

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/31
C07K 14/21 A61K 39/02
A61K 39/395 A61K 48/00
G01N 33/569 C07K 16/12

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809501.9

[43] 公开日 2002 年 11 月 6 日

[11] 公开号 CN 1378596A

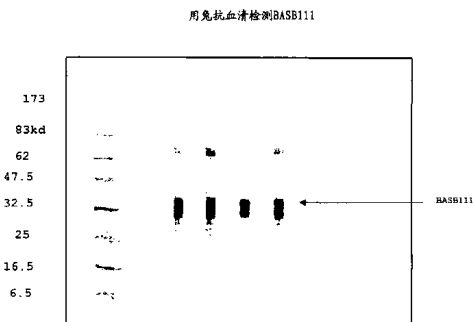
[22] 申请日 2000.6.23 [21] 申请号 00809501.9
[30] 优先权
[32] 1999.6.25 [33] GB [31] 9914945.2
[86] 国际申请 PCT/EP00/05852 2000.6.23
[87] 国际公布 WO01/00837 英 2001.1.4
[85] 进入国家阶段日期 2001.12.25
[71] 申请人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司
地址 比利时里克森萨特
[72] 发明人 J·通纳德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 钟守期

权利要求书 2 页 说明书 47 页 附图 3 页

[54] 发明名称 粘膜炎症莫拉氏菌 BASB111 多肽和多核苷酸

[57] 摘要
本发明提供 BASB111 多肽和编码 BASB111 多肽的多核苷酸以及通过重组技术生产这种多肽的方法。本发明还提供诊断性、预防性和治疗性的应用。



ISSN 1008-4274

1. 含有如下氨基酸序列的分离多肽, 该氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列全长序列具有至少 85% 的同一性。

2. 权利要求 1 的分离多肽, 其中氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列具有至少 95% 的同一性。

3. 权利要求 1 的分离多肽, 含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

4. SEQ ID NO: 2 的分离多肽。

5. 权利要求 1-4 任一项的多肽的免疫原性片段, 其中所述免疫原性片段的免疫原活性基本上与 SEQ ID NO: 2 的多肽相同。

6. 权利要求 1-5 任一项的多肽, 其中所述多肽是较大融合蛋白的一部分。

7. 编码权利要求 1-6 任一项的多肽的分离多核苷酸。

8. 含有编码与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列全长序列具有至少 85% 的同一性的核苷酸序列的分离多核苷酸; 或与该分离多核苷酸互补的核苷酸序列。

9. 含有与编码 SEQ ID NO: 2 的多肽全部编码区的核苷酸序列具有至少 85% 的同一性的核苷酸序列的分离多核苷酸; 或与该分离多核苷酸互补的核苷酸序列。

10. 含有与 SEQ ID NO: 1 的全长序列具有至少 85% 的同一性的核苷酸序列的分离多核苷酸; 或与该分离多核苷酸互补的核苷酸序列。

11. 权利要求 7-10 任一项的分离多核苷酸, 其中与 SEQ ID NO: 1 的同一性为至少 95%。

12. 含有编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的核苷酸序列的分离多核苷酸。

13. 含有 SEQ ID NO: 1 的多核苷酸的分离多核苷酸。

14. 含有编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的核苷酸序列的分离多核苷酸, 它可通过在严紧杂交条件下, 用具有 SEQ ID NO: 1 或其片段的序列的标记探针筛选合适的文库获得。

15. 含有权利要求 7-14 任一项的分离多核苷酸的表达载体或重组的活微生物。

16. 含有权利要求 15 的表达载体的宿主细胞或表达一种分离多

肽的该宿主细胞的膜，所述分离多肽含有与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列具有至少 85% 的同一性的氨基酸序列。

17. 生产含有与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列具有至少 85% 的同一性的氨基酸序列的多肽的方法，包括在足以产生所述多肽的条件下
5 培养权利要求 16 的宿主细胞并从培养基中回收该多肽。

18. 表达权利要求 7-14 任一项的多核苷酸的方法，包括用含有至少一种所述多核苷酸的表达载体转化宿主细胞，并在足以表达任何一种所说多核苷酸的条件下培养所述宿主细胞。

19. 含有有效量的权利要求 1 至 6 任一项的多肽和可药用载体的
10 疫苗组合物。

20. 含有有效量的权利要求 7 至 14 任一项的多核苷酸和可药用载体的疫苗组合物。

21. 权利要求 19 或 20 任一项的疫苗组合物，其中所述组合物至少含有一种另外的粘膜莫拉氏菌抗原。

15 22. 对权利要求 1 至 6 任一项的多肽或免疫性片段具有免疫特异性的抗体。

23. 诊断莫拉氏菌感染的方法，包括鉴定在来自怀疑具有这种感染的动物的生物样品中存在的权利要求 1-6 任一项的多肽、或对所述多肽具有免疫特异性的抗体。

20 24. 含有免疫有效量的权利要求 1-6 任一项的多肽的组合物在制备用于在动物中产生免疫应答的药物中的用途。

25. 含有免疫有效量的权利要求 7-14 任一项的多核苷酸的组合物在制备用于在动物中产生免疫应答的药物中的用途。

26. 用于治疗患有粘膜莫拉氏菌疾病的人的治疗组合物，它包
25 括至少一种抗权利要求 1-6 的多肽的抗体以及合适的药用载体。

粘膜炎莫拉氏菌 BASB111 多肽和多核苷酸

发明领域

5 本发明涉及多核苷酸（本文中称“BASB111 多核苷酸”）、它们编码的多肽（本文中称“BASB111”或“BASB111 多肽”）、重组物质以及它们的制备方法。在另一个方面，本发明涉及使用这种多肽和多核苷酸包括抵抗细菌感染的疫苗的方法。再一方面，本发明涉及检测某些病原体感染的诊断试验。

10

发明背景

粘膜炎莫拉氏菌（粘膜炎布兰汉氏球菌）是一种能经常从人的上呼吸道分离到的革兰氏阴性细菌。它导致几种疾病，主要是婴幼儿中耳炎和老年人肺炎。它也引起鼻窦炎和医院内感染，偶尔还会引起侵袭性疾病。

15

中耳炎从病例数量和其后遗症来讲是重要的儿童疾病。在美国年发病 350 万例以上，据估计 80% 的儿童在 3 岁之前会罹患中耳炎至少一次（Klein, JO (1994) Clin. Inf. Dis., 19:823）。如未得到治疗或转为慢性，会导致暂时（中耳积液时）或永久（听神经损害）的听力丧失。在婴儿中，这种听力丧失会导致说话延迟。

20

从患有中耳炎的儿童中耳分离的菌株主要有三种：肺炎链球菌、非典型性流感嗜血杆菌（NTHi）和粘膜炎莫拉氏菌。它们在 60% 到 90% 的病例中存在。近期研究表明，中耳炎病例中，肺炎链球菌和非典型性流感嗜血杆菌均占约 30%，粘膜炎莫拉氏菌约占 15%（Mruphy, TF (1996) Microbiol. Rev. 60:267）。从中耳中也可分离到其它细菌（B 型流感嗜血杆菌、酿脓链球菌等），但频度低得多（2% 或更低）。

25

流行病数据显示，中耳中发现的病原体引起中耳炎必需首先定居在上呼吸道；但是，发病还必需有其它因素（Dickinson, DP et al. (1988) J. Infect. Dis., 158:205, Faden, HL et al., (1991) Ann. Otorhinol. Laryngol. 100:612）。这对引起细菌经咽鼓管迁移到中耳然后开始炎症至关重要。这些因素迄今仍不清楚。据推测，诸如病毒感染后免疫系统暂时性异常可能引起不能控制呼吸道定居（Faden, HL et al (1994) J. Infect. Dis.

30

169:1312)。另一种解释是,暴露于环境因素之下使某些儿童中更为重要的定居得以发生,而这些儿童因为中耳中持续存在病原体而对中耳炎更为敏感(Murphy, TF (1996) Microbiol. Rev. 60:267)。

对粘膜炎莫拉氏菌的免疫应答知之甚少。按时从0到2岁的幼儿鼻咽分离的菌株的分析表明,他们经常获得和清除新菌株。这表明在细菌定居的儿童中建立了针对该细菌的有效免疫应答(Faden, HL et al (1994) J. Infect. Dis. 169:1312)。

在大部分测试的成人中鉴定到了杀菌抗体(Chapman, AJ et al. (1985) J. Infect. Dis. 151:878)。粘膜炎莫拉氏菌不同菌株抵抗血清杀菌活性的能力存在差异:一般,从患病个体中分离的菌株较仅仅携带该细菌的个体分离的菌株的抗性更强(Hol, C et al (1993) Lancet 341:1281, Jordan, KL et al. (1990) Am. J. Med. 88 (suppl. 5A):23S)。血清抗性因此可以被认为是细菌毒力因子。中耳炎病愈后的儿童血清中可以见到调理活性。

除了OMP B1、UspA1和UspA2(Chen D. et al. (1999), Infect. Immuno. 67:1310)外,人体中这些不同的免疫应答针对的抗原尚未鉴定,OMP B1是一种84 kDa的蛋白,其表达受铁调控,可以被肺炎患者血清识别(Sethi, S, et al. (1995) Infect. Immuno. 63:1516)。

粘膜炎莫拉氏菌表面存在的一些其它膜蛋白已经使用生化方法鉴定,或者揭示了他们在诱导保护性免疫中的潜在意义(综述见Murphy, TF (1996) Microbiol. Rev. 60:267)。在小鼠肺炎模型中,针对其中的一些成员(UspA, copB)的抗体的存在有利于迅速清除肺炎感染。另一种多肽(OMP CD)在粘膜炎莫拉氏菌菌株中高度保守,与铜绿假单胞菌的孔蛋白具有同源性,而后者已被证实对动物模型中的该细菌有效。

在过去几十年中,粘膜炎莫拉氏菌的发病率有了很大的提高。这已被归咎为多重抗生素抗性菌株的出现和具有较弱的免疫系统的人群体的增加。分离到对某些或所有标准抗生素具有抗性的菌株已不再鲜见。这种现象就使我们产生了针对这种微生物的新型抗微生物试剂、疫苗、药物筛选方法和诊断试验的永不满足的需求。

发明简述

本发明涉及 BASB111 特别是 BASB111 多肽和 BASB111 多核苷酸、重组物质以及它们的制备方法。在另一个方面，本发明涉及使用这种多肽和多核苷酸的方法，包括微生物疾病的预防与治疗及其他。在一个进一步的方面，本发明涉及检测与微生物感染有关的疾病及与这样的感染有关的症状的诊断试验，例如检测 BASB111 多核苷酸或多肽的表达或活性的试验。

通过阅读下面的描述和本公开的其他部分，本领域的技术人员将很容易理解在本发明公开的精神和范围之内的各种改变和修饰。

10

发明详述

如下文的详细介绍，本发明涉及 BASB111 多肽和多核苷酸。具体地说，本发明涉及粘膜炎莫拉氏菌的 BASB111 的多肽和多核苷酸。本发明尤其涉及具有分别列于 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的核苷酸和氨基酸序列的 BASB111。应当理解，在后面的序列表中列举为“DNA”的序列代表本发明的一个实施方案的举例，因为普通的技术人员知道，这样的序列通常被用作多核苷酸，包括多核糖核苷酸。

15

多肽

在本发明的一个方面，提供了在这里被称为“BASB111”和“BASB111 多肽”的粘膜炎莫拉氏菌的多肽，及其在生物学、诊断、预防、临床或治疗上有用的变体，以及含有它们的组合物。

20

本发明进一步提供：

- (a) 含有这样一种氨基酸序列的分离多肽，该氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 85% 的同一性，更优选至少 90% 的同一性，更优选至少 95% 的同一性，最优选至少 97-99% 的同一性或完全相同；
- 25 (b) 由含有如下一种多核苷酸序列的分离多核苷酸编码的多肽，该多核苷酸序列分别与 SEQ ID NO: 1 的整个长度具有至少 85% 的同一性，更优选至少 90% 的同一性，更优选至少 95% 的同一性，更优选至少 97-99% 的同一性或完全相同；或者
- (c) 由含有如下一种多核苷酸序列的分离多核苷酸编码的多肽，该多核苷酸序列编码这样一种多肽，这种多肽与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 85% 的同一性，更优选至少 90% 的同一性，更优选至少 95% 的同一性，最优选至少 97-99% 的同一性或完全相同；

30

SEQ ID NO: 2 中提供的 BASB111 多肽是来自粘膜炎症莫拉氏菌菌株 MC2931 (ATCC 43617) 的 BASB111 多肽。

本发明还提供 BASB111 多肽的一种免疫原性片段, 即 BASB111 多肽的一个连续的部分, 它与含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多肽具有相同或基本上相同的免疫原性活性。也就是说, 该片段 (必要时可与一种载体偶联) 能够产生能识别 BASB111 多肽的免疫应答。这种免疫原性片段可包括诸如缺少 N-末端前导序列和/或跨膜区域和/或 C-末端锚定区域的 BASB111 多肽。在一个优选的方面, 根据本发明的 BASB111 的免疫原性片段包含基本上一种多肽的所有胞外结构域, 其中该多肽与 SEQ ID NO: 2 在 SEQ ID NO: 2 的整个长度上至少有 85% 的同一性, 更优选至少 90% 的同一性, 更优选至少 95% 的同一性, 最优选至少 97-99% 的同一性。

片段是这样一种多肽, 它具有与本发明的任何多肽的任何氨基酸序列的一部分而不是全部完全相同的氨基酸序列。就 BASB111 多肽而言, 片段可以是“独立存在”, 或处于一个较大的多肽中, 在一个单独的较大多肽中组成一个部分或区域, 优选是一种单个的连续区域。

优选的片段包括, 诸如具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的一个部分的截短的多肽或其变体, 例如包括氨基末端和或羧基末端氨基酸序列的连续残基系列。用或在一种宿主细胞中制备的本发明的多肽的降解形式也是优选的。更优选的是具有结构或功能特征的片段, 例如含有 α 螺旋和 α 螺旋形成区域、 β 折叠和 β 折叠形成区域、转角和转角形成区域、线团和线团形成区域、亲水区域、疏水区域、 α 两亲性区域、 β 两亲性区域、柔性区域、表面形成区域、底物结合区域和高抗原性区域的片段。

更优选的片段包括含有如下氨基酸序列的分离多肽, 该氨基酸序列具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的至少 15、20、30、40、50 或 100 个连续氨基酸; 或含有如下氨基酸序列的分离多肽, 该氨基酸序列具有从 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列截短或缺失的至少 15、20、30、40、50 或 100 个连续氨基酸。

本发明的多肽片段可用于通过肽合成制备相应的全长多肽; 因此, 这些片段可用作制备本发明的全长多肽的中间体。

特别优选的是变体, 其中以任何组合方式取代、缺失或添加了几个、5-10、1-5、1-3、1-2 或 1 个氨基酸。

本发明的多肽或免疫原性片段可以是“成熟”蛋白形式, 或者可以是一种较大蛋白如前体或融合蛋白的一部分。通常优选包含含有分泌或前导序列、前序列、能协助纯化的序列如多组氨酸残基, 或能在重组制备过程中起稳定作用的额外序列。而且, 还考虑加入外源性多肽或脂类尾巴或多核苷酸序列以增加最终分子的免疫原性能力。

在一个方面, 本发明涉及遗传工程制备的可溶性融合蛋白, 这种融合蛋白含有本发明的一种多肽或其片段以及各亚类免疫球蛋白 (IgG、IgM、IgA、IgE) 的重链或轻链的恒定区的各种部分。优选的是, 免疫球蛋白是人 IgG 特别是 IgG1 的恒定区部分, 而融合发生在铰链区。在一个特别的实施方案中, Fc 部分可简单地通过引入一个切割序列而去除, 这种切割序列可用血凝因子 Xa 切割。

而且, 本发明涉及通过遗传工程制备这些融合蛋白的方法, 以及涉及它们在药物筛选、诊断和治疗中的应用。本发明的一个进一步的方面还涉及编码这种融合蛋白的多核苷酸。融合蛋白技术的例子可在国际专利申请 Nos. WO94/29458 和 WO94/22914 中发现。

蛋白质可通过化学方法接合, 或以重组融合蛋白的形式表达, 这种融合蛋白形式能比非融合蛋白在一种表达系统以较高水平制备。融合配体可帮助提供 T 辅助表位 (免疫性融合配体), 优选的是能被人识别的 T 辅助表位; 或者能帮助蛋白比原来的重组蛋白以较高产量进行表达的 T 辅助表位 (表达增强子)。融合配体优选既是一种免疫性融合配体, 又是表达增强子配体。

融合配体包括来自流感嗜血杆菌的蛋白 D 和来自流感病毒的非结构蛋白 NS1 (血凝素)。另一种融合配体是被称为 LytA 的蛋白。优选使用该分子的 C 末端部分。LytA 来自肺炎链球菌, 它合成一种 N-乙酰-L-丙氨酸酰胺酶---LytA 酰胺酶 (由 lytA 基因编码 {《基因》43 (1986) 265-272 页}), 后者是一种自溶素, 它特异性地降解肽聚糖骨架中的某些键。LytA 蛋白的 C 末端区域负责与胆碱或某些胆碱类似物如 DEAE 的亲合性。这种特性已被用于发展能用于融合蛋白表达的大肠杆菌 C-LytA 表达质粒。在其氨基端含有 C-LytA 片段的杂合蛋白的纯化已经有介绍 {《生物技术》10 卷 (1992) 795-798 页}。可以使用 LytA 分子

中在 C 末端发现的重复部分, 从残基 178 开始, 例如残基 188-305。

本发明还包括前面提到的多肽的变体, 即通过保守性氨基酸取代与参照物不同的多肽, 其中一种残基被另一种具有相似特征的残基取代。典型的这种取代在如下氨基酸之间: Ala、Val、Leu 和 Ile; Ser
5 和 Thr, 酸性残基 Asp 和 Glu; Asn 和 Gln; 碱性残基 Lys 和 Arg; 或芳族残基 Phe 和 Tyr。

本发明的多肽可以任何合适的方式进行制备。这种多肽包括分离的天然产生的多肽、重组制备的多肽、合成制备的多肽、或用这些方法的组合制备的多肽。制备这种多肽的方法在本领域是熟知的。

10 本发明的多肽更优选来自粘膜莫拉氏菌, 但它也优选可获自相同分类学属的其他生物体。本发明的多肽还可获自诸如相同分类学科或目的生物体。

多核苷酸

本发明的一个目的是提供编码 BASB111 多肽的多核苷酸, 特别是编码这里被称为 BASB111 的多肽的多核苷酸。

在本发明的特别优选的实施方案中, 多核苷酸包含一个编码 BASB111 多肽的区域, 该区域包含一个列于 SEQ ID NO: 1 的序列, 它包括一个全长的基因或其变体。

SEQ ID NO: 1 中提供的 BASB111 多核苷酸是来自粘膜莫拉氏
20 菌菌株 MC2931 (ATCC 43617) 的 BASB111 多核苷酸。

本发明的一个进一步的方面提供了编码和/或表达 BASB111 多肽和多核苷酸特别是粘膜莫拉氏菌的 BASB111 多肽和多核苷酸的分离核酸分子, 包括诸如未加工的 RNAs、核酶 RNAs、mRNAs、cDNAs、基因组 DNAs、B-和 Z-DNAs。本发明的进一步的实施方案包括在生
25 物性、诊断性、预防性、临床或治疗性有用的多核苷酸和多肽以及含有它们的组合物。

本发明的另一个方面涉及至少包括一个全长基因的分离多核苷酸, 该基因编码一种具有 SEQ ID NO: 2 的推定氨基酸序列的 BASB111, 以及与其密切相关的多核苷酸及其变体。

30 在本发明的另一个特别优选的实施方案中, 提供了一种来自粘膜莫拉氏菌的 BASB111 多肽, 它包括或由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其变体组成。

使用这里提供的信息，例如 SEQ ID NO: 1 列出的多核苷酸序列，本发明的编码 BASB111 多肽的多核苷酸可使用标准的克隆和筛选方法获得，例如使用那些用于从细菌中克隆和测序染色体 DNA 片段的方法以粘膜炎莫拉氏菌作为起始物质，接着获得一个全长克隆。例如，
5 为获得本发明的一种多核苷酸序列，例如 SEQ ID NO: 1 中给出的多核苷酸序列，通常使用一种来自部分序列的放射性标记的寡核苷酸，优选 17-mer 或更长，对大肠杆菌或其他合适宿主中的粘膜炎莫拉氏菌的染色体 DNA 克隆文库进行筛选。携带与探针相同 DNA 的克隆接着用严紧杂交条件进行区分。通过用根据原来的多肽或多核苷酸序列设计的测序引物对这样用杂交方法鉴定的单个克隆进行测序，就有可能在两个方向延伸多核苷酸序列，从而确定全长的基因序列。这种测序常规使用诸如由质粒克隆制备的变性的双链 DNA 来进行。合适的技术见 Maniatis, T., Fritsch, E.F.和 Sambrook 等《分子克隆实验室指南，第二版》Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New
10 York (1989)。(具体见杂交筛选 1.90 和变性双链 DNA 模板测序 13.70)。也可应用直接的基因组 DNA 测序来获得全长的基因序列。为说明本发明，SEQ ID NO: 1 列出的每个多核苷酸都来自粘膜炎莫拉氏菌的 DNA 文库中发现。

而且，SEQ ID NO: 1 中列出的每个 DNA 序列都含有一个编码如下蛋白的开放阅读框，该蛋白含有 SEQ ID NO: 2 中列出的氨基酸残基数目，其推导的分子量可使用本领域技术人员熟知的氨基酸残基的分子量数值进行计算。
20

SEQ ID NO: 1 的多核苷酸位于 SEQ ID NO: 1 的起始密码子的核苷酸 1 和从核苷酸 829 开始的终止密码子之间，编码 SEQ ID NO: 2 的多肽。
25

在一个进一步的方面，本发明提供一种分离的多核苷酸，该核苷酸包括或由以下组成：

- (a) 一种多核苷酸序列，它与 SEQ ID NO: 1 分别在 SEQ ID NO: 1 的整个长度上至少有 85% 的同一性，更优选至少 90% 的同一性，更优选至少 95% 的同一性，最优选至少 97-99% 的同一性或完全相同；或
30 (b) 一种编码一种多肽的多核苷酸序列，该多肽与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 2 的整个长度上具有至少 85% 的同一

性，更优选至少 90%的同一性，更优选至少 95%的同一性，更优选至少 97-99%的同一性或 100%完全相同。

5 编码本发明的一种多肽的多核苷酸，包括来自除粘膜炎莫拉氏菌以外的种类的同源物或同源进化物，可通过一种包括以下步骤的方法来获得：在严紧杂交条件下（例如使用 45-65°C 的温度范围，SDS 的浓度为 0.1-1%）用一种标记的或可检测的探针对合适的文库进行筛选，其中探针包含或由 SEQ ID NO: 1 的序列或其一个片段组成，并分离含有所说多核苷酸序列的全长基因和/或基因组克隆。

10 本发明提供一种在其整个长度上与 SEQ ID NO: 1 的编码序列（开放阅读框）相同的多核苷酸序列。本发明还提供单独的成熟多肽或其片段的编码序列以及与另一个编码序列在一个阅读框内的成熟多肽或其片段的编码序列，另一个编码序列的例子为编码一种前导或分泌序列、前-、原-或前原-蛋白的序列。本发明的多核苷酸也可含有至少一种非编码序列，包括但不限于，诸如至少一种非编码的 5'和 3'序
15 列，例如转录但不翻译的序列、终止信号（例如 rho-依赖和非 rho-依赖的终止信号）、核糖体结合位点、Kozak 序列、稳定 mRNA 的序列、内含子和聚腺苷酸化信号。多核苷酸序列也可包含编码额外氨基酸的额外编码序列。例如，可以编码一种能促进融合多肽纯化的标记序列。在本发明的某些实施方案中，标记序列是一种 6 组氨酸肽，由 pQE 载体提供（Qiagen, Inc.），见 Gentz 等《美国科学院院刊》86: 821-824,
20 （1989）中的介绍；或是一种 HA 肽尾巴（Wilson 等，《细胞》37: 767（1984）；两种标记序列都可用于纯化与它们融合的多肽。本发明的多核苷酸还包括但不限于，包含一种结构基因和其天然相连的控制基因表达的序列。

25 编码 SEQ ID NO: 2 的 BASB111 多肽的核苷酸序列可以与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 1 至 828 所含的多肽编码序列相同。另外，它可以是这样一种序列，即由于遗传密码丰余（简并性）也编码 SEQ ID NO: 2 的多肽。

30 用于此处，“编码一种多肽的多核苷酸”一词涉及包括一种编码本发明的多肽的序列的多核苷酸，本发明的多肽具体说是一种细菌多肽，更具体说是粘膜炎莫拉氏菌 BASB111 多肽，它具有 SEQ ID NO: 2 所列的氨基酸序列。该词还涉及这样一种多核苷酸，它包括编码该

肽的一个单一的连续区域或非连续区域（例如被整合的噬菌体、整合的插入序列、整合的载体序列、整合的转座子序列或因 RNA 编辑或基因组 DNA 重排所打断的多核苷酸）以及另外的区域，这种另外的区域也可含有编码和/或非编码序列。

- 5 本发明进一步涉及这里介绍的多核苷酸的变体，这种变体能编码具有 SEQ ID NO: 2 的推定氨基酸序列的多肽的变体。本发明的多核苷酸的片段可用于诸如合成本发明的全长多核苷酸。

更加特别优选的实施方案是编码 BASB111 变体的多核苷酸，该变体具有在 SEQ ID NO: 2 中几个、少数、5 至 10、1 至 5、1 至 3、2、
10 1 或没有氨基酸被以任何组合方式取代、修饰、缺失和/或添加的 BASB111 多肽的氨基酸序列。在它们中尤其优选的是并不改变 BASB111 多肽的特性和活性的沉默取代、添加和缺失。

本发明的更优选的实施方案是与编码具有 SEQ ID NO: 2 列出的氨基酸序列的 BASB111 多肽的多核苷酸在其整个长度上至少有 85%
15 相同的多核苷酸；以及与这种多核苷酸互补的多核苷酸。就此而言，特别优选的是在整个长度上至少有 90% 的同一性的多核苷酸，而在这些特别优选多核苷酸中，至少有 95% 的同一性的多核苷酸更为优选，而且在这些至少有 95% 的同一性的多核苷酸中，至少有 97% 相同的多核苷酸更优选，同样在它们中，至少有 98% 和至少有 99% 相同的多核苷酸尤其更加优选，其中至少有 99% 相同的多核苷酸更优选。
20

优选的实施方案是编码基本上保留了 SEQ ID NO: 1 的 DNA 编码的成熟多肽的相同生物功能或活性的多肽的多核苷酸。

根据本发明的特定优选实施方案，本发明提供能与 BASB111 多核苷酸序列例如 SEQ ID NO: 1 的多核苷酸序列杂交，尤其是在严紧
25 条件下杂交的多核苷酸。

本发明进一步涉及能与这里提供的多核苷酸序列杂交的多核苷酸序列。就此而言，本发明特别涉及能在严紧条件下与这里介绍的多核苷酸杂交的多核苷酸。用于此处，“严紧条件”和“严紧杂交条件”的意思是杂交只发生在序列之间至少有 95% 优选至少有 97% 相同时。
30 严紧杂交条件的一个具体例子是在 42°C 在一种溶液中温育过夜，该溶液包括：50% 甲酰胺、5x SSC（150 mM NaCl、15 mM 柠檬酸钠）、50 mM 磷酸钠（pH7.6）、5x Denhardt's 溶液、10% 葡聚糖硫酸酯和 20

微克/ml 的变性剪切鲑精 DNA，接着在 0.1x SSC 中在约 65°C 时洗涤杂交支持物。杂交和洗涤条件是众所周知的，并在 Sambrook 等《分子克隆实验室指南，第二版》Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 中特别是 11 章中举例。溶液杂交也可用本发明提供的多核苷酸序列进行。

本发明还提供含有或由这样一种多核苷酸序列组成的多核苷酸，该多核苷酸序列通过用一种探针在严紧杂交条件下筛选一种合适的文库并分离所述多核苷酸序列来获得，其中文库含有 SEQ ID NO: 1 列出的多核苷酸序列的完整基因，而探针具有 SEQ ID NO: 1 列出的所述多核苷酸序列的序列。可用于获得这样一种多核苷酸的片段包括诸如本文的其他部分详细介绍的探针和引物。

如本发明在这里的其他部分对多核苷酸试验的讨论，例如，本发明的多核苷酸可用作 RNA、cDNA 和基因组 DNA 的杂交探针来分离编码 BASB111 的全长 cDNAs 和基因组克隆，并分离与 BASB111 基因具有高同一性特别是高序列同一性的其他基因的 cDNA 和基因组克隆。这种探针一般具有至少 15 个核苷酸残基或碱基对，这种探针优选具有至少 30 个核苷酸残基或碱基对，也可具有至少 50 个核苷酸残基或碱基对。特别优选的探针具有至少 20 个核苷酸残基或碱基对，并少于至少 30 个核苷酸残基或碱基对。

BASB111 基因的编码区可通过使用 SEQ ID NO: 1 提供的 DNA 序列合成一种寡核苷酸探针进行筛选来分离。然后使用与本发明的基因序列互补的标记寡核苷酸筛选一种 cDNA、基因组 DNA 或 mRNA 文库，来确定该探针杂交的文库成员。

对本领域的技术人员来说，有几种方法是可以使用和熟知的，可以用来获得全长 DNAs 或延伸短的 DNAs，例如以 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 方法为基础的方法 (见诸如 Frohman 等,《美国科学院院刊》85: 8998-9002, 1988)。这种技术的最近修改，例如 MarathonTM 技术 (Clontech Laboratories Inc.)，明显简化了对较长 cDNAs 的寻找。在 MarathonTM 技术中，cDNAs 用从一种选择的组织中抽提的 mRNA 制备，并在每个末端连上一种“接头”。然后使用基因特异的和接头特异的寡核苷酸组合进行核酸扩增 (PCR) 来扩增“丢失”的 DNA 的 5' 末端。然后使用“巢式”引物重复 PCR 反应，巢式引物即设计

来与扩增产物的内部退火的引物（通常为与接头序列的 3'退火的一种接头特异性引物和与所选择的基因序列的 5'退火的一种基因特异性引物）。然后用 DNA 测序对该反应的产物进行分析，通过将产物直接与已有的 DNA 连接产生一个完整的序列，或者使用设计 5'引物的新序列信息5 进行一个单独的全长 PCR，来构建一个全长的 DNA。

本发明的多核苷酸和多肽可用作诸如发现疾病特别是人疾病的治疗和诊断的研究试剂和物质，如同这里与多核苷酸试验有关的讨论。

本发明的多核苷酸是衍生自 SEQ ID NO: 1 序列的寡核苷酸，它们可用于这里介绍的方法，但更优选用于 PCR，用来确定这里鉴定的10 多核苷酸是否全部或部分能在细菌或感染组织中转录。应当理解，这种序列也可用于诊断感染的阶段和所获得病原体的感染类型。

本发明也提供编码这样一种多肽的多核苷酸，这种多肽是一种成熟蛋白加上另外的氨基或羧基末端氨基酸、或成熟多肽内部的氨基酸（例如，当成熟形式含有一个以上的多肽链时）。这种序列可在将一15 种蛋白从前体加工成成熟形式时起作用，可允许蛋白运输，可延长或缩短蛋白的半寿期，或可便于蛋白用于试验或制备时的操作。通常在体内时，另外的氨基酸可通过细胞酶从成熟蛋白上加工除去。

对于本发明的每一种和所有的多核苷酸，都提供一种与之互补的多核苷酸。这些互补多核苷酸优选与它们互补的每一种多核苷酸完全20 互补。

一种含有多肽的成熟形式与一种或多种原序列融合的前体蛋白可能是该多肽的无活性形式。当除去原序列时，这种无活性的前体一般被激活。在活化前，一些或所有的原序列可被除去。这种前体一般被称为蛋白原。

25 核苷酸除了用标准的 A、G、C、T/U 表示外，“N”也可用来描述本发明的特定多核苷酸。“N”指 4 种 DNA 或 RNA 核苷酸的任何一个都可出现在 DNA 或 RNA 序列的该指定位点，但优选 N 不是一种核酸，当它与相邻的核苷酸位置组合在一起，当按正确的阅读框阅读时，在该阅读框中产生一种成熟前的终止密码子。

30 总而言之，本发明的多核苷酸可编码一种成熟蛋白、一种成熟蛋白加一种前导序列（它可被称为一种前蛋白）、含有一种或多种非前蛋白的前导序列的原序列的成熟蛋白的前体、或原蛋白的前体前原蛋

白，其具有一种前导序列和一种或多种原序列，它们通常在产生多肽的活性和成熟形式的加工过程中被除去。

根据本发明的一个方面，提供本发明的多核苷酸在治疗性或预防性目的特别是遗传免疫方面的应用。

5 本发明的多核苷酸在遗传免疫方面的应用优选使用一种合适的传递方法，例如直接将质粒 DNA 注射进肌肉（Wolff 等《人类分子遗传学》（1992）1: 363, Manthorpe 等，《人类基因治疗》（1983）4: 419）；将 DNA 与特异性蛋白载体复合后进行传递（Wu 等，《生物化学杂志》（1989）264: 16985），将 DNA 与磷酸钙共沉淀（Benvenisty&Reshef,
10 《美国科学院院刊》（1986）83: 9551）；将 DNA 用各种形式的脂质体包裹（Kaneda 等，《科学》（1989）243: 375）；粒子轰击（Tang 等，《自然》（1992）356: 152, Eisenbraun 等《DNA 与细胞生物学》（1993）12: 791）以及使用克隆的逆转录载体进行体内感染（Seeger 等，《美国科学院院刊》81: 5949）。

15 载体、宿主细胞、表达系统

本发明还涉及含有本发明的多核苷酸的载体、用本发明的载体进行了遗传工程改造的宿主细胞以及通过重组技术制备本发明的多肽。无细胞翻译系统也可用于使用来自本发明的 DNA 结构物的 RNAs 制备这样的蛋白。

20 本发明的重组多肽可使用本领域技术人员熟知的方法由含有表达系统的遗传工程宿主细胞进行制备。因此，在一个进一步的方面，本发明涉及含有本发明的多核苷酸的表达系统、用这种表达系统遗传工程改造的宿主细胞以及用重组技术制备本发明的多肽。

为进行本发明的多肽的重组制备，宿主细胞可通过遗传工程改造
25 来整合表达系统或其部分或本发明的多核苷酸。将多核苷酸导入宿主细胞可通过多种标准实验室手册介绍的方法来完成，例如 Davis 等《分子生物学基本方法》（1986）和 Sambrook 等《分子克隆实验室指南，第二版》Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York（1989），例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、载体转
30 染(transfection)、显微注射、阳离子脂介导的转染、电穿孔、转导、划痕接种、轰击导入和感染。

合适宿主的代表性例子包括细菌细胞如链球菌、葡萄球菌、肠球

菌、大肠杆菌、链霉菌、蓝细菌、枯草芽孢杆菌、粘膜莫拉氏菌、流感嗜血杆菌和粘膜莫拉氏菌的细胞；真菌细胞如克鲁维氏酵母、糖酵母等酵母、白色假丝酵母和曲霉等担子菌的细胞；昆虫细胞如果蝇 S2 和草地夜蛾 Sf9 的细胞；动物细胞如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1 和 Bowes 黑素瘤细胞；以及植物细胞如裸子植物或被子植物的细胞。

多种表达系统可用于制备本发明的多肽。这种载体包括染色体型、游离型、病毒型衍生载体，例如由细菌质粒、细菌噬菌体、转座子、酵母游离体、插入元件、酵母染色体元件、病毒如杆状病毒、乳多空病毒如 SV40、痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病毒、微小 RNA 病毒、逆转录病毒和甲型病毒衍生的载体或由它们的组合物衍生的载体，例如由质粒和噬菌体遗传元件衍生的载体，如粘粒和噬菌粒。表达系统结构物可含有调节以及引起表达的控制区域。就这个方面一般来说，任何适合于维持、增殖或表达多核苷酸和/或在一种宿主中表达一种多肽的系统或载体都可用于表达。合适的 DNA 序列可通过任何熟知的和常规的技术插入到表达系统中，例如 Sambrook 等《分子克隆实验室指南》(上文)中列出的技术。

在真核细胞重组表达系统中，为使翻译蛋白分泌到内质网层中、周质间或胞外环境中，可将合适的分泌信号整合到表达的多肽中。这些信号对多肽来说可以是内源性的，或者也可以是异源性的。

本发明的多肽可通过熟知的技术从重组细胞培养物中回收和纯化，这些技术包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。更优选将金属离子亲和层析 (IMAC) 用于纯化。熟知的用于蛋白重新折叠的技术可用于当多肽在胞内合成、分离和/或纯化过程中变性时活性构象的再生。

表达系统也可是一种重组的活微生物，例如一种病毒或细菌。目标基因可插入到活的重组病毒或细菌的基因组中。接种和体内感染这种活的载体将导致抗原的体内表达和免疫应答诱导。用于此目的病毒和细菌是诸如痘病毒(例如痘苗病毒、禽痘病毒、金丝雀禽痘病毒)、甲病毒(辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒)、腺病毒、腺伴随病毒、微小 RNA 病毒(脊髓灰质炎病毒、鼻病

毒)、疱疹病毒(水痘带状疱疹病毒等)、李斯特氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、奈瑟氏菌、BCG。这些病毒和细菌可以是毒性的、或用各种方法减毒来获得一种活疫苗。这种活疫苗也是本发明的一个部分。

诊断、预测、血清分型和突变试验

5 本发明还涉及将本发明的 BASB111 多核苷酸和多肽用作诊断试剂。在真核细胞特别是哺乳动物细胞尤其是人细胞中检测 BASB111 多核苷酸和/或多肽可为诊断疾病、疾病阶段或感染生物体对药物的应答提供一种诊断方法。真核细胞,特别是哺乳动物细胞,尤其是人细胞,特别是那些感染或怀疑感染了含有 BASB111 基因或蛋白的生物
10 体的细胞,可在核酸或氨基酸水平通过多种熟知的技术以及这里提供的方法进行检测。

用于预测、诊断或其他分析的多肽和多核苷酸可获自假定感染和/或感染个体的机体物质。来自任何这些来源的多核苷酸尤其是 DNA 或 RNA 可直接用于检测,或者可在分析前使用 PCR 或其他任何扩增
15 技术进行酶促扩增。RNA 特别是 mRNA、cDNA 和基因组 DNA 也可以相同方式使用。使用扩增方法,通过对生物体的所选多核苷酸的基因型进行分析,可对感染性或个体中存在的定居生物体的种类和菌株进行鉴定。缺失和插入可通过扩增产物与一种选自相关生物体的参考序列的基因型相比的大小变化进行检测,优选与相同属的不同种或相
20 同种的不同株进行比较。点突变可通过将扩增 DNA 与标记的 BASB111 多核苷酸序列进行杂交来鉴定。对于 DNA 或 RNA 来说,通过 DNase 或 RNase 消化分别可将非常或明显匹配的序列与匹配不佳或明显错配的双体区分开来,或者通过检测融解温度或复性动力学的差异进行区分。多核苷酸序列差异也可通过多核苷酸片段在凝胶中与一种参考序
25 列相比的电泳迁移的改变来检测。这可使用或不使用变性试剂。多核苷酸差异也可通过直接的 DNA 或 RNA 测序来检测。见诸如 Myers 等,《科学》230: 1242 (1985)。特殊位置的序列改变也可通过核酸酶保护试验如 RNase、V1 和 S1 保护试验或化学裂解方法来显示。见诸如 Cotton 等《美国科学院院刊》85: 4397-4401 (1985)。

30 在另一个实施方案中,可以构建一系列含有 BASB111 核苷酸序列或其片段的寡核苷酸探针,来对诸如遗传突变、血清型、分类或鉴定进行有效的筛选。平行技术方法是众所周知的,具有通用性,可用

来解决分子遗传学中的多种问题，包括基因表达、遗传连锁和遗传变异（见诸如 Chee 等《科学》274: 610（1996）。

因此，在另一个方面，本发明涉及一种诊断试剂盒，它包括

- （a）本发明的一种多核苷酸，优选 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列或其片段；
- （b）与（a）的核苷酸序列互补的核苷酸序列；
- （c）本发明的一种多肽，优选 SEQ ID NO: 2 的多肽或其片段；
- 或
- （d）针对本发明的多肽的抗体，优选针对 SEQ ID NO: 2 的多肽的抗体。

在任何这样一种试剂盒中，（a）、（b）、（c）或（d）可优选含有一种基本组分。这种试剂盒可用于疾病或对疾病的易感性的诊断或其他。

本发明还涉及将本发明的多核苷酸用作诊断试剂。对本发明的多核苷酸优选 SEQ ID NO: 1 的与一种疾病或致病性相关的突变形式的检测，可提供一种诊断手段，这种诊断手段可增加或限定由于该多核苷酸的低表达、过量表达或表达改变而引起的一种疾病的诊断、疾病过程的预测、疾病阶段、或疾病的易感性的确定。在这样的多核苷酸中带有突变的生物体特别是感染性生物体可通过各种技术例如这里任何地方介绍的技术在多核苷酸水平进行检测。

来自在本发明的多核苷酸和/或多肽中带有突变或多态性（等位突变）的生物体的细胞也可用来使用多种技术在多核苷酸或多肽水平进行检测，从而进行诸如血清学分型。例如，RT-PCR 可用来检测 RNA 中的突变。优选将 RT-PCR 与自动检测系统如 GeneScan 结合起来进行使用。RNA、cDNA 或基因组 DNA 也可用于相同的目的---PCR。例如，与编码 BASB111 多肽的多核苷酸互补的 PCR 引物可用来鉴定和分析突变。

本发明进一步提供从 5'和/或 3'末端除去 1、2、3 或 4 个核苷酸的引物。这些引物可与其他材料一起用于扩增从个体获得的一种样品如机体物质中分离的 BASB111 DNA 和/或 RNA。这些引物可用于扩增从感染个体中分离的一种多核苷酸，这样，该多核苷酸可随后通过各种技术来阐明多核苷酸序列。通过这种方法，可检测多核苷酸序列中

的突变，并用于诊断和/或预测感染或其阶段或过程，或进行感染因子的血清学分型和/或分类。

本发明进一步提供诊断疾病，优选是细菌感染，更优选是由粘膜
5 炎莫拉氏菌引起的感染的方法，这包括在从个体获得的样品如一种机
体物质中检测具有 SEQ ID NO: 1 序列的多核苷酸的表达水平的提高。
BASB111 多核苷酸表达的增加或减少可使用本领域任何已知的用于多
核苷酸定量的方法进行检测，例如扩增、PCR、RT-PCR、RNase 保护、
Northern 印迹、分光光度和其他杂交方法。

此外，根据本发明的用于检测 BASB111 多肽与正常对照组织样
10 品相比过量表达的诊断试验可用来检测例如一种感染的存在。可用来
测定 BASB111 多肽在来自一种宿主如一种机体物质中的水平的试验
技术对本领域的技术人员来说是熟知的。这种试验方法包括放射免疫
试验、竞争结合试验、Western 印迹、抗体夹心试验、抗体检测和 ELISA
试验。

15 本发明的多核苷酸可用作多核苷酸列阵优选是高密度列阵或载网
的组分。这些高密度列阵对于诊断和预测目的特别有用。例如，各含
一种不同基因并进一步含有本发明的多核苷酸的一套点可用于探针检
测，例如使用杂交或核酸扩增，使用来自或衍生自一种机体样品的探
针，来检测一种特别的寡核苷酸序列或相关序列在一个个体中的存
20 在。这种存在可说明一种病原体尤其是粘膜莫拉氏菌的存在，并可
用来诊断和/或预测疾病或疾病过程。优选的是一种含有多种 SEQ ID
NO: 1 的核苷酸序列的变体的载网。含有编码 SEQ ID NO: 2 的多肽
序列的多核苷酸序列的多种变体的载网也是优选的。

抗体

25 本发明的多肽和多核苷酸或其变体或者表达它们的细胞可用作免
疫原来制备分别针对这种多肽或多核苷酸的抗体。

在本发明的特定优选实施方案中，提供针对 BASB111 多肽或多
核苷酸的抗体。

针对本发明的多肽或多核苷酸制备的抗体可通过使用传统的方法
30 获得，即将本发明的多肽和/或多核苷酸、或它们之一或两者的携带表
位的片段、它们之一或两者的类似物、或表达它们之一或两者的细胞
给药于一种动物，优选是一种非人类的动物。本领域任何能提供用连

续细胞系培养制备的抗体的技术都可以使用。例子包括各种技术，例如 Kohler,G.和 Milstein, C.《自然》256: 495-497 (1975); Kozbor 等《今日免疫学》4: 72 (1983); Cole 等《单克隆抗体和癌症治疗》，Alan R. Liss, Inc. (1985)的 77-96 页。

- 5 制备单链抗体的技术（美国专利 No. 4,946,778）可修改来制备针对本发明的多肽或多核苷酸的单链抗体。转基因鼠或其他生物体或动物如其他哺乳动物也可用来表达对本发明的多肽或多核苷酸免疫特异的人源化抗体。

10 另外，噬菌体显示技术可用来从含有抗 BASB111 的人淋巴细胞的 PCR 扩增的 V-基因文库或天然文库中选择对本发明的多肽具有结合活性的抗体基因（McCafferty 等（1990）《自然》348: 552-554; Marks 等（1992）《生物技术》10: 779-783）。这些抗体的亲和性也可通过诸如链置换技术进行提高（Clackson 等，（1991）《自然》352: 628）。

15 上面介绍的抗体可用来分离或鉴定能够表达本发明的多肽或多核苷酸的克隆，来通过诸如亲和层析纯化这些多肽或多核苷酸。

 这些抗体以及其他针对 BASB111 多肽或 BASB111 多核苷酸的抗体可用来治疗感染，特别是细菌感染。

 多肽变体包括抗原性、表位性或免疫性等价的变体，它们组成了本发明的一个特别的方面。

20 抗体或其片段优选通过修饰，使之在个体中具有较小的免疫原性。例如，如果个体是人，抗体可更优选是一种“人源化”的抗体，其中杂交瘤来源抗体的互补决定区被移植到人单克隆抗体中，例如 Jones 等（1986）《自然》321, 522-525 或 Tempest 等（1991）《生物技术》9, 266-273 中的介绍。

25 拮抗剂和激动剂---试验和分子

 本发明的多肽和多核苷酸还可用来评价小分子底物与配体在诸如细胞、无细胞抽提物、化学文库和天然产物混合物中的结合。这些底物和配体可以是天然底物和配体，或者可以是结构或功能模拟物，见诸如 Coligan 等《当代免疫学方法》1（2）：5 章（1991）。

30 筛选方法可通过一种直接或间接受候选化合物连接的标记简单地测量候选化合物与多肽或多核苷酸、或者携带多肽或多核苷酸的细胞或膜、或者多肽的融合蛋白的结合。此外，筛选方法可包括与一种标

记的竞争物进行竞争。而且，这些筛选方法可检测候选化合物是否导致一种由多肽或多核苷酸的活化产生的信号，这可使用与含有多肽或多核苷酸的细胞适宜的检测系统来进行。活化的抑制剂一般在存在一种已知激动剂的情况下进行试验，并观察候选化合物对激动剂活化作用的影响。组成型活性多肽和/或组成型表达的多肽和多核苷酸可根据需要，在没有任何激动剂或拮抗剂的情况下，用于逆转激动剂或抑制剂的筛选方法，这可通过检测候选化合物是否导致多肽或多核苷酸的活化的抑制来进行。而且，筛选方法可简单地包括以下步骤，将一种候选化合物与含有本发明的一种多肽或多核苷酸的溶液混合，形成一种混合物；检测混合物中 BASB111 多肽和/或多核苷酸的活性；将混合物中 BASB111 多肽和/或多核苷酸的活性与一种标准进行比较。融合蛋白如这里介绍的 Fc 部分与 BASB111 多肽制备的融合蛋白也可用于高通量的筛选试验，用来鉴定本发明的多肽的拮抗剂以及系统发育和/或功能上相关的多肽（见 D. Bennett 等《分子识别杂志》8: 52-58 (1995) 和 K. Johanson 等《生物化学杂志》270 (16): 9459-9471 (1995)）。

能够与本发明的一种多肽结合和/或相互作用的多核苷酸、多肽和抗体也可用于设计检测加入的化合物对细胞中 mRNA 和/或多肽产生的影响的筛选方法。例如，可以设计一种 ELISA 试验，使用单克隆和多克隆抗体，按照本领域的标准方法，测量多肽的分泌或细胞结合水平。这可用于发现能抑制或增强多肽在合适的操作细胞或组织中产生的试剂（分别也被称为拮抗剂或激动剂）。

本发明还提供一种筛选化合物的方法，用来鉴定能够增强（激动剂）或阻断（拮抗剂）BASB111 多肽或多核苷酸的作用的化合物，尤其是能够抑菌和/或杀菌的化合物。这种筛选方法可使用高通量技术。例如，为筛选激动剂或拮抗剂，将一种合成反应混合物、一种细胞组分如膜、细胞包膜或细胞壁、或者它们的任何制备物、包括 BASB111 多肽和一种标记底物或这种多肽的配体，在一种可能是 BASB111 激动剂或拮抗剂的候选分子存在或不存在的条件下，进行温育。候选化合物激动或拮抗 BASB111 多肽的能力反映于标记配体的结合降低或这种底物的产物的产生减少。无效结合即不诱导 BASB111 多肽的效果的分子很可能是优秀的拮抗剂。根据情况，结合良好并增加产物由

底物产生的速率、增加信号转导或增加化学通道活性的分子即是激动剂。根据情况，产物由底物产生、信号传导或化学通道活性的速率或水平的检测可通过使用一种报告系统来增强。可用于此目的报告系统包括但不限于比色、标记底物转变成产物、一种对 BASB111 多核苷酸或多肽的变化应答的报告基因以及本领域熟知的结合试验。

BASB111 激动剂试验的另一个例子是一种竞争试验，该试验将 BASB111 和一种可能的激动剂与 BASB111 结合分子、重组 BASB111 结合分子、天然底物或配体、或底物或配体的模拟物组合在一起，在合适的条件下进行竞争抑制试验。BASB111 可进行标记，例如用放射性或比色化合物标记，使结合到一种结合分子上或转化成产物的 BASB111 分子的数目可以精确测定，来评价可能的拮抗剂的作用。

可能的拮抗剂包括能与本发明的多核苷酸和/或多肽结合并因而抑制或压制其活性或表达的小有机分子、肽、多肽以及抗体及其他。可能的拮抗剂也可以是这样的小有机分子、肽、多肽如密切相关的蛋白或抗体，它们结合在结合分子的相同位点，例如一种结合分子，但不诱导 BASB111 诱导的活性，从而通过阻止 BASB111 多肽和/或多核苷酸结合来抑制 BASB111 多肽和/或多核苷酸的活化或表达。

可能的拮抗剂包括这样的小分子，它们结合和占据多肽的结合位点，因而阻止其与细胞结合分子结合，从而抑制正常的生物活性。小分子的例子包括但不限于小有机分子、肽或肽样分子。其他可能的拮抗剂包括反义分子（见 Okano, 《神经化学杂志》56: 560 (1991); 《寡脱氧核苷酸作为基因表达的反义抑制剂》CRC Press, Boca Raton, FL (1988), 对这些分子的介绍）。优选的可能的拮抗剂包括与 BASB111 及其变体有关的化合物。

在一个进一步的方面，本发明涉及遗传工程的可溶性融合蛋白，这种蛋白包括本发明的一种多肽或其片段以及各种亚类免疫球蛋白（IgG、IgM、IgA、IgE）的重链或轻链恒定区的各种部分。优选的免疫球蛋白是人 IgG 特别是 IgG1 重链的恒定区部分，其中融合发生于铰链区。在一个特别的实施方案中，Fc 部分可通过以下方法简单地除去：引入一个切割序列，该序列可用血液凝集因子 Xa。而且，本发明涉及通过遗传工程制备这些融合蛋白的方法，并涉及将其用于药物筛选、诊断和治疗。本发明的一个进一步的方面还涉及编码这种融合

蛋白的多核苷酸。融合蛋白技术的例子可见于国际专利申请 Nos. WO94/29458 和 WO94/22914。

这里提供的每个多核苷酸序列可用于发现和开发抗菌化合物。编码蛋白通过表达可用作筛选抗菌药物的靶。此外，编码所编码蛋白的氨基末端区域或相应 mRNA 的 SD 或其他翻译促进区域的多核苷酸序列可用于构建反义序列来控制目标编码序列的表达。

本发明还提供将本发明的多肽、多核苷酸、激动剂或拮抗剂用于干扰一种病原体或多种病原体与一种对感染继发病敏感的真核生物优选是哺乳动物宿主之间的最初生理相互作用。具体地说，本发明的分子可用于：抑制细菌具体说是革兰氏阳性和/或革兰氏阴性细菌粘附于真核生物优选是哺乳动物的深埋装置的细胞外基质蛋白或粘附于伤口的细胞外基质蛋白；阻断真核生物优选是哺乳动物的细胞外基质蛋白与细菌 BASB111 蛋白之间的细菌性粘附，后者介导组织损伤；和/或阻断不管是深埋装置植入还是其他外科技术引起的感染的正常致病过程。

根据本发明的另一个方面，提供 BASB111 激动剂和拮抗剂，优选是抑菌或杀菌性激动剂和拮抗剂。

本发明的拮抗剂和激动剂可用于例如阻止、抑制和/或治疗疾病。

在一个进一步的方面，本发明涉及本发明的多肽的模拟表位。模拟表位是一种肽序列，与天然肽足够相似（序列上或结构上），它可能被识别天然肽的抗体识别，或在与一种合适载体偶联时能够产生识别天然肽的抗体。

肽模拟表位可通过添加、缺失或取代所选择的氨基酸用于特别的目的。因此，肽可被修饰以易于与一种蛋白载体连接。例如，对于某些化学结合方法，需要含有一个末端半胱氨酸。此外，对于肽与一种蛋白载体结合，需要包含一个远离肽结合末端的疏水末端，使肽的未结合的游离末端保持与载体蛋白表面的相互作用。从而使肽具有一种构象，这种构象与肽在整个天然分子结构中具有的构象非常相似。例如，肽可被修改来具有一个 N 末端半胱氨酸和一个 C 末端疏水的酰胺化的尾巴。另外，可以进行一种或多种氨基酸的 D 立体异构体的添加或取代，来制备一种有用的衍生物，用来例如增强肽的稳定性。

此外，肽模拟表位可通过诸如噬菌体显示技术（EP 0 552 267 B1）使用能与本发明的多肽结合的抗体来鉴定。这种技术产生大量的模拟天然肽的结构的肽序列，这些肽序列因此能够结合抗天然肽的抗体，但可能不足以与天然多肽具有明显的序列同源性。

5 疫苗

本发明的另一个方面涉及在个体特别是哺乳动物优选是人中诱导免疫应答的方法，这种方法包括用 BASB111 多核苷酸和/或多肽或其片段或变体接种个体，它们足以产生抗体和/或 T 细胞免疫应答，保护个体不被感染，特别是细菌感染，尤其是粘膜莫拉氏菌感染。本发明
10 明还提供产生这种免疫应答以延缓细菌复制的方法。本发明的另一个方面涉及在个体中诱导免疫应答的方法，包括给予这种个体一种指导 BASB111 多核苷酸和/或多肽表达或其片段或变体表达的核酸载体、序列或核酶，来在体内表达 BASB111 多核苷酸和/或多肽表达或其片段或变体，从而诱导一种免疫应答，例如产生抗体和/或 T 细胞免疫
15 应答，包括诸如产细胞因子 T 细胞或细胞毒 T 细胞，来保护所述个体，优选是人免于患病，而不管这种疾病是已经在个体中存在还是不存在。基因给药的一个例子是将其作为颗粒或其他物质的包被物来促进其进入所需的细胞。这种核酸载体可包括 DNA、RNA、核酶、修饰的核酸、DNA/RNA 杂合体、DNA 蛋白复合物或 RNA-蛋白复合物。

20 本发明的一个进一步的方面涉及一种免疫组合物，该组合物在导入个体优选是人时，能够诱导一种免疫应答，即在该个体中诱导针对 BASB111 多核苷酸和/或由其编码的多肽的免疫应答。其中组合物包含重组的 BASB111 多核苷酸和/或由其编码的多肽；和/或包含能够编码和表达所述 BASB111 多核苷酸、由其编码的多肽或本发明的其他
25 多肽的抗原的 DNA 和/或 RNA。免疫应答可用于治疗或预防目的，并且可采用抗体免疫和/或细胞免疫的形式，例如由 CTL 或 CD4 + T 细胞引起的细胞免疫。

因此，BASB111 多肽或其片段可与辅助蛋白或化学半分子融合，辅助蛋白或化学半分子能够或不能自身产生抗体，但能够使第一种蛋
30 白稳定，并产生一种融合的或修饰的蛋白，后者具有抗原性和/或免疫原性，优选是保护性。这样的融合重组蛋白优选进一步含有一种抗原性辅助蛋白，例如来自流感嗜血杆菌的脂蛋白 D、谷胱甘肽-S-转移酶

(GST) 或 β -半乳糖苷酶或其他任何能够稳定蛋白并促进其制备和纯化的大辅助蛋白。而且, 辅助蛋白在对接受该蛋白的生物体的免疫系统提供一种标准刺激时, 可用作一种佐剂。辅助蛋白可连接在第一种蛋白的氨基端或羧基端。

- 5 在本发明的疫苗组合物中, BASB111 多肽和/或多核苷酸或其片段、模拟表位(mimotope)、或变体可以存在于一种载体中, 如上述活细菌载体等活重组载体。

BASB111 多肽的无生命载体也是合适的, 例如细菌外膜囊泡(vesicle)或“小泡(bleb)”。OM 小泡衍生自革兰氏阴性细菌双层膜的外膜, 已在多种革兰氏阴性细菌包括 *C. trachomatis* 和 *C. psittaci* 中报导
10 (Zhou, L 等, 1998, FEMS 微生物通讯, 163: 223 - 228)。据报导产生小泡的细菌病原体的非限制性实例也包括: 百日咳博德特氏菌、布氏疏螺旋体、马尔他布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、嗜肺军团菌、淋病奈瑟氏菌、粘膜炎莫拉氏菌、铜绿假单胞菌和
15 小肠结肠炎耶尔森氏菌。

小泡的优势是以天然构象提供外膜蛋白, 因此在疫苗中特别有用。小泡也可以通过工程改造细菌以改变外膜上一个或多个分子的表达而用于疫苗。因此, 例如可以引入或上调(如通过改变启动子)BASB111多肽等所需的免疫原性蛋白在外膜的表达。另一种方式或者进一步,
20 不相关(如非保护性抗原或免疫优势但可变的蛋白)或有害(如 LPS 等毒性分子, 或自身免疫应答的潜在诱导物)的外膜分子的包括可以被下调。这些方式以下详述。

BASB111 基因的非编码旁侧区含有基因表达中重要的调控元件。这种调控既存在于转录水平又存在于翻译水平。这些区域(无论是基因
25 因开放阅读框的上游还是下游)的序列可以通过 DNA 测序获得。这种序列信息可以确定潜在的调控基元, 如不同的启动子元件、终止子序列、可诱导序列元件、阻遏物、负责相转变的元件, 核糖体结合序列、具有参与调控的潜在二级结构, 以及其它类型的调控基元或序列。该序列是本发明的另一方面。

30 该序列信息允许调节 BASB111 基因的天然表达。基因表达的上调也可通过改变启动子、核糖体结合序列、潜在阻遏物或操纵基因元件或任何其它有关元件。同样, 表达的下调可以通过类似的调控实现。

或者，通过改变相转变序列，基因的表达可以置于相转变控制之下，或者可以与这种调控解偶联。另一种途径是，该基因的表达可以置于一个或多个允许调节表达的可诱导元件的控制之下。这种调节的实例包括但不限于通过温度转变的诱导，加入选定碳水化合物或其衍生物等诱导底物、痕量元素、维生素、辅因子、金属离子等。

上述改变可以通过几种不同方式导入。改变参与基因表达的序列可以通过体内随机诱变然后选择所需表型来实现。另一种途径是分离目标区域，通过随机诱变或定点置换、插入或缺失诱变改变之。改变的区域可以通过同源重组重新导入细菌基因组，基因表达的效果可以被评价。另一种途径是，目标区域的序列知识可以用于置换或缺失天然调控序列的全部或部分。这种情况下，分离和改变目标调控区，以包括来自其它基因的调控元件，来自不同基因的调控元件的组合，合成调控区，或任何其它调控区，或缺失野生型调控序列的选定部分。这些改变的序列可以通过同源重组被重新导入细菌基因组中。可以用于上调基因表达的优选启动子的非限制性实例包括来自粘膜炎莫拉氏菌或淋病奈瑟氏菌的启动子 *proA*, *proB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB*; 来自 *M. Catarrhalis* 的 *TbpB*; 来自流感嗜血杆菌的 *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw2*。

在一个实例中，基因表达可以通过将其启动子换成较强的启动子（通过分离该基因的上游序列，体外修饰该序列，通过同源重组再导入基因组中）加以改变。上调的表达可以在细菌以及来自该细菌的外膜囊泡中实现。

在一个实例中，上述途径可以用来产生疫苗应用中性能改进的重组细菌菌株。这些可以是减毒菌株，选定抗原的表达增加的菌株，干预免疫应答的基因敲除（或表达降低）的菌株，免疫优势蛋白的表达改变的菌株，外膜囊泡的脱落改变的菌株，但不限于此。

因此，本发明也提供 *BASB111* 基因的变化的上游区，这些变化的区域也含有异源调控元件，其变化位于外膜蛋白的 *BASB111* 蛋白的表达水平。本发明这方面的上游区包括 *BASB111* 基因的上游序列。上游区始于 *BASB111* 基因的上游，通常延伸至 *ATG* 起始密码子上游不到约 1000bp 处。在基因位于多顺反子序列（操纵子）中时，上游区可以刚好始于目的基因之前，或操纵子第一个基因之前。优选，本

发明这方面的改变上游区含有位于 ATG 上游 500 到 700bp 位置处的异源启动子。

因此，本发明提供在改变的细菌小泡中的 BASB111 多肽。本发明也提供能够产生基于非生命膜的小泡载体的修饰宿主细胞。本发明还提供含有 BASB111 基因的核酸载体，所述基因具有含有异源调控元件的改变上游区。

本发明还提供制备本发明的宿主细胞和细菌小泡的方法。

本发明也提供含有本发明的多肽和/或多核苷酸以及免疫调节 DNA 序列如 Sato, Y.《科学》273: 352 (1996) 中介绍的 DNA 序列的组合物，特别是疫苗组合物，以及方法。

本发明还提供在粘膜炎莫拉氏菌感染的动物模型的这种遗传免疫实验中所用的多核苷酸结构物中使用所介绍的多核苷酸或其特殊片段的方法，其中多核苷酸或其特殊片段已经显示编码细菌细胞表面蛋白的非可变区。这种实验可特别用于鉴定能够激发预防性或治疗性免疫应答的蛋白表位。可以相信，这种方法将能够用于随后成功地抵抗或清除了感染的动物的必需的器官，制备有特殊价值的单克隆抗体，用于发展哺乳动物特别是人的治疗细菌性感染特别是奈瑟氏菌感染的预防性试剂或治疗性试剂。

本发明还包括疫苗制剂，这种制剂包括本发明的一种免疫原性重组多肽和/或多核苷酸以及一种合适的载体，例如一种可药用载体。因为多肽和多核苷酸可能在胃中会被打断，它们都优选经肠道外给药，包括诸如皮下、肌肉、静脉或皮内，适用于肠道外给药的制剂包括水和非水的无菌注射溶液，它们可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和能够使制剂与个体的体液优选是血液等渗的溶剂，以及可包含悬浮剂或增稠剂的水和非水无菌悬液。制剂可置于单剂量或多剂量的容器内，例如密封的安瓶和小瓶，并可贮存于冷冻干燥的环境，只需在使用前加入无菌的液体载体。

本发明的疫苗制剂也可包括佐剂系统，用来增强制剂的免疫原性。优选佐剂系统优先引发 TH1 型应答。

免疫应答大体上可分为两个典型的种类，即体液或细胞介导的免疫应答（一般分别用其保护作用的抗体和细胞效应机制来区分）。这些应答种类被称为 TH1 型应答（细胞介导的应答）和 TH2 型免疫应

答（体液应答）。

典型的 TH1 型免疫应答的特征是产生抗原特异的单元型限制的细胞毒 T 淋巴细胞和自然杀伤型细胞应答。在小鼠中，TH1 型应答的特征通常是产生 IgG2a 亚型的抗体，而在人中，它们的对应物是 IgG1 型抗体。TH2 型免疫应答的特征是产生广谱的免疫球蛋白同种型，在小鼠中包括 IgG1、IgA 和 IgM。

可以想象得到，这两种类型的免疫应答之后的驱动力是细胞因子。高水平的 TH1 型细胞因子优先诱导针对所给抗原的细胞介导的免疫应答，而高水平的 TH2 型细胞因子优先诱导针对抗原的体液免疫应答。

TH1 和 TH2 型免疫应答的区分不是绝对的。事实上，一个个体可以支持一种被描述为 TH1 优势或 TH2 优势的免疫应答。但是，通常方便地按照 Mosmann 和 Coffman 在鼠 CD4+ve T 细胞克隆中的介绍来考虑细胞因子的家族（Mosmann, T.R. 和 Coffman, R.L. (1989), TH1 和 TH2 细胞：淋巴因子的不同分泌模式导致不同的功能特性。《免疫学年鉴》7 卷，145-173 页）。通常，TH1 型应答与 T 淋巴细胞产生 INF- γ 和 IL-2 细胞因子相关。其他通常直接与 TH1 型免疫应答诱导有关的细胞因子如 IL-12 不由 T 细胞产生。相反，TH2 型应答与 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13 的分泌有关。

已知特定的疫苗佐剂特别适合于刺激 TH1 或 TH2 型细胞因子应答。疫苗接种或感染后免疫应答的 TH1：TH2 平衡的最佳指标通常包括在体外用抗原再刺激后直接测量 T 淋巴细胞产生的 TH1 或 TH2 细胞因子，和/或测量抗原特异的抗体应答的 IgG1：IgG2a 比率。

因此，TH1 型佐剂是在体外用抗原再刺激时优先刺激分离的 T 细胞群体产生高水平的 TH1 型细胞因子和促进 CD8+细胞毒 T 淋巴细胞和与 TH1 型同种型相关的抗原特异的免疫球蛋白应答产生的佐剂。

能够优先刺激 TH1 细胞应答的佐剂在国际专利申请 No.WO94/00153 和 WO95/17209 中介绍。

3 De-O-酰化单磷酸类脂 A（3D-MPL）是一种这样的佐剂。这可由 GB2220211（Ribi）知道。它在化学上是 3 De-O 酰化单磷酸类脂 A 与 4、5 或 6 酰基链的混合物，并由 Ribi Immunochem, Montana 制造。3 De-O-酰化单磷酸类脂 A 的一种优选形式在欧洲专利 0 689 454（SmithKline Beecham Biologicals SA）中公开。

3D-MPL 颗粒优选小到足以通过一个 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤除菌（欧洲专利 0 689 454）。

3D-MPL 以每剂 10 μg -100 μg ，优选是 20-25 μg 的范围存在，而抗原通常以每剂 2-50 μg 的范围存在。

- 5 另一个优选的佐剂包含 QS21，它是一种来自 *Quillaja Saponaria* Molina 的茎的 Hplc 纯化的无毒组分。它可选用来与 3 De-O-酰化单磷酸类脂 A（3D-MPL）混合，并可与一种载体一起使用。

制备 QS21 的方法在美国专利 No.5,057,540 中公开。

- 10 含有 QS21 的非反应性的佐剂制剂在以前已有介绍（WO 96/33739）。含有 QS21 和胆甾醇的这种制剂在与抗原一起配制时已显示是成功的 TH1 刺激佐剂。

优先刺激 TH1 型细胞应答的进一步的佐剂包括免疫调节性的寡核苷酸，例如非甲基化的 CpG 序列，如 WO 96/02555 中的公开。

- 15 不同 TH1 刺激性佐剂如上文所介绍的佐剂的组合也被认为是能提供一种优先刺激 TH1 型细胞应答的佐剂。例如，QS21 可与 3D-MPL 组合配制。OS21：3D-MPL 的比率通常为 1：10 至 10：1，优选为 1：5 至 5：1，并且通常为大约 1：1。优选的最佳组合范围是 2.5：1 至 1：1 的 3D-MPL：QS21。

- 20 根据本发明，疫苗组合物还优选含有一种载体。载体可以是一种水包油乳剂，或一种铝盐如磷酸铝或氢氧化铝。

水包油乳剂优选包含一种可代谢的油，例如角鲨烯、 α -生育酚和 Tween 80。在一个特别优选的方面，根据本发明，疫苗组合物中的抗原与 QS21 和 3D-MPL 在这样一种乳剂中组合。另外，该水包油乳剂可以含有 span 85 和/或卵磷脂和/或三辛精。

- 25 在对人给药时，疫苗中 QS21 和 3D-MPL 的范围是每剂 1 μg -200 μg ，例如 10-100 μg ，优选是 10 μg -50 μg 。水包油通常含有 2 至 10% 的角鲨烯、2 至 10% 的 α -生育酚和 0.3 至 3% 的 Tween 80。在以更稳定的乳剂形式提供时，角鲨烯： α -生育酚：Tween 80 的比例优选相同或少于 1。还可包含 1% 水平的 Span85。在某些情况下，本发明的疫苗
30 优选进一步含有一种稳定剂。

非毒性的水包油乳剂优选在一种水载体中含有一种非毒性的油如角鲨烷或角鲨烯、一种乳化剂如 Tween 80。水载体可以是例如磷酸缓

冲盐水。

WO 95/17210 中介绍了一种特别强有力的佐剂制剂，它含有在一种水包油乳剂中的 QS21、3D-MPL 和生育酚。

5 本发明还提供一种多价的疫苗组合物，它含有本发明的疫苗制剂以及其他抗原，特别是对治疗癌症、自身免疫疾病和相关病症有用的抗原。这样一种多价疫苗组合物可包括一种如前所述的 TH1 诱导型佐剂。

10 虽然本发明对特定的 BASB111 多肽和多核苷酸进行了介绍，但应当理解它们覆盖了天然产生的多肽和多核苷酸以及含有添加、缺失或取代的相似多肽和多核苷酸，这些添加、缺失或取代基本上不影响重组多肽或多核苷酸的免疫原特征。

组合物、试剂盒和给药

15 在本发明的一个进一步的方面，提供含有用于对一个细胞或一个多细胞生物体给药的 BASB111 多核苷酸和/或 BASB111 多肽的组合物。

20 本发明还涉及含有这里讨论的多核苷酸和/或多肽或它们的激动剂或拮抗剂的组合物。本发明的多肽和多核苷酸可与一种非无菌或无菌载体或用于细胞、组织或生物体的载体，例如一种适用于对个体给药的药用载体组合使用。这种组合物包括例如一种介质添加剂或一种治疗有效剂量的本发明的多肽和/或多核苷酸以及一种可药用载体或赋形剂。这种载体可包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇以及它们的组合物。制剂应适合于给药模式。本发明进一步涉及

25 诊断和药用包装和试剂盒，它们含有一种或多种容器，容器中装有一种或多种本发明的上面提到的成分。

本发明的多肽、多核苷酸和其他化合物可单独或与其他化合物例如治疗性化合物一起使用。

药用组合物可通过任何有效、传统的方式进行给药，包括诸如通过局部、口、肛门、阴道、静脉内、腹膜内、肌肉、皮下、鼻内或皮内途径及其他途径进行给药。

30 在用于治疗或预防时，活性试剂可以一种可注射的组合物形式给药于个体，例如以无菌水分散物优选是等渗的形式给药。

在一个进一步的方面，本发明提供药用组合物，它包含一种治疗

有效剂量的多肽和/或多核苷酸例如本发明的多肽和/或多核苷酸的可溶形式、激动剂或拮抗剂或小分子化合物、以及一种可药用载体或赋形剂。这种载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇以及它们的组合物。本发明进一步涉及药用包装和试剂盒，它们含有一种或多种容器，容器中装有一种或多种本发明的上面提到的成分。本发明的多肽、多核苷酸和其他化合物可单独或与其他化合物例如治疗性化合物一起使用。

组合物应采用一种给药途径，例如通过一种全身性或经口途径。全身性给药的优选形式包括注射，通常通过静脉注射。其他的注射途径例如皮下、肌肉或腹膜都可以采用。全身性给药的其他方法包括使用渗透剂如胆盐或梭链孢酸或其他去污剂经粘膜和皮肤给药。此外，如果本发明的一种多肽或其他化合物可配制成一种肠溶或一种胶囊制剂，经口途径也可以使用。这些化合物的给药也可经表皮和/或局部，以药膏、帖膏、凝胶、溶液、粉末等形式使用。

为对哺乳动物特别是人进行给药，活性试剂的每日剂量水平应从0.01 mg/kg 至 10 mg/kg，通常为 1 mg/kg 左右。在任何情况下，医生应确定最适合于个体的实际剂量，并根据年龄、体重和特殊个体的应答而不同。当然，在个体情况时，可以使用更高或更低的剂量范围，这些也都在本发明的范围内。

所需的剂量范围依赖于所选择的肽、给药途径、制剂的性质、用药者病症的性质以及医师的判断。但合适的剂量为每 kg 0.1-100 μ g 的范围。

疫苗组合物一般采用注射形式。传统的佐剂可用来增强免疫应答。疫苗接种的合适单位剂量为 0.5-5 μ g/kg 的抗原，这样的剂量优选给药1-3 次、间隔 1-3 周。对于指定的剂量范围，本发明的化合物在给药于合适的个体时，不会观察到毒副作用。

但考虑到可以使用不同的化合物以及不同给药途径可产生不同的效果，所需的剂量有广泛的变化。例如，口服途径比静脉注射需要更高的剂量。这些剂量水平的变化可按照本领域熟知的方法使用标准的优化实践途径进行调整。

序列数据库、有形介质中的序列以及算法

多核苷酸和多肽序列组成了有价值的信息来源，用来确定它们的

二维和三维结构以及进一步鉴定相似同源的序列。这些方法可很方便地通过下述步骤来进行, 即将它们存入计算机可读介质, 然后将数据存入一个已知的大分子结构程序或使用熟知的搜索工具如 GCG 程序包搜索一个序列数据库。

5 本发明还提供分析特征序列或链特别是基因序列或编码蛋白序列的方法。优选的序列分析的方法包括: 诸如序列同源性分析方法如同—性和相似性分析、DNA、RNA 和蛋白结构分析、序列排列、进化分析、序列基元分析、开放阅读框确定、核酸碱基召唤、密码子使用分析、核酸碱基整理、和序列层析峰分析。

10 本发明提供了一种以计算机为基础的方法, 用于进行同源性鉴定。此方法包括以下步骤: 提供在一种计算机可读介质中的含有本发明的一种多核苷酸序列的第一个多核苷酸序列, 将所述第一个多核苷酸与至少一种第二个多核苷酸或多肽序列比较, 来确定同源性。

本发明提供了一种以计算机为基础的方法, 用于进行同源性鉴定。
15 所述方法包括以下步骤: 提供在一种计算机可读介质中的含有本发明的一种多肽序列的第一个多肽序列, 将所述第一个多肽序列与至少一种第二个多核苷酸或多肽序列比较, 来确定同源性。

本申请书中引用的所有出版物和参考文献, 包括但不限于专利和专利申请, 在这里都全文引入作为参考, 如同它们各自都特别地和个别地在此全文列出。本申请要求优先权的任何专利申请也以与上面对
20 出版物和参考所介绍的相同方式在此全文引入作为参考。

定义

“同一性”如同本领域所熟知的, 是两种或多种多肽序列或两种或多种多核苷酸序列之间的相关性, 根据具体情况, 可通过序列比较
25 来确定。在本领域, “同一性”还指多肽或多核苷酸序列之间序列相关的程度, 根据具体情况, 可通过这些序列的链的匹配来确定。“同一性”可使用已知的方法方便地计算, 包括但不限于(《计算分子生物学》, Lesk, A.M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; 《生物计算机: 信息和基因组计划》Smith, D.W.编辑, Academic Press, New York, 1993; 《序
30 列数据的计算机分析》I 部分, Griffin, A.M.和 Griffin, H.G.编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; 《分子生物学中的序列分析》von Heine, G., Academic Press, 1987; 和《序列分析引物》Gribskov, M.和 Devereux, J.

编辑, M Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo, H.和 Lipman, D.,
《SIAM J. Applied Math》48: 1073(1988)。测定同一性的方法被设计来
给出检测序列之间的最大匹配。而且, 测定同一性的方法在公众可获得
的计算机程序中编码。用来测定两种序列之间的同一性的计算机程
序方法包括但不限于 GCG 程序包中的 GAP 程序 (Devereux, J.等《核
酸研究》12 (1): 387 (1984)、BLASTP、BLASTN (Altschul, S.F.等《分
子生物学杂志》215: 403-410 (1990) 以及 FASTA (Pearson 和 Lipman
《美国科学院院刊》85: 2444-2448 (1988)。BLAST 程序家族可从 NCBI
和其他来源获得(《BLAST 手册》Altschul, S.等, NCBI NLM NIH Bethesda,
MD 20894; Altschul, S.等《分子生物学杂志》215: 403-410 (1990)。
著名的 Smith Waterman 算法也可用来测定同一性。

多肽序列比较的参数包括以下:

算法: Needleman 和 Wunsch, 《分子生物学杂志》48: 443-453
(1970)

比较矩阵: Henikoff 和 Henikoff 的 BLOSSUM62

《美国科学院院刊》89: 10915-10919 (1992)

缺口补偿: 8

缺口长度补偿: 2

使用这些参数的程序可以从 Genetics Computer Group, Madison WI
以“缺口”程序的形式获得。上述参数是多肽比较的缺省参数(对末端
缺口无补偿)。

多核苷酸序列比较的参数包括以下:

算法: Needleman 和 Wunsch, 《分子生物学杂志》48: 443-453
(1970)

比较矩阵: 匹配=+10, 不匹配=0

缺口补偿: 50

缺口长度补偿: 3

来源: Genetics Computer Group, Madison WI 的“缺口”程序。
上述参数是核酸比较的缺省参数。

多核苷酸和多肽的“同一性”的优选含义根据情况在下面(1)和
(2)中提供。

(1) 多核苷酸实施方案进一步包括含有如下核苷酸序列的分离多

核苷酸，该核苷酸序列与 SEQ ID NO: 1 的参考序列至少具有 50、60、70、80、85、90、95、97 或 100% 的同一性，其中所述多核苷酸序列可以与 SEQ ID NO: 1 的参考序列相同，或者与参考序列相比，可包括一定数量的核苷酸改变，其中这种改变可以选自至少一个核苷酸缺失、置换（包括转换和颠换）或插入，其中所述改变可以发生在参照多核苷酸序列的 5' 或 3' 末端或两个末端之间的任何位置，分别散布在参照序列的核苷酸之间，或者以一个或多个毗连群散布在参照序列中，其中核苷酸改变的数量如下确定：SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数乘以相应同一性百分数（除以 100），然后将其结果从 SEQ ID NO: 1 的总核苷酸数中减除，或者：

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y)$$

其中 n_n 是核苷酸改变的数目， x_n 是 SEQ ID NO: 1 中的核苷酸总数， y 对 50% 来说是 0.50，对 60% 来说是 0.60，对 70% 来说是 0.70，对 80% 来说是 0.80，对 85% 来说是 0.85，对 90% 来说是 0.90，对 95% 来说是 0.95，对 97% 来说是 0.97，对 100% 来说是 1.00，而 $\bullet$ 是乘法运算的符号，对 x_n 和 y 的结果不是整数，则将其四舍五入取最近的整数，再从 x_n 中减除。编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的多核苷酸的改变可能在该编码序列中产生无义、错义或移码突变，因此改变后的多核苷酸编码的多肽会发生变化。

例如，本发明的多核苷酸序列可以与 SEQ ID NO: 1 的参照序列相同，即同一性为 100%，或者与参照序列相比包括一定数量的核苷酸改变，因此同一性小于 100%。这种改变可以选自至少一个核苷酸缺失、置换（包括转换和颠换）或插入，其中所述改变可以发生在参照多核苷酸序列的 5' 或 3' 末端或两个末端之间的任何位置，分别散布在参照序列的核苷酸之间，或者以一个或多个毗连群散布在参照序列中。核苷酸改变的数量如下确定：SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数乘以相应同一性百分数（除以 100），然后将其结果从 SEQ ID NO: 1 的总核苷酸数中减除，或者：

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y)$$

其中 n_n 为核苷酸改变数量, x_n 为 SEQ ID NO: 1 的总核苷酸数, y 值在 70% 时为 0.70, 在 80% 时为 0.80, 在 85% 时为 0.85, 依此类推, $\bullet$ 为乘法运算的符号, 其中若 x_n 和 y 的结果不是整数, 则将其四舍五入取最近的整数, 再从 x_n 中减除。

(2) 多肽实施方案进一步包括含有如下多肽序列的分离多肽, 该多肽序列与 SEQ ID NO: 2 的参考序列至少具有 50、60、70、80、85、90、95、97 或 100% 的同一性, 其中所述多肽序列可以与 SEQ ID NO: 2 的参考序列相同, 或者与参考序列相比, 可包括一定数量的氨基酸改变, 其中所述改变选自至少一个氨基酸缺失、取代 (包括保守性或非保守性取代) 或插入, 而且所述改变可发生在参考多肽序列的氨基或羧基末端位置或这些末端位置之间的任何地方、分别散布在参考序列的氨基酸中或者以一个或多个毗连群散布在参考序列中, 并且所述氨基酸改变的数目如下确定: SEQ ID NO: 2 中的总氨基酸数乘以相应同一性百分数 (除以 100), 然后将其结果从 SEQ ID NO: 2 的总氨基酸数中减除, 或者:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y)$$

其中 n_a 为氨基酸改变数量, x_a 为 SEQ ID NO: 2 中的氨基酸总数, y 对 50% 来说是 0.50, 对 60% 来说是 0.60, 对 70% 来说是 0.70, 对 80% 来说是 0.80, 对 85% 来说是 0.85, 对 90% 来说是 0.90, 对 95% 来说是 0.95, 对 97% 来说是 0.97, 对 100% 来说是 1.00, 而 $\bullet$ 是乘法运算的符号, 若 x_a 和 y 的结果不是整数, 则将其四舍五入取最近的整数, 再从 x_a 中减除。

例如, 本发明的多肽序列可以与 SEQ ID NO: 2 的参照序列相同, 即同一性为 100%, 或者与参照序列相比包括一定数量的氨基酸改变, 因此同一性小于 100%。这种改变可以选自至少一个氨基酸缺失、置换 (包括保守和非保守置换) 或插入, 其中所述改变可以发生在参照多肽序列的氨基或羧基末端或两个末端之间的任何位置, 分别散布在参照序列的氨基酸之间, 或者以一个或多个毗连群散布在参照序列中。同一性百分数一定时氨基酸改变的数量如下确定: SEQ ID NO: 2

中的总氨基酸数乘以相应同一性百分数（除以 100），然后将其结果从 SEQ ID NO: 2 的总氨基酸数中减除，或者：

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y)$$

5

其中 n_a 为氨基酸改变数量， x_a 为 SEQ ID NO: 2 的总氨基酸数， y 值在 70% 时为 0.70，在 80% 时为 0.80，在 85% 时为 0.85，依此类推，而 $\bullet$ 是乘法运算的符号，其中若 x_a 和 y 的结果不是整数，则将其四舍五入取最近的整数，再从 x_a 中减除。

10

“个体”在用于此处指示一种生物体时，是指一种多细胞真核生物，包括但不限于后生动物、哺乳动物、卵生动物、牛科、猿、灵长动物和人。

15

“分离的”表示“通过人工”改变其天然状态，即如果“分离的”组合物或物质在自然界中存在，则它已经从其原始环境改变或取出或者已经取出并改变。例如，在本文中使用该术语时，在活动物体内存存在的多核苷酸或多肽不是“分离的”，但已经与天然状态下共存物质分开的同样多核苷酸或多肽就是“分离的”。而且，一种多核苷酸或多肽在通过转化、遗传操作或任何其他重组方法导入一种生物体时，即使它仍然存在于所述生物体中，它也是“分离”的，该生物体

20

可以是活的或死的。

“多核苷酸”一般指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸，它可以是修饰或非修饰的 RNA 或 DNA，包括单链和双链区域。

25

“变体”指不同于参照多核苷酸或多肽但保留了基本特性的多核苷酸或多肽。一般多核苷酸变体的核苷酸序列与参照多核苷酸不同。变体核苷酸序列的变化可能改变或不改变由参照多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。如下所述，核苷酸改变可能导致参照序列编码的多肽中氨基酸的置换、添加、缺失、融合和截短。一般多肽变体的氨基酸序列与参照多肽不同。通常，差异有限，因此参照多肽和变体的序列在总体上是极其近似的，在许多区域是相同的。变体和参照多肽在氨基酸序列上可以有任何组合形式的一个或多个置换、添加、缺失的区别。置换或插入的氨基酸残基可以是或不是遗传密码编码的氨基酸。多核苷酸或多肽的变体可以是天然存在的，如等位变体，或者是非天

30

然存在的。非天然存在的多核苷酸和多肽变体可以通过诱变技术或直接合成制备。

“疾病”是指任何由细菌感染导致或与之有关的疾病，包括诸如婴幼儿中耳炎、老年人肺炎、鼻窦炎、医院内感染和侵袭性疾病、伴有听力丧失的慢性中耳炎、中耳积液、听神经损害、说话延迟、上呼吸道感染和中耳炎症。

实施例

下面的实施例使用标准的技术进行，这些技术对本领域的技术人员来说是熟知的和常规的，除非它们在其他地方详细介绍。实施例是说明性的，不能限制本发明。

实施例 1: 粘膜炎莫拉氏菌菌株 ATCC 43617 中 BASB111 基因的发现和验证性 DNA 测序

粘膜炎莫拉氏菌菌株 ATCC 43617 (也称为 MC2931) 的 BASB111 基因序列示于 SEQ ID NO: 1。SEQ ID NO: 2 中所示为 BASB111 多核苷酸序列的翻译结果。

实施例 2: 表达重组 BASB111 的质粒的构建

A: BASB111 的克隆

将 EcoRI 和 SalI 限制位点分别插入正向 MC-Lip2-Fn/t-RI (5'-AGG CAG AGG GAA TTC ATG AAT TTT GGT AAA ATT AAT GG-3', SEQ ID NO:3)和反向 MC-Lip2RCh/t-Sal (5'-AGG CAG AGG GTC GAC TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CCA GCC TTT GAT AAC ACC ATC TT-3', SEQ ID NO:4)扩增引物，它们允许 PCR 产物定向克隆至大肠杆菌表达质粒 pTLZ2 中，使得 BASB111 蛋白可以表达成 C 末端含有(His)₆亲和层析标志的融合蛋白。BASB111 PCR 产物使用硅胶基自旋柱 (QiaGen) 按照厂商说明由扩增产物中纯化。为了产生克隆所需的 EcoRI 和 SalI 末端，纯化的 PCR 产物用 EcoRI 和 SalI 限制酶按照厂商 (Life Technologies) 说明依次消化完全。

第一次限制消化后，PCR 产物同上通过自旋柱纯化以除去盐，在第二次酶消化之前，用无菌水洗脱。消化的 DNA 片段在与 pTLZ2 质

粒连接前使用硅胶基自旋柱再次纯化。

B: 表达载体制备

为了制备连接用的表达质粒 pTLZ2, 将其用 EcoRI 和 SalI 同样消化完全, 然后按照厂商说明用牛肠磷酸酶 (CIP, 约 0.02 单位/皮摩尔 5'末端, Life Technologies) 处理以防止自身连接。将相对制备的载体约 5 倍摩尔过量的消化片段用来进行连接反应。标准的 20 μ l 连接反应 (约 16 $^{\circ}$ C, 约 16 小时) 利用本领域已知的技术使用 T4 DNA 连接酶 (约 2.0 单位/反应, Life Technologies) 进行。连接反应 (约 5 μ l) 的等分试样按照本领域已知技术用来转化电感受态 JM109 细胞。在约 1.0 毫升 LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 下生长约 2-3 小时后, 转化细胞涂布于含有氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的 LB 琼脂平板上。在选择培养基中包括抗生素。平板在 37 $^{\circ}$ C 温育约 16 小时。单独的 ApR 菌落用无菌牙签挑出, “片状” 接种新鲜 LB ApR 平板以及约 1.0 ml LB ApRR 培养液。片状平板和培养液在标准温育箱 (平板) 或水浴摇床上 37 $^{\circ}$ C 温育。

进行全细胞 PCR 分析以确证转化子含有 BASB111 DNA 插入物。将约 1.0 毫升 LB Ap 过夜培养物转移到 1.5 毫升聚丙烯管中, 在 Beckman 离心机中离心收集细胞 (约 3 分钟, 室温, 约 12000 $\times$ g)。细胞沉淀重悬于约 200 μ l 无菌水中, 约 10 μ l 等分试样用于进行终体积约 50 μ l 的 PCR 反应, 其中含有 BASB111 正向和反向扩增引物。PCR 反应成分的终浓度基本上与实施例 2 中相同, 但使用约 5 单位 Taq 聚合酶。开始的 95 $^{\circ}$ C 变性步骤增加到 3 分钟以确保细菌细胞的热裂解和质粒 DNA 的释放。使用 ABI 9700 型热循环仪, 进行 32 循环的 3 步热循环, 循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 45 秒; 55-58 $^{\circ}$ C 45 秒; 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 以扩增裂解的转化子样品的 BASB111 PCR 片段。热循环后, 取约 20 μ l 反应等分试样通过琼脂糖凝胶电泳 (Tris-乙酸-EDTA(TAE)缓冲液中的 0.8% 琼脂糖) 进行分析。凝胶电泳后使用 UV 照射和溴化乙锭染色显示 DNA 片段。DNA 分子量标准 (1 Kb 梯度, Life Technologies) 与试样平行电泳, 用于估计 PCR 产物的大小。产生预期 PCR 产物的转化子鉴定为含有 BASB111 表达构建体的菌株。然后分析含有表达质粒的菌株中重组 BASB111 的诱导表达。

C: PCR 阳性转化子的表达分析

对于以上鉴定的每一个 PCR 阳性转化子, 约 5 毫升含有氨苄青霉

素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 的 LB 培养液用来自片状平板的细胞接种, 37°C 振荡 (约 250 rpm) 生长过夜。过夜种子培养物的等分试样 (约 1.0 ml) 接种含有约 25 毫升 LB Ap 培养液的 125 毫升烧瓶中, 37°C 振荡 (约 250 rpm) 生长过夜, 直至培养物浊度达到 O.D.600 约为 0.5, 即中数期 (通常需约 1.5 到 2.0 小时)。此时, 约一般培养物 (约 12.5 ml) 被转移到第二个 125 毫升烧瓶中, 通过加入 IPTG (无菌水中制备的 1.0 M 原液, Sigma) 至终浓度 1.0 mM 诱导重组 BASB111 蛋白的表达。IPTG 诱导和未诱导培养物在 37°C 下再振荡温育约 4 小时。诱导和未诱导培养物样品 (约 1.0 毫升) 在诱导期后取出, 室温下在离心机中离心约 3 分钟收集细胞。单独的细胞沉淀悬浮于约 50 μl 无菌水中, 然后与等体积含有 2-巯基乙醇的 2 $\times$ Laemmli SDS-PAGE 样品缓冲液混合, 置于沸水浴中约 3 分钟以变性蛋白。等体积 (约 15 μl) IPTG 诱导和未诱导细胞粗裂解物上样于两块 12% Tris/甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶 (1 mm 厚 Mini-gels, Novex)。诱导和未诱导裂解物样品与预先染色的分子量标记 (SeeBlue, Novex) 在常规条件下一起电泳, 使用标准 SDS/Tris/甘氨酸电泳缓冲液 (BioRad)。电泳后, 一块凝胶用考马斯亮蓝 R250 (BioRad) 染色, 然后脱色以显示新的 BASB111 IPTG 诱导蛋白。第二块凝胶使用 BioRad Mini-Protein II 印迹装置和 Towbin 甲醇 (20%) 转移缓冲液在 4°C 下电印迹约 2 小时转移到 PVDF 膜 (0.45 微米孔径, Novex)。膜的封闭和抗体温育按照本领域已知技术进行。使用单克隆抗 RGS(His)3 抗体, 然后是缀合有 HRP (QiaGen) 的兔抗小鼠抗体, 以确证 BASB111 重组蛋白的表达和身份。使用 ABT 不溶底物或使用 Amersham ECL 化学发光系统的 Hyperfilm 显示抗 His 抗体反应性特征。

实施例 4: 产生重组 BASB111

细菌菌株

含有编码粘膜炎莫拉氏菌 BASB111 的质粒 (pTLZ2) 的大肠杆菌 JM109 重组表达菌株被用来产生纯化重组蛋白的细胞群体。表达菌株在 LB 琼脂平板上培养, 平板中含有 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素 (Ap) 以确保 pTLZ2 质粒存在。为了在 -80°C 下冷藏, 菌株在含有相同浓度的抗生素的 LB 培养液中增殖, 然后与等体积含有 30% (w/v) 甘油的 LB 培养

液混合。

培养基

用于产生重组蛋白的发酵培养基为含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Ap 的 2X YT 培养液(Difco)。向发酵罐中的培养基加入消泡剂至 0.25 ml/L (Antifoam
5 204, Sigma)。为了诱导 BASB111 重组蛋白的表达, 向发酵罐中加入 IPTG (异丙基 β -D-硫代半乳糖吡喃苷)(1 mM, 终浓度)。

发酵

含有 50 毫升工作体积的 500 毫升种子培养烧瓶中接种 0.3 毫升迅速解冻的冰冻培养物或来自选择性琼脂平板上的几个菌落, 在摇床
10 (Innova 2100, New Brunswick Scientific) 上以 150rpm 在 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 温育约 12 小时。该种子培养物用来接种含有 2X YT 培养液和 Ap、工作体积为 5 升的发酵罐。发酵罐 (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) 的运行条件为 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、0.2-0.4 VVM 通气、Rushton 叶轮 250rpm。烧瓶种子培养物和发酵罐中的 pH 无需控制。发酵期间, 发酵罐中的 pH
15 为 6.5 到 7.3。当培养物达到生长的中对数期时 (O.D. 600 为约 0.7 单位), 向发酵罐中加入 IPTG (1.0 M 原液, 在无菌水中制备)。诱导细胞 2-4 小时, 然后, 使用 28RS Heraeus (Sepatech) 或 RC5C 超速离心机(Srovall Instruments)离心收集细胞。细胞沉淀保存在 -20°C 待用。

纯化

20 化学药品和材料

生物技术级或更高级别咪唑、盐酸胍、Tris(羟甲基)和 EDTA(乙二胺四乙酸)均获自 Ameresco Chemical, Solon, Ohio。Triton X-100(叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)、Triton X-114、一价磷酸钠、尿素均为试剂级或更优级别, 均获自 Sigma Chemical Company, St. Louis,
25 Missouri。冰乙酸和盐酸获自 Mallincrodt Baker Inc., Phillipsburg, New Jersey。甲醇获自 Fisher Scientific, Fairlawn, New Jersey。Pefabloc®SC (4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟)、全蛋白酶抑制剂混合物片剂和 PMSF(苯甲基-磺酰氟)获自 Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Indiana。苯丁抑制素、抑胃酶肽 A 和 E64 蛋白酶抑制剂获自 Calbiochem,
30 La Jolla, California。Dulbecco's 磷酸缓冲盐水 (1×PBS) 获自 Quality Biological, Inc., Gaithersburg, Maryland。Dulbecco's 磷酸缓冲盐水 (10×PBS) 获自 BioWhittaker, Walkersville, Maryland。无 BSA 的五 His

抗体获自 QiaGen, Valencia, California. 过氧化物酶耦联的亲合纯级羊抗小鼠 IgG 获自 Jackson Immuno Research, West Grove, Penn. AEC 溶液获自 Zymed, South San Francisco, California. 所有其它试剂均为试剂级或更高级别。

- 5 Ni 螯合 Sepharose 速流树脂获自 Pharmacia, Sweden, California. 预制 Tris-甘氨酸 4 - 20 % 和 10 - 20 % 聚丙烯酰胺凝胶、所有电泳缓冲液和溶液、SeeBlue 预先染色标准、多标记多色标准和 PVDF 转移膜获自 Novex, San Diego, California. SDS - PAGE 银染试剂盒获自 Daiichi Pure Chemicals Company Limtid, Toyko, Japan. 考马斯染色溶液获自
- 10 Bio-Rad Laboratories, Hercules, California. Acrodisc®PF 0.2m 注射器式过滤器获自 Pall Gelman Science, Ann Arbor, Michigan. GD/X 25mm 一次性注射器式过滤器获自 Whatman Inc., Clifton, New Jersey. 透析管 8,000 MWCO 获自 BioDesign Inc. Od New York, Carmak New York. BCA 蛋白分析试剂和 Snake Skin 透析管 3,500 MWCO 获自 Pierce Chemical Co.
- 15 Rockford, Illinois.

由大肠杆菌中纯化重组 BASB111

提取纯化

- 细胞沉淀在室温解冻 30 到 60 分钟。细胞沉淀破碎后,用含有 Triton X-114 的冰冷 PBS 分配上清。除去细胞,上清加热到 37°C,离心分离
- 20 各相。该级分然后过镍螯合 Sepharose 速流树脂,树脂预先用含有 10 % 甘油和 0.05% Triton X100 的 PBS (pH7.5) 平衡过。蛋白用含有 200 mM 咪唑的相同缓冲液洗脱。收集含有洗脱蛋白的级分并在 10 kDa 截止搅拌室中浓缩,然后对含有 0.1% Triton X100 的 PBS 透析。

- 如图 1A 所示,纯化 BASB111 蛋白在 SDS - PAGE 分析时为约 36
- 25 kDa (估计相对分子量)迁移的双带。纯度估计大于 90 %。两个带对小鼠抗 6 组氨酸基元单克隆抗体均有反应 (图 1B)。

生化鉴定

SDS - PAGE 和蛋白印迹分析

- 重组纯化蛋白在 4 - 20 % 聚丙烯酰胺凝胶上分离,如前所述在 100V
- 30 下 1 小时电转移到 PVDF 膜上 (Thebaine 等, 1979, 美国国家科学院院刊, 76: 4350 - 4354)。PVDF 膜然后用 25 ml 含有 5 % 无脂奶粉的 Dulbecco's 磷酸缓冲盐水预处理。所有进一步的温育均使用该预处理

缓冲液进行。

PVDF 膜用 25 毫升 1: 500 稀释的预先免疫血清获自兔抗 His 免疫血清在室温温育 1 小时。然后用洗涤缓冲液 (20 mM Tris 缓冲液, pH7.5, 含有 150mM 氯化钠和 0.05% Tween-20) 洗膜两次。PVDF 膜
5 然后用 25 毫升 1: 5000 稀释的过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 室温温育 30 分钟。PVDF 膜然后用洗涤缓冲液洗涤 4 次, 用 Zymed (San Francisco, CA) 提供的 3-氨基-9-乙基咔唑和脲过氧化物各显色 10 分钟。

10 实施例 5: 产生重组 BASB111 抗血清

多价抗 BASB111 蛋白血清通过用纯化重组 BASB111 蛋白免疫两只或者四只兔子产生。每只动物通过皮下注射给予 3 次免疫, 每次 10 μ g BASB111 蛋白, 间隔约 21 天。在首次免疫之前 (前血样) 和 49 天、56 天, 由动物取血。针对 BASB111 蛋白的多价血清通过用纯化重组 BASB111
15 蛋白免疫小鼠 6 次产生。每只动物皮下免疫二或三次, 每次注射约 10 μ g BASB111 蛋白, 间隔约 14 天。在首次免疫之前 (前血样) 和最后一次免疫后一周, 由动物取血。抗 BASB111 蛋白滴度使用纯化重组 BASB111 蛋白 (4 μ g/孔) 通过 ELISA 测定。该滴度定义为使用 XL Fit 软件通过 4 参数逻辑模型计算的中点滴度。兔子和小鼠血清中, 免疫后滴度分别为
20 1: 270000 和 1: 46500。抗血清用作第一抗体, 以如下实施例 7 所述在蛋白质印迹中鉴定蛋白。蛋白质印迹表明在免疫动物血清中存在抗 BASB111 抗体 (图 2)。

实施例 6: 免疫鉴定: BASB111 表面暴露

25 抗 BASB111 蛋白滴度使用福尔马林灭活的粘膜炎莫拉氏菌菌株 14, 358, 216, 2926 (20 μ g/孔) 全细胞通过 ELISA 确定。该滴度定义为使用 XL Fit 软件通过 4 参数逻辑模型计算的中点滴度。使用兔子免疫血清 (分别为 1: 2600, 1: 2300, 1: 430, 1: 3300) 观察到的滴度表明在粘膜炎莫拉氏菌细胞表面检测到 BASB111 蛋白。

30

实施例 7: 免疫鉴定: 蛋白质印迹分析

粘膜炎莫拉氏菌 ATCC 43617 于 36°C 在 Muller Hinton 琼脂平板

上培养 24 小时。几个菌落用来接种 250 毫升烧瓶中的 50 毫升 BHI 培养液。培养物在 200 rpm 培养约 5 小时，直至 A620 为约 0.6，然后收集离心。细胞浓缩 10 倍， 4×10^8 CFU 在 150 微升 PAGE 样品缓冲液中溶解（360 mM Tris 缓冲液，pH8.8，含有 4% 十二烷基硫酸钠和 20% 甘油）。100°C 温育悬液 5 分钟。溶解的细胞在 4-20% 聚丙烯酰胺凝胶上分离，分离的蛋白如前所述（Thebaine et al. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354）100 伏 1 小时电转移到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜然后用 50 毫升含有 3% 牛血清白蛋白（BSA）的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水预处理。随后所有温育使用该预处理缓冲液进行。

10 硝酸纤维素膜用 1: 20 稀释的免疫前血清或小鼠免疫血清 250 微升室温温育 2 小时。硝酸纤维素膜然后用洗涤缓冲液（含有 150 mM 氯化钠和 0.05% Tween-20 的 20 mM Tris 缓冲液，pH7.5）洗涤 3 次。硝酸纤维素膜用 50 毫升 1: 500 稀释的生物素标记绵羊抗小鼠 Ig（Amersham Life Science Products）室温温育 60 分钟。硝酸纤维素膜然后
15 后用洗涤缓冲液洗涤 3 次，用 4-氯-1-萘酚（Sigma）各显色 10 分钟。在莫拉氏菌 ATCC43617 菌株中检测到与抗血清反应的约 29 kDa（相当于 BASB111 预期的分子量）蛋白（图 3）。

实施例 8: 免疫鉴定: 杀菌活性

20 分析抗 BASB111 抗体的补体介导的细胞毒活性以确定如上所述制备的 BASB111 蛋白抗血清的疫苗潜力。测定免疫前血清和抗 BASB111 抗血清介导补体灭活粘膜莫拉氏菌的活性。

25 粘膜莫拉氏菌菌株于 36°C 在 Muller Hinton 琼脂平板上培养 24 小时。几个菌落加入 125 毫升烧瓶中的 15 毫升 BHI 培养液。培养物在 200 rpm 培养约 4 小时，直至 A620 为约 0.4。洗涤一次后，细胞沉淀用 HBSS 悬浮，稀释到每毫升 28500 CFU。

50 微升免疫前血清和抗 BASB111 血清（56°C 灭活 30 分钟）加入 96 孔板的第一孔，HBSS 的两倍系列稀释液加入同一排的其它孔中。随后加入 25 微升活的稀释粘膜莫拉氏菌，混合物在室温温育 15 分钟。以先前的毒性实验中限定的工作稀释度向各孔中加入幼兔补体（Pel freez, clinical systems, Brown Deer, WI, USA）。

覆盖微量板，37°C 下 200rpm 温育 1 小时。

每个实验包括一个补体对照（未加含有活性或灭活补体源的血清的孔）、阳性对照（含有已知滴度的杀菌抗体的孔）、培养物对照（没有血清和补体的孔）和血清对照（没有补体的孔）。

5 兔子和小鼠抗血清的杀菌滴度（同源菌株 50% 杀灭）为 $<1:60$ （免疫前）和 $>1:316$ （免疫）。

保藏材料

含有粘膜炎莫拉氏菌 Catlin 菌株的保藏物已于 1997 年 6 月 21 日在美国典型培养物保藏中心（这里表示为“ATCC”）进行保藏，保藏号为 43617。该保藏物为粘膜炎布兰汉氏球菌（Frosch 和 Kolle），是一种从患有慢性支气管炎的矿工气管吸出物获得的粘膜炎莫拉氏菌分离物构建的 1.5-2.9 kb 插入文库的冻干物。该保藏物在 Antimicrob. Agents Chemother. 21:506-508（1982）中介绍。

该粘膜炎莫拉氏菌菌株保藏物在此被称为“保藏菌株”或“保藏菌株的 DNA”。

10 保藏菌株含有全长的 BASB111 基因。

由粘膜炎莫拉氏菌 DNA 插入 pQE30 组成的载体 pMC-ORG1/2 于 1999 年 2 月 12 日保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC），保藏号为 207118。

15 保藏菌株/克隆中所含的多核苷酸以及编码的任何多肽的氨基酸序列与本文的序列描述不一致时，以前者为准。

保藏菌株的保藏是根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约》的条款进行的。在专利被授予时，该菌株即可不受限制地无条件向公众发放。提供该保藏菌株仅为方便本领域技术人员，并不表明本发明的实施需要该保藏材料，如同 35U.S.C. §112 的要求。

序列信息

BASB111 多核苷酸和多肽序列

SEQ ID NO: 1

5 粘膜炎症莫拉氏菌 ATCC43617 菌株 BASB111 多核苷酸序列

```
ATGAATTTTGGTAAAATTAATGGTATTTGTGCACTGGCATCTGGCATCGCATTGGCAGGC
TGCAGCAATCAATCAAACGAACCAGCTGCCATATCTAAAACAGCTGCACAGACTATCAAG
GTTGGCGTCATGGCAGGTCCTGAACAAGCTGTGGCAGAGGTAGCAGGTCAAGTCGCCAAA
GAAAAATACAACCTGACCGTTGAATTGGTTGAGTTTAAATGACTATGCCATGCCAACTCA
GCCGTCTCAAAAAGGTGAACTTGACGCCAATGCCATGCAGCACAAACCTATCTTGAAAAA
GACAGCCAAGAAAAAGGCCTAAATAACTTGGTCATCGTCGGCAACACCTTTGTATACCCA
TTGGCAGGTTATTCAACCAAAATCAAGACATTAAATGAGCTAAAAGATGGTGCAACCATC
GCCGTTCCAAATGATCCCTCAAACCTAGCTCGTGCATTAATTTTACTTGAAAAACAAGGC
TTAATTAAATTAAAAGACAACACCAACCTATTCTCAACCACACTTGATATCGTAGAAAAT
CCAAAAAATTGGTCATCAAAGAAGTGGATACCTCAGTTGCTGCTCGTGCAATTGACGAT
GTGGACTTGGCAGTGGTAAATAACAACCTATGCAGGTCAAGTAGGTTTAACAGCCAGTGAA
AATGGCGTTTTTTGTTGAAGATAAAGACTCGCCTTATGTCAATATCATCGTCGCTCGTGCT
GACAATAAAGACTCTAAGGCCATCCAAGACTTTGTGAAAGCCTATCAAACCGATGAAGTG
GAAGCTGAAGCCAAAAAGCAATTTAAAGATGGTGTATCAAAGGCTGGTAA
```

SEQ ID NO: 2

由 SEQ ID NO: 1 多核苷酸序列推导的粘膜炎症莫拉氏菌 BASB111 多肽序列

```
MNFGKINGICALASGIALAGCSNQSNEPAAISKTAQTIKVGMAGPEQAVAEVAGQVAK
EKYNLTVELVEFNDYAMPNSAVSKGELDANAMQHHPYLEKDSQEKGLNNLVIVGNTFVYP
LAGYSTKIKTLNELKDGATIAVPNDPSNLRALILLEKQGLIKLDNTNLFSTTLDIVEN
PKKLVIKEVDTSVAAARAIDVDLAVVNNNYAGQVGLTASENGVFVEDKDSPYVNIIVARA
DNKDSKAIQDFVKAYQTDEVEAEAKKQFKDGVIKGW
```

SEQ ID NO: 3

AGG CAG AGG GAA TTC ATG AAT TTT GGT AAA ATT AAT GG

10

SEQ ID NO: 4

AGG CAG AGG GTC GAC TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CCA GCC TTT GAT AAC
ACC ATC TT

通过SDS-PAGE分离的纯化重组BASB111分析
(A) 考马斯染色 (B) 抗His免疫试剂染色

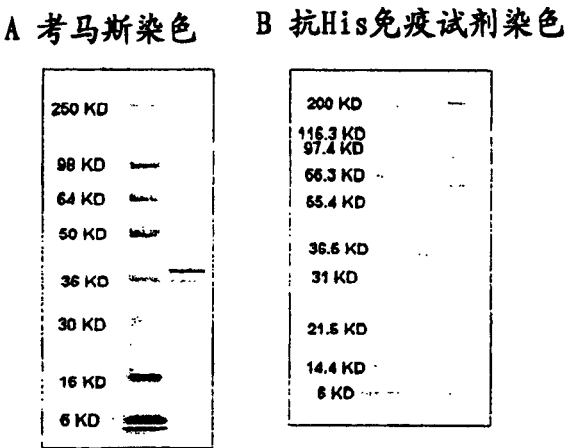


图 1

用兔抗血清检测BASB111

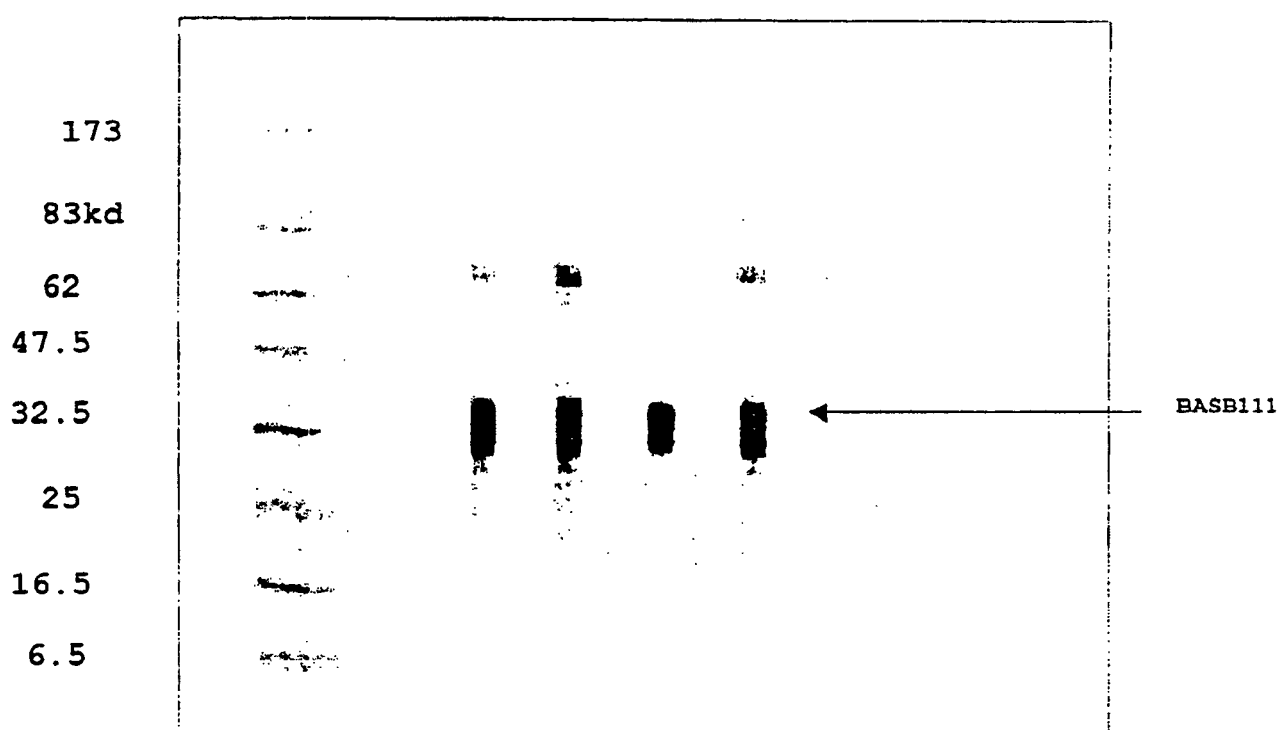


图 2

在莫拉氏菌细胞裂解物中存在抗BASB111

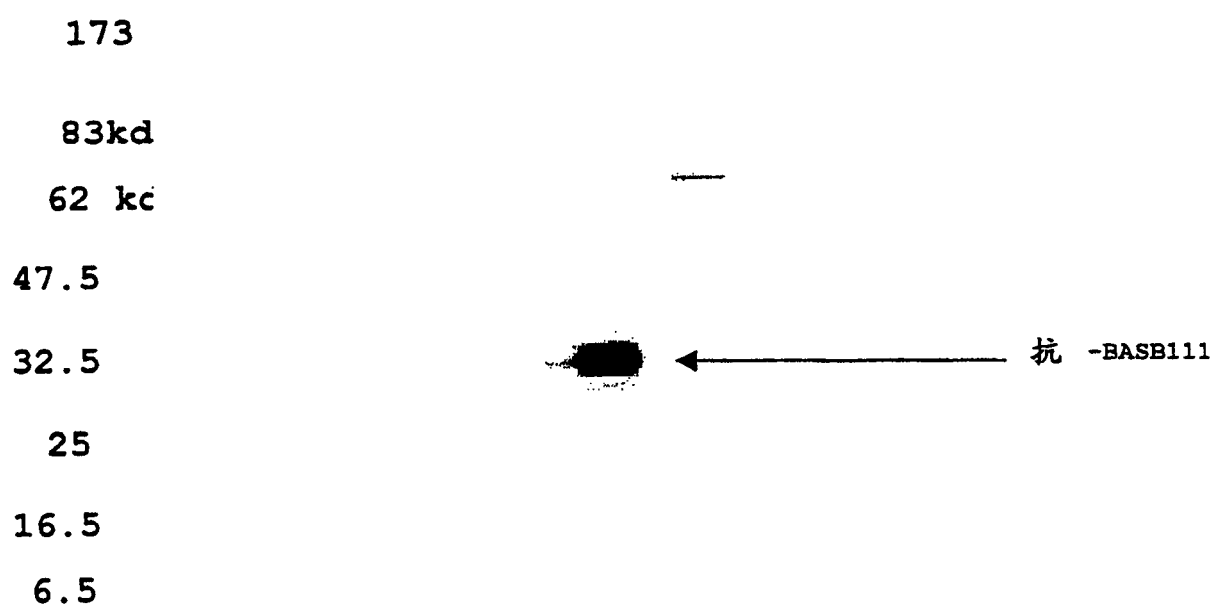


图 3

专利名称(译)	粘膜炎症莫拉氏菌BASB111多肽和多核苷酸		
公开(公告)号	CN1378596A	公开(公告)日	2002-11-06
申请号	CN00809501.9	申请日	2000-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司		
[标]发明人	J通纳德		
发明人	J·通纳德		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/02 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/21 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12R1/19 G01N33/569 A61K39/395		
CPC分类号	A61K39/00 A61K48/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/212		
优先权	1999014945 1999-06-25 GB		
其他公开文献	CN100352924C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供BASB111多肽和编码BASB111多肽的多核苷酸以及通过重组技术生产这种多肽的方法。本发明还提供诊断性、预防性和治疗性的应用。

