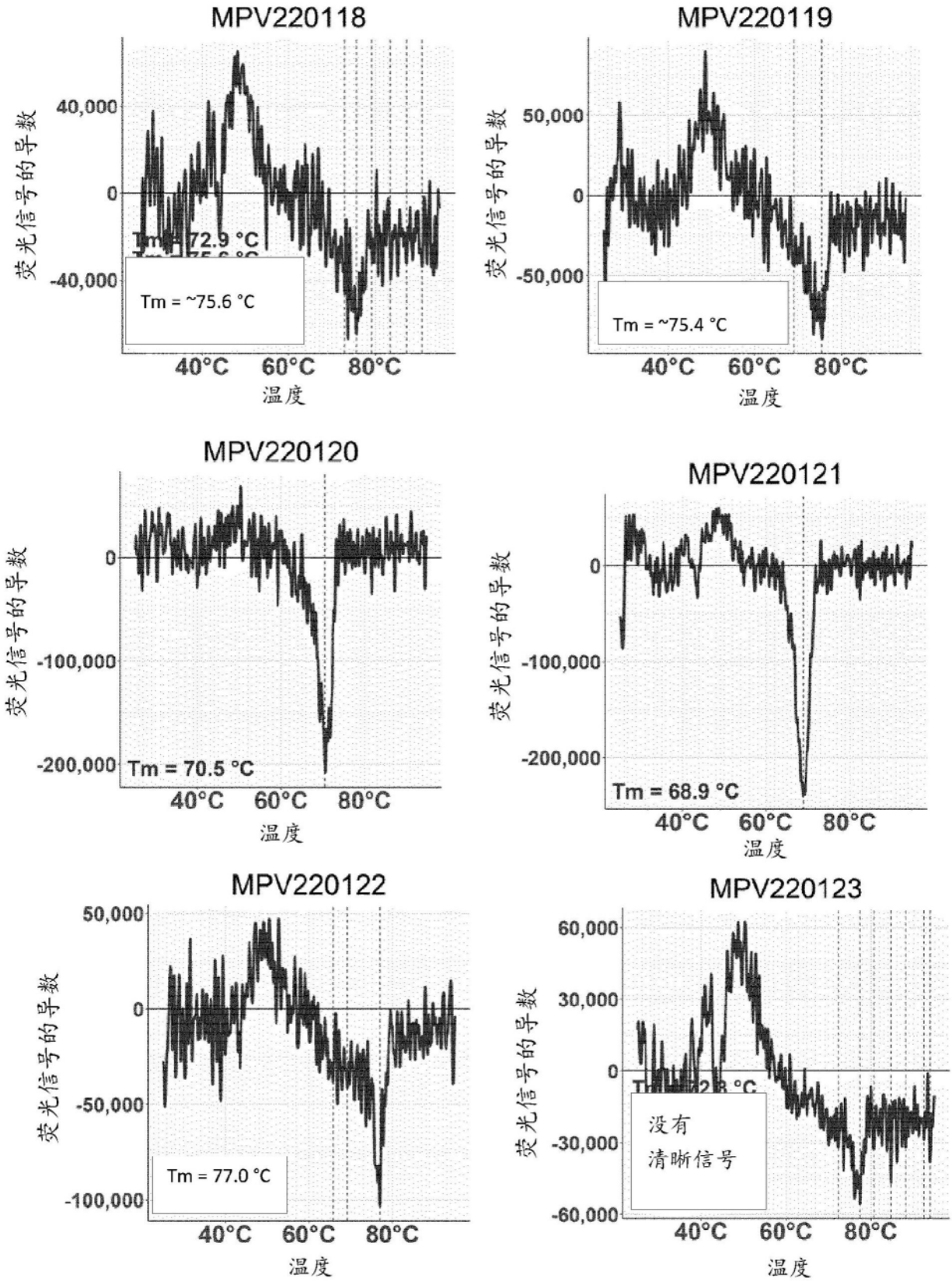

MPV220118
荧光信号的导数
40,000
0
-40,000
Tm = ~75.6 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220119
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
Tm = ~75.4 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220120
荧光信号的导数
0
-100,000
-200,000
Tm = 70.5 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220121
荧光信号的导数
0
-100,000
-200,000
Tm = 68.9 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220122
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
-100,000
Tm = 77.0 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220123
荧光信号的导数
60,000
30,000
0
-30,000
-60,000
没有
清晰信号
40°C 60°C 80°C
温度

图9续

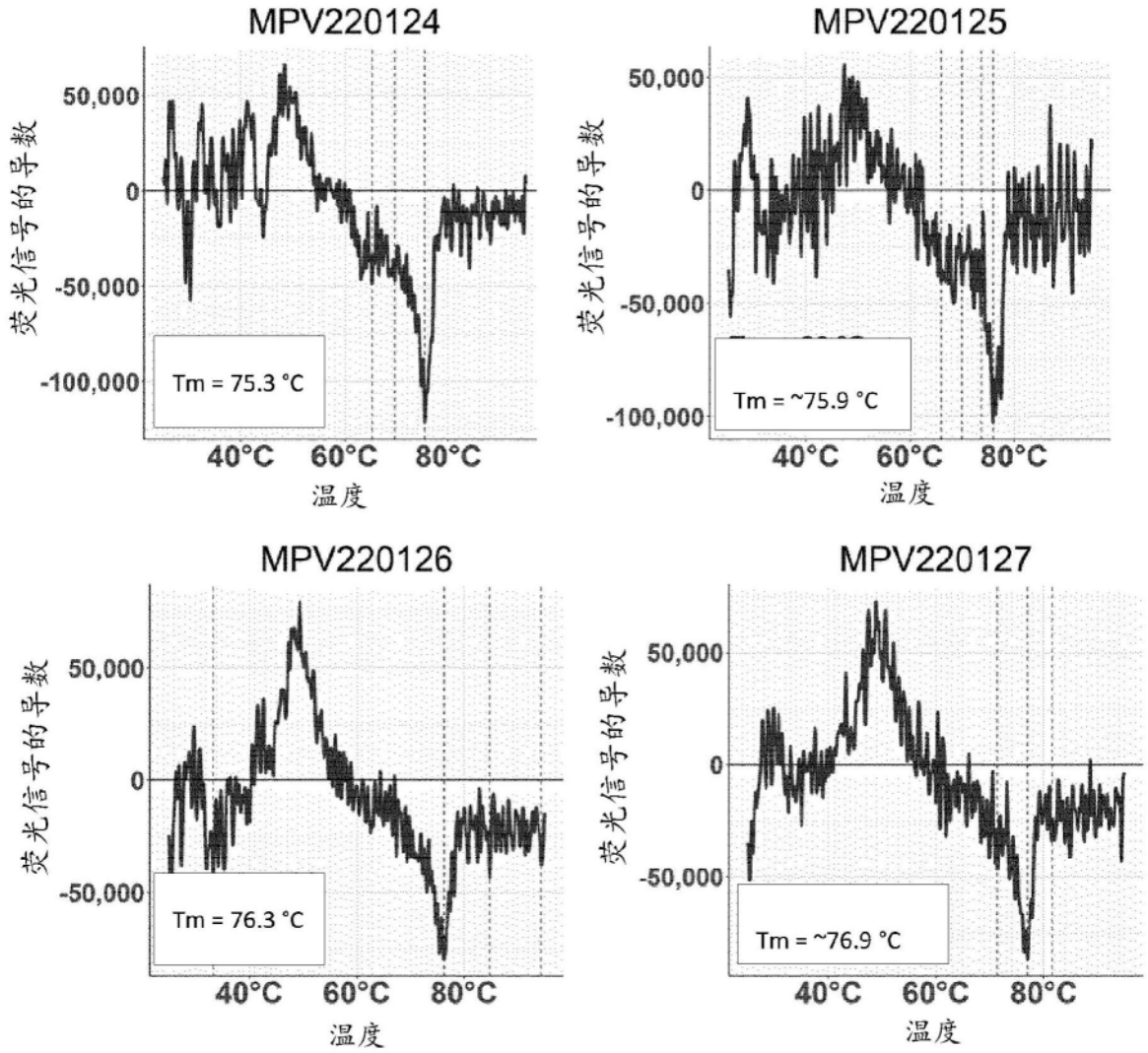
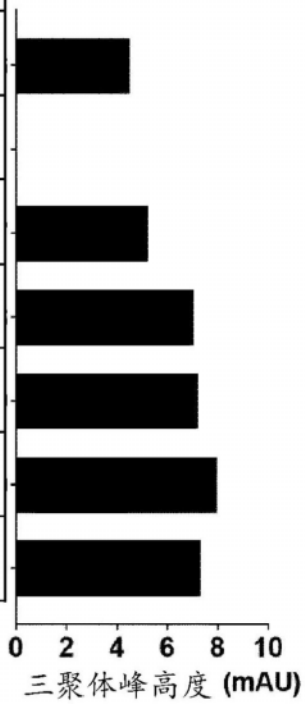

MPV220124
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
-100,000
Tm = 75.3 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV220125
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
-100,000
Tm = ~75.9 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV220126
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
Tm = 76.3 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV220127
荧光信号的导数
50,000
0
-50,000
Tm = ~76.9 °C
40°C
60°C
80°C
温度

图9续

A

	69	112	149	209	231	313	404	445	453
	T	V	S	D	V	N	N	S	E
MPV220116		R		E	I				P
MPV220127		R		E	I		P		P
MPV220128		R	Y	E	I		P		P
MPV220129	W	R	Y	E	I		P		P
MPV220130		R	Y	E	I		P	Y	P
MPV220131		R	Y	E	I	W	P	Y	P



B

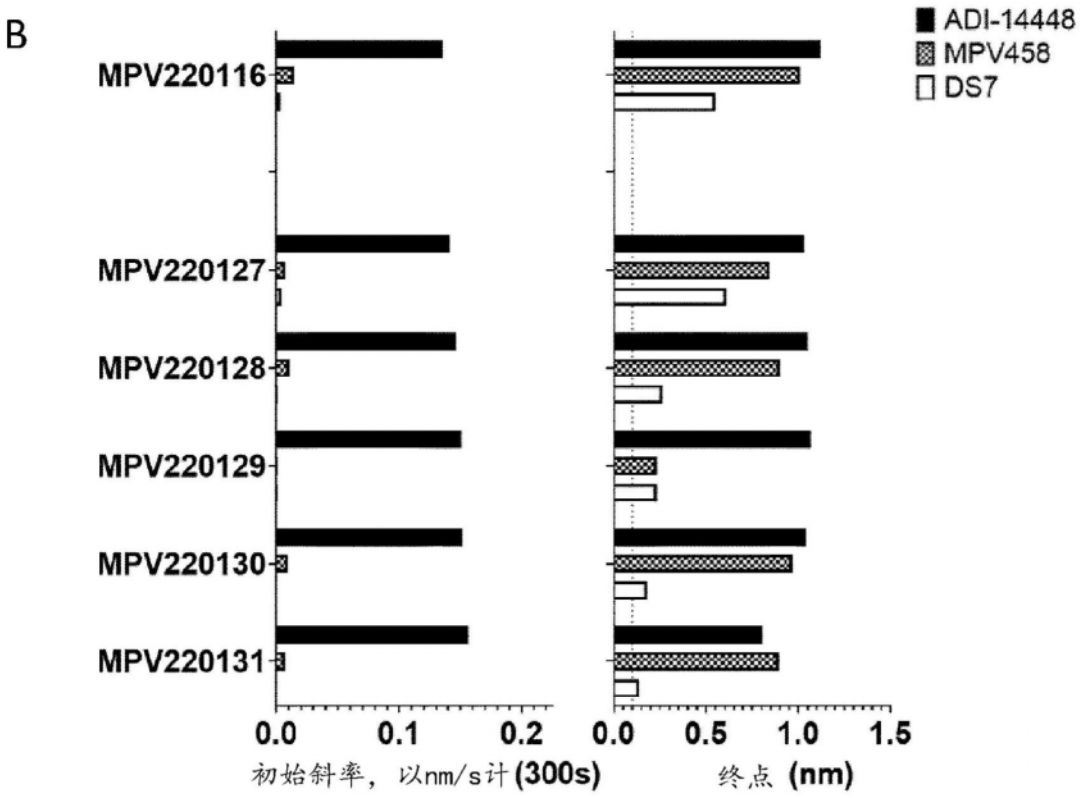


图10

C

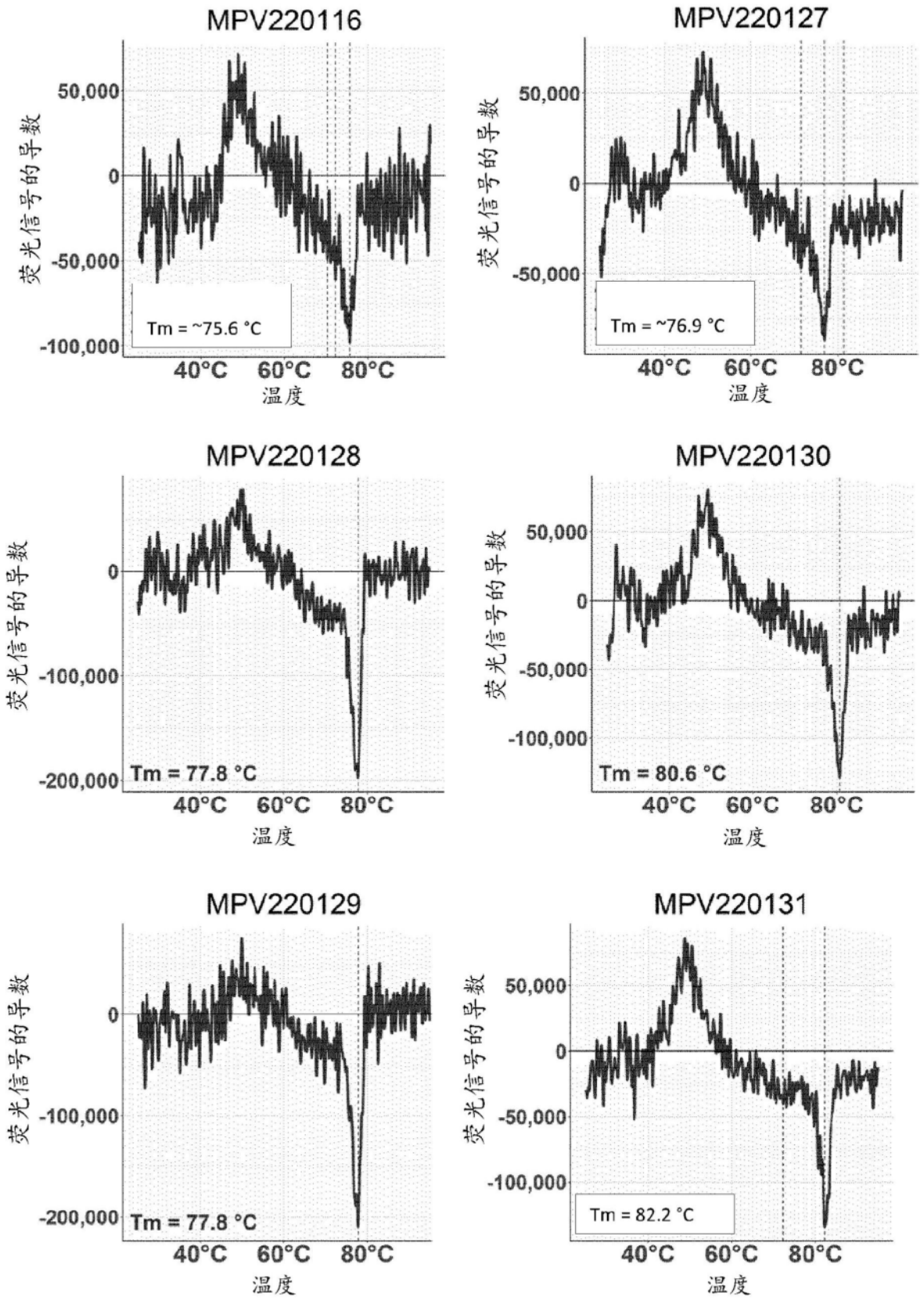

MPV220116
MPV220127
MPV220128
MPV220130
MPV220129
MPV220131
荧光信号的导数
温度
40°C
60°C
80°C
50,000
0
-50,000
-100,000
-200,000
Tm = ~75.6 °C
Tm = ~76.9 °C
Tm = 77.8 °C
Tm = 80.6 °C
Tm = 77.8 °C
Tm = 82.2 °C

图10续

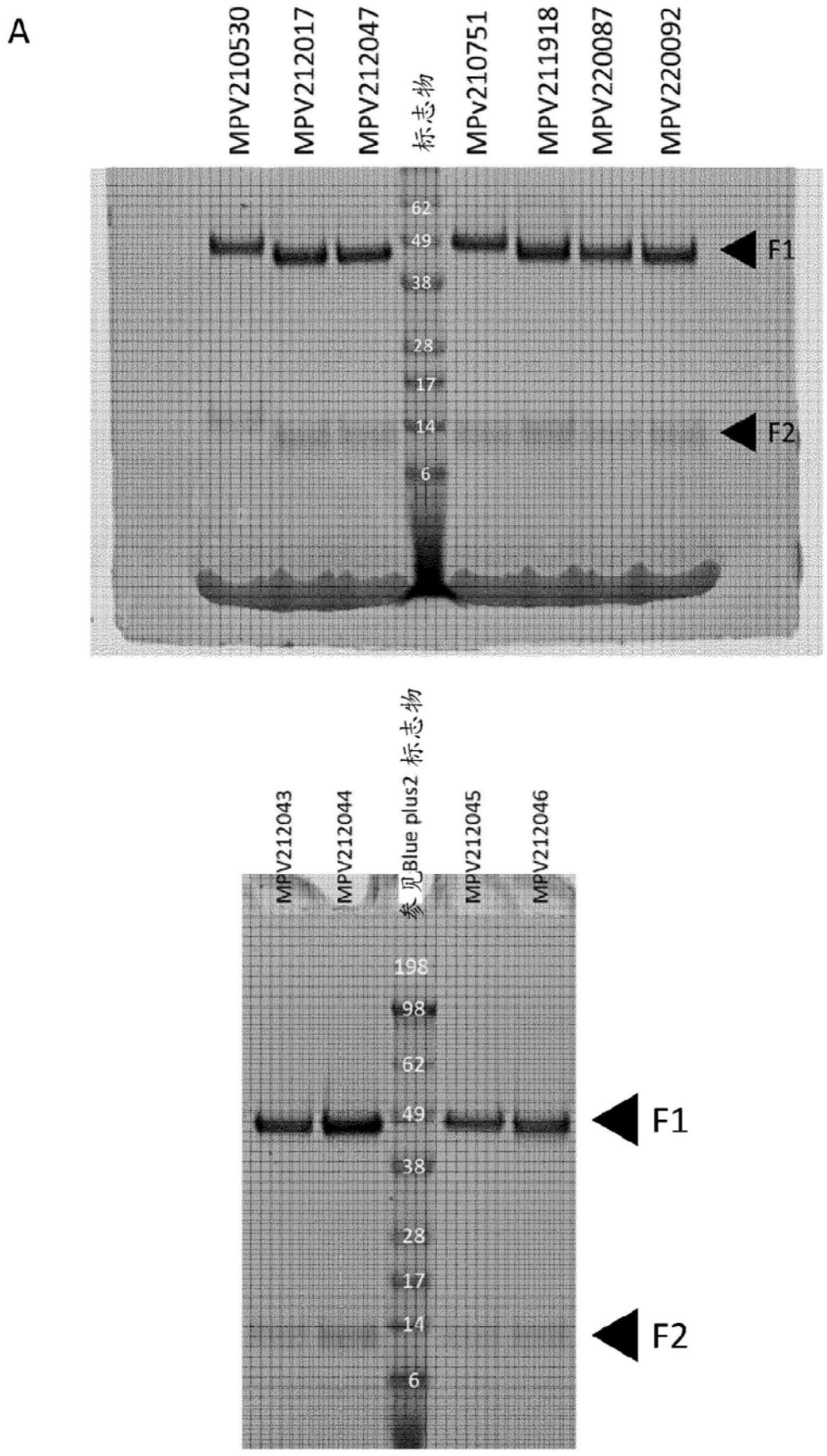

A
MPV210530
MPV212017
MPV212047
标志物
MPV210751
MPV211918
MPV220087
MPV220092
62
49
38
28
17
14
6
F1
F2
MPV212043
MPV212044
参见Blue plus2 标志物
MPV212045
MPV212046
198
98
62
49
38
28
17
14
6
F1
F2

图11

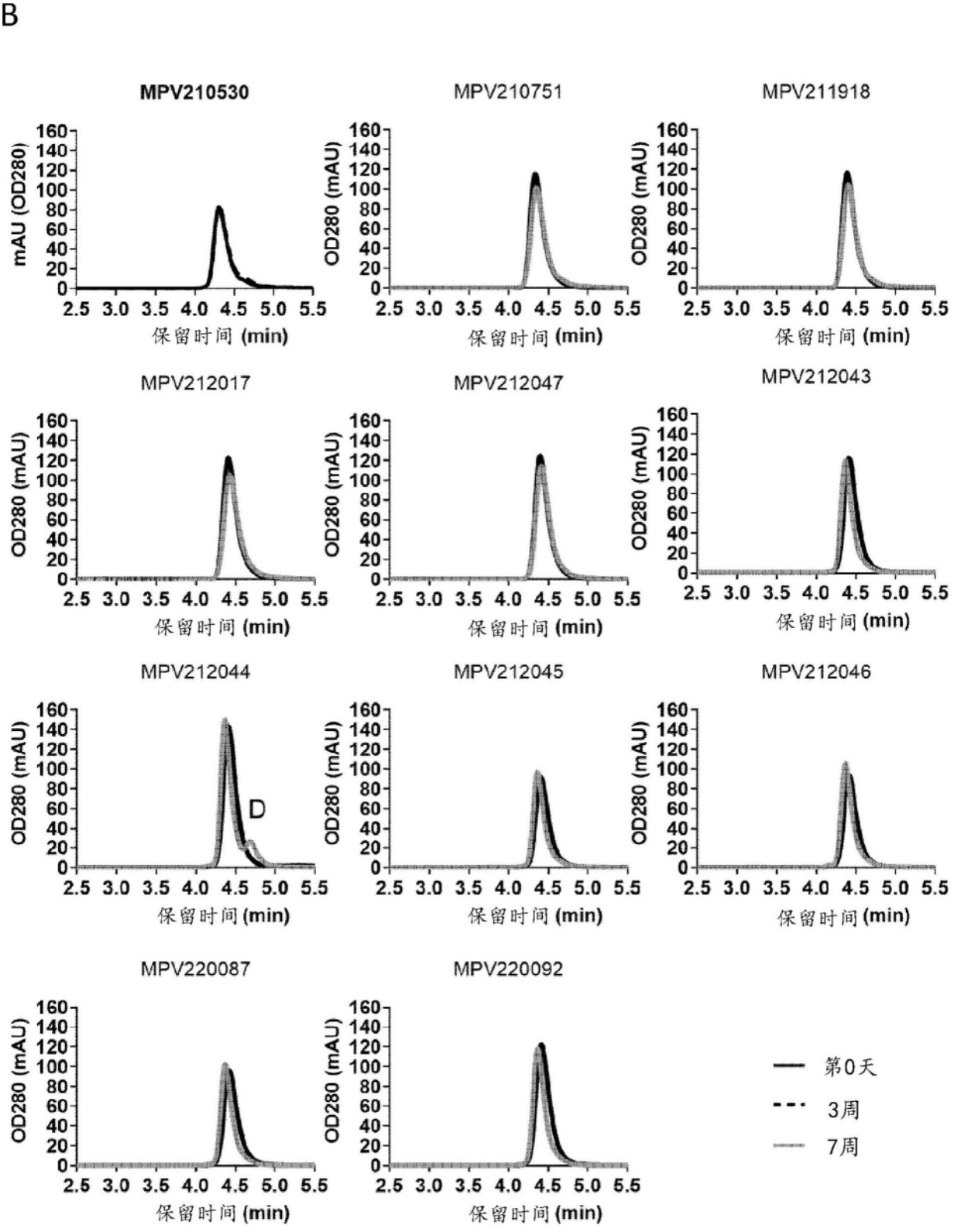

B
MPV210530
MPV210751
MPV211918
MPV212017
MPV212047
MPV212043
MPV212044
MPV212045
MPV212046
MPV220087
MPV220092
mAU (OD280)
OD280 (mAU)
保留时间 (min)
D
第0天
3周
7周

图11续

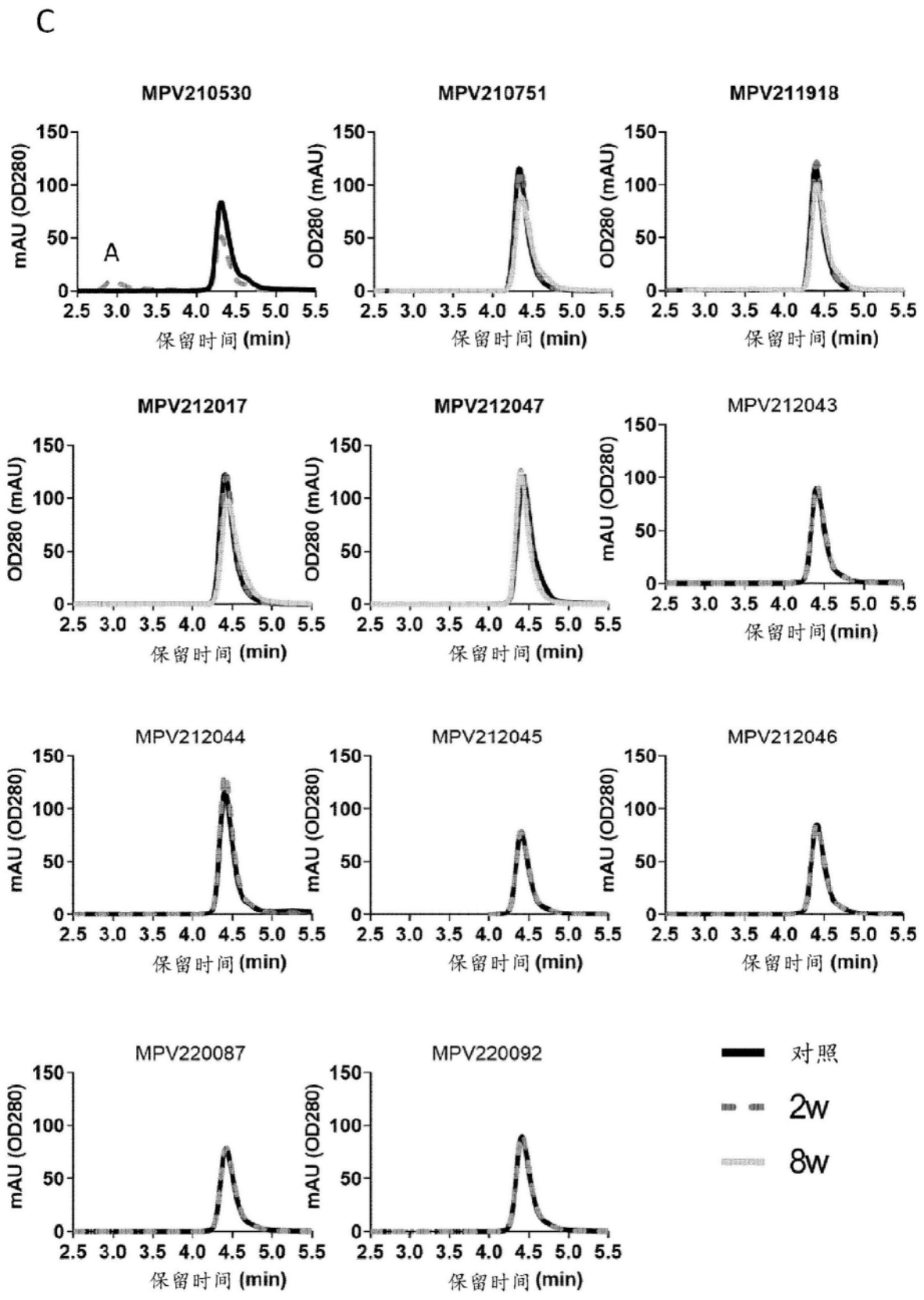

C
MPV210530
MPV210751
MPV211918
MPV212017
MPV212047
MPV212043
MPV212044
MPV212045
MPV212046
MPV220087
MPV220092
A
mAU (OD280)
OD280 (mAU)
保留时间 (min)
对照
2w
8w

图11续

D

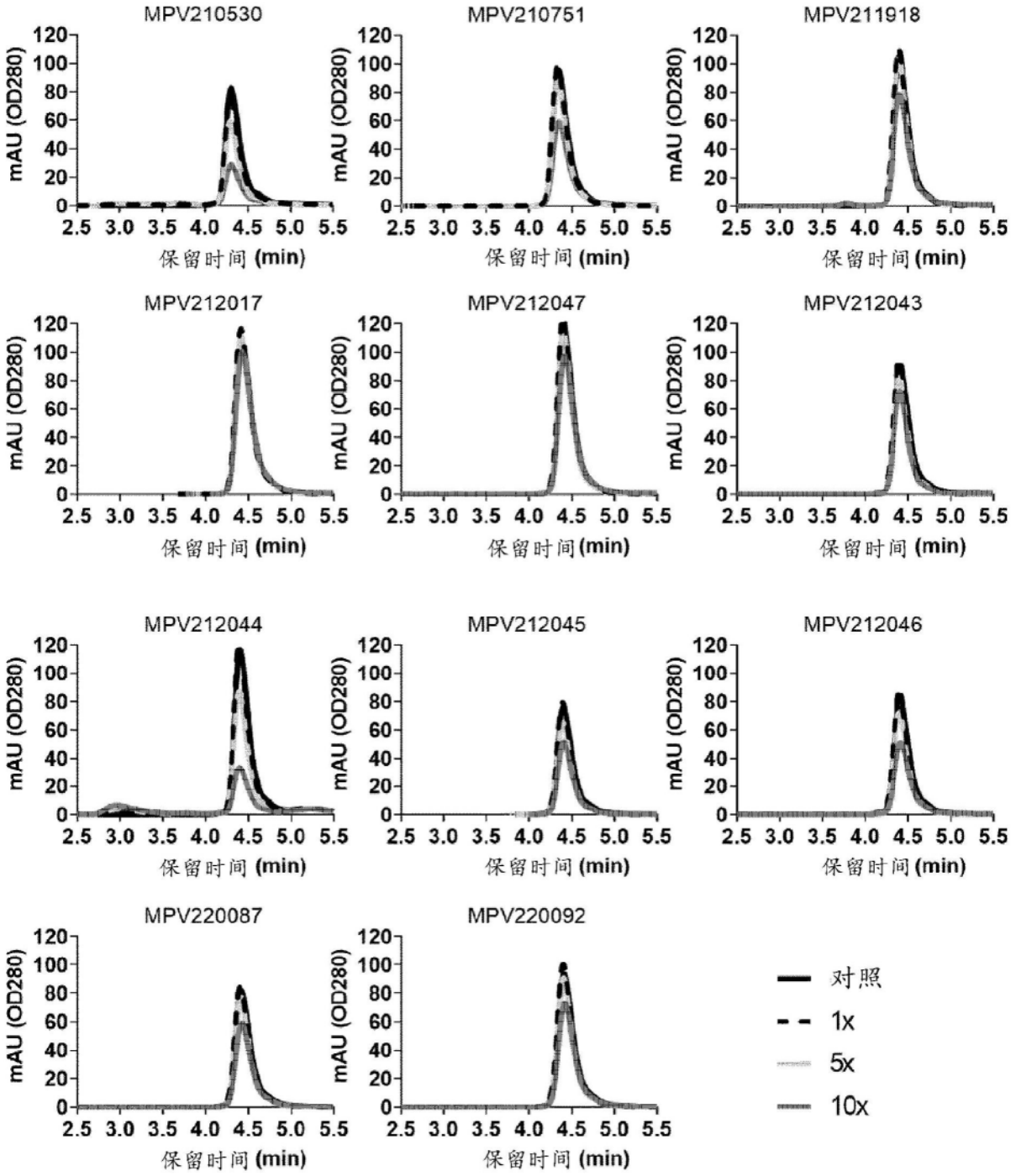

MPV210530
MPV210751
MPV211918
MPV212017
MPV212047
MPV212043
MPV212044
MPV212045
MPV212046
MPV220087
MPV220092
mAU (OD280)
保留时间 (min)
对照
1x
5x
10x

图11续

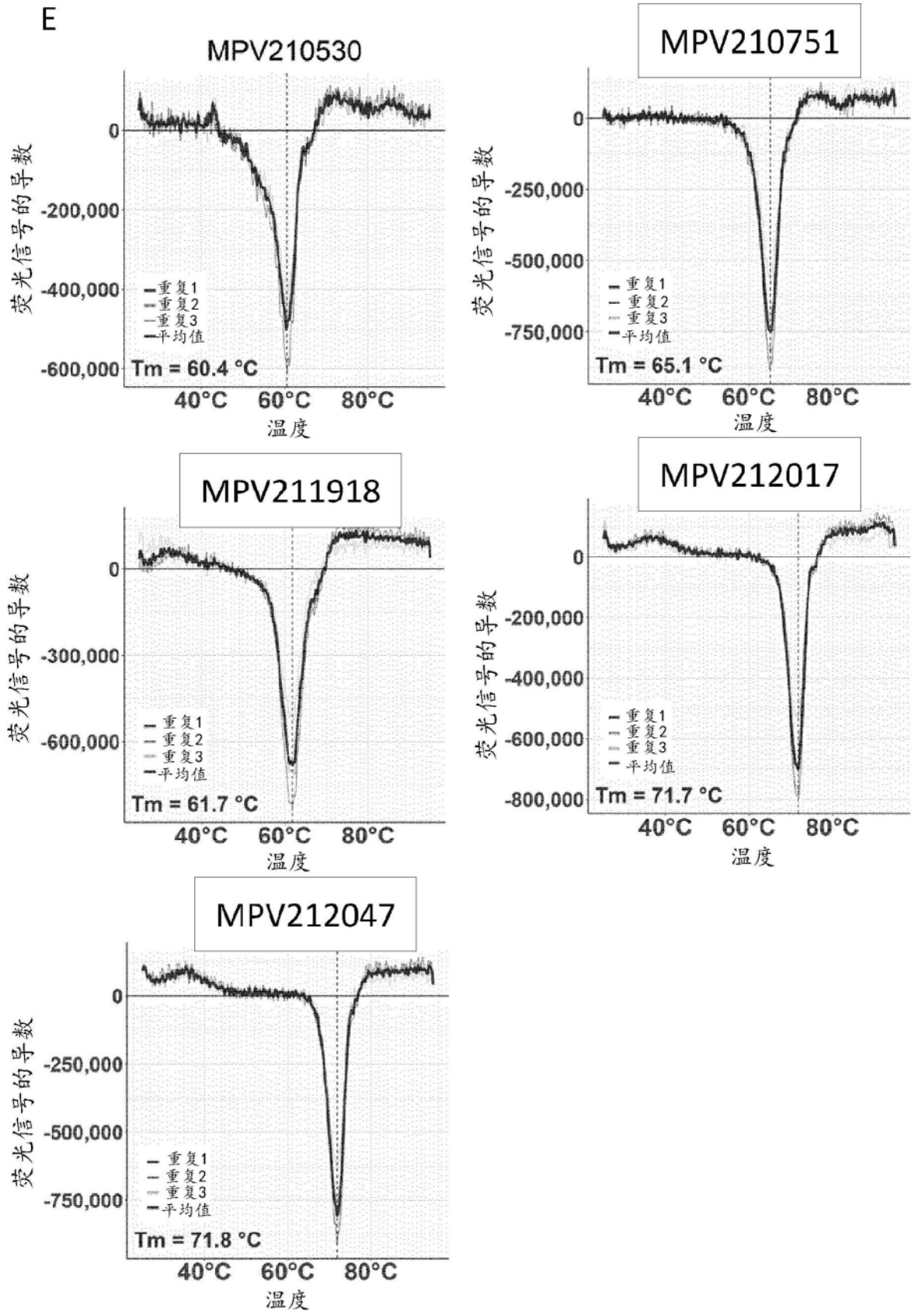

E
MPV210530
荧光信号的导数
0
-200,000
-400,000
-600,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 60.4 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV210751
荧光信号的导数
0
-250,000
-500,000
-750,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 65.1 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV211918
荧光信号的导数
0
-300,000
-600,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 61.7 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV212017
荧光信号的导数
0
-200,000
-400,000
-600,000
-800,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 71.7 °C
40°C
60°C
80°C
温度
MPV212047
荧光信号的导数
0
-250,000
-500,000
-750,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 71.8 °C
40°C
60°C
80°C
温度

图11续

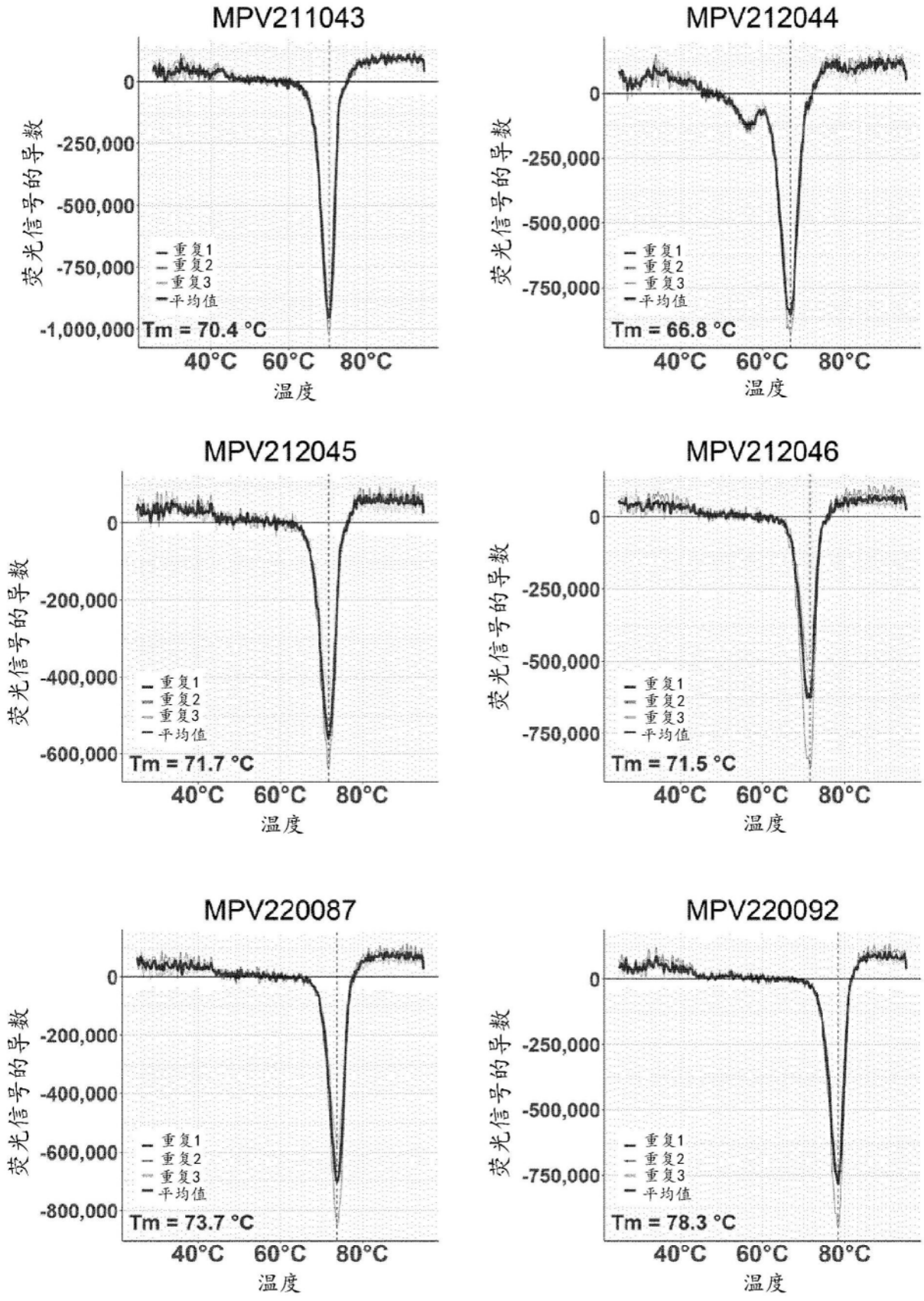

MPV211043
荧光信号的导数
0
-250,000
-500,000
-750,000
-1,000,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 70.4 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV212044
荧光信号的导数
0
-250,000
-500,000
-750,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 66.8 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV212045
荧光信号的导数
0
-200,000
-400,000
-600,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 71.7 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV212046
荧光信号的导数
0
-250,000
-500,000
-750,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 71.5 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220087
荧光信号的导数
0
-200,000
-400,000
-600,000
-800,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 73.7 °C
40°C 60°C 80°C
温度
MPV220092
荧光信号的导数
0
-250,000
-500,000
-750,000
重复1
重复2
重复3
平均值
Tm = 78.3 °C
40°C 60°C 80°C
温度

图11续

F

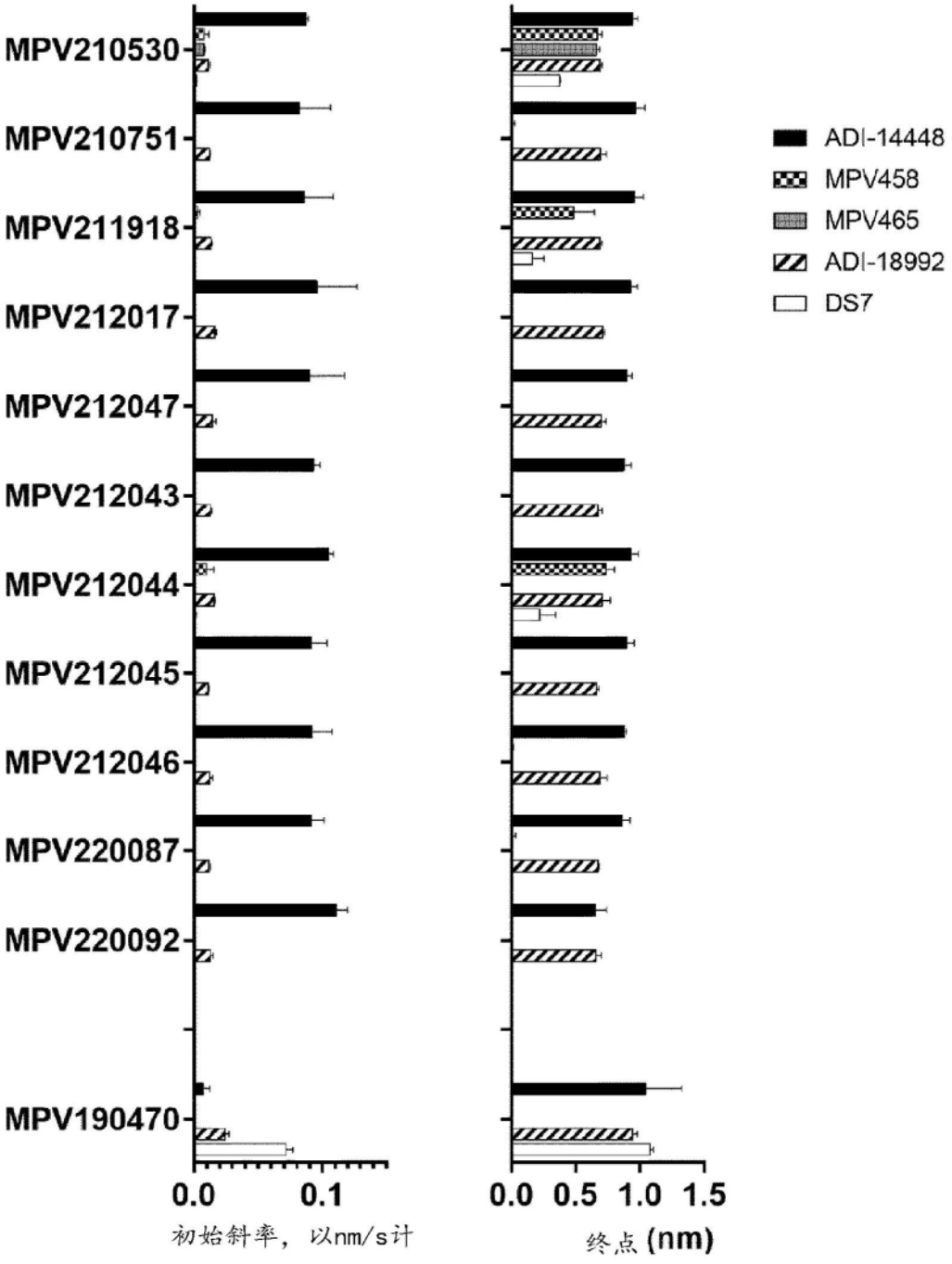

MPV210530
MPV210751
MPV211918
MPV212017
MPV212047
MPV212043
MPV212044
MPV212045
MPV212046
MPV220087
MPV220092
MPV190470
ADI-14448
MPV458
MPV465
ADI-18992
DS7
0.0
0.1
初始斜率，以nm/s计
0.0
0.5
1.0
1.5
终点(nm)

图11续

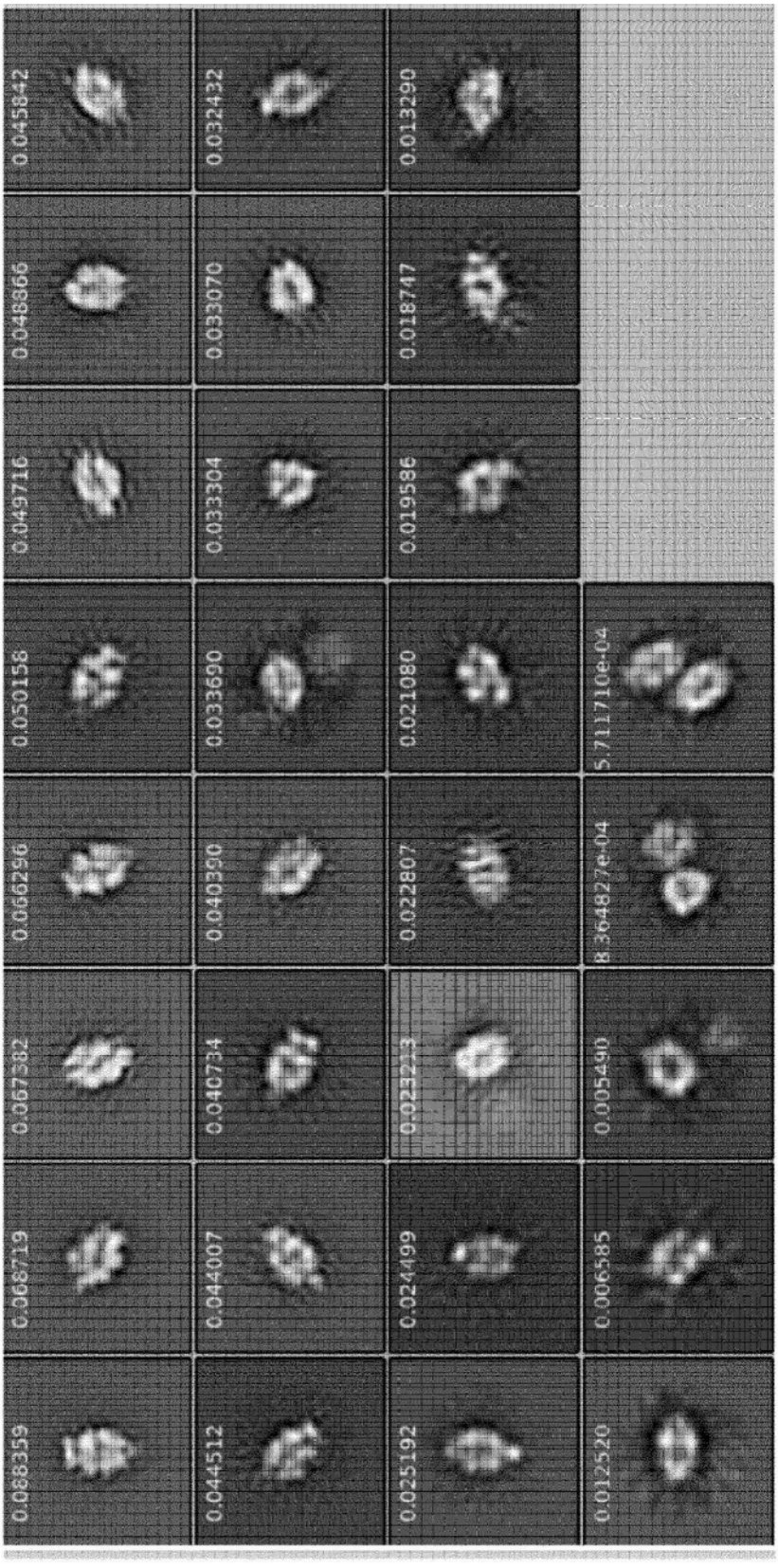

G
0.045842
0.032432
0.013290
0.048866
0.033070
0.018747
0.049716
0.033304
0.019598
0.050158
0.033690
0.021080
5.711710e-04
0.066256
0.040390
0.022807
8.364827e-04
0.067382
0.040734
-0.023213
0.005490
0.068719
0.044007
0.024499
0.006585
0.068359
0.044512
0.025192
0.012520

图11续

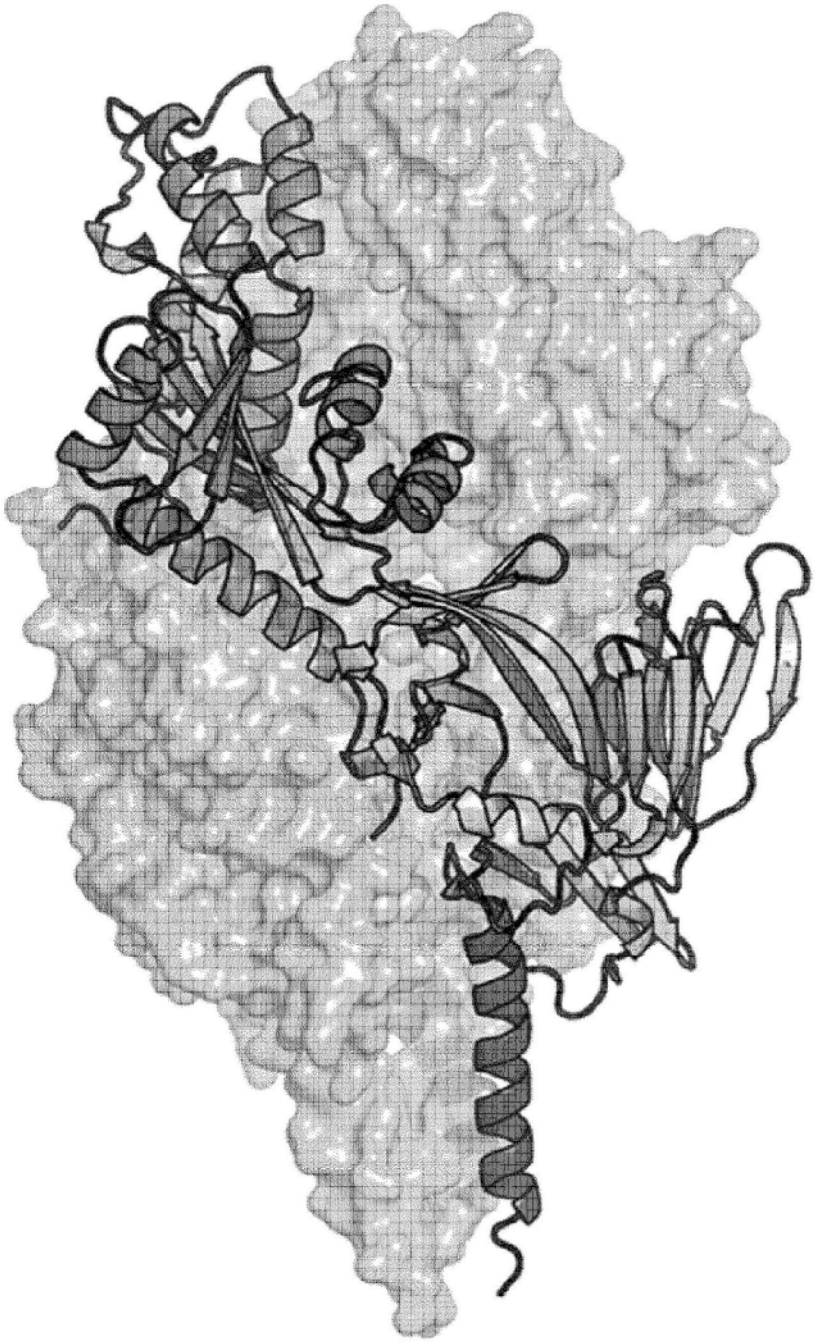


图12

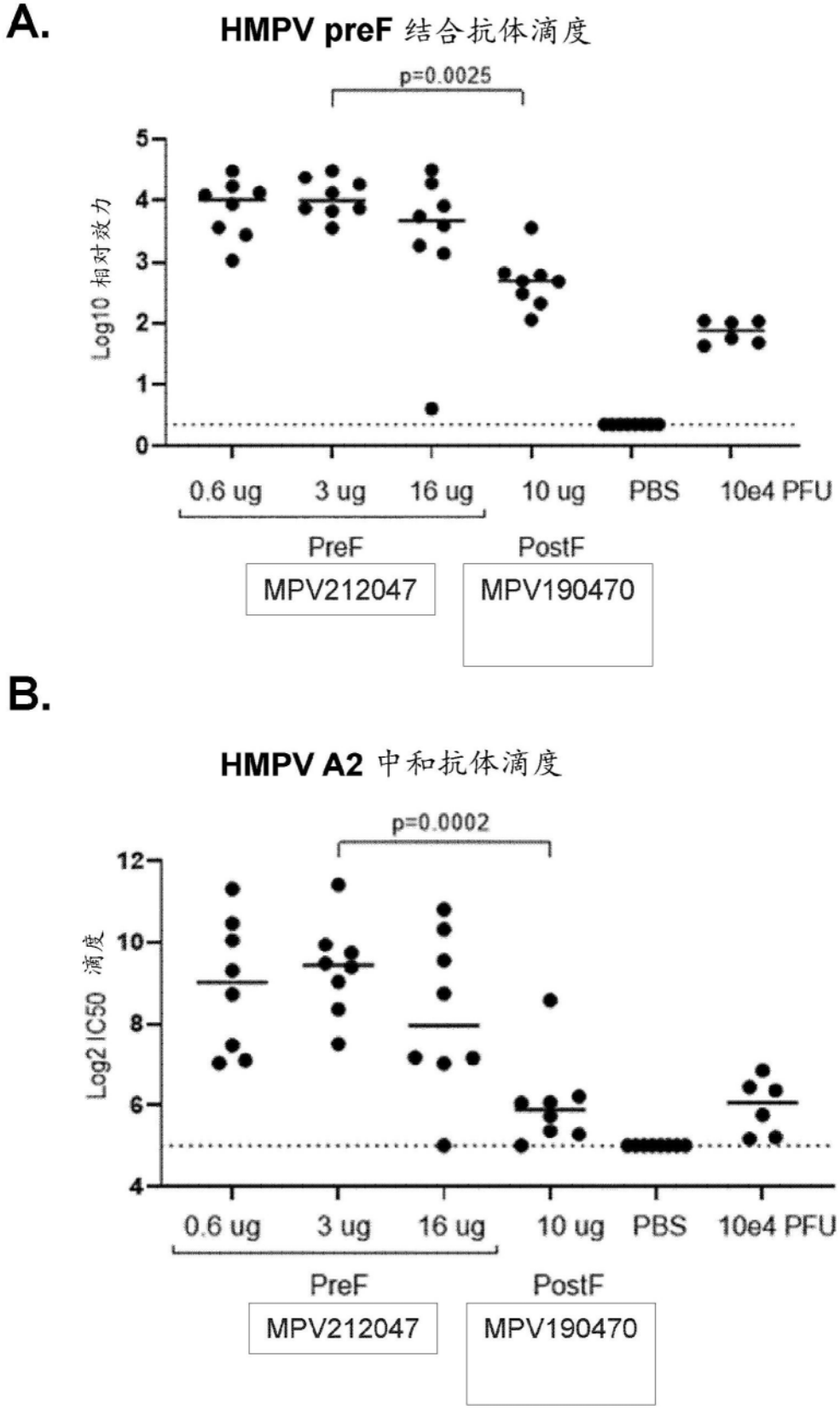

A.
HMPV preF 结合抗体滴度
p=0.0025
Log10 相对效力
0
1
2
3
4
5
0.6 ug
3 ug
16 ug
10 ug
PBS
10e4 PFU
PreF
PostF
MPV212047
MPV190470
B.
HMPV A2 中和抗体滴度
p=0.0002
Log2 IC50 滴度
4
6
8
10
12
0.6 ug
3 ug
16 ug
10 ug
PBS
10e4 PFU
PreF
PostF
MPV212047
MPV190470

图13

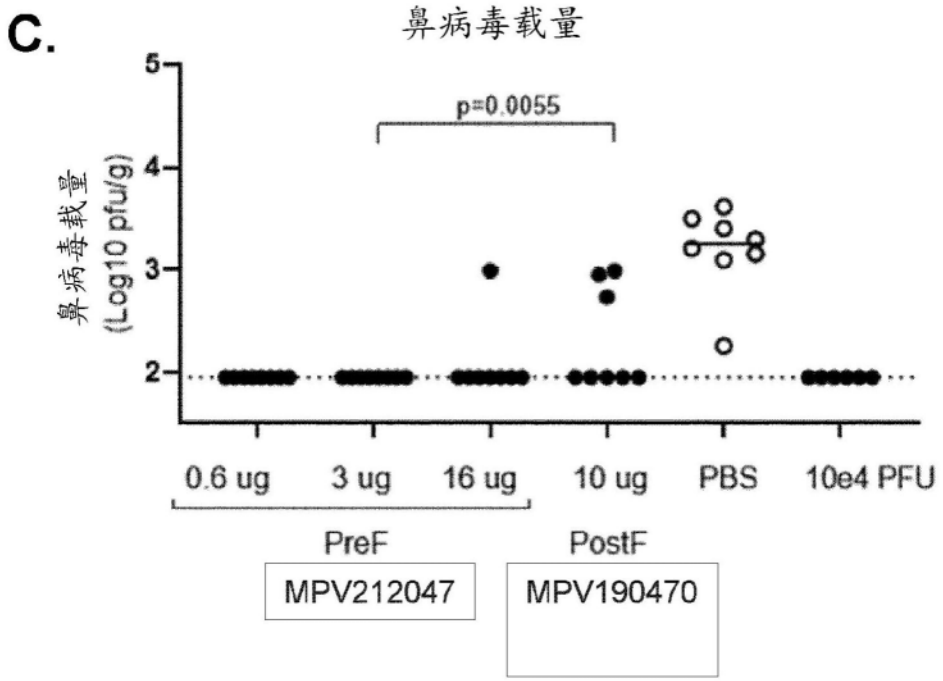

C.
鼻病毒载量
鼻病毒载量 (Log10 pfu/g)
p=0.0055
5
4
3
2
0.6 ug
3 ug
16 ug
10 ug
PBS
10e4 PFU
PreF
PostF
MPV212047
MPV190470

图13续

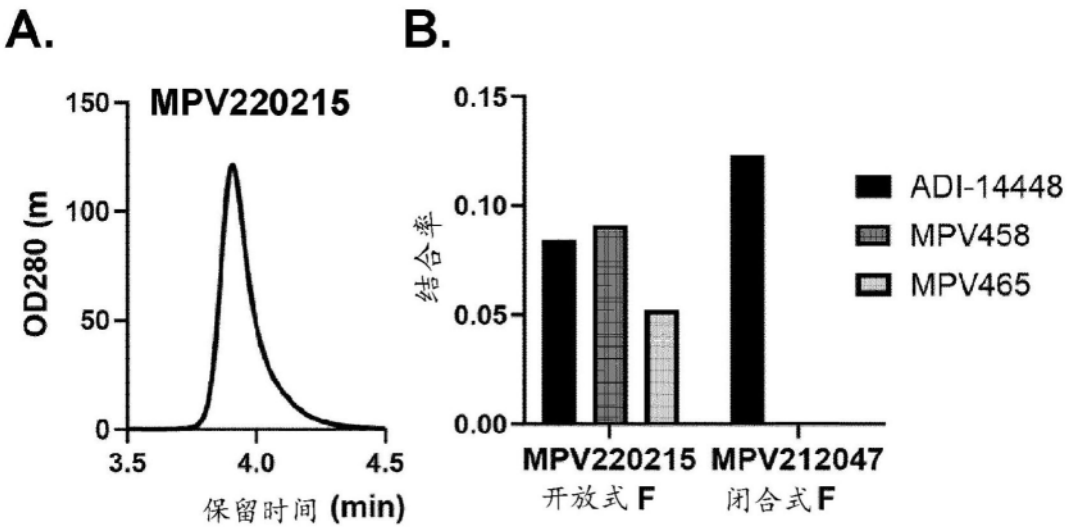

A.
MPV220215
150
100
50
0
OD280 (m
3.5
4.0
4.5
保留时间 (min)
B.
0.15
0.10
0.05
0.00
结合率
ADI-14448
MPV458
MPV465
MPV220215
MPV212047
开放式 F
闭合式 F

图14

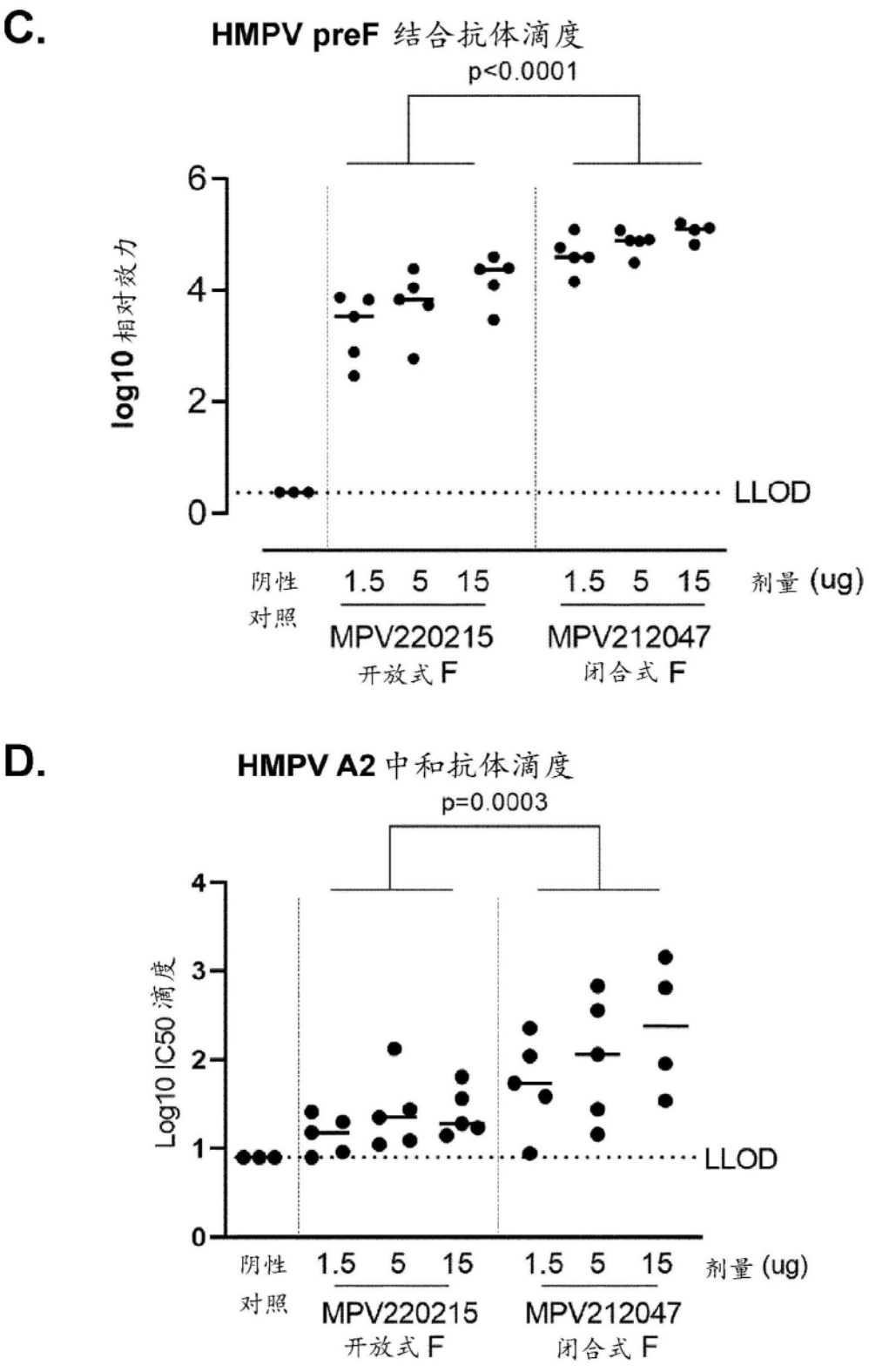

C.
HMPV preF 结合抗体滴度
p<0.0001
log10 相对效力
6
4
2
0
LLOD
阴性对照
1.5 5 15
1.5 5 15
剂量 (ug)
MPV220215
开放式 F
MPV212047
闭合式 F
D.
HMPV A2 中和抗体滴度
p=0.0003
Log10 IC50 滴度
4
3
2
1
0
LLOD
阴性对照
1.5 5 15
1.5 5 15
剂量 (ug)
MPV220215
开放式 F
MPV212047
闭合式 F

图14续

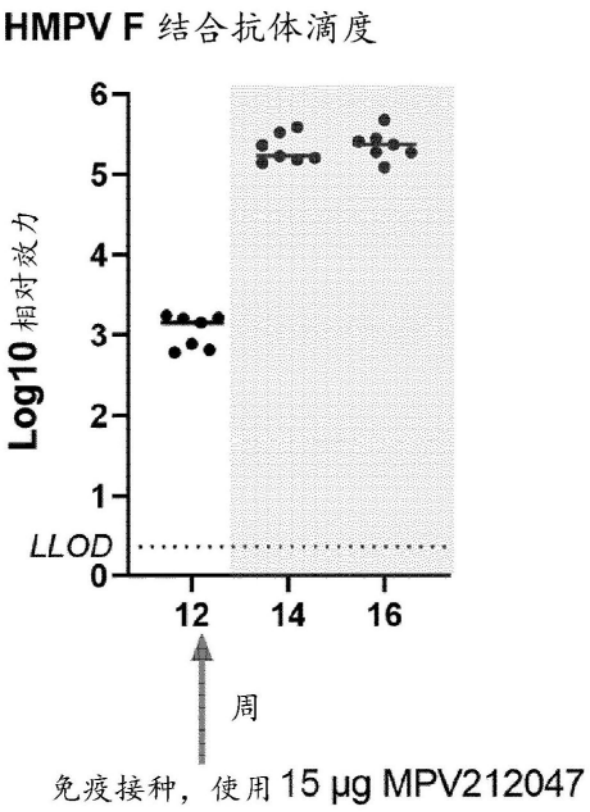
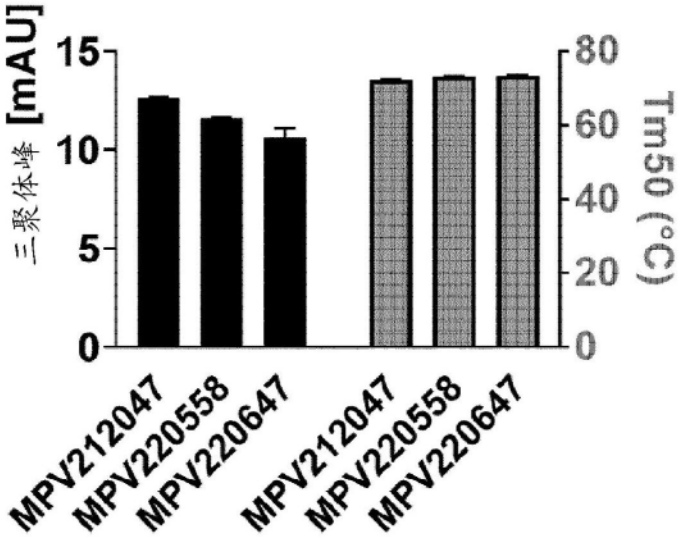

HMPV F 结合抗体滴度
Log10 相对效力
6
5
4
3
2
1
LLOD
0
12
14
16
周
免疫接种，使用 15 μg MPV212047

图15

A.



B.

构建体 ID	亚型	收集年份	HMPV 毒株标识符	Genbank ID
MPV220647	A2	2000	TN/00/3-14	EU857553.1
MPV220639	A2	2019	HMPV/Yokohama.JPN/P9767/2019	BBI90013.1
MPV220640	B1	2020	B/NSW/WM217053 9/17	QTW05440.1
MPV220641	B2	2019	2019_1360	QQY99338.1

图16

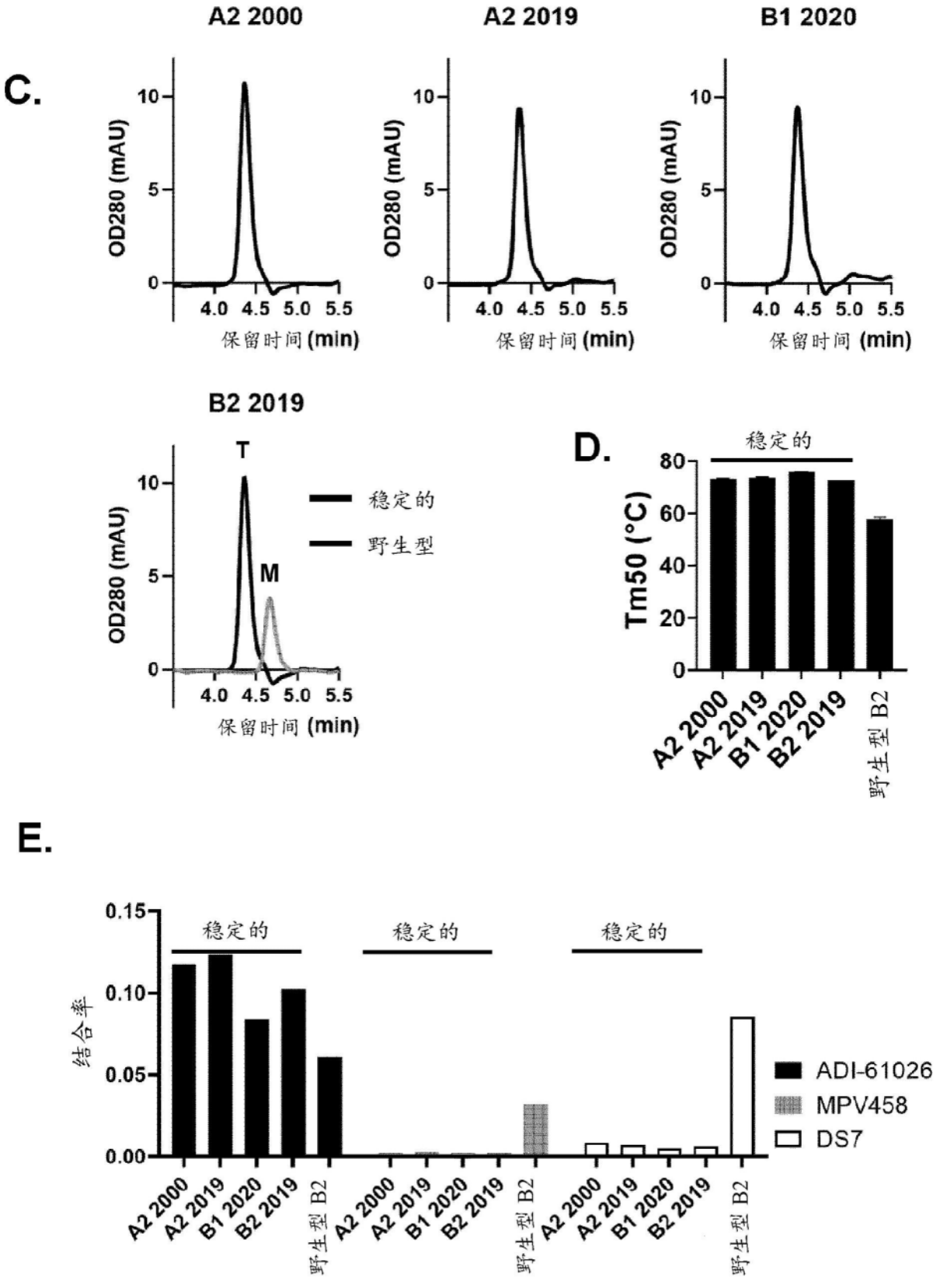
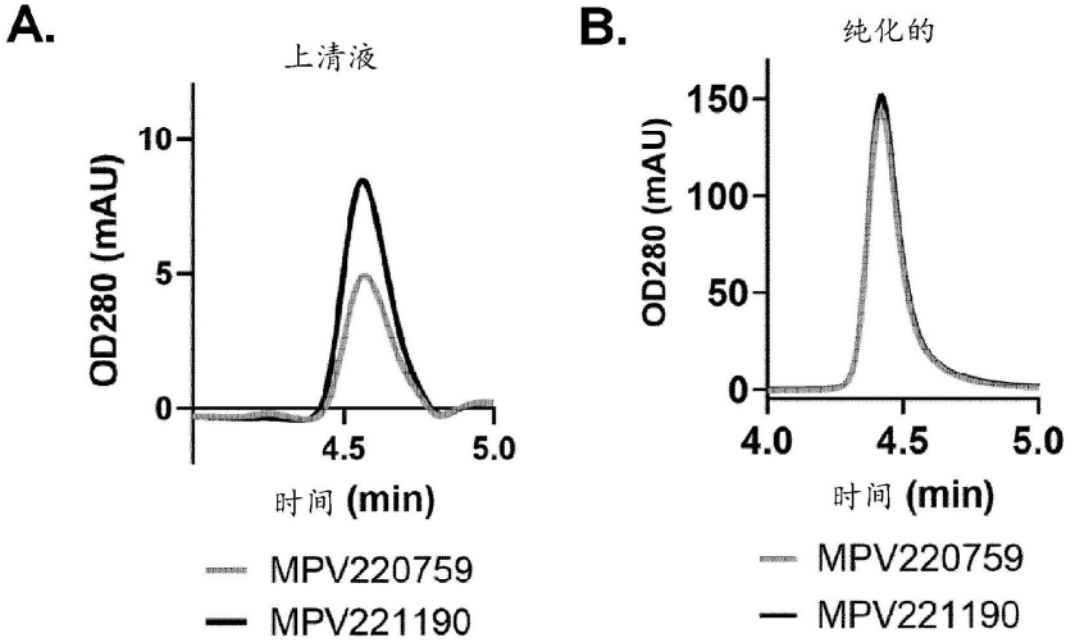

C.
A2 2000
A2 2019
B1 2020
OD280 (mAU)
保留时间 (min)
B2 2019
T
M
稳定的
野生型
D.
稳定的
Tm50 (°C)
A2 2000
A2 2019
B1 2020
B2 2019
野生型 B2
E.
结合率
稳定的
ADI-61026
MPV458
DS7

图16续



C.

	MPV220759	MPV221190
测定的重量 (kDa)	157.0 (±0.668%)	157.4 (±0.595%)
理论的重量 (kDa)	151.6	151.8
可能的构象	三聚体	三聚体

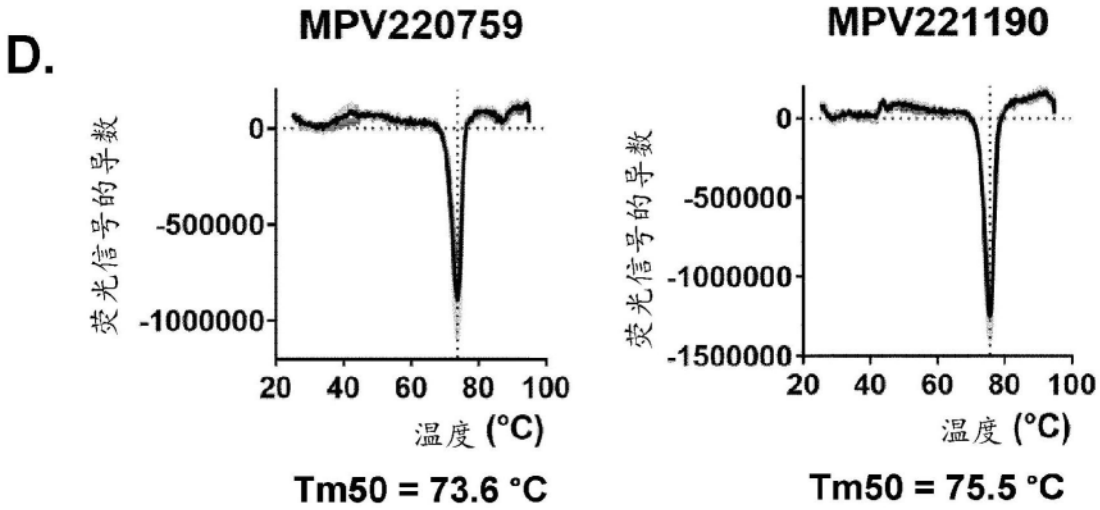


图17

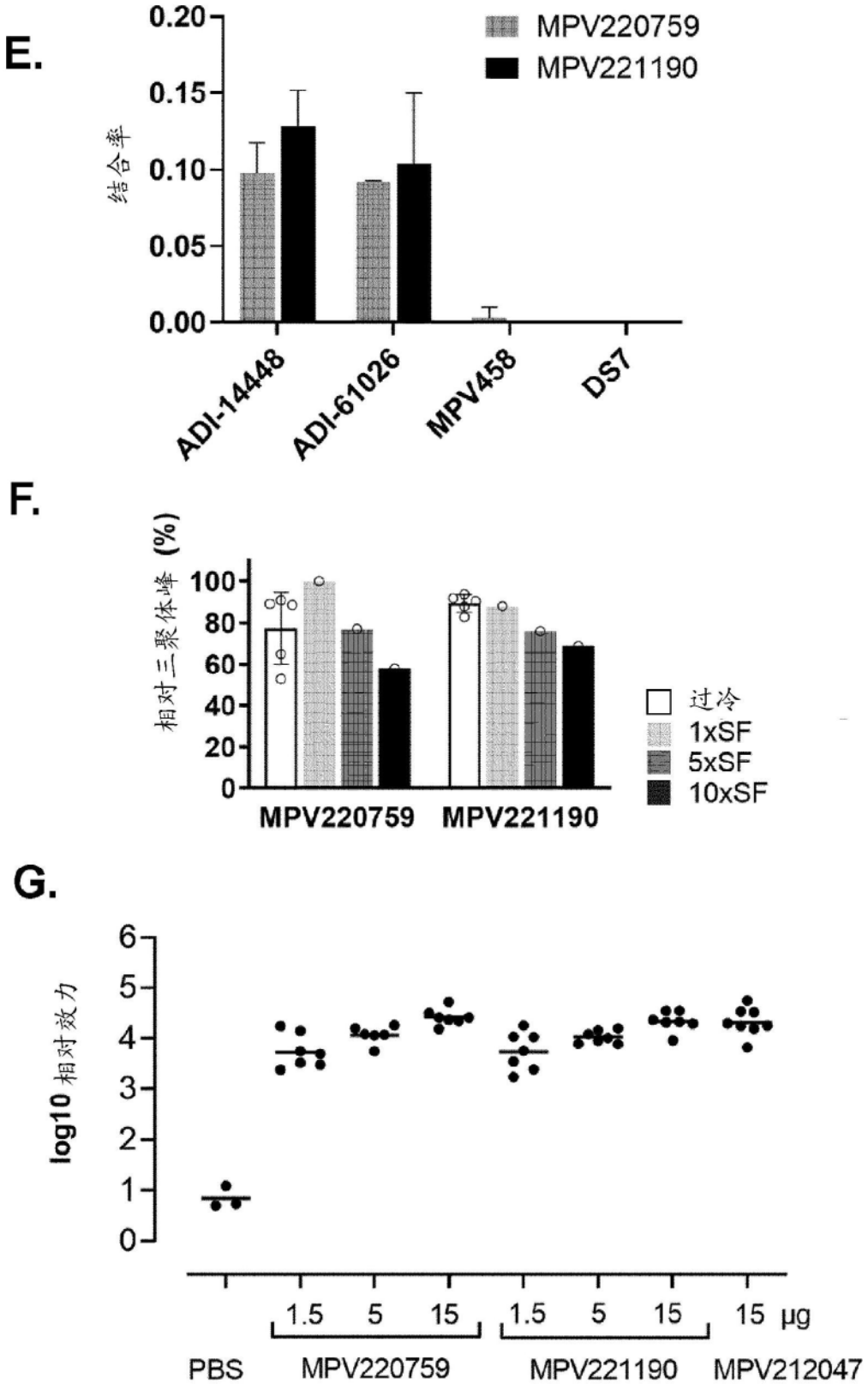
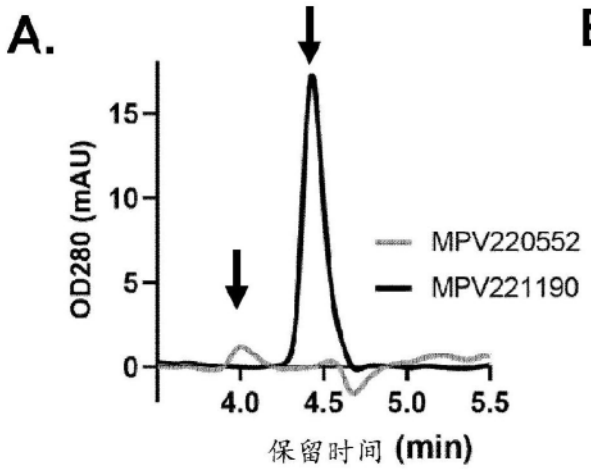
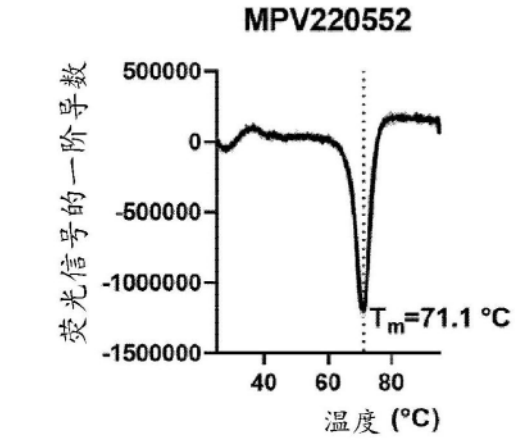

E.
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
结合率
MPV220759
MPV221190
ADI-14448
ADI-61026
MPV458
DS7
F.
相对三聚体峰 (%)
100
80
60
40
20
0
MPV220759
MPV221190
过冷
1xSF
5xSF
10xSF
G.
log10 相对效力
6
5
4
3
2
1
0
1.5
5
15
1.5
5
15
15 μg
PBS
MPV220759
MPV221190
MPV212047

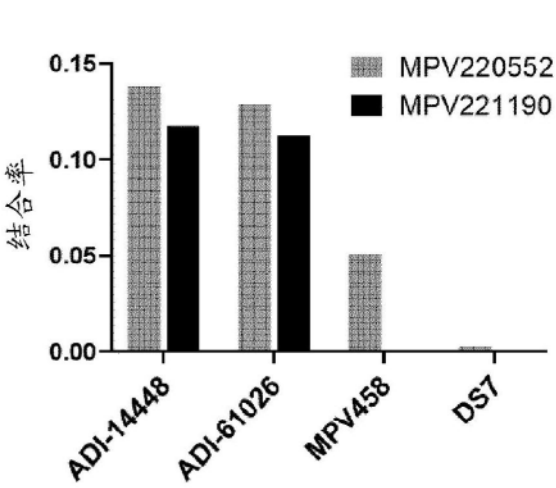
图17续



B.

MPV220552	
测定的重量 (kDa)	177.9 (±0.221%)
理论的重量 (kDa)	175.0
可能的构象	三聚体





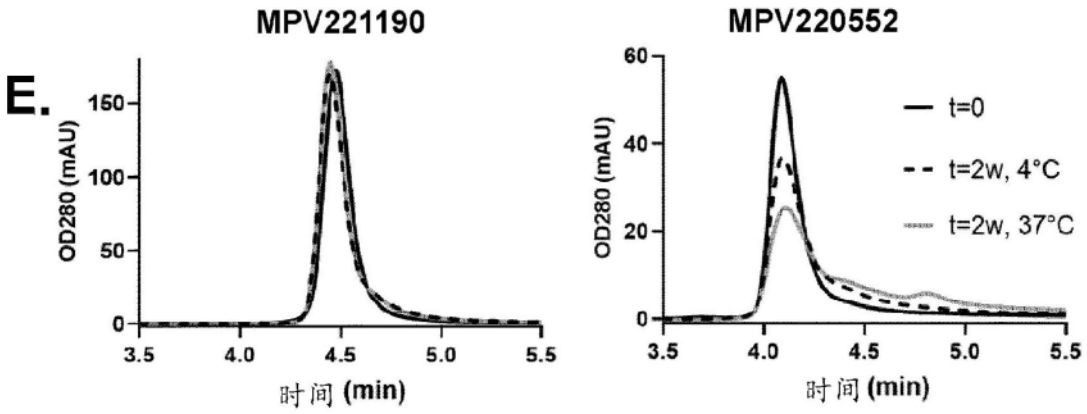


图18

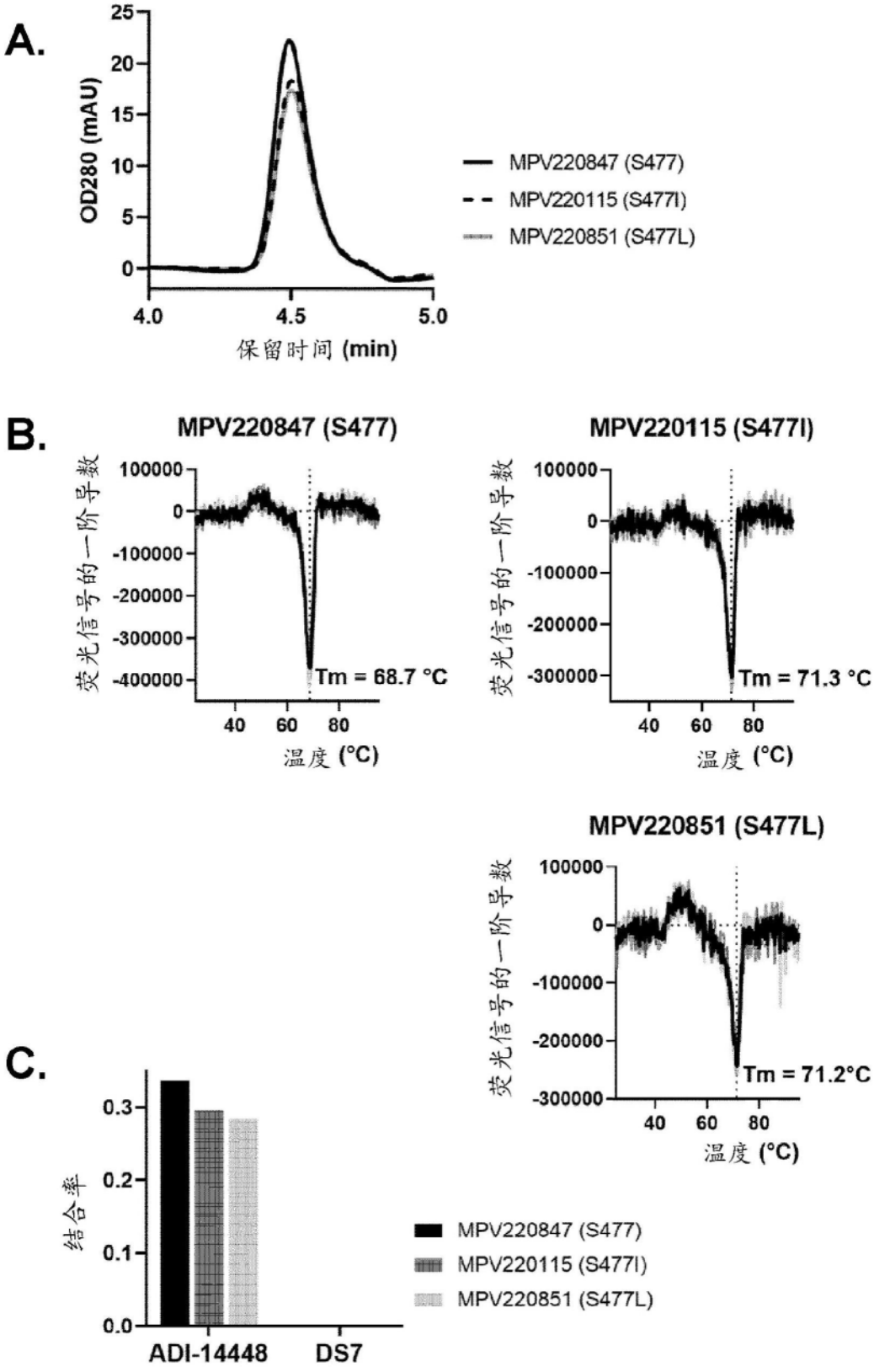

A.
OD280 (mAU)
25
20
15
10
5
0
4.0
4.5
5.0
保留时间 (min)
MPV220847 (S477)
MPV220115 (S477I)
MPV220851 (S477L)
B.
MPV220847 (S477)
荧光信号的一阶导数
100000
0
-100000
-200000
-300000
-400000
Tm = 68.7 °C
40
60
80
温度 (°C)
MPV220115 (S477I)
荧光信号的一阶导数
100000
0
-100000
-200000
-300000
Tm = 71.3 °C
40
60
80
温度 (°C)
MPV220851 (S477L)
荧光信号的一阶导数
100000
0
-100000
-200000
-300000
Tm = 71.2°C
40
60
80
温度 (°C)
C.
结合率
0.3
0.2
0.1
0.0
ADI-14448
DS7
MPV220847 (S477)
MPV220115 (S477I)
MPV220851 (S477L)

图19

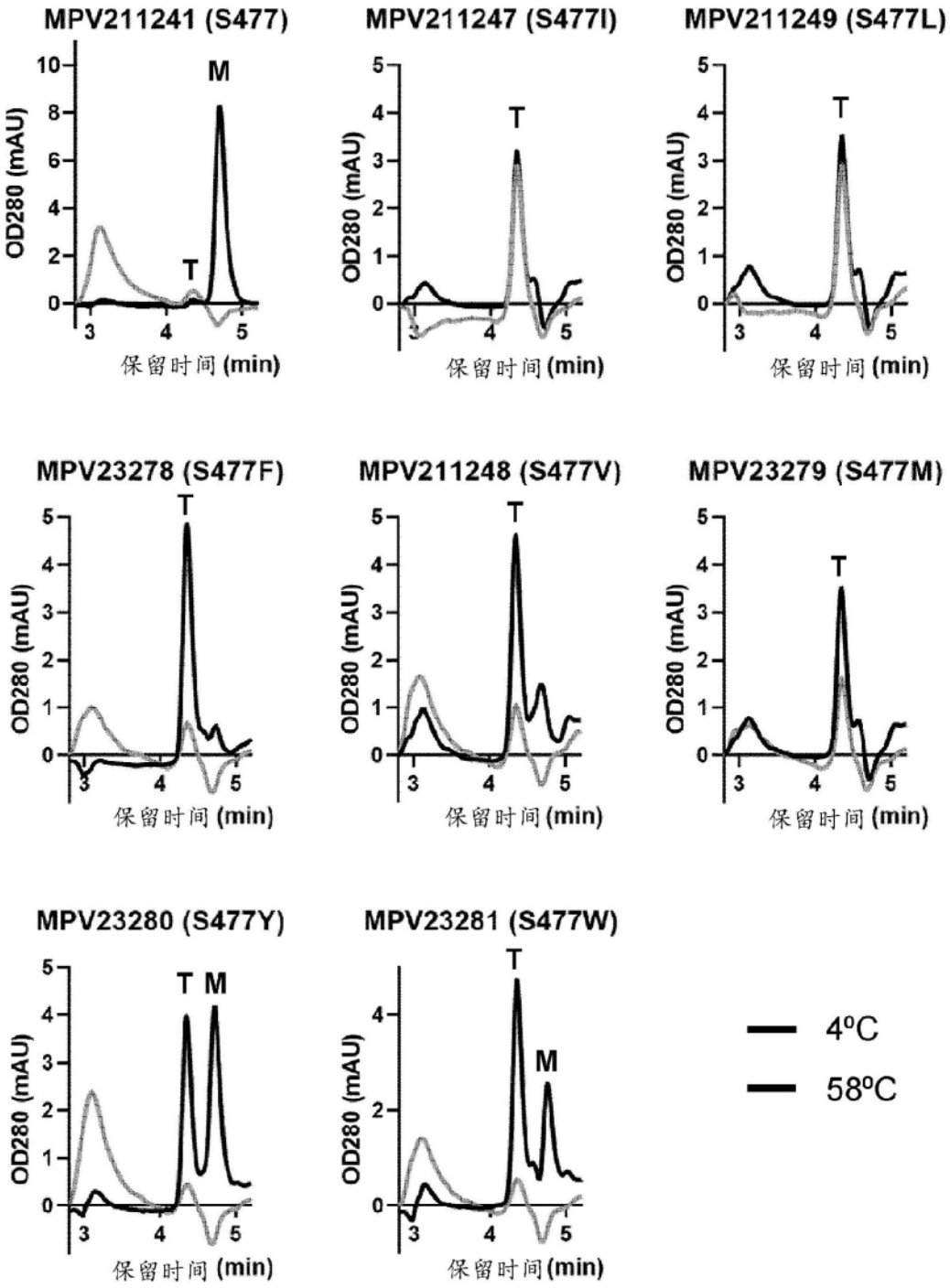

MPV211241 (S477)
MPV211247 (S477I)
MPV211249 (S477L)
MPV23278 (S477F)
MPV211248 (S477V)
MPV23279 (S477M)
MPV23280 (S477Y)
MPV23281 (S477W)
OD280 (mAU)
保留时间 (min)
T
M
4°C
58°C

图20

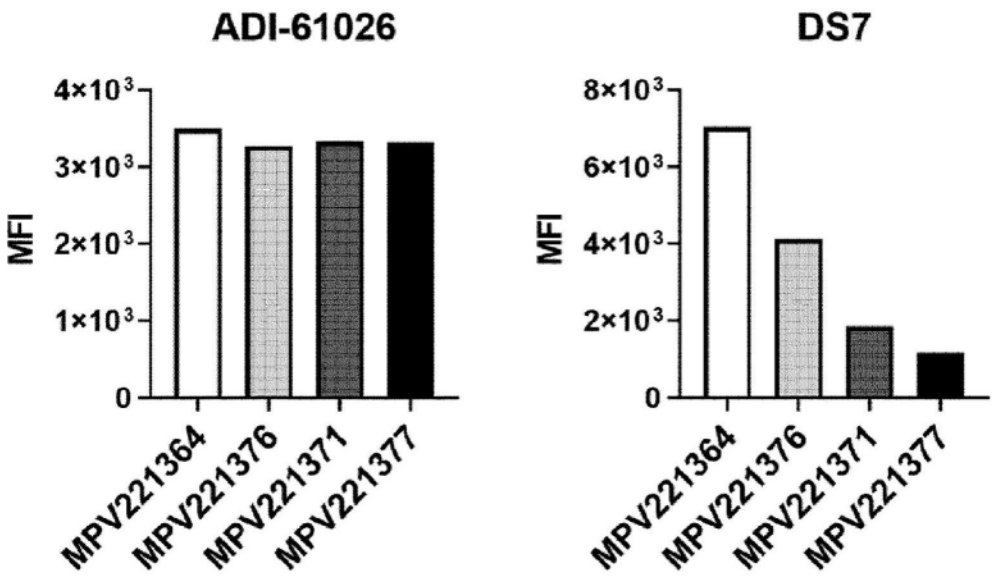

ADI-61026
MFI
4×10³
3×10³
2×10³
1×10³
0
MPV221364
MPV221376
MPV221371
MPV221377
DS7
MFI
8×10³
6×10³
4×10³
2×10³
0
MPV221364
MPV221376
MPV221371
MPV221377

图21

A.

构建体	描述	P27 序列
MPV23260	p27-B	RRRREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRR
MPV23259	p27-A	RRRRELPRFMNYTLNNTKNTNVTLSKKRKRR
MPV23261	p27-A_Δ 聚糖1	RRRRELPRFMQYTLNNTKNTNVTLSKKRKRR
MPV23262	p27-A_Δ 聚糖2	RRRRELPRFMNYTLQNTKNTNVTLSKKRKRR
MPV23263	p27-A_Δ 聚糖3	RRRRELPRFMNYTLNNTKNTQVTLSKKRKRR
MPV23264	p27-A_Δ 聚糖1+2	RRRRELPRFMQYTLQNTKNTNVTLSKKRKRR
MPV23265	p27-A_Δ 聚糖2+3	RRRRELPRFMNYTLQNTKNTQVTLSKKRKRR
MPV23266	p27-A_Δ 聚糖1+3	RRRRELPRFMQYTLNNTKNTQVTLSKKRKRR
MPV23267	p27-A_Δ 聚糖1+2+3	RRRRELPRFMQYTLQNTKNTQVTLSKKRKRR
MPV23268	p27-A_ 缺失-1	RRRRE---------NNTKNTNVTLSKKRKRR
MPV23269	p27-A_ 缺失-2	RRRRELPRFMNYTL----------KKRKRR

B.

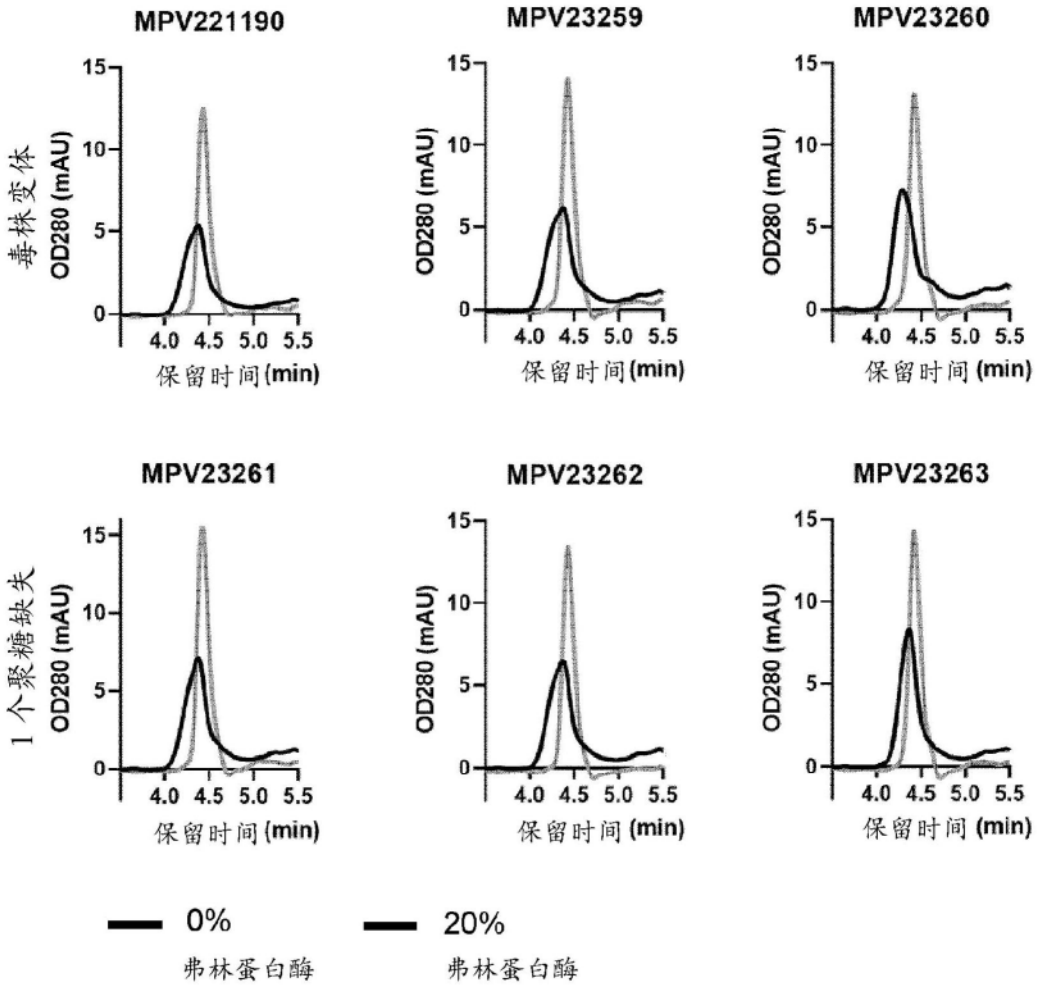
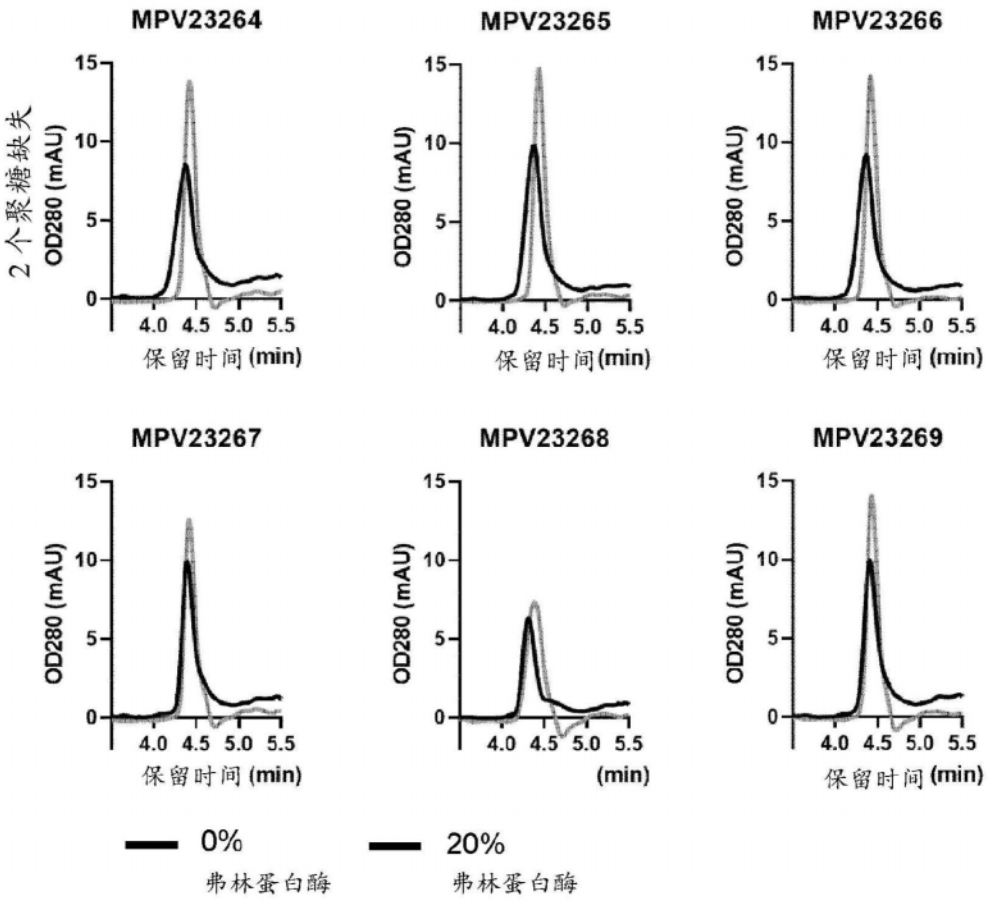


图22


MPV23264
MPV23265
MPV23266
MPV23267
MPV23268
MPV23269
2个聚糖缺失
OD280 (mAU)
保留时间 (min)
0%
弗林蛋白酶
20%
弗林蛋白酶

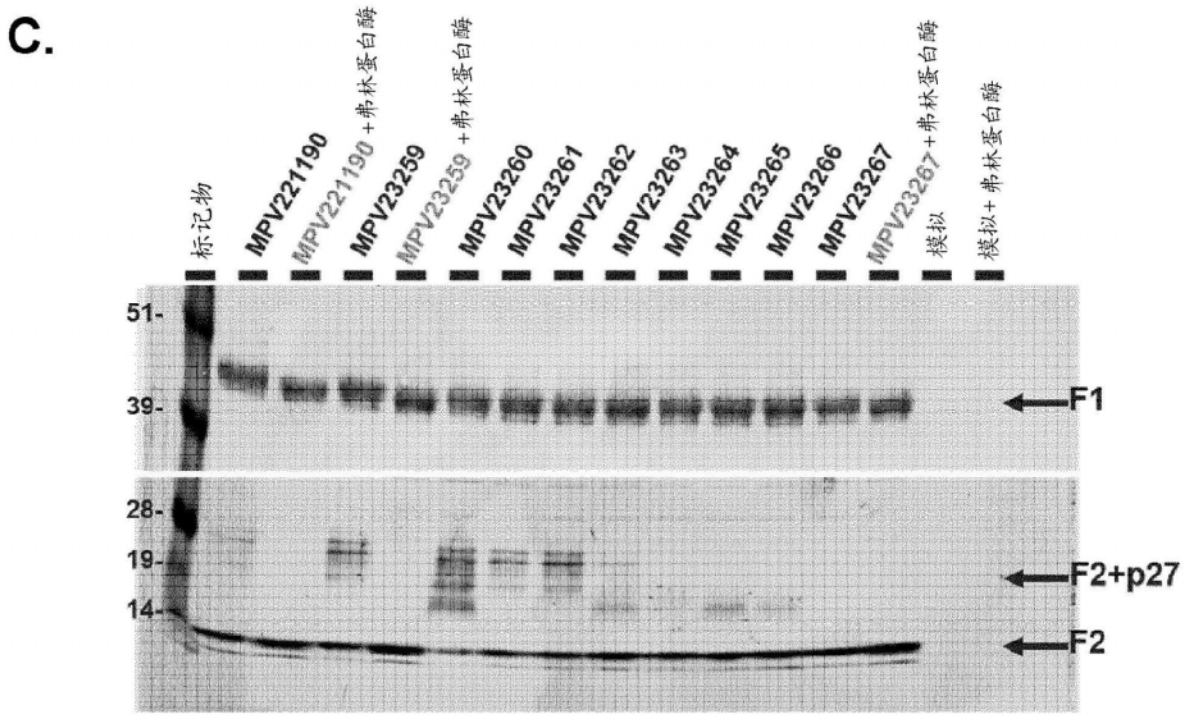

C.
标记物
MPV221190
MPV221190+弗林蛋白酶
MPV23259
MPV23259+弗林蛋白酶
MPV23260
MPV23261
MPV23262
MPV23263
MPV23264
MPV23265
MPV23266
MPV23267
MPV23267+弗林蛋白酶
模拟
模拟+弗林蛋白酶
51-
39-
28-
19-
14-
F1
F2+p27
F2

图22续