



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111423508 A

(43)申请公布日 2020.07.17

(21)申请号 202010241479.3

A61P 31/14(2006.01)

(22)申请日 2020.03.31

G01N 33/569(2006.01)

(71)申请人 江苏省疾病预防控制中心(江苏省
公共卫生研究院)

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区江苏路
172号

(72)发明人 张文帅 郭喜玲 焦永军 曾晓燕
朱凤才 朱宝立

(74)专利代理机构 北京预立生科知识产权代理
有限公司 11736

代理人 朱萍 孟祥斌

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/42(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

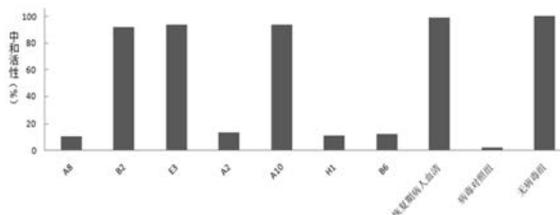
序列表14页 附图1页

(54)发明名称

一种分离的抗病毒感染的SARS-CoV-2蛋白
结合分子

(57)摘要

本发明公开了一种分离的抗病毒感染的
SARS-CoV-2蛋白结合分子,该结合分子是SARS-
CoV-2的S蛋白的单克隆抗体。该结合分子的重链
可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NOs:4、12、和
20,轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NOs:
8、16、和24。本发明的结合分子能够与SARS-CoV-
2的S蛋白特异性结合并能中和SARS-CoV-2从而
发挥抗病毒作用。



1. 一种分离的抗病毒感染的SARS-CoV-2蛋白结合分子,其特征在于,所述结合分子包括:

重链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NOs:1、9、和17的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

重链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NOs:2、10、和18的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

重链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NOs:3、11、和19的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

轻链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NOs:5、13、和21的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

轻链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NOs:6、14、和22的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

轻链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NOs:7、15、和23的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的结合分子,其特征在于,所述结合分子包括:

重链可变区,其包含与选自SEQ ID NOs:4、12、和20的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列;

轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NOs:8、16、和24的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的结合分子,其特征在于,所述结合分子包括嵌合、人源化或全人源抗体或其部分;优选地,所述抗体的部分包括Fab、F(ab')₂、Fv片段、或scFv。

4. 编码权利要求1-3中任一项所述的结合分子的核酸;优选地,所述核酸序列如SEQ ID NOs:25-48所示。

5. 包含权利要求4所述的核酸的重组载体。

6. 包含权利要求4所述的核酸或权利要求5所述的重组载体的宿主细胞。

7. 组合物或检测产品,其包含权利要求1-3中任一项所述的结合分子。

8. 一种非诊断目的的检测SARS-CoV-2病毒的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 获取含有SARS-CoV-2病毒的样品;

(2) 将步骤(1)获取的样品与权利要求1-3中任一项所述的结合分子接触;

(3) 检测样品与权利要求1-3中任一项所述的结合分子的结合情况。

9. 权利要求1-3中任一项所述的结合分子的应用,所述应用包括以下任一项:

(1) 在制备权利要求7所述的组合物或检测产品中的作用;

(2) 在制备调节SARS-CoV-2活性或水平的药物中的应用;

(3) 在制备中和SARS-CoV-2毒力的药物中的应用;

(4) 在制备抗SARS-CoV-2感染的药物中的应用;

(5) 在制备治疗由SARS-CoV-2感染导致的疾病的药物中的应用。

10. 权利要求7所述的组合物的应用,所述应用包括以下任一项:

(1) 在制备调节SARS-CoV-2活性或水平的药物中的应用;

- (2) 在制备中和SARS-CoV-2毒力的药物中的应用；
- (3) 在制备抗SARS-CoV-2感染的药物中的应用；
- (4) 在制备治疗由SARS-CoV-2感染导致的疾病的药物中的应用。

一种分离的抗病毒感染SARS-CoV-2蛋白结合分子

技术领域

[0001] 本发明属于抗病毒治疗、分子免疫学领域,涉及一种分离的抗病毒感染SARS-CoV-2蛋白结合分子,所述结合分子是针对蛋白的特异性抗体。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019,COVID-19),简称“新冠肺炎”,是由SARS-CoV-2感染导致的肺炎,呼吸道飞沫传播是主要传播途径,在相对封闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶情况下存在经气溶胶传播的可能,其他传播途径尚待明确;人群普遍易感,潜伏期1~14d,一般为3~7d。临床类型包括无症状感染者、轻型、普通型、重型和危重型,老年及有基础疾病病例预后较差,儿童病例症状相对较轻。截至2020年3月25日17时,我国累计报告确诊病例81896例,累计死亡病例3287例;国外累计报告确诊病例342244例,累计死亡病例15747例,COVID-19已对全球人类健康构成了严重威胁。

[0003] 新型冠状病毒肺炎的病原SARS-CoV-2为冠状病毒科β病毒属,是线性正链RNA病毒,研究发现,SARS-CoV-2在进化树的位置上,与SARS-CoV、类SARS-CoV的类群相邻,新型冠状病毒有4种主要的结构蛋白:刺突蛋白(spike protein,S蛋白),核衣壳蛋白(nucleocapsid,N蛋白),膜蛋白(membrane protein,M蛋白),包膜蛋白(envelope protein,E蛋白)。S蛋白含有两个亚基,S1和S2,S1包括N-末端域和C-末端RBD域。中和抗体(Neutralizing Antibody)是一种可通过中和或抑制病原体(例如病毒)的生物学活性来保护细胞免受侵害的治疗性抗体。研究表明,SARS-CoV-2-S-RBD与人ACE2互作进而感染人的呼吸道上皮细胞,对于病毒感染起到重要作用,是宿主中和抗体的重要作用位点以及疫苗设计的关键靶点。COVID-19传播迅速、疫情紧急,目前尚无有效的疫苗用于预防,人感染了SARS-CoV-2,亦无特效药用于临床,主要以对症治疗为主。而作为疫苗和化学治疗的补充,由抗体介导的预防和治疗病毒感染的措施已显现良好的效果,其应用前景得到专家的认同。目前已经有将COVID-19患者康复后的血浆,输注给重症病人实现治愈的成功案例。但多抗血浆不仅来源有限,同时其临床应用也受到诸如难以质控、供受体血型不匹配、潜在的传染性因子等条件的限制,而人源化抗体对病原体具有高度的特异性,在安全性上有所保障;与痊愈病人血清相比,抗体可以通过工程化实现药物量产,从而保证临床大量应用。

[0004] 目前国内外尚没有上市的抗SARS-CoV-2的抗体,因此建立和发展具有自主知识产权的以抗体为基础的检测和诊治用品,对于多种相关性疾病的干预具有重要的现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种SARS-CoV-2蛋白结合分子,所述结合分子通过中和SARS-CoV-2发挥抗病毒感染的作用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种分离的抗病毒感染的SARS-CoV-2蛋白结合分子,所述结合分子包括:

[0008] 重链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NOs:1、9、和17的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

[0009] 重链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NOs:2、10、和18的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

[0010] 重链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NOs:3、11、和19的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

[0011] 轻链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NOs:5、13、和21的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

[0012] 轻链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NOs:6、14、和22的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

[0013] 轻链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NOs:7、15、和23的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

[0014] 一优选的组合包括:

[0015] (a) 重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;

[0016] (b) 重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;

[0017] (c) 重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;

[0018] (d) 轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;

[0019] (e) 轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;和

[0020] (f) 轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0021] 另一优选的组合包括:

[0022] (a) 重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列;

[0023] (b) 重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;

[0024] (c) 重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;

[0025] (d) 轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;

[0026] (e) 轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;和

[0027] (f) 轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0028] 另一优选的组合包括:

[0029] (a) 重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0030] (b) 重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;

[0031] (c) 重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;

[0032] (d) 轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;

[0033] (e) 轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和

[0034] (f) 轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。

[0035] 进一步,本发明的结合分子包括:

[0036] 重链可变区,其包含与选自SEQ ID NOs:4、12、和20的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列;

[0037] 轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NOs:8、16、和24的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

[0038] 一优选的组合包括:

- [0039] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:4所示的所示的氨基酸序列;
- [0040] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:8所示的所示的氨基酸序列。
- [0041] 另一优选的组合包括:
- [0042] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:12所示的所示的氨基酸序列;
- [0043] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:16所示的所示的氨基酸序列。
- [0044] 另一优选的组合包括:
- [0045] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:20所示的所示的氨基酸序列;
- [0046] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:24所示的所示的氨基酸序列。
- [0047] 本发明的结合分子可以为例如全长抗体,或者,所述结合分子可以为抗体片段,诸如Fab或Fab'2片段,或单链抗体。
- [0048] 本发明还涵盖编码本发明的结合分子的核酸,以及包含此类核酸的重组载体和包含此类核酸或重组载体的宿主细胞。
- [0049] 重组载体的种类没有特别限定,可以使用通常使用的表达载体等。重组载体可以是直链状也可以是环状,可以是质粒等非病毒载体,也可以是病毒载体,还可以是基于转座子的载体。作为载体,例如可以举出病毒载体、质粒载体、附加型载体和人工染色体载体等。作为病毒载体,例如可以举出仙台病毒载体、逆转录病毒(包括慢病毒)载体,腺病毒载体、腺伴随病毒载体、疱疹病毒载体、痘苗病毒载体、痘病毒载体,脊髓灰质炎病毒载体、希尔比斯病毒载体、弹状病毒载体,副粘液病毒载体、正粘液病毒载体等。作为质粒载体,例如可举出pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等动物细胞表达用质粒载体。附加型载体是能够在染色体外进行自主复制的载体。作为附加型载体,例如可以举出包含来自EBV、SV40等的自主复制所需的序列作为载体要素的载体。作为自主复制所需的载体要素,具体而言,可以举出编码复制起始点和与复制起始点结合来控制复制的蛋白质的基因。例如,EBV可以举出复制起始点oriP与EBNA-1基因,SV40可以举出复制起始点ori和SV40LT基因。作为人工染色体载体,例如可举出YAC (Yeast artificial chromosome) 载体、BAC (Bacterial artificial chromosome) 载体、PAC (P1-derived artificial chromosome) 载体等。
- [0050] 可用于本发明的宿主细胞包括但不限于微生物,例如经含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌(E.coli)、枯草芽孢杆菌(B.subtilis));经含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母菌例如酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia));经含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;经重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(CaMV);烟草花叶病毒(TMV)感染的或经含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或携带含有来源于哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3细胞)。
- [0051] 本发明还提供了组合物,其含有本发明的结合分子。
- [0052] 所述组合物可以包括药物组合物、免疫缀合物、双特异性分子。
- [0053] 所述药物组合物包含本发明的结合分子,与药剂学可接受载体配制在一起。
- [0054] 本发明的药用组合物还可以以联合疗法施用,即联合其它药剂。
- [0055] 在用于本文时,“药剂学可接受载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细

菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、等等生理学相容的载体。优选的是,载体适于静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。

[0056] 本发明的药物化合物可以包含一种或多种药剂学可接受的盐。“药剂学可接受的盐”指这样一种盐,其保留亲本化合物的期望生物学活性且不产生任何不利的毒理学效果。此类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸,诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等等的盐,以及衍生自无毒有机酸,诸如脂肪族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等等的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属,诸如钠、钾、镁、钙等等的盐,以及衍生自无毒有机胺,诸如N,N'-二苄乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等等的盐。

[0057] 本发明的药物组合物还可以包含药剂学可接受的抗氧化剂。药剂学可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性的抗氧化剂,诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等等;(2)油溶性的抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT),卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等等;和(3)金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

[0058] 可以用于本发明的药物组合物的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)及其合适的混合物、植物油诸如橄榄油、和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。通过例如使用包衣材料诸如卵磷脂,通过在分散体的情况中保持期望颗粒大小,及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。

[0059] 这些组合物还可以包含佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌规程,见上文,及通过加入各种抗细菌和抗真菌剂,诸如对羟基苯甲酸酯类(paraben)、氯丁醇、酚、山梨酸等等,可以确保对微生物存在的预防。可能还希望向组合物中加入等渗剂,诸如糖类、氯化钠等等。此外,通过加入延迟吸收的药剂,诸如单硬脂酸铝和明胶,可以导致可注射药用形式的延长吸收。

[0060] 药剂学可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和药剂用于药剂学活性物质的用途是本领域已知的。除了任何常规介质或药剂都与活性化合物不相容的情况之外,设想了其在本发明的药物组合物中的用途。还可以向组合物中掺入补充性的活性化合物。

[0061] 治疗性组合物在生产和贮存条件下通常必须是无菌的和稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳液、脂质体、或适于高药物浓度的其它有序结构。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。例如通过使用涂层诸如卵磷脂,在分散体的情况中通过维持期望颗粒大小,及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在许多情况中,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖类、多元醇诸如甘露醇、山梨醇、或氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可以造成可注射组合物的延长吸收。

[0062] 缀合物包括本发明的结合分子和与所述结合分子化学缀合的可检测物质。通过将本发明的结合分子偶联到可检测物质可以促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、利用各种正电子发射断层扫描的正电子发射金属、以及非放射性的顺磁性金属离子。利用本领域已知的技术,可检测物质可以直接地与结合分子偶联或缀合,或经中间物(例如本领域已知的接头)间接地偶联或缀合。合适

的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素；合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、dichlorotriazinylamine 荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的实例包括鲁米诺；生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素、和水母发光蛋白；合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

[0063] 本发明的结合分子可以进行衍生化或连接至另一功能性分子上，例如另一种肽或蛋白质以生成与至少两种不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。本发明的结合分子事实上可以进行衍生化或连接至一个以上其它功能性分子以生成与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子；此类多特异性分子还意图为本文中所使用的术语“双特异性分子”所涵盖。为创建本发明的双特异性分子，可以将本发明的结合分子在功能上连接（例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式）至一种或多种其它结合分子，诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模仿物，从而产生双特异性分子。

[0064] 本发明的双特异性分子可以是包含单个单链抗体和结合决定簇的单链分子，或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可以包含至少两条单链分子。

[0065] 本发明提供了调控受试者免疫应答的方法，其包括给受试者施用本发明的结合分子，使得受试者中的免疫应答得到调控。优选的是，本发明的结合分子增强、刺激或增加受试者中的免疫应答。

[0066] 在另一方面，本发明提供了治疗SARS-CoV-2的方法，其包括给患者施用治疗有效量的本发明的结合分子。

[0067] 此外，本发明提供了增强受试者对SARS-CoV-2的免疫应答的方法，其包括给受试者施用：本发明的结合分子，使得受试者对SARS-CoV-2的免疫应答得到增强。

[0068] 术语“免疫应答”指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞，和由上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子（包括抗体、细胞因子和补体）的作用，其导致损害、破坏或消除侵袭人体的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性细胞，或在自身免疫或病理性炎症时的正常人细胞或组织。

[0069] 术语“抗体”在用于本文时包括完整的抗体及其任何抗原结合片段（即“抗原结合部分”）或单链。“抗体”指包含通过二硫键相互连接的至少两条重（H）链和两条轻（L）链的糖蛋白，或其抗原结合部分。抗体包括可变区和恒定区，重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白对宿主组织或因子的结合，其包括免疫系统的各种细胞（例如效应细胞）和经典补体系统的第一组分。

[0070] 术语抗体的“抗体部分”（也可成为抗原结合部分）在用于本文时指一个或多个保留了与抗原特异性结合的能力的抗体片段。已显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段行使。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括（i）Fab片段；（ii）F（ab'）₂片段，包含通过铰链区二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；（iii）Fd片段；（iv）Fv片段；（v）dAb片段；和（vi）分离的互补决定区。此外，虽然Fv片段的两个结构域由分开的基因编码，但是可以使用重组方法通过合成的接头将它们连接，从而使它们能够制备成单个蛋白链，其中VL和VH区配对形成单价分子（称为单链Fv（scFv））。此类单链抗体也意图涵盖在术语抗体的“抗体部分”中。这些抗体片段可使用本领域技术人员公知的常规技术获得，可以以与完整抗体相同的方式对片段筛选功用。

[0071] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指单一分子组合物的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物展现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0072] 术语“人源化抗体”意图指将源自另一哺乳动物物种,诸如小鼠种系的CDR序列嫁接到人框架序列上获得的抗体。可以在人框架序列中进行别的框架区修饰。

[0073] 术语“嵌合抗体”意图指可变区序列源自一种物种而恒定区序列源自另一种物种的抗体,诸如可变区序列源自小鼠抗体而恒定区序列源自人抗体的抗体。

[0074] 术语“治疗”指为了以统计学显著的方式治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进或影响疾患(例如疾病)、疾患的症状,或预防或延缓症状、并发症、生化指标的发作,或以其它方式阻滞或抑制疾病、疾患或病症的进一步发展而施用活性剂。

[0075] 在用于本文时,术语“受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0076] 本发明还提供了一种包括前面所述结合分子的检测产品。

[0077] 所述检测产品包括但不限于检测试剂、试剂盒、芯片或试纸。凡是包括前面所述结合分子的能够检测出SFTSV的检测产品均包括在本发明的范围之内。

[0078] 本发明还提供了一种非诊断目的的检测SARS-CoV-2的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

[0079] (1) 获取含有SARS-CoV-2的样品;

[0080] (2) 将步骤(1)获取的样品与前面所述的结合分子接触;

[0081] (3) 检测样品与结合分子的结合反应。

[0082] 本发明还提供了前面所述的结合分子的应用,所述应用包括以下任一项:

[0083] (1) 在制备前面所述的检测产品中的应用;

[0084] (2) 在制备前面所述的组合物中的应用;

[0085] (3) 在制备调节SARS-CoV-2活性或水平的药物中的应用;

[0086] (4) 在制备中和SARS-CoV-2毒力的药物中的应用;

[0087] (5) 在制备抗SARS-CoV-2感染的药物中的应用;

[0088] (6) 在制备治疗由SARS-CoV-2感染导致的疾病的药物中的应用。

[0089] 本发明还提供了前面所述的组合物的应用,所述应用包括以下任一项:

[0090] (1) 在制备调节SARS-CoV-2活性或水平的药物中的应用;

[0091] (2) 在制备中和SARS-CoV-2毒力的药物中的应用;

[0092] (3) 在制备抗SARS-CoV-2感染的药物中的应用;

[0093] (4) 在制备治疗由SARS-CoV-2感染导致的疾病的药物中的应用。

[0094] SARS-CoV-2感染导致的疾病包括新型冠状病毒肺炎。

附图说明

[0095] 图1显示利用Phage-ELISA鉴定抗SARS-CoV-2-S蛋白单链抗体的结合特异性的结果图;

[0096] 图2显示微量中和实验结果图。

具体实施方式

[0097] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0098] 实施例1抗SARS-CoV-2单链抗体的筛选

[0099] 一、病毒培养(所有操作均在BSL-3实验室中进行)

[0100] BetaCoV/JS03/human/2020毒株为专利申请者于2020年在一名江苏省COVID-19患者咽拭子中分离获得。该病毒经梯度稀释后接种Vero E6细胞,5%CO₂、37℃孵育,测定50%组织感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

[0101] 二、重组表达的SARS-CoV-2的S蛋白(SARS-CoV-2-S蛋白),商业购买,序列如SEQ ID NO:49所示。

[0102] 三、ScFv人源抗体文库构建和抗SARS-CoV-2-S蛋白单链抗体的筛选

[0103] 1、材料

[0104] 引物:根据《Phage Display》一书设计家族特异性轻链(V_K和V_L)、IgG重链(VH)和overlap-PCR引物,其中V_K12对、V_L24对、VH 6对、overlap-PCR 1对。

[0105] V_K正向引物:

[0106] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC-3' ;

[0107] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACYCAGTCTCC-3' ;

[0108] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGWTGACRCAGTCTCC-3' ;

[0109] V_K反向引物:

[0110] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATYTCCACCTTGGTCCC-3' ;

[0111] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3' ;

[0112] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC-3' ;

[0113] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATATCCACTTTGGTCCC-3' ;

[0114] V_L正向引物:

[0115] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGBTGACGACGCCCCCTC-3' ;

[0116] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCCTC-3' ;

[0117] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGT-3' ;

[0118] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAATCGCCCTC-3' ;

[0119] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCATGCTGACTCAGCCCCACTC-3' ;

[0120] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGGTGACYCAGGAGCCMTC-3' ;

[0121] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCTTC-3' ;

[0122] 5' -GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGGGCAGACTCAGCAGCTCTC-3' ;

[0123] V_L反向引物:

[0124] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCTAGGACGGTCASCTTGGTS-3' ;

[0125] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCTAAAATGATCAGCTGGGTT-3' ;

[0126] 5' -GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCGAGGACGGTCAGCTSSGTS-3' ;

- [0127] VH正向引物:
- [0128] 5' -GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGGGCGGTGGCTCGGGC-3' ;
- [0129] 5' -GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGG-3' ;
- [0130] 5' -GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGTGGCGGTGGCTCGGGC-3' ;
- [0131] 5' -GGTGGTTCCTCTGATCTTCCTCCTCGGTGGCGGTGGCTCGGGCG-3' ;
- [0132] 5' -GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGC-3' ;
- [0133] 5' -GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGTCGGGC-3' ;
- [0134] VH反向引物:
- [0135] 5' -CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACCGATGGGCCCTTGGTGGAR-3' ;
- [0136] overlap-PCR正向引物:
- [0137] 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC-3' ;
- [0138] overlap-PCR反向引物:
- [0139] 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGCCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTG-3' ;
- [0140] 2、方法
- [0141] 2.2.1外周血淋巴细胞的分离及总RNA提取
- [0142] 将2名COVID-19患者恢复期外周血分别与等量的生理盐水混合后按照淋巴细胞分离液说明书吸取单个核细胞,生理盐水洗涤三次后参照总RNA抽提试剂盒说明抽提RNA。
- [0143] 2.2.2抗体可变区基因的PCR扩增
- [0144] 将抽提的2份总RNA混合后反转录出cDNA第一链,反转录条件如下:55℃30min,85℃5min,4℃30min。再以cDNA为模板PCR扩增人源性抗体V_κ、V_λ和VH基因,PCR反应条件为:94℃预变性10min,然后94℃20s,57℃45s,72℃1min,25个循环,最后72℃延伸20min,凝胶电泳并切胶纯化回收。
- [0145] 2.2.3 ScFv基因的拼接
- [0146] 将纯化的V_κ基因片段与V_λ基因片段等摩尔混合后再与VH基因片段等量混合,利用overlap-PCR拼接scFv基因,overlap-PCR反应条件为:94℃预变性10min,然后94℃20s,57℃45s,72℃1min,25个循环,最后72℃延伸20min,凝胶电泳并切胶纯化回收。
- [0147] 2.2.4噬菌体单链抗体文库的构建及质量鉴定
- [0148] 纯化后的scFv基因与pComb3XSS质粒分别经sfiI酶切,连接胶纯化回收后的目的片段,转入感受态大肠杆菌XL1-Blue,加入20mL 2YT培养液中37℃培养45min后离心,沉淀涂于2YT平板30℃过夜培养。次日将平板上生长的菌苔全部收集于2YT培养基中,37℃培养至OD600为0.8。加入终浓度为1×10⁹PFU/mL的辅助噬菌体VCSM13 37℃培养1h。加入终浓度为50μg/mL的卡纳霉素,37℃继续培养8h,900g离心20min弃沉淀,于上清中加入5×PEG/NaCl,混匀后置于冰上6h,900g离心45min,把沉淀重悬于3mL的PBS中,过0.22μm的滤膜,滤液即为源性噬菌体单链抗体文库,同时计算文库库容和多样性。
- [0149] 2.2.5抗SARS-CoV-2-S蛋白特异性单链抗体的筛选
- [0150] 取200μL扩增后的噬菌体文库与固相化包被的SARS-CoV-2-S蛋白共同孵育,进行4轮“吸附-洗脱-扩增”亲和筛选,取第4轮洗脱液感染对数生长期的大肠杆菌XL1-Blue后,涂布2×YT培养板,37℃培养过夜,随机挑取100个单菌落分别接种96孔深孔板(含100μg/mL氨苄青霉素、12.5μg/mL四环素和1g/mL葡萄糖),37℃过夜振荡培养,次日1:10分别接种到新

96孔深孔板(含100 μ g/mL氨苄青霉素和30 μ g/mL四环素)中37 $^{\circ}$ C振摇培养6h,加入辅助噬菌体VCSM13(终浓度为 1×10^9 PFU/mL),37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入卡纳霉素(终浓度为50 μ g/mL)30 $^{\circ}$ C过夜振摇培养制备成噬菌体单链抗体,用0.1 μ g/孔SARS-CoV-2-S蛋白包被酶标板,二抗是用PBS缓冲液(含5g/mL脱脂奶粉)按1:2000稀释的HRP标记抗M13抗体,进行Phage-ELISA鉴定并测定OD450值,当Positive/Negative ≥ 2.1 时定为阳性,阳性克隆的菌液送商业公司测序。

[0151] 3、结果

[0152] 以SARS-CoV-2-S蛋白为抗原对人源化SARS-CoV-2单链抗体文库进行了4轮亲和筛选,抗SARS-CoV-2-S蛋白特异性单链抗体得到了选择性富集,产出/投入比值提高了近40倍(表1)。随机挑取100个噬菌体单克隆进行Phage-ELISA试验并测定OD450值,结果显示有20个单链抗体与SARS-CoV-2-S蛋白能特异性结合(图1)。20个阳性克隆菌液经测序分析,获得7种不同氨基酸序列的scFv抗体,分别命名为B2、E3、A2、A10、H1、A8和B6。

[0153] B2抗体的重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:25所示;重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示;重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:27所示。轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:29所示;轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:30所示;轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:31所示。重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:28所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:32所示。

[0154] A10抗体的重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:33所示;重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:34所示;重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:35所示。轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:37所示;轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:38所示;轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:39所示。重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:36所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:40所示。

[0155] E3抗体的重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:41所示;重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:42所示;重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:43所示。轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:45所示;轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:46所示;轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:47所示。重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:44所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:48所示。

[0156] 表1亲和筛选对抗SARS-CoV-2-S蛋白特异性ScFv抗体的富集效应

	筛选轮数	投入scFv的滴度(PFU)	产出scFv的滴度(PFU)	产出/投入
[0157]	第一轮	2.8×10^{12}	4.2×10^5	1.50×10^{-7}
	第二轮	2.1×10^{12}	5.9×10^5	2.81×10^{-7}
[0158]	第三轮	1.6×10^{12}	7.2×10^5	4.50×10^{-7}
	第四轮	1.2×10^{12}	7.1×10^6	5.92×10^{-6}

[0159] 实施例2筛选获得的单链抗体的中和活性检测

[0160] 7个scFv单抗克隆微量中和实验(所有操作均在BSL-3实验室中进行)。

[0161] 1、噬菌体抗体的制备

[0162] 分别挑取Phage-ELISA实验阳性的7种单菌落至2ml 2×YT培养基(含100μg/mL氨苄青霉素、12.5μg/mL四环素和1g/mL葡萄糖)中,37℃过夜振摇培养,次日1:10分别接种到10ml 2×YT培养基(含100μg/mL氨苄青霉素和30μg/mL四环素)中37℃振摇培养6h,加入辅助噬菌体VCSM13(终浓度为 1×10^9 PFU/mL),37℃孵育1h,加入卡纳霉素(终浓度为50μg/mL)30℃过夜振摇培养后900g离心30分钟,弃沉淀,于上清中加入5×PEG/NaCl,混匀后置于冰上6小时,900g离心30min,弃上清,用1mlPBS重悬沉淀后900g离心30min,将上清加入透析袋中在PBS缓冲液中透析3天过0.22μm的滤膜后4℃保存。

[0163] 2、微量中和实验操作

[0164] (1) Vero细胞接种于96孔板,培养至对数生长期。

[0165] (2) 将50TCID₅₀病毒(共50μl)与等体积噬菌体抗体混匀,37℃孵育1h。

[0166] (3) 把抗原抗体复合物100μl加入细胞培养孔中,设置复孔,同时设置阳性对照组(康复期病人血清)、阴性对照组(2×YT培养基)和空白对照组(只有细胞,没有病毒)。

[0167] (4) 细胞培养物置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养5天,每天观察细胞病变(Cytopathic effect,CPE)。对于能抑制大于50% CPE出现的单抗被认为具有中和抑制作用。

[0168] 3、结果

[0169] 实验结果显示,7种ScFv单抗中B2、A10和E3对SARS-CoV-2具有中和抑制作用(图2)。

[0170] 虽然以上仅描述了本发明的具体实施方式范例,但是本领域的技术人员应当理解,这些仅是举例说明,本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下,可以对这些实施方式做出多种变更或修改,但这些变更或修改均落入本发明的保护范围。

50	55	60													
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Val	Gly	Glu	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Asp	Val
			100					105						110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115						120							

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 5
 Asn Ile Gly Ser Lys Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 6
 Asp Asp Ser
 1
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 7
 Gln Leu Trp Asp Gly Ser Ser Asp Arg Ala Ile
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 8
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Ser Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

<400> 19

Ala Arg His Asn Ala Gln Phe Gly Glu Leu Leu Val Pro Gln Asp Ala
1 5 10 15

Phe Asp Met

<210> 20

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Met Ser Lys Asp Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Asn Ala Gln Phe Gly Glu Leu Leu Val Pro Gln Asp Ala
 100 105 110

Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Pro Thr Ser Pro Lys Val Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln
 130 135 140

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 21

Gln Gln Ile Ser Asn Trp
1 5

<210> 22

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 22

attagttgga atggtggtat cata 24
<210> 27
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 27
gcgaaagttg gcgaagtggg tagtagggag tggagtgctt ttgatgtc 48
<210> 28
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 28
caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt cggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atggtggtat cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggcctat attactgtgc gaaagttggc 300
gaagtgggta gtagggagtg gagtgctttt gatgtctggg gccaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 29
aacattggaa gtaaaagt 18
<210> 30
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 30
gatgatagc 9
<210> 31
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 31
cagctgtggg atggaagcag tgatcgtgcc ata 33
<210> 32
<211> 387

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 32

ctgcctgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgacct caggacagac ggccaggatt 60
 acctgtgggg gaagcaacat tggagtaaa agtgtgacct ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggccccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc acctgacca tcagcggagt tgaggccggg 240
 gatgaggccg actattactg tcagctgtgg gatggaagca gtgatcgtgc catattcggg 300
 ggagggacga agctggccgt cttaggtcag cccaaggctg ccccctcggc ggccgcagaa 360
 caaaaactca tctcagagga agatctg 387

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 33

ggttacagct ttaacaaata tggc 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 34

atgaacccta acagtggtaa caca 24

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 35

gcgagaggcg gtaacggggg tatggacgtc 30

<210> 36

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 36

caggtgcagc tggcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaaga cttctggta cagcttaac aaatatggca tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gacttgagt gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggcgtt 300
 aacgggggta tggacgtctg gggccaaggc acctggtca cegtctctc a 351

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 37
agctccaaca tcgaaataa tctt 24
<210> 38
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 38
tatgatgat 9
<210> 39
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 39
gcggcatggg atgacatcct gagtgttat gtc 33
<210> 40
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 40
tcctatgagc tgactcagcc accctcggcg tctggggccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatcttg ttaactggta ccagcagctc 120
ccaggaaaga ctcccagact cctcatctat tatgatgata tcgtggcctc aggggtctct 180
gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgcg gcatgggatg acatcctgag tgcttatgtc 300
ttcggacctg ggaccaaggt caccgtcctg agtcagccca aggccgcccc ctcggcggcc 360
gcagaacaaa aactcatctc agaggaagat ctg 393
<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 41
ggtgactcca tcagcagtag caactgg 27
<210> 42
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 42
atctatcata gtgggagcac c 21
<210> 43
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 43
gcgagacata acgcgcaatt cggggaatta ttggttcac aggatgcatt tgatatg 57
<210> 44
<211> 423
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 44
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggggac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctctggtga ctccatcagc agtagcaact ggtggagttg ggtccgccag 120
ccccaggga aggggctgga gtggattggg gaaatctatc atagtgggag caccaactac 180
aaccctccc tcaagagccg agtcaccata tcagtagaca tgtccaagga ccagttctcc 240
ctgaagctga gctctgtgac cgccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacataac 300
gcgcaattcg ggaattatt ggttcacag gatgcatttg atatgtgggg ccaggggaca 360
atggtcaccg tctcttcagc atccccgacc agccccaagg tcaactagtgg ccaggccggc 420
cag 423
<210> 45
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 45
cagcagatta gtaactgg 18
<210> 46
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 46
gatgcctcc 9
<210> 47
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 47

caacagtaca gtaattatcc tccgtggacg 30
 <210> 48
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 48
 gagctccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gcagattagt aactggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgat gctccagtt tggaaactgg ggtcccgtca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa tteactetca ccatcagcag cctgcaggct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tacagtaatt atcctccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca agctggagat caaa 324
 <210> 49
 <211> 693
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 49
 Met Phe Leu Leu Thr Thr Lys Arg Thr Met Phe Val Phe Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln
 20 25 30
 Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro
 35 40 45
 Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu His Ser Thr Gln Asp Leu Phe
 50 55 60
 Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp Phe His Ala Ile His Val Ser
 65 70 75 80
 Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn
 85 90 95
 Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly
 100 105 110
 Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile
 115 120 125
 Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe
 130 135 140
 Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser
 145 150 155 160
 Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr
 165 170 175

Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln
 180 185 190
 Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly
 195 200 205
 Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp
 210 215 220
 Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile
 225 230 235 240
 Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser
 245 250 255
 Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr
 275 280 285
 Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro
 290 295 300
 Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly
 305 310 315 320
 Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val
 325 330 335
 Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn
 340 345 350
 Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser
 355 360 365
 Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser
 370 375 380
 Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys
 385 390 395 400
 Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val
 405 410 415
 Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr
 420 425 430
 Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn
 435 440 445
 Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu
 450 455 460
 Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu
 465 470 475 480
 Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn

	485		490		495
Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val					
	500		505		510
Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His					
	515		520		525
Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys					
	530		535		540
Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val					
545		550		555	560
Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg					
	565		570		575
Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu					
	580		585		590
Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr					
	595		600		605
Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val					
	610		615		620
Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro					
625		630		635	640
Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala					
	645		650		655
Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp					
	660		665		670
Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn					
	675		680		685
Ser Pro Arg Arg Ala					
	690				

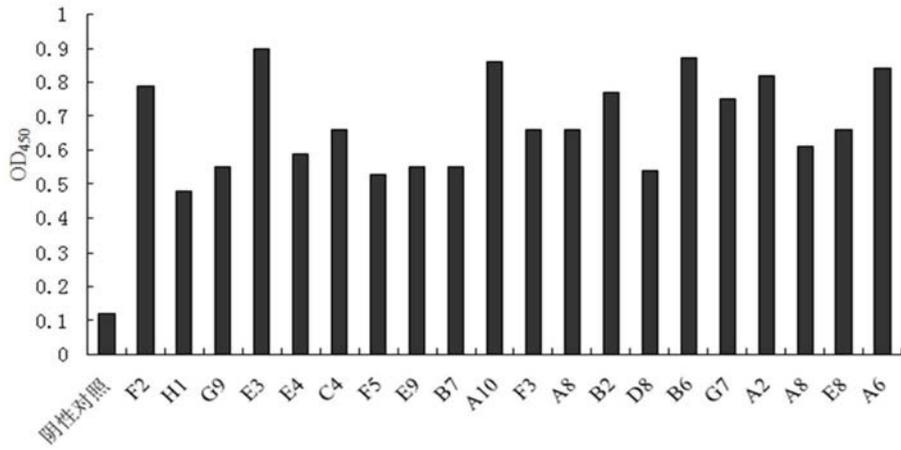


图1

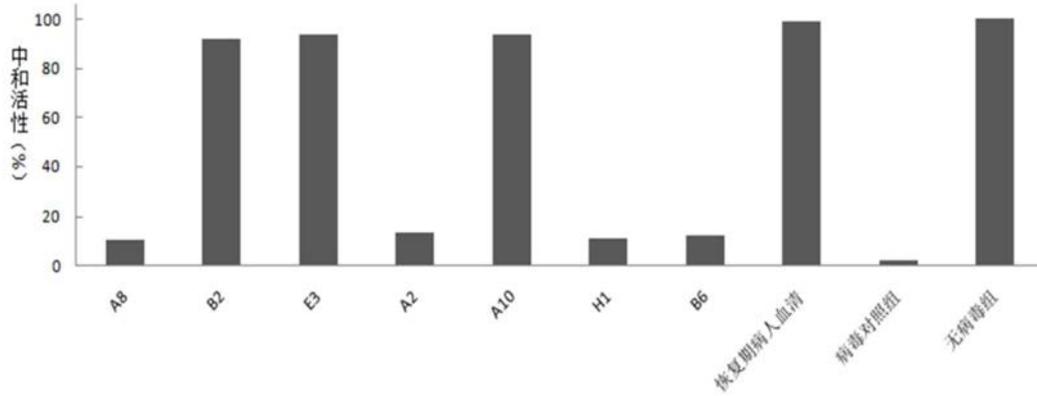


图2