

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/31

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/22 G01N 33/53

C12Q 1/68 C07K 16/12

A61K 39/095 A61K 39/395

A61K 48/00

[21] 申请号 00812746.8

[43] 公开日 2002 年 10 月 9 日

[11] 公开号 CN 1373805A

[22] 申请日 2000.7.13 [21] 申请号 00812746.8

[30] 优先权

[32] 1999.7.14 [33] GB [31] 9916529.2

[86] 国际申请 PCT/IB00/01026 2000.7.13

[87] 国际公布 WO01/04316 英 2001.1.18

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.11

[71] 申请人 启龙股份公司

地址 意大利锡耶纳

[72] 发明人 V·马斯格阿尼 V·斯卡拉托

M·斯卡塞利 C·加莱奥蒂

M·莫拉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 76 页 附图页数 0 页

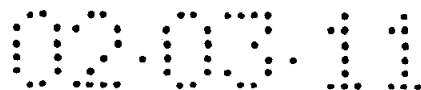
[54] 发明名称 脑膜炎球菌的抗原性肽

[57] 摘要

WO99/36544 公开了大量的来自脑膜炎奈瑟球菌的蛋白质。本发明涉及这些蛋白质的含有至少一个抗原决定簇的片段。还公开了含有这些片段的同源序列和蛋白质。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版



权 利 要 求 书

1.一种片段，其特征在于，它是 WO99/36544 中所公开的蛋白质的片段，所述片段含有至少一个抗原决定簇。

5 2. 如权利要求 1 所述的片段，其特征在于，片段长度为 100 个氨基酸或更短。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的片段，其特征在于，片段长度为 3 个氨基酸或更长。

10 4. 如权利要求 1—3 中任一权利要求所述的片段，其特征在于，它是表 1 中 1769 种片段之一。

5. 一种多肽，其特征在于，它与权利要求 1—4 中任一权利要求所述的片段有 50%或更高的序列相同性。

15 6. 一种蛋白质，其特征在于，它包含权利要求 1、2 或 3 所述的一种或多种片段，附加条件是该蛋白质不是 WO99/36544 中所公开的 45 种完整蛋白质序列之一。

7. 一种抗体，其特征在于，它识别权利要求 1—4 中任一项所述的片段。

8. 一种蛋白质，其特征在于，它包含一肽序列，所述肽序列被权利要求 7 所述的抗体识别。

20 9. 一种核酸，其特征在于，它编码权利要求 1、2、或 3 所述的片段，权利要求 5 所述的多肽，或权利要求 8 所述的蛋白质。

10. 一种组合物，其特征在于，它包含权利要求 1、2、或 3 所述的片段，权利要求 5 所述的多肽，权利要求 8 所述的蛋白质，权利要求 7 所述的抗体，和/或权利要求 9 所述的核酸，其中该组合物是疫苗、诊断试剂或免疫原性组合物。

11. 如权利要求 10 所述的组合物的用途，其特征在于，用作药物。

25 12. 如权利要求 1、2、或 3 所述的片段，权利要求 5 所述的多肽，权利要求 8 所述的蛋白质，权利要求 7 所述的抗体，和/或权利要求 9 所述的核酸的用途，其特征在于，用于生产下列物质：(i)用于治疗或预防奈瑟球菌属细菌感染的药剂；(ii)用于检测奈瑟球菌属细菌或检测抗奈瑟球菌属细菌抗体是否存在的诊断试剂；和/或(iii)用于产生抗奈瑟球菌属细菌的抗体的试剂。

30 13. 一种治疗患者的方法，其特征在于，包括给予患者治疗有效量的权利要求 10 所述的组合物。

说明书

脑膜炎球菌的抗原性肽

5 在本文中提及的所有文件都全部通过引用纳入本文。尤其是国际专利申请 WO99/36544 的内容全部引入本文。

发明领域

本发明涉及来自细菌—脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)的抗原性肽序列。

10

背景技术

脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)是不能动的、对人有致病性的革兰氏阴性双球菌。

15 根据该菌的荚膜多糖,已经鉴定出 12 种脑膜炎奈瑟球菌的血清型。A 型是南撒哈拉-非洲地区流行病中最常见的病原体。B 型和 C 型血清型菌是导致美国以及大多数发达国家内大多数病例的原因。W135 和 Y 型血清型菌是导致美国和发达国家的其余病例的原因。

20 目前使用的脑膜炎球菌疫苗是由血清型 A、C、Y 和 W135 组成的四价多糖疫苗。然而脑膜炎球菌 B(menB)仍是一个问题。不能采用多糖方法,因为 menB 荚膜多糖是一种 $\alpha(2-8)$ -相连的 N-乙酰神经氨酸的聚合物,它也存在于哺乳动物组织中。一种 menB 疫苗方法是采用外膜蛋白(OMP)的混合物。为了克服抗原变异性,已经构建了含有高达 9 种不同膜孔蛋白的多价疫苗(例如, Poolman JT(1992) Infect. Agents Dis. 4:13-28)。用于外膜疫苗的其它蛋白是 opa 和 opc 蛋白,但是这些方法均不能克服抗原变异性(例如 Ala' Aldeen 和 Borriello(1996) Vaccine 14(1):49-53)。

25

本发明

本发明提供了在国际专利申请 WO99/36544 中所公开的蛋白质的片段,其中所述片段含有至少一个抗原决定簇。

30 因此,如果在 WO99/36544 中公开的任一特定蛋白质序列的长度为 x 个氨基酸(见表 II),那么本发明提供了该蛋白质的至多含 x-1 个氨基酸的片段。该片段可以比其更短(例如 x-2, x-3, x-4,...),并且宜为 100 个氨基酸或更少(例如 90 个氨基酸, 80 个氨

基酸等)。该片段可以短至 3 个氨基酸, 但宜为更长(如高达 6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、50、75、或 100 个氨基酸)。

优选的片段含有表 I 中所公开的脑膜炎球菌肽序列, 或其亚序列。片段可以比表 I 中所给出的片段更长, 例如当表 I 中的片段是从蛋白质的氨基酸残基 p 至残基 q, 那么

5 本发明还涉及从残基(p-1)、(p-2)或(p-3)至残基(q+1)、(q+2)或(q+3)的片段。

本发明还提供了与这些片段同源(即有序列相同性)的多肽。根据具体的序列, 序列相同性的程度宜大于 50%(例如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。这些同源的多肽包括片段的突变体和等位基因变体。两个序列之间的相同性宜用 Smith-Waterman 同源性搜寻算法确定, 如在 MPSRCH 程序(Oxford Molecular)中, 采用参数
10 “缺口罚分(gap open penalty)”为 12, “缺口延伸罚分(gap extension penalty)”为 1 进行缺口仿射搜索。

本发明还提供了含有一种或多种上述片段的蛋白质。

本发明的附加条件是: 在其范围内不包括含有 WO99/36544 中所公开的 45 个蛋白质序列中任一个蛋白质序列的蛋白质(即 WO99/36544 中偶数 SEQ ID 2, 4, 6, 8, 10, ...,
15 888, 890, 892)。

当然, 本发明的蛋白质可以用多种方法制备(例如, 重组表达、从细胞培养物中纯化、化学合成等), 并可采用各种形式(例如天然的、C 末端和/或 N 末端融合形式等)。它们宜制成基本上纯净的形式(即基本上不含其它奈瑟球菌或宿主细胞蛋白)。短的蛋白质优选用化学肽合成法生产。

20 另一方面, 本发明提供了识别本发明片段的抗体, 附加条件是本发明在其范围内不包括识别 WO99/36544 中 45 个完整蛋白质序列之一的抗体。抗体可以是多克隆的, 或更佳地是单克隆的, 并且可以用任何合适方式产生。

本发明还提供了含有被这些抗体识别的肽序列的蛋白质。当然, 这些肽序列包括 WO99/36544 中脑膜炎球菌蛋白质的片段, 但还包括结合于免疫球蛋白时模拟脑膜炎球菌肽抗原性结构的肽。
25

另一方面, 本发明提供了编码本发明所述片段和蛋白质的核酸, 附加条件是本发明在其范围内不包括编码 WO99/36544 中 45 个中任一个蛋白质序列的核酸。

此外, 本发明提供了一类核酸, 所述核酸含有与这些序列同源(即有序列相同性)的序列。此外, 本发明还提供了可杂交于这些序列(较佳地在“高度严紧”条件下杂交
30 (如 65°C, 0.1×SSC, 0.5%SDS 溶液中))的核酸。

还应理解, 本发明提供了一类核酸, 所述核酸含有与上述序列互补的序列(例如用于反义或探测目的)。

当然，本发明的核酸可以用多种方法制备(例如，化学合成、从基因组或 cDNA 文库、或从生物体本身制得等)，并可采用各种形式(例如单链、双链、载体、探针等)。此外，术语“核酸”包括 DNA 和 RNA，以及它们的类似物，如含有修饰骨架的那些类似物，还包括肽核酸(PNA)等。

- 5 另一方面，本发明提供了含有本发明的核苷酸序列的载体(如表达载体)以及用这些载体转化的宿主细胞。

另一方面，本发明提供了含有本发明蛋白质、抗体和/或核酸的组合物。这些组合物适合作为例如疫苗、诊断试剂或免疫原性组合物。

- 10 本发明还提供了用作药剂(例如作为疫苗或免疫原性组合物)，或作为诊断试剂的本发明的核酸、蛋白质或抗体。本发明还提供了本发明的核酸、蛋白质或抗体在生产下列物质中的应用：(i)用于治疗或预防奈瑟球菌属细菌感染的药剂；(ii)用于检测奈瑟球菌属细菌或检测抗奈瑟球菌属细菌抗体是否存在的诊断试剂；和/或(iii)用于产生抗奈瑟球菌属细菌的抗体的试剂。所述的奈瑟球菌属细菌可以是任何物种或菌株(例如淋病奈瑟球菌)，但优选脑膜炎奈瑟球菌，尤其是菌株 A 或菌株 B。

- 15 本发明还提供了一种治疗患者的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的本发明的核酸、蛋白质和/或抗体。

另一方面，本发明提供了各种方法。

提供了一种生产本发明的蛋白的方法，该方法包括步骤：在诱导蛋白表达的条件下，培育本发明的宿主细胞。

- 20 提供了一种生产本发明蛋白质或核酸的方法，其中用化学法部分或全部地合成所述蛋白或核苷酸。

提供了一种检测本发明的多核苷酸的方法，该方法包括下列步骤：(a)在杂交条件下使本发明的核酸探针与生物样品接触，形成双链体；和(b)检测所述双链体。

- 25 提供了一种检测本发明的蛋白质的方法，该方法包括下列步骤：(a)在适合形成抗体-抗原复合物的条件下使本发明的抗体和生物样品接触；和(b)检测所述复合物。

下面是可用于实施本发明(例如为了免疫或诊断目的而使用所公开的序列)的标准技术和程序的综述。该综述不是对本发明的限制，相反它只是给出了一些可以使用但并非必需的例子。

30 综述

除非另有描述，本发明的实施将采用分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术，这些均是本领域技术人员所知的。这些技术在下列文献中有全面的描

- 述：例如，Sambrook《分子克隆实验手册》第2版(1989)；《DNA克隆》第I和II卷(D.N. Glover 编 1985)；《寡核苷酸合成》(M.J. Gait 编, 1984)；《核酸杂交》(B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编, 1984)；《转录和翻译》(B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编, 1984)；《动物细胞培养》(R.I. Freshney 编, 1986)；《固定化细胞和酶》(IRL 出版社, 1986)；B. Perbal, 5 《分子克隆实用指南》(1984)；《酶学方法》系列丛书(Academic Press, Inc.), 尤其是 154 和 155 卷；《哺乳动物细胞的基因转移载体》(J.H. Miller 和 M.P. Calos 编, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)；Mayer 和 Walker 编(1987), 《细胞和分子生物学的免疫化学方法》(Academic Press, London)；Scopes,(1987)《蛋白质纯化：原理和实践》第2版(Springer-Verlag, N.Y.), 以及《实验免疫学手册》I-IV 卷(D.M. Weir 和 C.C. 10 Blackwell 编 1986)。

在本说明书中采用了核苷酸和氨基酸的标准缩写。

本文引用的所有出版物、专利和专利申请均全部纳入本文作参考。

定义

- 15 当组合物中总 X+Y 重量的至少 85%是 X 时，则称含有 X 的组合物“基本上没有 Y”。较佳的，X 占组合物中 X+Y 总重量的至少约 90%，更佳至少约 95%或者甚至 99%(重量)。

术语“包含”指“含有”和“由.....构成”，例如“包含”X 的组合物可以完全由 X 构成，或者可以含有 X 之外的物质，例如 X+Y。

- 20 术语“抗原决定簇”包括 B 细胞表位和 T 细胞表位。

- 术语“异源”指在自然界中发现不在一起的两种生物学组分。此组分可以是宿主细胞、基因、或调控区如启动子。尽管异源组分在自然界中发现不在一起，但是它们能一起起作用，例如当与某基因异源的一种启动子与该基因操作性相连时。另一个例子是脑膜炎球菌序列与小鼠宿主细胞异源。另一例子是来自相同或不同蛋白质的两个 25 表位，已经以自然界没有的排列方式组装在一个蛋白质中。

- “复制起点”是启动和调节多核苷酸(例如表达载体)复制的一种多核苷酸序列。复制起点可作为细胞内多核苷酸复制的自主性单位，能在其自身的控制下进行复制。复制起点是载体在特定宿主细胞中复制所需要的。有了某一复制起点，表达载体就能在细胞中合适蛋白的存在下高拷贝数的复制。复制起点的例子是在酵母中有效的自主 30 复制序列；以及在 COS-7 细胞中有效的病毒性 T-抗原。

表达系统

脑膜炎球菌属细菌的核苷酸序列可在各种不同的表达系统中表达；例如与哺乳动物细胞、杆状病毒、植物、细菌和酵母一起使用的那些系统。

i. 哺乳动物系统

5 哺乳动物表达系统是本领域中已知的。哺乳动物启动子是能结合哺乳动物 RNA 聚合酶并启动下游(3')编码序列(如结构基因)转录成 mRNA 的任何 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区，其通常邻近编码序列的 5'端，还具有一个 TATA 盒，其通常位于转录起始位点上游 25-30 个碱基对(bp)处。认为 TATA 盒指导 RNA 聚合酶 II 在正确位点开始 RNA 合成。哺乳动物启动子还含有一个上游启动子元件，其通常位于 TATA
10 盒上游 100 至 200bp 内。该上游启动子元件决定了转录启动的速度，并可在两个方向之一上起作用[Sambrook 等人(1989)“克隆基因在哺乳动物细胞中的表达”《分子克隆：实验手册》，第 2 版]。

哺乳动物病毒基因通常是高表达的，具有广泛的宿主范围；因此，编码哺乳动物病毒基因的序列提供了特别有用的启动子序列。例子包括 SV40 早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒 LTR 启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)以及单纯疱疹病毒启动子。
15 另外，从非病毒基因(如鼠金属硫蛋白基因)衍生的序列也提供了有用的启动子序列。表达可以是组成型的或受调控的(诱导型)，取决于启动子能否在激素反应性细胞中用促糖皮质激素诱导。

增强元件(增强子)的存在，联合上述启动子元件通常会提高表达水平。增强子是
20 这样一种调控性 DNA 序列，当其与同源或异源启动子相连，合成在正常的 RNA 起始位点开始时，它能刺激转录提高 1000 倍。当增强子位于转录起始位点的上游或下游，处于正常或翻转方向，或距离启动子 1000 个核苷酸以上的距离时，它均具有活性 [Maniatis 等人(1987)Science 236:1237; Alberts 等人(1989)《细胞分子生物学》，第 2 版]。从病毒衍生获得的增强子元件可能是特别有用的，因为它们通常具有较宽的宿主
25 范围。例子包括 SV40 早期基因增强子[Dijkema 等人(1985) EMBO J. 4: 761]以及衍生自 Rous 肉瘤病毒的长末端重复序列(LTR)的增强子/启动子[Gorman 等人(1982b)Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777]以及来自人巨细胞病毒的增强子/启动子[Boshart 等人(1985) Cell 41:521]。另外，一些增强子仅仅在诱导物(例如激素或金属离子)的存在下是可调节的并具有活性[Sassone-Corsi 和 Borelli(1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis 等人
30 (1987)Science 236:1237]。

DNA 分子可在哺乳动物细胞中胞内表达。启动子序列可以和 DNA 分子直接相连，在这种情况下，重组蛋白的 N 端第一个氨基酸始终是甲硫氨酸，其由 ATG 起始密

码子编码。如果需要，可通过和溴化氰体外培育来从蛋白上切下此 N 端。

另外，外来蛋白也可从细胞中分泌到生长培养基中，方法是产生嵌合的 DNA 分子，该 DNA 分子编码的融合蛋白包括一前导序列片段，该片段在哺乳动物细胞中提供了外源蛋白的分泌。较佳的，在前导序列片段和外源基因之间可以有能在体内或体外断裂的加工位点。前导序列片段通常编码一种信号肽，该信号肽由引导蛋白分泌出细胞的疏水性氨基酸组成。腺病毒三联前导序列是哺乳动物细胞中分泌外来蛋白的一个前导序列的例子。

通常，哺乳动物细胞识别的转录终止和聚腺苷酸化序列是位于翻译终止密码子 3' 的调控区域，因此它和启动子元件一起连接在编码序列的侧面。成熟 mRNA 的 3' 端由定点的转录后断裂和聚腺苷酸化形成[Birnstiel 等人(1985) *Cell* 41:349; Proudfoot 和 Whitelaw(1988) "真核 RNA 的终端和 3' 端加工" 《转录和剪接》(B.D. Hames 和 D.M. Glover 编); Proudfoot(1989) *Trends Biochem. Sci.* 14:105]。这些序列指导 mRNA 的转录，mRNA 能被翻译成该 DNA 编码的多肽。转录终止子/聚腺苷酸化信号的例子包括从 SV40 衍生的那些[Sambrook 等人(1989) "克隆基因在培养的哺乳动物细胞中的表达" 《分子克隆实验指南》]。

通常，上述组件，包括启动子、聚腺苷酸化信号以及转录终止序列被一起放在表达构建物中。如果需要，表达构建物中还包括增强子、具有功能性剪接供体和受体位点的内含子以及前导序列。表达构建物通常以复制子形式维持，例如是能在宿主(如哺乳动物细胞或细菌)中稳定维持的染色体外元件(如质粒)。哺乳动物复制系统包括从动物病毒衍生的那些系统，其需要反式作用因子来进行复制。例如，含有乳多空病毒复制系统的质粒，如 SV40[Gluzman(1981) *Cell* 23:175]或多瘤病毒，在合适的病毒 T 抗原存在下复制出极高的拷贝数。哺乳动物复制子的其它例子包括衍生自牛乳头瘤病毒和 EB 病毒的复制子。另外，复制子可以有两个复制系统，从而使其能维持在例如哺乳动物细胞中进行表达并能在原核宿主中克隆和扩增。这些哺乳动物细菌穿梭载体的例子包括 pMT2[Kaufman 等人(1989) *Mol. Cell. Biol.* 9:946]和 pHEBO[Shimizu 等人(1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:1074]。

所用的转化程序取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞中的方法是本领域所知的，其包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、Polybrene(1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物)介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸包裹在脂质体中以及将 DNA 直接显微注射到胞核中。

可作为宿主进行表达的哺乳动物细胞系是本领域中已知的，其包括许多从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的无限增殖细胞系，包括但不限于，中国仓鼠卵巢

(CHO)细胞、海拉细胞、乳仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(如 Hep G2)和其它许多细胞系。

ii. 杆状病毒系统

5 也可将编码蛋白质的多核苷酸插入合适的昆虫表达载体中，并与该载体中的控制元件操作性相连。载体构建采用本领域已知的技术。总地来说，表达系统的组分包括一种转移载体，通常是细菌质粒，其含有杆状病毒基因组片段以及便于插入待表达异源基因的限制性位点；野生型杆状病毒，其序列与转移载体中的杆状病毒特异性片段同源(这使得异源基因能同源重组到杆状病毒基因组中)；以及合适的昆虫宿主细胞和生
10 长培养基。

将编码蛋白质的 DNA 序列插入转移载体中后，将载体和野生型病毒基因组转染到昆虫宿主细胞中，使载体和病毒基因组重组。表达包装的重组病毒，鉴定并纯化重组噬斑。杆状病毒/昆虫细胞表达系统材料及其方法，除别的以外，可以试剂盒形式购自 Invitrogen, San Diego CA("MaxBac"试剂盒)。这些技术通常是本领域技术人员所知的，在 Summers 和 Smith 的 Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)(后称“Summer 和 Smith 的文章”)中有充分描述。

在将编码蛋白质的 DNA 序列插入杆状病毒基因组之前，通常将上述组件，包括启动子、前导序列(如果需要)、感兴趣的编码序列以及转录终止序列装配在中间置换型构建物(转移载体)中。该构建物可含有单个基因以及操作性相连的调控元件；多个基因，每个基因有其自己的一套操作性相连调控元件；或是由同一组调控元件调控的多个基因。中间置换型构建物通常保持在一个复制子中，例如能在宿主(如细菌)内稳定保持的染色体外元件(如质粒)。复制子将具有一个复制系统，从而使其能保持在合适的宿主中进行克隆和扩增。

目前，用来将外源基因导入 AcNPV 的最常用的转移载体是 pAc373。还可设计本
25 领域技术人员已知的其它许多载体。这些载体例如包括，pVL985(其将多角体蛋白的起始密码子从 ATG 变为 ATT，在 ATT 下游 32 个碱基对处引入一个 *Bam*HI 克隆位点；见 Luckow 和 Summers, *Virology*(1989)17:31)。

质粒通常还含有多角体蛋白聚腺苷酸化信号(Miller 等人(1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177)以及用来在大肠杆菌中选择和繁殖的原核氨苄青霉素抗性(amp)基
30 因和复制起点。

杆状病毒转移载体通常含有杆状病毒启动子。杆状病毒启动子是能结合杆状病毒 RNA 聚合酶并启动下游(5'到 3')编码序列(如结构基因)转录成 mRNA 的 DNA 序列。启

Miller 等人(1989), *Bioessays* 4:91。当 DNA 序列被克隆在表达载体多角体蛋白基因位置中时, 其 5'和 3'均侧接了多角体蛋白特异性序列, 并位于多角体蛋白启动子的下游。

随后将新形成的杆状病毒表达载体包装到感染性重组杆状病毒中。发生同源重组的频率很低(在约 1%和 5%之间); 因此, 共转染后产生的大多数病毒仍是野生型病毒。

- 5 因此, 需要用一种方法来鉴别重组病毒。该表达系统的一个优点是肉眼筛选能区分重组病毒。在病毒感染后期, 天然病毒产生的多角体蛋白在受其感染细胞的胞核中产生的水平非常高。累积的多角体蛋白形成的包涵体还含有包埋颗粒。这些包涵体的大小为 15 微米, 它们具有高度的折光性, 从而使它们呈现明亮的发光外观, 在光学显微镜下很容易观察。感染了重组病毒的细胞缺少包涵体。为了区分重组病毒和野生型病毒,
- 10 用本领域已知的技术将转染上清接种到单层昆虫细胞上形成噬斑。即, 在光学显微镜下筛选存在(表明是野生型病毒)或不存在(表明是重组病毒)包涵体的噬斑。“当代微生物学方法”第 2 卷(Ausubel 等人编辑), 16.8(增补 10, 1990); Summers 和 Smith, 同上; Miller 等人(1989)。

- 已经开发出感染进入几种昆虫细胞的重组杆状病毒表达载体。例如, 已经开发出
- 15 用于感染以下昆虫细胞的重组杆状病毒: 埃及伊蚊、苜蓿丫纹夜蛾、家蚕、黑尾果蝇、草地夜蛾和粉纹夜蛾(WO 89/046699; Carbonell 等人(1985)*J. Virol.* 56:153; Wright(1986) *Nature* 321:718; Smith 等人(1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:2156; 综述见 Fraser 等人(1989) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:225)。

- 可以购得细胞和细胞培养基用于在杆状病毒/表达系统中直接表达和融合表达异
- 20 源多肽; 细胞培养技术是本领域技术人员通常所知的。例如见 Summers 和 Smith, 同上。

- 然后, 经修饰的昆虫细胞可以生长在合适的营养培养基中, 该培养基能稳定地保持该质粒于修饰的昆虫宿主中。当表达产物的基因处于可诱导的控制下时, 可以使宿主生长至高密度, 并诱导表达。另外, 当表达是组成型表达时, 产物将被连续表达到
- 25 培养基中, 营养性培养基必需不断循环, 取出感兴趣的产物同时补充消耗的营养物。产物可用以下这些技术来纯化: 例如层析, 如 HPLC、亲和层析、离子交换层析等; 电泳; 密度梯度离心; 溶剂抽提等。产物可按需作进一步纯化, 以基本上除去所有也分泌到培养基中或由昆虫细胞裂解而产生的昆虫蛋白, 以提供一种至少基本上不含宿主碎片如蛋白质、脂质和多糖的产物。

- 30 为了进行蛋白质表达, 将从转化子衍生获得的重组宿主细胞培育在允许重组蛋白的编码序列表达的条件下。这些条件将随所选定的宿主细胞而变。然而, 本领域技术人员容易根据本领域已知的知识来确定该条件。

iii. 植物系统

本领域已知有许多植物细胞培养系统和全植物遗传表达系统。典型的植物细胞基因表达系统包括在以下专利中描述的那些，例如：US 5,693,506；US 5,659,122；和 US 5,608,143。Zenk, *Phytochemistry* 30:3861-3863(1991)中描述了在植物细胞培养物中遗传表达的其它例子。除上述参考文献外，关于植物蛋白信号肽的描述还可在下列文献中找到：Vaulcombe 等人, *Mol. Gen. Genet.* 209:33-40(1987)；Chandler 等人, *Plant Molecular Biology* 3:407-418(1984)；Rogers, *J. Biol. Chem.* 260:3731-3738(1985)；Rothstein 等人, *Gene* 55:353-356(1987)；Whittier 等人, *Nucleic Acids Research* 15:2515-2535(1987)；Wirsal 等人, *Molecular Microbiology* 3:3-14(1989)；Yu 等人, *Gene* 122:247-253(1992)。关于用植物激素、赤霉素酸和赤霉素酸诱导分泌的酶调节植物基因表达的描述可在 R.L. Jones 和 J. MacMillin, *Gibberellins*, 《植物生理学进展》, Malcolm B. Wilkins 编辑, 1984 Pitman Publishing Limited, London, 21-52 页中找到。描述其它调节代谢的基因的参考文献参见：Sheen, *Plant Cell*, 2:1027-1038(1990)；Maas 等人, *欧洲分子生物学协会杂志(EMBO J.)* 9:3447-3452(1990)；Benkel 和 Hickey, *美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci.)*, 84:1337-1339(1987)。

通常，利用本领域已知的技术，将所需的多核苷酸序列插入一表达盒中，该表达盒含有为在植物中操作而设计的基因调控元件。将该表达盒插入所需的表达载体中，表达盒的上游和下游有适合在植物宿主中表达的伴随序列。这些伴随序列可来自质粒或病毒，并为载体提供所需的性能，以允许载体将 DNA 从起初的克隆宿主(如细菌)中移动到所需植物宿主中。基础的细菌/植物载体构建物最好能提供宽的宿主范围原核复制起点；原核可选择标记；以及，对于农杆菌转化而言，宜提供 T DNA 序列用于农杆菌介导的转移至植物染色体。当异源基因不易检测时，该构建物最好还具有一个适用于确定植物细胞是否已经转化的可选择标记基因。关于合适标记(例如对于禾草类家族成员)的综述可在 Wilmonk 和 Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Reprtr*, 11(2):165-185 中找到。

还建议采用适合将异源序列整合到植物基因组中的序列。这些序列可能包括用于同源重组的转座子序列以及允许将异源表达盒随机插入植物基因组中的 Ti 序列。合适的原核可选择标记包括抗生素(如氨苄青霉素或四环素)抗性标记。编码其它功能的其它 DNA 序列也可存在于载体中，这是本领域所知的。

本发明的核酸分子可包括在一个表达盒中来表达感兴趣的蛋白质。通常只要一个表达盒，但是两个或多个表达盒也是可行的。除了编码异源蛋白的序列外，重组表达

盒还含有下列元件：启动子区域、植物 5'非翻译序列、起始密码子(根据结构基因原来是否具有而定)、以及转录和翻译终止序列。表达盒 5'和 3'端的独特限制性酶位点能使表达盒方便地插入预先存在的载体中。

5 异源编码序列可以用于任何与本发明有关的蛋白。编码感兴趣的蛋白的序列将编码出一个信号肽，该信号肽能适当地加工和转运蛋白质，并且通常缺少可能会导致本发明的所需蛋白与膜结合的序列。由于对于大部分来说，转录起始区将针对发芽期间表达和转运的基因，采用提供转运的信号肽，也可提供转运感兴趣的蛋白质。通过这种方式，感兴趣的蛋白将从表达该蛋白的细胞中转运出来，并能被有效地收获。通常，种子中的分泌是通过糊粉或小盾体上皮层进入种子的胚乳。尽管不需要使蛋白从产生
10 该蛋白的细胞中分泌出来，但是这种分泌有利于重组蛋白的分离和纯化。

由于所需基因产物的最终表达将在真核细胞中进行，因此需要确定克隆的基因部分是否含有作为内含子被宿主剪接体机制加工的序列。如果是这样，需要对“内含子”区进行定点诱变，以防止一部分遗传信息作为错误的内含子密码而丧失，Reed 和 Maniatis, Cell 41:95-105, 1985。

15 可用微量移液管以机械方式转移重组 DNA，将载体直接显微注射到植物细胞中。Crossway, Mol. Gen. Genet, 202:179-185。还可用于聚乙二醇将遗传物质转移到植物细胞中，Krens 等人, Nature, 296, 72-74, 1982。导入核酸片段的另一种方法是用小颗粒进行高速弹道贯穿，在这些小珠或颗粒的基质中或表面上带有核酸，Klein 等人, Nature, 327, 70-73, 1987, Knudsen 和 Muller, 1991, Planta, 185:330-336 提出用颗粒轰击大麦胚乳以产生转基因大麦。还有一种导入方法是使原生质体和其它实体(微细胞(minicell)、细胞、溶酶体或其它可融合的脂质表面体)融合，Fraley 等人, 美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 79, 1859-1863, 1982。
20

载体也可通过电穿孔导入植物细胞中。(Fromm 等人, PNAS USA 82: 5824, 1985)。在该技术中，在含有基因构建物的质粒存在下电穿孔植物原生质体。高电场强度的电脉冲使生物膜可逆地被通透，从而允许导入质粒。电穿孔的植物原生质体重新形成细胞壁，分裂并形成植物愈伤组织。
25

能分离出原生质体并能培育成全再生植物的所有植物，都能用本发明进行转化，从而回收得到含有转基因的全植物。已经知道实际上可以从培育的细胞或组织再生所有的植物，其包括但不限于，甘蔗、甜菜、棉花、果实和其它树、豆科植物和蔬菜的所有主要种类。一些合适的植物包括，例如，草莓属、莲花属、苜蓿属、驴食豆属、三叶草属、胡卢巴属、豇豆属、柑橘属、亚麻属、老鹳草属、木薯属(*Manihot*)、胡萝卜属(*Daucus*)、鼠耳芥属、芸苔属、萝卜属、白芥属、颠茄属、辣椒属、曼陀罗属、
30

天仙子属、番茄属、烟草属、茄属、碧冬茄属、毛地黄属、*Majorana*、菊苣属、向日葵属、莴苣属、雀麦属、天门冬属、金鱼草属、龙骨角属、龙面花属(*Nemesia*)、天竺葵属、稷属、狼尾草属、毛茛属、千里光属、蛾蝶花属(*Salpiglossis*)、香瓜属、*Browaalia*、大豆属、黑麦草属、玉蜀黍属、小麦属、蜀黍属和曼陀罗属各种类。

- 5 再生方式随各种植物而有所不同，但是通常是首先提供含有异源基因拷贝的转化的原生质体悬液。形成愈伤组织，从愈伤组织中诱生出枝条，随后是根。另外，从原生质体悬液可以诱生形成胚胎。这些胚胎象天然的胚胎那样发芽形成植物。培养基通常含有各种氨基酸和激素，如植物生长素和细胞分裂素。尤其是对于玉米和苜蓿属来说，在培养基中加入谷氨酸和脯氨酸也是很有利的。枝条和根通常同时发育。有效的再生取决于培养基、基因型以及培养史。如果控制了这三个变量，那么再生能完全再现和重复。

- 10 在一些植物细胞培养系统中，本发明所需的蛋白可能被排泄出来，或者蛋白可从全植物中提取出来。当本发明所需的蛋白被分泌到培养基中后，就可进行收集。或者，可以用机械方式破碎胚以及无胚-半种子或其它植物组织，以释放出分泌到细胞和组织之间的蛋白。将该混合物悬于缓冲液中，以回收可溶性蛋白。然后用常规的蛋白分离和纯化方法纯化重组蛋白。用常规方法调节时间、温度、pH、氧和体积等参数，以优化异源蛋白的表达和回收。

iv. 细菌系统

- 20 细菌表达技术是本领域已知的。细菌启动子是能结合细菌 RNA 聚合酶并启动下游(3')编码序列(如结构基因)转录成 mRNA 的 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区，其通常位于编码序列的 5'端附近。该转录起始区通常包括 RNA 聚合酶结合位点以及一个转录起始位点。细菌启动子可能还有第二个功能区域称为操纵子，它可能与毗邻的 RNA 合成开始的 RNA 聚合酶结合位点重叠。该操纵子允许(可诱导)对转录的负调节，因为基因阻遏蛋白可能结合操纵子并因而抑制特定基因的转录。在负调节元件(如操纵子)不存在时，可能发生组成型表达。另外，正调节可通过基因激活蛋白结合序列来实现，如果有的话，该结合序列通常邻近 RNA 聚合酶结合序列的(5')。基因激活蛋白的例子是分解代谢物激活剂蛋白(CAP)，它帮助启动大肠杆菌(*E. coli*)中的 lac 操纵子的转录[Raibaud 等人(1984) *Annu. Rev. Genet.* 18:173]。因此，表达的调控可能是正作用或负作用，从而增强或减弱转录。

编码代谢途径中的酶的序列提供了特别有用的启动子序列。例子包括衍生自糖(如半乳糖、乳糖(lac)[Chang 等人(1977) *Nature* 198:1056]和麦芽糖)代谢酶的启动子序列。

其它例子包括衍生自生物合成酶(如色氨酸(trp))[Goeddel 等人(1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton 等人(1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; 美国专利 4,738,921; EP-A-0036776 和 EP-A-0121775]的启动子序列。 β -内酰胺酶(bla)启动子系统[Weissmann(1981) "干扰素的克隆和其它错误" 《干扰素 3》(I. Gresser 编辑)], λ 嗜菌体 PL[Shimatake 等人(1981)

5 Nature 292:128]和 T5[美国专利 4,689,406]启动子系统也提供了有用的启动子序列。

另外, 非天然存在的合成的启动子也可象细菌启动子一样起作用。例如, 一种细菌或嗜菌体启动子的转录激活序列可以和另一种细菌或嗜菌体启动子的操纵子序列连接在一起, 形成合成的杂交启动子[美国专利 4,551,433]。例如, tac 启动子是杂合的 trp-lac 启动子, 它由 trp 启动子以及受 lac 阻遏蛋白调节的 lac 操纵子序列组成[Amann
10 等人(1983) *Gene* 25:167; de Boer 等人, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21]。另外, 细菌启动子可包括非细菌来源但能结合细菌 RNA 聚合酶并启动转录的天然存在的启动子。天然存在的非细菌来源的启动子还能和相容的 RNA 聚合酶偶联在一起, 从而在原核细胞中高水平地表达某些基因。噬菌体 T7 RNA 聚合酶/启动子系统就是一种偶联的启动子系统[Studier 等人(1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; Tabor 等人(1985) *Proc. Natl. Acad.*
15 *Sci.* 82:1074]。另外, 杂合的启动子还可由嗜菌体启动子以及大肠杆菌操纵子区域组成 (EP-A-0267 851)。

除了有功能的启动子序列外, 有效的核糖体结合位点对于外来基因在原核细胞中的表达也是有用的。在大肠杆菌中, 核糖体结合位点称为 Shine-Dalgarno(SD)序列, 其包括起始密码子(ATG)以及在起始密码子上游 3-11 个核苷酸处的长度为 3-9 个核苷酸的序列[Shine 等人(1975) *Nature* 254:34]。认为 SD 序列是通过 SD 序列和大肠杆菌 16S
20 rRNA 的 3'端之间碱基配对来促进 mRNA 与核糖体结合的[Steitz 等人(1979) "信使 RNA 中的遗传信号和核苷酸序列" 《生物学调节和发育: 基因表达》(编者 R.F. Goldberger)]。为了表达具有弱的核糖体结合位点的原核基因和真核基因[Sambrook 等人(1989) "克隆基因在大肠杆菌中的表达" 《分子克隆实验手册》]。

25 DNA 分子可以在胞内表达。启动子序列可以直接与 DNA 分子相连, 在这种情况下, N 端的第一个氨基酸始终是甲硫氨酸, 其由 ATG 起始密码子编码。如果需要, 可通过和溴化氰体外培育或通过和细菌甲硫氨酸 N-端肽酶体内或体外培育, 将 N 端的甲硫氨酸从蛋白质上切下(EPO-A-0219 237)。

融合蛋白为直接表达提供了另一种方法。通常, 将编码内源细菌蛋白或其它稳定的蛋白之 N 端部分的 DNA 序列与异源编码序列的 5'端融合。在表达时, 该构建物将
30 提供这两个氨基酸序列的融合物。例如, λ 噬菌体细胞基因可以和外源基因的 5'端相连并在细菌中表达。所得融合蛋白宜保留一个酶(因子 Xa)加工位点, 以便将噬菌体蛋白

与外源基因切开[Nagai 等人(1984) *Nature* 309:810]。融合蛋白也可用 lacZ[Jia 等人(1987) *Gene* 60:197], trpE[Allen 等人(1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff 等人(1989), *J. Gen. Microbiol.* 135:11]以及 Chey[EP-A-0324 647]基因的序列组成。两个氨基酸序列连接处的 DNA 序列可以编码或不编码一可切割的位点。另一个例子是遍在蛋白融合蛋白。这种融合蛋白由遍在蛋白区域组成, 该区域宜保留一个酶(例如遍在蛋白特异性加工蛋白酶)加工位点, 以便将外源蛋白和遍在蛋白切开。通过这种方法, 可以分离获得天然的外源蛋白[Miller 等人(1989) *Bio/Technology* 7:698]。

另外, 还可通过产生嵌合的 DNA 分子来将外源蛋白分泌出细胞, 该嵌合的 DNA 分子编码的融合蛋白含有一个信号肽序列片段, 该序列片段能使细菌中的外源蛋白分泌出来[美国专利 4,336,336]。信号序列片段通常编码一个信号肽, 该信号肽含有疏水性氨基酸, 能指引蛋白分泌出细胞。蛋白质被分泌到生长培养基(革兰阳性菌)中或细胞内膜和外膜之间的周质间隙内(革兰阴性菌)。在编码的信号肽片段和外源基因之间宜具有能在体内或体外切割的加工位点。

编码合适信号序列的 DNA 可以从分泌性细菌蛋白的基因衍生获得, 这些基因例如是大肠杆菌外膜蛋白基因(ompA)[Masui 等人(1983), 《基因表达的实验操作》; Ghayeb 等人(1984) *EMBO J.* 3:2437]以及大肠杆菌碱性磷酸酶信号序列(phoA)[Oka 等人(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7212]。另一个例子是, 可采用各种芽孢杆菌菌株的 α 淀粉酶基因的信号序列将异源蛋白分泌出枯草芽孢杆菌[Palva 等人(1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582; EP-A-0244 042]。

通常, 细菌所识别的转录终止序列是位于翻译终止密码子 3'的调控区, 它和启动子一起侧接在编码序列的两侧。这些序列指导 mRNA 的转录, 而 mRNA 能被翻译成该 DNA 所编码的多肽。转录终止序列通常包括约 50 个核苷酸的 DNA 序列, 该序列能形成帮助终止转录的茎环结构。例子包括衍生自具有强启动子的基因(如大肠杆菌中的 trp 基因以及其它生物合成的基因)的转录终止序列。

上述组件, 包括启动子、信号序列(如果需要)、感兴趣的编码序列以及转录终止序列通常一起被放在表达构建物中。表达构建物通常以复制子的形式维持, 例如能在宿主(如细菌)中稳定维持的染色体外元件(如质粒)。复制子具有一个复制系统, 从而允许其维持在原核宿主中或进行表达或进行克隆和扩增。另外, 复制子可以是高拷贝数或低拷贝数的质粒。高拷贝数质粒的拷贝数大致在约 5 至 200 之间, 通常在约 10 至 150 之间。含有高拷贝数质粒的宿主宜含有至少约 10 个质粒, 更佳的含有至少约 20 个质粒。根据载体以及外源蛋白对宿主的影响, 可以选择高拷贝数或低拷贝数的载体。

另外, 表达构建物可以和一个整合载体一起整合入细菌基因组中。整合载体通常

含有至少一个序列与细菌染色体同源,从而允许该载体整合。整合看来是载体和细菌染色体中的同源 DNA 之间重组的结果。例如,用不同芽孢杆菌菌株的 DNA 构建的整合载体整合到芽孢杆菌染色体中(EP-A-0127 328)。整合载体还可包含噬菌体或转座子序列。

5 通常,染色体外构建物以及整合的表达构建物可含有可选择的标记,以便选择已经转化的菌株。可选择标记可在细菌宿主中表达,其包括赋予细菌对药物(如氨苄青霉素、氯霉素、红霉素、卡那霉素(新霉素)和四环素)抗性的基因[Davies 等人(1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32:469]。可选择标记还可包括生物合成性基因,如在组氨酸、色氨酸以及亮氨酸生物合成途径中的那些基因。

10 另外,上述某些组件可以一起放在转化载体中。转化载体通常包含一个可选择标记,如上所述,该载体以复制子形式维持或发展成一个整合载体。

已经开发出了用于转化到许多细菌中的表达和转化载体(无论是染色体外复制子还是整合载体)。例如,已经开发出了用于下列细菌的表达载体:枯草芽孢杆菌[Palva 等人, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0036 259 和 063 953; WO 84/04541],大肠杆菌[Shimatake 等人, (1981) *Nature* 292:128; Amann 等人, (1985) *Gene* 40:183; Studier 等人, (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; EP-A-0036 776、136 829 和 136 907],酪链球菌[Powell 等人, (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655];浅青紫链球菌[Powell 等人, (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655],浅青紫链霉菌[美国专利 4,745,056]。

20 将外源 DNA 导入细菌宿主的方法是本领域熟知的,通常包括用氯化钙或其它试剂(如二价阳离子和二甲亚砷)处理对细菌进行转化。DNA 还可通过电穿孔方法导入细菌细胞。转化程序通常因待转化的细菌种类而不同。[参见,例如使用杆菌:Masson 等人, (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60:273; Palva 等人, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0036 259 和 063 953; WO 84/04541; 使用弯曲杆菌:Miller 等人, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:856; 和 Wang 等人, (1990) *J. Bacteriol.* 172:949; 使用埃希氏大肠杆菌:Cohen 等人, (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110; Dower 等人, (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6127; Kushner (1978) "用 ColE1-衍生质粒转化大肠杆菌的改进方法" *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (H.W. Boyer 和 S. Nicosia 编辑); Mandel 等人, (1970) *J. Mol. Biol.* 53:159; Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949:318; 使用乳酸杆菌:Chassy 等人, (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44:173; 使用假单胞菌:Fiedler 等人, (1988) *Anal. Biochem* 170:38; 使用葡萄球菌:Augustin 等人, (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66:203; 使用链球菌:Barany 等人, (1980) *J. Bacteriol.* 144:698; Harlander (1987) "用电穿孔转化链球菌产乳酸微生物"

Streptococcal Genetics (J. Ferretti 和 R. Curtiss III 编辑); Perry 等人, (1981) *Infect. Immun.* 32:1295; Powell 等人, (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655; Somkuti 等人, (1987) *Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology* 1:412].

5 v. 酵母表达

酵母表达系统也是本领域技术人员所知的。酵母启动子是能结合酵母 RNA 聚合酶并启动下游(3')编码序列(如结构基因)转录成 mRNA 的 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区, 它通常位于编码序列的 5'端附近。该转录起始区通常包括 RNA 聚合酶结合位点("TATA"盒)以及一个转录起始位点。酵母启动子可能还有第二个功能区域称为上游激活序列(UAS), 如果存在的话, 它通常远离结构基因。UAS 能调节表达(可诱导)。在 UAS 不存在时, 发生组成型表达。表达的调控可能是正作用或负作用的, 从而增强或减弱转录。

酵母是一种发酵生物体, 具有活泼的代谢途径, 因此编码代谢途径中的酶的序列提供了特别有用的启动子序列。例子包括醇脱氢酶(ADH)(EP-A-0284 044)、烯醇酶、葡萄糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAP 或 GAPDH)、己糖激酶、磷酸果糖激酶、3-磷酸甘油酸变位酶、以及丙酮酸激酶(PyK)(EP-A-0329 203)。编码酸性磷酸酶的酵母 PHO5 基因也提供了有用的启动子序列[Myanohara 等人(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1]。

另外, 非天然存在的合成的启动子也可象酵母启动子一样起作用。例如, 一种酵母启动子的 UAS 序列可以和另一种酵母启动子的转录激活区连接在一起, 形成合成的杂合启动子。这种杂合启动子的例子包括与 GAP 转录激活区相连的 ADH 调控序列(美国专利 No. 4,876,197 和 4,880,734)。杂合启动子的其它例子包括由 ADH2、GAL4、GAL10 或 PHO5 基因的调控序列组成的启动子与糖酵解酶基因如 GAP 或 PyK 的转录激活区的组合(EP-A-0164 556)。另外, 酵母启动子可包括非酵母来源但能结合酵母 RNA 聚合酶并启动转录的天然存在的启动子。这些启动子的例子包括, 尤其是, [Cohen 等人, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1078; Henikoff 等人, (1981) *Nature* 283:835; Hollenberg 等人, (1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96:119; Hollenberg 等人, (1979) "细菌抗生素抗性基因在酿酒酵母中的表达" *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (K.N. Timmis 和 A. Puhler 编辑); Mercerau-Puigalon 等人, (1980) *Gene* 11:163; Panthier 等人, (1980) *Curr. Genet.* 2:109]。

DNA 分子可以在酵母菌胞内表达。启动子序列可以直接与 DNA 分子相连, 在这种情况下, 重组蛋白 N 端的第一个氨基酸始终是甲硫氨酸, 其由 ATG 起始密码子编码。

如果需要, 可通过和溴化氰体外培育将 N 端的甲硫氨酸从蛋白质上切下。

象在哺乳动物、杆状病毒以及细菌表达系统中一样, 融合蛋白为酵母表达系统提供了另一种方法。通常, 将编码内源酵母蛋白或其它稳定的蛋白之 N 端部分的 DNA 序列与异源编码序列的 5'端融合。在表达时, 该构建物将提供这两个氨基酸序列的融合物。例如, 酵母或人超氧化物歧化酶(SOD)基因可以和外源基因 5'端相连并在酵母中表达。两个氨基酸序列连接处的 DNA 序列可以编码或不编码可切割的位点。例如参见 EP-A-0196 056。另一个例子是遍在蛋白融合蛋白。这种融合蛋白由遍在蛋白区域组成, 该区域宜保留一个酶(例如遍在蛋白特异性加工蛋白酶)加工位点, 以便将外源蛋白和遍在蛋白切开。因此, 通过这种方法, 可以分离获得天然的外源蛋白(例如 WO88/024066)。

另外, 还可通过产生嵌合的 DNA 分子来将外源蛋白从细胞分泌到生长培养基中, 该嵌合的 DNA 分子编码的融合蛋白含有一个前导序列片段, 该前导序列片段能使酵母中的外源蛋白分泌出来。较佳的, 在编码的前导片段和外来基因之间宜具有能在体内或体外切割的加工位点。该前导序列片段通常编码了含有疏水性氨基酸的信号肽, 其引导蛋白从细胞分泌出来。

编码合适信号序列的 DNA 可以从分泌性酵母蛋白的基因衍生获得, 这些基因例如有酵母转化酶基因(EP-A-0012 873; JPO 62:096,086)以及 A-因子基因(美国专利 4,588,684)。另外, 非酵母来源的前导序列(如干扰素前导序列)的存在也能提供分泌出酵母的作用(EP-A-0060 057)。

较佳的一类分泌前导序列采用了酵母 α -因子基因的片段, 其含有"pre"信号序列和"pro"区。可采用的 α 因子片段的类型包括全长 pre-pro α 因子前导序列(约 83 个氨基酸残基)以及截短的 α -因子前导序列(通常约 25 至 50 个氨基酸残基)(美国专利 4,546,083 和 4,870,008; EP-A-0324 274)。采用 α -因子前导片段提供分泌作用的其它前导序列包括杂合的 α -因子前导序列, 其由第一个酵母的 pre 序列以及第二个酵母 α 因子的 pro 区域组成(例如见 WO 89/02463)。

通常, 酵母识别的转录终止序列是位于翻译终止密码子 3'的调控区, 其和启动子一起侧接在编码序列的两侧。这些序列指导 mRNA 的转录, 而 mRNA 能被翻译成该 DNA 所编码的多肽。转录终止序列和其它酵母识别的终止序列的例子是编码糖酵解酶的那些转录终止序列。

上述组件, 包括启动子、前导序列(如果需要时)、感兴趣的编码序列以及转录终止序列, 通常被一起放在表达构建物中。表达构建物通常以复制子的形式保持, 例如能在宿主(如酵母或细菌)中稳定保持的染色体外元件(如质粒)。复制子可能具有两个复

制系统, 从而允许其能维持在例如酵母中进行表达, 并能维持在原核宿主进行克隆和扩增。这些酵母-细菌穿梭载体的例子包括 YEp24[Botstein 等人(1979) *Gene* 8:17-24], pCL/1[Brake 等人,(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4642-4646]和 YRp17[Stinchcomb 等人(1982) *J. Mol. Biol.* 158:157]。另外, 复制子可以是高拷贝数或低拷贝数的质粒。

- 5 高拷贝数质粒的拷贝数大致在约 5 至 200 之间, 通常在约 10 至 150 之间。含有高拷贝数质粒的宿主宜含有至少约 10 个质粒, 更佳的含有至少约 20 个质粒。根据载体以及外源蛋白对宿主的影响, 可以选择高拷贝数或低拷贝数的载体。例如参见 Brake 等人, 同上。

- 10 另外, 表达构建物可以和一个整合载体一起整合入酵母基因组中。整合载体通常含有至少一个序列与酵母染色体同源, 从而允许该载体整合, 最好含有两个同源序列侧接该表达构建物。整合看来是载体和酵母染色体中同源 DNA 之间重组的结果[Orr-Weaver 等人(1983)*Methods in Enzymol.* 101:228-245]。通过选择合适的同源序列插入载体中, 可将整合载体导入酵母中某一特定的基因座。见 Orr-Weaver 等人, 同上。可以整合入一个或多个表达构建物, 这可能会影响重组蛋白产生的水平[Rine 等人(1983)
- 15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6750]。载体中的染色体序列可以载体中的单个片段形式存在(从而导致整个载体的整合), 或是与染色体中的相邻片段同源的两个片段, 这两个片段在载体中侧接在表达构建物两侧, 从而可导致仅表达构建物的稳定性整合。

- 通常, 染色体外构建物以及整合的表达可建物均含有可选择标记, 以便选择已经转化的酵母菌株。可选择标记可包括能在酵母宿主中表达的生物合成基因(如
- 20 ADE2、HIS4、LEU2、TRP1 和 ALG7 以及 G418 抗性基因), 这些基因分别赋予酵母细胞对衣霉素以及 G418 的抗性。另外, 合适的可选择标记还可能为酵母在毒性化合物(如金属)存在下提供生长能力。例如, CUP1 的存在使酵母能在铜离子存在下生长[Butt 等人, (1987) *Microbiol. Rev.* 51:351]。

- 另外, 上述某些组件可以一起放在转化载体中。转化载体通常包含一个可选择标
- 25 记, 如上所述, 该载体以复制子形式维持或发展成一个整合载体。

- 已经开发出了用于转化入许多酵母中的表达和转化载体(无论是染色体外复制子还是整合载体)。例如, 已经开发出用于下列酵母菌的表达载体和将外源 DNA 导入酵母宿主的方法: 白色念珠菌[Kurtz, 等人, (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142], 麦芽糖念珠菌[Kunze, 等人, (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], 多形汉逊酵母[Gleeson, 等人,
- 30 (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp 等人, (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302], 脆壁克鲁维酵母[Das, 等人, (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165], 乳酸克鲁维酵母[De Louvencourt 等人, (1983) *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Berg 等人, (1990)

- Bio/Technology* 8:135], 季也蒙毕赤酵母[Kunze 等人, (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], 巴斯德毕赤酵母[Cregg, 等人, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; 美国专利 No.4,837,148 和 4,929,555], 酿酒酵母[Hinnen 等人, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito 等人, (1983) *J. Bacteriol.* 153:163], 栗酒裂植酵母[Beach 和 Nurse (1981) *Nature* 300:706], 以及 解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*) [Davidow, 等人, (1985) *Curr. Genet.* 10:380471 Gaillardin, 等人, (1985) *Curr. Genet.* 10:49]。

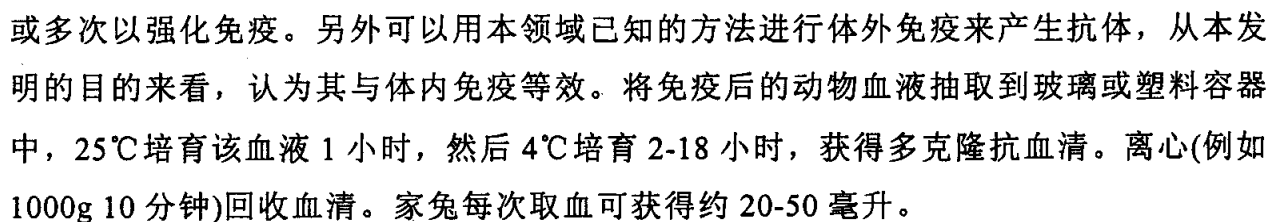
将外源 DNA 导入酵母宿主的方法是本领域熟知的, 通常包括用碱阳离子处理转化原生质球或完整酵母细胞。转化程序通常因待转化的酵母种类而不同。例如参见, [Kurtz 等人, (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142; Kunze 等人, (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; 念珠菌]; [Gleeson 等人, (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp 等人, (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302; 汉逊酵母]; [Das 等人, (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165; De Louvencourt 等人, (1983) *J. Bacteriol.* 154:1165; Van den Berg 等人, (1990) *Bio/Technology* 8:135; 克鲁维酵母]; [Cregg 等人, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; Kunze 等人, (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; 美国专利 No.4,837,148 和 4,929,555; 毕赤酵母]; [Hinnen 等人, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito 等人, (1983) *J. Bacteriol.* 153:163 酿酒酵母]; [Beach 和 Nurse (1981) *Nature* 300:706; 裂殖酵母]; [Davidow 等人, (1985) *Curr. Genet.* 10:39; Gaillardin 等人, (1985) *Curr. Genet.* 10:49; *Yarrowia*]。

20 抗体

本文所用的术语“抗体”指由至少一个抗体结合位点组成的一个或一组多肽。“抗体结合位点”是一个三维结合空间, 其内表面形状和电荷分布与抗原表位的特征互补, 从而使抗体与抗原结合。“抗体”例如包括, 脊椎动物抗体、杂合抗体、嵌合抗体、人源化抗体、经修饰的抗体、单价抗体、Fab 蛋白以及单结构域抗体。

- 25 针对本发明蛋白的抗体可用于亲和层析、免疫试验以及区别/鉴定脑膜炎球菌蛋白。

针对本发明蛋白的多克隆和单克隆抗体可用常规方法制得。通常, 首先用蛋白来免疫合适的动物, 较佳的是小鼠、大鼠、家兔或山羊。由于可获得的血清体积多, 能获得标记的抗家兔和抗山羊抗体, 因此对于制备多克隆抗血清来说, 家兔和山羊是较佳的。免疫通常这样进行: 将蛋白以盐水(较佳的以佐剂如 Freund 氏完全佐剂) 混合或乳化, 然后肠胃外(通常是皮下或肌内)注射该混合物或乳剂。每次注射 50-200 微克的剂量就足够了。2-6 周后用盐水(较佳的是用 Freund 氏不完全佐剂)配的蛋白质注射一次



用 Kohler 和 Milstein 的标准方法[Nature(1975) 256:495-96]或其改进方法制得单克隆抗体。通常，如上所述对小鼠或大鼠免疫。然而，并非是对动物取血然后抽提血清，而是取出脾脏(以及任选地取出几个大的淋巴结)，将其分离成单细胞。如果需要，可将细胞悬液(在除去非特异性粘附的细胞后)加入包被了蛋白质抗原的板或孔中，对脾细胞进行筛选。表达抗原特异性的膜结合免疫球蛋白的 B 细胞结合到板上，不象悬液其它物质那样被洗去。然后对所得 B 细胞或所有解离的脾细胞进行诱导，使其与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤，培养在选择性培养基(如次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基，“HAT”)中。通过有限稀释接种所得杂交瘤，并测定特异性结合免疫抗原(且不结合无关抗原)的抗体的产生。然后，体外(例如在组织培养瓶或中空纤维反应器中)或体内(如小鼠腹水中)培养所选的分泌单克隆抗体的杂交瘤。

如果需要，抗体(无论是多克隆还是单克隆抗体)可用常规技术来标记。合适的标记包括荧光团、发色团、放射活性原子(尤其是 ^{32}P 和 ^{125}I)、密电子试剂、酶、以及具有特异性结合配偶的配体。酶通常靠其活性来检测。例如，辣根过氧化物酶通常是检测其将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)转变成蓝色的能力，可用分光光度计定量测定。“特异性结合配偶”指能以高特异性结合配体分子的蛋白质，例如抗原以及对其有特异性的单克隆抗体。其它特异性结合配偶包括生物素和亲和素或链亲和素，IgG 和蛋白 A，以及本领域已知的许多受体-配体对。应理解，上述内容并非要将各种标记分成不同的类，因为同一标记可在几种不同的模型中起作用。例如， ^{125}I 可作为放射活性标记，或作为密电子试剂。HRP 可作为酶或单抗的抗原。另外，一种物质可以和各种标记组合以获得所需的效果。例如，在实施本发明中，单抗和亲和素也需要标记，因此，可以用生物素标记单抗，并用标记了 ^{125}I 的亲和素检测其存在，或用标记 HRP 的抗生物素单抗检测其存在。其它替换和可能性对于本领域普通技术人员来说是显而易见的，所以应认作等价物属于本发明的范围。

药物组合物

药物组合物可包含本发明的多肽、抗体或核酸。该药物组合物将包含治疗有效量的本发明的多肽、抗体或多核苷酸。

本文所用的术语“治疗有效量”指治疗剂治疗、缓解或预防目标疾病或状况的量,

或是表现出可检测的治疗或预防效果的量。该效果例如可通过化学标记或抗原水平来检测。治疗效果也包括生理性症状的减少，例如导致体温降低。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。因此，预先指定准确的有效量是没用的。然而，对于某给定的状况而言，可以用常规实验来确定该有效量，临床医师是能够判断出来的。

为了本发明的目的，有效的剂量为给予个体约 0.01 毫克/千克至 50 毫克/千克或 0.05 毫克/千克至 10 毫克/千克的 DNA 构建物。

药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂(例如抗体、多肽、基因或其它治疗剂)给药的载体。该术语指这样一些药剂载体：它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体，且给药后没有过分的毒性。合适的载体可能是大的、代谢缓慢的大分子，如蛋白质、多糖、聚乳酸(polylactic acid)、聚乙醇酸、氨基酸聚合物、氨基酸共聚物以及无活性的病毒颗粒。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。

本文可用的药学上可接受的盐例如有：无机酸盐，如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等；以及有机酸盐，如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。在 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N.J. 1991)中可找到关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。

治疗性组合物中药学上可接受的载体可含有液体，如水、盐水、甘油和乙醇。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。通常，可将治疗性组合物制成可注射剂，例如液体溶液或悬液；还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。脂质体也包括在药学上可接受的载体的定义中。

输药方法

一旦配成本发明的组合物，可将其直接给予对象。待治疗的对象可以是动物；尤其可以治疗人对象。

直接输送该组合物通常可通过皮下、腹膜内、静脉内或肌内注射或输送至组织间隙来实现。组合物也可输送至病灶区。其它给药方式包括口服和肺给药、栓剂和透皮或经皮肤施用(参见例如 WO98/20734)、用针、基因枪或手持喷雾器(hypospray)。治疗剂量方案可以是单剂方案或多剂方案。

疫苗

本发明的疫苗可以是预防性的(即预防感染)或治疗性的(即在感染后治疗疾病)。

这些疫苗包含免疫性抗原或免疫原、免疫原性多肽、蛋白或蛋白片段、或核酸，通常与“药学上可接受的载体”组合，这些载体包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体通常是大的、代谢缓慢的大分子，如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、氨基酸聚合物、氨基酸共聚物、脂质凝集物(如油滴或脂质体)以及无活性的病毒颗粒。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。另外，这些载体可起免疫刺激剂(“佐剂”)作用。另外，抗原或免疫原可以和细菌类毒素(如白喉、破伤风、霍乱、幽门螺杆菌等病原体的类毒素)偶联。

增强组合物效果的较佳的佐剂包括但不限于：(1)铝盐(alum)，如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等；(2)水包油型乳剂配方(有或没有其它特异性的免疫刺激剂，如胞壁肽(见下文)或细菌细胞壁成分)，例如，(a)MF59™(WO 90/14837；第10章疫苗设计：亚基和佐剂方法，Powell和Newman编，Plenum Press, 1995)，其含有5%鲨烯、0.5%吐温80和0.5%Span 85(任选地含有不同量的MTP-PE(见下文)，虽然并不需要)，用微量流化器(如110Y型微量流化器(Microfluidics, Newton, MA))制成亚微米级颗粒；(b)SAF，其含有10%鲨烯、0.4%吐温80、5%普卢兰尼克(pluronic)嵌段聚合物L121以及thr-MDP(见下文)，微量流化成亚微米级乳剂或涡流振荡产生粒径较大的乳剂，和(c)Ribi™佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem, Hamilton, MT)，其含有2%鲨烯、0.2%吐温80以及取自单磷酸脂A(MPL)、二霉菌酸海藻糖酯(TDM)、和细胞壁骨架(CWS)的一种或多种细菌细胞壁组分，较佳的是MPL+CWS(Detox™)；(3)皂素佐剂，例如可采用Stimulon™(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)或从其产生的颗粒，如ISCOM(免疫刺激性复合物)；(4)Freund完全佐剂(CFA)和Freund不完全佐剂(IFA)；(5)细胞因子，如白介素(如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、干扰素(如γ干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等；以及(6)作为免疫刺激剂来增强组合物效果的其它物质。Alum和MF59™是较佳的。

如上所述，胞壁肽包括但不限于，N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-去胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧)-乙胺(MTP-PE)等。

免疫原性组合物(如用于免疫的抗原/免疫原/多肽/蛋白/核酸，药学上可接受的载体以及佐剂)，通常含有稀释剂，如水，盐水，甘油，乙醇等。另外，辅助性物质，如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等可存在于这类运载体中。

通常，可将免疫原性组合物制成可注射剂，例如液体溶液或悬液；还可制成在注射前适合配入溶液或悬液、液体赋形剂的固体形式。该制剂还可乳化或包封在脂质体

中，在上述药学上可接受的载体下增强佐剂效果。

用作疫苗的免疫原性组合物，包含免疫学有效量的抗原性或免疫原性多肽以及上述其它所需的组分。“免疫学有效量”指以单剂或连续剂一部分给予个体的量对治疗或预防是有效的。该用量根据所治疗个体的健康状况和生理状况、所治疗个体的类别
5 (如非人灵长类、灵长类等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗的配制、治疗医师对医疗状况的评估、及其它的相关因素而定。预计该用量将在相对较宽的范围内，可通过常规实验来确定。

常规方法是从肠胃外途径通过注射给予免疫原性组合物，例如皮下、肌内或透皮给药(例如 WO98/20734)。适合其它给药方式的其它配方包括口服和肺制剂、栓剂和透
10 皮应用。治疗剂量可以是单剂方案或多剂方案。疫苗可以结合其它免疫调节剂一起给予。

作为以蛋白质为基础的疫苗的一种替代方案是，可以采用 DNA 疫苗接种[例如，Robinson 和 Torres(1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283; Donnelly 等人(1997) *Annu Rev. Immunol* 15:617-648; 见下文]。

15

基因输送载体

用于输送构建物的基因治疗载体可以局部或全身性给予，其中所述构建物包括本发明治疗剂的编码序列，将其输送至哺乳动物以便在哺乳动物体内表达。这些构建物可利用体内或活体外方式中的病毒或非病毒载体方法。这些编码序列的表达可用内源
20 哺乳动物启动子或异源启动子诱导。编码序列的体内表达可以是组成型的或受调控的。

本发明包括能表达所涉及的核酸序列的基因输送运载体。基因输送运载体宜为病毒载体，更佳的是逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒或甲病毒载体。病毒载体还可以是星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病
25 毒、小核糖核酸病毒、痘病毒或披膜病毒的病毒载体。通常参见 Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1:51-64; Kimura (1994) *Human Gene Therapy* 5:845-852; Connolly (1995) *Human Gene Therapy* 6:185-193; 以及 Kaplitt (1994) *Nature Genetics* 6:148-153。

逆转录病毒载体是本领域中熟知的并且我们认为任何逆转录病毒基因治疗载体都可用于本发明；它们包括 B、C 和 D 型逆转录病毒、异嗜性逆转录病毒(例如 NZB-
30 X1、NZB-X2 和 NZB9-1(见 O'Neill(1985) *J. Virol.* 53:160)广嗜性逆转录病毒如 MCF 和 MCF-MLV(见 Kelly(1983) *J. Virol* 45:291)、泡沫病毒和慢病毒。见《RNA 肿瘤病毒》第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory, 1985。

逆转录病毒基因治疗载体的诸部分可从不同逆转录病毒衍生获得。例如，逆转录载体 LTR 从小鼠肉瘤病毒衍生获得，tRNA 结合位点可以从 Rous 肉瘤病毒衍生获得，包装信号从小鼠白血病病毒获得，第二链的合成起点从禽类白血病病毒获得。

可将这些重组逆转录病毒载体导入合适的包装细胞系，用来产生转导感受态逆转录病毒载体颗粒(见美国专利 5,591,624)。通过将嵌合性整合酶掺入逆转录病毒颗粒，构建逆转录病毒载体，以便将其定点整合到宿主细胞 DNA 中(见 WO96/37626)。较佳的重组病毒载体是复制缺陷型重组病毒。

适合与上述逆转录病毒载体一起使用的包装细胞系是本领域熟知的，很容易制得(见 WO95/30763 和 WO92/05266)，并能用来产生能生产重组载体颗粒的生产型细胞系(也称为载体细胞系或“VCL”)。包装细胞系宜从人亲代细胞(如 HT1080 细胞)或貂亲代细胞系制取，以便消除人血清的灭活作用。

用来构建逆转录病毒基因治疗载体的较佳的逆转录病毒，包括禽类白血病病毒、牛白血病病毒、鼠白血病病毒、水貂细胞灶诱导病毒、鼠肉瘤病毒、网状内皮组织增殖病毒和 Rous 肉瘤病毒。特别佳的鼠白血病病毒包括 4070A 和 1504A(Hartley 和 Rowe (1976) *J Virol* 19:19-25)，Abelson(ATCC No. VR-999)，Friend (ATCC No. VR-245)，Graffi，Gross (ATCC No. VR-590)，Kirsten，Harvey 肉瘤病毒和 Rauscher (ATCC No. VR-998) 以及莫洛尼鼠白血病病毒(ATCC No. VR-190)。这些逆转录病毒可以从保藏机构或保藏中心如 Rockville, Maryland 的美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得，或用常用的技术从已知来源分离获得。

可用于本发明的典型的已知逆转录病毒基因治疗载体包括在以下专利申请中描述的那些载体：GB2200651，EP0415731，EP0345242，EP0334301，WO89/02468；WO89/05349，WO89/09271，WO90/02806，WO90/07936，WO94/03622，WO93/25698，WO93/25234，WO93/11230，WO93/10218，WO91/02805，WO91/02825，WO95/07994，US 5,219,740，US 4,405,712，US 4,861,719，US 4,980,289，US 4,777,127，US 5,591,624。另见 Vile (1993) *Cancer Res* 53:3860-3864；Vile (1993) *Cancer Res* 53:962-967；Ram (1993) *Cancer Res* 53 (1993) 83-88；Takamiya (1992) *J Neurosci Res* 33:493-503；Baba (1993) *J Neurosurg* 79:729-735；Mann (1983) *Cell* 33:153；Cane (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81:6349；以及 Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1。

人腺病毒基因治疗载体也是本领域中已知的，并可用于本发明。例如参见 Berkner (1988) *Biotechniques* 6:616 和 Rosenfeld (1991) *Science* 252:431，以及 WO93/07283，WO93/06223 和 WO93/07282。用于本发明的典型的已知的腺病毒基因治疗载体包括在上述文献以及下述专利中描述的那些例子：WO94/12649，WO93/03769，WO93/19191，

WO94/28938, WO95/11984, WO95/00655, WO95/27071, WO95/29993, WO95/34671, WO96/05320, WO94/08026, WO94/11506, WO93/06223, WO94/24299, WO95/14102, WO95/24297, WO95/02697, WO94/28152, WO94/24299, WO95/09241, WO95/25807, WO95/05835, WO94/18922 和 WO95/09654。另外, 可以采用 Curiel(1992) Hum. Gene Ther. 3:147-154 中描述的给予和已杀死腺病毒相连的 DNA 的方法。本发明的基因输递载体还包括腺病毒相关病毒(AAV)载体。用于本发明的这种载体的主要且较佳的例子是 Srivastava, WO93/09239 中公开的 AAV-2 为基础的载体。最佳的 AAV 载体包含两个 AAV 反向末端重复序列, 其中通过替换核苷酸对天然 D-序列进行修饰, 使至少 5-18 个天然的核苷酸(较佳的至少 10-18 个天然核苷酸, 最佳的 10 个天然核苷酸)被保留下来, 而 D-序列其余的核苷酸缺失或用非天然核苷酸取代。AAV 反向末端重复序列的天然 D-序列是每个 AAV 反向末端重复序列中不参与 HP 形成的 20 个串联核苷酸的序列(即每一端有一个序列)。非天然的替换核苷酸可以是天然 D-序列该位置中所见核苷酸以外的任何核苷酸。其它可采用的典型 AAV 载体是 pWP-19、pWN-1, 两者均公开在 Nahreini(1993) Gene 124:257-262 中。这样的 AAV 载体的另一个例子是 psub201(见 Samulski(1987) J. Virol. 61:3096)。另一个典型的 AAV 载体是 Double-D ITR 载体。Double-D ITR 载体的构建方案公开在美国专利 5,478,745 中。还有其它的载体是公开在 Carter 的美国专利 4,797,368 和 Muzyczka 的美国专利 5,139,941、Chartejee 的美国专利 5,474,935 和 Kotin 的 WO94/288157 中的载体。可用于本发明的另一个 AAV 载体例子是 SSV9AFABTKneo, 它含有 AFP 增强子和白蛋白启动子, 并且主要指导肝内表达。其结构和构建方案公开在 Su(1996) Human Gene Therapy 7:463-470 中。其它的 AAV 基因治疗载体在美国专利 5,354,678, 5,173,414, 5,139,941, 5,252,479 中有所描述。

本发明的基因治疗载体还包括疱疹载体。主要且较佳的例子是含有编码胸苷激酶多肽的序列的单纯疱疹病毒载体, 如公开在 US5,288,641 和 EP0176170(Roizman)中的那些。其它典型的单纯疱疹病毒载体包括 WO95/04139 中公开的 HFEM/ICP6-LacZ(Wistar Institute)、Geller(1988) Science 241:1667-1669 以及 WO90/09441 和 WO92/07945 中公开的 pHSVlac、Fink(1992) Human Gene Therapy 3:11-19 中描述的 HSV Us3::pgC-lacZ、EP 0453242(Breakefield)中描述的 HSV 7134、2 RH 105 和 GAL4 以及保藏于 ATCC、保藏号为 ATCC VR-977 和 ATCC VR-260 的那些病毒。

还考虑到甲病毒基因治疗载体也可用于本发明。较佳的甲病毒载体是新培斯病毒载体。披膜病毒、Semliki Forest 病毒(ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、Middleberg 病毒(ATCC VR-370)、Ross River 病毒(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)、委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)、以及在

美国专利 5,091,309, 5,217,879 以及 WO92/10578 中描述的那些。更具体地说, 可以采用 1995 年 3 月 15 日提交的美国申请 08/405,627、WO94/21792、WO92/10578、WO95/07994、US 5,091,309 和 US 5,217,879 中描述的那些甲病毒载体。这些甲病毒可以从保藏机构或保藏中心如 Rockville, Maryland 的美国典型培养物保藏中心(ATCC) 5 获得, 或用常用的技术从已知来源分离获得。较佳的是, 采用细胞毒性降低的甲病毒载体(见 USSN 08/679640)。

DNA 载体系统, 如真核分层的(layered)表达系统也可用于表达本发明的核酸。关于真核分层的表达系统详见 WO95/07994。较佳的, 本发明的真核分层表达系统宜从甲病毒载体衍生获得, 更佳的从新培斯病毒载体衍生获得。

10 适用于本发明的其它病毒载体包括: 从脊髓灰质炎病毒衍生的载体, 例如 ATCC VR-58 以及在 Evans, *Nature* 339 (1989) 385 和 Sabin (1973) *J. Biol. Standardization* 1:115 中描述的那些; 鼻病毒, 例如 ATCC VR-1110 以及在 Arnold (1990) *J Cell Biochem* L401 中描述的那些; 痘病毒, 如金黄色痘病毒或牛痘病毒, 例如 ATCC VR-111 和 ATCC VR-2010, 以及在 Fisher-Hoch (1989) *Proc Natl Acad Sci* 86:317; Flexner (1989) *Ann NY*
15 *Acad Sci* 569:86, Flexner (1990) *Vaccine* 8:17; US 4,603,112, US 4,769,330 以及 WO89/01973 中描述的那些; SV40 病毒, 例如 ATCC VR-305 以及在 Mulligan (1979) *Nature* 277:108 和 Madzak (1992) *J Gen Virol* 73:1533 中描述的那些; 流感病毒, 例如 ATCC VR-797 以及用例如 US 5,166,057 和 Enami (1990) *Proc Natl Acad Sci* 87:3802-3805; Enami 和 Palese (1991) *J Virol* 65:2711-2713; Luytjes (1989) *Cell* 59:110 中所述
20 的反基因技术制得的重组流感病毒(另见 McMichael (1983) *NEJ Med* 309:13, Yap (1978) *Nature* 273:238 以及 *Nature* (1979) 277:108); EP-0386882 和 Buchschacher (1992) *J. Virol.* 66:2731 中描述的人免疫缺陷病毒; 麻疹病毒, 例如 ATCC VR-67 和 VR-1247, 以及 EP-0440219 中描述的那些; 奥拉病毒, 例如 ATCC VR-368; Bebaru 病毒, 例如 ATCC VR-600 和 ATCC VR-1240; Cabassou 病毒, 例如 ATCC VR-922; 屈曲病毒, 例如 ATCC
25 VR-64 和 ATCC VR-1241; Fort Morgan 病毒, 例如 ATCC VR-924; Getah 病毒, 例如 ATCC VR-369 和 ATCC VR-1243; Kyzylagach 病毒, 例如 ATCC VR-927; Mayaro 病毒, 例如 ATCC VR-66; Mucambo 病毒, 例如 ATCC VR-580 和 ATCC VR-1244; Ndumu 病毒, 例如 ATCC VR-371; Pixuna 病毒, 例如 ATCC VR-372 和 ATCC VR-1245; Tonate 病毒, 例如 ATCC VR-925; Trinita 病毒, 例如 ATCC VR-469; Una 病毒, 例如 ATCC
30 VR-374; Whataroa 病毒, 例如 ATCC VR-926; Y-62-33 病毒, 例如 ATCC VR-375; O'Nyong 病毒, 东部脑炎病毒, 例如 ATCC VR-65 和 ATCC VR-1242; 西部脑炎病毒, 例如 ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622 和 ATCC VR-1252; 和冠状病毒,

例如 ATCC VR-740 和在 Hamre (1966) *Proc Soc Exp Biol Med* 121:190 中描述的那些。

5 将本发明的组合物输送至细胞内并不局限于上述病毒载体。还可采用其它输送方法和介质, 例如核酸表达载体、与已被杀死的腺病毒相连或不相连的单独的聚阳离子凝缩的 DNA(例如参见 1994 年 12 月 30 日美国申请 No. 08/366,787 和 Curiel(1992) *Hum Gene Ther* 3:147-154)、配体连接的 DNA(例如参见 Wu(1989) *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987)、真核细胞输送载体细胞(例如参见 1994 年 5 月 9 日提交的美国申请 No. 08/240,030 以及美国申请 No. 08/404,796)、光聚合水凝胶材料的沉淀、手提式基因转移颗粒枪(如美国专利 5,149,655 所述)、电离辐射(如 US5,206,152 和 WO92/11033 所述)、核电荷中和/或与细胞膜融合。其它方法在 Philip(1994) *Mol Cell Biol* 14:2411-2418 以及

10 Woffendin(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1581-1585 中有所描述。

可以采用颗粒介导的基因转移, 例如参见美国申请 No. 60/023,867。简言之, 可将序列插入含有控制高水平表达的常规序列的常规载体中, 然后和合成性基因转移分子一起培育, 这些基因转移分子例如是聚合性 DNA-结合阳离子(如聚赖氨酸、鱼精蛋白和白蛋白), 其与细胞寻靶配体(如脱唾液酸血清类粘蛋白(如 Wu 和 Wu(1987) *J. Biol.*

15 *Chem.* 262:4429-4432 所述)、胰岛素(如 Hucked(1990) *Biochem Pharmacol* 40:253-263 所述)、半乳糖(如 Plank(1992) *Bioconjugate Chem* 3:533-539 所述)、乳糖或运铁蛋白)相连。

裸 DNA 也可用于转化宿主细胞。典型的裸 DNA 导入方法在 WO 90/11902 和 US 5,580,859 中有所描述。用可生物降解的乳胶珠可以改善摄取效果。在对珠粒的胞吞作用开始后, DNA 包被的乳胶珠粒被有效地运输到细胞中。通过处理珠粒以提高其疏水性可进一步改进该方法, 从而促进核内体的破坏和将 DNA 释放到细胞质中。

20

可作为基因输送运载体的脂质体在 US 5,422,120, WO95/13796, WO94/23697, WO91/14445 和 EP-524,968 中有所描述。如 USSN 60/023,867 中所描述的, 在非病毒输送时, 可将编码多肽的核酸序列插入含有控制高水平表达的常规序列的常规载体中, 然后和合成性基因转移分子一起培育, 这些基因转移分子例如是聚合性 DNA-结合

25 阳离子(如聚赖氨酸、鱼精蛋白和白蛋白), 其与细胞寻靶配体(如脱唾液酸血清类粘蛋白、胰岛素、半乳糖、乳糖或运铁蛋白)相连。其它输送系统包括采用脂质体来包裹 DNA, 该 DNA 所含基因在各种组织特异性或活性普遍存在的启动子控制下。适用的其它非病毒输送系统包括机械输送系统, 如 Woffendin 等人(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(24):11581-11585 中描述的方法。另外, 这类编码序列和表达产物可以通过光

30 聚合的水凝胶材料的沉淀来输送。可用来输送编码序列的其它基因输送常规方法例如包括, 用手提式基因转移颗粒枪(如美国专利 5,149,655 所述); 用电离辐射来激活转移的基因(如 US 5,206,152 和 WO92/11033 所述)。

典型的脂质体和聚阳离子基因输送载体在下列文献中有所描述：US 5,422,120 和 4,762,915；WO 95/13796；WO94/23697；WO91/14445；EP-0524968；Stryer, Biochemistry, 236-240 页(1975) W.H. Freeman, San Francisco；Szoka (1980) *Biochem Biophys Acta* 600:1；Bayer (1979) *Biochem Biophys Acta* 550:464；Rivnay (1987) *Meth Enzymol* 149:119；Wang (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84:7851；Plant (1989) *Anal Biochem* 176:420。

多核苷酸组合物可包含治疗有效量的基因治疗运载体，其定义如上所述。出于本发明的目的，有效的剂量是给予个体约 0.01 毫克/千克至 50 毫克/千克或 0.05 毫克/千克至 10 毫克/千克的 DNA 构建物。

10

输送方法

一旦配制后，本发明的多核苷酸组合物可以以下三种方式给予：(1)直接给予对象；(2)活体外输送给对象衍生的细胞；或(3)体外表达重组蛋白。待处理的对象可以是哺乳动物或鸟类。另外，也可对人进行治疗。

15

直接输送该组合物通常可通过皮下、腹膜内、静脉内或肌内注射或输送至组织间隙来实现。该组合物也可输送至病损部位。其它给药方式包括口服和肺部给药、栓剂和透皮或经皮肤应用(例如见 WO98/20734)、用针、基因枪或手持喷雾器(hypospray)。治疗剂量方案可以是单剂方案或多剂方案。

20

活体外输送以及将转化的细胞重新植入对象体内的方法是本领域所熟知的，在例如 WO93/14778 中有所描述。用于活体外应用的细胞例子包括例如干细胞、尤其是造血细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞或肿瘤细胞。

25

通常，对于活体外和体外应用，核酸的输送可通过以下步骤来实现，例如葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、Polybrene 介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸包裹在脂质体中以及将 DNA 直接显微注射到胞核中，所有这些均是本领域所熟知的。

多核苷酸和多肽药物组合物

除了上述的药学上可接受的载体和盐外，多核苷酸和多肽组合物中还可采用下列附加试剂。

30

A. 多肽

一个例子是多肽，其包括但不限于：脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)；运铁蛋白；脱唾液酸糖蛋白；抗体；抗体片段；铁蛋白；白介素；干扰素；粒细胞-巨噬细胞集落

刺激因子(GM-CSF); 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、干细胞因子和促红细胞生成素。还可使用病毒抗原, 如包膜蛋白。另外, 可用来自其它侵袭性生物的蛋白, 例如疟原虫恶性疟疾的环孢子蛋白的 17 个氨基酸的肽(称为 RII)。

5

B. 激素, 维生素等

其它可包括的种类例如是: 激素、类固醇、雄激素、雌激素、甲状腺激素或维生素、叶酸。

10

C. 聚亚烷基、多糖等

另外, 聚(亚烷基)二醇可以和所需的多核苷酸或多肽组合在一起。在一个较佳的实施方案中, 聚(亚烷基)二醇是聚乙二醇。另外, 可以加入单糖、二糖或多糖。在此方面的一个较佳实施方案中, 多糖是葡聚糖或 DEAE-葡聚糖。另外有脱乙酰壳多糖和聚交酯-聚乙醇酸内酯共聚物。

15

D. 脂质和脂质体

所需的多核苷酸或多肽还可在输送给对象或对象衍生的细胞之前包裹在脂质中或包裹在脂质体中。

脂质包裹通常用能稳定结合或捕获并保留核酸的脂质体来实现。浓缩的多核苷酸与脂质制剂之比可以不同, 但是通常在约 1: 1(毫克 DNA: 微摩尔脂质)之间, 或脂质更多。关于脂质体作为输送核酸的载体的综述参见 Hug 和 Sleight(1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1097:1-17; Straubinger(1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527。

用于本发明的脂质体制剂包括阳离子(带正电荷)、阴离子(带负电荷)和中性制剂。阳离子脂质体已经显示出能以有功能的形式介导质粒 DNA 的胞内输送 (Felgner(1987)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416); mRNA(Malone(1989)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081); 和纯化的转录因子的胞内输送(Debs(1990)*J. Biol. Chem.* 265:10189-10192)。

阳离子脂质体很容易购得。例如, N[1-2,3-二油烯基氧)丙基]-N,N,N-三乙铵(DOTMA)脂质体可以以 Lipofectin 的商标从 GIBCO BRL, Grand Island, NY 购得。(另见 Felgner, 同上)。其它商品脂质体包括 transfectace(DDAB/DOPE) 和 DOTAP/DOPE(Boehringer)。其它阳离子脂质体可用本领域熟知的方法从易购得的材料制得。例如参见, Szoka(1978) *PNAS USA* 75:4194-4198; WO90/11092 关于 DOTAP(1,2-

二(油酰基氧)-3-(三甲基铵溶)丙烷)脂质体合成的描述。

同样，阴离子和中性脂质体也是容易获得的，例如购自 Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL)，或容易用易购得的材料制得。这种材料包括磷脂酰胆碱、胆固醇、磷脂酰乙醇胺、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。这些材料还能以合适比例与 DOTMA 和 DOTAP 原料混合。用这些材料制备脂质体的方法是本领域熟知的。

脂质体可包含多层脂质体(MLV)，小的单层脂质体(SUV)、或大的单层脂质体(LUV)。各种脂质体-核酸复合物可用本领域已知的方法制得。例如参见 Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101:512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394:483; Wilson (1979) *Cell* 17:77; Deamer 和 Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443:629; Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:836; Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3348; Enoch 和 Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:145; Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255:10431; Szoka 和 Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:145; 以及 Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215:166。

E. 脂蛋白

另外，脂蛋白也可加入待输送的多核苷酸或多肽中。采用的脂蛋白的例子包括：乳糜微粒、HDL、IDL、LDL 和 VLDL。还可采用这些蛋白的突变体、片段或融合蛋白。另外，可采用天然存在的脂蛋白的修饰物，例如乙酰化的 LDL。这些脂蛋白能使多核苷酸的输送指向表达脂蛋白受体的细胞。较佳的，如果待输送的多核苷酸中加入了脂蛋白，则组合物中不加入其它寻靶的配体。

天然存在的脂蛋白包含脂质和蛋白部分。蛋白部分称为脱辅基蛋白。目前，已经分离并鉴定出了脱辅基蛋白 A、B、C、D 和 E。其中至少有两个含有几种蛋白，用罗马数字 AI、AII、AIV；CI、CII、CIII 命名。

脂蛋白可包含多个脱辅基蛋白。例如，天然存在的乳糜微粒包含 A、B、C 和 E，随着时间的推移，这些脂蛋白失去 A，得到 C 和 E 脱辅基蛋白。VLDL 包含 A、B、C、和 E 脱辅基蛋白，LDL 包含脱辅基蛋白 B；HDL 包含脱辅基蛋白 A、C 和 E。

这些脱辅基蛋白的氨基酸是已知的，并且在下列文献中有所描述：Breslow (1985) *Annu Rev. Biochem* 54:699; Law (1986) *Adv. Exp Med. Biol.* 151:162; Chen (1986) *J Biol Chem* 261:12918; Kane (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2465; and Utermann (1984) *Hum Genet* 65:232。

脂蛋白含有各种脂质，包括甘油三酯、胆固醇(游离的和酯型)以及磷脂。天然存在的脂蛋白中脂质的组成是不同的。例如，乳糜微粒主要含甘油三酯。关于天然存在的脂蛋白的脂质含量更详细的描述可在例如 Meth. Enzymol. 128(1986)中找到。选择脂质的组成，以使脱辅基蛋白的构型有利于受体结合活性。还可选择脂质的组成，以促进与多核苷酸结合分子中的疏水性相互作用和结合。

天然存在的脂蛋白可以用诸如超离心方法从血清中分离出来。这些方法在 Meth. Enzymol. (同上); Pitas(1980) J. BioChem. 255:5454-5460 以及 Mahey(1979) J Clin. Invest 64:743-750 中有所描述。脂蛋白还可在体外产生，或通过所需宿主细胞中表达脱辅基蛋白基因的重组方法产生。例如参见 Atkinson(1986) Annu Rev Biophys Chem 15:403 和 Radding(1958) Biochim Biophys Acta 30:443。脂蛋白也可购自商业供应商，如 Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, USA。关于脂蛋白的进一步描述可在 Zuckermann 等人的 WO98/06437 中找到。

F. 聚阳离子试剂

聚阳离子试剂可以与或不与脂蛋白一起包括在含所需待输送多核苷酸/多肽的混合物中。

聚阳离子试剂通常在生理性相关的 pH 下表现出净的正电荷，并能中和核酸的电荷，而有助于输送至所需位置。这些试剂具有体外、活体外和体内的用途。聚阳离子试剂可用来将核酸通过肌肉或皮下等输送至活的对象。

下面是用作聚阳离子试剂的多肽例子：聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸和鱼精蛋白。其它例子包括组蛋白、鱼精蛋白、人血清白蛋白、DNA 结合蛋白、非组蛋白染色体蛋白、DNA 病毒的外壳蛋白，如(X174，转录因子还含有结合 DNA 的结构域，因此可用作核酸凝聚剂。简言之，转录因子如 C/CEBP、c-jun、c-fos、AP-1、AP-2、AP-3、CPF、Prot-1、Sp-1、Oct-1、Oct-2、CREP、和 TFIID 含有结合 DNA 序列的基本结构域。

聚阳离子有机试剂包括：精胺、亚精胺和腐胺。

从上面的清单可以推出聚阳离子试剂的尺寸和物理性能，以构建其它多肽聚阳离子试剂或产生合成的聚阳离子试剂。

有用的合成聚阳离子试剂例如包括，DEAE-葡聚糖、Polybrene。Lipofectin™和 lipofectAMINE™是与多核苷酸/多肽组合时形成聚阳离子复合物的单体。

免疫诊断试验

本发明的脑膜炎球菌抗原可用于免疫试验来检测抗体水平(或相反,可用抗脑膜炎球菌抗体来检测抗原水平)。根据明确的免疫试验,可以开发重组抗原,以代替侵入性诊断方法。可检测生物学样品(例如包括血液或血清样品)中的抗脑膜炎球菌蛋白的抗体。免疫试验的设计可作很大变化,其各种方案均是本领域中已知的。免疫试验的方案可采取例如竞争性、或直接反应或夹心型试验。方案例如还可采用固体支持物,或可以采用免疫沉淀法。大多数试验涉及采用有标记的抗体或多肽;该标记例如可以是荧光标记、化学发光标记、放射活性标记或染料分子。扩增探针信号的试验也是已知的;其例子是采用生物素和亲和素的试验,酶标记的和介导的免疫试验,如 ELISA 试验。

10 将合适的材料(包括本发明的组合物)以及进行试验所需的其它试剂和材料(例如合适的缓冲液、盐溶液等)和合适的试验说明书包装到合适的容器中,构成适用于免疫诊断且含有适当标记的试剂的试剂盒。

核酸杂交

15 “杂交”指两个核酸序列相互之间通过氢键而结合。通常,一个序列固定于固体载体,另一个将游离于溶液内。然后,在有利于形成氢键的条件下使两个序列相互接触。影响这种结合的因素包括:溶剂的类型和体积;反应温度;杂交时间;搅拌;封闭液相序列与固体载体非特异性结合的试剂(Denhardt's 试剂或 BLOTTO);各序列的浓度;是否使用化合物来增加序列结合的速度(硫酸葡聚糖或聚乙二醇);以及杂交后洗涤条件的严谨程度。见 Sambrook 等人[同上]第 2 卷,第 9 章,9.47 至 9.57 页。

20 “严谨性”指有利于非常相似的序列结合而不利于不同序列结合的杂交反应条件。例如,应选择温度和盐浓度的组合,使温度比所研究的杂交的 T_m 计算值低大约 120 至 200°C。温度和盐浓度常可通过初步实验中凭经验来确定,在初步实验中,固定在滤膜上的基因组 DNA 样品与感兴趣的序列杂交,然后在不同的严谨度条件下洗涤。见 Sambrook 等人第 9.50 页。

25 在进行例如 Southern 印迹时,要考虑的参数是(1)待印迹的 DNA 的复杂性以及(2)探针与受检测序列之间的同源性。对于高度复杂的真核基因组中的单拷贝基因,待研究片段的总量可以在 10 的一个数量级范围内变化,质粒为 0.1 至 1 微克,或将噬菌体消化至 10^{-9} 至 10^{-8} 克。对于复杂性较低的多核苷酸,可以采用实际上更短的印迹、杂交以及接触时间,更少量的起始多核苷酸,以及比活更低的探针。例如,从 1 微克酵母 DNA 开始,用仅仅 1 小时的接触时间,印迹 2 小时,然后和 10^8 cpm/ μ g 的探针杂交 4-8 小时,就可以检测单拷贝酵母基因。对于单拷贝哺乳动物基因而言,一种保守的方

法是从 10 微克 DNA 开始，印迹过夜，在 10%硫酸葡聚糖存在下用 $10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$ 以上的探针杂交过夜，导致接触时间约为 24 小时。

有几个因素可能会影响探针与感兴趣片段之间的 DNA-DNA 杂交物的解链温度 (T_m)，因而影响杂交和洗涤的合适条件。在许多情况下，探针并非与待测片段 100%同源。其它常常遇到的变量包括杂交序列的长度和 G+C 总含量，以及杂交缓冲液的离子强度和甲酰胺含量。所有这些因素的作用可近似表示成一个方程式：

$$T_m = 81 + 16.6(\log_{10} C_i) + 0.4[\%(G+C)] - 0.6(\% \text{甲酰胺}) - 600/n - 1.5(\% \text{错配})$$

其中 C_i 是盐浓度(单价离子)， n 是杂交物碱基对的长度(对 Meinkoth 和 Wahl(1984) Anal. Biochem. 138:267-284 的方法稍作了修改)。

- 10 在设计杂交实验时，影响核酸杂交的一些因素可以方便地予以改变。杂交和洗涤时的温度以及洗涤时的盐浓度的调节最为简单。随着杂交温度(即严谨度)的升高，不同源的链之间发生杂交的可能性变得更少，结果背景值降低。如果放射性标记的探针并非与固定的片段完全同源(这在基因家族和种间杂交实验中是常见的)，则必须降低杂交温度，而背景值将会增加。洗涤温度以类似的方式影响杂交带的强度和背景值的程度。
- 15 洗涤的严谨性也随盐浓度的降低而升高。

- 通常，在 50%甲酰胺存在下的方便的杂交温度是：对于靶片段同源性达 95%至 100%的探针而言，是 42°C ；对于同源性为 90%至 95%的探针，为 37°C ；对于同源性为 85%和 90%的探针，为 32°C 。对于较低的同源性，应用上述方程式应相应地降低甲酰胺含量和调节温度。如果探针和靶片段之间的同源性是未知的，则最简单的方法是从非严谨的杂交和洗涤条件开始。如果在放射自显影后发现了非特异性的条带或高背景值，则可在高严谨性下洗涤滤膜，并重新曝光。如果曝光所需时间使得该方法不切实际，则应平行测试几种杂交和/或洗涤严谨性。
- 20

核酸探针试验

- 25 采用本发明的核酸探针的方法(如 PCR、分支 DNA 探针试验或印迹技术)能确定 cDNA 或 mRNA 的存在。如果探针和本发明的序列能形成稳定地足以被检测到的双链体或双链复合物，则称探针与本发明的序列“杂交”。

- 核酸探针将与本发明的脑膜炎球菌核苷酸序列(包括有义和反义链)杂交。尽管有许多不同的核苷酸序列编码该氨基酸序列，但是天然的脑膜炎球菌序列是较佳的，因为它实际存在于细胞中的序列。mRNA 代表一种编码序列，因此探针应与该编码序列互补；单链 cDNA 与 mRNA 互补，因此 cDNA 探针应与非编码序列互补。
- 30

探针序列无需和脑膜炎球菌序列(或其互补体)相同，序列以及长度的一些差异能增加试验的灵敏度，如果核酸探针能和靶核苷酸形成能被检测的双链体的话。另外，

核酸探针可包括其它核苷酸，以使形成的双链体稳定。其它脑膜炎球菌序列也是有帮助的，可作为检测形成的双链体的标记。例如，非互补的核苷酸序列可以和探针的 5' 端相连，探针序列的其余部分与脑膜炎球菌序列互补。或者，可将非互补的碱基或较长的序列散布到探针中，只要探针序列与脑膜炎球菌序列有足够的互补性以便与其杂交从而形成能被检测的双链体。

探针的确切长度和序列将取决于杂交条件，如温度、盐浓度等。例如，对于诊断应用，根据分析物序列的复杂程度，核酸探针通常含有至少 10-20 个核苷酸，较佳的 15-25 个，更佳的至少 30 个核苷酸，但是也可短于该长度。短的引物通常需要较低温度，以便和模板形成足够稳定的杂交复合物。

探针可用合成方法产生，例如 Matteucci 等人[J. Am. Chem. Soc. (1981) 103:3185] 的方法或 Urdea 等人[Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1983) 80:7461]的方法，或用市售的自动寡核苷酸合成仪合成。

可以根据偏好选择探针的化学特征。对于某些应用，DNA 或 RNA 是合适的。对于其它的应用，可以加入修饰，例如骨架修饰，如硫代磷酸酯或甲基磷酸酯，可用来增加体内半衰期，改变 RNA 亲和力，增加核酸酶抗性等[例如参见 Agrawal 和 Iyer (1995) Curr Opin Biotechnol 6:12-19; Agrawal (1996) TIBTECH 14:376-387]; 还可采用类似物如肽核酸 [例如参见 Corey (1997) TIBTECH 15:224-229; Buchardt 等人(1993) TIBTECH 11:384-386]。

另外，聚合酶链反应(PCR)是另一个熟知的检测少量靶核酸的手段。该试验在 Mullis 等人[Meth. Enzymol. (1987) 155:335-350];美国专利 4,683,195 和 4,683,202 中有所描述。用两个“引物”核苷酸与靶核酸杂交，并用来引导反应。引物可包含不与扩增靶序列(或其互补序列)杂交的序列，以帮助双链体的稳定性，或例如可插入一个简便的限制性位点。这些序列通常侧接所需的脑膜炎球菌序列。

利用最初的靶核酸作为模板，热稳定的聚合酶能从引物产生靶核酸的拷贝。在聚合酶产生临界量的靶核酸后，它们可用较传统的方法(如 Southern 印迹)来检测。当采用 Southern 印迹方法时，标记的探针将与脑膜炎球菌序列(如其互补序列)杂交。

另外，mRNA 或 cDNA 也可用 Sambrook 等人[同上]描述的传统印迹技术来检测。用凝胶电泳可纯化并分离利用聚合酶从 mRNA 产生的 mRNA 或 cDNA。然后，将凝胶上的核酸印迹到固体载体如硝酸纤维素上。使固体载体与标记的探针接触，然后洗涤除去所有未杂交的探针。然后，检测含有标记探针的双链体。该探针通常用放射活性物质作标记。

优选片段的例子

对 WO99/36544 中所公开的蛋白质序列进行计算机分析，预测在全长蛋白质中的抗原性肽片段。在该分析中使用了 3 种算法：

- 两亲性(AMPHI)，该程序用于预测 T 细胞表位[Gao 等人 (1989) J. Immunol.

143:3007; roberts 等人 (1996) AIDS Res Hum Retrovir 12:593; Quakyi 等人 (1992) Scand J Immunol suppl. 11:9], 并且可从 DNASTAR, Inc(1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715, USA)的 Protean 软件包中获得。

- 抗原性指数(ANTIGENIC INDEX), 由 Jameson & Wolf (1988) “抗原性指数: 一种新的预测抗原决定簇的算法”, CABIOS, 4: 181: 186 所公开。
- 亲水性(HYDROPHILICITY), 由 Hopp & Woods (1981) “根据氨基酸序列预测蛋白质的抗原决定簇”, PNAS USA, 78: 3824-3828。

表 I 预测了 WO99/36544 中所公开的蛋白质的优选片段。这 3 种算法常鉴别出相同的片段(例如, ORF38-1 中从残基 37-42 的片段和从残基 143-146 的片段两者被鉴别出二次)。这类多重鉴别出的片段是特别优选的。这些算法还常常鉴别出重迭的片段(例如对于 ORF40-1, 两亲性算法鉴别出残基 161-165, 而亲水性算法鉴别出残基 163-175)。本发明明明白白地包括这些重迭片段组合所形成的片段(例如, 对于 ORF40-1, 从残基 161-175 的片段)。还鉴别出被一个氨基酸所隔开的片段(例如 ORF40-1 中, 抗原性指数算法鉴别出 423-426 和 428-438)。本发明还包括横跨了这种“相邻”片段的两个极值的片段(如 ORF40-1 的 423-438)。

表 I—在 WO99/36544 中所公开的蛋白质的 1769 种片段

关键词: 本申请的片段#1 是 WO99/36544 中公开的 ORF38-1 的氨基酸 6-14。
本申请的片段#2 是 WO99/36544 中公开的 ORF38-1 的氨基酸 57-59, 依此类推。

片段编号	WO99/36544 ORF	算 法	氨 基 酸
1.	38-1	两亲性	6-14
2.	38-1	两亲性	57-59
3.	38-1	两亲性	67-76
4.	38-1	两亲性	92-100
5.	38-1	两亲性	127-137
6.	38-1	两亲性	149-166
7.	38-1	两亲性	210-215
8.	38-1	两亲性	231-236
9.	38-1	两亲性	270-272
10.	38-1	两亲性	303-320
11.	38-1	抗原性指数	16-34
12.	38-1	抗原性指数	37-42
13.	38-1	抗原性指数	46-64
14.	38-1	抗原性指数	72-91
15.	38-1	抗原性指数	94-112
16.	38-1	抗原性指数	114-117
17.	38-1	抗原性指数	124-136
18.	38-1	抗原性指数	143-146
19.	38-1	抗原性指数	148-160
20.	38-1	抗原性指数	167-195
21.	38-1	抗原性指数	201-216
22.	38-1	抗原性指数	218-240
23.	38-1	抗原性指数	244-252
24.	38-1	抗原性指数	257-278
25.	38-1	抗原性指数	282-290
26.	38-1	抗原性指数	308-314
27.	38-1	亲水性	21-34
28.	38-1	亲水性	37-42
29.	38-1	亲水性	47-55
30.	38-1	亲水性	57-61
31.	38-1	亲水性	72-74
32.	38-1	亲水性	76-78
33.	38-1	亲水性	82-91
34.	38-1	亲水性	94-101
35.	38-1	亲水性	108-112
36.	38-1	亲水性	126-136
37.	38-1	亲水性	143-146
38.	38-1	亲水性	148-160

39.	38-1	亲水性	167-195
40.	38-1	亲水性	221-223
41.	38-1	亲水性	226-236
42.	38-1	亲水性	244-250
43.	38-1	亲水性	257-274
44.	38-1	亲水性	282-286
45.	38-1	亲水性	311-314
46.	38a	两亲性	6-14
47.	38a	两亲性	57-59
48.	38a	两亲性	67-76
49.	38a	两亲性	92-100
50.	38a	两亲性	127-137
51.	38a	两亲性	149-166
52.	38a	两亲性	210-215
53.	38a	两亲性	223-225
54.	38a	两亲性	231-236
55.	38a	两亲性	270-272
56.	38a	两亲性	303-320
57.	38a	抗原性指数	16-34
58.	38a	抗原性指数	37-42
59.	38a	抗原性指数	46-64
60.	38a	抗原性指数	72-91
61.	38a	抗原性指数	94-112
62.	38a	抗原性指数	114-117
63.	38a	抗原性指数	124-136
64.	38a	抗原性指数	143-146
65.	38a	抗原性指数	148-160
66.	38a	抗原性指数	165-195
67.	38a	抗原性指数	201-216
68.	38a	抗原性指数	218-240
69.	38a	抗原性指数	244-252
70.	38a	抗原性指数	257-278
71.	38a	抗原性指数	282-290
72.	38a	抗原性指数	308-314
73.	38a	亲水性	21-34
74.	38a	亲水性	37-42
75.	38a	亲水性	47-55
76.	38a	亲水性	57-61
77.	38a	亲水性	72-74
78.	38a	亲水性	76-78
79.	38a	亲水性	82-91
80.	38a	亲水性	94-101
81.	38a	亲水性	108-112
82.	38a	亲水性	126-136
83.	38a	亲水性	143-146

84.	38a	亲水性	148-160
85.	38a	亲水性	165-195
86.	38a	亲水性	221-223
87.	38a	亲水性	226-236
88.	38a	亲水性	244-250
89.	38a	亲水性	257-273
90.	38a	亲水性	282-286
91.	38a	亲水性	311-314
92.	39-1	两亲性	6-13
93.	39-1	两亲性	21-24
94.	39-1	两亲性	37-40
95.	39-1	两亲性	60-75
96.	39-1	两亲性	118-122
97.	39-1	两亲性	134-139
98.	39-1	两亲性	165-183
99.	39-1	两亲性	192-195
100.	39-1	两亲性	233-241
101.	39-1	两亲性	247-267
102.	39-1	两亲性	273-275
103.	39-1	两亲性	299-308
104.	39-1	两亲性	310-319
105.	39-1	两亲性	322-330
106.	39-1	两亲性	338-347
107.	39-1	两亲性	358-364
108.	39-1	两亲性	366-368
109.	39-1	两亲性	376-378
110.	39-1	两亲性	385-392
111.	39-1	两亲性	413-416
112.	39-1	两亲性	421-424
113.	39-1	两亲性	429-438
114.	39-1	两亲性	445-454
115.	39-1	两亲性	456-458
116.	39-1	两亲性	498-500
117.	39-1	两亲性	512-519
118.	39-1	两亲性	576-587
119.	39-1	两亲性	589-600
120.	39-1	两亲性	650-652
121.	39-1	两亲性	670-674
122.	39-1	抗原性指数	26-32
123.	39-1	抗原性指数	35-45
124.	39-1	抗原性指数	54-69
125.	39-1	抗原性指数	79-84
126.	39-1	抗原性指数	88-96
127.	39-1	抗原性指数	105-110
128.	39-1	抗原性指数	117-124

129.	39-1	抗原性指数	152-154
130.	39-1	抗原性指数	190-192
131.	39-1	抗原性指数	222-231
132.	39-1	抗原性指数	246-265
133.	39-1	抗原性指数	292-295
134.	39-1	抗原性指数	318-335
135.	39-1	抗原性指数	353-362
136.	39-1	抗原性指数	370-372
137.	39-1	抗原性指数	402-404
138.	39-1	抗原性指数	406-408
139.	39-1	抗原性指数	419-421
140.	39-1	抗原性指数	446-449
141.	39-1	抗原性指数	453-460
142.	39-1	抗原性指数	465-469
143.	39-1	抗原性指数	476-487
144.	39-1	抗原性指数	491-499
145.	39-1	抗原性指数	505-514
146.	39-1	抗原性指数	522-536
147.	39-1	抗原性指数	557-567
148.	39-1	抗原性指数	569-575
149.	39-1	抗原性指数	577-580
150.	39-1	抗原性指数	593-599
151.	39-1	抗原性指数	603-619
152.	39-1	抗原性指数	626-628
153.	39-1	抗原性指数	634-637
154.	39-1	抗原性指数	639-647
155.	39-1	抗原性指数	655-658
156.	39-1	抗原性指数	672-674
157.	39-1	抗原性指数	677-686
158.	39-1	抗原性指数	688-691
159.	39-1	抗原性指数	693-699
160.	39-1	抗原性指数	707-710
161.	39-1	亲水性	28-32
162.	39-1	亲水性	38-44
163.	39-1	亲水性	54-69
164.	39-1	亲水性	80-83
165.	39-1	亲水性	89-96
166.	39-1	亲水性	117-119
167.	39-1	亲水性	121-123
168.	39-1	亲水性	152-154
169.	39-1	亲水性	224-231
170.	39-1	亲水性	247-265
171.	39-1	亲水性	318-332
172.	39-1	亲水性	357-361
173.	39-1	亲水性	402-404

174.	39-1	亲水性	406-408
175.	39-1	亲水性	446-449
176.	39-1	亲水性	454-459
177.	39-1	亲水性	465-469
178.	39-1	亲水性	476-487
179.	39-1	亲水性	491-499
180.	39-1	亲水性	506-514
181.	39-1	亲水性	525-535
182.	39-1	亲水性	560-567
183.	39-1	亲水性	573-575
184.	39-1	亲水性	577-580
185.	39-1	亲水性	594-596
186.	39-1	亲水性	605-607
187.	39-1	亲水性	611-619
188.	39-1	亲水性	634-637
189.	39-1	亲水性	639-647
190.	39-1	亲水性	672-674
191.	39-1	亲水性	677-686
192.	39-1	亲水性	688-690
193.	39-1	亲水性	693-695
194.	39a	两亲性	6-13
195.	39a	两亲性	21-24
196.	39a	两亲性	37-40
197.	39a	两亲性	60-75
198.	39a	两亲性	118-122
199.	39a	两亲性	134-139
200.	39a	两亲性	165-183
201.	39a	两亲性	192-195
202.	39a	两亲性	233-241
203.	39a	两亲性	247-267
204.	39a	两亲性	273-275
205.	39a	两亲性	299-308
206.	39a	两亲性	310-319
207.	39a	两亲性	322-330
208.	39a	两亲性	338-347
209.	39a	两亲性	358-364
210.	39a	两亲性	366-368
211.	39a	两亲性	376-378
212.	39a	两亲性	385-392
213.	39a	两亲性	413-416
214.	39a	两亲性	421-424
215.	39a	两亲性	429-438
216.	39a	两亲性	445-454
217.	39a	两亲性	456-458
218.	39a	两亲性	498-500

219.	39a	两亲性	512-520
220.	39a	两亲性	576-587
221.	39a	两亲性	589-600
222.	39a	两亲性	650-652
223.	39a	两亲性	670-674
224.	39a	抗原性指数	26-32
225.	39a	抗原性指数	35-45
226.	39a	抗原性指数	54-69
227.	39a	抗原性指数	79-84
228.	39a	抗原性指数	89-96
229.	39a	抗原性指数	103-110
230.	39a	抗原性指数	117-124
231.	39a	抗原性指数	152-154
232.	39a	抗原性指数	190-192
233.	39a	抗原性指数	222-231
234.	39a	抗原性指数	246-265
235.	39a	抗原性指数	292-295
236.	39a	抗原性指数	318-335
237.	39a	抗原性指数	353-362
238.	39a	抗原性指数	370-372
239.	39a	抗原性指数	402-404
240.	39a	抗原性指数	406-408
241.	39a	抗原性指数	419-421
242.	39a	抗原性指数	446-449
243.	39a	抗原性指数	453-460
244.	39a	抗原性指数	465-469
245.	39a	抗原性指数	476-487
246.	39a	抗原性指数	491-499
247.	39a	抗原性指数	505-514
248.	39a	抗原性指数	529-535
249.	39a	抗原性指数	557-567
250.	39a	抗原性指数	569-575
251.	39a	抗原性指数	577-580
252.	39a	抗原性指数	593-599
253.	39a	抗原性指数	603-619
254.	39a	抗原性指数	626-628
255.	39a	抗原性指数	634-637
256.	39a	抗原性指数	639-647
257.	39a	抗原性指数	655-658
258.	39a	抗原性指数	672-674
259.	39a	抗原性指数	677-686
260.	39a	抗原性指数	688-691
261.	39a	抗原性指数	693-699
262.	39a	抗原性指数	707-710
263.	39a	亲水性	28-32

264.	39a	亲水性	38-44
265.	39a	亲水性	54-69
266.	39a	亲水性	80-83
267.	39a	亲水性	89-95
268.	39a	亲水性	105-108
269.	39a	亲水性	117-119
270.	39a	亲水性	121-123
271.	39a	亲水性	152-154
272.	39a	亲水性	224-231
273.	39a	亲水性	247-265
274.	39a	亲水性	318-332
275.	39a	亲水性	357-361
276.	39a	亲水性	402-404
277.	39a	亲水性	406-408
278.	39a	亲水性	446-449
279.	39a	亲水性	454-459
280.	39a	亲水性	465-469
281.	39a	亲水性	476-487
282.	39a	亲水性	491-499
283.	39a	亲水性	506-514
284.	39a	亲水性	529-535
285.	39a	亲水性	560-567
286.	39a	亲水性	573-575
287.	39a	亲水性	577-580
288.	39a	亲水性	594-596
289.	39a	亲水性	605-607
290.	39a	亲水性	611-619
291.	39a	亲水性	634-637
292.	39a	亲水性	639-647
293.	39a	亲水性	672-674
294.	39a	亲水性	677-686
295.	39a	亲水性	688-690
296.	39a	亲水性	693-695
297.	40-1	两亲性	6-14
298.	40-1	两亲性	16-19
299.	40-1	两亲性	22-27
300.	40-1	两亲性	30-33
301.	40-1	两亲性	41-44
302.	40-1	两亲性	62-68
303.	40-1	两亲性	129-139
304.	40-1	两亲性	161-165
305.	40-1	两亲性	181-191
306.	40-1	两亲性	199-202
307.	40-1	两亲性	215-220
308.	40-1	两亲性	237-249

309.	40-1	两亲性	298-302
310.	40-1	两亲性	313-318
311.	40-1	两亲性	335-342
312.	40-1	两亲性	376-383
313.	40-1	两亲性	399-402
314.	40-1	两亲性	426-428
315.	40-1	两亲性	430-433
316.	40-1	两亲性	435-437
317.	40-1	两亲性	479-482
318.	40-1	两亲性	491-511
319.	40-1	两亲性	523-525
320.	40-1	两亲性	560-563
321.	40-1	抗原性指数	21-32
322.	40-1	抗原性指数	49-61
323.	40-1	抗原性指数	64-66
324.	40-1	抗原性指数	74-92
325.	40-1	抗原性指数	98-123
326.	40-1	抗原性指数	129-135
327.	40-1	抗原性指数	138-176
328.	40-1	抗原性指数	193-195
329.	40-1	抗原性指数	199-219
330.	40-1	抗原性指数	226-240
331.	40-1	抗原性指数	242-245
332.	40-1	抗原性指数	251-257
333.	40-1	抗原性指数	261-276
334.	40-1	抗原性指数	279-306
335.	40-1	抗原性指数	308-346
336.	40-1	抗原性指数	352-367
337.	40-1	抗原性指数	375-378
338.	40-1	抗原性指数	384-406
339.	40-1	抗原性指数	408-420
340.	40-1	抗原性指数	423-426
341.	40-1	抗原性指数	428-438
342.	40-1	抗原性指数	453-459
343.	40-1	抗原性指数	462-481
344.	40-1	抗原性指数	485-494
345.	40-1	抗原性指数	506-518
346.	40-1	抗原性指数	535-539
347.	40-1	抗原性指数	544-552
348.	40-1	抗原性指数	559-566
349.	40-1	抗原性指数	571-582
350.	40-1	亲水性	21-32
351.	40-1	亲水性	51-61
352.	40-1	亲水性	64-66
353.	40-1	亲水性	75-92

354.	40-1	亲水性	100-122
355.	40-1	亲水性	129-135
356.	40-1	亲水性	140-145
357.	40-1	亲水性	149-152
358.	40-1	亲水性	157-161
359.	40-1	亲水性	163-175
360.	40-1	亲水性	199-201
361.	40-1	亲水性	203-219
362.	40-1	亲水性	227-240
363.	40-1	亲水性	251-257
364.	40-1	亲水性	261-276
365.	40-1	亲水性	279-306
366.	40-1	亲水性	308-318
367.	40-1	亲水性	320-328
368.	40-1	亲水性	334-341
369.	40-1	亲水性	354-356
370.	40-1	亲水性	359-366
371.	40-1	亲水性	392-398
372.	40-1	亲水性	400-405
373.	40-1	亲水性	410-420
374.	40-1	亲水性	429-438
375.	40-1	亲水性	463-467
376.	40-1	亲水性	471-480
377.	40-1	亲水性	487-493
378.	40-1	亲水性	506-518
379.	40-1	亲水性	547-552
380.	40-1	亲水性	575-579
381.	40a	两亲性	6-10
382.	40a	两亲性	19-27
383.	40a	两亲性	30-33
384.	40a	两亲性	41-44
385.	40a	两亲性	61-72
386.	40a	两亲性	78-81
387.	40a	两亲性	92-94
388.	40a	两亲性	128-130
389.	40a	两亲性	132-134
390.	40a	两亲性	161-165
391.	40a	两亲性	181-193
392.	40a	两亲性	197-199
393.	40a	两亲性	204-211
394.	40a	两亲性	213-218
395.	40a	两亲性	227-229
396.	40a	两亲性	237-249
397.	40a	两亲性	298-302
398.	40a	两亲性	313-318

399.	40a	两亲性	335-342
400.	40a	两亲性	376-383
401.	40a	两亲性	399-402
402.	40a	两亲性	426-428
403.	40a	两亲性	435-437
404.	40a	两亲性	475-483
405.	40a	两亲性	492-512
406.	40a	两亲性	524-526
407.	40a	两亲性	561-564
408.	40a	抗原性指数	21-34
409.	40a	抗原性指数	50-64
410.	40a	抗原性指数	75-83
411.	40a	抗原性指数	88-97
412.	40a	抗原性指数	105-122
413.	40a	抗原性指数	129-134
414.	40a	抗原性指数	140-176
415.	40a	抗原性指数	190-207
416.	40a	抗原性指数	211-217
417.	40a	抗原性指数	224-240
418.	40a	抗原性指数	242-245
419.	40a	抗原性指数	250-255
420.	40a	抗原性指数	260-276
421.	40a	抗原性指数	279-306
422.	40a	抗原性指数	308-346
423.	40a	抗原性指数	352-367
424.	40a	抗原性指数	375-378
425.	40a	抗原性指数	384-406
426.	40a	抗原性指数	408-420
427.	40a	抗原性指数	423-438
428.	40a	抗原性指数	453-468
429.	40a	抗原性指数	471-481
430.	40a	抗原性指数	487-493
431.	40a	抗原性指数	507-519
432.	40a	抗原性指数	536-540
433.	40a	抗原性指数	545-553
434.	40a	抗原性指数	560-567
435.	40a	抗原性指数	572-583
436.	40a	亲水性	21-34
437.	40a	亲水性	50-64
438.	40a	亲水性	75-83
439.	40a	亲水性	88-96
440.	40a	亲水性	105-121
441.	40a	亲水性	129-134
442.	40a	亲水性	140-145
443.	40a	亲水性	148-155

444.	40a	亲水性	157-161
445.	40a	亲水性	163-175
446.	40a	亲水性	196-202
447.	40a	亲水性	211-217
448.	40a	亲水性	225-230
449.	40a	亲水性	232-240
450.	40a	亲水性	253-255
451.	40a	亲水性	261-276
452.	40a	亲水性	279-306
453.	40a	亲水性	308-318
454.	40a	亲水性	320-328
455.	40a	亲水性	334-341
456.	40a	亲水性	354-356
457.	40a	亲水性	359-366
458.	40a	亲水性	392-398
459.	40a	亲水性	400-405
460.	40a	亲水性	410-420
461.	40a	亲水性	428-438
462.	40a	亲水性	462-468
463.	40a	亲水性	472-481
464.	40a	亲水性	489-493
465.	40a	亲水性	507-519
466.	40a	亲水性	548-553
467.	40a	亲水性	576-580
468.	41-1	两亲性	30-36
469.	41-1	两亲性	93-98
470.	41-1	两亲性	111-122
471.	41-1	两亲性	126-129
472.	41-1	两亲性	136-143
473.	41-1	两亲性	145-150
474.	41-1	两亲性	156-158
475.	41-1	两亲性	186-195
476.	41-1	两亲性	201-208
477.	41-1	两亲性	213-223
478.	41-1	两亲性	236-247
479.	41-1	两亲性	250-255
480.	41-1	两亲性	273-282
481.	41-1	两亲性	303-309
482.	41-1	两亲性	311-314
483.	41-1	两亲性	329-338
484.	41-1	两亲性	344-362
485.	41-1	两亲性	372-377
486.	41-1	两亲性	385-392
487.	41-1	两亲性	409-412
488.	41-1	两亲性	419-426

489.	41-1	两亲性	458-463
490.	41-1	两亲性	470-474
491.	41-1	两亲性	486-489
492.	41-1	两亲性	512-518
493.	41-1	两亲性	527-551
494.	41-1	两亲性	564-579
495.	41-1	两亲性	593-597
496.	41-1	抗原性指数	13-22
497.	41-1	抗原性指数	30-38
498.	41-1	抗原性指数	43-55
499.	41-1	抗原性指数	73-75
500.	41-1	抗原性指数	87-89
501.	41-1	抗原性指数	105-112
502.	41-1	抗原性指数	114-124
503.	41-1	抗原性指数	136-141
504.	41-1	抗原性指数	147-153
505.	41-1	抗原性指数	163-166
506.	41-1	抗原性指数	174-184
507.	41-1	抗原性指数	195-207
508.	41-1	抗原性指数	226-236
509.	41-1	抗原性指数	244-246
510.	41-1	抗原性指数	249-265
511.	41-1	抗原性指数	281-287
512.	41-1	抗原性指数	294-313
513.	41-1	抗原性指数	317-342
514.	41-1	抗原性指数	350-375
515.	41-1	抗原性指数	379-386
516.	41-1	抗原性指数	390-396
517.	41-1	抗原性指数	413-422
518.	41-1	抗原性指数	425-430
519.	41-1	抗原性指数	436-440
520.	41-1	抗原性指数	446-465
521.	41-1	抗原性指数	468-495
522.	41-1	抗原性指数	498-518
523.	41-1	抗原性指数	520-522
524.	41-1	抗原性指数	525-542
525.	41-1	抗原性指数	547-558
526.	41-1	抗原性指数	565-590
527.	41-1	抗原性指数	595-602
528.	41-1	抗原性指数	608-619
529.	41-1	亲水性	14-21
530.	41-1	亲水性	30-33
531.	41-1	亲水性	45-55
532.	41-1	亲水性	87-89
533.	41-1	亲水性	106-111

534.	41-1	亲水性	114-120
535.	41-1	亲水性	122-124
536.	41-1	亲水性	136-141
537.	41-1	亲水性	148-150
538.	41-1	亲水性	177-184
539.	41-1	亲水性	195-207
540.	41-1	亲水性	226-234
541.	41-1	亲水性	249-265
542.	41-1	亲水性	285-287
543.	41-1	亲水性	294-297
544.	41-1	亲水性	299-313
545.	41-1	亲水性	317-321
546.	41-1	亲水性	323-342
547.	41-1	亲水性	350-371
548.	41-1	亲水性	379-386
549.	41-1	亲水性	417-422
550.	41-1	亲水性	425-427
551.	41-1	亲水性	447-449
552.	41-1	亲水性	459-462
553.	41-1	亲水性	468-475
554.	41-1	亲水性	479-482
555.	41-1	亲水性	484-491
556.	41-1	亲水性	499-518
557.	41-1	亲水性	520-522
558.	41-1	亲水性	526-542
559.	41-1	亲水性	550-558
560.	41-1	亲水性	568-590
561.	41-1	亲水性	595-598
562.	41-1	亲水性	617-619
563.	41a	两亲性	6-12
564.	41a	两亲性	32-34
565.	41a	两亲性	69-74
566.	41a	两亲性	86-98
567.	41a	两亲性	111-119
568.	41a	两亲性	121-126
569.	41a	两亲性	132-134
570.	41a	两亲性	155-160
571.	41a	两亲性	162-171
572.	41a	两亲性	177-184
573.	41a	两亲性	189-199
574.	41a	两亲性	212-223
575.	41a	两亲性	226-231
576.	41a	两亲性	249-258
577.	41a	两亲性	287-290
578.	41a	两亲性	305-314

579.	41a	两亲性	320-338
580.	41a	两亲性	348-353
581.	41a	两亲性	361-368
582.	41a	两亲性	385-388
583.	41a	两亲性	395-402
584.	41a	两亲性	434-439
585.	41a	两亲性	446-450
586.	41a	两亲性	462-467
587.	41a	两亲性	470-475
588.	41a	两亲性	488-494
589.	41a	两亲性	503-525
590.	41a	两亲性	540-555
591.	41a	两亲性	569-573
592.	41a	两亲性	578-594
593.	41a	抗原性指数	10-13
594.	41a	抗原性指数	19-31
595.	41a	抗原性指数	48-50
596.	41a	抗原性指数	63-65
597.	41a	抗原性指数	82-101
598.	41a	抗原性指数	112-117
599.	41a	抗原性指数	123-129
600.	41a	抗原性指数	139-142
601.	41a	抗原性指数	150-160
602.	41a	抗原性指数	171-183
603.	41a	抗原性指数	202-212
604.	41a	抗原性指数	220-222
605.	41a	抗原性指数	225-241
606.	41a	抗原性指数	257-263
607.	41a	抗原性指数	270-289
608.	41a	抗原性指数	293-318
609.	41a	抗原性指数	326-351
610.	41a	抗原性指数	355-362
611.	41a	抗原性指数	366-372
612.	41a	抗原性指数	389-398
613.	41a	抗原性指数	401-406
614.	41a	抗原性指数	412-416
615.	41a	抗原性指数	422-441
616.	41a	抗原性指数	444-446
617.	41a	抗原性指数	451-471
618.	41a	抗原性指数	475-494
619.	41a	抗原性指数	496-498
620.	41a	抗原性指数	501-518
621.	41a	抗原性指数	523-534
622.	41a	抗原性指数	540-566
623.	41a	抗原性指数	571-578

624.	41a	抗原性指数	582-595
625.	41a	亲水性	21-31
626.	41a	亲水性	63-65
627.	41a	亲水性	83-96
628.	41a	亲水性	98-100
629.	41a	亲水性	112-117
630.	41a	亲水性	124-126
631.	41a	亲水性	153-160
632.	41a	亲水性	171-183
633.	41a	亲水性	202-210
634.	41a	亲水性	220-222
635.	41a	亲水性	225-241
636.	41a	亲水性	261-263
637.	41a	亲水性	270-273
638.	41a	亲水性	275-289
639.	41a	亲水性	293-297
640.	41a	亲水性	299-318
641.	41a	亲水性	326-347
642.	41a	亲水性	355-362
643.	41a	亲水性	393-398
644.	41a	亲水性	401-403
645.	41a	亲水性	423-425
646.	41a	亲水性	435-438
647.	41a	亲水性	454-458
648.	41a	亲水性	460-471
649.	41a	亲水性	475-494
650.	41a	亲水性	496-498
651.	41a	亲水性	502-518
652.	41a	亲水性	527-534
653.	41a	亲水性	544-566
654.	41a	亲水性	571-574
655.	41a	亲水性	593-595
656.	44-1	两亲性	57-60
657.	44-1	两亲性	76-79
658.	44-1	抗原性指数	22-34
659.	44-1	抗原性指数	38-46
660.	44-1	抗原性指数	50-55
661.	44-1	抗原性指数	64-70
662.	44-1	抗原性指数	72-80
663.	44-1	抗原性指数	83-89
664.	44-1	抗原性指数	96-106
665.	44-1	抗原性指数	110-124
666.	44-1	亲水性	22-34
667.	44-1	亲水性	40-46
668.	44-1	亲水性	64-69

669.	44-1	亲水性	73-80
670.	44-1	亲水性	84-89
671.	44-1	亲水性	97-106
672.	44-1	亲水性	120-124
673.	44a	两亲性	57-60
674.	44a	两亲性	76-79
675.	44a	抗原性指数	23-34
676.	44a	抗原性指数	38-46
677.	44a	抗原性指数	50-55
678.	44a	抗原性指数	64-70
679.	44a	抗原性指数	72-80
680.	44a	抗原性指数	83-89
681.	44a	抗原性指数	96-106
682.	44a	抗原性指数	110-124
683.	44a	亲水性	28-34
684.	44a	亲水性	40-46
685.	44a	亲水性	64-69
686.	44a	亲水性	73-80
687.	44a	亲水性	84-89
688.	44a	亲水性	97-106
689.	44a	亲水性	120-124
690.	49-1	两亲性	16-21
691.	49-1	两亲性	44-48
692.	49-1	两亲性	56-61
693.	49-1	两亲性	92-97
694.	49-1	两亲性	118-127
695.	49-1	两亲性	130-149
696.	49-1	两亲性	156-178
697.	49-1	两亲性	235-240
698.	49-1	两亲性	253-264
699.	49-1	两亲性	268-271
700.	49-1	两亲性	278-285
701.	49-1	两亲性	287-292
702.	49-1	两亲性	298-300
703.	49-1	两亲性	328-337
704.	49-1	两亲性	343-350
705.	49-1	两亲性	355-365
706.	49-1	两亲性	378-389
707.	49-1	两亲性	422-424
708.	49-1	两亲性	442-450
709.	49-1	两亲性	464-481
710.	49-1	两亲性	486-496
711.	49-1	两亲性	514-521
712.	49-1	两亲性	548-551
713.	49-1	两亲性	553-557

714.	49-1	两亲性	562-568
715.	49-1	两亲性	573-575
716.	49-1	两亲性	588-590
717.	49-1	两亲性	603-605
718.	49-1	两亲性	614-618
719.	49-1	抗原性指数	15-21
720.	49-1	抗原性指数	26-43
721.	49-1	抗原性指数	50-59
722.	49-1	抗原性指数	61-75
723.	49-1	抗原性指数	79-87
724.	49-1	抗原性指数	98-108
725.	49-1	抗原性指数	110-120
726.	49-1	抗原性指数	122-139
727.	49-1	抗原性指数	147-164
728.	49-1	抗原性指数	171-179
729.	49-1	抗原性指数	185-197
730.	49-1	抗原性指数	214-216
731.	49-1	抗原性指数	229-231
732.	49-1	抗原性指数	248-266
733.	49-1	抗原性指数	278-283
734.	49-1	抗原性指数	289-295
735.	49-1	抗原性指数	316-326
736.	49-1	抗原性指数	337-349
737.	49-1	抗原性指数	368-378
738.	49-1	抗原性指数	386-388
739.	49-1	抗原性指数	390-410
740.	49-1	抗原性指数	412-414
741.	49-1	抗原性指数	423-429
742.	49-1	抗原性指数	438-454
743.	49-1	抗原性指数	462-475
744.	49-1	抗原性指数	482-500
745.	49-1	抗原性指数	503-509
746.	49-1	抗原性指数	521-528
747.	49-1	抗原性指数	540-562
748.	49-1	抗原性指数	572-579
749.	49-1	抗原性指数	590-606
750.	49-1	抗原性指数	610-612
751.	49-1	抗原性指数	617-619
752.	49-1	抗原性指数	626-634
753.	49-1	抗原性指数	637-640
754.	49-1	亲水性	18-21
755.	49-1	亲水性	26-29
756.	49-1	亲水性	31-43
757.	49-1	亲水性	51-57
758.	49-1	亲水性	64-68

759.	49-1	亲水性	79-87
760.	49-1	亲水性	98-107
761.	49-1	亲水性	122-125
762.	49-1	亲水性	147-164
763.	49-1	亲水性	172-175
764.	49-1	亲水性	187-197
765.	49-1	亲水性	229-231
766.	49-1	亲水性	256-262
767.	49-1	亲水性	264-266
768.	49-1	亲水性	278-283
769.	49-1	亲水性	290-292
770.	49-1	亲水性	319-326
771.	49-1	亲水性	337-349
772.	49-1	亲水性	368-376
773.	49-1	亲水性	386-388
774.	49-1	亲水性	390-410
775.	49-1	亲水性	412-414
776.	49-1	亲水性	423-429
777.	49-1	亲水性	441-451
778.	49-1	亲水性	466-472
779.	49-1	亲水性	484-490
780.	49-1	亲水性	492-494
781.	49-1	亲水性	496-498
782.	49-1	亲水性	522-528
783.	49-1	亲水性	543-562
784.	49-1	亲水性	591-606
785.	49-1	亲水性	617-619
786.	49-1	亲水性	626-632
787.	49-1	亲水性	637-640
788.	49a	两亲性	55-61
789.	49a	两亲性	92-97
790.	49a	两亲性	118-127
791.	49a	两亲性	129-135
792.	49a	两亲性	137-145
793.	49a	两亲性	156-178
794.	49a	两亲性	198-200
795.	49a	两亲性	235-240
796.	49a	两亲性	252-264
797.	49a	两亲性	277-285
798.	49a	两亲性	287-292
799.	49a	两亲性	298-300
800.	49a	两亲性	321-326
801.	49a	两亲性	328-337
802.	49a	两亲性	343-350
803.	49a	两亲性	355-365

804.	49a	两亲性	378-389
805.	49a	两亲性	392-397
806.	49a	两亲性	415-424
807.	49a	两亲性	453-456
808.	49a	两亲性	471-480
809.	49a	两亲性	486-504
810.	49a	两亲性	514-519
811.	49a	两亲性	527-534
812.	49a	两亲性	551-554
813.	49a	两亲性	561-568
814.	49a	两亲性	600-605
815.	49a	两亲性	612-616
816.	49a	两亲性	628-633
817.	49a	两亲性	636-641
818.	49a	两亲性	654-660
819.	49a	两亲性	669-691
820.	49a	两亲性	706-721
821.	49a	两亲性	735-739
822.	49a	两亲性	744-760
823.	49a	抗原性指数	4-23
824.	49a	抗原性指数	27-43
825.	49a	抗原性指数	51-62
826.	49a	抗原性指数	64-68
827.	49a	抗原性指数	72-75
828.	49a	抗原性指数	79-87
829.	49a	抗原性指数	98-108
830.	49a	抗原性指数	110-120
831.	49a	抗原性指数	124-139
832.	49a	抗原性指数	147-164
833.	49a	抗原性指数	176-179
834.	49a	抗原性指数	185-197
835.	49a	抗原性指数	214-216
836.	49a	抗原性指数	229-231
837.	49a	抗原性指数	248-267
838.	49a	抗原性指数	278-283
839.	49a	抗原性指数	289-295
840.	49a	抗原性指数	305-308
841.	49a	抗原性指数	316-326
842.	49a	抗原性指数	337-349
843.	49a	抗原性指数	368-378
844.	49a	抗原性指数	386-388
845.	49a	抗原性指数	391-407
846.	49a	抗原性指数	423-429
847.	49a	抗原性指数	436-455
848.	49a	抗原性指数	459-484

849.	49a	抗原性指数	492-517
850.	49a	抗原性指数	521-528
851.	49a	抗原性指数	532-539
852.	49a	抗原性指数	555-564
853.	49a	抗原性指数	567-572
854.	49a	抗原性指数	578-582
855.	49a	抗原性指数	588-607
856.	49a	抗原性指数	610-612
857.	49a	抗原性指数	617-637
858.	49a	抗原性指数	641-660
859.	49a	抗原性指数	662-664
860.	49a	抗原性指数	667-684
861.	49a	抗原性指数	689-700
862.	49a	抗原性指数	706-732
863.	49a	抗原性指数	737-744
864.	49a	抗原性指数	748-761
865.	49a	亲水性	4-23
866.	49a	亲水性	31-43
867.	49a	亲水性	51-53
868.	49a	亲水性	55-57
869.	49a	亲水性	64-68
870.	49a	亲水性	79-87
871.	49a	亲水性	98-106
872.	49a	亲水性	114-120
873.	49a	亲水性	130-139
874.	49a	亲水性	147-164
875.	49a	亲水性	187-197
876.	49a	亲水性	229-231
877.	49a	亲水性	249-262
878.	49a	亲水性	264-266
879.	49a	亲水性	278-283
880.	49a	亲水性	290-292
881.	49a	亲水性	319-326
882.	49a	亲水性	337-349
883.	49a	亲水性	368-376
884.	49a	亲水性	386-388
885.	49a	亲水性	391-407
886.	49a	亲水性	427-429
887.	49a	亲水性	436-439
888.	49a	亲水性	441-455
889.	49a	亲水性	459-463
890.	49a	亲水性	465-484
891.	49a	亲水性	492-513
892.	49a	亲水性	521-528
893.	49a	亲水性	559-564

894.	49a	亲水性	567-569
895.	49a	亲水性	589-591
896.	49a	亲水性	601-604
897.	49a	亲水性	620-624
898.	49a	亲水性	626-637
899.	49a	亲水性	641-660
900.	49a	亲水性	662-664
901.	49a	亲水性	668-684
902.	49a	亲水性	693-700
903.	49a	亲水性	710-732
904.	49a	亲水性	737-740
905.	49a	亲水性	759-761
906.	51-1	两亲性	15-21
907.	51-1	两亲性	40-54
908.	51-1	两亲性	75-86
909.	51-1	两亲性	108-110
910.	51-1	两亲性	112-124
911.	51-1	两亲性	141-148
912.	51-1	两亲性	184-189
913.	51-1	两亲性	211-216
914.	51-1	抗原性指数	58-65
915.	51-1	抗原性指数	123-127
916.	51-1	抗原性指数	132-137
917.	51-1	抗原性指数	149-153
918.	51-1	抗原性指数	165-177
919.	51-1	抗原性指数	198-204
920.	51-1	抗原性指数	222-231
921.	51-1	亲水性	60-65
922.	51-1	亲水性	123-127
923.	51-1	亲水性	132-135
924.	51-1	亲水性	165-174
925.	51-1	亲水性	200-203
926.	51-1	亲水性	222-227
927.	51a	两亲性	15-21
928.	51a	两亲性	40-54
929.	51a	两亲性	75-86
930.	51a	两亲性	108-110
931.	51a	两亲性	112-124
932.	51a	两亲性	141-148
933.	51a	两亲性	184-189
934.	51a	两亲性	211-216
935.	51a	亲水性	60-65
936.	51a	亲水性	123-127
937.	51a	亲水性	132-135
938.	51a	亲水性	165-174

939.	51a	亲水性	200-203
940.	51a	亲水性	222-227
941.	52-1	两亲性	48-50
942.	52-1	两亲性	64-73
943.	52-1	抗原性指数	19-26
944.	52-1	抗原性指数	30-35
945.	52-1	抗原性指数	42-52
946.	52-1	抗原性指数	57-86
947.	52-1	亲水性	22-26
948.	52-1	亲水性	30-35
949.	52-1	亲水性	42-52
950.	52-1	亲水性	57-71
951.	52-1	亲水性	78-86
952.	69-1	两亲性	25-27
953.	69-1	两亲性	46-66
954.	69-1	抗原性指数	32-41
955.	69-1	抗原性指数	43-45
956.	69-1	抗原性指数	71-78
957.	69-1	亲水性	32-38
958.	69-1	亲水性	71-78
959.	69a	两亲性	25-27
960.	69a	两亲性	46-66
961.	69a	抗原性指数	32-41
962.	69a	抗原性指数	43-46
963.	69a	抗原性指数	71-78
964.	69a	亲水性	32-38
965.	69a	亲水性	71-78
966.	77-1	两亲性	12-16
967.	77-1	两亲性	23-33
968.	77-1	两亲性	35-42
969.	77-1	两亲性	51-57
970.	77-1	两亲性	67-70
971.	77-1	两亲性	73-79
972.	77-1	两亲性	122-124
973.	77-1	两亲性	130-134
974.	77-1	两亲性	165-178
975.	77-1	两亲性	191-211
976.	77-1	抗原性指数	22-31
977.	77-1	抗原性指数	34-44
978.	77-1	抗原性指数	80-94
979.	77-1	抗原性指数	101-104
980.	77-1	抗原性指数	155-158
981.	77-1	抗原性指数	167-181
982.	77-1	亲水性	22-28
983.	77-1	亲水性	38-44

984.	77-1	亲水性	80-92
985.	77-1	亲水性	171-178
986.	77a	两亲性	8-15
987.	77a	两亲性	24-30
988.	77a	两亲性	40-43
989.	77a	两亲性	46-52
990.	77a	两亲性	95-97
991.	77a	两亲性	103-107
992.	77a	两亲性	114-125
993.	77a	两亲性	144-151
994.	77a	两亲性	154-156
995.	77a	两亲性	166-184
996.	77a	抗原性指数	7-17
997.	77a	抗原性指数	53-67
998.	77a	抗原性指数	74-77
999.	77a	抗原性指数	128-131
1000.	77a	抗原性指数	140-154
1001.	77a	亲水性	11-17
1002.	77a	亲水性	53-65
1003.	77a	亲水性	141-151
1004.	81-1	两亲性	30-40
1005.	81-1	两亲性	54-56
1006.	81-1	两亲性	60-63
1007.	81-1	两亲性	76-93
1008.	81-1	两亲性	96-101
1009.	81-1	两亲性	104-406
1010.	81-1	两亲性	118-126
1011.	81-1	两亲性	190-205
1012.	81-1	两亲性	230-233
1013.	81-1	两亲性	239-242
1014.	81-1	两亲性	256-258
1015.	81-1	两亲性	264-284
1016.	81-1	两亲性	290-297
1017.	81-1	两亲性	317-326
1018.	81-1	两亲性	388-396
1019.	81-1	两亲性	403-414
1020.	81-1	两亲性	458-463
1021.	81-1	两亲性	476-480
1022.	81-1	抗原性指数	1-4
1023.	81-1	抗原性指数	35-38
1024.	81-1	抗原性指数	86-89
1025.	81-1	抗原性指数	95-98
1026.	81-1	抗原性指数	100-103
1027.	81-1	抗原性指数	128-136
1028.	81-1	抗原性指数	154-174

1029.	81-1	抗原性指数	197-211
1030.	81-1	抗原性指数	220-226
1031.	81-1	抗原性指数	232-240
1032.	81-1	抗原性指数	244-249
1033.	81-1	抗原性指数	251-253
1034.	81-1	抗原性指数	255-258
1035.	81-1	抗原性指数	276-290
1036.	81-1	抗原性指数	292-301
1037.	81-1	抗原性指数	307-312
1038.	81-1	抗原性指数	318-323
1039.	81-1	抗原性指数	334-345
1040.	81-1	抗原性指数	352-358
1041.	81-1	抗原性指数	364-372
1042.	81-1	抗原性指数	376-384
1043.	81-1	抗原性指数	387-401
1044.	81-1	抗原性指数	409-417
1045.	81-1	抗原性指数	423-444
1046.	81-1	抗原性指数	452-459
1047.	81-1	抗原性指数	486-488
1048.	81-1	抗原性指数	490-499
1049.	81-1	抗原性指数	507-520
1050.	81-1	亲水性	1-4
1051.	81-1	亲水性	35-38
1052.	81-1	亲水性	95-98
1053.	81-1	亲水性	128-136
1054.	81-1	亲水性	154-164
1055.	81-1	亲水性	166-172
1056.	81-1	亲水性	202-209
1057.	81-1	亲水性	220-226
1058.	81-1	亲水性	234-238
1059.	81-1	亲水性	245-249
1060.	81-1	亲水性	251-253
1061.	81-1	亲水性	284-287
1062.	81-1	亲水性	292-299
1063.	81-1	亲水性	307-312
1064.	81-1	亲水性	321-323
1065.	81-1	亲水性	338-345
1066.	81-1	亲水性	366-368
1067.	81-1	亲水性	378-384
1068.	81-1	亲水性	387-401
1069.	81-1	亲水性	409-415
1070.	81-1	亲水性	453-459
1071.	81-1	亲水性	493-499
1072.	81-1	亲水性	507-509
1073.	81-1	亲水性	512-518

1074.	82a	两亲性	36-40
1075.	82a	两亲性	95-111
1076.	82a	两亲性	117-132
1077.	82a	两亲性	135-137
1078.	82a	两亲性	160-174
1079.	82a	两亲性	183-187
1080.	82a	抗原性指数	2-8
1081.	82a	抗原性指数	56-60
1082.	82a	抗原性指数	90-97
1083.	82a	抗原性指数	104-111
1084.	82a	抗原性指数	114-137
1085.	82a	抗原性指数	141-151
1086.	82a	抗原性指数	170-175
1087.	82a	抗原性指数	180-188
1088.	82a	抗原性指数	194-201
1089.	82a	抗原性指数	206-209
1090.	82a	抗原性指数	216-218
1091.	82a	亲水性	2-8
1092.	82a	亲水性	56-60
1093.	82a	亲水性	90-97
1094.	82a	亲水性	105-108
1095.	82a	亲水性	120-128
1096.	82a	亲水性	130-134
1097.	82a	亲水性	141-151
1098.	82a	亲水性	170-175
1099.	82a	亲水性	186-188
1100.	82a	亲水性	195-201
1101.	82a	亲水性	206-209
1102.	112-1	两亲性	6-8
1103.	112-1	两亲性	12-34
1104.	112-1	两亲性	45-53
1105.	112-1	两亲性	63-65
1106.	112-1	两亲性	70-82
1107.	112-1	两亲性	84-86
1108.	112-1	两亲性	107-109
1109.	112-1	两亲性	116-123
1110.	112-1	两亲性	183-186
1111.	112-1	两亲性	244-246
1112.	112-1	两亲性	248-258
1113.	112-1	两亲性	280-282
1114.	112-1	两亲性	302-313
1115.	112-1	抗原性指数	35-44
1116.	112-1	抗原性指数	57-61
1117.	112-1	抗原性指数	81-84
1118.	112-1	抗原性指数	91-98

1119.	112-1	抗原性指数	125-133
1120.	112-1	抗原性指数	140-147
1121.	112-1	抗原性指数	149-159
1122.	112-1	抗原性指数	161-165
1123.	112-1	抗原性指数	174-190
1124.	112-1	抗原性指数	192-200
1125.	112-1	抗原性指数	202-216
1126.	112-1	抗原性指数	218-224
1127.	112-1	抗原性指数	228-232
1128.	112-1	抗原性指数	239-244
1129.	112-1	抗原性指数	255-263
1130.	112-1	抗原性指数	290-300
1131.	112-1	亲水性	38-40
1132.	112-1	亲水性	57-61
1133.	112-1	亲水性	92-98
1134.	112-1	亲水性	125-133
1135.	112-1	亲水性	141-143
1136.	112-1	亲水性	150-159
1137.	112-1	亲水性	161-164
1138.	112-1	亲水性	175-190
1139.	112-1	亲水性	203-216
1140.	112-1	亲水性	218-224
1141.	112-1	亲水性	228-232
1142.	112-1	亲水性	239-244
1143.	112-1	亲水性	259-261
1144.	112-1	亲水性	293-297
1145.	112a	两亲性	6-8
1146.	112a	两亲性	12-34
1147.	112a	两亲性	47-54
1148.	112a	两亲性	63-65
1149.	112a	两亲性	69-72
1150.	112a	两亲性	84-86
1151.	112a	两亲性	89-91
1152.	112a	两亲性	107-109
1153.	112a	两亲性	116-123
1154.	112a	两亲性	183-186
1155.	112a	两亲性	244-246
1156.	112a	两亲性	248-258
1157.	112a	两亲性	280-282
1158.	112a	两亲性	302-310
1159.	112a	两亲性	321-336
1160.	112a	抗原性指数	35-44
1161.	112a	抗原性指数	57-61
1162.	112a	抗原性指数	81-84
1163.	112a	抗原性指数	91-98

1164.	112a	抗原性指数	125-133
1165.	112a	抗原性指数	140-147
1166.	112a	抗原性指数	150-158
1167.	112a	抗原性指数	161-164
1168.	112a	抗原性指数	174-190
1169.	112a	抗原性指数	194-200
1170.	112a	抗原性指数	202-216
1171.	112a	抗原性指数	218-220
1172.	112a	抗原性指数	222-224
1173.	112a	抗原性指数	228-232
1174.	112a	抗原性指数	239-244
1175.	112a	抗原性指数	256-263
1176.	112a	抗原性指数	290-301
1177.	112a	抗原性指数	351-356
1178.	112a	亲水性	38-40
1179.	112a	亲水性	57-61
1180.	112a	亲水性	93-98
1181.	112a	亲水性	125-133
1182.	112a	亲水性	141-143
1183.	112a	亲水性	150-155
1184.	112a	亲水性	161-164
1185.	112a	亲水性	175-190
1186.	112a	亲水性	203-216
1187.	112a	亲水性	218-220
1188.	112a	亲水性	222-224
1189.	112a	亲水性	228-232
1190.	112a	亲水性	239-244
1191.	112a	亲水性	259-261
1192.	112a	亲水性	293-297
1193.	112a	亲水性	351-356
1194.	114-1	两亲性	45-54
1195.	114-1	两亲性	154-160
1196.	114-1	两亲性	182-190
1197.	114-1	两亲性	224-226
1198.	114-1	两亲性	229-233
1199.	114-1	两亲性	285-287
1200.	114-1	两亲性	303-310
1201.	114-1	两亲性	321-332
1202.	114-1	两亲性	392-398
1203.	114-1	两亲性	413-416
1204.	114-1	两亲性	450-452
1205.	114-1	两亲性	477-487
1206.	114-1	两亲性	506-509
1207.	114-1	两亲性	525-529
1208.	114-1	两亲性	565-567

1209.	114-1	两亲性	614-621
1210.	114-1	两亲性	631-635
1211.	114-1	两亲性	770-774
1212.	114-1	两亲性	810-813
1213.	114-1	两亲性	847-849
1214.	114-1	两亲性	851-853
1215.	114-1	两亲性	875-879
1216.	114-1	两亲性	951-956
1217.	114-1	两亲性	975-980
1218.	114-1	两亲性	1034-1036
1219.	114-1	两亲性	1048-1051
1220.	114-1	两亲性	1073-1081
1221.	114-1	两亲性	1086-1090
1222.	114-1	两亲性	1095-1102
1223.	114-1	两亲性	1111-1115
1224.	114-1	两亲性	1163-1167
1225.	114-1	两亲性	1242-1245
1226.	114-1	两亲性	1275-1281
1227.	114-1	两亲性	1312-1317
1228.	114-1	两亲性	1338-1347
1229.	114-1	两亲性	1349-1355
1230.	114-1	两亲性	1357-1360
1231.	114-1	两亲性	1362-1365
1232.	114-1	两亲性	1376-1398
1233.	114-1	两亲性	1418-1421
1234.	114-1	两亲性	1425-1429
1235.	114-1	两亲性	1468-1473
1236.	114-1	两亲性	1476-1485
1237.	114-1	两亲性	1495-1515
1238.	114-1	两亲性	1518-1526
1239.	114-1	两亲性	1546-1555
1240.	114-1	两亲性	1557-1559
1241.	114-1	两亲性	1580-1583
1242.	114-1	两亲性	1585-1597
1243.	114-1	两亲性	1604-1606
1244.	114-1	两亲性	1613-1624
1245.	114-1	两亲性	1626-1630
1246.	114-1	两亲性	1638-1644
1247.	114-1	两亲性	1655-1660
1248.	114-1	两亲性	1662-1664
1249.	114-1	两亲性	1672-1674
1250.	114-1	两亲性	1677-1679
1251.	114-1	两亲性	1691-1694
1252.	114-1	两亲性	1713-1716
1253.	114-1	两亲性	1719-1729

1254.	114-1	两亲性	1735-1738
1255.	114-1	两亲性	1753-1757
1256.	114-1	两亲性	1772-1778
1257.	114-1	两亲性	1790-1792
1258.	114-1	两亲性	1817-1826
1259.	114-1	两亲性	1828-1832
1260.	114-1	两亲性	1840-1851
1261.	114-1	两亲性	1854-1856
1262.	114-1	两亲性	1871-1881
1263.	114-1	两亲性	1883-1896
1264.	114-1	两亲性	1922-1927
1265.	114-1	两亲性	1934-1946
1266.	114-1	两亲性	1950-1955
1267.	114-1	两亲性	1957-1964
1268.	114-1	抗原性指数	1-6
1269.	114-1	抗原性指数	10-16
1270.	114-1	抗原性指数	23-37
1271.	114-1	抗原性指数	41-55
1272.	114-1	抗原性指数	75-85
1273.	114-1	抗原性指数	91-97
1274.	114-1	抗原性指数	102-140
1275.	114-1	抗原性指数	147-156
1276.	114-1	抗原性指数	161-168
1277.	114-1	抗原性指数	172-174
1278.	114-1	抗原性指数	181-189
1279.	114-1	抗原性指数	196-203
1280.	114-1	抗原性指数	208-213
1281.	114-1	抗原性指数	220-229
1282.	114-1	抗原性指数	242-248
1283.	114-1	抗原性指数	251-266
1284.	114-1	抗原性指数	268-276
1285.	114-1	抗原性指数	295-307
1286.	114-1	抗原性指数	309-312
1287.	114-1	抗原性指数	318-340
1288.	114-1	抗原性指数	345-351
1289.	114-1	抗原性指数	357-366
1290.	114-1	抗原性指数	371-381
1291.	114-1	抗原性指数	385-392
1292.	114-1	抗原性指数	404-417
1293.	114-1	抗原性指数	419-432
1294.	114-1	抗原性指数	440-456
1295.	114-1	抗原性指数	464-468
1296.	114-1	抗原性指数	473-480
1297.	114-1	抗原性指数	482-488
1298.	114-1	抗原性指数	496-511

1299.	114-1	抗原性指数	515-530
1300.	114-1	抗原性指数	535-549
1301.	114-1	抗原性指数	555-560
1302.	114-1	抗原性指数	564-582
1303.	114-1	抗原性指数	588-596
1304.	114-1	抗原性指数	602-615
1305.	114-1	抗原性指数	617-620
1306.	114-1	抗原性指数	622-624
1307.	114-1	抗原性指数	628-632
1308.	114-1	抗原性指数	637-640
1309.	114-1	抗原性指数	647-654
1310.	114-1	抗原性指数	660-666
1311.	114-1	抗原性指数	668-688
1312.	114-1	抗原性指数	696-725
1313.	114-1	抗原性指数	730-733
1314.	114-1	抗原性指数	738-755
1315.	114-1	抗原性指数	760-766
1316.	114-1	抗原性指数	779-783
1317.	114-1	抗原性指数	786-799
1318.	114-1	抗原性指数	807-809
1319.	114-1	抗原性指数	811-819
1320.	114-1	抗原性指数	831-839
1321.	114-1	抗原性指数	845-857
1322.	114-1	抗原性指数	860-862
1323.	114-1	抗原性指数	864-868
1324.	114-1	抗原性指数	872-879
1325.	114-1	抗原性指数	883-891
1326.	114-1	抗原性指数	893-903
1327.	114-1	抗原性指数	908-916
1328.	114-1	抗原性指数	919-936
1329.	114-1	抗原性指数	941-947
1330.	114-1	抗原性指数	950-956
1331.	114-1	抗原性指数	959-976
1332.	114-1	抗原性指数	979-991
1333.	114-1	抗原性指数	993-1000
1334.	114-1	抗原性指数	1007-1022
1335.	114-1	抗原性指数	1041-1053
1336.	114-1	抗原性指数	1062-1068
1337.	114-1	抗原性指数	1075-1108
1338.	114-1	抗原性指数	1115-1121
1339.	114-1	抗原性指数	1126-1145
1340.	114-1	抗原性指数	1148-1152
1341.	114-1	抗原性指数	1156-1178
1342.	114-1	抗原性指数	1195-1206
1343.	114-1	抗原性指数	1208-1212

1344.	114-1	抗原性指数	1217-1243
1345.	114-1	抗原性指数	1246-1263
1346.	114-1	抗原性指数	1271-1282
1347.	114-1	抗原性指数	1284-1288
1348.	114-1	抗原性指数	1292-1295
1349.	114-1	抗原性指数	1299-1307
1350.	114-1	抗原性指数	1318-1328
1351.	114-1	抗原性指数	1330-1340
1352.	114-1	抗原性指数	1344-1359
1353.	114-1	抗原性指数	1367-1384
1354.	114-1	抗原性指数	1395-1399
1355.	114-1	抗原性指数	1405-1417
1356.	114-1	抗原性指数	1445-1449
1357.	114-1	抗原性指数	1491-1510
1358.	114-1	抗原性指数	1526-1529
1359.	114-1	抗原性指数	1532-1548
1360.	114-1	抗原性指数	1552-1556
1361.	114-1	抗原性指数	1560-1562
1362.	114-1	抗原性指数	1573-1583
1363.	114-1	抗原性指数	1594-1611
1364.	114-1	抗原性指数	1627-1635
1365.	114-1	抗原性指数	1643-1645
1366.	114-1	抗原性指数	1647-1665
1367.	114-1	抗原性指数	1680-1686
1368.	114-1	抗原性指数	1700-1722
1369.	114-1	抗原性指数	1724-1726
1370.	114-1	抗原性指数	1739-1746
1371.	114-1	抗原性指数	1752-1757
1372.	114-1	抗原性指数	1780-1783
1373.	114-1	抗原性指数	1791-1795
1374.	114-1	抗原性指数	1804-1808
1375.	114-1	抗原性指数	1829-1835
1376.	114-1	抗原性指数	1841-1859
1377.	114-1	抗原性指数	1867-1886
1378.	114-1	抗原性指数	1897-1903
1379.	114-1	抗原性指数	1908-1912
1380.	114-1	抗原性指数	1917-1922
1381.	114-1	抗原性指数	1926-1934
1382.	114-1	抗原性指数	1938-1945
1383.	114-1	抗原性指数	1947-1957
1384.	114-1	抗原性指数	1961-1968
1385.	114-1	抗原性指数	1974-1978
1386.	114-1	亲水性	4-6
1387.	114-1	亲水性	12-15
1388.	114-1	亲水性	23-34

1389.	114-1	亲水性	43-55
1390.	114-1	亲水性	76-85
1391.	114-1	亲水性	104-110
1392.	114-1	亲水性	118-123
1393.	114-1	亲水性	127-132
1394.	114-1	亲水性	147-154
1395.	114-1	亲水性	163-167
1396.	114-1	亲水性	185-187
1397.	114-1	亲水性	197-203
1398.	114-1	亲水性	208-211
1399.	114-1	亲水性	221-227
1400.	114-1	亲水性	243-245
1401.	114-1	亲水性	253-261
1402.	114-1	亲水性	263-266
1403.	114-1	亲水性	270-272
1404.	114-1	亲水性	295-301
1405.	114-1	亲水性	309-312
1406.	114-1	亲水性	320-328
1407.	114-1	亲水性	332-337
1408.	114-1	亲水性	345-351
1409.	114-1	亲水性	360-366
1410.	114-1	亲水性	371-378
1411.	114-1	亲水性	387-392
1412.	114-1	亲水性	404-415
1413.	114-1	亲水性	419-432
1414.	114-1	亲水性	441-450
1415.	114-1	亲水性	452-456
1416.	114-1	亲水性	473-480
1417.	114-1	亲水性	482-485
1418.	114-1	亲水性	496-500
1419.	114-1	亲水性	504-509
1420.	114-1	亲水性	515-520
1421.	114-1	亲水性	536-549
1422.	114-1	亲水性	555-560
1423.	114-1	亲水性	565-568
1424.	114-1	亲水性	570-579
1425.	114-1	亲水性	589-594
1426.	114-1	亲水性	602-604
1427.	114-1	亲水性	609-615
1428.	114-1	亲水性	617-620
1429.	114-1	亲水性	660-666
1430.	114-1	亲水性	668-680
1431.	114-1	亲水性	684-686
1432.	114-1	亲水性	699-708
1433.	114-1	亲水性	715-725

1434.	114-1	亲水性	730-733
1435.	114-1	亲水性	738-744
1436.	114-1	亲水性	746-754
1437.	114-1	亲水性	760-766
1438.	114-1	亲水性	789-793
1439.	114-1	亲水性	816-818
1440.	114-1	亲水性	831-836
1441.	114-1	亲水性	845-857
1442.	114-1	亲水性	860-862
1443.	114-1	亲水性	864-866
1444.	114-1	亲水性	873-879
1445.	114-1	亲水性	883-885
1446.	114-1	亲水性	887-889
1447.	114-1	亲水性	896-899
1448.	114-1	亲水性	908-916
1449.	114-1	亲水性	919-932
1450.	114-1	亲水性	941-947
1451.	114-1	亲水性	962-975
1452.	114-1	亲水性	979-989
1453.	114-1	亲水性	993-1000
1454.	114-1	亲水性	1007-1022
1455.	114-1	亲水性	1041-1043
1456.	114-1	亲水性	1045-1053
1457.	114-1	亲水性	1062-1068
1458.	114-1	亲水性	1075-1078
1459.	114-1	亲水性	1080-1087
1460.	114-1	亲水性	1089-1104
1461.	114-1	亲水性	1115-1121
1462.	114-1	亲水性	1126-1141
1463.	114-1	亲水性	1143-1145
1464.	114-1	亲水性	1148-1151
1465.	114-1	亲水性	1157-1178
1466.	114-1	亲水性	1197-1203
1467.	114-1	亲水性	1217-1243
1468.	114-1	亲水性	1246-1263
1469.	114-1	亲水性	1271-1273
1470.	114-1	亲水性	1275-1277
1471.	114-1	亲水性	1284-1288
1472.	114-1	亲水性	1299-1307
1473.	114-1	亲水性	1318-1326
1474.	114-1	亲水性	1334-1340
1475.	114-1	亲水性	1350-1355
1476.	114-1	亲水性	1357-1359
1477.	114-1	亲水性	1367-1384
1478.	114-1	亲水性	1407-1417

1479.	114-1	亲水性	1491-1510
1480.	114-1	亲水性	1534-1540
1481.	114-1	亲水性	1576-1583
1482.	114-1	亲水性	1595-1607
1483.	114-1	亲水性	1629-1635
1484.	114-1	亲水性	1643-1645
1485.	114-1	亲水性	1649-1665
1486.	114-1	亲水性	1682-1686
1487.	114-1	亲水性	1704-1722
1488.	114-1	亲水性	1724-1726
1489.	114-1	亲水性	1740-1746
1490.	114-1	亲水性	1804-1806
1491.	114-1	亲水性	1829-1835
1492.	114-1	亲水性	1842-1855
1493.	114-1	亲水性	1876-1879
1494.	114-1	亲水性	1898-1900
1495.	114-1	亲水性	1910-1912
1496.	114-1	亲水性	1920-1922
1497.	114-1	亲水性	1928-1930
1498.	114-1	亲水性	1938-1940
1499.	114-1	亲水性	1948-1954
1500.	114-1	亲水性	1962-1967
1501.	114a	两亲性	45-54
1502.	114a	两亲性	154-160
1503.	114a	两亲性	182-190
1504.	114a	两亲性	224-226
1505.	114a	两亲性	229-233
1506.	114a	两亲性	285-287
1507.	114a	两亲性	303-310
1508.	114a	两亲性	321-332
1509.	114a	两亲性	348-350
1510.	114a	两亲性	392-398
1511.	114a	两亲性	414-416
1512.	114a	两亲性	478-486
1513.	114a	两亲性	506-509
1514.	114a	两亲性	525-529
1515.	114a	两亲性	565-567
1516.	114a	两亲性	614-621
1517.	114a	两亲性	631-635
1518.	114a	两亲性	770-774
1519.	114a	两亲性	811-813
1520.	114a	两亲性	847-849
1521.	114a	两亲性	851-853
1522.	114a	两亲性	875-879
1523.	114a	两亲性	951-959

1524.	114a	两亲性	975-981
1525.	114a	两亲性	1034-1036
1526.	114a	两亲性	1048-1051
1527.	114a	两亲性	1073-1081
1528.	114a	两亲性	1086-1090
1529.	114a	两亲性	1095-1102
1530.	114a	两亲性	1111-1115
1531.	114a	两亲性	1163-1166
1532.	114a	两亲性	1275-1281
1533.	114a	两亲性	1312-1317
1534.	114a	两亲性	1338-1347
1535.	114a	两亲性	1349-1355
1536.	114a	两亲性	1357-1365
1537.	114a	两亲性	1376-1398
1538.	114a	两亲性	1418-1420
1539.	114a	两亲性	1455-1460
1540.	114a	两亲性	1472-1484
1541.	114a	两亲性	1497-1505
1542.	114a	两亲性	1507-1512
1543.	114a	抗原性指数	1-6
1544.	114a	抗原性指数	10-16
1545.	114a	抗原性指数	23-37
1546.	114a	抗原性指数	41-55
1547.	114a	抗原性指数	75-85
1548.	114a	抗原性指数	91-97
1549.	114a	抗原性指数	102-137
1550.	114a	抗原性指数	147-156
1551.	114a	抗原性指数	161-168
1552.	114a	抗原性指数	172-174
1553.	114a	抗原性指数	181-189
1554.	114a	抗原性指数	196-203
1555.	114a	抗原性指数	208-213
1556.	114a	抗原性指数	220-229
1557.	114a	抗原性指数	242-248
1558.	114a	抗原性指数	251-266
1559.	114a	抗原性指数	268-276
1560.	114a	抗原性指数	295-307
1561.	114a	抗原性指数	309-312
1562.	114a	抗原性指数	318-340
1563.	114a	抗原性指数	345-352
1564.	114a	抗原性指数	357-366
1565.	114a	抗原性指数	371-381
1566.	114a	抗原性指数	385-392
1567.	114a	抗原性指数	404-427
1568.	114a	抗原性指数	429-434

1569.	114a	抗原性指数	440-456
1570.	114a	抗原性指数	465-468
1571.	114a	抗原性指数	473-494
1572.	114a	抗原性指数	496-510
1573.	114a	抗原性指数	515-530
1574.	114a	抗原性指数	535-549
1575.	114a	抗原性指数	555-560
1576.	114a	抗原性指数	564-578
1577.	114a	抗原性指数	588-596
1578.	114a	抗原性指数	602-615
1579.	114a	抗原性指数	617-620
1580.	114a	抗原性指数	622-624
1581.	114a	抗原性指数	628-632
1582.	114a	抗原性指数	637-640
1583.	114a	抗原性指数	647-654
1584.	114a	抗原性指数	660-666
1585.	114a	抗原性指数	668-688
1586.	114a	抗原性指数	697-725
1587.	114a	抗原性指数	730-733
1588.	114a	抗原性指数	738-755
1589.	114a	抗原性指数	760-766
1590.	114a	抗原性指数	779-783
1591.	114a	抗原性指数	786-799
1592.	114a	抗原性指数	806-809
1593.	114a	抗原性指数	811-819
1594.	114a	抗原性指数	831-839
1595.	114a	抗原性指数	845-857
1596.	114a	抗原性指数	860-862
1597.	114a	抗原性指数	864-868
1598.	114a	抗原性指数	872-879
1599.	114a	抗原性指数	883-891
1600.	114a	抗原性指数	893-902
1601.	114a	抗原性指数	908-916
1602.	114a	抗原性指数	923-936
1603.	114a	抗原性指数	941-947
1604.	114a	抗原性指数	950-956
1605.	114a	抗原性指数	959-976
1606.	114a	抗原性指数	979-989
1607.	114a	抗原性指数	993-1000
1608.	114a	抗原性指数	1007-1022
1609.	114a	抗原性指数	1041-1053
1610.	114a	抗原性指数	1062-1068
1611.	114a	抗原性指数	1075-1108
1612.	114a	抗原性指数	1115-1121
1613.	114a	抗原性指数	1126-1145

1614.	114a	抗原性指数	1148-1152
1615.	114a	抗原性指数	1157-1176
1616.	114a	抗原性指数	1195-1206
1617.	114a	抗原性指数	1208-1212
1618.	114a	抗原性指数	1224-1243
1619.	114a	抗原性指数	1247-1263
1620.	114a	抗原性指数	1271-1282
1621.	114a	抗原性指数	1284-1288
1622.	114a	抗原性指数	1292-1295
1623.	114a	抗原性指数	1299-1307
1624.	114a	抗原性指数	1318-1328
1625.	114a	抗原性指数	1330-1340
1626.	114a	抗原性指数	1344-1359
1627.	114a	抗原性指数	1367-1384
1628.	114a	抗原性指数	1396-1399
1629.	114a	抗原性指数	1405-1417
1630.	114a	抗原性指数	1434-1436
1631.	114a	抗原性指数	1449-1451
1632.	114a	抗原性指数	1468-1487
1633.	114a	抗原性指数	1498-1503
1634.	114a	抗原性指数	1509-1515
1635.	114a	抗原性指数	1525-1532
1636.	114a	亲水性	4-6
1637.	114a	亲水性	12-15
1638.	114a	亲水性	23-34
1639.	114a	亲水性	43-55
1640.	114a	亲水性	75-85
1641.	114a	亲水性	104-110
1642.	114a	亲水性	118-123
1643.	114a	亲水性	127-132
1644.	114a	亲水性	147-154
1645.	114a	亲水性	163-167
1646.	114a	亲水性	185-187
1647.	114a	亲水性	197-203
1648.	114a	亲水性	208-211
1649.	114a	亲水性	221-227
1650.	114a	亲水性	243-245
1651.	114a	亲水性	253-261
1652.	114a	亲水性	263-266
1653.	114a	亲水性	270-272
1654.	114a	亲水性	295-301
1655.	114a	亲水性	309-312
1656.	114a	亲水性	320-328
1657.	114a	亲水性	332-337
1658.	114a	亲水性	345-351

1659.	114a	亲水性	360-366
1660.	114a	亲水性	371-378
1661.	114a	亲水性	387-392
1662.	114a	亲水性	404-417
1663.	114a	亲水性	421-423
1664.	114a	亲水性	425-427
1665.	114a	亲水性	442-456
1666.	114a	亲水性	473-488
1667.	114a	亲水性	499-509
1668.	114a	亲水性	515-520
1669.	114a	亲水性	536-549
1670.	114a	亲水性	555-560
1671.	114a	亲水性	565-568
1672.	114a	亲水性	570-578
1673.	114a	亲水性	589-594
1674.	114a	亲水性	602-604
1675.	114a	亲水性	609-615
1676.	114a	亲水性	617-620
1677.	114a	亲水性	660-665
1678.	114a	亲水性	668-680
1679.	114a	亲水性	684-686
1680.	114a	亲水性	699-708
1681.	114a	亲水性	715-725
1682.	114a	亲水性	730-733
1683.	114a	亲水性	738-744
1684.	114a	亲水性	746-754
1685.	114a	亲水性	760-766
1686.	114a	亲水性	789-793
1687.	114a	亲水性	816-818
1688.	114a	亲水性	831-836
1689.	114a	亲水性	845-857
1690.	114a	亲水性	860-862
1691.	114a	亲水性	864-866
1692.	114a	亲水性	873-879
1693.	114a	亲水性	883-885
1694.	114a	亲水性	887-889
1695.	114a	亲水性	896-899
1696.	114a	亲水性	908-916
1697.	114a	亲水性	923-932
1698.	114a	亲水性	941-947
1699.	114a	亲水性	961-975
1700.	114a	亲水性	979-989
1701.	114a	亲水性	993-1000
1702.	114a	亲水性	1007-1022
1703.	114a	亲水性	1041-1043

1704.	114a	亲水性	1045-1053
1705.	114a	亲水性	1062-1068
1706.	114a	亲水性	1075-1078
1707.	114a	亲水性	1080-1087
1708.	114a	亲水性	1089-1104
1709.	114a	亲水性	1115-1121
1710.	114a	亲水性	1126-1141
1711.	114a	亲水性	1143-1145
1712.	114a	亲水性	1148-1151
1713.	114a	亲水性	1158-1171
1714.	114a	亲水性	1197-1203
1715.	114a	亲水性	1224-1243
1716.	114a	亲水性	1251-1263
1717.	114a	亲水性	1271-1273
1718.	114a	亲水性	1275-1277
1719.	114a	亲水性	1284-1288
1720.	114a	亲水性	1299-1307
1721.	114a	亲水性	1318-1326
1722.	114a	亲水性	1334-1340
1723.	114a	亲水性	1350-1359
1724.	114a	亲水性	1367-1384
1725.	114a	亲水性	1407-1417
1726.	114a	亲水性	1449-1451
1727.	114a	亲水性	1469-1482
1728.	114a	亲水性	1484-1486
1729.	114a	亲水性	1498-1503
1730.	114a	亲水性	1510-1512
1731.	114a	亲水性	1527-1532
1732.	124-1	两亲性	37-43
1733.	124-1	两亲性	94-96
1734.	124-1	两亲性	113-115
1735.	124-1	抗原性指数	20-26
1736.	124-1	抗原性指数	38-43
1737.	124-1	抗原性指数	52-55
1738.	124-1	抗原性指数	62-70
1739.	124-1	抗原性指数	88-97
1740.	124-1	抗原性指数	104-114
1741.	124-1	抗原性指数	123-135
1742.	124-1	抗原性指数	146-155
1743.	124-1	亲水性	20-26
1744.	124-1	亲水性	41-43
1745.	124-1	亲水性	52-55
1746.	124-1	亲水性	63-69
1747.	124-1	亲水性	91-94
1748.	124-1	亲水性	104-114

1749.	124-1	亲水性	123-135
1750.	124-1	亲水性	146-155
1751.	124a	两亲性	19-21
1752.	124a	两亲性	23-29
1753.	124a	两亲性	37-43
1754.	124a	两亲性	94-96
1755.	124a	抗原性指数	38-43
1756.	124a	抗原性指数	52-55
1757.	124a	抗原性指数	62-70
1758.	124a	抗原性指数	77-80
1759.	124a	抗原性指数	90-96
1760.	124a	抗原性指数	105-115
1761.	124a	抗原性指数	120-135
1762.	124a	抗原性指数	145-153
1763.	124a	亲水性	41-43
1764.	124a	亲水性	52-55
1765.	124a	亲水性	63-69
1766.	124a	亲水性	91-95
1767.	124a	亲水性	108-115
1768.	124a	亲水性	120-135
1769.	124a	亲水性	146-153

应理解，本发明是仅通过实例如上进行描述的，可以在本发明的范围和精神内进行改动。

表 II

5 本发明在其范围内不包括包含 WO99/36544 中所公开的 45 种蛋白质序列中任一序列的蛋白质。如上所述，如果在 WO99/36544 中所公开的任一特定蛋白质序列的长度是 x 个氨基酸，那么本发明的抗原性片段具有该蛋白质的至多 $x-1$ 个氨基酸。对于 WO99/36544 中给出的 45 种蛋白质的每一种蛋白，在下表中给出了 x 的值，以供参考：

SEQ ID NO:	x	SEQ ID NO:	x	SEQ ID NO:	x	SEQ ID NO:	x
2	245	26	571	50	185	74	150
4	591	28	710	52	166	76	255
6	592	30	710	54	326	78	255
8	164	32	62	56	356	80	172
10	321	34	86	58	284	82	242
12	321	36	92	60	1978	84	242
14	124	38	103	62	1532	86	183
16	124	40	85	64	593	88	155
18	173	42	78	66	129	90	153
20	640	44	78	68	319		
22	761	46	219	70	619		
24	111	48	212	72	595		