



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102365097 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 29

(21) 申请号 201080008673. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 02. 19

A61K 39/40 (2006. 01)

C07K 16/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

0902851. 5 2009. 02. 20 GB

0916153. 0 2009. 09. 15 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2010/050288 2010. 02. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02010/094970 EN 2010. 08. 26

(71) 申请人 卫生防护机构

地址 英国威尔特郡

申请人 麦克罗弗姆有限公司

(72) 发明人 克利福德·肖恩 约翰·兰登

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

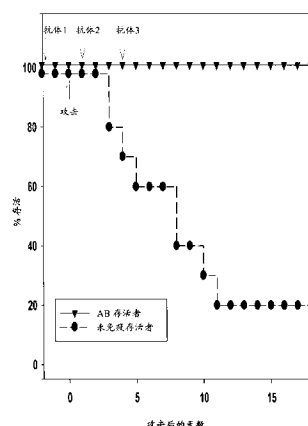
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 6 页

(54) 发明名称

艰难梭菌毒素的抗体

(57) 摘要

本申请提供用于预防或治疗艰难梭菌 (C. difficile) 感染的包含羊抗体的抗体组合物, 其中所述抗体结合艰难梭菌毒素。



1. 一种抗体组合物,所述抗体组合物包含羊抗体,用于预防或治疗艰难梭菌(*C. difficile*)感染,其中所述抗体结合艰难梭菌毒素。
2. 根据权利要求1所述的抗体组合物,其中所述抗体是多克隆抗体。
3. 根据任一前述权利要求所述的抗体组合物,其中所述抗体结合选自下列组成的组的至少一种艰难梭菌毒素:艰难梭菌毒素A、艰难梭菌毒素B和艰难梭菌二元毒素。
4. 根据任一权利要求3所述的抗体组合物,其中所述抗体结合艰难梭菌毒素A并且结合艰难梭菌毒素B。
5. 根据任一权利要求3所述的抗体组合物,其中所述抗体结合艰难梭菌毒素A并且结合艰难梭菌二元毒素。
6. 根据任一权利要求3所述的抗体组合物,其中所述抗体结合艰难梭菌毒素B并且结合艰难梭菌二元毒素。
7. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体组合物,其中所述艰难梭菌毒素是选自以下的组的毒素A:毒素型0、毒素型III和毒素型V。
8. 根据权利要求1-3、权利要求4或权利要求6中任一项所述的抗体组合物,其中所述艰难梭菌毒素是选自以下的组的毒素B:毒素型0、毒素型III和毒素型V。
9. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-8所述的抗体组合物,以及选自药学上可接受的载体、赋形剂和/或用于肠胃外施用的盐的至少一种组分。
10. 一种用于预防或治疗艰难梭菌感染的方法,所述方法包括施用根据权利要求1至8所述的抗体组合物或根据权利要求9所述的药物组合物。
11. 一种产生用于根据权利要求1至8所述的抗体组合物或用于根据权利要求9所述的药物组合物的羊抗体的方法,其中所述羊抗体是由绵羊响应于包含艰难梭菌毒素或其片段的免疫原而引发的。
12. 一种产生用于根据权利要求1至7所述的抗体组合物或用于根据权利要求8所述的药物组合物的羊抗体的方法,所述方法包括:(i)施用包含艰难梭菌毒素或其片段的免疫原给绵羊;(ii)容许有足够的时间在所述绵羊中产生抗体;以及(iii)从所述绵羊获得所述抗体。
13. 根据权利要求11或权利要求12所述的方法,其中所述免疫原是艰难梭菌类毒素。

艰难梭菌毒素的抗体

[0001] 本发明涉及羊抗体及其在预防或治疗艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 感染 (CDI) 中的用途。

[0002] 艰难梭菌感染 (CDI) 目前是世界范围内医院的主要问题。该细菌引起医院的抗生素相关疾病,这种疾病自身表现为从轻度自身限制性腹泻至可能威胁生命的严重结肠炎的几种形式。中老年患者大部分具有这些可能威胁生命的疾病的风险并且 CDI 的发病率在过去 10 年内急剧增加。在 2007 年,英国有 50,000 多例 CDI,其中 8,000 多例伴随着死亡。CDI 每年度花费英国国民卫生服务 (NHS) 超过 5 亿英镑。

[0003] 各种艰难梭菌菌株可以通过大量方法来分类。最常用的方法之一是聚合酶链式反应 (PCR) 核糖核酸分型 (ribotyping),其中使用 PCR 来扩增艰难梭菌的 16S-23S rRNA 基因间隔区。来自这种方法的反应产物提供了鉴定分离株细菌核糖核酸型的特征带型。毒素分型 (toxintyping) 是另一分型方法,其中使用源自编码艰难梭菌毒素的 DNA 的限制模式来鉴定菌株的毒素型。在不同菌株的毒素基因之间观察到的限制模式的差异还表示艰难梭菌毒素家族内的序列变异。毒素 B 显示了一些区域内的序列变异。例如,毒素型 0 毒素 B 的 C 末端 60kDa 区域与毒素型 III 的相同区域相比具有大约 13% 的序列差异。尽管这种序列差异相对较小,但它们对于分子的抗原特性可能极为重要并且可能对抗体结合具有深远影响并因此对抗体的毒素中和特性具有深远影响。

[0004] 艰难梭菌菌株产生多种毒力因子,其中值得注意的是几种蛋白毒素:毒素 A、毒素 B 以及在某些菌株中的二元毒素,该二元毒素与产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 1 毒素类似。毒素 A 是大的蛋白细胞毒素 / 肠毒素,它在感染的病理中起作用并且可能影响肠定殖过程。已经报道了毒素 A 阴性 / 毒素 B 阳性菌株的 CDI 发作,这表明毒素 B 也能够疾病病理中起重要作用。毒素 A 和毒素 B 二者都是经由包括下列的多步机制来实现它们的作用机制的:结合细胞表面的受体,内化,随后易位并释放效应结构域进入细胞胞质溶胶以及最终的胞内作用。对于毒素 A 和毒素 B 二者,这牵涉了 Rho 家族的小 GTP 酶的灭活。对于这种灭活,每种毒素催化葡萄糖部分 (来自 UDP-葡萄糖) 转移至 Rho 蛋白的氨基残基。毒素 A 和毒素 B 二者还都含有半胱氨酸蛋白酶形式的第二种酶活性,该第二种酶活性似乎在易位后效应结构域释放到胞质溶胶中起重要作用。艰难梭菌二元毒素通过牵涉将 ADP-核糖部分由 NAD 转移至其靶蛋白的机制修饰细胞肌动蛋白而以不同的方式起作用。

[0005] 艰难梭菌感染的治疗目前依赖于抗生素,其中甲硝唑和万古霉素构成了选择的治疗。然而,这些抗生素不是在所有情况下都有效,并且 20-30% 的患者会遭受疾病复发。最受关注的是在英国出现了毒力更强的菌株,该菌株在 2002 年首次在加拿大被鉴定。这些菌株属于 PCR 核糖核酸型 027,毒素型 III,它们会引起具有比之前观察到的 CDI 高 3 倍直接归因死亡率的 CDI。

[0006] 因此现在尤其急迫地需要新的治疗,因为目前的抗生素功效似乎在降低。

[0007] 因此,本领域内存在对能够特别地解决艰难梭菌感染 (CDI) 的新疗法 / 治疗的需要。这种需要被本发明解决了,本发明解决了上述问题的一个或多个。

[0008] 更详细地,本发明的第一方面提供了用于预防或治疗 CDI 的羊抗体。在另一方面,

本发明提供了包含用于预防或治疗 CDI 的羊抗体的抗体组合物。在一个实施方案中,所述羊抗体是多克隆抗体。

[0009] 使用时,本发明的抗体结合艰难梭菌毒素或其片段,优选中和毒素或其片段的生物活性。因此,本发明的抗体能够预防或治疗 CDI 并优选还预防患者复发。

[0010] 本发明的抗体提供了相对于其他治疗的明显优势,因为它们能够抑制艰难梭菌一种或多种毒素的生物活性,同时对患者具有低的免疫原性作用。此外,本发明的抗体可以高效价地产生。因此,羊抗体可以容易地获得并且可以保护和 / 或患者免于艰难梭菌产生的病理作用而具有最小的副作用。本发明的抗体还可以用于开发针对 CDI 的被动免疫的疫苗。

[0011] 本发明的首要目标是艰难梭菌毒素或其片段。本发明的抗体可以结合和 / 或中和的合适的艰难梭菌毒素包括引起 CDI 或其症状或与 CDI 或其症状相关的任何艰难梭菌毒素。在又一实施方案中,本发明的抗体结合和 / 或中和选自下列的至少一种类型的艰难梭菌毒素:艰难梭菌毒素 A 或其片段、艰难梭菌毒素 B 或其片段、以及艰难梭菌二元毒素或其片段。

[0012] 因此,在一个实施方案中,本发明的抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)的羊抗体。在另一实施方案中,本发明的抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段)的羊抗体。在又一实施方案中,本发明的抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的羊抗体。

[0013] 在另一实施方案中,本发明的抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)和艰难梭菌毒素 B(或其片段)的羊抗体。在另一实施方案中,本发明的抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的羊抗体。在又一实施方案中,本发明的抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段)和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的羊抗体。

[0014] 本发明的抗体组合物还可以包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)、艰难梭菌毒素 B(或其片段)和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的羊抗体。

[0015] 在一个实施方案中,抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)的第一抗体,以及选自结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段)的抗体或结合和 / 或中和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的抗体的第二抗体。在此实施方案中,所述第二抗体可以结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段),并且所述组合物任选包括结合和 / 或中和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的第三抗体。

[0016] 在另一实施方案中,抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段)的第一抗体,以及选自结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)的抗体或结合和 / 或中和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的抗体的第二抗体。在此实施方案中,所述第二抗体可以结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段),并且所述组合物任选包括结合和 / 或中和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的第三抗体。

[0017] 在另一实施方案中,抗体组合物包含结合和 / 或中和艰难梭菌二元毒素(或其片段)的第一抗体,以及选自结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)的抗体或结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段)的抗体的第二抗体。在此实施方案中,所述第二抗体可以结合和 / 或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段),并且所述组合物任选包括结合和 / 或中和

艰难梭菌毒素 B(或其片段)的第三抗体。可选择地,所述第二抗体可以结合和/或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段),并且所述组合物任选包括结合和/或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)的第三抗体。

[0018] 本发明的抗体可以(特异性地)结合和/或中和艰难梭菌毒素 A(或其片段)或艰难梭菌毒素 B(或其片段)或艰难梭菌二元毒素(或其片段)中的一种。可选择地,本发明的抗体可以结合艰难梭菌毒素 A(或其片段)或艰难梭菌毒素 B(或其片段)或艰难梭菌二元毒素(或其片段)中的两种或更多种。当抗体结合和/或中和两种或更多种毒素类型时,所述抗体优选结合和/或中和艰难梭菌毒素 B(或其片段)加上艰难梭菌毒素 A(或其片段)和/或艰难梭菌二元毒素(或其片段)中的一种或两种。

[0019] 本发明的抗体与毒素的特定表位相互作用。例如,抗体可以结合艰难梭菌毒素 A 的 N 末端结构域(例如,在氨基酸 1-957 之间)或中间区域结构域(例如,在氨基酸 958-1831 之间)或 C 末端重复结构域(例如,在氨基酸 1832-2710 之间)中的表位。例如,抗体可以结合艰难梭菌毒素 A 的氨基酸 1832-2710 中的表位。类似地,抗体可以结合毒素 B 的 N 末端结构域(例如,在氨基酸 1-955 之间)或中间区域结构域(例如,在氨基酸 956-1831 之间)或 C 末端重复结构域(例如,在氨基酸 1832-2366 之间)中的表位。例如,抗体可以结合毒素 B 的氨基酸 1832-2366 中的表位。在二元毒素的情况下,抗体可以结合催化结构域(片段 A)或受体结合结构域,受体结合结构域的残基位于片段 B 的 C 末端部分(大约残基 400-870);和/或结合片段 B 的 N 末端半侧(大约残基 1-400),其参与片段 A 的结合和向细胞中的易位。

[0020] 在一个实施方案中,艰难梭菌毒素选自毒素型 0 至 XV 中的一种。优选的毒素型(加上示例的核糖核酸型和菌株)列在下面的表 1 中。所列的毒素型纯粹是示例,并不旨在限制本发明。

[0021] 表 1

毒素型	示例的核糖核酸型	示例的菌株	参考文献
0	001、106	VPI10463	Rupnik 等人(1998) J.Clinical Microbiol. 36:2240-2247
I	003、012、102	EX623	
II	103	AC008	
III	027、034、075、080	R20291、QCD-32g58	
IV	023、034、075、080	55767	
V	066、078	SE881	
VI	045、063、066	51377	
VII	063	57267	
VIII	017、047	1470	
IX	019	51680	
X	036	8864	
XI	033	IS58、R11402	Rupnik 等人(2001) Microbiology 147:439-447
XII	056	IS25	
XIII	070	R9367	
XIV	111	R10870	
XV	122	R9385	

[0023] 本发明的不同抗体可以结合和/或中和相同或不同菌株的艰难梭菌毒素。例如,

抗体可以结合和 / 或中和下列的一种或多种 :艰难梭菌毒素 A- 毒素型 0 ;艰难梭菌毒素 B- 毒素型 0 ;艰难梭菌毒素 A- 毒素型 III ;艰难梭菌毒素 B- 毒素型 III ;艰难梭菌毒素 A- 毒素型 V ;和 / 或艰难梭菌毒素 B- 毒素型 V。优选地,采用结合和 / 或中和来自所有这些毒素型的毒素 A 和 B 的抗体的混合物。本发明的抗体可以结合所述菌株的艰难梭菌毒素 A 和 / 或艰难梭菌毒素 B 的 N 末端结构域、中间区域结构域、和 / 或 C 末端重复结构域中的表位。

[0024] 在某些实施方案中,本发明的抗体可以结合和 / 或中和至少一种如下的艰难梭菌毒素 :所述艰难梭菌毒素包含与 SEQ ID NO :1-6 至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更多相同的氨基酸序列或其片段。

[0025] 本发明还涵盖用于预防或治疗 CDI 的相应方法,所述方法包括施用本发明的抗体组合物给患者。患者可以被艰难梭菌感染,或具有艰难梭菌的症状(例如,轻度自身限制性腹泻、腹痛、发热和食欲丧失乃至威胁生命的病症,例如,假膜性结肠炎和细胞毒性巨结肠)或具有艰难梭菌感染的诱因(例如,经受着抗生素治疗、经历过艰难梭菌并具有复发的风险、或接触显示出与艰难梭菌感染相关的临床症状的第二个体)。本发明因此提供了预防或治疗 CDI 的有效手段。

[0026] 在一个实施方案中,所述治疗 CDI 的方法包括施用本发明的抗体组合物给感染艰难梭菌或经受 CDI 症状的患者。这可以使用治疗有效量的抗体来完成。这种施用可以通过重复施用本发明的抗体组合物一段延长的时间阶段来实现。所述组合物的抗体组分可以相同或不同(根据它们的毒素型特异性和 / 或艰难梭菌毒素上的靶向的结合区域或表位),并且施用可以是同时的或顺序的,且可以任何次序实现。

[0027] 在另一实施方案中,所述预防 CDI 的方法包括施用本发明的抗体组合物给患者以提供针对 CDI 的被动免疫。这可以通过在 CDI 发病前或极早期使用预防有效量的抗体来完成。这种施用可以通过重复施用本发明的抗体组合物一段延长的时间阶段来实现。所述组合物的抗体组分可以相同或不同(根据它们的毒素型特异性和 / 或艰难梭菌毒素上的靶向的结合区域或表位),并且施用可以是同时的或顺序的,且可以任何次序实现。

[0028] 抗体制备

[0029] 羊抗体是在绵羊中产生的抗体。因此,本发明包括产生用于本发明的抗体组合物的羊抗体的方法,所述方法一般包括 (i) 施用包含艰难梭菌毒素或其片段的免疫原给绵羊;(ii) 容许有足够的时间在所述绵羊中产生抗体;以及 (iii) 从所述绵羊中获得所述抗体。如本文所用的,绵羊包括属于盘羊属 (*Ovis*) 的任何物种(例如,盘羊 (*Ovis ammon*)、*Ovis orientalis aries*、*Ovis orientalis orientalis*、维氏盘羊 (*Ovis orientalis vignei*)、加拿大盘羊 (*Ovis Canadensis*)、戴氏盘羊 (*Ovis dalli*)、雪羊 (*Ovis nivicola*))。

[0030] 本发明还包括产生用于本发明的抗体组合物的羊抗体的方法,其中所述羊抗体是由绵羊响应于包含艰难梭菌毒素或其片段(优选地,具有与全长天然毒素抗原交叉反应性和 / 或保留全长天然毒素的毒素或毒素样活性的片段)的免疫原而引发的。

[0031] 抗体可以由绵羊血清获得。因此,该程序产生了含有能够结合和中和艰难梭菌毒素的抗体的绵羊抗血清。在另一实施方案中,抗体是分离的和 / 或纯化的。因此,本发明的另一方面包括从绵羊抗血清中纯化抗体。

[0032] 在一个实施方案中,用于产生本发明的抗体的免疫原是任选被纯化的艰难梭菌毒

素或其片段。合适的艰难梭菌毒素包括引起 CDI 或其症状、或与 CDI 或其症状相关的任何艰难梭菌毒素。在另一实施方案中,毒素选自下列毒素中的至少一种:艰难梭菌毒素 A 或其片段、艰难梭菌毒素 B 或其片段、以及艰难梭菌二元毒素或其片段。艰难梭菌毒素还可以是选自如上文所定义的毒素型 0 至 XV 中的一种的毒素。

[0033] 纯化的艰难梭菌毒素的产生在实施例 1 中示例。在某些实施方案中,免疫原是艰难梭菌毒素变体。在另一实施方案中,免疫原包含与 SEQ ID NO:1-6 至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更多相同的氨基酸序列或其片段。

[0034] 用于产生本发明的抗体的免疫原还可以是部分或完全灭活的,即,具有降低的毒性。修饰的实例包括:化学处理(例如,用 UDP-二醛、甲醛、戊二醛、过氧化物或氧处理)和重组方法(例如,毒素中的缺失或突变)。例如,免疫原可以是源自通过用甲醛处理的天然毒素的艰难梭菌类毒素或其片段。可选择地,重组类毒素可以通过用定点诱变选择性灭活活性位点基序而产生。降低或消除毒素 A 和毒素 B 的毒素作用的定点诱变的实例是修饰毒素的 N 末端结构域中的 DXD 基序。可以将天冬氨酸和/或其他残基突变为例如丙氨酸以降低毒素 A 和毒素 B 中任一种的生物活性。例如,对于毒素 A,可以突变下列氨基酸中的一种或多种:Asp 269、Asp285、Asp 287、Asn383、Trp519、Tyr283、Arg272。例如,对于毒素 B,可以突变下列氨基酸中的一种或多种:Asp270、Asp286、Asp 288、Asn384、Trp520、Tyr284、Arg273。

[0035] 抗原可以与佐剂一起配制。合适的佐剂可以包括广泛用于人的铝(磷酸铝或氢氧化铝),以及其他佐剂,如皂苷及其纯化组分 Quil A、弗氏完全佐剂、RIBBI 佐剂以及用于研究和兽医应用的其他佐剂。

[0036] 艰难梭菌毒素或类毒素可以单独地或者同时或顺序地组合用作免疫原,以产生对单个艰难梭菌毒素或组合特异的抗体。例如,两种或更多种毒素或类毒素可以混合在一起并用作单个免疫原。可选择地,艰难梭菌毒素(例如,艰难梭菌毒素 A)可单独地用作第一绵羊或山羊的第一免疫原,并且另一艰难梭菌毒素(例如,艰难梭菌毒素 B)可单独地用于第二绵羊或山羊。可以组合由单独免疫产生的抗体以产生针对艰难梭菌毒素的抗体组合物。

[0037] 该方法包括所有的免疫模式,包括皮下、肌内、腹膜内和静脉内。本发明还包括种类繁多的免疫方案。在一个实施方案中,在第 0 天给绵羊或山羊施用毒素并且绵羊或山羊随后按间隔接受毒素。应了解所需的间隔范围和剂量范围取决于免疫原的精确性质、施用途径、制剂的性质以及参与人员的判断。可以使用用于优化的标准经验程序来调节这些剂量水平的变化。类似地,本发明并不旨在限于收集抗体的任何具体方案。优选的收集时间是第 56 天之后的某天。特异性抗体,即结合免疫原的抗体的水平应呈现为每升血清中至少 3g。

[0038] 可以在收集后按需要修饰本发明的抗体,以便在某些情况下它们在所施用的患者中具有较低的免疫原性。例如,如果患者是人,则可以通过本领域中熟知的方法使抗体脱种特性(despeciate)。关于可如何制备较低免疫原性的抗体的一个实例是制备 (Fab)₂ 片段。本发明的抗体可以用于产生这种抗体片段,已针对该抗体片段开发了多种技术。例如,片段可以通过完整抗体的蛋白水解消化衍生。用于它们的产生的其他技术对于熟练的从业者来说是明显的。

[0039] 抗体递送

[0040] 在使用时,本发明采用药物组合物,所述药物组合物包含呈适于肠胃外、优选静脉内施用的形式的本发明的抗体组合物。将纯化的完整抗体或其片段配制为用于这种递送。例如,可以将浓度在 5-50 或 15-50 或 25-50g/ 升的抗体或其片段配制在缓冲液中。合适的缓冲液组分的实例包括生理盐,如柠檬酸钠和 / 或柠檬酸。优选的缓冲液含有 100-200mM 或 125-175mM 或大约 150 (例如,153)mM 生理盐,如氯化钠。优选的缓冲液将药物组合物维持在接近患者的生理 pH 的 pH 下 - 例如,5.5-6.4 的 pH、或 5.6-6.3 的 pH、或 5.7-6.2 的 pH 或 5.8-6.2 的 pH。本发明的含抗体组合物优选不包括佐剂,因为不希望在患者中刺激针对所述抗体的免疫应答。

[0041] 本发明的抗体可以被配制为用于但不限于肌内、皮下或静脉内递送。适于肌内、皮下或静脉内注射的组合物包括无菌水溶液。若需要的话这种水溶液应被适当缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。本发明的抗体组合物不是口服制剂,并且不采用这种施用模式。在此方面,口服递送的关键问题是确保足够的抗体到达需要其的结肠。阻止抗体到达肠的因素包括消化性分泌物中存在的蛋白水解酶,其降解抗体分子;并且在一些情况下还包括 CDI 自身的作用,其也会引起麻痹性肠梗阻和阻止液体沿消化道向下移动的其他并发症。

[0042] 适于注射的组合物可以为溶液、悬浮液或在使用前溶解或悬浮于合适的溶媒中的干粉形式。

[0043] 在制备时,抗体或其片段的溶液可以溶解在溶媒中,若需要通过添加氯化钠使溶液等渗,并且在装入合适的无菌瓶或安瓿中并密封之前通过使用无菌技术通过无菌过滤器过滤而灭菌。有利地,可以将如下的添加剂溶解在溶媒中:缓冲剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂或杀菌剂、或悬浮剂和 / 或局部麻醉剂。

[0044] 在使用前溶解或悬浮在合适的溶媒中的干粉可以通过在无菌区域中使用无菌技术将预灭菌的成分装入无菌容器中来制备。可选择地,可以在无菌区域中使用无菌技术将成分溶解在合适的容器中。然后将产物冷冻干燥并无菌密封容器。

[0045] 用于施用本发明的抗体的剂量范围是产生期望的治疗作用的那些剂量范围。应了解所需的剂量范围取决于抗体或组合物的精确性质、施用途径、制剂的性质、患者的年龄、患者病症的性质、程度或严重度、禁忌症(若存在)、以及主治医师的判断。可以使用用于优化的标准经验程序来调节这些剂量水平的变化。

[0046] 合适的日剂量在 5-20mg/kg 体重的范围内。单位剂量可以从低于 100mg 变化,但通常在每剂 250-2000mg 的区域内,该剂量可以每天施用或频率更低地施用(例如,隔天施用,持续多达 1 周)。

[0047] 还在本发明的范围内的是在预防或治疗 CDI 的治疗方法中如下使用本发明的抗体:将本发明的抗体彼此组合、或作为另一种常用于 CDI 治疗的其他已确定的治疗的辅助或与其结合。例如,本发明的抗体可以与合适的抗生素(例如,甲硝唑和 / 或万古霉素)结合施用。

[0048] 组合治疗可以按本领域的技术人员认为必要或方便的任何方式实施,并且为了本说明书的目的,不包括关于组合使用的化合物的次序、量、重复或相对量的限制。

[0049] 定义部分

[0050] 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 是梭状芽孢杆菌属的革兰氏阳性菌物种。

[0051] 艰难梭菌感染 (CDI) 意指影响人和动物并且导致如下的一系列症状的细菌感染：从轻度自身限制性腹泻至威胁生命的病症，如假膜性结肠炎和细胞毒性巨结肠。在这种疾病中，艰难梭菌取代了正常的肠道菌群并产生攻击和损坏肠道上皮的细胞毒素。人 CDI 的主要风险因子包括：接受广谱抗生素、超过 65 岁以及住院。

[0052] 艰难梭菌毒素 A 是大小为大约 300kDa 的蛋白细胞毒素 / 肠毒素家族。毒素 A 具有在 N 末端区域内的酶活性，该酶活性起作用破坏哺乳动物细胞的细胞骨架而引起细胞死亡。在艰难梭菌菌株中存在大量天然存在的毒素 A 变体，它们称为‘毒素型’。毒素 A 的各毒素型在它们的一级序列中总体具有通常小于 10% 的变异。合适的毒素 A 序列的实例包括 SEQ ID No :1 和 SEQ ID No :3。

[0053] 艰难梭菌毒素 B 是大小为大约 270kDa 的蛋白细胞毒素家族，其与毒素 A 类似但具有显著更高的细胞毒性。像毒素 A 一样，毒素 B 具有在 N 末端区域内的酶活性，该酶活性起作用破坏哺乳动物细胞的细胞骨架而引起细胞死亡。在艰难梭菌菌株中存在大量天然存在的毒素 B 变体，它们称为‘毒素型’。毒素 B 的各毒素型在它们的一级序列中总体具有通常小于 15% 的变异。合适的毒素 A 序列的实例包括 SEQ ID No :2 和 SEQ ID No :4。

[0054] 二元毒素是由一些但并非全部的艰难梭菌菌株产生的二组分细胞毒素。二元毒素在作用上与肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*) C2 和产气荚膜梭菌 ι 毒素相似，与艰难梭菌二元毒素类似，这些毒素由大约 100kDa 的细胞结合片段和大约 50kDa 的酶活性‘效应’片段组成。合适的二元毒素序列的实例包括 SEQ ID No :5 和 SEQ ID No :6。

[0055] 如本文所用的术语“毒素”涵盖所述毒素片段。片段可以为在参考毒素的 10 至 2700 (例如，至少 50、100、150、200、250、300、350、400、500、750、1000、1500、2000 或 2500) 个氨基酸的任何数目的范围内，片段优选包括所研究的基因产物的至少一个表位。“片段”还可以具有与其所来源的毒素共同的抗原交叉反应性和 / 或基本上相同的体内生物活性。例如，能够结合片段的抗体还能够结合该片段所来源的毒素。可选择地，片段可以共有诱导 T 淋巴细胞的“记忆应答”的共同能力，所述 T 淋巴细胞之前已暴露于艰难梭菌毒素的抗原组分。

[0056] 术语毒素的含义涵盖其“变体”- 例如，与艰难梭菌毒素具有至少 80% 或 85% 或 90% 或 95% 或 96% 或 97% 或 98% 或 99% 氨基酸序列同源性的肽或肽片段。在另一实施方案中，“变体”可以是肽或肽片段的模拟物，该模拟物再现该肽或肽片段的至少一个表位。

[0057] 提及毒素涵盖毒素“类毒素”，下面对其进行更详细地讨论。

[0058] 毒素型通常用于分类艰难梭菌菌株。毒素型基于表征所获得的毒素基因的限制模式的方法。如上所述的，毒素 A 和 B 的毒素型代表这些蛋白毒素的一级氨基酸序列变体。

[0059] 艰难梭菌类毒素用于描述艰难梭菌毒素 (毒素 A、毒素 B 或二元毒素) 或被部分或完全灭活的艰难梭菌毒素的混合物。如果通过体外细胞毒性测定或通过动物毒性测量，毒素具有比未处理的毒素更低的毒性 (例如，低 100%、99%、95% 或 90% 的毒性)，则认为该毒素是灭活的。

[0060] 与感兴趣的毒素结合的抗体是能够以足够的亲和力与该毒素结合而使该抗体可用作治疗剂的抗体。与感兴趣的毒素结合的抗体是以至少 10^4 M 的亲和力 (K_d) 与艰难梭菌的毒素结合的抗体。

[0061] 毒素中和意指阻断艰难梭菌的一种或多种细胞毒素 (毒素 A 和 / 或毒素 B 和 / 或

二元毒素)的生物学作用的物质(例如,抗体)的作用。细胞毒素的生物学作用被定义为其杀伤或削弱哺乳动物细胞、尤其是哺乳动物肠道上皮的细胞的功能的能力。物质的毒素中和活性可以通过其阻止以培养物生长的哺乳动物细胞死亡的能力来测量。

[0062] 治疗有效量是指在单独或组合施用给患者以治疗 CDI 或至少一种 CDI 的临床症状时足以影响疾病或症状的这种治疗的抗体的量。治疗有效量可以依据例如抗体、感染、和/或感染症状、感染严重度、和/或感染症状、待治疗患者的年龄、体重和/或健康、以及开药医师的判断而变化。任何给定情况下的合适治疗有效量可以由本领域的技术人员确定或者能够通过常规实验确定。治疗有效量还是其中抗体的有益效果超过其任何毒性或有害作用的量。

[0063] “预防有效量”是在单独或组合施用给患者时,抑制或延迟 CDI 或 CDI 的至少一种临床症状的发作或复发的抗体的任何量。在一些实施方案中,预防有效量完全阻止艰难梭菌感染的发作或复发。“抑制”发作意指降低感染发作的可能或完全阻止发作。

[0064] 绵羊意指属于盘羊属的任何物种(例如,盘羊、*Ovis orientalis aries*、*Ovis orientalis orientalis*、维氏盘羊、加拿大盘羊、戴氏盘羊、雪羊)。

[0065] 山羊意指属于山羊属(*Capra*)的任何物种(例如,例如西班牙山羊(*Capra pyrenaica*)、北山羊(*Capra ibex*)、云山羊(*Capra nubiana*)、亚洲山羊(*Capra sibirica*)、西敏山羊(*Capra walie*)、高加索山羊(*Capra caucasica*)、东山羊(*Capra cylindricornis*)、野山羊(*Capra aegagrus*)、捻角山羊(*Capra falconeri*))。

[0066] 羊抗体是与在绵羊中产生的抗体具有至少 100%、99%、95%、90%、80%、75%、60%、50%、25%或 10%氨基酸序列同一性的抗体。

[0067] 对于序列比较,通常一个序列作为参考序列,测试序列可以与其比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,若需要则随后指定坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0068] 可以进行用于比较的最佳序列比对,例如通过 Smith 和 Waterman 的局部同源性比对算法 [Adv. Appl. Math. 2 :484(1981)];通过 Needleman & Wunsch 的算法 [J. Mol. Biol. 48 :443(1970)];通过 Pearson & Lipman 的相似性方法检索 [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85 :2444(1988)];通过这些算法的计算机实现方式 (GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA-威斯康辛大学生物技术中心 (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) 的遗传学计算机组 (Genetics Computer Group) 的序列分析软件包);或通过视觉检查 [参见 Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学实验技术), F.M. Ausubel 等人,编, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc. 合资 (1995 补充材料) Ausubel]。

[0069] 适于确定百分比序列相似性的算法的实例是 BLAST 算法和 BLAST2.0 算法 [参见 Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215 :第 403-410 页;和美国国立生物技术信息中心的“<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>”]。

[0070] 在优选的同源性比较中,在长度为至少 10 个氨基酸,优选至少 20 个氨基酸,更优选至少 30 个氨基酸残基的序列区域内存在同一性。

[0071] “抗体”以最广含义使用,并且具体涵盖多克隆抗体和抗体片段,只要它们表现出

期望的生物活性即可。具体地,抗体是包括至少一个或两个重链(H)可变区(本文缩写为VHC)和至少一个或两个轻链(L)可变区(本文缩写为VLC)的蛋白。VHC区和VLC区可进一步细分为称为“互补决定区”(“CDR”)的高变区,其散布于更保守的称为“框架区”(FR)的区域中。框架区和CDR的范围已被精确定义(参见,Kabat, E. A., 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白序列),第5版,美国卫生和公共服务部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH公布第91-3242号,1991,和 Chothia, C. 等人, J. Mol. Biol. 196 :901-917, 1987, 它们通过引用并入本文)。

[0072] 优选地,各VHC和VLC由从氨基末端到羧基末端以如下次序排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0073] 抗体的VHC或VLC链可以进一步包括重链或轻链恒定区的全部或部分。在一个实施方案中,抗体是两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的四聚体,其中所述免疫球蛋白重链和轻链通过例如二硫键互相连接。重链恒定区包括三个结构域:CH1、CH2和CH3。轻链恒定区由一个结构域CL构成。重链和轻链的可变区含有与抗原互相作用的结合结构域。抗体的恒定区通常介导抗体与包括下列的宿主组织或因子的结合:免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)。术语“抗体”包括型IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(以及它们的亚型)的完整免疫球蛋白,其中所述免疫球蛋白的轻链可以是 κ 型或 λ 型。

[0074] 如本文所用的术语抗体还指结合艰难梭菌的毒素(例如,毒素B)的抗体的部分,例如,其中一条或更多条免疫球蛋白链不是全长,但结合毒素的分子。涵盖在术语抗体中的结合部分的实例包括(i) Fab片段,由VLC、VHC、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包括由铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VHC和CH1结构域组成的Fc片段;(iv) 由抗体单臂的VLC和VHC结构域组成的Fv片段;(v) dab片段(Ward等人, Nature 341 :544-546, 1989),其由VHC结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR),其具有足够的框架来结合例如可变区的抗原结合部分。轻链可变区的抗原结合部分和重链可变区的抗原结合部分,例如, Fv片段的两个结构域VLC和VHC可以使用重组方法通过合成的连接子连接,所述合成的连接子使得它们可以作为单个蛋白链制备,在该单个蛋白链中VLC和VHC区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见,例如, Bird等人(1988) Science 242 :1521-1524;和 Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883)。这种单链抗体也涵盖在术语抗体内。这些是使用本领域的技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式筛选这些部分的效用。

[0075] 下面是示例了本发明的方面和/或实施方案的附图的简要说明。

[0076] 图1通过亲和色谱对血清中毒素A的抗体进行的测量。将结合毒素A的抗体固定于琼脂糖凝胶上,随后将其洗脱。该图显示了血清加载量与洗脱的毒素A特异性抗体之间的线性关系。实验细节在实施例9中提供。

[0077] 图2通过亲和色谱对血清中毒素A的抗体进行的测量。将结合毒素A的抗体固定于琼脂糖凝胶上,随后将其洗脱。该图展示了用毒素A的类毒素免疫的绵羊中的特异性抗体。毒素A的抗体以大于3mg/ml (3g/升)存在于绵羊血清中。实验细节在实施例9中提供。

[0078] 图3通过用羊抗艰难梭菌毒素A和B混合物被动免疫进行的CDI预防。用10mg/

剂 (▼)、2mg/剂 (■) 的毒素 A 和 B 的羊抗体或用非特异性对照抗体 (●) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -2 天接受克林霉素, 并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (2×10^2 菌落形成单位) 攻击。存活率、攻击后的天数由曲线显示。

[0079] 图 4 通过用羊抗艰难梭菌毒素 A 或 B 被动免疫进行的 CDI 预防。用 10mg/剂的毒素 A+B 的羊抗体 (▼)、10mg/剂的单独毒素 A 抗体 (△)、10mg/剂的单独毒素 B 抗体 (○) 或用非特异性对照抗体 (□) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -2 天接受克林霉素, 并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (2×10^2 菌落形成单位) 攻击。存活率、攻击后的天数由曲线显示。

[0080] 图 5 用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 混合物被动免疫进行的对 027 核糖核酸型 ‘高毒力’ 艰难梭菌 (菌株 R20291, Stoke Mandeville) 诱导的 CDI 的预防。用 10mg/剂的毒素 A 和 B 羊抗体 (▼) 或用非特异性对照抗体 (■) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -3 天接受克林霉素, 并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (1×10^3 菌落形成单位) 攻击。在攻击后不同天数的疾病状态由曲线显示。

[0081] 图 6 用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 混合物被动免疫进行的对 078 核糖核酸型 ‘高毒力’ 艰难梭菌 (毒素型 5) 诱导的 CDI 的预防。用 10mg/剂的毒素 A 和 B 羊抗体 (▼) 或用非特异性对照抗体 (●) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -2 天接受克林霉素, 并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (2×10^3 菌落形成单位) 攻击。在攻击后不同天数的疾病状态由曲线显示。

[0082] 实施例概述

[0083] 实施例 1 毒素型 0 的艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化

[0084] 实施例 2 其他毒素型的艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化

[0085] 实施例 3 重组艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化

[0086] 实施例 4 艰难梭菌二元毒素的纯化

[0087] 实施例 5 艰难梭菌毒素 A 和 B 的类毒素的制备

[0088] 实施例 6 抗血清的制备

[0089] 实施例 7 毒素型 0 的毒素 A 和 B 的抗血清的制备

[0090] 实施例 8 使用体外细胞测定进行的抗血清对毒素的中和功效的评估

[0091] 实施例 9 使用免疫亲和柱定量血清中艰难梭菌毒素的特异性抗体的量

[0092] 实施例 10 抗体混合物的制备

[0093] 实施例 11 羊抗体用于预防 CDI 的体内功效的评估

[0094] 实施例 12 羊抗血清用于治疗 CDI 的体内功效的评估

[0095] 实施例 13 抗体制剂的临床应用

[0096] 实施例 14 通过用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 抗体混合物被动免疫进行的 CDI 预防

[0097] 实施例 15 通过用羊抗艰难梭菌毒素 A 或 B 抗体、或用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 抗体混合物被动免疫进行的 CDI 预防

[0098] 实施例 16 用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 混合物被动免疫进行的对 027 核糖核酸型 ‘高毒力’ 艰难梭菌 (菌株 R20291, Stoke Mandeville) 诱导的 CDI 的预防

[0099] 实施例 17 用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 混合物被动免疫进行的对 078 核糖核酸型 ‘高毒力’ 艰难梭菌分离株诱导的 CDI 的预防

[0100] SEQ ID NO 概述

[0101] 在下列 SEQ ID NO 的任一个中指示了起始 Met 氨基酸残基或相应的起始密码子时,所述残基 / 密码子是任选的。

[0102] 1. 艰难梭菌毒素 A- 毒素型 0 的蛋白序列

[0103] 2. 艰难梭菌毒素 B- 毒素型 0 的蛋白序列

[0104] 3. 艰难梭菌毒素 A- 毒素型 III 的蛋白序列

[0105] 4. 艰难梭菌毒素 B- 毒素型 III 的蛋白序列

[0106] 5. 艰难梭菌二元毒素片段 A 的蛋白序列

[0107] 6. 艰难梭菌二元毒素片段 B 的蛋白序列

实施例

[0108] 实施例 1 毒素型 0 的艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化

[0109] 产生毒素型 0 毒素 A 和 B 的艰难梭菌菌株 (例如, VPI 10463) 按照所描述的 (Roberts 和 Shone (2001) Toxicon 39 :325-333) 生长在透析囊 (dialysis sac) 培养物中。生长后,从透析囊收集细胞浆液,并然后以 10000×g 离心 30 分钟,并将所得上清液的 pH 调节为 pH 7.5,并使其关于硫酸铵为 70% 饱和。通过离心收集含有毒素的沉淀,然后重悬于 50mM bistris pH 6.5 缓冲液并使其在 4℃ 对同一缓冲液透析。透析后,通过 Q 琼脂糖色谱、阴离子交换色谱和用 NaCl 梯度洗脱的含有毒素的蛋白峰来纯化粗毒素 A 和 B 的溶液。将含有毒素 A 的峰对含有 0.5M NaCl 的 50mM Hepes pH 7.4 缓冲液透析并在 Zn 螯合柱 (Zn 琼脂糖) 上纯化。加载毒素并从柱上洗去污染蛋白后,用含有 50mM Hepes pH 7.4、20mM EDTA 和 0.1M NaCl 的缓冲液洗脱纯化的毒素 A。将纯化的毒素 A 对含有 0.15M NaCl 的 50mM Hepes pH 7.4 缓冲液透析并储存在 4℃ 或冷冻直至使用。通过在高分辨的 Mono Q 阴离子交换树脂柱上的色谱来进一步纯化来自最初的 Q 琼脂糖柱的含有毒素 B 的峰。在将毒素加载到在 50mM bistris pH 6.5 缓冲液中的柱之后,用 NaCl 梯度洗脱纯化的毒素 B 并收集含有毒素的级分。将纯化的毒素 B 对含有 0.15M NaCl 的 50mM Hepes pH 7.4 缓冲液透析并储存在 4℃ 或冷冻直至使用。

[0110] 实施例 2 其他毒素型的艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化

[0111] 代表任何已知毒素型的毒素 A 和 B 可按照实施例 1 中所描述的进行纯化。产生各种毒素型的毒素 A 和 B 的已知艰难梭菌菌株在表 1 中给出,并且通过选择纯化所需的菌株,可以纯化所需毒素型的毒素 A 和 B。可选择地,可以按先前所描述的 (Rupnik 等人 (1998) J. Clinical Microbiol. 36 :2240-2247 ;Rupnik 等人 (2001) Microbiology 147 :439-447) 对艰难梭菌进行毒素分型直到获得产生期望毒素型的毒素的艰难梭菌菌株。

[0112] 为产生毒素型 III 毒素 A 和 B,将艰难梭菌菌株 R20291 (也称为 NCTC 13366) 按所描述的 (Roberts 和 Shone (2001) Toxicon 39 :325-333) 生长在透析囊培养物中,并按实施例 1 中所描述的纯化毒素。

[0113] 实施例 3 重组艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化

[0114] 艰难梭菌毒素 A 和 B 的实例的氨基酸序列显示在 Seq ID 1 至 4 中。具有对于任何期望表达宿主 (例如,大肠杆菌 (E. coli)、巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris)) 的密码子偏倚的编码这些肽的基因可以商业形式得到。使用标准的分子生物学方法 (例如 Sambrook

等人 1989, Molecular Cloning a Laboratory Manual (分子克隆实验室手册), 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) 从这些基因表达肽并通过疏水相互作用色谱、离子交换色谱和陶瓷羟基磷灰石色谱的组合纯化所得的可溶性的表达多肽。可以使用对蛋白纯化领域来说熟知的其他色谱技术, 例如尺寸排阻色谱和 / 或亲和色谱。对于后者来说, 可以与亲和纯化标签 (例如, 组氨酸 -6、strep 标签) 一起表达重组片段, 诸如在 pET vector Expression System Manual (pET 载体表达系统手册), 第 11 版, Merck KGaA 出版, Darmstadt, Germany 中所描述的。

[0115] 为了从序列未知的艰难梭菌毒素型产生重组毒素, 必须首先提取 DNA 并通过标准分子生物学方法得到毒素序列。一旦得到序列, 就可以如上从合成的基因表达重组毒素。

[0116] 实施例 4 艰难梭菌二元毒素的纯化

[0117] 艰难梭菌二元毒素片段 A 和 B 的氨基酸序列分别显示在 Seq ID 5 和 6 中。具有对于任何期望表达宿主 (例如, 大肠杆菌、巴斯德毕赤酵母) 的密码子偏倚的编码这些肽的基因可以商业形式得到。使用标准的分子生物学方法 (例如 Sambrook 等人 1989, Molecular Cloning a Laboratory Manual (分子克隆实验室手册), 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) 从这些基因表达肽并通过疏水相互作用色谱、离子交换色谱和陶瓷羟基磷灰石色谱的组合纯化所得的可溶性的表达肽。可以使用对蛋白纯化领域来说熟知的其他色谱技术, 例如尺寸排阻色谱和 / 或亲和色谱。可选择地, 可以与亲和纯化标签 (例如, 组氨酸 -6、strep 标签) 一起表达重组片段, 诸如在 pET vector Expression System Manual (pET 载体表达系统手册), 第 11 版, Merck KGaA 出版, Darmstadt, Germany 中所描述的。

[0118] 如果以不溶性形式制备肽, 则可以用商购获得的表达载体如 pET52b 将它们与组氨酸 -6 纯化标签一起表达, 并通过柱上复性技术复性, 如 Lia 等人的综述和其中所含的参考文献 (Lia M 等人 (2004) Protein Expression & Purification 33, 1-10) 中所描述的, 它们通过引用并入本文。

[0119] 实施例 5 艰难梭菌毒素 A 和 B 的类毒素的制备

[0120] 将浓度为 0.2-2mg/ml 的纯化的艰难梭菌毒素对合适的缓冲液 (例如, 含有 150mM NaCl 的 10mM Hepes 缓冲液 pH 7.4) 透析, 然后添加终浓度为 0.05% 至 0.5% 的甲醛并在 35°C 下孵育 1 至 25 天。孵育后, 通过透析移除甲醛。不同的肽之间用甲醛处理的条件可以变化, 并且最终的条件可以基于预防功效评估结果来细调。

[0121] 实施例 6 抗血清的制备

[0122] 在制备抗血清期间要考虑大量因素以达成最佳的体液抗体应答。这些因素包括:

[0123] 动物品种

[0124] 佐剂选择

[0125] 免疫位点的数目和位置

[0126] 免疫原的数量

[0127] 给药的次数和给药之间的间隔

[0128] 作为优化这些参数的结果, 常规的是获得超过 6g/L 血清的特异性抗体水平。

[0129] 对于绵羊, 将含有 10 至 500 μ g 的艰难梭菌抗原的 2ml 缓冲液与 2.6ml 弗氏佐剂混合。完全形式的佐剂用于初免, 不完全弗氏佐剂用于所有的后续加强。佐剂混合持续进

行几分钟以确保稳定的乳液。使用约 4.2ml 的抗原 / 佐剂混合物来通过肌肉注射免疫每只绵羊并覆盖了包括颈部和所有上肢的 6 个位点。每 28 天重复一次这种免疫。在每次免疫后的 14 天取血液样品。一旦达到了足够的抗体水平,将更大体积 (10ml/kg 体重) 移入无菌袋中。缓慢旋转袋子以加速凝血,以 $4500 \times g$ 离心 30 分钟并在无菌条件下取出血清并收集。从群体中移出显示对期望的艰难梭菌抗原的低效价的任何动物。

[0130] 实施例 7 毒素型 0 的毒素 A 和 B 的抗血清的制备

[0131] 按照实施例 1 中所描述的制备来自毒素型 0 菌株 (例如, VPI 10463) 的毒素 A 和 B。可选择地,毒素 A 或 B 可以按照 Yang 等人所述的重组方法 (Yang G, Zhou B, Wang J, He X, Sun X, Nie W, Tzipori S, Feng H(2008) Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium* (巨大芽孢杆菌中的重组艰难梭菌毒素 A 和 B 的表达). BMC Microbiol. 8:192) 制备。可以按照实施例 5 中所描述的方法对纯化的毒素制备类毒素。

[0132] 对于用类毒素 A 或 B 免疫绵羊,将含有 10 至 $500 \mu g$ 的艰难梭菌类毒素 A 或 B 的 2ml 缓冲液与 2.6ml 弗氏佐剂混合。完全形式的佐剂用于初免,不完全弗氏佐剂用于所有的后续加强。佐剂混合持续进行几分钟以确保稳定的乳液。混合后,使用大约 4.2ml 的抗原 / 佐剂混合物来通过肌肉注射免疫每只绵羊并覆盖了包括颈部和所有上肢的 6 个位点。每 28 天重复一次这种免疫并且在每次免疫后 14 天收集血清样品。一旦达到了足够的抗体水平,将更大的生产样品 (10ml/kg 体重) 移入无菌袋中。缓慢旋转袋子以加速凝血,以 $4500 \times g$ 离心 30 分钟并在无菌条件下取出血清并收集。将显示对毒素 A 或 B 的低效价的任何动物从群体中略去。

[0133] 实施例 8 使用体外细胞测定进行的抗血清对毒素的中和功效的评估

[0134] 抗艰难梭菌毒素抗血清的毒素中和活性通过使用 Vero 细胞的细胞毒性测定来测量。将固定量的纯化的艰难梭菌毒素 A 或毒素 B 与多种稀释度的抗体混合,在 $37^{\circ}C$ 下孵育 1 小时,然后应用于生长在 24 孔组织培养板上的 Vero 细胞。毒素 A 和 B 均具有导致 Vero 细胞在 24-72 小时的期间内特征性变圆的细胞毒活性。在存在中和抗体的条件下,这种活性被抑制并且抗体制剂的中和强度可以通过中和指定量的毒素 A 或 B 的作用所需的稀释度来评估。

[0135] 展示艰难梭菌毒素 A 的羊抗体的中和活性的数据显示在表 2 中。在此实验中,将多种稀释度的羊抗体与终浓度为 50ng/ml 的毒素 A 混合并在 $37^{\circ}C$ 下孵育 1 小时,然后应用于上述 Vero 细胞并在 $37^{\circ}C$ 下孵育,在 24-72 小时期间监测。计算保护细胞抵抗毒素 A 的细胞毒作用的抗体稀释度。表 2 显示免疫 14 周的绵羊具有 16000 的中和效价 (即, 1/16000 稀释度的血清保护细胞免于毒素 A 的细胞毒作用)。

[0136] 表 2- 针对甲醛处理的毒素 A 产生的羊抗体的中和效价:

[0137]	接种次数	免疫时间 (周)	抗体中和效价 [¶]
	0	0	<10
	1	0	<10
	2	6	2000
	3	10	4000
	4	14	16000

[0138] [¶]在细胞中和测定中中和 50ng/ml 毒素 A 所需的血清的稀释度

[0139] 表 3- 针对甲醛处理的毒素 B 产生的羊抗体的中和效价: 这些数据 (下面) 显示如通过 Vera 细胞的细胞毒性测定测量的, 类毒素 B 抗原的较高的免疫剂量导致更好的羊毒素 - 中和免疫应答。所采用的测定在紧靠上面的实施例 8 中描述。

[0140]	艰难梭菌类毒素 B 的免疫剂量 (μg)	在细胞测定中针对毒素 B 的中和效价 [¶]
	绵羊抗类毒素 B (10 μg)	1/1280
	绵羊抗类毒素 B (50 μg)	1/2560
	绵羊抗类毒素 B (250 μg)	1/10240

[0141] 所有动物被给予 2 剂量的甲醛处理的毒素 B

[0142] ¶ 在细胞中和测定中完全中和 0.5ng/ml 毒素 B 所需的血清的稀释度

[0143] 表 4- 羊抗毒素 B 对等同浓度的来自毒素型 0 和毒素型 III 的毒素 B 的中和效价

[0144] 这些数据 (下面) 比较了针对源自毒素 B (毒素型 0) 的类毒素 B 产生的羊抗体中和等同量的毒素 B (毒素型 0) 和毒素 B (毒素型 III) 的能力。毒素 B (毒素型 0) 和毒素 B (毒素型 III) 分别由艰难梭菌菌株 VPI 10463 和 R20291 纯化。

[0145] 细胞测定使用等同细胞毒性量的每种毒素 B 类型按照紧靠上文的实施例 8 中所描述的进行。在一个实验中对固定的 4 单位 (诱导细胞死亡所需的量的 4 倍) 毒素 B 进行滴定并且在另一实验中使用 10 单位。

[0146] 数据显示使用源自毒素型 0 菌株的类毒素 B 产生的针对毒素 B 的羊抗体以相同的功效中和毒素 B (毒素型 0) 和毒素 B (毒素型 III)。

[0147]	毒素型	羊抗毒素 B-中和效价	
		4 单位毒素 B	10 单位毒素 B
	毒素 B-毒素型 0	2560	1280
	毒素 B-毒素型 III	2560	1280
	相对效价 (0:III)	1	1

[0148] 表 5- 羊抗毒素 B 对等同浓度的来自毒素型 0 和毒素型 V 的毒素 B 的中和效价

[0149] 这些数据比较了针对源自毒素 B (毒素型 0) 的类毒素 B 产生的羊抗体中和等同量的毒素 B (毒素型 0) 和毒素 B (毒素型 V) 的能力。毒素 B (毒素型 0) 和毒素 B (毒素型 V) 分别由艰难梭菌菌株 VPI 10463 和艰难梭菌核糖核酸型 078 分离株纯化。

[0150] 细胞测定使用等同细胞毒性量的每种毒素 B 类型按照实施例 8 进行。在一个实验中对固定的 4 单位 (诱导细胞死亡所需的量的 4 倍) 毒素 B 进行滴定并且在另一实验中使用 10 单位。

[0151] 数据显示使用源自毒素型 0 菌株的类毒素 B 产生的针对毒素 B 的羊抗体中和毒素 B (毒素型 0) 并且还以降低 2 倍的功效中和毒素 B (毒素型 V)。

[0152]	毒素型	羊抗毒素 B-中和效价	
		4 单位毒素 B	10 单位毒素 B
	毒素 B-毒素型 0	2560	1280
	毒素 B-毒素型 V	1280	640
	相对效价 (0:V)	2	2

[0153] 实施例 9 使用免疫亲和柱定量血清中艰难梭菌毒素的特异性抗体的量

[0154] 柱制备

[0155] 称重所需量的 CNBr- 激活的琼脂糖凝胶 4FF (Sepharose 4 Fast Flow) (0.5g 干

重)放入合适的干净容器(玻璃或塑料的)中。添加约 10ml 的稀盐酸(1mM)以使凝胶膨胀,并且在 20-30 分钟后,将凝胶转移到 10-mL 玻璃柱中并再用 20mL 的 HCl(1mM)洗涤,随后用 20mL 的偶联缓冲液(碳酸氢钠,100mM, pH 8.3,含有 500mM 氯化钠)洗涤。用偶联缓冲液将浓度为 1mg/mL 的毒素(毒素 A、毒素 B 或二元毒素片段)溶液(1mL)稀释至 5mL 并添加至含有激活的凝胶的柱中,并轻轻混合内容物直到凝胶重悬,在室温下旋转过夜(16-18 小时)。排空柱并添加 5ml 阻断试剂(乙醇胺溶液,1M),轻轻混合并在室温下旋转 2 小时。接着,先后用 20mL 偶联缓冲液和 20mL 洗脱缓冲液(甘氨酸溶液 100mM, pH 2.5)洗涤柱。重复此步骤两次。最后用 20mL 的测定缓冲液(含有 500mM 氯化钠和终浓度为 1g/L 的叠氮化钠的磷酸钠缓冲液,10mM, pH 7.4)洗涤柱并在 2-8℃下储存在 3-5mL 的测定缓冲液中直到使用。

[0156] 柱评估

[0157] 在使用前必须测定柱的特异性结合和非特异性能力。从冰箱中拿出柱并使其在室温下平衡,然后用 25mL 测定缓冲液洗涤。将递增体积的产物(全抗血清、纯化的 IgG、Fab 或 F(ab')₂)分别加载到柱上并在室温下轻轻翻转混合 1 小时。用 25mL 测定缓冲液洗去未结合级分并且然后用 20ml 洗脱缓冲液(甘氨酸缓冲液 100mM, pH 2.5)将结合级分从柱洗脱。洗脱的级分的蛋白含量在 280nm 以分光光度法使用关于产物的消光系数确定,关于产物的消光系数即对于绵羊 IgG 为 1.5(Curd 等人,1971)或对于绵羊 Fab 和 F(ab')₂ 为 1.4(Allen,1996)。通过绘制洗脱蛋白的量与加载体积的曲线来获得饱和曲线。

[0158] 使用免疫前正常绵羊血清(NSS)评估非特异性结合(NSB)。因此,必须区分这种结合与由于正常血清中某些特异性抗体引起的结合(因为所有动物都将暴露于艰难梭菌)。图 1 展示典型的结合能力曲线,该曲线显示了由于增加抗血清加载体积所引起的特异性结合增加。随着加载体积的增加,非特异性结合(NSB)仅有少量改变。0.5g(1.5-2.0mL 膨胀凝胶)含有 1mg 毒素(偶联率为 2mg/g)对于加载的特异性抗血清的体积(0.5-4mL)是足够的。然而,为了容易和方便计算,1ml 是建议的加载体积。

[0159] 10 个重复的变异系数(在测定之间的 CV)是大约 6%。随着时间推移柱容量没有降低(在使用 80-100 次时评估)。这表明没有毒素从柱中浸出。

[0160] 用于产物评估的亲合柱

[0161] 该柱用于过程中产物和终产物即全抗血清、纯化的 IgG、Fab 和 F(ab')₂ 的 GMP/GLP 评估。它还用于评估和监测被免疫动物的免疫应答并检测人样品中的抗毒素抗体。

[0162] 从冰箱中拿出柱并使其在室温下平衡,然后用 25mL 测定缓冲液洗涤。将产物(1mL)添加到柱中并在室温下轻轻翻转混合 1 小时,然后用 25mL 测定缓冲液(含有 500mM 氯化钠和终浓度为 1g/L 的叠氮化钠的磷酸钠缓冲液,10mM, pH 7.4)洗掉未结合级分。然后用 20ml 洗脱缓冲液(甘氨酸缓冲液 100mM, pH 2.5)洗脱结合级分并且使用关于产物的消光系数在 280nm 以分光光度法确定其蛋白含量。图 2 显示来自用毒素 A 的类毒素免疫的绵羊的血清的分析。

[0163] 实施例 10 抗体混合物的制备

[0164] 将抗体共混形成终产物以便使最终的混合物中存在所需的针对毒素 A 和 B 的中和活性以及它们的各种亚型(毒素型)。

[0165] 可以共混针对各种艰难梭菌毒素型制备的抗体以提供与实施例 10 中所评估的类

似的交叉保护功效。例如,为提供针对源自毒素型 0 和 III 的抗艰难梭菌毒素 B 的类似交叉保护,可以将抗体以多种比例(例如,1 : 1、2 : 1、1 : 2 的比率)混合以提供针对每种毒素 B 毒素型的相似的特异性中和活性。

[0166] 实施例 11 羊抗体用于预防 CDI 的体内功效的评估

[0167] 为证明抗 CDI 抗体在体内的预防(防止)功效,用具有针对一种或多种艰难梭菌的毒素的中和活性的羊抗体被动免疫叙利亚仓鼠。为评估预防功效,在攻击前 96 小时至用艰难梭菌攻击后 240 小时的不同时间以静脉内或腹膜内途径给予仓鼠抗体。

[0168] 给被动免疫的仓鼠施用广谱抗生素(例如,克林霉素)并且在 12-72 小时后用艰难梭菌孢子经口攻击。然后监测动物艰难梭菌相关疾病的症状多达 15 天。对照、未免疫的动物发展有疾病的病征(例如,腹泻、腹胀、昏睡、皱毛),而用羊抗体被动免疫的那些则显示正常。

[0169] 实施例 12 羊抗血清用于治疗 CDI 的体内功效的评估

[0170] 为证明抗血清在体内治疗 CDI 的功效,用具有针对一种或多种艰难梭菌毒素的中和活性的羊抗体被动免疫叙利亚仓鼠。为评估治疗制剂的功效,在用艰难梭菌攻击后 6 小时至攻击后 240 小时的不同时间以静脉内或腹膜内途径给予仓鼠抗体。

[0171] 在被动免疫之前,给仓鼠施用广谱抗生素(例如,克林霉素)并且在 12-72 小时后用艰难梭菌孢子经口攻击。然后监测动物艰难梭菌相关疾病的症状多达 15 天。对照、未免疫的动物发展有疾病的病征(例如,腹泻、腹胀、昏睡、皱毛),而用羊抗体处理的那些则显示正常。

[0172] 实施例 13 抗体制剂的临床应用

[0173] 三个实例用来例示具有不同严重程度的 CDI 的患者中系统性羊产物(systemic ovine products)的治疗价值。

[0174] 轻度 CDI

[0175] 一位 67 岁男性在重度心肌梗塞后被允许进入冠心病监护室。他在平静地恢复时发展了轻度腹泻而没有任何其他病征或症状。由于该医院中最近有 CDI 发作,立即将粪便样品送去测试,并且发现含有毒素 A 和毒素 B。在隔离到带有卫生间的单独病房中后,他静脉内接受了 250mg 的羊 F(ab')₂,随后在两天后接受第二次注射。他的腹泻迅速停止并且不需要甲硝唑或万古霉素的情况下完全恢复。

[0176] 具有复发风险的重度 CDI

[0177] 一位 81 岁的女性在家中摔倒并且遭受了左髌骨折。立即让她入院,并且髌部被成功以骨钉固定。她虚弱的状况阻止了她早出院,并且若干天之后,她发展了排痰性咳嗽,为此给予她广谱抗生素。在又 8 天后,她发展了伴有腹痛和触痛的过度腹泻,并且通过适当的粪便测试诊断为 CDI。此时,还具有包括显著增加的白细胞计数的感染和显著的液体流失伴脱水的系统性表现的迹象。立即开始给患者口服万古霉素并且同时静脉内接受每日 5 次注射 250mg 基于羊 F(ab')₂ 的产物的第一次。病征和症状以及 CDI 的实验室表现迅速消退。然而,为了避免在停止万古霉素后她的 CDI 复发的风险,继续对她用口服形式的抗体治疗法治疗两周。她没有经历复发。

[0178] 具有并发症的重度 CDI

[0179] 一位 87 岁的女性在居住在长期护理机构时发展了支气管肺炎。当地的全科医师

开始对她进行抗生素疗程,并具有立即的有益效果。然而,在停止抗生素后 8 天,她经历了重度腹泻。她的情况开始恶化而被迫入院,在医院中通过 ELISA 测试在她的粪便中检测到了毒素 A。此时,她的病情极为恶劣,并且具有循环衰竭的迹象,且她的腹泻已停止。发现后者是由于麻痹性肠梗塞和中毒性巨结肠联合造成的并且认为紧急的完全结肠切除术是必须的。由于这种手术伴有超过 60% 的死亡率,她接受了静脉内替代治疗以及 2 安瓿 (500mg) 的产物内容物。在 4 小时后进入手术室时,她的总体状况已显著改善并且在手术后存活下来。

[0180] 实施例 14 通过用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 抗体混合物被动免疫进行的 CDI 预防

[0181] 用 10mg/剂 (▼)、2mg/剂 (■) 的毒素 A 和 B 的抗体或用非特异性对照抗体 (●) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -2 天接受克林霉素,并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (2×10^2 菌落形成单位) 攻击。存活率、攻击后的天数由曲线显示。

[0182] 数据 (参见图 3) 清楚地显示用毒素 A 和 B 的羊抗体的混合物进行的被动免疫提供了对 CDI 的预防。在此实验中,给予高抗体剂量的动物中 90% 在攻击后 12 天是无症状的。

[0183] 实施例 15 通过用羊抗艰难梭菌毒素 A 或 B 抗体、或用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 抗体混合物被动免疫进行的 CDI 预防

[0184] 用 10mg/剂的毒素 A+B 的羊抗体 (▼)、10mg/剂的单独毒素 A 抗体 (△)、10mg/剂的单独毒素 B 抗体 (○) 或用非特异性对照抗体 (□) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -2 天接受克林霉素,并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (2×10^2 菌落形成单位) 攻击。存活率、攻击后的天数由曲线显示。

[0185] 数据 (参见图 4) 显示关于对 CDI 的预防,毒素 A+B 抗体的混合物的功效显著好于单独的任一给定抗体。

[0186] 实施例 16 用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 混合物被动免疫进行的对 027 核糖核酸型 ‘高毒力’ 艰难梭菌 (菌株 R20291, Stoke Mandeville) 诱导的 CDI 的预防

[0187] 用 10mg/剂的毒素 A 和 B 抗体 (▼) 或用非特异性对照抗体 (■) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -3 天接受克林霉素,并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (1×10^3 菌落形成单位) 攻击。在攻击后不同天数的疾病状态由曲线显示。

[0188] 数据 (参见图 5) 清楚地显示用毒素 A 和 B 的羊抗体的混合物进行的被动免疫提供了对 027 ‘高毒力’ 艰难梭菌 (菌株 R20291, stoke Mandeville) 诱导的 CDI 的预防。在此实验中,给予毒素 A/B 抗体的动物中 90% 在攻击后 18 天是无症状的,而未免疫的对照中 80% 显示重度 CDI 症状。

[0189] 实施例 17 用羊抗艰难梭菌毒素 A 和 B 混合物被动免疫进行的对 078 核糖核酸型 ‘高毒力’ 艰难梭菌分离株诱导的 CDI 的预防

[0190] 用 10mg/剂的毒素 A 和 B 的羊抗体 (▼) 或用非特异性对照抗体 (●) 在指定的时间被动免疫 (腹膜内) 叙利亚仓鼠 (10 只的组)。动物在第 -2 天接受克林霉素,并且在第 0 天用艰难梭菌孢子 (2×10^3 菌落形成单位) 攻击。在攻击后不同天数的疾病状态由曲线显示。

[0191] 数据（参见图 6）清楚地显示用毒素 A 和 B 的羊抗体的混合物进行的被动免疫提供了对 078 ‘高毒力’艰难梭菌诱导的 CDI 的预防。在此实验中，给予毒素 A/B 抗体的动物中 100% 在攻击后 18 天是无症状的，而未免疫的对照中 80% 显示重度 CDI 症状。

[0192] SEQ ID NO

[0193] 1. 艰难梭菌毒素 A- 毒素型 0

[0194] MSLISKEELIKLAYSI RPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKKLNESIDVFMNKYKTSSRNR

[0195] ALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVLN

[0196] TLKKAIVESSTTEALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKS

[0197] HLVSEYNRDETIVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLAL

[0198] KNFGGVYLDVDMPLGIHSDLFKTISRPSISGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNF

[0199] KLIIESKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLN

[0200] PAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINL

[0201] QENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSLEDNGVDFNK

[0202] NTALDKNYLLNNKIPSNVVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLFSKNPKNSII IQRNMNESAKSY

[0203] FLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISP

[0204] KNVEVNLLGCNMFSDYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRIINSEGRKELLAH

[0205] SGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLASISEDIKTLLLDASVSPDTKFI LNNLKL

[0206] NIESSIGDYIYYEKLEPVKNI IHNSIDDLIDEFNLEENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNST

[0207] YSVRFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNIQLDHTSQVNTLNAAFF

[0208] IQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGLNTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVS

[0209] TILDGINLGAAIKELLDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAGISAG

[0210] IPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPIDDLVISEIDFNNNSIKLGTCNILA

[0211] MEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIPSLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPS RVFWWETGAVPGL

[0212] RSLNDGTRLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDDKTRNFIMPTITTNEIRN

[0213] KLSYFSDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINK

[0214] NKLIIGNQTIDFSGDIDNKDRYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNTIEKIN

[0215] TLGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSI IHYKKDSKNILEFYNDSTLEFNSKDFIAEDINVMK

[0216] DDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYL NESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLF LD

[0217] NISFWKLFGFENINFVIDKYGTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYGFWKTSSSKSTIFSGNGRNVVVE

[0218] PIYNPDTGEDISTSLDFSYPELYGIDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYSNEYYPEIIVLNPNTFHKK

[0219] VNINLDSSSFYEYKWSTRGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIM

[0220] SNFKSFENSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDP IEFNLVTGWQTINGKKYY

[0221] FDINTGAALTSYKII NGKHFFYNNDGVMQLGVFKGPDGFYFAPANTQNNNIEGQAI VYQSKFLTNGK

[0222] KYYFDNNSKAVTGWRI INNEKYYFNPNNIAAAVGLQVIDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDTD

[0223] TAI AFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTNGFEYFAPANTYNNNIEGQAI VYQSKFLTNGKKYYF

[0224] DNNSKAVTGLQTIDSKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIA

[0225] STGYTII NGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAI LYQNEGLTLNGKKYYFGSDS

[0226] KAVTGWRI INNKKYYFNPNNIAAAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGV

[0227] FKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLTAEAA

[0228] TGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGP
[0229] NGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQ
[0230] TINGKKYYFNTNTSIASGTIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYGAPANTDANNIEGQAIRYQN
[0231] RFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSGNF
[0232] EYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEI
[0233] DGVYFFGVGDGVKAPGIYG
[0234] 2. 艰难梭菌毒素 B- 毒素型 0 的蛋白序列
[0235] MSLVNRKQLEKMANVRFRTEDEYVAILDAL E EYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYIDTYKKSGRN
[0236] KALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDYNVNVFYDSNAFLI
[0237] NTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEI IYDKQKNFINYYKAQREENPELI IDDIVK
[0238] TYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDVRNGEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISA
[0239] LKEIGGMYLDVDMPLPGIQPDLFESIEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLEEVQSS
[0240] FESVLASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAGNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSL
[0241] NPAISEDNDNFNTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQDLLM
[0242] FKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNIFYEGSLGEDDNLDFS
[0243] QNIVVDKEYLLEKISSLARSSERYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAKTPYDSVLFQKNIEDSEIAYYY
[0244] NPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNTDIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKS
[0245] IEINLLGCNMFSSYSINVEETYPGKLLLKVVDKISELMPSSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSG
[0246] EWINKEESI IKDISSKEYISFNPKENKITVKSKNLPELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINV
[0247] ISNIDTQIVEERIEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIESISDALCDLKQQNELEDSHFISFEDISSETDEGFS
[0248] IRFINKETGESIFVETEKTFSEYANHITTEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLNAAFFIQ
[0249] SLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETIDLLPTLSEGLPIIATI
[0250] IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAITTSSLGIASGFSILLVPLAGISAGIP
[0251] SLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVGTLLDDKIMMPQDDLVI SEIDFNNSIIVLGKCEIWRME
[0252] GSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPGLRS
[0253] LENDGTKLLDRI RDNYEGEFYWR YFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREK
[0254] LSYSFYGSGGTIALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDIEGILSTLSIEEN
[0255] KIIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTGSILEGINATIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNSNHIQQKIDY
[0256] IGFNSELQKNIPYSFVDSEKGNGFINGSTKEGLGVSELPDVVLISKVYMDDSKPSFGYYSNNLKDVKV
[0257] ITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLN SVHLDESGVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLES
[0258] MNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQFEFICDENDNIQPYFIKFNLTETNYTLYVGNRQNM
[0259] VEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKYLYGIDSCVNKVVISPNITYTDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYI
[0260] NEKINVNINDLSIRYVWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSKQDQVPVSE
[0261] IILSFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDK
[0262] YYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIID
[0263] ENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDD
[0264] SGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFD
[0265] DSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTA EAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVIFYFSDSGIIES
[0266] GVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYITIE

[0267] TGWIYDMENESDKYYGNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNYYFNENGEMQGGYIN
[0268] IEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSV
[0269] IIDGEEYYFDPDTAQLVISE
[0270] 3. 艰难梭菌毒素 A- 毒素型 III 的蛋白序列
[0271] MSLISKEELIKLAYSI RPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKKLNESIDVFMNKYKNSSRNR
[0272] ALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFLVN
[0273] TLKKAIVESSTTEALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYKYSQINKPTVPTIDDIKS
[0274] HLVSEYNRDETLLSYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLAL
[0275] KNFGGVYLDVDMPLGIHSDLFKTIPRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNF
[0276] KLIIESKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLN
[0277] PAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMTLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINL
[0278] QENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSSENGVDNFN
[0279] NTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLFSKNPKNSIIQRNMNESAKSY
[0280] FLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISP
[0281] KNVEVNLLGCNMFSDYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEVRIINSEGRKELLAH
[0282] SGKWINKEEAIMSDLSSKEYIGFDSIDNKLKAKSKNIPGLASISEDIKTLLLDASVSPDTKGILNNLKL
[0283] NIESSIGDYIYYEKLEPVKNI IHNSIDDLIDEFNLLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNST
[0284] YSVRFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNTQLDHTSQVNTLNAAFF
[0285] IQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVLQYLAQLFSTGLNTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVS
[0286] TILDGINLGAAIKELLDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTFLLFIAGISAG
[0287] IPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKEYGPLKTEDDKILVPIDDLVISEIDFNNSIKLGT CNILA
[0288] MEGGSGHTVTGNIDHFFSPYISSHIPSLSVYSAIGIKTENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGL
[0289] RSLNNGTKLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNTKIKLDKDTRNFIMPTITTDEIRN
[0290] KLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISMNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINK
[0291] NKLIIGNQTI DFGSDIDNKDRYIFLTCELDDKISLII E INLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNTIEKIN
[0292] TLGLDSKNIAAYNTDESNNKYFGAISKTSQKSI IHYKKDSKNILEFYNGSTLEFNSKDFIAEDINVFMK
[0293] DDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYLNESVYSSYLD FVKNSDGHHTSNFMNLFNL
[0294] NISFWKLFGFENINFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNGRNVVVE
[0295] PIYNPDTGEDISTSLDFSYPELYGIDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKK
[0296] VNINLDSSSFYKWKSTEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIM
[0297] SNFKSFENSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDP IESNLVTGWQTINGKKYY
[0298] FDINTGAASTSYKIINGKHFFYFNNGVMQLGVFKGPDGFEYFAPANTQNNNIEGQAI VYQSKFLTNGK
[0299] KYYFDNDSKAVTGWRIINNEKYFFNPNNIAAAGVLQVIDNNKYFFNPDTAII SKGWQTVNGSRYYFDTD
[0300] TAI AFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIEGQAI VYQSKGLTLNGKKYYF
[0301] DNNSKAVTGWQTIDSKKYFFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIA
[0302] STGYTIINGKYFFNTDGI MQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIYQNKFLTNGKKYYFGSDS
[0303] KAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAAATHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGV
[0304] FKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKKYFFNLNTAVAV
[0305] TGWQTIDGEKYFFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFFNTNTYIASTGYTIINGKHFFYFNTDGI MQIGVFKGP

[0306] DGF EYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQ
[0307] TINGKKYYFNTNTYIASTGYTIIISGKHFFYNTDGMQIGVFKGPDGF EYFAPANTDANNIEGQAIRYQN
[0308] RFLYLHDNIYYGGNDSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYGRNGLPQIGVFKGPNGG
[0309] EYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVVYFMPDTAMAAAGGLFEI
[0310] DGVIIYFFGVDGVKAPGIYG
[0311] 4. 艰难梭菌毒素 B- 毒素型 III 的蛋白序列
[0312] MSLVNRKQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDALEEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYIDTYKKSGRN
[0313] KALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDYNVNVFYDSNAFLI
[0314] NTLKKTIVESATNDTLESFRENLDNPRFDYNKFYRKRMEI IYDKQKNFINYYKTQREENPDLI IDDI VK
[0315] IYLSNEYSKDI DELNSYIEESLNKV TENSNGNDVRNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAAASDILRISA
[0316] LKEVGGVYLDVDMPLPGIQPDLFESIEKPSSVTVDGWEMVKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLEEEVQSS
[0317] FESVLASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSL
[0318] NPAISEDNDNFNTTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGGFFPDVKTITINLSGPEAYAAAYQDLLM
[0319] FKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFEGSLGEDDNLDFS
[0320] QNTVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAKTPYDSVLFQKNIEDSEIAYYY
[0321] NPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNTDIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKS
[0322] IEINLLGCNMFSYSVNVEETYPGKLLL RVKDKVSELMPSSISQDSIIVSANQYEVRI NSEGRRELLDHSG
[0323] EWINKEESI IKDISSKEYISFNPKENKIIVKSKNLP ELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLAECEINV
[0324] ISNIDTQVVEGRIEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIESISDALYDLKQQNELEESHFISFEDILETDEGFS
[0325] IRFIDKETGESIFVETEKAI FSEYANHITTEEISKIKGTIFD TVNGKLVKKVNLDA THEVNTLNAAFFIQ
[0326] SLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETIDLLPTLSEGLPVIATI
[0327] IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIITSSLG IASGFSILLVPLAGISAGIP
[0328] SLVNNELILRDKATKVVDYFSHISLAESEGAFTSLDDKIMMPQDDLVI SEIDFNNSNITLGKCEIWRME
[0329] GGSIGHTVTDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPGLRS
[0330] LENDGTKLLDRIRDNYEGEFYWR YFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREK
[0331] LSYSFYGGGTYALSLSQYNMNI NIELNENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGD LIENILSKLSIEDN
[0332] KII LDNHEINFSGTLNGGNFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKTLMANSNSVQQKIDY
[0333] IGLNSELQKNIPYSFMDDKGKENGFINCSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMDNSKPLFGYCSNDLKDVKV
[0334] ITKDDVII LTGYLLKDDIKISLSGTIQDENTIKLNGVYLDENGVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLES
[0335] MNIKSIFINSLQSNTKLILD TNFIIISGTTSIGQFEFICDKDNNIQPYFIKFNTLET KYTLYVGNRQNM I
[0336] VEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKYLYGIDSCVNKVIISPNIYTDEINITPIYEANNTYPEVIVLDTNYI
[0337] SEKINININDLSIRYVWSNDGSDFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFSDKQDVSINK
[0338] VISTFTPSYYVEGLLN YDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIGDDK
[0339] YYGNPDNGGAASVGETIIDGKNYYGSQNGVLQTGVFSTEDGFKYFAPADTLDENLEGEAIDFTGKLTID
[0340] ENVYYFGDNYRAAIEWQTL DDEVYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKFYFNSDGMQKGFVNINDKTFYGDD
[0341] SGVMKSGYTEIDGKYFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFAHHD EDLGNEEGEALSYSGILNFNKKIYYFD
[0342] DSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGISINDGKYFNDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVES
[0343] GMQNIDDNYFYIDENGLVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETY TIE
[0344] TGWIYDMENESDKYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLN

[0345] IEDKTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFYFTDEYIAATGSV

[0346] IIDGEEYYFDPDTAQLVISE

[0347] 5. 艰难梭菌二元毒素片段 A 的蛋白序列

[0348] MKKFRKHKRISNCISILLILYLTLGGLLPNNIYAQDLQSYSEKVCNTTYKAPIESFLKDKEKAKEWERK

[0349] EAERIEQKLERSEKEALESYKKDSVEISKYSQTRNYFYDYQIEANSREKEYKELRNAISKNKIDKPMYV

[0350] YYFESPEKFAFNKVIRTENQNEISLEKFNEFKETIQNKLFKQDGFKDISLYEPGKGDEKPTPLLMHLKL

[0351] PRNTGMLPYTNTNNVSTLIEQGYSIKIDKIVRIVIDGKHYYKAEASVVNSLDFKDDVSKGDSWKGKANYN

[0352] DWSNKLTPNELADVNDYMRGGYTAIINNYLISNGPVNPNPELDSKITNIENALKREPIPTNLTVYRRSG

[0353] PQEFGTLTSPYDGNKLENIDAFKSKWEGQALSYPNFISTSIGSVNMSAFAKRKIVLRITIPKGSPPGA

[0354] YLSAIPGYAGEYEVLLNHGSKFKINKIDSYKDGTITKLIVDATLIP

[0355] 6. 艰难梭菌二元毒素片段 B 的蛋白序列

[0356] MKIQMRNKKVLSFLTTLTAIVSQALVYPVYAQTSTSNHNSKKKEIVNEDILPNNGLMGYYFSDEHFKDLK

[0357] LMAPIKDGNLKFEEKKVDKLLDKDKSDVKSIRWTGRIIPSKDGEYTLSTDRDDVLMQVNTESTISNTLK

[0358] VNMKKGKEYKVRIELQDKNLGSIDNLSSPNLYWELDGMKKIIPPEENLFLRDYSNIEKDDPGIPNNFFD

[0359] PKLMSDWEDEDLTDNDNIPDSYERNGYTIKDLIAVKWEDSFAEQGYKKYVSNYLESNTAGDPYTDYEK

[0360] ASGSFDKAIKTEARDPLVAAYPIVGVGMEKLIISTNEHASTDQGKTVSRATNSKTESNTAGVSVNVGY

[0361] QNGFTANVTTNYSHTTDNSTAVQDSNGESWNTGLSINKGESAYINANVRYNTGTAPMYKVTPPTNLVL

[0362] DGDTLSTIKAQENQIGNNLSPGDTYPKKGLSPLALNTMDQFSSRLIPINYDQLKKLDAGKQIKLETTQV

[0363] SGNFGTKNSSGQIVTEGNSWSDYISQIDSISASIIIDTENESYERRVTAKNLQDPEDKTPELTIGEAIIE

[0364] KAFGATKKDGLLYFNDIPIDESCVELIGDDNTANKIKDSLKTLSDKKIYNVKLERGMNIIKTPTYFTN

[0365] FDDYNNYPSTWSNVNTTNQDGLQGSANKLNGETKIKIPMSELKPYKRYVFSGYSKDPLTSNSIIVKIIKA

[0366] KEEKTDYLVPEQGYTKFSYEFETTEKDSSNIEITLIGSGTTYLDNLSITELNSTPEILDEPEVKIPTDQ

[0367] EIMDAHKIYFADLNFNPSTGNTYINGMYFAPTQTNKEALDYIQKYRVEATLQYSGFKDIGTKDKEMRNY

[0368] LGDPNQPKTNYVNLRSYFTGGENIMTYKKLRITYAITPDDRELLVLSVD

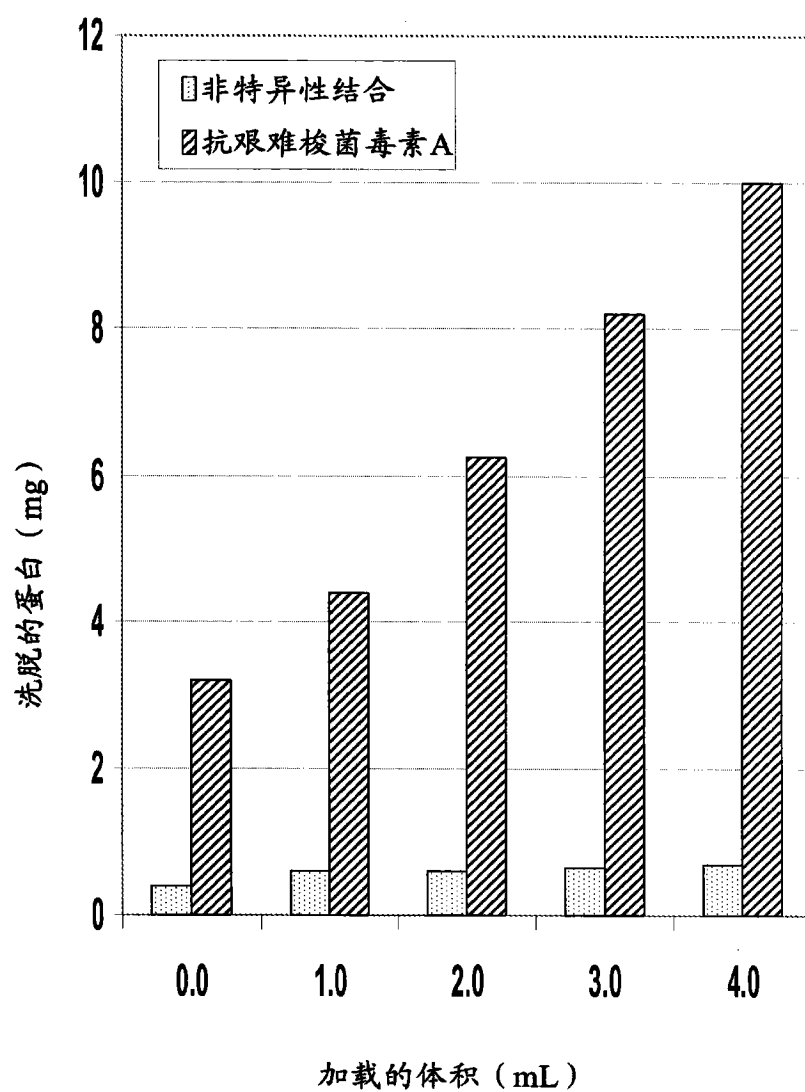


图 1

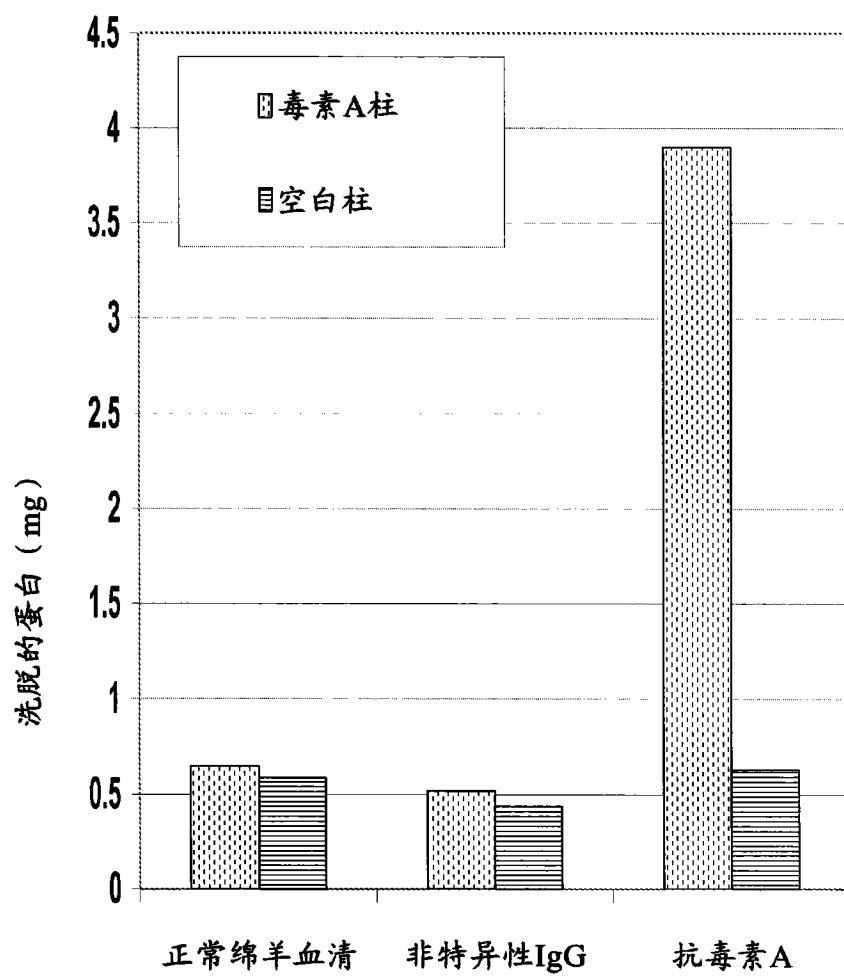


图 2

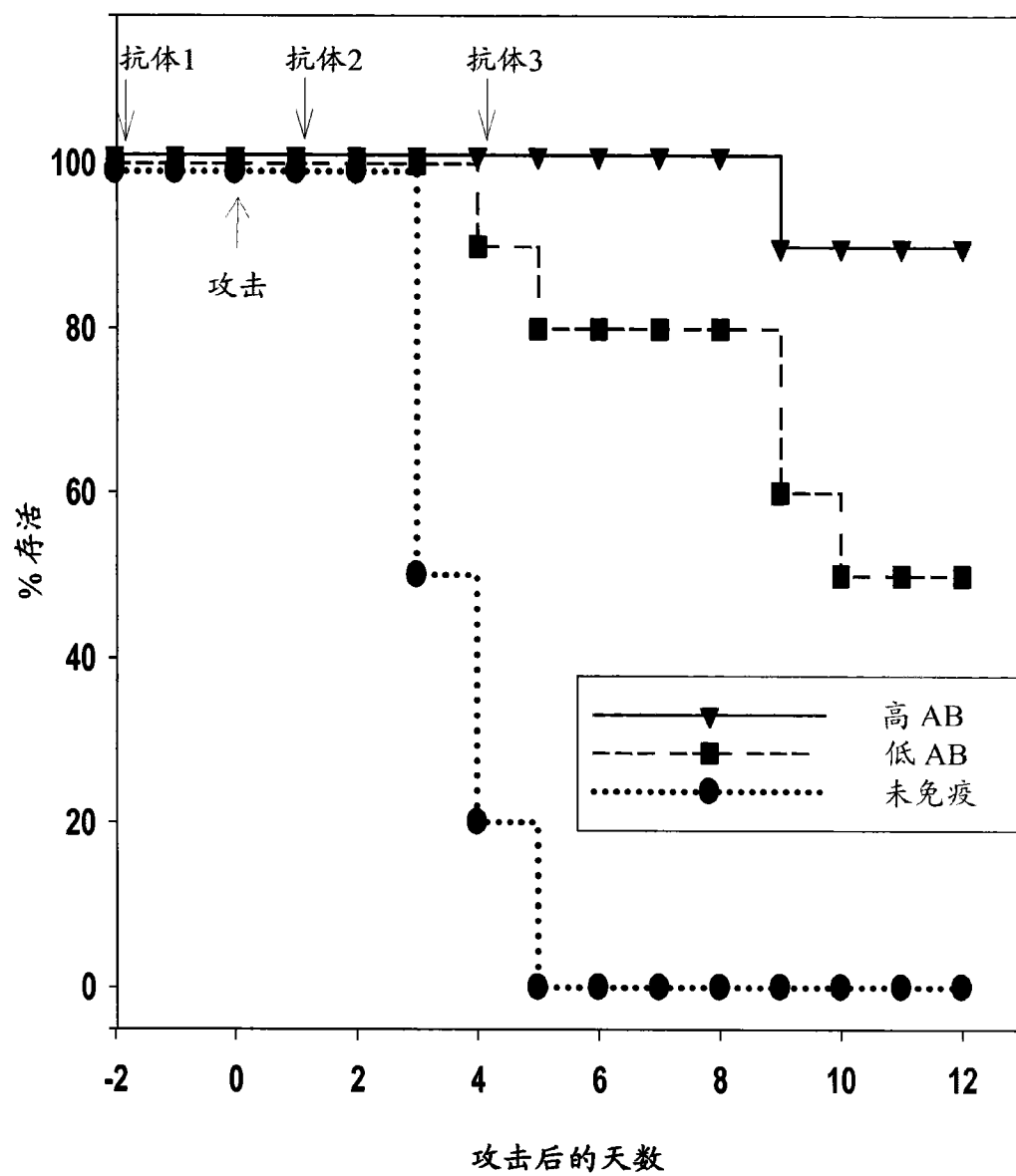


图 3

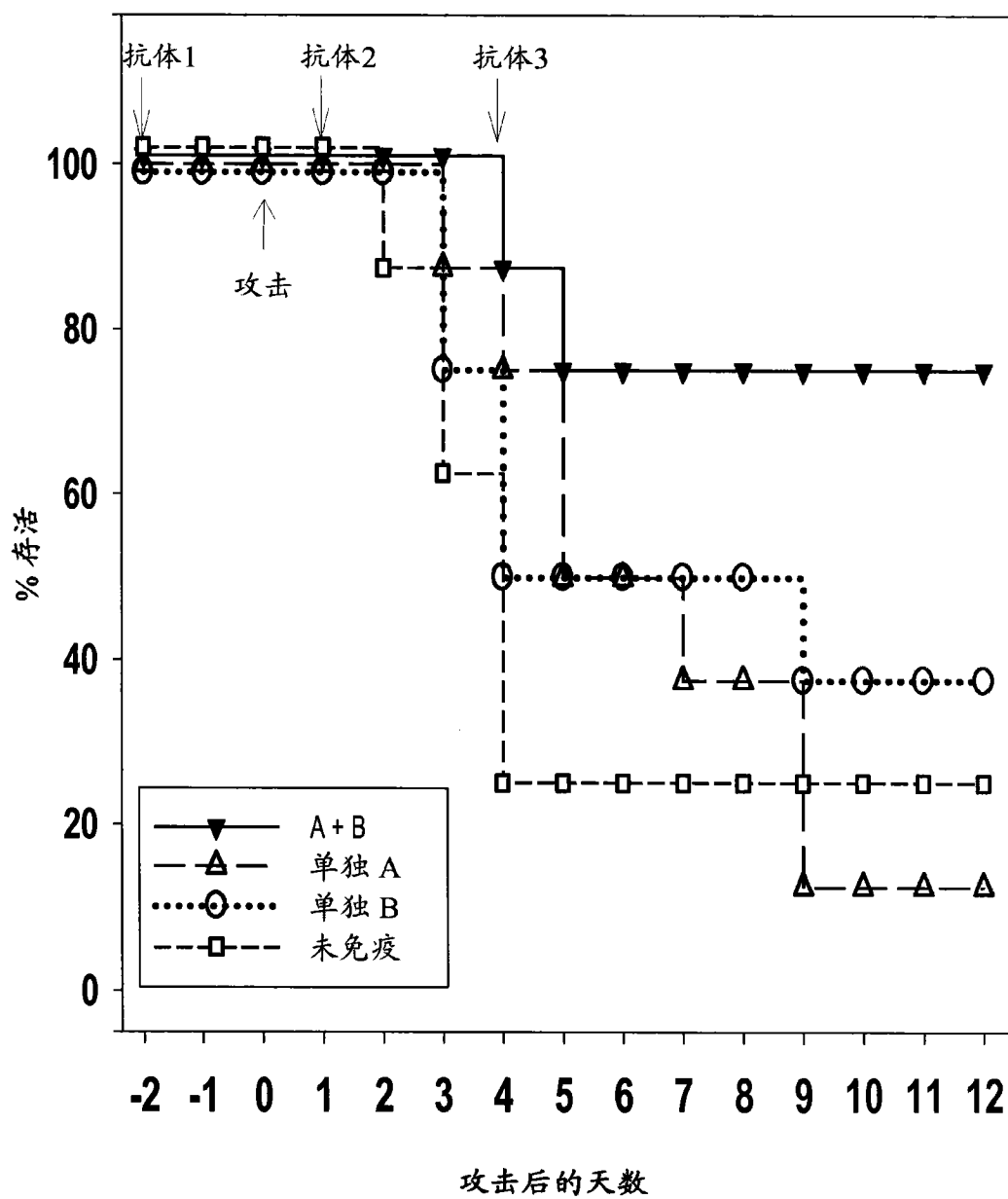


图 4

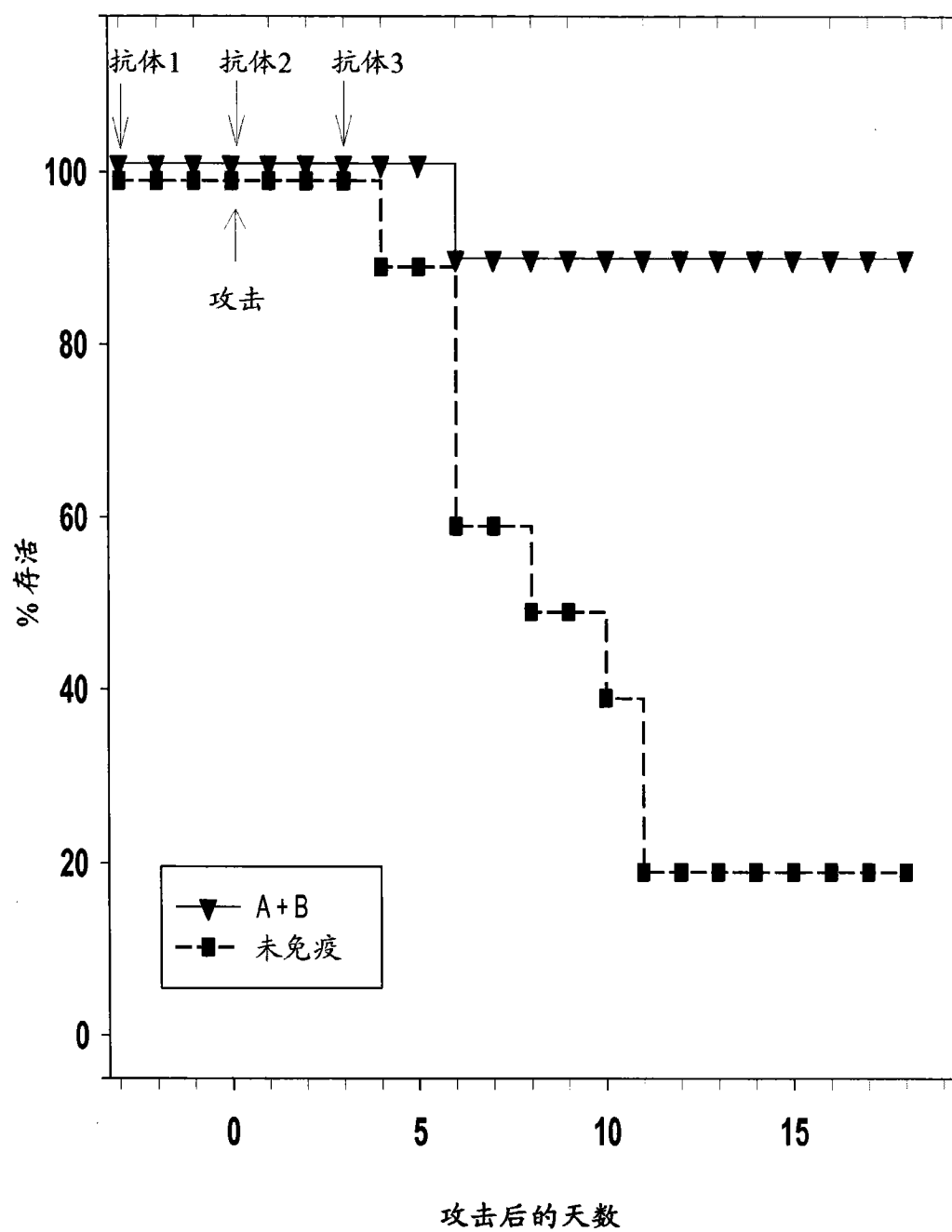


图 5

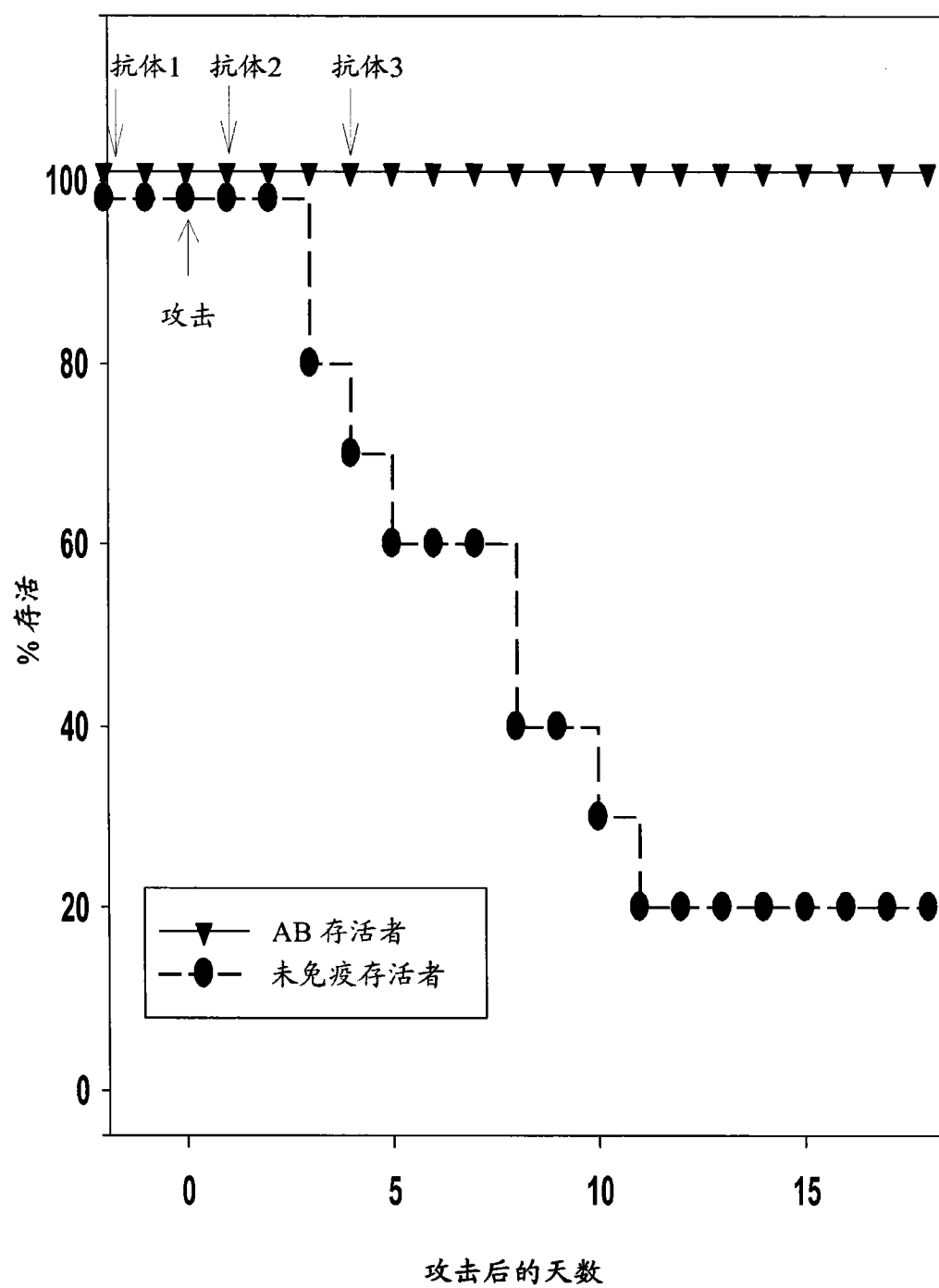


图 6