

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880004508.1

[51] Int. Cl.

C07K 14/045 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 16 日

[11] 公开号 CN 101605808A

[22] 申请日 2008.2.5

[21] 申请号 200880004508.1

[30] 优先权

[32] 2007.2.7 [33] EP [31] 07101864.2

[86] 国际申请 PCT/EP2008/000876 2008.2.5

[87] 国际公布 WO2008/095677 英 2008.8.14

[85] 进入国家阶段日期 2009.8.7

[71] 申请人 希格马托制药工业公司

地址 意大利罗马

[72] 发明人 N·加尔加诺 E·贝赫托

A·斯帕东尼 F·德帕奥利斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 罗菊华

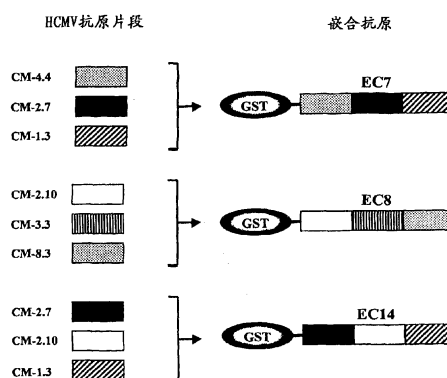
权利要求书 4 页 说明书 37 页 序列表 25 页
附图 4 页

[54] 发明名称

人巨细胞病毒 (HCMV) 的重组抗原

[57] 摘要

本文所述的发明涉及与针对 HCMV 感染的人类 B-细胞应答的 HCMV 蛋白质的抗原性区域的鉴定方法, 将这些抗原性区域组合成嵌合融合产物的形式的方法, 以及它们作为诊断和免疫原性试剂的用途。



1. 一种包含 HCMV 蛋白质的至少 3 个不同抗原性区域的融合物的嵌合重组抗原, 其中所述的抗原性区域为 B 细胞表位, 该 B 细胞表位与 HCMV 特异性抗体结合, 其中所述的 3 个不同抗原性区域中的一个区域由氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 12 构成。

2. 权利要求 1 所述的嵌合抗原, 其中所述的 HCMV 特异性抗体是从已经感染有 HCMV 的受试者的血清提取得到的。

3. 权利要求 1 或 2 所述的嵌合抗原, 其中所述的 3 个不同的抗原性区域通过共价键或肽连接体连接起来。

4. 任何前述权利要求所述的嵌合抗原, 其中所述的嵌合抗原包含 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的嵌合抗原, 其中所述的嵌合抗原进一步包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。

6. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的嵌合抗原, 其中所述的嵌合抗原进一步包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列。

7. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的嵌合抗原, 其中所述的嵌合抗原进一步包含选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列。

8. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的嵌合抗原, 其包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列。

9. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的嵌合抗原,其包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列。

10. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的嵌合抗原,其包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列。

11. 一种编码根据任何前述权利要求所述的抗原的核苷酸序列。

12. 根据权利要求 11 所述的核苷酸序列,其包含 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列。

13. 根据权利要求 11 所述的核苷酸序列,其包含 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列。

14. 根据权利要求 11 所述的核苷酸序列,其包含 SEQ ID NO: 35 的核苷酸序列。

15. 一种在严格的杂交条件下与根据权利要求 11 至 14 的任何序列发生杂交的核苷酸序列。

16. 由权利要求 15 所述的核苷酸序列编码的嵌合重组抗原。

17. 权利要求 11 至 15 中任一项所述的核苷酸序列,其为 DNA 序列。

18. 一种包含权利要求 17 所述的 DNA 序列的载体。

19. 一种使用权利要求 18 所述的载体转化的宿主细胞。

20. 一种用于生产根据权利要求 1 至 10、或 16 中任一项所述的抗原的方法，其包括培养权利要求 19 所述的宿主细胞，以及分离所需的产物。

21. 根据权利要求 1 至 10、或 16 中任一项所述的抗原作为活性试剂用于诊断 HCMV 感染的用途。

22. 一种用于检测 HCMV 感染的诊断试剂，其包含至少一种根据权利要求 1 至 10、或 16 中任一项所述的抗原。

23. 一种用于诊断 HCMV 感染的测定试剂盒，其包含至少一种根据权利要求 22 所述的诊断试剂。

24. 一种用于诊断 HCMV 感染的方法，其包括将测试样品与根据权利要求 22 所述的诊断试剂相接触。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中就 HCMV 抗体的存在情况来检查所述的测试样品，并且所述的方法包括以下步骤：(i)将所述的测试样品与权利要求 22 所述的诊断试剂一起温育；(ii)允许形成抗体-诊断试剂的复合物；以及(iii)检测所述复合物的存在情况。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的测试样品为怀疑感染有 HCMV 的受试者的血清或血浆。

27. 根据权利要求 1 至 10、或 16 中任一项所述的抗原作为药物的用途。

28. 权利要求 1 至 10、或 16 中任一项所述的抗原作为活性组分在制备用于预防或治疗 HCMV 感染的药物中的用途。

29. 权利要求 11 至 15 中任一项所述的核苷酸序列作为药物的用途。

30. 权利要求 11 至 15 中任一项所述的核苷酸序列在制备用于治疗或预防 HCMV 感染的药物中的用途。

31. 一种免疫调节疫苗，其包含至少一种根据权利要求 1 至 10、或 16 所述的抗原，以及佐剂。

32. 根据权利要求 31 所述的疫苗，其中所述的佐剂选自铝盐以及水包油的乳液。

33. 一种药物组合物，特别是疫苗形式的药物组合物，其包含至少一种权利要求 1 至 10、或 16 中任一项所述的抗原。

34. 一种药物组合物，特别是疫苗形式的药物组合物，其包含至少一种权利要求 11 至 15 中任一项所述的核苷酸序列。

35. 根据权利要求 33 或 34 所述的组合物，其适用于在人和/或兽中使用。

36. 一种治疗患有 HCMV 感染的哺乳动物的方法，其包括施用治疗有效量的权利要求 31 至 35 中任一项所述的疫苗。

人巨细胞病毒（HCMV）的重组抗原

技术领域

本文所述的发明涉及制备非直接应用于动物或人体的诊断手段的技术领域。

本发明还提供了多种化合物，它们的制备方法，它们的使用方法以及包含这些化合物的组合物，其中所述的化合物适用于在药物和诊断领域中的工业应用中，特别适用于人巨细胞病毒感染的检测和诊断，以及适用于治疗和预防所述的感染。

背景技术

在所有的治疗领域中，早期诊断是优选的，并且是非常理想的目标，特别是因为早期诊断会相当大地改善患者的生命，并且附带对卫生保健系统和患者而言都是节省的。特别是在本文所描述的本发明的情况下，在孕妇中潜在地或已经发生巨细胞病毒感染、需要特别关注胎儿健康的情况下，以及在被感染的受试者、特别是免疫功能低下的那些受试者中，早期诊断是非常重要的课题。

人巨细胞病毒（HCMV）是人疱疹病毒-5 的俗名，其为疱疹病毒科的高度宿主特异性病毒。就形态学而言，HCMV 是该病毒科中最大的病毒，其具有编码了大约 165 个基因的 235kbp 的双链 DNA 基因组 (Dolan et al., 2004, J. Gen. Virol. 85:1301-1312)。与所有的疱疹病毒相似，HCMV 在宿主中经历潜伏和再活化。该病毒在人类群体中是普遍的，并且在宿主中有 50-90% 发生了再活化。所述的病毒在人类群体中是普遍的，并且到 50 岁为止，有 50-90% 的成年人为血清阳性，而这取决于社会经济学因素和地理位置 (Gandhi and Khanna, 2004, Lancet Infect. 4:725-738)。人类是 HCMV 的唯一储存库 (reservoir)。初次感染 HCMV 通常是无症状的，并且自限于免疫活性宿主中，但是会形

成周期性再活化的终身载体状态，并使病毒从粘膜位点上脱落。与此截然不同，在免疫抑制的成人中，潜伏病毒的再活化可以引起具有非常严重后果的肺炎 (Gandhi et al., 2003, Blood Rev. 17: 259-264)。此外，在怀孕期间发生初次感染可以导致流产，或者在先天性感染的新生儿中导致严重的胎儿疾病 (Revello and Gerna, Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 680-715)。

就 HCMV 感染问题的广泛综述而言，读者可参考专业的医学文献。

通过在血液或体液中分离出病毒和/或病毒产物、采用 PCR 检测特定的核苷酸序列、并检测由于宿主响应所述的感染而产生的特异性抗-HCMV 抗体来建立 HCMV 感染的诊断 (Revello and Gerna, Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 680-715)。

对临床医生的主要挑战是诊断孕妇中的初次 HCMV 感染，以及诊断他们的新生儿中的先天性感染。在这两种情况下，为了在适当的时间实施合适的治疗以及为了避免对胎儿和新生儿造成可能的损害，非常重要确定孕妇是在怀孕前还是在怀孕后发生的病毒感染。此外，必需确定由母亲向胎儿的垂直传播是何时发生的。

在妊娠期间的血清转化、以及对新生儿中先天性感染的诊断通常是通过试图检测多种抗-HCMV 免疫球蛋白 (IgG, IgM, IgG 的亲合力) 的存在情况、并对比母亲与其孩子的免疫特征来进行的。但是，可利用的商业化测定法不能提供足够的敏感性和特异性以正确诊断所有患者中的感染情况。此外，大多数的当前可以利用的免疫测定法使用了由 HCMV-感染的成纤维细胞培养物衍生得到的、限定不清的病毒抗原，并且在他们检测血清免疫球蛋白的能力存在变化。最后，由于缺少金标准，在 HCMV 血清诊断问题中的另一个问题是所得结果的真正的分类。因此，利用特异性的、敏感的和新型的诊断试剂是理想的。

大量的研究已经发现了多种不同的 HCMV 抗原蛋白质，并且还测定出相应的基因序列。

在用于诊断和治疗目的的大部分所关注的疫苗形式的蛋白质中，我们应该提及 pp150，其为病毒的大磷酸化间层蛋白 (tegument

protein), 已经证明该蛋白质可以通过已知对 HCMV 呈抗体阳性的血清来进行非常可靠的检测。并未发现在这种蛋白质, 与 EB 病毒 (Epstein-Barr)、水痘带状疱疹病毒 (varicella-zoster) 和单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus) 的蛋白质之间具有同源性, 因此降低了与其他病毒蛋白质发生交叉反应的风险。

长期以来, HCMV 抗原首先是以以多种方式获得的抗原混合物的形式被人们所知和利用的。例如, Greijer 及其同事 (Greijer et al., J. Clin. Microbiol. 1999, 37:179-188) 报道了由 pp52 (UL44) 和 pp150 (UL32) 衍生得到的、用于以特异性和高度敏感性早期检测 HCMV IgM 的多种肽的特异性结合, 然而选择来自 pp150 (UL32)、gB (UL55) 和 pp28 (UL99) 的多种肽的组合来得到对 HCMV IgG 的最佳且特异性的反应性。根据使用所述这些肽的组合物所得的结果, 建立新的高度特异性的血清诊断测定法。与使用“金标准”(基于病毒抗原的 ELISA) 所获得的结果相比, 这些测定法对 IgG 和 IgM 的敏感度分别为 98.9% 和 96.4%。

根据所述研究的结果, 可以断定高度限定的合成肽的特异性组合物可以取代在当前血清诊断中使用的复合 HCMV 病毒提取物。

在近 10 年中, 许多研究已经报道了重组抗原在用于血清诊断 HCMV 感染和用于治疗性应用 (例如疫苗) 中的用途。

应该强调的是, 所有这些抗原都是通过分子生物学技术的手段而获得的, 其中使用了在细菌和哺乳动物细胞中表达的蛋白质。所引用的文件均未描述使由 HCMV 基因组衍生得到 cDNA 片段文库在 λ 噬菌体中表达/暴露 (噬菌体展示), 从而得到病原体抗原的片段的技术。

国际专利申请 W003/010198 公开了以与 λ 噬菌体的蛋白质 D (pD) 的氨基末端部分发生分子融合的 DNA 表达和蛋白质暴露的载体。这种载体被称为 λ KM4, 其与用于表达实验的那些载体 (例如参见 λ gt11) 不同, 这是由于由所述的外源 DNA 片段编码的重组蛋白质是以与噬菌体本身的蛋白质所形成的融合产物的形式表达, 然后被暴露在衣壳上。根据该方法, 只要所述的蛋白质片段的开放阅读框 (ORF) 与 pD 一致,

所述噬菌体便可以使该蛋白质片段暴露于表面上。对所述文库中克隆的 DNA 片段的尺寸加以选择,以代表 200 至 1000 个核苷酸碱基对 (bp) 的中等尺寸的群体,并且就统计学原因而言,大部分的阅读框移位的序列都包含不能进行翻译、并由此进行暴露在噬菌体表面上的终止密码子。

发明概述

目前,已经发现了亲合力的选择与噬菌体展示技术的组合方法提供了用于鉴定 HCMV 的特异性抗原片段的方法,具体而言是通过使用来自被感染个体的一盘血清来在 HCMV DNA 片段的噬菌体展示文库上进行亲合力选择。DNA 片段是通过 HCMV 病毒的基因组 DNA 进行酶解而获得的。采用该方法,证明可以由极大的文库(即,表达极大量的不同序列)中鉴定出抗原片段。由此鉴定的抗原片段可以用于诊断和治疗目的。此外,已经发现 HCMV 蛋白质的抗原性区域的组合物(重组嵌合蛋白质的形式)保留了单个抗原片段的抗原性性质,并改善了其中使用了这些抗原片段的诊断测定法的性能。由此制得的相应嵌合蛋白质可以用于诊断和治疗目的。

因此,本文所述的本发明的一个目标是提供通过使用来自被感染的个体的一盘血清来在 HCMV DNA 片段的噬菌体展示文库上进行亲合力选择、从而用于鉴定 HCMV 蛋白质的抗原片段的方法。

本发明所提供的方法可以证实已知的 HCMV 抗原作为诊断试剂的用途,还可以在已知的抗原中鉴定触发人的免疫应答的表位,并且这一部分也是本发明的另一目标;而且还可以鉴定 HCMV 蛋白质的抗原性功能,就 HCMV 蛋白质而言,所述的功能以前是未知的;最后,根据本发明的方法还提供了 HCMV 基因产物的新抗原片段,这同样也构成了本发明的另一目标。

本发明的另一目标是使用上文提及的方法分离和表征的抗原片段,其用作单一的重组蛋白质,或组合为“抗原混合物”,或者通过其他的基因工程方法而形成的嵌合抗原。本文所述的本发明还扩展至

所述抗原性区域中所包含的表位。

所述重组蛋白质（抗原片段以及通过将所选抗原的2个或多个抗原性区域相组合而得到的嵌合抗原）作为诊断试剂的用途，以及包含所述重组蛋白质的相关诊断佐剂（例如酶联免疫测定，或者试剂盒，或者其他支持物）构成了本发明的另一个目标。

所述抗原片段和嵌合抗原作为活性试剂用于制备配制物、特别是疫苗形式（其可用于预防和治疗人类的感染）中的用途构成了本发明的其他目标。

本发明的另一个目标是提供编码上文提及的抗原片段和嵌合抗原的基因序列、他们作为特别用于预防和治疗 HCMV 感染（例如基因治疗）的药物的用途。本发明还扩展至在严格杂交状态下与上文提及的片段的序列发生杂交的基因序列。

此外，下文通过实施例和附图来详细说明上述及其他目标。

发明详述

本发明的主要目标是提供 HCMV 基因产物的重组抗原片段，以及提供通过融合 HCMV 蛋白质的不同的抗原性区域而获得的重组嵌合抗原，以及由此获得的重组产物用于研发选择性诊断和治疗手段的用途。

当将本发明的嵌合抗原用于使用血清来检测感染的诊断免疫测定法时，使用本发明的嵌合抗原优于上文所述文献中已知的其他类型的抗原或抗原片段的主要优点如下，并且这些优点是明显的：

一就完整的 HCMV 抗原（其是经裂解制备的，来自被感染细胞的全细胞提取物）的应用而言，所述的重组嵌合抗原具有避免由于存在其他非病毒物质而发生的非特异性反应，并且提供良好的再现性的优点。

一就 HCMV 抗原的单一抗原性区域的应用而言，所述的重组嵌合抗原显示出改善其中使用了这些抗原的测定法的敏感性的优点。换言之，它们的应用减少或消除了假阳性反应的发生。

一就单一抗原性区域的混合物或者集合的工业适用性和生产而言，其优点在于通过经济且可再现的方法更容易生产包含3个或多个

抗原性区域的单一的经改造的构建体，而不是单独地生产各种单一的片段并随后再将它们组装起来。

这些以及其他的优点在实施例部分中示出。

本发明包括：从 HCMV DNA 制备的 DNA 片段的表达/暴露文库的构建；使用已经被 HCMV 感染的患者的血清选择这种文库；对抗原片段进行表征；以及使用所述的片段用于研发选择性的诊断和治疗手段。

根据本发明的方法将亲合力的选择与噬菌体展示的能力有利地组合。如本领域中普通的技术人员所理解的那样，噬菌体展示所意味的是基于选择表达/暴露文库的策略，其中将小的蛋白质结构域暴露在包含相应遗传信息的噬菌体的表面上。噬菌体展示类型的文库是使用衍生自病原有机体的 DNA 构建而成的，该文库可以开发亲合力选择，所述的亲合力选择是以将特异性的血清（其对病原体具有反应性）与噬菌体的集合进行温育为基础的，其中所述的噬菌体在它们的衣壳上表达病原体蛋白质的部分，并且包含相应的遗传信息。可以容易地回收与血清中存在的抗体发生特异性结合的噬菌体，其与固体支承体（例如磁珠）保持结合（通过抗体本身）；而与此截然不同的是，非特异性结合的噬菌体则被洗脱。当恰好作为所述选择的结果而使得所述文库的复杂性（即，不同数量的序列）被大幅降低时，仅仅在后来的阶段进行直接筛选，即，分析单一噬菌体克隆与给定血清的抗体的结合能力。

具体而言，本发明涵盖了由选自如下的氨基酸序列构成的人巨细胞病毒(HCMV)抗原片段：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14，和它们的混合物。

根据另一个实施方式，本发明涵盖了嵌合重组抗原，该抗原包含 HCMV 蛋白质的至少 3 个不同的抗原性区域的融合体，其中所述的抗原性区域是结合 HCMV-特异性抗体的 B 细胞表位；优选地，所述的 HCMV-特异性抗体从已经受到 HCMV 感染的受试者的血清提取。

优选地，在本发明的嵌合抗原中，所述的 3 种不同的抗原性区域

通过共价键或通过肽连接体而连接；更优选地，3种不同的抗原性区域中的每个由选自如下的氨基酸序列构成：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 14。

根据本发明的具体的实施方式，所述的嵌合抗原包含SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列，或者SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。

术语“多肽”通常用于包含至少4个相邻的氨基酸（通常为20至500个相邻的氨基酸）的多肽链。

本文所称的术语“表位”涉及被T-细胞受体或B-细胞受体或抗体所识别和结合的抗原分子的部分（即，在大型分子上的决定区，针对该决定区可以产生抗体，并且该抗体可以与所述的决定区相结合）。本文所用的该术语意欲包括天然分子或可以模仿天然抗原决定区的合成分子的抗原决定区。

模仿天然的抗原决定区的分子还可以被称为“模拟表位”，并且就不是通过抗原的一级序列的连续区段形成的表位而言，这些术语可以交换使用。

根据本发明，表位为9至40个氨基酸的长度的多肽链。

本文所称的术语“抗原片段”或“抗原性区域”涉及包含表位的抗原性分子的区域。

根据本发明，抗原片段为大约50至大约500个、优选为100至200个氨基酸长度的多肽链。

术语“嵌合构建体”或“融合构建体”在本文中用于指包含至少1个上文所定义的氨基酸序列的多肽。由此，所述的多肽是由如下核酸序列所编码的，其中所述的核酸序列是通过将编码本发明的经分离的多肽的核酸序列与包含HCMV基因产物的免疫显性表位的其他抗原片段相连而产生的，并且所述的核酸序列还包含在细菌细胞中进行基因表达和复制所必须的重要核酸序列。

优选地，其他抗原片段可以选自HCMV的噬菌体展示文库（例如本发明所述的抗原片段）和/或所述文献中已知的HCMV的抗原性区域。

本发明的嵌合抗原可以采用已知的方法进行改造。融合体可以为直接的（一个氨基酸序列的 C-末端通过简单的共价键与其他氨基酸的 N-末端相连），或者它们可以使用不同长度的挠性连接体结构域（例如人 IgG 的铰链区）和/或由小氨基酸（例如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸）构成的多肽连接体。例如，所述的连接体可以是被丝氨酸或苏氨酸以一定的间隔所隔开的多甘氨酸重复。

优选地，所述的连接体由 3 个甘氨酸残基和 2 个丝氨酸残基构成，从而得到氨基酸序列 Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SGGGS 连接体)。

本发明的另一个目标是提供编码上文所定义的嵌合抗原的核苷酸序列。

优选地，本发明的核苷酸序列选自：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16。

根据本发明的另一方面，所述的核苷酸序列包含至少 3 种不同的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 13。

此外，在严格的杂交条件下与任何根据权利要求 8 至 10 的序列发生杂交的、具有任何上文所提及的核苷酸序列的核苷酸序列，以及由该序列所编码的嵌合重组抗原都包含在本发明的范围内。

优选地，所述的核苷酸序列为 DNA 序列。

本发明的重组抗原可以通过使用合适的表达载体，在原核或真核表达系统中进行克隆和表达来制备。可以采用本领域已知的任何方法。

例如，可以通过本领域中公知的技术（参见 Sambrook et al, 1989, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY）来将编码本发明的抗原的 DNA 分子插入到合适的经构建的表达载体中。这种载体是本发明的另一个目标。

为了能够表达所需的蛋白质（在这种情况下是抗原片段和嵌合抗原），表达载体还应该包含具有转录和翻译调控信息的特定核苷酸序

列，其中所述的特定核苷酸序列以允许基因表达和蛋白质生产的方式而与编码所需蛋白质的 DNA 连接。首先，为了使基因被转录，其前方必需为可以被 RNA 聚合酶识别的启动子，聚合酶与该启动子结合并由此起始转录过程。目前有多种此类启动子被使用，这些启动子具有不同的效率（强和弱启动子）。

对于真核宿主而言，可以根据宿主的性质来使用不同的转录和翻译调控序列。这些序列来源于病毒（例如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒等），其中所述的调控信号与特定的基因相关，而这些特定的基因具有高的表达水平。实例有疱疹病毒的 TK 启动子、SV40 早期启动子、酵母 gal4 基因启动子等。可以选择能够进行抑制和活化的转录起始调控信号，这样可以调整基因的表达。所有这些宿主均为本发明的另一个目标。

可以将编码本发明的重组抗原的核酸分子连接至异源序列，从而使得组合的核酸分子编码融合蛋白质。这种组合的核酸分子包括在本发明的实施方式中。例如，将它们连接至编码如下蛋白质的 DNA，所述蛋白质允许通过仅一步的亲合层析来纯化所述重组抗原。这种连接/融合的蛋白质可以是例如谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)，从而在 GST 蛋白质的羧基末端产生融合产物。在经转化的大肠杆菌细胞的细胞质中表达的、相应的重组蛋白质可以通过使用谷胱甘肽-琼脂糖树脂的亲合层析来进行纯化。备选地，所述的连接/融合的蛋白质可以是多组氨酸标签（也称为 His-标签），从而在重组蛋白质的羧基末端或氨基末端产生融合产物。在经转化的大肠杆菌细胞的细胞质中表达的、相应的重组产物可以通过使用了镍-螯合剂（例如 Ni-NTA 树脂，得自 Qiagen, USA）亲合层析的亲合层析来进行纯化。

将包含编码本发明的抗原片段的核苷酸序列的 DNA 分子插入到载体中，该载体具有可操作地连接的转录和翻译调控信号，该信号能够在宿主细胞中复制所需的基因序列。还可以通过引入一个或多个标记物来选择由被引入的 DNA 所稳定转化的细胞，其中所述的标记物可以对含有所述表达载体的宿主细胞进行选择。所述的标记物还可以向营

养缺陷型宿主提供光营养、杀虫剂抗性（例如抗生素）或重金属（例如铜）等。所述的可选择的标记物基因可以直接与待表达的 DNA 基因序列相连，或者通过共转染而被引入到相同的细胞中。此外，还需要其他元件用于本发明的蛋白质的最佳合成。

选择特定的质粒或病毒载体中的重要因素包括：从不含有所述载体的那些受体细胞中识别和选择出含有所述载体的受体细胞的容易程度；在特定的宿主中具有所需载体的拷贝数量；以及是否能够令人满意地使所述的载体在不同种类的宿主细胞之间“穿梭”。

一旦制备包含所述构建体的载体或 DNA 序列用于表达，便可以通过多种合适手段中的任何手段来将所述的 DNA 构建体引入到合适的宿主细胞中，其中所述的手段为：转化、转染、缀合、原生质体融合、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接微注射等。

宿主细胞可以为原核的或真核的。真核宿主的实例为哺乳动物细胞，例如人、猴子、小鼠和中国仓鼠卵 (CHO) 细胞。在这些宿主细胞中的表达为蛋白质分子提供了翻译后的修饰，包括正确的折叠或者在正确的位点进行糖基化。此外，酵母细胞可以进行翻译后的肽修饰，其中包括糖基化。在酵母中存在有使用强启动子序列的大量重组 DNA 策略和用于生产所需蛋白质的高拷贝数的质粒。

酵母识别经克隆的哺乳动物基因产物上的前导序列，并且分泌出具有前导序列的肽（即，前肽）。原核宿主的实例为细菌，例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

在引入载体之后，宿主细胞在选择性培养基中生长，所述的选择性培养基就包含载体的细胞生长进行选择。

经克隆的基因序列的表达产生所需蛋白质的生产。

通过任何一种已知的方法来进行重组抗原的纯化，就纯化而言，即，任何常规的工艺包括提取、沉淀、层析、电泳等。就纯化本发明的抗原而言，可以使用的其他纯化工艺是使用单克隆抗体的亲和层析，其中所述的单克隆抗体结合靶蛋白质，并且可以在柱内所包含的凝胶基质上制备并固定于其上。将含有所述重组蛋白质的不纯的制备物通

过所述的柱。所述的抗原通过特异性抗体与所述的柱结合，而杂质通过。洗涤后，通过 pH 或离子强度的改变将所述抗原从凝胶上洗脱下来。

本发明的另一方面是提供用于制备上文所述的重组抗原的方法，该方法包括：培养宿主细胞，其中所述的宿主细胞经包含本发明的核苷酸序列的载体所转化，以及分离所需的产物。

本发明的另一个目标是提供包含编码上文所述融合蛋白质的 DNA 序列的 DNA 分子，以及基本上相同的核苷酸序列。

“基本上相同的核苷酸序列”包括所有其他的核酸序列，由于遗传密码的简并性，所述的其他的核酸序列还编码给定的氨基酸序列。

本发明的另一目标是提供如下核苷酸序列，该核苷酸序列在高度严格或中度严格的条件下与编码本发明抗原片段的核苷酸序列的互补序列杂交，条件是所得的抗原保持了相同的生物学活性即可，即，能够与针对寄生虫的抗体结合。

如本文所用的术语“杂交”是指两种核酸分子通过氢键键合彼此结合。通常，其中的一种分子被固定在固体支承体上，而另一种分子游离于溶液中。

然后，将所述的两种分子在有利于氢键键合的条件下彼此接触放置。影响所述键合的因素包括：溶剂的种类和体积；反应温度；杂交时间；振荡情况；阻断液相分子与固体支承体之间发生非特异性附着的试剂 (Denhardt 试剂或 BLOTTO)；分子的浓度；增加分子结合速率的化合物 (葡聚糖硫酸酯或聚乙二醇) 的使用情况；以及杂交后洗涤条件的严格程度。

严格条件是杂交实验中所采用的温度、杂交溶液中一价阳离子的摩尔浓度和甲酰胺的百分比的函数。为了测定与任何一组给定条件有关的严格程度，首先使用 Meinkoth 等人 (1984) 的等式来测定 100%一致性的杂交体的稳定性，其中 100%一致性以 DNA-DNA 杂交体的熔融温度 T_m 来表示，其中所述的等式为： $T_m = 81.5^{\circ} \text{C} + 16.6 (\text{Log} M) + 0.41 (\% \text{GC}) - 0.61 (\% \text{ form}) - 500/L$ ，其中 M 为一价阳离子的摩尔浓度， $\% \text{GC}$ 为 DNA 中 G 和 C 核苷酸的百分比， $\% \text{ form}$ 为杂交溶液中甲酰胺的

百分比，而 L 为以碱基对表示的杂交体长度。相对于由 100%一致性的杂交体计算的温度而言， T_m 每降低 1°C ，允许的错配量便增加 1%。因此，如果在特定的盐和甲酰胺浓度下，用于任何给定杂交实验的 T_m 低于根据 Meinkoth 等式计算得到的、用于 100%杂交体的 T_m 以 10°C ，则即使错配增加至 10%，杂交也会发生。

如本文所用，高度严格的条件是指耐受多至大约 15%的序列差异的那些条件，而中度严格条件是指耐受多至大约 20%的序列差异的那些条件。无意于进行限定，高度严格(低于杂交体计算的 T_m 以 $12-15^\circ\text{C}$)条件和中度严格(低于杂交体计算的 T_m 以 $15-20^\circ\text{C}$)条件的实例采用低于杂交体计算的 T_m 的合适温度下，2 X SSC 的洗涤溶液(标准的柠檬酸盐)和 0.5%的 SDS。所述条件的最终严格情况主要应归于洗涤条件，特别是如果所采用的杂交条件允许较不稳定的杂交体与稳定的杂交体一起形成的那些条件。然后，在更高严格程度的洗涤条件下除去较不稳定的杂交体。可以与上文所述的高度严格至中度严格的洗涤条件一起使用的、普通的杂交条件是在低于 T_m 以大约 $20^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$ 的温度下，在 6 X SSC (或 6 X SSPE)、5 X Denhardt's 试剂、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ 变性的破碎鲑鱼精子 DNA 的溶液中进行杂交。如果使用混合探针，则优选的是使用四甲基氯化铵(TMAC)，而并非 SSC (Ausubel, 1987-1998)。

此外，术语“核酸分子”还包括 DNA 和 RNA 的类似物，例如包含经修饰的主链的那些。

本发明的另一方面是上文所述的嵌合抗原在作为药物的用途。具体而言，本发明的一个主要目标是提供嵌合抗原在作为活性组分用于制备预防或治疗 HCMV 感染的药物中的用途。所述的药物组合物应该优选地包含治疗有效量的本发明的嵌合抗原或者相应的核苷酸序列。由此，本发明的嵌合抗原可以起到用于预防或治疗 HCMV 感染的疫苗的作用。就治疗用途而言，在药物或疫苗的制备在用于进一步参考的普通知识的构架范围内的情况下，读者可以再次参考本说明书中所引用的专利文献。

根据本发明的另一方面，提供了多肽疫苗。两种主要类型的多肽疫苗为：与佐剂物质混合的多肽，以及与抗原呈递细胞 (APC) 一起引入的多肽 (Mayordomo et al. 1995, Nature Med. 1:1297)。

用于后一种疫苗的最常见细胞是骨髓和外周血来源的树突细胞，因为这些细胞表达辅助激活 CTL 的共刺激分子。可以通过用编码所述多肽的多核苷酸 (例如 DNA, RNA) 加载 APC，或者用所述的多肽本身加载 APC 来进行所述多肽的呈递。

根据第一种类型的多肽疫苗，将刺激免疫原性的佐剂物质与所述的多肽混合，从而改善对所述多肽的免疫应答。免疫佐剂通常被分为两种基本的类型：铝盐和油状乳剂。磷酸铝和氢氧化铝 (铝) 佐剂在基于铝的疫苗中诱导出升高水平的针对抗原的抗体，而这一水平要高于使用相应的水性疫苗所得到的抗体。例如美国专利号 5,747,653、6,013,264、6,306,404 和 6,372,223 中所公开的，研发出了大量的基于铝的疫苗，并包括该疫苗的制备方法。但是，铝的化合物并非总能增强疫苗的免疫原性。

基于油的佐剂的主要成分为：油、乳化剂和免疫刺激剂。最早类型的基于油的乳化佐剂为弗氏不完全佐剂 (IFA) (其由大约 50:50 的油包水乳液构成)、和弗氏完全佐剂 (CFA) (其为包含被杀灭的结核菌的相似制备物)。CFA 的有效的抗体刺激效果还未被任何其他佐剂超越。

然而，由于严重的毒性反应，CFA 只可以用于实验目的，而不能用于人或兽用的疫苗中。IFA 在人类中的应用限于其中水性疫苗是相对无效的、并且铝的化合物不能提供足够的佐剂活性的那些临床情况。通过增强抗原的免疫原性、作为疫苗佐剂的经改善的乳液的实例包括例如在美国专利号 5,961,970 中公开的亚微乳液 (submicron emulsion)、以及在美国专利号 5,716,637 中公开的固体脂肪纳米乳液。

可以通过多种方法来帮助本发明的多肽的吸收。例如，如美国专利号 5,554,378 中所公开的那样，霍乱毒素 B 亚单元的非毒性衍生物，或者内毒素大肠杆菌的治愈不稳定性内毒素的结构相关亚单元 B 的非

毒性衍生物可以被加入到所述的组合物中。

可以将本发明的多肽组合物直接施用至个体，以用于免疫个体。备选地，根据本发明的实施方式，所述的多肽可以用于产生具有已知单克隆抗体的特性和活性的新型抗体。使用这些多肽的 T-细胞的离体活化还可以引发所需的免疫刺激的活性。因此，所述的组合物可以用于在离体系统中诱导抗体，并且随后可以将所诱导的抗体施用至个体，以用于治疗感染。如本领域所述，所述的组合物还可以用于离体系统中，以便刺激在所采用的免疫治疗方法中待施用的 T-细胞。

如本文所用的术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防靶向的疾病或状况，或者展示可检测的治疗性或预防性效果所需要的治疗试剂的量。就任何化合物而言，可以在例如肿瘤性细胞的细胞培养物测定法中，或者在动物模型（通常为小鼠、兔、狗或猪）中对治疗有效剂量进行最初的估测。

所述的动物模型还可以用于测定施用的合适浓度范围和途径。随后，此类信息可以用于测定在人类中施用的可用剂量和途径。

用于人类受试者的精确的有效量取决于疾病状态的严重程度、受试者的总体健康情况、受试者的年龄、受试者的体重、受试者的性别、饮食情况、施用的时间、施用的频率、药物的组合情况、反应的敏感性、以及对治疗的耐受情况/应答情况。可以通过常规的实验来测定所述的量，并且该量在临床医生的判断范围内。所述的组合物可以单独地向患者进行施用，或者可以与其他试剂、药物或激素形成的组合进行施用。

药物组合物还可以包含用于施用治疗试剂的可药用的载体。此类载体包括抗体和其他多肽、基因、和诸如脂质体之类的其他治疗试剂，前体条件是所述的载体本身不能诱导产生对接受所述组合物的个体有害的抗体，并且所述的载体可以在不具有不适的毒性的条件下进行施用。合适的载体可以为大的、缓慢代谢的高分子，例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚甘氨酸、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物以及无活性的病毒粒子。

在治疗组合物中的可药用的载体可以另外包含液体，例如水、盐水、甘油和乙醇。此外，诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等之类的辅助物质可以存在于所述的组合物中。此类载体可以使所述的药物组合物被配制成为用于患者消化的片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆料、悬浮液等。

本发明的组合物一旦被配制形成，便可以直接施用至受试者。待治疗的受试者可以为动物；具体而言，可以治疗人类受试者。

本发明所用的药物组合物可以通过多种途径进行施用，所述的途径包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、骨髓内、膜内、心室内、透皮或经皮应用（例如参见 W098/20734）、皮下、腹膜内、鼻内、肠、局部、舌下、阴道内或直肠手段。此外，还可以使用基因枪或无针注射器来施用本发明的药物组合物。通常，所述的治疗组合物可以被制备成可注射的液体溶液或悬浮液；此外，还可以制备在注射前适用于溶解于或悬浮于液体媒介物中的固体形成。剂量治疗可以为单剂量时间表或多剂量时间表。

治疗患有 HCMV 感染的哺乳动物的方法代表了本发明的一个方面，其中所述的方法包括施用治疗有效量的上文所述的疫苗。

本发明的其他目标是上文所述的重组抗原作为活性试剂用于诊断 HCMV 感染、特别是作为用于诊断感染时间的用途。

此外，用于诊断 HCMV 感染的、包含至少一种抗原片段或抗原片段的组合或嵌合抗原的试剂盒也是本发明的一部分。此类试剂盒可用于诊断急性和/或潜伏性的 HCMV 感染。

事实上，本发明的重组抗原可以用于任何测定法形式中，其中所述的测定法形式使用已知的抗原用于检测抗体。所有这些测定法的共同特征在于所述的抗原可以在允许该抗原与疑似含有抗体的肌体成分中存在的任何此类抗体发生结合的条件下与所述成分相接触。所述的条件通常为使用了过量抗原的生理温度、pH 和离子强度。将抗原与样本温育，然后对由抗原构成的免疫复合物进行检测。

免疫测定法的设计经过了多次的改变，并且许多形式都是本领域

已知的。多种方案使用了例如固体支承体或免疫沉淀。大部分的测定法涉及使用标记的抗体或多肽；所述的标记物可以为例如酶、荧光、化学发光、放射性或染料分子。扩增免疫复合物的信号的测定法也是已知的；其实例为使用了生物素和抗生物素蛋白的测定法，以及诸如 ELISA 测定法之类的酶标记或介导的免疫测定法。

所述的免疫测定法可以是但不限于异源或同源形式，以及标准的或竞争性的类型。在异源形式中，多肽通常与固体基质或支承体结合，从而有利于在温育之后从多肽中分离出样品。

可以使用的固体支承体的实例为：硝酸纤维素（例如膜或微孔形式），聚氯乙烯（例如薄片或微孔），聚苯乙烯乳胶（例如珠子或微孔板形式），聚偏氟乙烯（也称为 Immulon™），重氮纸，尼龙膜，活化的珠子以及蛋白质 A 珠子。例如，在异源形式中，可以使用 Dynatech Immulon™1 或 Immulon™2 微孔板，或者 0.25 英寸的聚苯乙烯珠子 (Precision Plastic Ball)。通常在从测试样品中分离出包含抗原多肽的固体支承体之后、并且在检测结合的抗体之前来洗涤所述的固体支承体。标准的和竞争性的形式也是本领域已知的。

在同源形式中，将测试样品与抗原的组合物一起在溶液中温育。例如，可以在能够使所形成的任何抗原-抗体复合物发生沉淀的条件下。用于这些测定法的标准的或竞争性的形式是本领域已知的。

在标准的形式中，形成抗体-抗原复合物的抗体的量被直接监测。这可以通过测定经标记的抗异种（例如抗人）的抗体是否由于复合物的形成而发生结合来完成，其中所述的抗体能够识别抗 HCMV 抗体上的表位。在竞争性的形式中，样品中抗体的量是通过监测对所述的复合物中已知量的标记抗体（或其他竞争性的配体）的结合的竞争性作用来推断的。

包含抗 HCMV 抗体的所形成复合物（或者在竞争性测定法的情况下，竞争性抗体的量）可以通过多种已知技术中的任何技术来检测，这取决于所述的形式。例如，可以使用与标记物（例如酶标记物）复合的抗异种 IgG 的缀合体来检测所述复合物中的未被标记的抗体。

在免疫沉淀或凝集测定形式中，重组抗原与抗体之间的反应形成了从溶液或悬浮液中沉淀出的网络，并且形成了可视的一层或一薄层沉淀物。如果在测试样本中不含有抗 HCMV 的抗体，则不能形成可视的沉淀物。

本发明的重组抗原通常以试剂盒的形式被包装起来以用于这些这些免疫测定法中。当在标记物不能直接产生信号的情况下，所述的测定形式需要相同的信号生成试剂（例如酶底物）时，所述的试剂盒通常在单独的容器中装有抗原（已经与固体基质结合，或者与将它们与基质结合对试剂分离）、对照抗体配制物（阳性和/或阴性）、标记的抗体的组合。用于实施所述测定法的说明书（例如书面的、磁带、VCR、CD-ROM 等）通常也被包含在所述的试剂盒内。

由此，作为本发明的目标的诊断试剂盒是本领域的专家所已知的。现在，通过实施例和附图来更详细地说明本发明。

附图说明

图 1. 细菌表达载体 pGEX-SN-Flag 的质粒图谱。

图 2. 所选择的噬菌体克隆的图示。

将从噬菌体展示文库中分离的重组 HCMV 抗原片段与相应的天然蛋白质的序列进行比对。该图显示出各个克隆的相应氨基酸，以及它们在 HCMV 蛋白质序列上的位置。

图 3. 重组嵌合抗原的图示。

编码 HCMV 基因产物的蛋白质片段的克隆 CM-4.4、CM-2.7、CM-1.3、CM-2.10、CM-3.3 和 CM-8.3 的 DNA 序列用于构建 GST-EC7-Flag, GST-EC8-Flag 和 GST-EC14 融合蛋白质。

图 4. 重组抗原大肠杆菌细胞中的表达。

A-经纯化的重组 GST(泳道 2)、GST-CM1.3(泳道 3)、GST-CM2.7(泳道 4)、GST-CM4.4(泳道 5)、GST-CM2.10(泳道 6)、GST-CM3.3(泳道 7)、GST-CM7.3(泳道 8)和 GST-CM8.3(泳道 9)融合蛋白质的 SDS-PAGE 分析。所述的重组蛋白质经过了在 12%丙烯酰胺凝胶上的电泳(0,002

mg/泳道)。KDa, 分子量标记物(泳道 1)。

B-经纯化的重组 GST(泳道 2)和嵌合抗原 GST-EC7-Flag (泳道 3)和 GST-EC8-Flag (泳道 4)的 SDS-PAGE 分析(12%丙烯酰胺凝胶)。KDa, 分子量标记物(泳道 1)。

C-经纯化的重组 GST (泳道 1)、以及嵌合抗原 GST-EC7-Flag(泳道 2)和 GST-EC8-Flag(泳道 3)的 Western Blot 分析,其使用了抗 Flag 的辣根过氧化物酶缀合的单克隆抗体。

实施例

λ 展示 HCMV DNA 文库的构建

来自 HCMV(AD169 株)的基因组 DNA 是市售可得的(Advanced Biotechnology, MD, USA)。使用 0.5ng 的核酸内切酶 DNaseI(Sigma-Aldrich, USA)将 10 μg 的总 DNA 随机破碎。将 DNA 和 DnaseI 的混合物在 15℃下温育 20 分钟,并采用"QIAquick PCR Purification Kit"(Qiagen, CA, USA)的手段根据制造商提供的说明书纯化所得的 DNA 片段。通过将所述的 DNA 与酶 T4 DNA 聚合酶(New England Biolabs, MA, USA)在 15℃下温育 60 分钟,将 DNA 片段的末端“截平(flattened)”。然后,通过在苯酚/氯仿中提取及随后在乙醇中沉淀的手段来纯化所述的片段。使用酶 T4 DNA 连接酶将所得的 DNA 与 20 倍摩尔过量的“合成连接体”连接,从而将限制性位点 SpeI 和 NotI 加入到所述片段的末端。根据 Beghetto 等人之前所描述的工艺(Beghetto et al., Int. J. Parasitol. 2003, 33:163-173),使用 6 个连接体。通过在 2%的琼脂糖凝胶上进行电泳来由所述的连接混合物中除去过量的未连接的连接体,然后由所述的凝胶上切下分子量范围为 200bp 至 1000 个碱基对(bp)的 DNA 片段,随后通过"Qiaquick gel extraction kit"(Qiagen, CA, USA)的手段,根据制造商提供的说明书来进行纯化。将载体 λ KM4 用 SpeI/NotI 进行酶切,然后与所述的 DNA 片段连接。就所述文库的构建而言,形成 6 种连接混合物,每种混合物都包含 0.4 μg 的载体和大约 7 ng 的插入物。所述的连接

混合物在与酶 T4 DNA 连接酶在 4℃ 下过夜温育后, 将其在体外与 "Gigapack gold" (Stratagene, USA) 一起包装, 并铺板用于感染 BB4 细胞 (大肠杆菌菌株 BB4 的细菌细胞; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)。所述的噬菌体在 37℃ 下过夜温育后, 在装有 SM 缓冲剂的平板中对其进行洗脱 (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), 然后进行纯化和浓缩, 再在含有 7%二甲亚砜的 SM 缓冲剂中储存在 -80℃。以具有插入物的独立克隆的总数来计算的文库的复杂性为 2×10^6 个克隆。

使用人血清进行的 HCMV 展示文库的亲合力选择

将涂敷有蛋白质 G (Dynabeads Protein-G, Dynal, Norway) 的磁珠在室温下与 10 μ l 的人血清温育 30 分钟。然后, 将所得的珠子与封闭溶液在 37℃ 下温育 1 小时, 其中所述的封闭溶液由溶于 PBS 中的 5% 脱脂奶粉、0.05% Tween 20 以及 10 mM $MgSO_4$ 构成。将大约 10^{10} 个噬菌体粒子的文库加入到所述的珠子中, 并在 1ml 的封闭溶液中稀释, 以用于在室温下进一步温育 4 小时, 并进行轻微的搅拌。将所得的珠子用 1ml 的洗涤溶液 (PBS、1% TritonX100、10 mM $MgSO_4$) 洗涤 10 次。扩增结合的噬菌体以用于感染直接被加入到珠子 (每次选择均为 1.2 ml) 中的 BB4 细胞, 随后在室温下温育 30 分钟。将 NZY-Top Agar (Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 加入到珠子的混合物中, 然后立即将细胞倒入到 NZY 平板中。将所得的平板在 37℃ 下温育 12-16 小时。第二天, 通过在每个平板中加入 15ml 的 SM 缓冲剂来从各平板上收集噬菌体, 然后在室温下搅拌 4 小时。通过在 PEG/NaCl (20% 聚乙二醇, NaCl 1M) 中进行沉淀来纯化所述的噬菌体, 最后将所得噬菌体悬浮于 5ml 的 SM 中, 在存放于 +4℃ 下。

Phage-ELISA

使用抗 λ 多克隆抗体 (0.7 μ g/ml 溶于 50 mM 的 $NaHCO_3$ 中, pH 9.6)

将多孔板 (Maxisorb, Nunc, Denmark) 在 4℃ 下涂敷过夜。在除去涂敷溶液后, 将所述的板用封闭溶液 (溶于 PBS 中的 5% 的脱脂奶粉、0.05% Tween-20) 温育 1 小时, 然后用洗涤缓冲剂 (PBS、0.05% Tween-20) 洗涤两次。将 100 μ l 含有噬菌体溶解物的封闭溶液混合物加入到各孔中, 并在 37℃ 下温育 60 分钟。在室温下, 将 1 μ l 的人血清与溶于 100 μ l 封闭溶液中的 10^9 个野生型噬菌体粒子、1 μ l 的兔血清、1 μ l 的 BB4 细胞的细菌提取物、1 μ l 胎牛血清温育 30 分钟。将所述的板在与噬菌体溶解物温育后洗涤 5 次, 然后在 37℃ 下与血清溶液温育 60 分钟。然后将所述的板洗涤 5 次, 再与包含抗人 IgG 辣根过氧化物酶缀合抗体 (Sigma-Aldrich, USA) 的封闭溶液温育 30 分钟。将所述的板洗涤 5 次, 使用 100 μ l 的 TMB 液体底物 (Sigma-Aldrich, USA) 测定酶活性。15 分钟的显影后, 通过加入 25 μ l 2M 的 H_2SO_4 来终止反应。最后, 使用自动化的 ELISA 读取器 (Multiskan, Labsystem, Finland) 分析所述的板, 并将所得结果用 $OD=OD_{450nm}-OD_{620nm}$ 表示。以两个独立测定法的平均值来评估 ELISA 的数据。

免疫筛选

通过在室温下温育 60 分钟的手段将噬菌斑由细菌培养基中转移至硝酸纤维素过滤器 (Schleicher & Schuell, Germany) 上。在室温下, 将该过滤器在封闭溶液 (溶于 PBS 中的 5% 的脱脂奶粉、0.05% Tween-20) 中封闭 60 分钟。将 40 μ l 的人血清与 40 μ l 的 BB4 细胞的细菌提取物、 10^9 个野生型 λ 噬菌体粒子在 4ml 的封闭溶液中进行预先温育。在除去封闭溶液后, 在室温下, 将所述的过滤器与所述的血清温育 3 小时, 并进行搅拌。然后, 将所述的过滤器用洗涤缓冲剂 (PBS、0.05% Tween-20) 洗涤 5 次, 再在室温下用抗人 IgG 碱性磷酸酶缀合抗体 (Sigma-Aldrich, USA) 在封闭溶液中温育 60 分钟。

在将所述的过滤器洗涤 5 次以后, 加入 5ml 的显影溶液 (底物 BCIP 和 NBT, Sigma-Aldrich, USA), 并通过在水中洗涤过滤器来中断显影。从各个噬菌斑上分离被证明为阳性的噬菌体克隆, 然后进行扩增以用于随后的表征 (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: a

laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)。

阳性克隆的表征

随后, 对所选噬菌体的 DNA 插入物进行测序, 并与当前可用的多个序列数据库 (Non-Redundant Genbank CDS, Non-Redundant Database of Genbank Est Division, Non-Redundant Genbank+EMBL+DDBJ+PDB Sequences) 进行对比。

所得的序列可以分为三组:

-编码已知 HCMV 抗原的片段的序列;

-编码已知 HCMV 蛋白质的片段的序列, 但是并不清楚该 HCMV 蛋白质是否与人抗体应答有关;

-编码未知蛋白质的片段的序列 (例如 ORF)。

例如, 下表 1 给出了一些所选克隆的序列:

表 1

名称	序列	特征	分类
CM-2.10 (SEQ ID 1)	ACCAAAGACACGTCGTTACAGGCTCCGCCTT CCTACGAGGAAAGTGTTTATAATTCTGGTCGC AAAGGACCGGGACCAACGTCGTCTGATGCAT CCACGGCGGCTCCGCCTTACACCAACGAGCA GGCTTACCAGATGCTTCTGGCCCTGGCCCGT CTGGACGCAGAGCAGCGAGCGCAGCAAAAC GGTACAGATTCTTTGGACGGACAGACTGGCA CGCAT	UL55 (片段)	糖蛋白-B, 包 膜蛋白质
CM-3.3 (SEQ ID 3)	GCTCACATTAACACCGTCTCCTGTCCTACCGT TATGAGGTTTCGACCAGCGGCTGCTGGAAGAG GGCGACGAGGAGGATGAAGTGACCGTGATGT CGCCGTCACCCGAGCCCGTGCAACAGCAGCC GCCGGTCGAGCCCGTGACGAGCAGCCCCA GGGACGCGGGTCTCACCGTCGGCGCTACAA GGAGTCGGCGCCGCAAGAGACGCTGCCTAC GAATCACGAACGCGAGATTTTGGATCTCATGC GACACAGCCCCGACGTGCCTCGGGAGGCGG TGATGTCACCGACCATGGTCACCATACTCCT CCCCAGATACCCTTTGTGGGTTCCGCGCGTG AACTT	UL71 (片段)	假定的蛋白 质
CM-8.3 (SEQ ID 5)	TCACGTCGCTCTGGCGAACCCTCGACGGTGA TTTATATCCCCTCGAGCAACGAGGACACGCC GGCGGATGAGGAGGCGGAGGACAGCGTTTT CACGAGCACGCGGGCGCGCAGCGCCACGGA AGATCTGGATCGCATGGAGGCCGGTTTGTGCG CCCTACAGCGTCTCCTCGGACGCTCCGTCGT CCTTCGAGCTCGTGCGCGAGACCGGCGGCA CCGGCGCCGCCAAGAAACCGAGCGAAAAGAA ACGATCGTTT	UL25 (片段)	间层蛋白质

CM-7.3 (SEQ ID 7)	CTTATTCTCGAGGAGATTGACGTCCGCTGCC AGATGGCACGGGGGGGCGACGGCCCCGAGGG CGAGGCTATTACCTGCGTGGACGGGAGGCG CAT	UL56 (片段)	病毒 DNA 结合 蛋白质
CM-1.3 (SEQ ID 9)	ACGAGCCAGAAACCGGTGCTGGGCAAGCGA GTCGCGACGCCGCACGCGTCCGCCGAGCG CAGACGGTGACGTCGACGCCGGTTCAGGGAA GGCTAGAGAAACAGGTGTCGGGCACGCCGTC GACGGTACCCGCCACGCTGTTGCAACCTCAA CCGGCTTCGTCTAAAACGACGTCATCAAGGAA CGTGACTTCTGGCGCGGGAACTCTTCCGCT TCTTCGGCTCGACAGCCGTCAGCCTCGGCGT CCGTTTTGTCGCCACGGAGGATGATGTCGT GTCCCCCGCCACATCGCCGCTGTCCATGCTT TCGTCAGCCTCTCCGTCCCCGGCCAAGAGTG CCCCCCCGTCTCCGGTGAAAGGCCGGGGCA GCCGCGTCGGTGTTCTTCTTCAAACCTACT TTGGGCGGCAAGGCGGTGGTAGGTCGACCG CCCTCGGTCCCCGTGAGCGGTAGCGCGCCG GGTCGCCTGTCCGGCAGC	UL32 (片段)	间层磷酸化 蛋白质 (pp150)
CM-2.7 (SEQ ID 11)	CTGGTGGACATCACGGATACCGAGACGAGCG CCAAACCGCCCGTCACCACCGCGTACAAGTT CGAGCAACCGACGTTGACGTTCCGGCGCCGGA GTTAACGTTCTGCTGGCGCCGGCGCTGCCA TCCTCACGCCGACGCCTGTCAATCCTTCCAC GGCCCCCGCTCCGGCCCCGACACCTACCTTC GCGGGTACCCAAACCCCGGTCAACGGTAACT CGCCCTGGGCTCCGACGGCGCCGTTGCCCG GGGATATGAACCCCGCCAACCTGGCCGCGCGA ACGCGCGTGGGCCCTCAAGAATCCTCACCTG GCTTACAATCCCTTCAGGATGCCTACGACTTC CACGGCTTCTCAAACACCGTGTCCACCACC CCTCGGAGGCCGTCGACTCCACGCGCCGCG GTGACACAAACAGCGTCTCGGGACGCCGCTG ATGAGGTTTGGGCTTTAAGGGACCTT	UL32 (片段)	间层磷酸化 蛋白质 (pp150)
CM-4.4 (SEQ ID 13)	GGCAGTCAGAAACCGACCGAGCGGTCCCTTGA ACATCCCGCAACAACAACAGCGTCACGCGGC TTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAGGTGACCAAG GCCAGCCCGGGAAGGGTCCGTCGGGACAGC GCGTGGGACGTGAGGCCGCTCACGGAGACC AGAGGGGATCTTTTCTCGGGCGACGAGGATT CCGACAGCTCGGATGGCTATCCCCCAACCG TCAAGATCCGCGTTTCACCGACACGCTGGTG GACATCACGGATACCGAGATT	UL32 (片段)	间层磷酸化 蛋白质 (pp150)

序列 CM-2.10 构成 HCMV 基因组的 DNA 片段，被归为 UL55 一类，并且编码包膜糖蛋白 gB 的片段 (Pereira et al, Virol., 1984 139: 73-86)，该片段从未被鉴定为被人抗体应答所识别的“抗原片段”。所述的克隆具有氨基酸序列

TKDTSLQAPPSYEESVYNSGRKGPGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALARLD AEQRA
QQNGTDSL DGTGTH (SEQ ID 2), 并且其作为包含表位的片段的用途被
涵盖在本发明的范围内。

序列 CM-3.3 构成 HCMV 基因组的 DNA 片段, 被归为 UL71 一类
(Davison et al., J. Gen. Virol. 2003, 84:17-28), 并且编码从
未被鉴定为被人体液应答所识别的“抗原”的多肽。所述的克隆具有
氨基酸序列
AHINTVSCPTVMRFDQRLLEEGDEEDEVTVMSPSPEPVQQQPPVEPVQQQPQGR
GSHRRRYKESAPQETLPTNHEREILDLMRHSPDVPREAVMSPTMTIPPPQIPFVG
SAREL (SEQ ID 4), 并且其作为包含表位的片段用途被涵盖在本发明
的范围内。

序列 CM-8.3 构成 HCMV 基因组的 DNA 片段, 被归为 UL25 一类, 并
且编码间层抗原的片段 (Lazzarotto et al., J. Gen. Virol. 2001,
82: 335-338), 该片段从未被鉴定为被人抗体应答所识别的“抗原片
段”。所述的克隆具有氨基酸序列
SRRSGEPSTVIYIPSSNEDTPADEEAEDSVFTSTRARSATEDLDRMEAGLSPYSVSS
DAPSSFELVRETGGTGA AKKPSEKKRSF (SEQ ID 6), 并且其作为包含表位
的片段用途被涵盖在本发明的范围内。

序列 CM-7.3 构成 HCMV 基因组的 DNA 片段, 被归为 UL56 一类
(Krosky et al., J. Virol. 1998, 72: 4721-4728), 并且编码从未
被鉴定为被人体液应答所识别的“抗原片段”的该多肽。所述的克隆
具有氨基酸序列 LILEEIRRPLPDGTGGDGPEGEAIHLRGREAH (SEQ ID 8),
并且其作为包含表位的片段用途被涵盖在本发明的范围内。

序列 CM-1.3、CM-2.7 和 CM-4.4 构成 HCMV 基因组的 DNA 片段, 被
归为 UL32 一类, 并且编码大型结构的间层磷酸化蛋白质 pp150 的片段
(Jahn et al., J. Virol. 1987, 61:1358-1367), 该片段从未被鉴定
为可以被人抗体应答所识别的“抗原片段”。所述的克隆具有氨基酸
序列

TSQKPVLGKRVATPHASARAQTVTSTPVQGRLEKQVSGTPSTVPATLLQPQPASSK
 TTSSRNVTSGAGTSSASSARQPSASASVLSPTEDDVSPATSPLSMLSSASPSPAK
 SAPPSPVKGRGSRVGVPSLKPTLGKAVVGRPPSVPVSGSAPGRLSGS (SEQ ID
 10), LVDITDTETSAKPPVTTAYKFEQPTLT
 FGAGVNVFAGAGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPG
 DMNPANWPRERAWALKNPHLAYNPFRMPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQT
 ASRDAADEVWALRDL (SEQ ID 12), 和 GSQKPTSGPLNIPQQ
 QQRHAAFSLVSPQVTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLFSGDESDSSSDGYP
 PNRQDPRFTDTLVDITDTEI (SEQ ID 14), 并且其作为包含表位的片段用
 途被涵盖在本发明的范围内。

嵌合抗原的构建

EC7 蛋白质产物为包含克隆 CM-1.3/CM-2.7 和 CM-4.4 的 DNA 序列
 的嵌合分子。

使用寡核苷酸 K749 (5'-GGACTAGTGGCAGTCAGAAACCGACCAG-3') 和
 K751 (5'-GGACTAGTGGCAGTCAGAAACCGACCAG-3'), SEQ ID 14 用作模板,
 来进行克隆 CM-4.4 的 DNA 扩增。寡核苷酸 K751 包含编码连接体 SGGGS
 的序列, 所述的序列将序列 CM-4.4 与 CM-2.7 连接起来。PCR 的条件
 为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 30"; 共 25 个循环。

使用寡核苷酸 K750 (5'-TCTGGTGGCGGTAGCCTGGTGGACATCACGG
 ATAC-3') 和 K753 (5'-CGTGCTACCGCCACCAGAAAGGTCCCTTAAAGCCC
 AAAC-3'), SEQ ID 12 用作模板, 来进行克隆 CM-2.7 的 DNA 扩增。寡
 核苷酸 K753 包含编码连接体 SGGGS 的序列, 该序列将序列 CM-2.7 与
 CM-1.3 连接起来。PCR 的条件为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 30";
 共 25 个循环。

使 用 寡 核 苷 酸 K752
 (5'-TCTGGTGGCGGTAGCACGAGCCAGAAACCGGTGCTG-3') 和 K754 (5'-
 CCGCGGCCGCTGGACACGACATCATCCTCC-3'), SEQ ID 10 用作模板, 来进
 行克隆 CM-1.3 的 DNA 扩增。PCR 的条件为: 94℃, 30"; 52℃, 30";

72℃, 30"; 共 25 个循环。

通过"Qiagen Purification Kit" (Qiagen, CA, USA) 手段纯化 PCR 产物。将 50ng 的 SEQ ID 14 的 DNA 扩增产物和 SEQ ID 12 的 DNA 扩增产物混合在一起, 并通过使用寡核苷酸 K749 和 K753, 以所述的混合物作为模板来进行 PCR 反应。PCR 的条件为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 90"; 共 30 个循环。将所得的 50ng 的 DNA 扩增产物用"Qiagen Purification Kit" (Qiagen, CA, USA) 进行纯化, 然后与 50ng 的 SEQ ID 10 的 DNA 扩增产物混合。最后, 通过使用 K749 和 K754, 以所述的 DNA 混合物作为模板来进行 DNA 扩增, 以下为 PCR 的条件: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 120"; 共 30 个循环。

EC8 蛋白质产物为含有 DNA 序列 CM-2.10、CM-3.3 和 CM-8.3 的嵌合分子。

通过使用寡核苷酸 K761 (5'-GGACTAGTGCTCACATTAACACCGTCTC-3') 和 K762 (5'-GTGAGCTACCGCCACCAGAAAGTTACGCGCGGAAC-3'), 以 SEQ ID 4 作为模板, 以用于克隆 CM-3.3 的 DNA 扩增。

寡核苷酸 K762 包含编码连接体 SGGGS 的序列, 该序列将序列 CM-3.3 和 CM-8.3 连接起来。PCR 的方案为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 30"; 共 25 个循环。

通过使用寡核苷酸 K763 (5'-CTTTCTGGTGGCGGTAGCTACGTCGCTCTGGCG-3') 和 K764 (5'-GGTGCTACCGCCACCAGAAAACGATCGTTTCTTTTCGC-3'), 以 SEQ ID 6 作为模板, 以用于克隆 CM-8.3 的 DNA 扩增。

所述的寡核苷酸 K764 包含编码连接体 SGGGS 的序列, 该序列将序列 CM-8.3 和 CM-2.10 连接起来。PCR 的方案为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 30"; 共 25 个循环。

通过使用寡核苷酸 K765 (5'-TTTTCTGGTGGCGGTAGCACCAAAGACACGTCGTTAC-3') 和 K766 (5'-CCGCGGCCGCTACCGCCACCAGAATGCG-3'), 以 SEQ ID2 作为模板, 以用于克隆 CM-2.10 的 DNA 扩增。PCR 的方案为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 30"; 共 25 个循环。

通过"Qiagen Purification Kit" (Qiagen, CA, USA) 手段纯化所得的 PCR 产物。将 50ng 的 SEQ ID 6 的 DNA 扩增产物和 SEQ ID 8 的 DNA 扩增产物混合在一起, 并通过使用寡核苷酸 K761 和 K764, 以所述的混合物作为模板来进行 PCR 反应。PCR 的方案为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 90"; 共 30 个循环。将所得的 50ng 的 DNA 扩增产物进行纯化, 然后与 50ng 的 SEQ ID 2 的 DNA 扩增产物混合。最后, 通过使用 K761 和 K766, 以所述的 DNA 混合物作为模板来进行 DNA 扩增, 随后进行的 PCR 的条件为: 94℃, 30"; 52℃, 30"; 72℃, 120"; 共 30 个循环。

EC14 蛋白质产物为包含克隆 CM-2.7、CM-2.10 和 CM-1.3 的 DNA 序列的嵌合分子。

通过使用寡核苷酸 K825 (5'-GGGGATCCCACTAGTCGTGCTGGCCAGCCGCTG-3') 和 K826 (5'-GGTGCTACCGCCACCAGAAAGGTCCCTTAAAGCCAAAC-3'), 以 SEQ ID 12 作为模板, 以用于克隆 CM-2.7 的 DNA 扩增。寡核苷酸 K826 包含编码连接体 SGGGS 的序列, 该将序列 CM-2.7 和 CM-2.10 连接起来。

通过使用寡核苷酸 K827 (5'-CCTTTCTGGTGGCGGTAGCACCAAAGACACGTCGTTACAG-3') 和 K828 (5'-GAGACTACCACCCCGGAATGCGTGCCAGTCTGTCCG-3'), 以 SEQ ID 2 作为模板, 以用于克隆 CM-2.10 的 DNA 扩增。

通 过 使 用 寡 核 苷 酸 K829 (5'-CATTCGGGGGTGGTAGTCTCACGAGCCAGAAACCGG-3') 和 K830 (5'-CCAGACTCGAGTCACCCGCGGCCGC TACCGCCACCAGAGCTGCC-3'), 以 SEQ ID 10 作为模板, 以用于克隆 CM-1.3 的 DNA 扩增。

通过"Qiagen Purification Kit" (Qiagen, CA, USA) 手段纯化所得的 PCR 产物。将 50ng 的 SEQ ID 12 的 DNA 扩增产物和 SEQ ID 2 的 DNA 扩增产物混合在一起, 并通过使用寡核苷酸 K825 和 K828, 以所述的混合物作为模板来进行 PCR 反应。PCR 的条件为: 94℃, 30"; 50℃, 30"; 72℃, 90"; 共 30 个循环。将所得的 50ng 的 DNA 扩增产

物用 "Qiagen Purification Kit" (Qiagen, CA, USA) 进行纯化, 然后与 50ng 的 SEQ ID 10 的 DNA 扩增产物混合。最后, 通过使用 K825 和 K830, 以所述的 DNA 混合物作为模板来进行 DNA 扩增, 随后进行的 PCR 的条件为: 94℃, 30"; 50℃, 30"; 72℃, 120"; 共 30 个循环。

例如, 下表 2 给出了 EC7 和 EC8 嵌合抗原的 DNA 序列:

表 2

名称	序列
EC7 (SEQ ID 15)	ACTAGTGGCAGTCAGAAACCGACCAGCGGTCCCTTGAACATCCCGC AACAAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAGGTG ACCAAGGCCAGCCCGGGAAGGGTCCGTGCGGACAGCGCGTGGGAC GTGAGGCCGCTCACGGAGACCAGAGGGGATCTTTCTCGGGCGACG AGGATTCCGACAGCTCGGATGGCTATCCCCCAACCGTCAAGATCC GCGTTTCACCGACACGCTGGTGGACATCACGGATACCGAGATTCTG GTGGCGGTAGCCTGGTGGACATCACGGATACCGAGACGAGCGCCAA ACCGCCCCTCACCGCGTACAAGTTCGAGCAACCGACGTTGACG TTCGGCGCCGGAGTTAACGTTCTGCTGGCGCCGGCGTGCCATCC TCACGCCGACGCCTGTCAATCCTTCCACGGCCCCCGCTCCGGCCCC GACACCTACCTTCGCGGGTACCCAAACCCCGGTCAACGGTAACTCG CCCTGGGCTCCGACGGCGCCGTTGCCCGGGGATATGAACCCCGCC AACTGGCCGCGCGAACGCGCGTGGGCCCTCAAGAATCCTCACCTGG CTTACAATCCCTTCAGGATGCCTACGACTTCCACGGCTTCTCAAAACA CCGTGTCCACCACCCCTCGGAGGCCGTCGACTCCACGCGCCGCGGT GACACAAACAGCGTCTCGGGACGCCGCTGATGAGGTTTGGGCTTTA AGGGACCTTTCTGGTGGCGGTAGCACGAGCCAGAAACCGGTGCTGG GCAAGCGAGTCGCGACGCCGCACGCGTCCGCCCGAGCGCAGACGG TGACGTCGACACCGGTTCAAGGAAGGGTAGAGAAACAGGTATCGGG CACGCCGTCGACGGTACCCGCCACGCTGTTGCAACCTCAACCGGCT TCGTCTAAACAACGTCATCAAGGAACGTGACTTCTGGCGCGAGAAC CTCTTCCGCTTCGGCTCGACAGCCGTCAGCCTCGGCGTCCGTTTTGT CGCCACGGAGGATGATGTCGTGTCCCCCTCTGGTGGCGGTAGCGG CCGC
EC8 (SEQ ID 17)	ACTAGTGCTCACATTAACACCGTCTCCTGTCCTACCGTTATGAGGTTG GACCAGCGGCTGCTGGAAGAGGGCGACGAGGAGGATGAAGTGACC GTGATGTCGCCGTACCCGAGCCCGTGCAACAGCAGCCGCCGGTGC AGCCCGTGACGAGCAGCAGCCCCAGGGACGCGGGTCTCACCGTCGGC GCTACAAGGAGTCGGCGCCGCAAGAGACGCTGCCTACGAATCACGA ACGCGAGATTTTGGATCTCATGCGACACAGCCCCGACGTGCCTCGG GAGGCGGTGATGTCACCGACCATGGTCACCATACCTCCTCCCCAGAT ACCCTTTGTGGGTTCCGCGCGTGAACCTTCTGGTGGCGGTAGCTCAC GTCGCTCTGGCGAACCTCGACGGTGATTTATATCCCTCGAGCAAC GAGGACACGCCGGCGGATGAGGAGGCGGAGGACAGCGTTTTACG AGCACGCGGGCGCGCAGCGCCACGGAAGATCTGGATCGCATGGAG GCCGGTTTGTGCGCCTACAGCGTCTCCTCGGACGCTCCGTGCTCCT CGAGCTCGTGCGCAGACCGGCGGCACCGGCGCCGCCAAGAAACC GAGCGAAAAGAAACGATCGTTTTCTGGTGGCGGTAGCACCAAGACA CGTCGTTACAGGCTCCGCCTTCTACGAGGAAAGTGTTTATAATTCT GGTCGCAAAGGACCGGGACCAACCGTCTGATGATCCACGGCGG CTCCGCCTTACACCAACGAGCAGCGCTTACCAGATGCTTCTGGCCCTG GCCCGTCTGGACGAGAGCAGCGAGCGCAGCAAAACGGTACAGATT CTTTGGACGGACAGACTGGCACGCATTCTGGTGGCGGTAGCGGCCG C

EC14

(SEQ ID 35)

ACTAGTCGTGCTGGCCAGCCGCTGGTGGACATCACGGATACCGAGA
 CGAGCGCCAAACCGCCCGTACCACCGCGTACAAGTTCGAGCAACC
 GACGTTGACGTTCCGCGCCGGAGTTAACGTTCTGCTGGCGCCGGC
 GCTGCCATCCTCACGCCGACGCTGTCAATCCTCCACGGCCCCCG
 CTCCGGCCCCGACACCTACCTTCGCGGGTACCCAAACCCCGGTCAA
 CGGTAACCTCGCCCTGGGCTCCGACGGCGCCGTTGCCCGGGGATATG
 AACCCCGCCAACTGGCCGCGCGAACGCGCGTGGGCCCTCAAGAATC
 CTCACCTGGCTTACAATCCCTTCAGGATGCCTACGACTTCCACGGCT
 TCTCAAAACACCGTGTCCACCACCCCTCGGAGGCCGTCGACTCCAG
 GCGCCGCGGTGACACAAACAGCGTCTCGGGACGCCGCTGATGAGGT
 TTGGGCTTTAAGGGACCTTTCTGGTGGCGGTAGCACCAAAGACACGT
 CGTTACAGGCTCCGCCTTCCTACGAGGAAAGTGTTTATAATTCTGGT
 CGCAAAGGACCGGGACCACCGTCGTCTGATGCATCCACGGCGGGCTC
 CGCCTTACACCAACGAGCAGGCTTACCAGATGCTTCTGGCCCTGGC
 CCGTCTGGACGCAGAGCAGCGAGCGCAGCAAAACGGTACAGATTCT
 TTGGACGGACAGACTGGCACGCATTCCGGGGGTGGTAGTCTCACGA
 GCCAGAAACCGGTGCTGGGCAAGCGAGTCGCGACGCCGCACGCGT
 CCGCCCGAGCGCAGACGGTGACGTCGACGCCGGTTCAGGGAAGGC
 TAGAGAAACAGGTGTCGGGCACGCCGTCGACGGTACCCGCCACGCT
 GTTGCAACCTCAACCGGCTTCGTCTAAAACGACGTCATCAAGGAACG
 TGACTTCTGGCGCGGGAACCTCTCCGCTTCTTCGGCTCGACAGCC
 GTCAGCCTCGGCGTCCGTTTTGTGCGCCACGGAGGATGATGTCGTG
 TCCCCCGCCACATCGCCGCTGTCCATGCTTTCGTCAGCCTCTCCGTC
 CCCGGCCAAGAGTGCCCCCGCTCTCCGGTGAAAGGCCGGGGCAG
 CCGCGTCGGTGTTCTTCCTTGAAACCTACTTTGGGCGGCAAGGCG
 GTGGTAGGTGACCGCCCTCGGTCCCCGTGAGCGGTAGCGCGCCG
 GGTCGCCTGTCCGGCAGCTCTGGTGGCGGTAGCGGCCGC

嵌合蛋白质 EC7 具有氨基酸序列
 TSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQVTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRG
 DLFSGDESDSSDGYPPNRQDPRFTDTLVDITDTEISGGGSLVDITDTETTAYKFEQ
 PTLTFGAGVNVPAAGAGAAILTPTVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTA
 PLPGDMNPANWPRERAWALKNPHLAYNPFMRMPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAA
 VTQTASRDAADEVWALRDLSGGGSTSQKPVLGKRVATPHASARAQTVTSTPVQGR
 VEKQVSGTPSTVPATLLQPQPASSKTTSSRNVTSGARTSSASARQPSASASVLSPT
 EDDVVSPSGGGSGR (SEQ ID 16), 并且其作为包含多个 HCMV 蛋白质片
 段的重组抗原的用途也被涵盖在本发明的范围内。

嵌合蛋白质 EC8 具有氨基酸序列
 TSAHINTVSCPTVMRFDQRLLEEGDEEDEVTVMSPSPEPVQQQPPVEPVQQQPQG

RGSHRRRYKESAPQETLPTNHEREILDLMRHSPDVPREAVMSPTMVTIPPPQIPFV
 GSARELSGGGSSRRSGEPSTVIYIPSSNEDTPADEEAEDSVFTSTRARSATEDLDR
 MEAGLSPYSVSSDAPSSFELVRETGGTGAAKKPSEKKRSFSGGGSTKDTSLQAPP
 SYEESVYNSGRKGPGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALARLD AEQRAQQNGTD
 SLDGQTGTHSGGGSGR (SEQ ID 18), 并且其作为包含多个 HCMV 蛋白质
 片段的重组抗原的用途也被涵盖在本发明的范围内。

嵌合蛋白质 EC14 具有氨基酸序列
 PLVDITDTETSAKPPVTTAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAAILTPTPNPSTAPAPA
 PTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANWPRERAWALKNPHLAYNPFRMP
 TTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASRDAADEVWALRDLSGGGSTKDTSLQA
 PPSYEESVYNSGRKGPGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALARLD AEQRAQQNG
 TDSLDGQTGTHSGGGSLTSQKPVLGKRVATPHASARAQTVTSTPVQGRLEKQVSG
 TPSTVPATLLQPQPASSKTTSSRNVTSGAGTSSASSARQPSASASVLSPTEDDVVS
 PATSPLSMLSSASPSPAKSAPPSPVKGRGSRVGVPSLKPTLG GKAVVGRPPSPVPV
 SGSAPGRLSGSSGGGSGR (SEQ ID NO: 36), 并且其作为包含多个 HCMV
 蛋白质片段的重组抗原的用途也被涵盖在本发明的范围内。

指导重组抗原作为与 GST 的融合产物在大肠杆菌细胞的细胞质中
 进行表达的 DNA 的构建

将编码所选 HCMV 噬菌体克隆的 DNA 片段作为与蛋白质谷胱甘肽 S
 转移酶 (GST) 的融合产物进行克隆, 并在细菌细胞的细胞质中表达出可
 溶性的蛋白质, 以用于测定这些蛋白质的特异性和选择性。使用限制
 性酶 SpeI 和 NotI 对克隆 CM-2.10、CM-3.3、CM-8.3、CM-7.3、CM-1.2、
 CM-1.3、CM-1.5、CM-2.7、CM-2.11 和 CM-4.4 的 DNA 序列进行消化。
 将经消化的 DNA 克隆到载体 pGEX-SN (Minenkova et al,
 International Journal of Cancer, 2003, 106:534-44) 中, 其中
 所述的载体事先使用 SpeI 和 NotI 核酸内切酶进行消化, 从而在 GST
 蛋白质的羧基末端形成融合产物。此外, 将编码嵌合抗原 EC7、EC8
 和 EC14 的 DNA 克隆到载体 pGEX-SN 和 pGEX-SN-Flag 中, 从而产生 GST

融合产物。通过插入短的 dsDNA 序列来构建质粒 pGEX-SN-Flag, 其中所述的 dsDNA 序列是通过将寡核苷酸 K718 (5'-GGCCGCGGAGACTACAAAGACGACGATGACAAATGAG-3') 和 K719 (5'-AATTCTCATTTGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCGC-3') 退火到经 SpeI-NotI 消化的 pGEX-SN 载体中而得到的 (参见图 1)。根据标准的方案, 将所得的质粒用于转化感受态的大肠杆菌细胞 (Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)。

重组抗原的生物化学表征

在经转化的大肠杆菌细胞的细胞质中表达重组 GST 融合蛋白质, 并通过使用谷胱甘肽-琼脂糖树脂 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 的亲合层析根据制造商提供的说明书来进行纯化。分别通过 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分析和 Bradford 测定法来评估蛋白质的纯度和浓度。

使用抗-FLAG-M2 单克隆抗体 (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich, USA) 作为一级抗体、碱性硫酸酶缀合的山羊抗小鼠 IgG 的抗体 (以 1 : 10000 的比例进行稀释; Sigma-Aldrich, USA) 作为二级抗体、以及硝基四氮唑兰 (NBT) 加上 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯 (BCIP) 作为底物, 将所得的重组嵌合抗原 GST-EC7-Flag 和 GST-EC8-Flag 进行 Western 印迹分析。

将亲合纯化的重组产物针对 PBS 进行透析, 然后用 PBS 以 1mg/ml 的浓度进行稀释, 再储存于 -20 $^{\circ}$ C, 直至使用。纯化产物的产率为 4mg/升至 15mg/升细菌培养物。

单一的重组抗原片段与得自 HCMV 感染个体的血清的 IgG 抗体的免疫反应性: IgG Rec-ELISA

通过使用溶于涂敷缓冲剂 (50 mM NaHCO₃, pH 9.6) 中的浓度为 1 μ g/ml 的单一抗原片段来涂敷 Maxisorb 多孔板 (Nunc), 从而进行 GST 融合产物的 ELISA 过程。在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜后, 将所述的板在 37 $^{\circ}$ C 下与封闭缓冲剂 (溶于 PBS 中的 5% 脱脂奶粉, 0.05% Tween-20) 温育 1h, 随后与得自 HCMV 血清阳性和血清阴性的个体的血清在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1h,

其中所述的血清用封闭溶液以 1:100 进行稀释。将所述的板用溶于 PBS 中的 0.05% Tween-20 进行充分的洗涤,然后将在封闭溶液中以 1:7500 进行稀释的抗人 IgG 碱性磷酸酶缀合抗体 (Sigma-Aldrich, USA) 加入到各个孔中。在 30 分钟后,在 37℃ 下,洗涤所述的板,并在显影溶液 (10% 二乙醇胺, pH 9.8、0.5mM MgCl_2 、0.05% NaN_3) 中与发色团底物对硝基苯基磷酸酯 (pNPP; Sigma-Aldrich, USA) 温育。将所得的结果记录为使用自动化的 ELISA 读取器 (Multiskan Labsystems, Finland) 在 405nm 和 620nm 处的光学密度 (OD) 之间的差异。就各种血清样品而言,一式两份进行测定,并计算平均值。

下表 3 概括了基于单一抗原片段的 ELISA 测定法的结果,其中所述的单一抗原片段表达为 GST 融合蛋白质,并使用了得自 36 个 HCMV 血清阳性和 33 个 HCMV 血清阴性的个体的血清样品。

使用全细胞 HCMV 抗原测定法 ETI-CYTOK-G PLUS (Diasorin, Saluggia, Italy), 根据制造商提供的说明书来测定血清样品中 HCMV 特异性的 IgG。就每一种重组抗原而言,截止值 (cutoff value) 被测定为平均值+由 HCMV IgG 阴性血清得到的、三倍吸光读数的标准偏差。作为对照,对各种血清估测针对野生型 GST 蛋白质的 IgG 反应性。用于评估针对单一重组抗原的阳性 IgG 反应性的诊断标准为 $\text{OD}_{\text{GST 抗原}}$ 大于截止值,并且 $\text{OD}_{\text{GST 抗原}}$ 大于 OD_{GST} 。在表 3 的各栏中报道了反应性血清的数量和相应的百分比。

表 3

重组抗原	来自 HCMV 感染的 受试者的血清	来自未受 HCMV 感染 的受试者的血清
GST-CM1.4	12/15 (80%)	2/15
GST-CM4.4	30/36 (83%)	0/33
GST-CM1.2	11/15 (73%)	0/15
GST-CM2.7	35/36 (97%)	0/33
GST-CM1.5	7/15 (47%)	0/15
GST-CM2.11	10/15 (67%)	2/15
GST-CM1.3	35/36 (97%)	0/33
GST-CM2.10	30/36 (83%)	0/33
GST-CM3.3	23/36 (64%)	1/33
GST-CM8.3	15/36 (42%)	0/33
GST-CM7.3	19/36 (53%)	0/33
GST (野生型)	0/36	0/33

下表 4 示出了使用来自 25 个妇女的血清样品 (CA1-CA25) 的 IgG Rec-ELISA 测定法结果,其中所述的妇女在近期发生了 HCMV 的再活化,或者在怀孕过程中发生二次 HCMV 感染。使用全细胞 HCMV 抗原测定法 ETI-CYTOK-G PLUS (Diasorin, Saluggia, Italy), 或者通过使用单一的重组抗原免疫测定法来测定血清样品中 HCMV 特异性的 IgG。就每一种 GST-融合产物而言,截止值被测定为平均值+由 HCMV 血清反应呈阴性的受试者得到的、吸光读数的 3SD (n = 20)。ETI-CYTOK PLUS, GST-CM2.10、GST-CM3.3、GST-CM8.3、GST-CM7.3、GST-CM1.3、GST-CM2.7 和 GST-CM4.4 的截止值分别为 0.2、0.073、0.078、0.101、0.089、0.145、0.147 和 0.138。以粗体字打印的值表示阳性应答。请注意,使用标准测定法得到的光学密度的数值不能与其他方法的数值比较,这是因为所有的测定法都是在未参照国际标准的情况下进行的。

表 4

血清 样品	CYTOK G PLUS	IgG Rec-ELISA(光学密度)						
		CM1.3	CM2.7	CM4.4	CM2.10	CM3.3	CM8.3	CM7.3
CA1	1.210	1.908	3.165	1.602	0.592	2.103	1.727	0.846
CA2	0.785	0.727	3.298	0.128	0.218	0.095	0.049	0.066
CA3	0.566	0.524	0.389	0.157	0.280	0.299	0.164	0.313
CA4	0.665	1.008	0.861	0.142	0.515	0.216	0.061	0.118
CA5	0.420	0.245	0.125	0.089	0.177	0.123	0.082	0.119
CA6	0.798	0.697	1.197	0.340	2.046	0.642	0.060	0.081
CA7	0.787	2.300	0.711	0.213	2.418	0.145	0.066	0.386
CA8	1.253	1.445	1.173	0.317	2.961	0.508	0.074	0.120
CA9	1.099	2.231	3.031	0.689	1.942	0.238	0.131	0.303
CA10	0.644	0.142	0.726	0.114	1.357	0.275	0.054	0.062
CA11	1.601	2.896	3.177	0.371	3.086	1.947	1.268	1.711
CA12	0.937	3.196	0.438	0.340	2.592	0.150	0.078	0.071
CA13	1.148	2.467	2.720	0.197	3.021	0.203	0.055	0.060
CA14	1.270	0.382	0.157	0.152	2.379	0.394	0.064	0.110
CA15	0.585	0.257	0.426	0.059	0.846	0.071	0.064	0.085
CA16	0.758	0.119	1.057	0.075	2.867	0.075	0.060	0.061
CA17	0.768	2.832	0.359	0.155	2.947	0.357	0.080	0.076
CA18	0.816	2.393	1.641	0.395	2.633	0.675	0.069	0.138
CA19	0.729	2.637	2.070	0.466	0.962	1.192	0.123	0.204
CA20	0.915	2.030	1.384	0.263	2.063	0.828	0.125	0.286
CA21	1.076	1.246	1.496	0.141	2.794	0.390	0.077	0.081
CA22	1.205	3.117	2.748	0.395	3.050	2.382	0.103	0.058
CA23	0.930	3.191	2.310	1.154	1.962	0.631	0.110	0.077
CA24	0.856	1.722	3.046	0.355	2.815	0.445	0.065	0.152
CA25	1.359	2.904	2.887	2.313	2.692	1.815	1.267	0.356

下表 5 示出了与使用单一重组抗原(IgG Rec-ELISA)所得结果相比的、商业化测定法(ETI-CYTOK-G PLUS)的性能特征。由表 5 可以清楚地知道,当使用本发明的重组抗原片段时,除了基于 CMV-3.3 抗原片段的 Rec-ELISA 以外,所述测定法的特异性和阳性预测值(参见第 3 栏和第 5 栏,均报道了假阳性的发生情况)均达到了最大值(100%)。

表 5

诊断测试	敏感性 (%)	特异性 (%)	一致性 (%)	PPV [*] (%)	NPV [*] (%)
ETI-CYTOK-G PLUS	100	100	100	100	100
CM1.3 Rec-ELISA	92.0	100	96.6	100	94.3
CM2.7 Rec-ELISA	96.0	100	98.3	100	97.1
CM4.4 Rec-ELISA	88.0	100	94.8	100	91.7
CM2.10 Rec-ELISA	100	100	100	100	100
CM3.3 Rec-ELISA	92.0	97.1	94.8	95.8	94.1
CM8.3 Rec-ELISA	36.0	100	72.4	100	67.3
CM7.3 Rec-ELISA	56.0	100	81.0	100	75.0

^{*}PPV: 阳性预测值; NPV: 阴性预测值。

重组嵌合抗原与来自 HCMV 感染个体血清的 IgG 抗体的免疫反应性

通过使用溶于涂敷缓冲剂中的浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、2 $\mu\text{g/ml}$ 和 3 $\mu\text{g/ml}$ 的 GST-EC7-Flag、GST-EC8-Flag 和 GST-EC14 来涂敷 Maxisorb 板 (Nunc)，从而进行重组嵌合抗原的 ELISA 过程。在 4℃ 下温育过夜后，将所述的板在 37℃ 下与封闭缓冲剂 (溶于 PBS 中的 5% 脱脂奶粉、0.05% Tween-20) 温育 1h，随后与血清样品在 37℃ 下温育 1h，其中所述的血清样品以 1:100 稀释于封闭溶液中。将所述的板用溶于 PBS 中的 0.05% Tween-20 进行洗涤，然后将在封闭溶液中以 1:20000 进行稀释的抗人 IgG 辣根过氧化物酶缀合的抗体 (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA) 加入到各个孔中。最后，将所述的板与发色团底物四甲基联苯胺 (TMB; Sigma-Aldrich, USA) 温育显示出酶的活性。将所得的结果记录为使用自动化的 ELISA 读取器 (LabSystem Multiskan, Finland) 在 450nm 和 620nm 处的光学密度 (Optical Density, OD) 之间的差异。就各种血清样品而言，一式两份进行测定，并计算平均值。

下表 6 示出了使用嵌合抗原 EC7-Flag、EC8-Flag 和 GST-EC14，或者全细胞 HCMV 抗原测定法 ETI-CYTOK-G PLUS (Diasorin, Saluggia, Italy) 的 ELISA 测定法的结果，其中使用的血清样品来自 36 个 HCMV 血清阳性 (C1-C36) 和 33 个 HCMV 血清阴性 (N1-N33) 的个体。就每一种嵌合抗原而言，截止值被测定为平均值+由 HCMV 血清阴性的受试者得到的、吸光读数的 3SD。ETI-CYTOK-G PLUS、GST-EC7-Flag、GST-EC8-Flag 和 GST-EC 14 的截止值分别为 0.296、0.296、0.273 和 0.203。以粗体字打印的值表示阳性应答。请注意，使用标准测定法得到的光学密度的数值不能与其他方法的数值比较，这是因为所有的测定都是在未参照国际标准的情况下进行的。

表 6

样品	ELISA 测定法 (光学密度)			
	ETI-CYTOK G PLUS	GST-EC7-Flag	GST-EC8-Flag	GST-EC14
C1	0.805	1.245	0.626	0.746
C2	1.679	2.867	2.006	2.132
C3	1.461	2.920	1.687	2.455
C4	2.896	2.813	2.185	2.988
C5	1.371	2.152	1.859	1.226
C6	2.360	2.987	2.337	3.018
C7	2.260	2.206	1.514	2.153
C8	2.585	1.579	2.771	1.405
C9	1.975	2.622	2.421	2.340
C10	0.961	2.500	2.499	2.741
C11	1.385	1.455	1.480	1.411
C12	0.657	0.595	1.825	1.206
C13	0.624	1.049	1.161	1.671
C14	1.171	1.543	1.044	0.899
C15	0.576	1.319	0.386	1.092
C16	2.772	2.927	2.225	3.104
C17	2.115	3.002	2.127	2.831
C18	2.019	2.541	2.313	1.468
C19	2.137	1.514	2.421	2.045
C20	0.637	0.814	1.475	1.097
C21	2.638	3.081	1.706	2.996
C22	0.622	1.222	1.157	1.011
C23	3.028	3.054	1.717	3.201
C24	1.027	1.831	1.863	0.935
C25	1.333	2.001	1.738	1.146
C26	0.668	1.101	1.162	1.327
C27	1.756	2.793	1.005	1.526
C28	0.759	1.323	0.822	0.828
C29	1.502	2.815	2.176	2.613
C30	1.869	0.340	1.011	2.241
C31	1.208	1.245	0.653	0.917
C32	0.523	1.732	0.492	1.523
C33	0.907	0.515	0.322	0.424
C34	0.737	2.603	1.859	2.242
C35	0.958	2.761	1.606	2.302
C36	0.281	1.270	0.486	0.254

表 6

血清 样品	ELISA 测定 (光学密度)			
	ETI-CYTOK G PLUS	GST-EC7-Flag	GST-EC8-Flag	GST-EC14
N1	0.087	0.188	0.141	0.073
N2	0.174	0.164	0.084	0.076
N3	0.129	0.185	0.149	0.075
N4	0.121	0.081	0.064	0.069
N5	0.057	0.214	0.145	0.040
N6	0.273	0.118	0.049	0.186
N7	0.095	0.143	0.107	0.051
N8	0.092	0.182	0.119	0.054
N9	0.090	0.097	0.176	0.132
N10	0.119	0.103	0.062	0.085
N11	0.089	0.144	0.031	0.055
N12	0.093	0.208	0.047	0.040
N13	0.080	0.077	0.058	0.169
N14	0.084	0.154	0.112	0.038
N15	0.105	0.130	0.086	0.051
N16	0.114	0.086	0.139	0.146
N17	0.178	0.058	0.015	0.049
N18	0.276	0.212	0.302	0.037
N19	0.118	0.075	0.067	0.043
N20	0.118	0.110	0.113	0.049
N21	0.172	0.191	0.132	0.052
N22	0.088	0.066	0.055	0.041
N23	0.103	0.244	0.328	0.112
N24	0.136	0.160	0.127	0.101
N25	0.085	0.091	0.088	0.095
N26	0.096	0.186	0.073	0.034
N27	0.096	0.116	0.099	0.045
N28	0.071	0.107	0.102	0.162
N29	0.100	0.108	0.052	0.056
N30	0.047	0.065	0.039	0.072
N31	0.167	0.212	0.139	0.123
N32	0.069	0.072	0.077	0.064
N33	0.074	0.096	0.129	0.077

下表 7 示出了与使用 EC7 和 EC8 嵌合抗原 (IgG Rec-ELISA) 所得结果相比的、商业化测定法 (ETI-CYTOK-G PLUS) 的性能特征。由表 7 可以清楚地知道, 当使用本发明的嵌合抗原时, 所述测定法的敏感性 (参见第 2 栏, 报道了假阳性的发生情况) 达到了最大值。此外, 应该注意, 使用了裂解的全细胞 CMV 抗原的商业化测试 ETI-CYTOK-G 以及具有嵌合抗原 EC7 或 EC14 的 IgG rec-ELISA 都显示出一致的性能特征, 同时保持了通常与使用重组抗原所进行的测定法相关的、可再现的水平。

表 7

诊断测试	敏感性	特异性	一致性	PPV*	NPV*
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
ETI-CYTOK-G PLUS	100	100	100	100	100
EC7-Flag IgG Rec-ELISA	100	100	100	100	100
EC8-Flag IgG Rec-ELISA	100	97.1	98.6	97.3	100
EC14 IgG Rec-ELISA	100	100	100	100	100

*PPV: 阳性预测值; NPV: 阴性预测值。

序列表

<110> Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

<120> 人巨细胞病毒 (HCMV) 的重组抗原

<130> 547

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 222

<212> DNA

<213> 人巨细胞病毒

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(222)

<400> 1

```
acc aaa gac acg tcg tta cag gct ccg cct tcc tac gag gaa agt gtt      48
Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser Val
1              5              10              15
```

```
tat aat tct ggt cgc aaa gga ccg gga cca ccg tcg tct gat gca tcc      96
Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala Ser
              20              25              30
```

```
acg gcg gct ccg cct tac acc aac gag cag gct tac cag atg ctt ctg      144
Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu Leu
              35              40              45
```

```
gcc ctg gcc cgt ctg gac gca gag cag cga gcg cag caa aac ggt aca      192
Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly Thr
              50              55              60
```

```
gat tct ttg gac gga cag act ggc acg cat      222
Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr His
65              70
```

<210> 2

<211> 74

<212> PRT

<213> 人巨细胞病毒

<400> 2

```
Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser Val
1              5              10              15
```

```
Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala Ser
              20              25              30
```

Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu Leu
 35 40 45

Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly Thr
 50 55 60

Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr His
 65 70

<210> 3
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人巨细胞病毒

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)

<400> 3
 gct cac att aac acc gtc tcc tgt cct acc gtt atg agg ttc gac cag 48
 Ala His Ile Asn Thr Val Ser Cys Pro Thr Val Met Arg Phe Asp Gln
 1 5 10 15
 cgg ctg ctg gaa gag ggc gac gag gag gat gaa gtg acc gtg atg tcg 96
 Arg Leu Leu Glu Glu Gly Asp Glu Glu Asp Glu Val Thr Val Met Ser
 20 25 30
 ccg tca ccc gag ccc gtg caa cag cag ccg ccg gtc gag ccc gtg cag 144
 Pro Ser Pro Glu Pro Val Gln Gln Gln Pro Pro Val Glu Pro Val Gln
 35 40 45
 cag cag ccc cag gga cgc ggg tct cac cgt cgg cgc tac aag gag tcg 192
 Gln Gln Pro Gln Gly Arg Gly Ser His Arg Arg Arg Tyr Lys Glu Ser
 50 55 60
 gcg ccg caa gag acg ctg cct acg aat cac gaa cgc gag att ttg gat 240
 Ala Pro Gln Glu Thr Leu Pro Thr Asn His Glu Arg Glu Ile Leu Asp
 65 70 75 80
 ctc atg cga cac agc ccc gac gtg cct cgg gag gcg gtg atg tca ccg 288
 Leu Met Arg His Ser Pro Asp Val Pro Arg Glu Ala Val Met Ser Pro
 85 90 95
 acc atg gtc acc ata cct cct ccc cag ata ccc ttt gtg ggt tcc gcg 336
 Thr Met Val Thr Ile Pro Pro Pro Gln Ile Pro Phe Val Gly Ser Ala
 100 105 110
 cgt gaa ctt 345
 Arg Glu Leu
 115

<210> 4

<211> 115
 <212> PRT
 <213> 人巨细胞病毒

<400> 4

Ala His Ile Asn Thr Val Ser Cys Pro Thr Val Met Arg Phe Asp Gln
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Glu Glu Gly Asp Glu Glu Asp Glu Val Thr Val Met Ser
 20 25 30

Pro Ser Pro Glu Pro Val Gln Gln Gln Pro Pro Val Glu Pro Val Gln
 35 40 45

Gln Gln Pro Gln Gly Arg Gly Ser His Arg Arg Arg Tyr Lys Glu Ser
 50 55 60

Ala Pro Gln Glu Thr Leu Pro Thr Asn His Glu Arg Glu Ile Leu Asp
 65 70 75 80

Leu Met Arg His Ser Pro Asp Val Pro Arg Glu Ala Val Met Ser Pro
 85 90 95

Thr Met Val Thr Ile Pro Pro Pro Gln Ile Pro Phe Val Gly Ser Ala
 100 105 110

Arg Glu Leu
 115

<210> 5
 <211> 255
 <212> DNA
 <213> 人巨细胞病毒

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(255)

<400> 5
 tca cgt cgc tct ggc gaa ccc tcg acg gtg att tat atc ccc tcg agc 48
 Ser Arg Arg Ser Gly Glu Pro Ser Thr Val Ile Tyr Ile Pro Ser Ser
 1 5 10 15

aac gag gac acg ccg gcg gat gag gag gcg gag gac agc gtt ttc acg 96
 Asn Glu Asp Thr Pro Ala Asp Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Phe Thr
 20 25 30

agc acg cgg gcg cgc agc gcc acg gaa gat ctg gat cgc atg gag gcc 144

Ser Thr Arg Ala Arg Ser Ala Thr Glu Asp Leu Asp Arg Met Glu Ala
35 40 45
ggt ttg tcg ccc tac agc gtc tcc tcg gac gct ccg tcg tcc ttc gag 192
Gly Leu Ser Pro Tyr Ser Val Ser Ser Asp Ala Pro Ser Ser Phe Glu
50 55 60
ctc gtg cgc gag acc ggc ggc acc ggc gcc gcc aag aaa ccg agc gaa 240
Leu Val Arg Glu Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Lys Lys Pro Ser Glu
65 70 75 80
aag aaa cga tcg ttt 255
Lys Lys Arg Ser Phe
85

<210> 6
<211> 85
<212> PRT
<213> 人巨细胞病毒

<400> 6

Ser Arg Arg Ser Gly Glu Pro Ser Thr Val Ile Tyr Ile Pro Ser Ser
1 5 10 15

Asn Glu Asp Thr Pro Ala Asp Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Phe Thr
20 25 30

Ser Thr Arg Ala Arg Ser Ala Thr Glu Asp Leu Asp Arg Met Glu Ala
35 40 45

Gly Leu Ser Pro Tyr Ser Val Ser Ser Asp Ala Pro Ser Ser Phe Glu
50 55 60

Leu Val Arg Glu Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Lys Lys Pro Ser Glu
65 70 75 80

Lys Lys Arg Ser Phe
85

<210> 7
<211> 96
<212> DNA
<213> 人巨细胞病毒

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (96)

<400> 7

ctt att ctc gag gag att cga cgt ccg ctg cca gat ggc acg ggg ggc Leu Ile Leu Glu Glu Ile Arg Arg Pro Leu Pro Asp Gly Thr Gly Gly 1 5 10 15	48
gac ggc ccc gag ggc gag gct att cac ctg cgt gga cgg gag gcg cat Asp Gly Pro Glu Gly Glu Ala Ile His Leu Arg Gly Arg Glu Ala His 20 25 30	96
<210> 8 <211> 32 <212> PRT <213> 人巨细胞病毒	
<400> 8 Leu Ile Leu Glu Glu Ile Arg Arg Pro Leu Pro Asp Gly Thr Gly Gly 1 5 10 15 Asp Gly Pro Glu Gly Glu Ala Ile His Leu Arg Gly Arg Glu Ala His 20 25 30	
<210> 9 <211> 480 <212> DNA <213> 人巨细胞病毒	
<220> <221> CDS <222> (1)..(480)	
<400> 9 acg agc cag aaa ccg gtg ctg ggc aag cga gtc gcg acg ccg cac gcg Thr Ser Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val Ala Thr Pro His Ala 1 5 10 15	48
tcc gcc cga gcg cag acg gtg acg tcg acg ccg gtt cag gga agg cta Ser Ala Arg Ala Gln Thr Val Thr Ser Thr Pro Val Gln Gly Arg Leu 20 25 30	96
gag aaa cag gtg tcg ggc acg ccg tcg acg gta ccc gcc acg ctg ttg Glu Lys Gln Val Ser Gly Thr Pro Ser Thr Val Pro Ala Thr Leu Leu 35 40 45	144
caa cct caa ccg gct tcg tct aaa acg acg tca tca agg aac gtg act Gln Pro Gln Pro Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Ser Arg Asn Val Thr 50 55 60	192
tct ggc gcg gga acc tct tcc gct tct tcg gct cga cag ccg tca gcc Ser Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala Arg Gln Pro Ser Ala 65 70 75 80	240
tcg gcg tcc gtt ttg tcg ccc acg gag gat gat gtc gtg tcc ccc gcc Ser Ala Ser Val Leu Ser Pro Thr Glu Asp Asp Val Val Ser Pro Ala 85 90 95	288

aca tcg ccg ctg tcc atg ctt tcg tca gcc tct ccg tcc ccg gcc aag 336
 Thr Ser Pro Leu Ser Met Leu Ser Ser Ala Ser Pro Ser Pro Ala Lys
 100 105 110

agt gcc ccc ccg tct ccg gtg aaa ggc cgg ggc agc cgc gtc ggt gtt 384
 Ser Ala Pro Pro Ser Pro Val Lys Gly Arg Gly Ser Arg Val Gly Val
 115 120 125

cct tcc ttg aaa cct act ttg ggc ggc aag gcg gtg gta ggt cga ccg 432
 Pro Ser Leu Lys Pro Thr Leu Gly Gly Lys Ala Val Val Gly Arg Pro
 130 135 140

ccc tcg gtc ccc gtg agc ggt agc gcg ccg ggt cgc ctg tcc gcc agc 480
 Pro Ser Val Pro Val Ser Gly Ser Ala Pro Gly Arg Leu Ser Gly Ser
 145 150 155 160

<210> 10
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> 人巨细胞病毒

<400> 10

Thr Ser Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val Ala Thr Pro His Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Ala Gln Thr Val Thr Ser Thr Pro Val Gln Gly Arg Leu
 20 25 30

Glu Lys Gln Val Ser Gly Thr Pro Ser Thr Val Pro Ala Thr Leu Leu
 35 40 45

Gln Pro Gln Pro Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Ser Arg Asn Val Thr
 50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala Arg Gln Pro Ser Ala
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Val Leu Ser Pro Thr Glu Asp Asp Val Val Ser Pro Ala
 85 90 95

Thr Ser Pro Leu Ser Met Leu Ser Ser Ala Ser Pro Ser Pro Ala Lys
 100 105 110

Ser Ala Pro Pro Ser Pro Val Lys Gly Arg Gly Ser Arg Val Gly Val
 115 120 125

Pro Ser Leu Lys Pro Thr Leu Gly Gly Lys Ala Val Val Gly Arg Pro

130	135	140	
Pro Ser Val Pro Val Ser Gly Ser Ala Pro Gly Arg Leu Ser Gly Ser			
145	150	155	160
<210> 11 <211> 462 <212> DNA <213> 人巨细胞病毒			
<220> <221> CDS <222> (1)..(462)			
<400> 11			
ccg ctg gtg gac atc acg gat acc gag acg agc gcc aaa ccg ccc gtc			48
Pro Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr Ser Ala Lys Pro Pro Val			
1	5	10	15
acc acc gcg tac aag ttc gag caa ccg acg ttg acg ttc ggc gcc gga			96
Thr Thr Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Pro Thr Leu Thr Phe Gly Ala Gly			
20	25	30	
gtt aac gtt cct gct ggc gcc ggc gct gcc atc ctc acg ccg acg cct			144
Val Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro			
35	40	45	
gtc aat cct tcc acg gcc ccc gct ccg gcc ccg aca cct acc ttc gcg			192
Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala			
50	55	60	
ggc acc caa acc ccg gtc aac ggt aac tcg ccc tgg gct ccg acg gcg			240
Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala			
65	70	75	80
ccg ttg ccc ggg gat atg aac ccc gcc aac tgg ccg cgc gaa cgc gcg			288
Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Trp Pro Arg Glu Arg Ala			
85	90	95	
tgg gcc ctc aag aat cct cac ctg gct tac aat ccc ttc agg atg cct			336
Trp Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala Tyr Asn Pro Phe Arg Met Pro			
100	105	110	
acg act tcc acg gct tct caa aac acc gtg tcc acc acc cct cgg agg			384
Thr Thr Ser Thr Ala Ser Gln Asn Thr Val Ser Thr Thr Pro Arg Arg			
115	120	125	
ccg tcg act cca cgc gcc gcg gtg aca caa aca gcg tct cgg gac gcc			432
Pro Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val Thr Gln Thr Ala Ser Arg Asp Ala			
130	135	140	
gct gat gag gtt tgg gct tta agg gac ctt			462
Ala Asp Glu Val Trp Ala Leu Arg Asp Leu			
145	150		

<210> 12
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> 人巨细胞病毒

<400> 12

Pro Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr Ser Ala Lys Pro Pro Val
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Pro Thr Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 20 25 30

Val Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro
 35 40 45

Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala
 50 55 60

Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala
 65 70 75 80

Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Trp Pro Arg Glu Arg Ala
 85 90 95

Trp Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala Tyr Asn Pro Phe Arg Met Pro
 100 105 110

Thr Thr Ser Thr Ala Ser Gln Asn Thr Val Ser Thr Thr Pro Arg Arg
 115 120 125

Pro Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val Thr Gln Thr Ala Ser Arg Asp Ala
 130 135 140

Ala Asp Glu Val Trp Ala Leu Arg Asp Leu
 145 150

<210> 13
 <211> 270
 <212> DNA
 <213> 人巨细胞病毒

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(270)

<400> 13
 ccg ggc agt cag aaa ccg acc agc ggt ccc ttg aac atc ccg caa caa 48
 Pro Gly Ser Gln Lys Pro Thr Ser Gly Pro Leu Asn Ile Pro Gln Gln
 1 5 10 15

 caa cag cgt cac gcg gct ttc agt ctc gtc tcc ccg cag gtg acc aag 96
 Gln Gln Arg His Ala Ala Phe Ser Leu Val Ser Pro Gln Val Thr Lys
 20 25 30

 gcc agc ccg gga agg gtc cgt cgg gac agc gcg tgg gac gtg agg ccg 144
 Ala Ser Pro Gly Arg Val Arg Arg Asp Ser Ala Trp Asp Val Arg Pro
 35 40 45

 ctc acg gag acc aga ggg gat ctt ttc tcg ggc gac gag gat tcc gac 192
 Leu Thr Glu Thr Arg Gly Asp Leu Phe Ser Gly Asp Glu Asp Ser Asp
 50 55 60

 agc tcg gat ggc tat ccc ccc aac cgt caa gat ccg cgt ttc acc gac 240
 Ser Ser Asp Gly Tyr Pro Pro Asn Arg Gln Asp Pro Arg Phe Thr Asp
 65 70 75 80

 acg ctg gtg gac atc acg gat acc gag att 270
 Thr Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Ile
 85 90

<210> 14
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> 人巨细胞病毒

<400> 14

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

 Gln Gln Arg His Ala Ala Phe Ser Leu Val Ser Pro Gln Val Thr Lys
 20 25 30

 Ala Ser Pro Gly Arg Val Arg Arg Asp Ser Ala Trp Asp Val Arg Pro
 35 40 45

 Leu Thr Glu Thr Arg Gly Asp Leu Phe Ser Gly Asp Glu Asp Ser Asp
 50 55 60

 Ser Ser Asp Gly Tyr Pro Pro Asn Arg Gln Asp Pro Arg Phe Thr Asp
 65 70 75 80

 Thr Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Ile
 85 90

<210> 15

<211> 1065
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1065)

<400> 15
 act agt ggc agt cag aaa ccg acc agc ggt ccc ttg aac atc ccg caa 48
 Thr Ser Gly Ser Gln Lys Pro Thr Ser Gly Pro Leu Asn Ile Pro Gln
 1 5 10 15
 caa caa cag cgt cac gcg gct ttc agt ctc gtc tcc ccg cag gtg acc 96
 Gln Gln Gln Arg His Ala Ala Phe Ser Leu Val Ser Pro Gln Val Thr
 20 25 30
 aag gcc agc ccg gga agg gtc cgt cgg gac agc gcg tgg gac gtg agg 144
 Lys Ala Ser Pro Gly Arg Val Arg Arg Asp Ser Ala Trp Asp Val Arg
 35 40 45
 ccg ctc acg gag acc aga ggg gat ctt ttc tcg ggc gac gag gat tcc 192
 Pro Leu Thr Glu Thr Arg Gly Asp Leu Phe Ser Gly Asp Glu Asp Ser
 50 55 60
 gac agc tcg gat ggc tat ccc ccc aac cgt caa gat ccg cgt ttc acc 240
 Asp Ser Ser Asp Gly Tyr Pro Pro Asn Arg Gln Asp Pro Arg Phe Thr
 65 70 75 80
 gac acg ctg gtg gac atc acg gat acc gag att tct ggt ggc ggt agc 288
 Asp Thr Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser
 85 90 95
 ctg gtg gac atc acg gat acc gag acg agc gcc aaa ccg ccc gtc acc 336
 Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr Ser Ala Lys Pro Pro Val Thr
 100 105 110
 acc gcg tac aag ttc gag caa ccg acg ttg acg ttc ggc gcc gga gtt 384
 Thr Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Pro Thr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Val
 115 120 125
 aac gtt cct gct ggc gcc ggc gct gcc atc ctc acg ccg acg cct gtc 432
 Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val
 130 135 140
 aat cct tcc acg gcc ccc gct ccg gcc ccg aca cct acc ttc gcg ggt 480
 Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Gly
 145 150 155 160
 acc caa acc ccg gtc aac ggt aac tcg ccc tgg gct ccg acg gcg ccg 528
 Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro
 165 170 175
 ttg ccc ggg gat atg aac ccc gcc aac tgg ccg cgc gaa cgc gcg tgg 576

Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Trp Pro Arg Glu Arg Ala Trp	
180 185 190	
gcc ctc aag aat cct cac ctg gct tac aat ccc ttc agg atg cct acg	624
Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala Tyr Asn Pro Phe Arg Met Pro Thr	
195 200 205	
act tcc acg gct tct caa aac acc gtg tcc acc acc cct cgg agg ccg	672
Thr Ser Thr Ala Ser Gln Asn Thr Val Ser Thr Thr Pro Arg Arg Pro	
210 215 220	
tcg act cca cgc gcc gcg gtg aca caa aca gcg tct cgg gac gcc gct	720
Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val Thr Gln Thr Ala Ser Arg Asp Ala Ala	
225 230 235 240	
gat gag gtt tgg gct tta agg gac ctt tct ggt ggc ggt agc acg agc	768
Asp Glu Val Trp Ala Leu Arg Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Thr Ser	
245 250 255	
cag aaa ccg gtg ctg ggc aag cga gtc gcg acg ccg cac gcg tcc gcc	816
Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val Ala Thr Pro His Ala Ser Ala	
260 265 270	
cga gcg cag acg gtg acg tcg aca ccg gtt cag gga agg gta gag aaa	864
Arg Ala Gln Thr Val Thr Ser Thr Pro Val Gln Gly Arg Val Glu Lys	
275 280 285	
cag gta tcg ggc acg ccg tcg acg gta ccc gcc acg ctg ttg caa cct	912
Gln Val Ser Gly Thr Pro Ser Thr Val Pro Ala Thr Leu Leu Gln Pro	
290 295 300	
caa ccg gct tcg tct aaa aca acg tca tca agg aac gtg act tct ggc	960
Gln Pro Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Ser Arg Asn Val Thr Ser Gly	
305 310 315 320	
gcg aga acc tct tcc gct tcg gct cga cag ccg tca gcc tcg gcg tcc	1008
Ala Arg Thr Ser Ser Ala Ser Ala Arg Gln Pro Ser Ala Ser Ala Ser	
325 330 335	
gtt ttg tcg ccc acg gag gat gat gtc gtg tcc ccc tct ggt ggc ggt	1056
Val Leu Ser Pro Thr Glu Asp Asp Val Val Ser Pro Ser Gly Gly Gly	
340 345 350	
agc ggc cgc	1065
Ser Gly Arg	
355	

<210> 16
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 16

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

Gln Gln Gln Arg His Ala Ala Phe Ser Leu Val Ser Pro Gln Val Thr
20 25 30

Lys Ala Ser Pro Gly Arg Val Arg Arg Asp Ser Ala Trp Asp Val Arg
35 40 45

Pro Leu Thr Glu Thr Arg Gly Asp Leu Phe Ser Gly Asp Glu Asp Ser
50 55 60

Asp Ser Ser Asp Gly Tyr Pro Pro Asn Arg Gln Asp Pro Arg Phe Thr
65 70 75 80

Asp Thr Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser
85 90 95

Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr Ser Ala Lys Pro Pro Val Thr
100 105 110

Thr Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Pro Thr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Val
115 120 125

Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val
130 135 140

Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Gly
145 150 155 160

Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro
165 170 175

Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Trp Pro Arg Glu Arg Ala Trp
180 185 190

Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala Tyr Asn Pro Phe Arg Met Pro Thr
195 200 205

Thr Ser Thr Ala Ser Gln Asn Thr Val Ser Thr Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val Thr Gln Thr Ala Ser Arg Asp Ala Ala
225 230 235 240

Asp Glu Val Trp Ala Leu Arg Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Thr Ser
245 250 255

Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val Ala Thr Pro His Ala Ser Ala
260 265 270

Arg Ala Gln Thr Val Thr Ser Thr Pro Val Gln Gly Arg Val Glu Lys
275 280 285

Gln Val Ser Gly Thr Pro Ser Thr Val Pro Ala Thr Leu Leu Gln Pro
290 295 300

Gln Pro Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Ser Arg Asn Val Thr Ser Gly
305 310 315 320

Ala Arg Thr Ser Ser Ala Ser Ala Arg Gln Pro Ser Ala Ser Ala Ser
325 330 335

Val Leu Ser Pro Thr Glu Asp Asp Val Val Ser Pro Ser Gly Gly Gly
340 345 350

Ser Gly Arg
355

<210> 17
<211> 879
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(879)

<400> 17
act agt gct cac att aac acc gtc tcc tgt cct acc gtt atg agg ttc 48
Thr Ser Ala His Ile Asn Thr Val Ser Cys Pro Thr Val Met Arg Phe
1 5 10 15

gac cag cgg ctg ctg gaa gag ggc gac gag gag gat gaa gtg acc gtg 96
Asp Gln Arg Leu Leu Glu Glu Gly Asp Glu Glu Asp Glu Val Thr Val
20 25 30

atg tcg ccg tca ccc gag ccc gtg caa cag cag ccg ccg gtc gag ccc 144
Met Ser Pro Ser Pro Glu Pro Val Gln Gln Gln Pro Pro Val Glu Pro

35	40	45	
gtg cag cag cag ccc cag gga cgc ggg tct cac cgt cgg cgc tac aag Val Gln Gln Gln Pro Gln Gly Arg Gly Ser His Arg Arg Arg Tyr Lys 50 55 60			192
gag tcg gcg ccg caa gag acg ctg cct acg aat cac gaa cgc gag att Glu Ser Ala Pro Gln Glu Thr Leu Pro Thr Asn His Glu Arg Glu Ile 65 70 75 80			240
ttg gat ctc atg cga cac agc ccc gac gtg cct cgg gag gcg gtg atg Leu Asp Leu Met Arg His Ser Pro Asp Val Pro Arg Glu Ala Val Met 85 90 95			288
tca ccg acc atg gtc acc ata cct cct ccc cag ata ccc ttt gtg ggt Ser Pro Thr Met Val Thr Ile Pro Pro Pro Gln Ile Pro Phe Val Gly 100 105 110			336
tcc gcg cgt gaa ctt tct ggt ggc ggt agc tca cgt cgc tct ggc gaa Ser Ala Arg Glu Leu Ser Gly Gly Gly Ser Ser Arg Arg Ser Gly Glu 115 120 125			384
ccc tcg acg gtg att tat atc ccc tcg agc aac gag gac acg ccg gcg Pro Ser Thr Val Ile Tyr Ile Pro Ser Ser Asn Glu Asp Thr Pro Ala 130 135 140			432
gat gag gag gcg gag gac agc gtt ttc acg agc acg cgg gcg cgc agc Asp Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Phe Thr Ser Thr Arg Ala Arg Ser 145 150 155 160			480
gcc acg gaa gat ctg gat cgc atg gag gcc ggt ttg tcg ccc tac agc Ala Thr Glu Asp Leu Asp Arg Met Glu Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ser 165 170 175			528
gtc tcc tcg gac gct ccg tcg tcc ttc gag ctc gtg cgc gag acc ggc Val Ser Ser Asp Ala Pro Ser Ser Phe Glu Leu Val Arg Glu Thr Gly 180 185 190			576
ggc acc ggc gcc gcc aag aaa ccg agc gaa aag aaa cga tcg ttt tct Gly Thr Gly Ala Ala Lys Lys Pro Ser Glu Lys Lys Arg Ser Phe Ser 195 200 205			624
ggt ggc ggt agc acc aaa gac acg tcg tta cag gct ccg cct tcc tac Gly Gly Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr 210 215 220			672
gag gaa agt gtt tat aat tct ggt cgc aaa gga ccg gga cca ccg tcg Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser 225 230 235 240			720
tct gat gca tcc acg gcg gct ccg cct tac acc aac gag cag gct tac Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr 245 250 255			768
cag atg ctt ctg gcc ctg gcc cgt ctg gac gca gag cag cga gcg cag Gln Met Leu Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln 260 265 270			816

caa aac ggt aca gat tct ttg gac gga cag act ggc acg cat tct ggt 864
 Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr His Ser Gly
 275 280 285

ggc ggt agc ggc cgc 879
 Gly Gly Ser Gly Arg
 290

<210> 18
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 18

Thr Ser Ala His Ile Asn Thr Val Ser Cys Pro Thr Val Met Arg Phe
 1 5 10 15

Asp Gln Arg Leu Leu Glu Glu Gly Asp Glu Glu Asp Glu Val Thr Val
 20 25 30

Met Ser Pro Ser Pro Glu Pro Val Gln Gln Gln Pro Pro Val Glu Pro
 35 40 45

Val Gln Gln Gln Pro Gln Gly Arg Gly Ser His Arg Arg Arg Tyr Lys
 50 55 60

Glu Ser Ala Pro Gln Glu Thr Leu Pro Thr Asn His Glu Arg Glu Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Leu Met Arg His Ser Pro Asp Val Pro Arg Glu Ala Val Met
 85 90 95

Ser Pro Thr Met Val Thr Ile Pro Pro Pro Gln Ile Pro Phe Val Gly
 100 105 110

Ser Ala Arg Glu Leu Ser Gly Gly Gly Ser Ser Arg Arg Ser Gly Glu
 115 120 125

Pro Ser Thr Val Ile Tyr Ile Pro Ser Ser Asn Glu Asp Thr Pro Ala
 130 135 140

Asp Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Phe Thr Ser Thr Arg Ala Arg Ser
 145 150 155 160

Ala Thr Glu Asp Leu Asp Arg Met Glu Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ser
165 170 175

Val Ser Ser Asp Ala Pro Ser Ser Phe Glu Leu Val Arg Glu Thr Gly
180 185 190

Gly Thr Gly Ala Ala Lys Lys Pro Ser Glu Lys Lys Arg Ser Phe Ser
195 200 205

Gly Gly Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr
210 215 220

Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser
225 230 235 240

Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr
245 250 255

Gln Met Leu Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln
260 265 270

Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr His Ser Gly
275 280 285

Gly Gly Ser Gly Arg
290

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 19
ggactagtgg cagtcagaaa ccgacca

27

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 20

ggactagtgg cagtcagaaa ccgaccag 28

<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 21 35
tctggtggcg gtagcctggt ggacatcacg gatac

<210> 22
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 22 39
cgtgctaccg ccaccagaaa ggtccttaa agcccaaac

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 23 36
tctggtggcg gtagcacgag ccagaaaccg gtgctg

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 24 30
ccgcggccgc tggacacgac atcatcctcc

<210> 25
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 25 ggactagtgc tcacattaac accgtctc	28
<210> 26 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 26 gtgagctacc gccaccagaa agttcacgcg cggaac	36
<210> 27 <211> 34 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 27 ctttctggtg gcggtagctc acgtcgtctt ggcg	34
<210> 28 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 28 ggtgctaccg ccaccagaaa acgatcgttt cttttcgc	38
<210> 29 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 29 ttttctggtg gcggtagcac caaagacacg tcgttac	37
<210> 30 <211> 28 <212> DNA <213> 人工的	

<220>		
<223>	合成的	
<400>	30	28
ccgcggcgcg taccgccacc agaatgcg		
<210>	31	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	31	37
ggccgcggag actacaaaga cgacgatgac aaatgag		
<210>	32	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	32	37
aatctctcatt tgtcatcgtc gtctttgtag tctccgc		
<210>	33	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(3)..(38)	
<400>	33	44
gc ggc cgc gga gac tac aaa gac gac gat gac aaa tga gaatcc		
Gly Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
1 5 10		
<210>	34	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的构建体	

<400> 34

Gly Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5 10

<210> 35

<211> 1236

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1236)

<400> 35

act agt cgt gct ggc cag ccg ctg gtg gac atc acg gat acc gag acg 48
 Thr Ser Arg Ala Gly Gln Pro Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr
 1 5 10 15

agc gcc aaa ccg ccc gtc acc acc gcg tac aag ttc gag caa ccg acg 96
 Ser Ala Lys Pro Pro Val Thr Thr Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Pro Thr
 20 25 30

ttg acg ttc ggc gcc gga gtt aac gtt cct gct ggc gcc ggc gct gcc 144
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Val Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala
 35 40 45

atc ctc acg ccg acg cct gtc aat cct tcc acg gcc ccc gct ccg gcc 192
 Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala
 50 55 60

ccg aca cct acc ttc gcg ggt acc caa acc ccg gtc aac ggt aac tcg 240
 Pro Thr Pro Thr Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser
 65 70 75 80

ccc tgg gct ccg acg gcg ccg ttg ccc ggg gat atg aac ccc gcc aac 288
 Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn
 85 90 95

tgg ccg cgc gaa cgc gcg tgg gcc ctc aag aat cct cac ctg gct tac 336
 Trp Pro Arg Glu Arg Ala Trp Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala Tyr
 100 105 110

aat ccc ttc agg atg cct acg act tcc acg gct tct caa aac acc gtg 384
 Asn Pro Phe Arg Met Pro Thr Thr Ser Thr Ala Ser Gln Asn Thr Val
 115 120 125

tcc acc acc cct cgg agg ccg tcg act cca cgc gcc gcg gtg aca caa 432
 Ser Thr Thr Pro Arg Arg Pro Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val Thr Gln
 130 135 140

aca gcg tct cgg gac gcc gct gat gag gtt tgg gct tta agg gac ctt 480
 Thr Ala Ser Arg Asp Ala Ala Asp Glu Val Trp Ala Leu Arg Asp Leu

145	150	155	160	
tct ggt ggc ggt agc acc aaa gac acg tcg tta cag gct ccg cct tcc				528
Ser Gly Gly Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser	165	170	175	
tac gag gaa agt gtt tat aat tct ggt cgc aaa gga ccg gga cca ccg				576
Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro	180	185	190	
tcg tct gat gca tcc acg gcg gct ccg cct tac acc aac gag cag gct				624
Ser Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala	195	200	205	
tac cag atg ctt ctg gcc ctg gcc cgt ctg gac gca gag cag cga gcg				672
Tyr Gln Met Leu Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala	210	215	220	
cag caa aac ggt aca gat tct ttg gac gga cag act ggc acg cat tcc				720
Gln Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr His Ser	225	230	235	240
ggg ggt ggt agt ctc acg agc cag aaa ccg gtg ctg ggc aag cga gtc				768
Gly Gly Gly Ser Leu Thr Ser Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val	245	250	255	
gcg acg ccg cac gcg tcc gcc cga gcg cag acg gtg acg tcg acg ccg				816
Ala Thr Pro His Ala Ser Ala Arg Ala Gln Thr Val Thr Ser Thr Pro	260	265	270	
gtt cag gga agg cta gag aaa cag gtg tcg ggc acg ccg tcg acg gta				864
Val Gln Gly Arg Leu Glu Lys Gln Val Ser Gly Thr Pro Ser Thr Val	275	280	285	
ccc gcc acg ctg ttg caa cct caa ccg gct tcg tct aaa acg acg tca				912
Pro Ala Thr Leu Leu Gln Pro Gln Pro Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser	290	295	300	
tca agg aac gtg act tct ggc gcg gga acc tct tcc gct tct tcg gct				960
Ser Arg Asn Val Thr Ser Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala	305	310	315	320
cga cag ccg tca gcc tcg gcg tcc gtt ttg tcg ccc acg gag gat gat				1008
Arg Gln Pro Ser Ala Ser Ala Ser Val Leu Ser Pro Thr Glu Asp Asp	325	330	335	
gtc gtg tcc ccc gcc aca tcg ccg ctg tcc atg ctt tcg tca gcc tct				1056
Val Val Ser Pro Ala Thr Ser Pro Leu Ser Met Leu Ser Ser Ala Ser	340	345	350	
ccg tcc ccg gcc aag agt gcc ccc ccg tct ccg gtg aaa ggc cgg ggc				1104
Pro Ser Pro Ala Lys Ser Ala Pro Pro Ser Pro Val Lys Gly Arg Gly	355	360	365	
agc cgc gtc ggt gtt cct tcc ttg aaa cct act ttg ggc ggc aag gcg				1152
Ser Arg Val Gly Val Pro Ser Leu Lys Pro Thr Leu Gly Gly Lys Ala	370	375	380	

gtg gta ggt cga ccg ccc tcg gtc ccc gtg agc ggt agc gcg ccg ggt 1200
 Val Val Gly Arg Pro Pro Ser Val Pro Val Ser Gly Ser Ala Pro Gly
 385 390 395 400

cgc ctg tcc ggc agc tct ggt ggc ggt agc ggc cgc 1236
 Arg Leu Ser Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Arg
 405 410

<210> 36
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 36

Thr Ser Arg Ala Gly Gln Pro Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr
 1 5 10 15

Ser Ala Lys Pro Pro Val Thr Thr Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Pro Thr
 20 25 30

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Val Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala
 35 40 45

Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala
 50 55 60

Pro Thr Pro Thr Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser
 65 70 75 80

Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn
 85 90 95

Trp Pro Arg Glu Arg Ala Trp Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala Tyr
 100 105 110

Asn Pro Phe Arg Met Pro Thr Thr Ser Thr Ala Ser Gln Asn Thr Val
 115 120 125

Ser Thr Thr Pro Arg Arg Pro Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val Thr Gln
 130 135 140

Thr Ala Ser Arg Asp Ala Ala Asp Glu Val Trp Ala Leu Arg Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser
165 170 175

Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro
180 185 190

Ser Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala
195 200 205

Tyr Gln Met Leu Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala
210 215 220

Gln Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr His Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Leu Thr Ser Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val
245 250 255

Ala Thr Pro His Ala Ser Ala Arg Ala Gln Thr Val Thr Ser Thr Pro
260 265 270

Val Gln Gly Arg Leu Glu Lys Gln Val Ser Gly Thr Pro Ser Thr Val
275 280 285

Pro Ala Thr Leu Leu Gln Pro Gln Pro Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser
290 295 300

Ser Arg Asn Val Thr Ser Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala
305 310 315 320

Arg Gln Pro Ser Ala Ser Ala Ser Val Leu Ser Pro Thr Glu Asp Asp
325 330 335

Val Val Ser Pro Ala Thr Ser Pro Leu Ser Met Leu Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Pro Ser Pro Ala Lys Ser Ala Pro Pro Ser Pro Val Lys Gly Arg Gly
355 360 365

Ser Arg Val Gly Val Pro Ser Leu Lys Pro Thr Leu Gly Gly Lys Ala
370 375 380

Val Val Gly Arg Pro Pro Ser Val Pro Val Ser Gly Ser Ala Pro Gly

385	390	395	400
Arg Leu Ser Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Arg	405	410	
<210> 37			
<211> 33			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 37			
ggggatccca ctagtcgtgc tggccagccg ctg			33
<210> 38			
<211> 39			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 38			
ggtgctaccg ccaccagaaa ggtcccttaa agcccaaac			39
<210> 39			
<211> 40			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 39			
ccitttctggt ggcggtagca ccaaagacac gtcgttacag			40
<210> 40			
<211> 37			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 40			
gagactacca cccccggaat gcgtgccagt ctgtccg			37
<210> 41			
<211> 37			
<212> DNA			

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 41

cattccgggg gtgtagtct cacgagccag aaaccgg

37

<210> 42

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工的

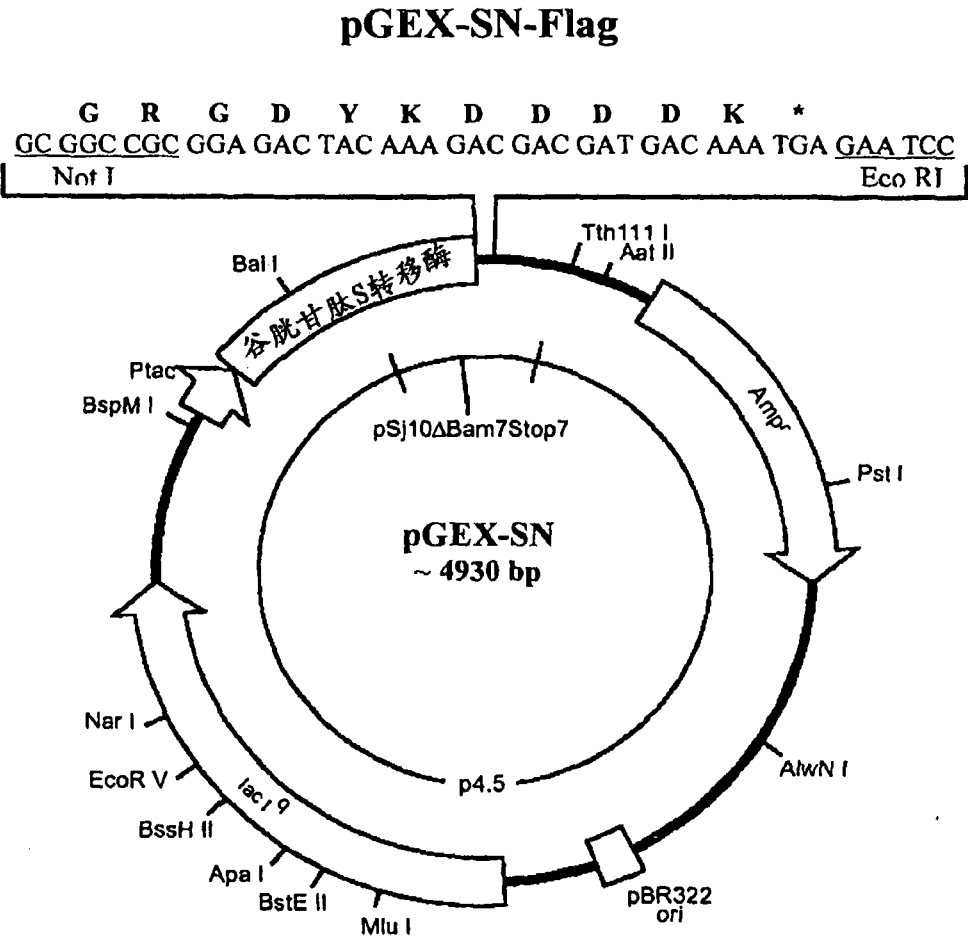
<220>

<223> 合成的

<400> 42

ccagactega gtcacccgcg gccgctaccg ccaccagagc tgcc

44



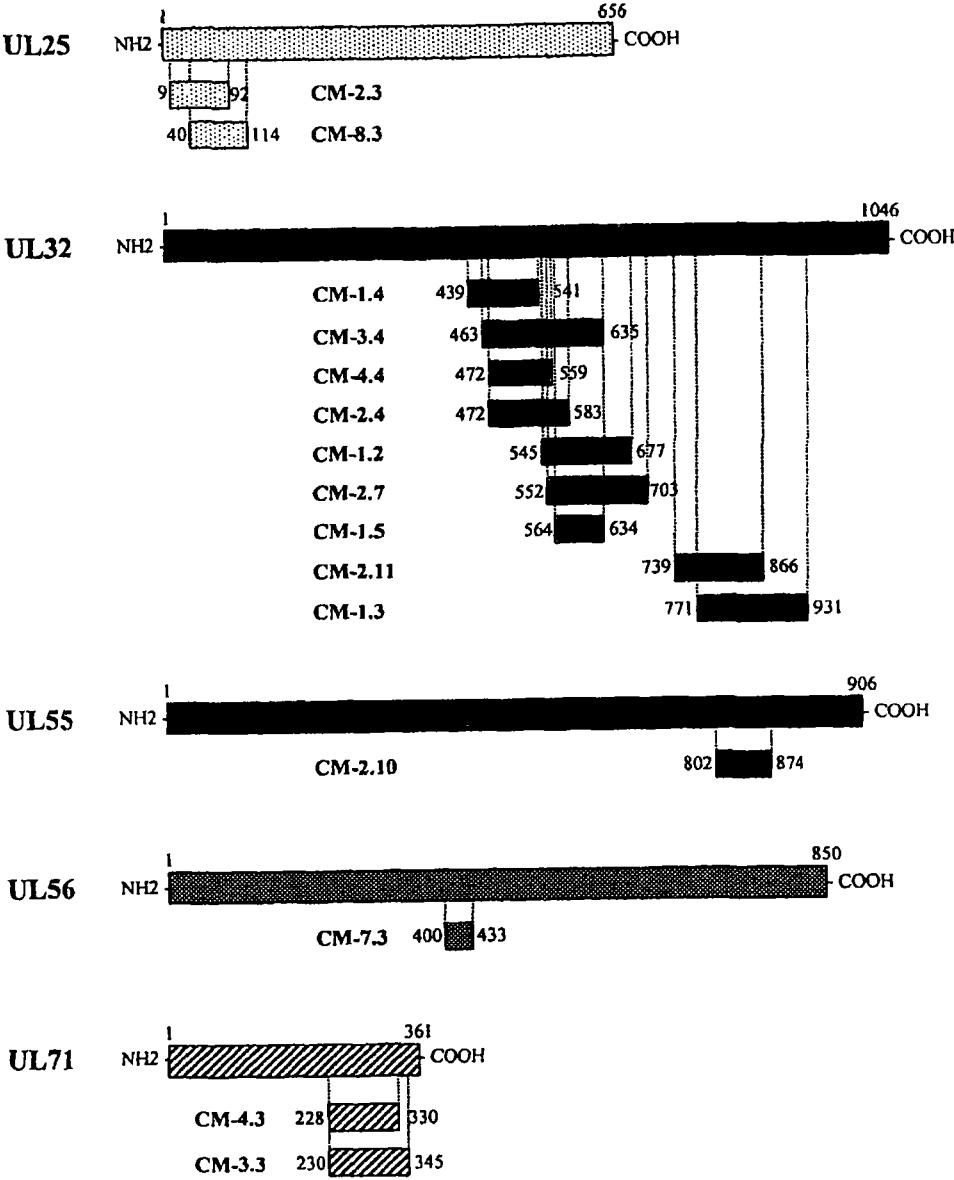


图 2

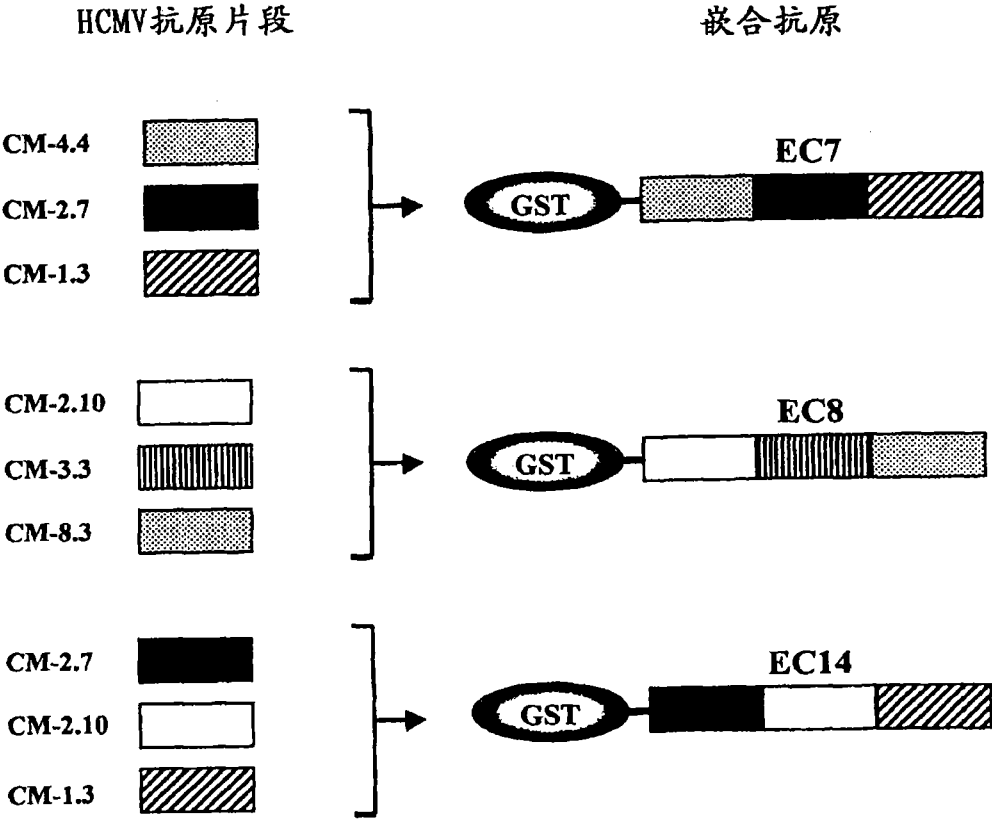


图 3

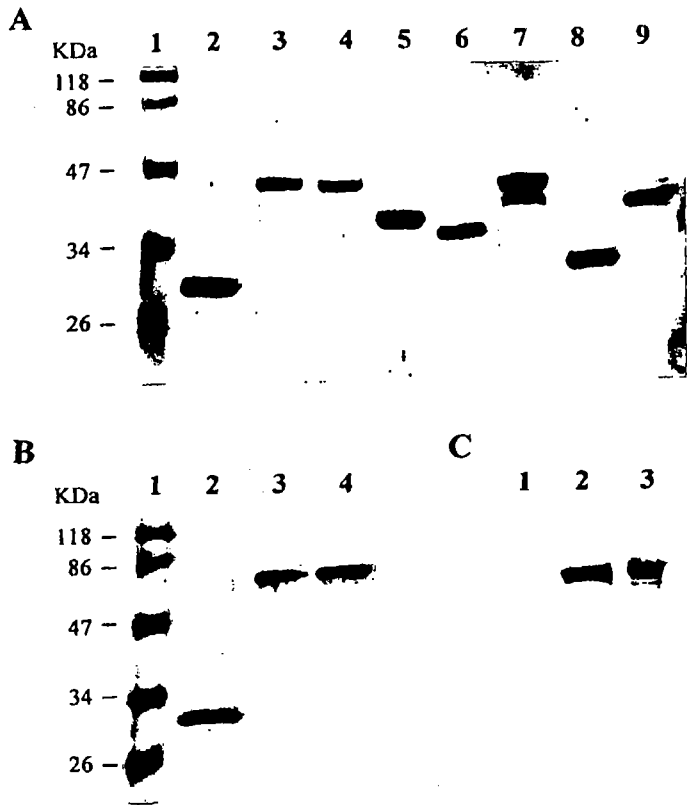


图 4