



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104755619 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201380055095. 0 *A61K 39/385*(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 10. 18 *A61K 39/395*(2006. 01)

(30) 优先权数据 *A61K 47/42*(2006. 01)
2012-233224 2012. 10. 22 JP *A61K 47/48*(2006. 01)
A61K 48/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *A61P 31/04*(2006. 01)
2015. 04. 22 *C07K 14/195*(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据 *C07K 14/395*(2006. 01)
PCT/JP2013/078305 2013. 10. 18 *C07K 14/47*(2006. 01)
C07K 16/12(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据 *C07K 16/14*(2006. 01)
W02014/065210 JA 2014. 05. 01 *C07K 16/18*(2006. 01)

(71) 申请人 一般财团法人化学及血清疗法研究
所 *C07K 19/00*(2006. 01)
地址 日本熊本县 *C12N 1/15*(2006. 01)
申请人 佳特泰斯创新株式会社 *C12N 1/19*(2006. 01)
C12N 1/21(2006. 01)

(72) 发明人 横川显治 胁贵志 本田容子
上藤洋敬 濑胁智满 新川武
原国哲也 宫田健 *C12N 5/10*(2006. 01)
G01N 33/53(2006. 01)

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl. *C12N 15/09*(2006. 01)
A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表13页 附图3页

(54) 发明名称
用于预防猪水肿病的疫苗

(57) 摘要
本发明的目的是对预计发生猪水肿病的农场提供可以预防猪水肿病的疫苗。满足该目的的疫苗是具有卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 结合而得的融合蛋白或所述融合蛋白的多聚体, 通过用该疫苗对猪免疫, 能够诱导高效中和抗体并抵御猪水肿病的发病。

1. 融合蛋白,其是通过使具有卷曲螺旋形成单元的多肽与志贺毒素 Stx2e 的 B 亚基 (Stx2eB) 结合而得的。

2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白,其在所述多肽与 Stx2eB 之间具有连接序列和 / 或标签序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白,其中所述卷曲螺旋形成单元来源于天然多聚体形成蛋白。

4. 根据权利要求 3 所述的融合蛋白,其中所述天然多聚体形成蛋白选自软骨寡聚基质蛋白 (COMP)、软骨基质蛋白 (CMP)、tetrabrachion (TB) 和 GCN4。

5. 根据权利要求 4 所述的融合蛋白,其中所述天然多聚体形成蛋白为 COMP 或 CMP。

6. 根据权利要求 5 所述的融合蛋白,其中所述天然多聚体形成蛋白为 COMP。

7. 根据权利要求 6 所述的融合蛋白,其为包含 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽。

8. 根据权利要求 5 所述的融合蛋白,其中所述天然多聚体形成蛋白为 CMP。

9. 根据权利要求 8 所述的融合蛋白,其为包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的融合蛋白,其中 Stx2eB 为包含 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽。

11. 融合蛋白多聚体,其是通过将权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白多聚化而得的。

12. 核酸片段,其包含编码权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白的 DNA 序列。

13. 重组表达载体,其包含权利要求 12 所述的核酸片段。

14. 转化体,其导入了权利要求 12 所述的核酸片段。

15. 转化体,其导入了权利要求 13 所述的重组表达载体。

16. 抗体,其能够与权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白结合。

17. 抗体,其能够与权利要求 11 所述的融合蛋白多聚体结合。

18. 针对猪水肿病的疫苗,其含有作为活性成分的权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白。

19. 针对猪水肿病的疫苗,其含有作为活性成分的权利要求 11 所述的融合蛋白多聚体。

20. 针对猪水肿病的治疗剂,其含有作为活性成分的权利要求 16 或 17 所述的抗体。

21. 针对猪水肿病的 DNA 疫苗,其含有作为活性成分的权利要求 12 所述的核酸片段。

22. 针对猪水肿病的 DNA 疫苗,其含有作为活性成分的权利要求 13 所述的重组表达载体。

23. 用于测定被检样品中针对 Stx2eB 的抗体的量的试剂盒,其包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白。

24. 用于测定被检样品中针对 Stx2eB 的抗体的量的试剂盒,其包含权利要求 11 所述的融合蛋白多聚体。

25. 用于测定被检样品中的 Stx2eB 含量的试剂盒,其包含权利要求 16 或 17 所述的抗体。

26. 融合蛋白多聚体的制备方法,其包括下述过程:使由具有卷曲螺旋形成单元的多肽与志贺毒素 Stx2e 的 B 亚基 (Stx2eB) 结合而得的融合蛋白在宿主中表达,然后将所述融合蛋白进行重折叠。

27. 根据权利要求 26 所述的制备方法,其中所述融合蛋白在所述多肽与 Stx2eB 之间具有间隔子。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于天然多聚体形成蛋白的卷曲螺旋形成单元,所述天然多聚体形成蛋白选自软骨寡聚基质蛋白 (COMP)、软骨基质蛋白 (CMP)、tetrabrachion (TB) 和 GCN4。

29. 根据权利要求 28 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于 COMP 或 CMP 的卷曲螺旋形成单元。

30. 根据权利要求 29 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于 COMP 的卷曲螺旋形成单元。

31. 根据权利要求 30 所述的制备方法,其中所述多肽为包含 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽。

32. 根据权利要求 29 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于 CMP 的卷曲螺旋形成单元。

33. 根据权利要求 32 所述的制备方法,其中所述多肽为包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽。

34. 根据权利要求 26 至 33 中任一项所述的制备方法,其中 Stx2eB 为包含 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽。

35. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白。

36. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予权利要求 11 所述的融合蛋白多聚体。

37. 猪水肿病的治疗方法,包括对猪给予权利要求 16 或 17 所述的抗体。

38. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予权利要求 12 所述的核酸片段。

39. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予权利要求 13 所述的重组表达载体。

用于预防猪水肿病的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防猪水肿病的疫苗。更具体而言,所述疫苗包含使具有卷曲螺旋形成单元的多肽与作为导致猪水肿病的毒素的 Stx2e 的 B 亚基 (Stx2eB) 融合而得的重组蛋白和 / 或所述重组蛋白的多聚体作为活性成分。通过对猪接种该融合蛋白和 / 或多聚体,能够诱导高效毒素中和抗体,该疫苗能预防水肿病的发病。

背景技术

[0002] 猪水肿病多发于 4 至 12 周龄的幼猪,导致眼睑浮肿、神经症状等,大部分在发病后 24 小时以内死亡 (非专利文献 1, Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 2006, 48, 7-13)。猪水肿病的死亡率高达 50 至 90%,并且由于复发、发育不良等导致生产能力降低,因此经济损失巨大。本疾病由与肠道粘附的产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin producing E. coli, STEC) 产生的志贺毒素 Stx2e 为原因而发病。Stx2e 为 AB₅型毒素蛋白,由具有 rRNA N-糖苷酶活性的 A 亚基 (Stx2eA) 和具有受体 (globotetraosyl ceramide (Gb4)) 结合能力的 B 亚基 5 聚体 (Stx2eB) 构成。已知的是,从肠道被导入且通过 B 亚基而到达诸如血管内皮细胞的细胞的表面的 Stx2e 将 A 亚基向靶细胞的胞质内递送,阻碍核糖体的蛋白合成,从而诱发水肿病的症状。在日本,用于预防猪水肿病的疫苗尚未市售,虽然也使用抗生素,但是发病后的给药变得为时已晚的情况多。此外,也报告了耐药菌的出现,因此期望有效的预防方法和治疗方法的开发。

[0003] 基于这样的背景,我们研究了能有效地预防猪水肿病的方法。例如,采用 Stx2e 类毒素免疫的实验例对实验感染显示防御效果 (非专利文献 2, Vet. Microbiol. 1991, 29, 309-318)。然而,在其他报告中,由于去毒化困难,因此一些猪在类毒素免疫后仍观察到水肿病的发病 (非专利文献 3, Infect. Immun. 1992, 60, 485-90)。此外,报告了将 Stx2eA 的氨基酸序列的一部分修饰而去毒化的重组 Stx2e 对猪免疫时,确认了中和抗体诱导产生的例子 (非专利文献 3, Infect. Immun. 1992, 60, 485-90)。然而,由重组大肠杆菌产生去毒化 Stx2e 的产生量极低,实用性方面存在问题。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献 1: 日本特开 2008-50344

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献 1: Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 2006, 48, 7-13

[0009] 非专利文献 2: Vet. Microbiol. 1991, 29, 309-318

[0010] 非专利文献 3: Infect. Immun. 1992, 60, 485-90

[0011] 非专利文献 4: Adv. Protein Chem. 2005, 70, 37-78

[0012] 非专利文献 5: Infect. Immun. 2005, 7, 5654-65

[0013] 非专利文献 6: Infect. Immun. 2011, 79(10), 4260-4275

发明内容

[0014] 发明所要解决的技术问题

[0015] 本发明所要解决的技术问题是对预计发生猪水肿病的农场提供能够有效地预防猪水肿病的疫苗。

[0016] 用于解决技术问题的手段

[0017] 本发明的发明人为了解决上述技术问题而进行了深入研究, 结果发现, 通过将具有卷曲螺旋形成单元的多肽和 Stx2eB 融合而得的蛋白作为疫苗对猪接种, 能诱导高效毒素中和抗体, 从而完成了本发明。

[0018] 即, 本发明包括以下,

[0019] [1]. 融合蛋白, 其是通过使具有卷曲螺旋形成单元的多肽与志贺毒素 Stx2e 的 B 亚基 (Stx2eB) 结合而得的。

[0020] [2]. 根据 [1] 所述的融合蛋白, 其在所述多肽与 Stx2eB 之间具有连接序列和 / 或标签序列。

[0021] [3]. 根据 [1] 或 [2] 所述的融合蛋白, 其中所述卷曲螺旋形成单元来源于天然多聚体形成蛋白。

[0022] [4]. 根据 [3] 所述的融合蛋白, 其中所述天然多聚体形成蛋白选自软骨寡聚基质蛋白 (COMP)、软骨基质蛋白 (CMP)、tetrabrachion (TB) 和 GCN4。

[0023] [5]. 根据 [4] 所述的融合蛋白, 其中所述天然多聚体形成蛋白为 COMP 或 CMP。

[0024] [6]. 根据 [5] 所述的融合蛋白, 其中所述天然多聚体形成蛋白为 COMP。

[0025] [7]. 根据 [6] 所述的融合蛋白, 其为包含 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽, 或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽。

[0026] [8]. 根据 [5] 所述的融合蛋白, 所述天然多聚体形成蛋白为 CMP。

[0027] [9]. 根据 [8] 所述的融合蛋白, 其为包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽, 或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽。

[0028] [10]. 根据 [1] 至 [9] 中任一项所述的融合蛋白, 其中 Stx2eB 为包含 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽, 或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽。

[0029] [11]. 融合蛋白多聚体, 其是通过将 [1] 至 [10] 中任一项所述的融合蛋白多聚化而得的。

[0030] [12]. 核酸片段, 其包含编码 [1] 至 [10] 中任一项所述的融合蛋白的 DNA 序列。

[0031] [13]. 重组表达载体, 其包含 [12] 所述的核酸片段。

[0032] [14]. 转化体, 其导入了 [12] 所述的核酸片段。

[0033] [15]. 转化体, 其导入了 [13] 所述的重组表达载体。

[0034] [16]. 抗体, 其能够与 [1] 至 [10] 中任一项所述的融合蛋白结合。

[0035] [17]. 抗体, 其能够与 [11] 所述的融合蛋白多聚体结合。

[0036] [18]. 针对猪水肿病的疫苗, 其含有作为活性成分的 [1] 至 [10] 中任一项所述的

融合蛋白。

[0037] [19]. 针对猪水肿病的疫苗,其含有作为活性成分的 [11] 所述的融合蛋白多聚体。

[0038] [20]. 针对猪水肿病的治疗剂,其含有作为活性成分的 [16] 或 [17] 所述的抗体。

[0039] [21]. 针对猪水肿病的 DNA 疫苗,其含有作为活性成分的 [12] 所述的核酸片段。

[0040] [22]. 针对猪水肿病的 DNA 疫苗,其含有作为活性成分的 [13] 所述的重组表达载体。

[0041] [23]. 用于测定被检样品中针对 Stx2eB 的抗体的量的试剂盒,其包含 [1] 至 [10] 中任一项所述的融合蛋白。

[0042] [24]. 用于测定被检样品中针对 Stx2eB 的抗体的量的试剂盒,其包含 [11] 所述的融合蛋白多聚体。

[0043] [25]. 用于测定被检样品中的 Stx2eB 含量的试剂盒,其包含 [16] 或 [17] 所述的抗体。

[0044] [26]. 融合蛋白多聚体的制备方法,其包括下述过程:使由具有卷曲螺旋形成单元的多肽与志贺毒素 Stx2e 的 B 亚基 (Stx2eB) 结合而得的融合蛋白在宿主中表达,然后将所述融合蛋白进行重折叠。

[0045] [27]. 根据 [26] 所述的制备方法,其中所述融合蛋白在所述多肽与 Stx2eB 之间具有间隔子。

[0046] [28]. 根据 [26] 或 [27] 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于选自软骨寡聚基质蛋白 (COMP)、软骨基质蛋白 (CMP)、tetrabrachion (TB) 和 GCN4 的天然多聚体形成蛋白的卷曲螺旋形成单元。

[0047] [29]. 根据 [28] 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于 COMP 或 CMP 的卷曲螺旋形成单元。

[0048] [30]. 根据 [29] 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于 COMP 的卷曲螺旋形成单元。

[0049] [31]. 根据 [30] 所述的制备方法,其中所述多肽为包含 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的多肽。

[0050] [32]. 根据 [29] 所述的制备方法,其中所述多肽具有来源于 CMP 的卷曲螺旋形成单元。

[0051] [33]. 根据 [32] 所述的制备方法,其中所述多肽为包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列的多肽。

[0052] [34]. 根据 [26] 至 [33] 中任一项所述的制备方法,其中 Stx2eB 为包含 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽,或为包含具有一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或插入的 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽。

[0053] [35]. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予 [1] 至 [10] 中任一项所述的融合蛋白。

[0054] [36]. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予 [11] 所述的融合蛋白多聚体。

- [0055] [37]. 猪水肿病的治疗方法,包括对猪给予 [16] 或 [17] 所述的抗体。
- [0056] [38]. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予 [12] 所述的核酸片段。
- [0057] [39]. 猪水肿病的预防方法,包括对猪给予 [13] 所述的重组表达载体。
- [0058] 发明的效果
- [0059] 如果将使具有卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 结合而得的融合蛋白作为活性成分的疫苗对猪接种,则能够诱导高效毒素中和抗体,预防猪水肿病的发病。

附图说明

- [0060] 图 1 是 Stx2eB-His 的示意图。
- [0061] 图 2 是 Stx2eB-His-COMP 的示意图。
- [0062] 图 3 是显示了 Stx2eB-His-COMP 的多聚体形成的图。
- [0063] 图 4 是 Stx2eB-His-COMP-Z 的示意图。
- [0064] 图 5 是显示了 Stx2eB-His-COMP-Z 的多聚体形成的图。
- [0065] 图 6 是 Stx2eB-His-CMP 的示意图。
- [0066] 图 7 是显示了 Stx2eB-His-CMP 的多聚体形成的图。

具体实施方式

[0067] (1) 融合蛋白

[0068] 本发明中包含由具有卷曲螺旋形成单元的多肽与志贺毒素 Stx2e 的 B 亚基 (Stx2eB) 结合而得的融合蛋白。

[0069] 构成本发明的融合蛋白的 Stx2eB 的实例包括包含分泌信号的前体 Stx2eB (例如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:20)、不含分泌信号的成熟 Stx2eB (例如 SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22)、为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将成熟 Stx2eB 的密码子优化获得的 Stx2eB (例如 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24)。

[0070] 作为编码 Stx2eB 的 DNA 序列 (Stx2eB 的 DNA 序列),除了 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23 的 DNA 序列以外,还包括在这些 DNA 序列中增加了合适的限制性酶切割位点的 DNA 序列、在这些 DNA 序列中缺失、取代或插入了一个或多个碱基的 DNA 序列。此外,还包括与这些 DNA 序列的同一性为 80% 以上,优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上的 DNA 序列。

[0071] 此外,Stx2eB 包括包含 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的多肽以及包含具有一个或多个氨基酸的缺失、取代或插入的这些氨基酸序列的多肽。此外,还包括包含与这些氨基酸序列的同一性为 80% 以上,优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上的氨基酸序列的多肽。

[0072] 另一方面,与 Stx2eB 结合而构成本发明的融合蛋白的具有卷曲螺旋形成单元的多肽没有特别限制,只要其具有形成卷曲螺旋结构的能力,但具有来源于能形成多聚体的天然蛋白 (多聚体形成蛋白) 的卷曲螺旋形成单元的多肽是适合的。例如,非专利文献 4 (Adv Protein Chem. 2005, 70, 37-78) 所记载的多聚体形成蛋白是一个实例,还列出具有来源于 COMP (软骨寡聚基质蛋白,5 聚体)、Staphylothermus marinus 来源的 tetrabrachion (TB, 4 聚体)、GCN4 (3 聚体)、鸡来源的软骨基质蛋白 (CMP, 3 聚体) 等多聚

体形成蛋白的卷曲螺旋形成单元的多肽。其中,优选为具有来源于形成 COMP 等 5 聚体和 CMP 等 3 聚体的蛋白的卷曲螺旋形成单元的多肽,特别优选为具有来源于形成 COMP 等 5 聚体的蛋白的卷曲螺旋形成单元的多肽,因为其与 Stx2eB 形成的融合蛋白为可溶性蛋白,凝集性低,诱导毒素中和抗体的效果优异。

[0073] 作为编码具有 COMP 的卷曲螺旋形成单元的多肽的 DNA 序列(卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列),除了 SEQ ID NO:26 的 DNA 序列以外,还包括为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将密码子优化的序列(例如 SEQ ID NO:10)、在这些 DNA 序列中增加了适当的限制性酶切割位点的 DNA 序列、在这些 DNA 序列中缺失、取代或插入了一个或多个碱基的 DNA 序列。此外,还包括与这些 DNA 序列的同一性为 80% 以上,优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上的 DNA 序列。

[0074] 此外,在具有 COMP 的卷曲螺旋形成单元的多肽中,还包括包含 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列以及为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将密码子优化的序列(例如 SEQ ID NO:28)的多肽,以及包含在这些氨基酸序列中缺失、取代或插入了一个或多个氨基酸的氨基酸序列的多肽。此外还包括包含与这些氨基酸序列的同一性为 80% 以上,优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上的氨基酸序列的多肽。

[0075] 作为编码具有 CMP 的卷曲螺旋形成单元的多肽的 DNA 序列(卷曲螺旋结构的 DNA 序列),除了 SEQ ID NO:30 的 DNA 序列以外,还包括为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将密码子优化的序列(例如 SEQ ID NO:31)、在这些 DNA 序列中增加了适当的限制性酶切割位点的 DNA 序列、在这些 DNA 序列中缺失、取代或插入了一个或多个碱基的 DNA 序列。此外,还包括与这些 DNA 序列的同一性为 80% 以上,优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上的 DNA 序列。

[0076] 此外,在具有 CMP 的卷曲螺旋形成单元的多肽中,还包括包含 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列、为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将密码子优化的序列(例如 SEQ ID NO:33)的多肽,以及包含在这些氨基酸序列中缺失、取代或插入了一个或多个氨基酸的氨基酸序列的多肽。此外还包括包含与这些氨基酸序列的同一性为 80% 以上,优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上的氨基酸序列的多肽。

[0077] 在本发明的融合蛋白中,具有卷曲螺旋形成单元的肽与 Stx2eB 可以相邻地结合,也可以出于使两者的分子间相互作用降低等目的而在肽与 Stx2eB 之间插入连接序列、标签序列等间隔子。连接序列没有特别限定,但例如,可以使用具有 GPGP 或 GGGGS(G_4S) 的组合的序列。此外,也可以使用重复 1~4 次(G_4S)的序列($(G_4S)_1 \sim (G_4S)_4$)作为连接序列,此外,可以在其中组合 $(GP)_2$ 。作为标签序列,可例如,谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、Hisx6(H_6)。标签序列与连接序列的组合的优选实例可以为 $(GP)_2GH_6(G_4S)_3$ 。此外,在该序列中,也能够将(G_4S)部分序列替换为重复序列($(G_4S)_{1 \sim 3}$)。此外,也能够使用 GPGPH₆GPGP、 $G_4SH_6G_4S$ 序列。

[0078] 本发明的融合蛋白的实例可以为具有 COMP 的卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 的融合蛋白,为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将密码子优化,其中在多肽与 Stx2eB 之间插入标签序列(H_6)和连接序列($(G_4S)_3$)(例如 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:16)。本发明的融合蛋白不仅包括 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列所示的蛋白,而且包括包含在该氨基酸序列中缺失、取代或插入一个或多个氨基酸的氨基酸序列的多肽。此外,还包括包含与这些氨基

酸序列的同一性为 80% 以上, 优选为 90% 以上, 更优选为 95% 以上的氨基酸序列的多肽。

[0079] 此外, 本发明的融合蛋白的另一实例为具有 CMP 的卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 的融合蛋白, 为了在大肠杆菌、酵母中进行表达而将密码子优化, 其中在所述多肽与 Stx2eB 之间插入了标签序列 (H_6) 和连接序列 ($(G_4S)_3$) (例如 SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35)。本发明的融合蛋白中, 不仅包括 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列所示的蛋白, 而且包括包含在该氨基酸序列中缺失、取代或插入了一个或多个氨基酸的氨基酸序列的多肽。此外, 还包括包含与这些氨基酸序列的同一性为 80% 以上, 优选为 90% 以上, 更优选为 95% 以上的氨基酸序列的多肽。

[0080] 在使具有卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 结合时, 可以通过基因工程技术使两者结合, 然后进行表达。例如, 在一种方法中, 可以使卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列和 Stx2eB 的 DNA 序列相邻的方式制备表达载体, 然后导入到适当的宿主中, 使融合蛋白表达。卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列可以设置在 Stx2eB 的 DNA 序列的 5' 侧, 也可以设置在 3' 侧。优选设置在 3' 侧。在制备上述表达载体时, 连接序列和 / 或标签序列的 DNA 序列可以插入到卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列与 Stx2eB 的 DNA 序列之间, 也可以附加到上述 DNA 序列的 5' 侧、3' 侧。例如, 在一种方法中, 按照从 5' 侧 Stx2eB 的 DNA 序列、标签序列和 / 或连接序列的 DNA 序列、卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列的设置来制备表达载体。

[0081] 上述的 DNA 序列能够通过化学合成而获得, 以其作为模板通过公知的基因扩增方法进行扩增, 使用各种限制性酶引入到表达载体, 制备重组表达载体。基因扩增中使用的寡核苷酸被设计为能与模板 DNA 序列的 5' 侧或 3' 侧杂交, 优选增加限制性酶的切割位点。能够使用上述的寡核苷酸、模板 DNA、DNA 聚合酶等, 通过公知的基因扩增方法来扩增模板 DNA。将扩增的 DNA 序列和表达载体用限制性酶处理后, 使它们通过适当的 DNA 连接酶结合, 从而能够构建插入了目标的 DNA 序列的重组表达载体。本发明中还包括这样的重组表达载体。

[0082] 作为表达载体, 可列举出质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、人工染色体载体等, 但从简便的操作和成本的观点考虑, 优选为质粒载体。例如, 在宿主为大肠杆菌的情况下, 可列举出 pFN6A (HQ) Flexi Vector (Promega)、pFN7A (HQ) Flexi Vector (Promega)、pFN2A (GST) Flexi Vector (Promega)、pET-22b (MERCK)、pET-21d (MERCK)、pCold 载体 (Takara Bio) 等, 在宿主为哺乳动物的情况下, 可列举出 pF4A CMV Flexi Vector (Promega)、pF5A CMV-neo Flexi Vector (Promega)、pF9A CMV hRluc-neo Flexi Vector (Promega)、pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega)。表达载体中可以包含复制起点、对基因表达具有调控作用的启动子序列、增强子序列等调控序列、选择标记的序列。

[0083] 作为启动子序列的实例, 细菌启动子为大肠杆菌 lacI 和 lacZ 启动子、T3 和 T7 启动子、gpt 启动子、 λ PR、PL 启动子、tac 启动子和 trp、trc 启动子。其中, 关于这点适当的公知的真核细胞启动子, 可列举出巨细胞病毒 (“CMV”) 即刻早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒 LTR 启动子, 例如劳氏肉瘤病毒 (“RoSV”) 的启动子, 以及金属硫蛋白 -I 启动子等金属硫蛋白启动子。

[0084] 在以高等真核细胞作为宿主表达融合蛋白时, 可以通过将增强子序列插入到表达载体来使转录活性增加。增强子序列在一定的宿主细胞型中以使启动子的转录活性增加的

方式起作用。增强子的例子包括 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点的下游的多瘤病毒增强子、 β 肌动蛋白增强子和腺病毒增强子等。

[0085] 作为选择标记的实例,可以为大肠杆菌的氨苄西林抗性基因、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 *trp1* 基因、哺乳动物细胞的新霉素抗性基因。

[0086] 本发明包括编码上述本发明的融合蛋白的、包含卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列和 Stx2eB 的 DNA 序列的核酸片段。本发明的核酸片段包括卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列与 Stx2eB 的 DNA 序列相邻地设置的核酸片段、或在卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列与 Stx2eB 的 DNA 序列之间插入有标签序列和 / 或连接序列的 DNA 序列的核酸片段。例如,包括 SEQ ID NO:17、34 的核酸片段。

[0087] 本发明的核酸片段能够通过将序列整体进行化学合成来获得。此外,可以通过化学合成来获得核酸片段的一部分和核酸片段的剩余部分后,通过公知的基因重组技术使它们连接。例如,在使 Stx2eB 或卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列化学合成后,使用公知的基因扩增方法使它们扩增后,插入到分别的克隆载体中。通过限制性酶从分别的克隆载体切出 Stx2eB 的 DNA 序列或卷曲螺旋形成单元的 DNA 序列之后,插入到同样地进行了限制性酶处理的表达载体中,制备重组表达载体。在插入时,以各片段连续地设置的方式设计。而且,通过使用限制性酶等从重组表达载体切出核酸片段,能够获得卷曲螺旋形成单元与 Stx2eB 的 DNA 序列连接后的核酸片段。在通过上述方法制备核酸片段时,可以使标签序列、连接序列的 DNA 序列插入到卷曲螺旋形成单元与 Stx2eB 的 DNA 序列之间而形成表达载体,制备核酸片段。

[0088] 通过用以上述方式制备出的表达载体转化宿主,可以获得含有表达载体的转化体。本发明中还包括这样的转化体。作为宿主,可列举出大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞系、昆虫细胞、植物等公知的宿主。作为大肠杆菌,可以列举出 BL21 株、DH5 α 等。作为酵母,可列举出毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),作为哺乳动物细胞,可列举出 CHO 细胞、HEK293 细胞、COS-1/-7 细胞等。

[0089] 表达载体向宿主的导入可以根据宿主而通过公知的方法来进行,实例可以为磷酸钙法、电穿孔法、脂质转染法等。在导入后,用包含选择标记的培养基进行培养,可以选择上述表达载体导入到宿主细胞中的转化体。

[0090] 可以使以上述方式制备出的转化体在适合条件下增殖后,使选择的启动子在特定的条件下 (pH、温度、添加化合物) 下诱导,产生融合蛋白。表达的融合蛋白在细胞内蓄积或向细胞外分泌。

[0091] 在使用大肠杆菌作为宿主进行表达的情况下,可以使包涵体部分表达融合蛋白。作为从大肠杆菌回收包涵体的方法,可例如,超声波破碎法、高压均质法、使用 BugBuster (Merck 株式会社) 的方法。

[0092] 这样得到的本发明的融合蛋白也可以作为单体使用,但从诱导高效毒素中和抗体的角度考虑,优选形成多聚体。例如,这样的融合蛋白多聚体为 2 聚体、3 聚体、4 聚体、5 聚体、5 聚体以上,还包括这些多聚体的混合物。为了形成这样的融合蛋白多聚体,例如,只要以上述方式从大肠杆菌回收包涵体,使融合蛋白溶解后,对溶解溶液进行重折叠处理即可。作为使来自包涵体的融合蛋白溶解的方法,可例如在包涵体中加入胍盐酸盐、脲溶液的方法、Inclusion Body Solubilization Reagent (Funakoshi)、Proteospin Inclusion Body

Isolation Kit(Norgen)。作为重折叠处理,可例如在溶解溶液中加入精氨酸、Tween80、乙酸钠和 DL- 胱氨酸的方法,利用 TAPS-sulfonate(片山工业株式会社)、Refolding CA Kit(Takara Bio) 的方法等。

[0093] 另外,本发明的融合蛋白是通过具有卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 结合而得的,它们可以化学结合。此时,在一种方法中,可以使具有卷曲螺旋形成单元的多肽与 Stx2eB 单独表达,然后使用交联剂进行结合。

[0094] 使具有卷曲螺旋形成单元的多肽、Stx2eB 单独表达时,能够通过化学合成获得各自的 DNA 序列,以其作为模板通过公知的基因扩增方法进行扩增,通过上文所述的方法来构建各自的表达质粒。表达质粒能够以上述方式导入到宿主中,分别获得目标蛋白。

[0095] 在使用交联剂进行结合时,可以利用存在于蛋白的氨基、硫醇基(SH基)、存在于蛋白的糖链的醛基等进行结合,但是所使用的官能团没有限制。例如,在一种方法中,可以使具有卷曲螺旋形成单元的多肽的 SH 基与 Stx2eB 的氨基反应,更具体而言,可以使通过二硫苏糖醇(DTT)等还原剂进行还原处理的多肽与通过 N-琥珀酰-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)导入了吡啶基二硫醚基的 Stx2eB 通过孵育来结合。此外也可以通过使用利用了生物素、抗生物素蛋白等生物分子彼此的相互作用的结合来化学结合。

[0096] 通过上述方法获得的融合蛋白及其多聚体可以通过一般的纯化方法进一步进行分离和纯化。这里作为纯化方法,可列举出亲和色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱、凝胶过滤色谱等各种纯化法。

[0097] 本发明包括以上述的本发明的融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体作为活性成分的针对猪水肿病的疫苗。在本发明的疫苗中,优选包含融合蛋白多聚体。优选为 2 聚体、3 聚体、4 聚体、5 聚体、5 聚体以上、或这些多聚体的混合物。

[0098] 在针对猪水肿病的疫苗中,优选每一剂量包含 0.1 ~ 1000 μ g 的上述融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体。此外,在将该疫苗对易感动物免疫的情况下,可以诱导能防御发病水平或更高水平的毒素中和抗体。

[0099] 本发明的疫苗中可以包含药学上可接受的载体。可列举出例如,盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、等渗水性缓冲液和它们的组合。此外,也可以在其中适当配合佐剂、乳化剂、防腐剂、等渗剂、pH 调节剂等添加剂。

[0100] 作为佐剂,包括 Emulsigen(MVP Laboratories)、生育酚乙酸酯、明矾、皂苷(QS21、ISCOM)、CpG oligo 等。

[0101] 本发明的疫苗中,除了上述融合蛋白以外,也可以增加预防猪感染性疾病的抗原。作为这样的感染性疾病的实例,可以为猪细小病毒病、猪丹毒、猪传染性胃肠炎、猪支原体肺炎、猪萎缩性鼻炎、猪日本脑炎、猪圆环病毒感染、猪繁殖和呼吸障碍综合征、猪链球菌病、猪流感、猪胸膜肺炎、格拉氏病、猪痢疾、猪流行性腹泻、猪大肠杆菌病、增生性肠病、猪坏死性肠炎、猪沙门氏菌病、猪轮状病毒感染。

[0102] 本发明的疫苗可以通过经皮给药、舌下给药、点眼给药、皮内给药、肌肉内给药、经口给药、经肠给药、经鼻给药、静脉内给药、皮下给药、腹腔内给药、从口至肺的吸入给药等任意给药途径来给药。

[0103] 通过将本发明的疫苗对猪接种,可以诱导高效毒素中和抗体,有效地预防猪水肿病的发生。推测其理由是因为,通过将 Stx2eB 与具有形成卷曲螺旋结构的能力的多肽融

合,能容易地实现包含 5 聚体形式的 Stx2eB 的原本的合适构象。

[0104] 本发明中包括用于测定被检样品中针对 Stx2eB 的抗体的量的试剂盒,其包含上述融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体。包含本发明的融合蛋白的试剂盒可以为固定有融合蛋白的板。将被检样品施加于上述板,使板上的融合蛋白与被检样品中所包含的抗体反应。施以酶、荧光物质标记的二抗,使其与一抗反应。根据需要加入酶的底物,检测酶反应的产物或荧光量,从而可以测定被检样品中包含的抗体的量。在将以融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体作为活性成分的疫苗对猪免疫后,通过检测来源于疫苗的抗体产生,本发明的试剂盒可以用于评价疫苗的有效性。

[0105] 本发明中包括包含以上述核酸片段、重组表达载体作为活性成分的针对猪水肿病的 DNA 疫苗。在本发明的 DNA 疫苗中,核酸片段、重组表达载体优选包含对猪免疫后能使融合蛋白表达的启动子序列。

[0106] 关于制备本发明的 DNA 疫苗的方法,在将上述 DNA 疫苗对猪接种前后通过 STEC 或 Stx2e 对猪进行攻击试验。作为结果,可以筛选使猪水肿病的临床症状显著减轻的核酸片段、重组表达载体作为猪水肿病治疗剂的活性成分,由此时的给药量规定活性成分量。

[0107] 本发明的 DNA 疫苗中也可以包含药学上可接受的载体。可列举出例如,盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、等渗水性缓冲液和它们的组合,此外也可以在其中适当配合佐剂、乳化剂、防腐剂、等渗剂、pH 调节剂等添加剂。

[0108] 本发明的 DNA 疫苗可以通过经皮给药、舌下给药、点眼给药、皮内给药、肌肉内给药、经口给药、经肠给药、经鼻给药、静脉内给药、皮下给药、腹腔内给药、从口至肺的吸入给药等任意给药途径来给药。

[0109] 本发明中包括能与上述融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体结合的抗体。以本发明的融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体作为抗原,通过常规免疫方法(现代分子生物学技术,抗体工程(Current Protocols in Molecular Biology, Antibody Engineering):A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. 或 ANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. Borrebaeck),能够进行单克隆和多克隆抗体等的制备或它们的人抗体的制备。或者,通过利用噬菌体展示技术的抗体制备技术(Phage Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual Edited by Brian K. Kay et al., Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. 或 ANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. Borrebaeck),能够进行与上述融合蛋白和 / 或其多聚体结合的抗体的制备。本发明的抗体设想到作为后述的猪水肿病治疗剂、试剂盒、亲和色谱用载体的用途。

[0110] 本发明中包括以上述抗体作为活性成分的针对猪水肿病的治疗剂。关于制备本发明的治疗剂的方法,在将通过上述方法制备的抗体对猪接种前后用 STEC 或 Stx2e 对猪进行攻击试验。作为结果,可以筛选使猪水肿病的临床症状显著减轻的抗体作为猪水肿病治疗剂的活性成分,由此时的抗体给药量规定活性成分量。

[0111] 以上述抗体作为活性成分的本发明的猪水肿病治疗剂也可以包含药学上可接受的载体。例如,可列举出盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、等渗水性缓冲液和它们的组合,此外也可以在其中适当配合佐剂、乳化剂、防腐剂、等渗剂、pH 调节剂等添加剂。

[0112] 本发明的针对猪水肿病的治疗剂也可以通过经皮给药、舌下给药、点眼给药、皮内

给药、肌肉内给药、经口给药、经肠给药、经鼻给药、静脉内给药、皮下给药、腹腔内给药、从口至肺的吸入给药等任意给药途径来给药。

[0113] 本发明中包括用于测定被检样品中的 Stx2eB 含量的试剂盒,其包含与融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体结合的抗体。作为这样的试剂盒,包含将与融合蛋白结合的抗体固定于板等的试剂盒。以 Stx2eB 的含量作为指标,包含本发明的抗体的试剂盒可以在评价是否感染猪水肿病时使用。例如,在上述的固定有抗体的板上施加被检样品之后,施以酶、荧光染料标记的抗体。对板进行孵育、洗涤后,根据需要加入显色底物,测定荧光量,从而可以评价被检样品中的 Stx2eB 含量。

[0114] 作为板,可例如 Nunc Immuno plate MaxiSorp(Thermo scientific)、ELISA 用板(住友 Bakelite 株式会社)、ELISPOT(MERCK)、Immuno plate(Cosmo Bio 株式会社)、ELISA 板(IWAKI)、ELISA 板(ExtraGene),对于本领域技术人员而言可以通过通常实施的方法使抗体与板结合。

[0115] 作为将抗体用酶、荧光染料标记的方法,可例如 EasyLink 抗体偶联试剂盒(abcam)、Lightning-Link 快速偶联系统(Innova Biosciences Ltd)、Oyster 抗体标记试剂盒(Luminartis GmbH)、酶标记试剂盒 EZ-Link(PIERCE Biotechnology)、PlatinumLink 蛋白标记试剂盒(Kreatech Biotechnology BV)、DyLight 抗体标记试剂盒(PIERCE Biotechnology)。

[0116] 本发明中包括亲和色谱用载体,其中使针对融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体的抗体与载体结合。本发明的融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体在宿主内或宿主外被表达,在宿主内表达的情况下,破坏宿主而回收融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体,在宿主外表达的情况下,从培养环境回收融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体。本发明的载体预想到用于从这样的杂质部分回收融合蛋白和 / 或融合蛋白多聚体等的用途。

[0117] 作为载体,可例如 HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)、NHS 活化 Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare)、CNBr 活化 Sepharose 4B(GE Healthcare)、CNBr 活化 Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare)、EAH Sepharose 4B(GE Healthcare)、ECH Sepharose 4B(GE Healthcare)、Profinity 环氧树脂(BIORAD)、Affi-Gel Hz Hydrazide 凝胶(BIORAD),对于本领域技术人员而言可以通过通常使用的方法使抗体结合。

[0118] 实施例

[0119] 以下进一步通过实施例对本发明进行详细地说明,但本发明不受这些实施例的任何限制。

[0120] 实施例 1

[0121] Stx2eB-His-COMP 蛋白及其多聚体的制备

[0122] (1) 表达载体的构建

[0123] Stx2eB-His 表达载体的构建和 Stx2eB-His 表达型大肠杆菌的制备

[0124] 设计以编码 Stx2eB 的前体 (SEQ ID NO:1) 的 DNA 序列为基础,将用于在大肠杆菌和酵母中表达的密码子优化,用于表达载体插入在 5' 末端增加了限制性酶 NdeI 识别序列以及在 3' 末端增加了限制性酶 XhoI 识别序列的 DNA 序列 (SEQ ID NO:2),人工合成出该 DNA 序列。将该合成的 DNA 和质粒 pET-22b(Merck 株式会社)用 NdeI 和 XhoI 处理,将两者连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5a,将所得的质粒设定为“中间载体 1”。

[0125] 以中间载体 1 作为模板,以包含限制性酶 NcoI 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:3) 和包含限制性酶 XhoI 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:4) 作为引物,进行 PCR 反应,将编码不含分泌信号序列的成熟 Stx2eB 的 DNA 进行扩增。

[0126] 将该扩增产物和质粒 pET-21d (Merck 株式会社) 用 NcoI 和 XhoI 进行处理,将两者连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5a,将所得的质粒设定为 pSTXB。该质粒表达 Stx2eB 和 His 标签的融合蛋白 (以下称为 Stx2eB-His) (SEQ ID NO:5) (图 1)。此外,编码 Stx2eB-His 的 DNA 碱基序列示于 SEQ ID NO:6。将 pSTXB 导入大肠杆菌 BL21 (DE3) (Merck 株式会社),获得表达 Stx2eB-His 的大肠杆菌 STXB 株。

[0127] (2) Stx2eB-His-COMP 表达载体的构建和 Stx2eB-His-COMP 表达型大肠杆菌的制备

[0128] 以作为霍乱毒素 B 亚基前体表达载体的 pB (非专利文献 5, Infect Immun. 2005, 7, 5654-65) 作为模板,以包含限制性酶 MunI 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:7) 和包含限制性酶 MunI 识别序列和 $(GP)_2GH_6$ (EcoR I) H_6 连接序列 (人工序列) 编码序列的寡 DNA (SEQ ID NO:8) 作为引物进行 PCR 反应,将编码 CTB- $(GP)_2GH_6$ (EcoRI) H_6 的 DNA 进行扩增。

[0129] 将扩增的 DNA 用 MunI 进行处理,此外将 pPIC3.5K 载体 (Life Technologies) 用 EcoRI 切割,将两者连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α ,将所得的质粒设为“中间载体 2”。

[0130] 设计并人工合成编码融合蛋白的编码 $(G_4S)_3$ 连接序列 (人工序列) 的 DNA (SEQ ID NO:9) 和编码软骨寡聚基质蛋白 (以下称为 COMP) 的 5 聚体形成结构域并为了在大肠杆菌和酵母中表达而将密码子优化的 DNA (SEQ ID NO:10) 的 DNA (SEQ ID NO:11)。以上述合成 DNA 作为模板,以包含限制性酶 MunI 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:12) 和包含限制性酶 EcoR I 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:13) 作为引物,进行 PCR 反应,将编码 $(G_4S)_3$ 连接序列 -COMP 的 DNA 进行扩增。将用 Mun I 和 EcoR I 进行处理的扩增产物与将中间载体 2 用 EcoR I 进行处理而得的产物连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5a,将所得的质粒设为“中间载体 3”。

[0131] 以中间载体 3 作为模板,以包含限制性酶 Xho I 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:14) 和包含限制性酶 Xho I 识别序列的寡 DNA (SEQ ID NO:15) 作为引物,进行 PCR 反应,将编码 $(GP)_2GH_6$ $(G_4S)_3$ 连接序列和 COMP 的融合蛋白的 DNA 进行扩增。将扩增的 DNA 和 pSTXB 用 Xho I 处理,将两者连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5a,将所得的质粒设为 pSTXC。本质粒为用于表达 Stx2eB、 $(GP)_2GH_6$ $(G_4S)_3$ 连接序列和 COMP 的融合蛋白 (以下称为 Stx2eB-His-COMP) (SEQ ID NO:16) (图 2) 的载体。此外,将编码 Stx2eB-His-COMP 的 DNA 碱基序列示于 SEQ ID NO:17。此外将 pSTXC 导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 株,获得了表达 Stx2eB-His-COMP 的大肠杆菌 STXC 株。

[0132] (3) Stx2eB-His-COMP-His-Z 表达载体的构建和 Stx2eB-His-COMP-His-Z 表达型大肠杆菌的制备

[0133] 将 COMP-His-Z 表达载体 (非专利文献 6, Infect. Immune. 2011, 79(10), 4260-4275) 用 Nco I 和 Xho I 切割,制备出编码 COMP、 $(GP)_2G_4SH_6G_4S$ $(GP)_2$ 连接序列和免疫球蛋白结合结构域 Z (以下称为结构域 Z) 的融合蛋白

(以下称为 COMP-His-Z) 的 DNA 片段。将该 DNA 片段与将 pET-21d 载体 (MERCK) 用限制性酶 Nco I 和 Xho I 进行处理而得的产物连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α , 将所得的质粒设为“中间载体 4”。将中间载体 4 进一步用 Nco I 和 Bsm I 处理, 制备出除去 COMP 的 5' 末端到 Bsm I 识别位点的“中间载体 5”。

[0134] 接下来, 以 pSTXC 作为模板, 以 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:15 的寡 DNA 作为引物进行 PCR 反应, 将编码 Stx2eB-His-COMP 的 DNA 进行扩增。将扩增的 DNA 用限制性酶 Nco I 和 Bsm I 进行处理。该 DNA 片段缺失 COMP 的羧基末端的一部分。将该 DNA 片段与中间载体 5 连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α , 将所得的质粒设为 pSTXZ。本质粒表达 Stx2eB、(GP)₂GH₆(G₄S)₃连接序列、COMP、(GP)₂G₄SH₆G₄S(GP)₂连接序列和结构域 Z 的融合蛋白 (以下称为 Stx2eB-His-COMP-His-Z) (SEQ ID NO:18) (图 4)。此外, 将编码 Stx2eB-His-COMP-His-Z 的 DNA 序列示于 SEQ ID NO:19。此外, 将 pSTXZ 导入大肠杆菌 BL21 (DE3) (MERCK), 获得表达 Stx2eB-His-COMP-His-Z 的大肠杆菌 STXZ 株。

[0135] 实施例 2

[0136] 重组大肠杆菌的培养和表达蛋白的纯化

[0137] (1) STXB 株的培养和 Stx2eB-His 的纯化

[0138] 在 12mL 尺寸的试管中加入 3mL 的 2×YT 培养基和氨苄西林溶液 (终浓度 200 μ g/mL), 接种 STXB 株, 在 37°C 振荡培养 16 小时左右 (前培养)。在 2L 尺寸的锥形烧瓶中加入 200mL 的 2×YT 培养基和氨苄西林溶液 (终浓度 200 μ g/mL), 在其中接种 2mL 的前培养菌液, 在 37°C 振荡培养直到 OD₅₉₀ 超过 0.5 为止。正式培养物的 OD₅₉₀ 超过了 0.5 后, 以终浓度 10 μ M 添加异丙基 - β - D - 吡喃半乳糖苷 (IPTG), 在 25°C 振荡培养 20 小时。将正式培养液移至离心管, 通过 10,000rpm、4°C、10 分钟的离心分离回收菌体。使用 BugBuster (Merck 株式会社), 从回收的菌体通过离心制备出包涵体部分。

[0139] 将制备的包涵体部分用 1% SDS 溶液溶解, 通过透析 (Spectrum laboratories, inc. Spectra/Por CE 透析膜. MWC0:3.5-5kD.) 将缓冲液替换为 PBS 而得的产物作为 Stx2eB-His 抗原。

[0140] (2) STXC 株的培养, Stx2e-His-COMP 的纯化

[0141] 在 12mL 尺寸的试管中加入 3mL 的 2×YT 培养基和氨苄西林溶液 (终浓度 200 μ g/mL), 接种 STXC 株, 在 37°C 振荡培养 16 小时左右 (前培养)。在 2L 尺寸的锥形烧瓶中加入 200mL 的 2×YT 培养基和氨苄西林溶液 (终浓度 200 μ g/mL), 在其中接种 2mL 的前培养菌液, 在 37°C 振荡培养直到 OD₅₉₀ 超过 0.5 为止。正式培养物的 OD₅₉₀ 超过了 0.5 后, 以终浓度 10 μ M 添加异丙基 - β - D - 吡喃半乳糖苷 (IPTG), 在 37°C 振荡培养 6 小时。将正式培养液移至离心管, 通过 10,000rpm、4°C、10 分钟的离心分离回收菌体。使用 BugBuster (Merck 株式会社), 从回收的菌体通过离心制备出包涵体部分。

[0142] 接下来, 在包涵体中加入 6M 胍盐酸盐 (pH8.2) 溶液, 制备溶解溶液。以专利文献 1 (日本特开 2008-50344) 为参考对溶解溶液进行重折叠处理。具体而言, 在溶解溶液中加入 Tween80 (终浓度 0.05%)、乙酸钠 (终浓度 1M)、DL- 胱氨酸 (终浓度 2mM), 在 4°C 静置过夜。在重折叠处理后, 使用 His Trap HP (GE Healthcare 日本株式会社) 对 Stx2eB-His-COMP 进行纯化, 通过超滤 (Amicon Ultra-15 30kDa, Millipore 株式会社) 将缓冲液替换为 PBS, 得到产物作为 Stx2eB-His-COMP 抗原。在非还原状态下使用 12.5% 丙

烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE, 通过采用 CBB 染色和抗 His 抗体的 western 印迹法来确认多聚体的形成 (图 3)。

[0143] (3) STXZ 株的培养和 Stx2e-His-COMP-His-Z 的纯化

[0144] 在 12mL 尺寸的试管中加入 3mL 的 2×YT 培养基和氨苄西林溶液 (终浓度 200 μg/mL), 接种 STXZ 株, 在 37°C 振荡培养 16 小时左右 (前培养)。在 2L 尺寸的锥形烧瓶中加入 200mL 的 2×YT 培养基和氨苄西林溶液 (终浓度 200 μg/mL), 在其中接种 2mL 的前培养菌液, 在 37°C 振荡培养直到 OD₅₉₀ 超过 0.5 为止。正式培养物的 OD₅₉₀ 超过了 0.5 后, 以终浓度 10 μM 添加 IPTG, 在 37°C 振荡培养 6 小时。将正式培养液移至离心管, 通过 10,000rpm、4°C、10 分钟的离心分离回收菌体。使用 BugBuster (MERCK), 从回收的菌体通过离心制备包涵体部分。

[0145] 接下来, 在包涵体中加入 6M 胍盐酸盐 (pH8.2) 溶液, 制备溶解溶液。以专利文献 1 (日本特开 2008-50344) 作为参考对溶解溶液进行重折叠处理。具体而言, 在溶解溶液中加入 Tween80 (终浓度 0.05%)、乙酸钠 (终浓度 1M), DL-胱氨酸 (终浓度 2mM), 在 4°C 静置过夜。在重折叠处理后, 使用 His Trap HP (GE Healthcare) 对 Stx2eB-His-COMP-His-Z 进行纯化, 通过超滤 (Amicon Ultra-15 30kDa, Millipore 株式会社) 将缓冲液替换为 PBS, 得到产物作为 Stx2e-His-COMP-His-Z 抗原。在非还原状态下使用 5-20% 丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE, 通过采用 CBB 染色和抗 His 抗体的 western 印迹法确认了多聚体的形成 (图 5)。

[0146] 实施例 3

[0147] 1. 小鼠中的中和抗体诱导确认

[0148] (1) 疫苗制备和对小鼠的免疫

[0149] a. Stx2eB-His 抗原和 Stx2eB-His-COMP 抗原的中和抗体诱导能力比较

[0150] 制备每 100 μL 为 50 μg 的 Stx2eB-His-COMP 抗原与 50 μL 的 Imject Alum (注册商标) (Thermo Fisher Scientific Inc.) 混合而得的疫苗。由于与 50 μg 的 Stx2eB-His-COMP 同等的摩尔数的 Stx2eB-His 为 26.6 μg, 因此, 制备每 100 μL 为 26.6 μg 的 Stx2eB-His 抗原和 50 μL 的 Imject Alum (注册商标) 混合而得的疫苗。此外, 将每 100 μL 为 50 μg 的 Stx2eB-His-COMP 抗原和 50 μL 的不完全弗氏佐剂 (日本 Becton Dickinson 株式会社) 混合和乳化来制备疫苗。

[0151] 对每组 5 只 7 周龄雌性 BALB/c 小鼠皮下注射 3 次疫苗, 每次 100 μL, 间隔 2 周。在第 3 次免疫后 2 周进行采血, 通过使用下述 Vero 细胞的 Stx2e 中和试验测定抗体效价。

[0152] b. Stx2eB-His-COMP 抗原和 Stx2eB-His-COMP-His-Z 抗原之间中和抗体诱导能力比较

[0153] 制备每 100 μL 为 50 μg 的 Stx2eB-His-COMP 抗原与 50 μL 的 Imject Alum (注册商标) 混合而得的疫苗。由于与 50 μg 的 Stx2eB-His-COMP 同等摩尔数的 Stx2eB-His-COMP-His-Z 为 75 μg, 因此制备每 100 μL 为 75 μg 的 Stx2eB-His-COMP-His-Z 抗原和 50 μL 的 Imject Alum (注册商标) 混合而得的疫苗。

[0154] 对每组 5 只 7 周龄雌性 BALB/c 小鼠皮下注射 3 次疫苗, 每次 100 μL, 间隔 2 周。在第 3 次免疫后 2 周进行采血, 通过使用了下述 Vero 细胞的 Stx2e 中和试验测定抗体效价。

[0155] (2) 毒素液的制备

[0156] 用由猪分离出的水肿病菌的甘油储备液对 Circlegrow (MP Biomedicals) 琼脂培养基接种 1 环的量, 在 37°C 培养过夜。将单菌落接种到加有 50mL 的 Circlegrow 培养基的 500mL 锥形烧瓶, 在 37°C 以 220rpm 旋转培养过夜。在加有 50mL 的 Circlegrow 培养基的 4 个 500mL 锥形烧瓶中每次 5mL 接种上述培养菌液, 在 37°C 以 220rpm 旋转培养 8 小时。集中菌液, 测定吸光度 (OD_{650})。在 10000g、4°C、15 分钟条件下离心, 回收沉淀物。将沉淀物悬浮在 20mL 的 10mM Tris-HCl (7.0) 中。进行超声波处理 (Branson, Duty Cycle 30%, Output 1), 在吸光度 (OD_{650}) 降至处理前的 60% 时结束。在 10000g、4°C、30 分钟条件下离心, 回收上清液。通过 0.22 μ m 过滤器过滤处理进行灭菌。在 -80°C 冷冻保存。

[0157] (3) 细胞毒性活性测定

[0158] <材料>

[0159] • 细胞 ;Vero 细胞

[0160] • 培养用培养基 : 加有 5% FBS 的伊格尔培养基 (10% TPB, 1.5% 碳酸氢钠, 0.1% PS)

[0161] • 稀释用培养基 : 伊格尔培养基 (10% TPB, 1.5% 碳酸氢钠, 0.1% PS)

[0162] <细胞悬浮液的制备>

[0163] 将 Vero 细胞在培养用培养基中培养, 除去上清液。每中等尺寸方形 (75cm²) 添加 3mL 的胰蛋白酶 -EDTA, 在 37°C 处理 5 ~ 10 分钟。添加 10mL 的培养用培养基, 通过抽吸将细胞分开并回收到离心管。以 1500rpm 离心 5 分钟, 回收细胞。用 5mL 的培养用培养基再悬浮, 计数细胞数。用培养用培养基调整至 4.0×10^5 个细胞 /mL。

[0164] <细胞毒性活性的测定>

[0165] 在细胞培养用 96 孔板中以 125 μ l / 孔的量加入稀释用培养基。以 25 μ l / 孔加入用稀释用培养基进行了 2 倍连续稀释的毒素液。以 50 μ l / 孔加入调整至 4.0×10^5 细胞 / mL 的细胞悬浮液。对板进行密封, 在 37°C 培养 5 天。

[0166] <评价>

[0167] 确认阴性对照的细胞片形成率为 95% 以上, 将细胞片形成率显示 50% 以下的稀释倍数设为 50% 细胞毒活性量 (细胞毒性剂量, CD_{50})。

[0168] (4) 使用 Vero 细胞的 Stx2e 中和试验

[0169] <材料>

[0170] • 细胞 :Vero 细胞

[0171] • 培养用培养基 : 加有 5% FBS 的伊格尔培养基 (10% TPB, 1.5% 碳酸氢钠, 0.1% PS)

[0172] • 稀释用培养基 : 伊格尔培养基 (10% TPB, 1.5% 碳酸氢钠, 0.1% PS)

[0173] <细胞悬浮液的制备>

[0174] 将 Vero 细胞在培养用培养基中培养后, 除去细胞的上清液。每中等尺寸方形 (75cm²) 添加 3mL 的胰蛋白酶 -EDTA, 在 37°C 处理 5 ~ 10 分钟。添加 10mL 的培养用培养基, 通过冲吸将细胞分开并回收到离心管。以 1500rpm 离心 5 分钟, 回收细胞。用 5mL 的培养用培养基再悬浮, 计数细胞数。用培养用培养基调整至 4.0×10^5 细胞 /mL。

[0175] <中和反应>

[0176] 将用稀释用培养基调整至 $10CD_{50}$ 的毒素液 (60 μ l) 和用稀释用培养基进行了 2 倍

连续稀释的被检血清样品 (60 μ L) 混合, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。在 96 孔板中将稀释用培养基以 100 μ L/孔加入。每孔 50 μ L 加入在 37 $^{\circ}$ C 反应的中和反应液。以 50 μ L/孔加入调整至 4.0×10^5 细胞/mL 的细胞悬浮液。对板进行密封, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 5 天。

[0177] <评价>

[0178] 确认阴性对照的细胞片形成率为 95% 以上, 将细胞片形成率显示 50% 以上的被检血清样品的最高稀释倍率设为中和抗体效价。结果示于表 1 和表 2 中。

[0179] [表 1]

[0180] Stx2eB-His 抗原和 Stx2eB-His-COMP 抗原的中和抗体诱导能力比较

[0181]

抗原	佐剂	个体编号				
		1	2	3	4	5
安慰剂(PBS)	ImjectAlum	<1	<1	<1	<1	<1
Stx2eB-His	ImjectAlum	<1	<1	<1	<1	<1
Stx2eB-His-COMP	ImjectAlum	>64	>64	32	32	8
Stx2eB-His-COMP	IFA	>64	>64	>64	8	16

[0182] [表 2]

[0183] Stx2eB-His-COMP 抗原和 Stx2eB-His-COMP-His-Z 抗原的中和抗体诱导能力比较

[0184]

抗原	佐剂	个体编号				
		1	2	3	4	5
安慰剂(PBS)	ImjectAlum	<2	<2	<2	<2	<2
Stx2eB-His-COMP	ImjectAlum	>128	16	>128	>128	>128
Stx2eB-His-COMP-Z	ImjectAlum	8	32	4	16	32

[0185] 由以上结果确认, Stx2eB-His-COMP 抗原在小鼠中诱导针对 Stx2e 的中和抗体。另一方面, 在 Stx2eB-His 注射组中未见中和抗体的上升。由该研究结果可知, 仅 Stx2eB 时难以形成合适的多聚体结构, 显示出与 COMP 融合的优势性。此外确认了, Stx2eB-His-COMP 抗原与 Stx2eB-His-COMP-His-Z 抗原相比可以诱导显著高效毒素中和抗体。

[0186] 2. 小鼠中的 Stx2e 攻击试验

[0187] 制备每 100 μ L 为 50 μ g 的 Stx2e-His-COMP 抗原和 50 μ L 的不完全弗氏佐剂 (日本 Becton Dickinson 社) 混合并乳化的疫苗。测试小鼠为 7 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 每组为 10 只, 将疫苗以 100 μ L 皮下注射 3 次, 间隔 2 周。在第 3 次免疫后 2 周, 腹腔内注射 0.4mL (32000 50% Vero 细胞变性量) 由水肿病菌制备的毒素液 (制备方法如上所述)。在 Stx2e 给药后 7 天进行观察, 确认了死亡只数的结果示于表 3 中。

[0188] [表 3]

[0189]

组	供试数	生存数	生存率(%)
安慰剂(PBS)	10	4	40
Stx2eB-His-COMP	10	10	100

[0190] 由表 3 确认了,在安慰剂组和免疫组中可见显著性差异 ($p = 0.0041$),通过将 Stx2eB-His-COMP 抗原对小鼠免疫能防御 Stx2e 攻击。

[0191] 实施例 4

[0192] 猪的中和抗体诱导确认

[0193] 制备包含每 2mL 为 100 μ g 的 Stx2eB-His-COMP 抗原和 0.4mL 的 Emulsigen (MVP Laboratories) 的疫苗。对 3~4 周龄的猪在颈部肌肉内注射 2 次疫苗,间隔 2 周。在初次免疫时、追加免疫时和追加免疫后 2 周采血,通过使用了 Vero 细胞的 Stx2e 中和试验测定抗体效价。将结果示于表 4 中。

[0194] [表 4]

[0195]

组	个体编号	初次免疫	追加免疫	追加免疫后 2 周
安慰剂(PBS)	1	<2	<2	<20
	2	<2	<2	<20
	3	<2	8	<20
	4	<2	<2	20
Stx2eB-His-COMP	5	<2	8	40
	6	<2	8	80
	7	2	2	80

[0196] 由该结果确认了,Stx2eB-His-COMP 抗原在猪中也能诱导针对 Stx2e 的中和抗体。

[0197] 实施例 5

[0198] 猪的 Stx2e 攻击试验

[0199] 对于在实施例 4 中使用的猪,在追加免疫后 2 周,腹腔内注射 20mL (600000 50% Vero 细胞变性量) 由水肿病菌制备的毒素液 (制备方法如上所述)。此外,为了排除混入的 LPS 的影响,将 Stx2e 溶液在 80℃ 加热 10 分钟而使 Stx2e 热失活而得的溶液给予安慰剂组的 1 只猪。在 Stx2e 给药后 3 天观察临床症状。将结果示于表 5 中。

[0200] [表 5]

[0201]

组	个体编号	攻击时中和抗体效价	毒素加热	攻击后3天观察
安慰剂(PBS)	1	<20	无	攻击次日死亡
	2	<20	有	无异常
	3	<20	无	无异常
Stx2eB-His-COMP	4	20	无	无异常
	6	80	无	无异常

[0202] 由表 5 的结果确认了,通过将 Stx2eB-His-COMP 抗原对猪免疫可以防御 Stx2e 的攻击。

[0203] 实施例 6

[0204] Stx2eB-His-CMP 蛋白及其多聚体的制备

[0205] (1)Stx2eB-His-CMP 表达载体的构建和 Stx2eB-His-CMP 表达型大肠杆菌的制备

[0206] 为了使 Stx2eB、(GP)₂GH₆(G₄S)₃ 连接序列和 CMP 的融合蛋白(以下称为 Stx2eB-His-CMP)(SEQ ID NO:35)(图 6)在大肠杆菌中表达而将密码子优化(SEQ ID NO:34),设计用于在表达载体中插入的对 5' 末端增加了限制性酶 Nco I 识别序列以及对 3' 末端增加了限制性酶 XhoI 识别序列,进一步对 5' 末端以及 3' 末端增加了保护碱基的 DNA 序列(SEQ ID NO:36),进行人工合成。将该合成 DNA 插入到质粒 pUC57(GenScript 株式会社)的 EcoRV 位点。将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α ,将所得的质粒设为“中间载体 6”。

[0207] 将中间载体 6 用 Nco I 和 Xho I 处理,获得了编码 Stx2eB-His-CMP 的 DNA 片段。将该 DNA 片段和用 Nco I 和 Xho I 进行了处理的质粒 pET-21d(Merck 株式会社)进行连接。将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α ,将所得的质粒设为 pSTX-CMP。此外,将 pSTX-CMP 导入到大肠杆菌 BL21(DE3)(Merck 株式会社)中,获得了表达的 Stx2eB-His-CMP 大肠杆菌 STX-CMP 株。

[0208] (2)STX-CMP 株的培养以及 Stx2e-His-CMP 抗原的制备

[0209] 在 12mL 尺寸的试管中加入 3mL 的 2 \times YT 培养基和氨苄西林溶液(终浓度 200 μ g/mL),接种 STX-CMP 株,在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 16 小时左右(前培养)。在 2L 尺寸的锥形烧瓶中加入 200mL 的 2 \times YT 培养基和氨苄西林溶液(终浓度 200 μ g/mL),在其中接种 2mL 的前培养菌液,在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养直到 OD₅₉₀ 超过 0.5 为止。正式培养物的 OD₅₉₀ 超过 0.5 后,以终浓度 10 μ M 添加异丙基 - β - D - 吡喃半乳糖苷(IPTG),在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6 小时。将正式培养液移至离心管中,通过 10,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分钟的离心分离来回收菌体。将 100mL 培养量的菌体悬浮在包含溶菌酶(终浓度 1mg/mL)的裂解缓冲液(50mM Tris-HCl(pH8.0),500mM NaCl)中,使用超声波粉碎机 UD-201(Tomy 株式会社)进行菌体破碎。将菌体破碎液以 10,000rpm、4 $^{\circ}$ C 下离心分离 10 分钟,获得包涵体。通过将该包涵体再次悬浮在裂解缓冲液中来进行洗涤,以 10,000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心分离 10 分钟,回收包涵体。

[0210] 接下来,在包涵体中加入包含 50mM tris(pH8.2)、6M 胍盐酸盐的缓冲液,制备溶解溶液。将溶解溶液通过阶段透析进行重折叠处理。具体而言,用包含 50mM tris(pH8.2)、2M

胍酸盐的缓冲液透析 4 小时,接下来用包含 50mM tris (pH8.2)、1M 胍酸盐、1M 精氨酸盐、5mM DL-胱氨酸的缓冲液透析 4 小时,接下来用包含 50mM tris (pH8.2)、0.5M 胍酸盐、1M 精氨酸盐、5mM DL-胱氨酸的缓冲液透析 16 小时,最后用包含 1M 精氨酸盐的 PBS 缓冲液透析 4 小时。将由此得到的样品作为 Stx2eB-His-CMP 抗原。在非还原状态下使用 12.5% 丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE,通过采用 CBB 染色和抗 His 抗体的 western 印迹法确认了多聚体的形成 (图 7)。

[0211] 实施例 7

[0212] 小鼠中的 Stx2e 攻击试验

[0213] (1) 疫苗制备

[0214] 由于与实施例 3 所记载的 50 μ g 的 Stx2eB-His-CMP 同等摩尔数的 Stx2eB-His-CMP 为 46.5 μ g,因此将每 100 μ L 为 46.5 μ g 的 Stx2eB-His-CMP 抗原和 50 μ L 的不完全弗氏佐剂 (日本 Becton Dickinson 株式会社) 混合并乳化来制备疫苗。

[0215] (2) 小鼠中的 Stx2e 攻击试验

[0216] 测试小鼠为每组 10 只的 9 周龄雌性 BALB/c 小鼠。免疫组中,每次 100 μ L 皮下注射 2 次疫苗,间隔 2 周。对未给药组不进行任何给药。在第 2 次免疫后 2 周,将由水肿病菌制备的 Stx2e 毒素液 (制备方法如上所述) 以 0.4mL (64000 50% Vero 细胞变性量) 注射到腹腔内。在 Stx2e 给药后观察 7 天,确认了死亡只数的结果示于表 6 中。

[0217] [表 6]

[0218]

组	测试数	生存数	生存率(%)
未给药	10	1	10
Stx2eB-His-CMP	10	5	50

[0219] 根据表 6 确认了,未给药组与免疫组中可见显著性差异 ($p = 0.047$),通过将 Stx2eB-His-CMP 抗原对小鼠免疫可以为半数的小鼠防御免受 Stx2e 攻击。

[0220] 工业实用性

[0221] 能够在预计发生猪水肿病的农场中进行猪水肿病的发病预防。

[0001]

序列表

- <110> 一般财团法人化学及血清疗法研究所
佳特泰斯创新株式会社
- <120> 用于预防猪水肿病的疫苗
- <130> PF-130023-W0
- <150> JP2012-233224
- <151> 2012-10-22
- <160> 36
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1
- <211> 264
- <212> DNA
- <213> STEC

- <400> 1
- atgaagaaga tgtttatage gttttatit gcattfgttt ctgttaatgc aatggcggeg 60
- gatttggeta aaggtaaaat tgagttttcc aagtataatg aggataatac ctttactgtg 120
- aagggtgtcag gaagagaata ctggacgaac agatggaatt tgcagccatt gttacaaagt 180
- gtcagctga cagggatgac tgtaacaatc atatctaata cctgcagttc aggtcaggc 240
- tttgcgccagg tgaagtttaa ctga 264

- <210> 2
- <211> 270
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 大肠杆菌和酵母表达的修饰

- <400> 2
- catatgaaaa aaatgtttat cgggtgctg ttegccttgg tgagcgtaa tgcgatgccc 60
- gcgatttgcg cgaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 120
- gtgaaagtga gcggtcgcga atattggacc aatcgttggga atctgcagcc gttactgcaa 180
- tcggcccagc tgaecggcat gaccgttacc attatcagea acacctgcag ctcgggcagt 240
- ggttttgcgc aggtgaaatt caatctcgag 270

- <210> 3
- <211> 31
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 包含 Nco I 限制性酶识别序列

- <400> 3
- catgccatgg attgcgcgaa aggc aaaatt g 31

[0002]

<220>		
<223>	包含Mun I 限制性酶识别序列	
<400>	7	
	gcgccaattg gccacatga ttaaattaa atttgggttt	40
<210>	8	
<211>	88	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Mun I限制性酶识别序列和(GP)2GH6 (EcoRI) H6连接序列	
<400>	8	
	ggcaattggt aatgatggtg atggtgatgg aattcatggt gatggtgatg atgtccaggt	60
	cctggacct ttgccatact aattgegg	88
<210>	9	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	(G4S)3 连接序列	
<400>	9	
	ggcggtggcg gtageggcgg tggeggtagc ggcggtggcg gtage	45
<210>	10	
<211>	165	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	为大肠杆菌和酵母表达进行修饰	
<400>	10	
	ggcggtgatc tggcgccgca gatgctgccc gaactgcagg aaaccaacgc ggccctgcaa	60
	gatgtgctg aactgctgccc ccagcaagtg aaagaaatta cttttctgaa aaatacggtt	120
	atggaatgeg atgctgtgg catgeagcgg gcccgtaacc cgggc	165
<210>	11	
<211>	210	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	为(G4S)3 连接序列和大肠杆菌进行修饰	
<400>	11	
	ggcggtggcg gtageggcgg tggeggtagc ggcggtggcg gtageggcgg tgatctggcg	60
	ccgcagatgc tgcgcgaact gcaggaaacc aacgeggccc tgcaagatgt gcgtgaaactg	120
	ctgcgccagc aagtgaaaga aattaccttt ctgaaaaata ccgttatgga atgcgatgcg	180

[0004]

tgtggcatgc agceggcccg taccecgge	210
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 包含Mun I 限制性酶识别序列	
<400> 12	
gcgcaattgg gcggtggcgg tagcggcggt	30
<210> 13	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 包含EcoR I 限制性酶识别序列	
<400> 13	
gcggaattcg cccggggtac ggcccggctg c	31
<210> 14	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 包含Xho I 限制性酶识别序列	
<400> 14	
gggctcgagg gtccaggacc tggacatc	28
<210> 15	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 包含Xho I 限制性酶识别序列	
<400> 15	
gggctcgagt cagcccggg tacggcc	28
<210> 16	
<211> 153	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Stx2cB-His-COMP	
<400> 16	
Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp	
1 5 10 15	

[0005]

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu Gly Pro Gly Pro Gly His His His His His
 65 70 75 80

His Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Ser Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu
 100 105 110

Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val
 115 120 125

Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys
 130 135 140

Gly Met Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly
 145 150

<210> 17
 <211> 462
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Stx2cB-His-COMP

<400> 17
 atggattgcg cgaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacetttacc 60
 gtgaaagtga gcggtcgca atattggacc aatcgttgga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccage tgaccggcat gaccgttaec attatcagea acacctgeag etcgggcagt 180
 ggttttgcegc agtgaaatt caatctogag ggtccaggac ctggacatca tcaccateac 240
 catgaattgg gcggtggcgg tagcggcggt ggcggtagcg gcggtggcgg tagcggcggt 300
 gatctggcgc cgcagatgct gcgcgaactg caggaaacca acgcggccct gcaagatgtg 360
 cgtgaaactgc tgcgccagca agtgaaagaa attacetttc tgaaaaatac cgttatggaa 420
 tgcgatgctg gtgcatgca gccggcccgt accccgggct ga 462

<210> 18
 <211> 231
 <212> PRT

[0006]

<213> 人工序列

<220>

<223> Stx2eB-His-COMP-His-Z

<400> 18

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu Gly Pro Gly Pro Gly His His His His His
65 70 75 80

His Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu
100 105 110

Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val
115 120 125

Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys
130 135 140

Gly Leu Asp Gly Pro Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser His His His His
145 150 155 160

His His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Gly Pro Leu Asp Val Asp Asn
165 170 175

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
180 185 190

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
195 200 205

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
210 215 220

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
225 230

[0007]

<210> 19
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Stx2eB-His-COMP-His-Z

<400> 19
 atggattgcg cgaaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 60
 gtgaaagtga gcggtcgega atattggacc aatcgttggga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctcgggcagt 180
 ggttttgcgc aggtgaaatt caatctcgag ggtccaggac ctggacatca tcaccateac 240
 catgaattgg gcggtggcgg tagcggcggt ggcggtagcg gcggtggcgg tagcggcggt 300
 gatctggcgc cgeagatgct gcgcgaactg caggaaacca acggggccct gcaagatgtg 360
 cgtgaactgc tgcgccagca agtgaaagaa attaccttct tgaaaaatac cgttatggaa 420
 tgcgatgcgt gtggcctega cggcccgggc cggggcggtg gcggtagcca teatcaccat 480
 catcacggcg gtggcggtag cggcccgggc cgcctcgacg tggataacaa atttaataaa 540
 gaacagcaga acgcttctta tgaattcttg calctgcaga acctgaacga agaacagcgt 600
 aacgcttita tteagagcct gaaagatgat cegagccaga gcgccaatct gctggcagaa 660
 gccaaaaaac tgaacgatgc acaggecccg aaataa 696

<210> 20
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> STEC

<400> 20

Met Lys Lys Met Phe Ile Ala Val Leu Phe Ala Leu Val Ser Val Asn
 1 5 10 15

Ala Met Ala Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30

Asn Glu Asp Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp
 35 40 45

Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr
 50 55 60

Gly Met Thr Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly
 65 70 75 80

Phe Ala Gln Val Lys Phe Asn
 85

[0008]

<210> 21
 <211> 207
 <212> DNA
 <213> STEC

 <400> 21
 gcggattgtg ctaaaggtaa aattgagttt tccaagtata atgaggataa tacctttact 60
 gtgaagggtg caggaagaga atactggaag aacagatgga atttgcagcc attgttacia 120
 agtgeteage tgacagggat gactgtaaca atcatateta atacctgcag ttcaggctea 180
 ggctttgccc aggtgaagtt taactga 207

<210> 22
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> STEC

<400> 22

Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

Val Lys Phe Asn
 65

<210> 23
 <211> 210
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 为大肠杆菌和酵母表达进行修饰, 不含分泌信号

<400> 23
 atggattgcg cgaaaggca aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 60
 gtgaaagtga gcggtcgcga atattggacc aatcgttggga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctggggcagt 180
 ggttttgcgc aggtgaaatt caatctcgag 210

<210> 24
 <211> 70
 <212> PRT

[0009]

<213> 人工序列

<220>

<223> 为大肠杆菌和酵母表达进行修饰, 不含分泌信号

<400> 24

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu
65 70

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (G4S)₃ 连接序列

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 26

<211> 165

<212> DNA

<213> 哺乳动物

<400> 26

ggtggagacc tagcccccaca gatgettcga gaactccagg agactaatgc ggcgctgcaa 60

gacgtgagag agctcttggc acagcaggtc aaggagatca ccttcctgaa gaatacgggtg 120

atggaatgtg acgcttgcgg aatgcagccc gcacgcaccc ceggt 165

<210> 27

<211> 55

<212> PRT

<213> 哺乳动物

<400> 27

Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn
1 5 10 15

[0010]

Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu
20 25 30

Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met
35 40 45

Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly
50 55

<210> 28

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 为大肠杆菌和酵母表达进行修饰

<400> 28

Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu
20 25 30

Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met
35 40 45

Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly
50 55

<210> 29

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码(G4S)3 连接序列和COMP

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala
20 25 30

Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu Ile
35 40 45

Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met Gln
50 55 60

Pro Ala Arg Thr Pro Gly

[0011]

65	70	
<210> 30		
<211> 129		
<212> DNA		
<213> 原鸡		
<400> 30		
gaggaagatc catgcgaatg taaatctata gtgaagttcc agacaaaagt tgaagaacte		60
atcaatacac tgcagcagaa attggaagct gtggcaaaaa ggattgaagc cctggagaat		120
aagatcattc		129
<210> 31		
<211> 129		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 为大肠杆菌和酵母表达进行修饰		
<400> 31		
gaagaagatc cgtgcgaatg taaatccatt gtgaaatttc agacaaaagt tgaagaactg		60
atcaacacgc tgcaacaaaa actggaagcg gtggcgaaac gcattgaagc actggaaaac		120
aaaatcattc		129
<210> 32		
<211> 43		
<212> PRT		
<213> 原鸡		
<400> 32		
Glu Glu Asp Pro Cys Glu Cys Lys Ser Ile Val Lys Phe Gln Thr Lys		
1 5 10 15		
Val Glu Glu Leu Ile Asn Thr Leu Gln Gln Lys Leu Glu Ala Val Ala		
20 25 30		
Lys Arg Ile Glu Ala Leu Glu Asn Lys Ile Ile		
35 40		
<210> 33		
<211> 43		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 为大肠杆菌和酵母表达进行修饰		
<400> 33		
Glu Glu Asp Pro Cys Glu Cys Lys Ser Ile Val Lys Phe Gln Thr Lys		
1 5 10 15		

[0012]

Val Glu Glu Leu Ile Asn Thr Leu Gln Gln Lys Leu Glu Ala Val Ala
 20 25 30

Lys Arg Ile Glu Ala Leu Glu Asn Lys Ile Ile
 35 40

<210> 34
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Stx2eB-His-CMP

<400> 34
 atggactgtg cgaaggcaa aatcgaattt agcaaataca atgaagataa taegtttacg 60
 gtgaaagtgt cgggtcgtga atactggacc aaccgttggga atctgcagec gctgetgcag 120
 tctgcgcaac tgaccggtat gaccgtcacc attatctcga acacgtgcag ctctggcage 180
 ggttttgecc aagttaaatt caatctggaa ggcccgggtc eggccatca ccateaccat 240
 cacgaactgg gcggtggcgg tagtggcggg ggcggttccg gcggtggcgg ttcagaagaa 300
 gatccgtgcg aatgtaaate catttgaaa tttagacca aagtgaaga actgatcaac 360
 acgctgcaac aaaaactgga agcgggtggcg aaacgcattg aagcactgga aaacaaaatc 420
 atctaa 426

<210> 35
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Stx2eB-His-CMP

<400> 35

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu Gly Pro Gly Pro Gly His His His His His
 65 70 75 80

His Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

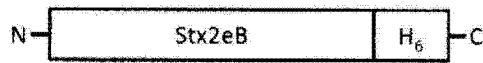
[0013]

	85	90	95
Gly Ser Glu Glu Asp Pro Cys Glu Cys Lys Ser Ile Val Lys Phe Gln	100	105	110
Thr Lys Val Glu Glu Leu Ile Asn Thr Leu Gln Gln Lys Leu Glu Ala	115	120	125
Val Ala Lys Arg Ile Glu Ala Leu Glu Asn Lys Ile Ile	130	135	140

<210> 36
 <211> 473
 <212> DNA
 <213> 人工序列

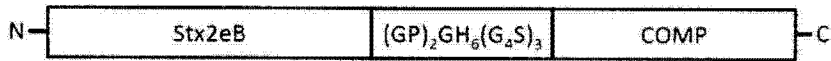
<220>
 <223> Stx2eB-His-CMP

<400> 36
 agaaggagat ataccatgga ctgtgcgaaa ggcaaaatcg aatttagcaa atacaatgaa 60
 gataatacgt ttacggtgaa agtgtcgggt cgtgaatact ggaccaaccg ttggaatctg 120
 cagccgctgc tgcagtctgc gcaactgacc ggtatgaccg tcacgattat ctcgaacacg 180
 tgcagctctg gcagcggttt tgcccaagtt aaattcaatc tggaaggccc gsgtccgggc 240
 catcaccatc accatcacga actgggcggt ggcggtagtg gcggtggcgg ttccggcggt 300
 ggcggttcag aagaagatcc gtgcgaatgt aaatccattg tgaaatttca gaccaaagtt 360
 gaagaactga tcaacacgct gcaacaaaaa ctggaagcgg tggegaaacg cattgaagca 420
 ctggaaaaaca aaatcatcta actcgagcac caccaccace accactgaga tcc 473



N: 氨基末端, C: 羧基末端, H₆: 组氨酸标签。

图 1



N: 氨基末端, C: 羧基末端, (GP)₂GH₆(G₄S)₃: 连接序列, COMP: 软骨寡聚基质蛋白的5聚体形成结构域。

图 2

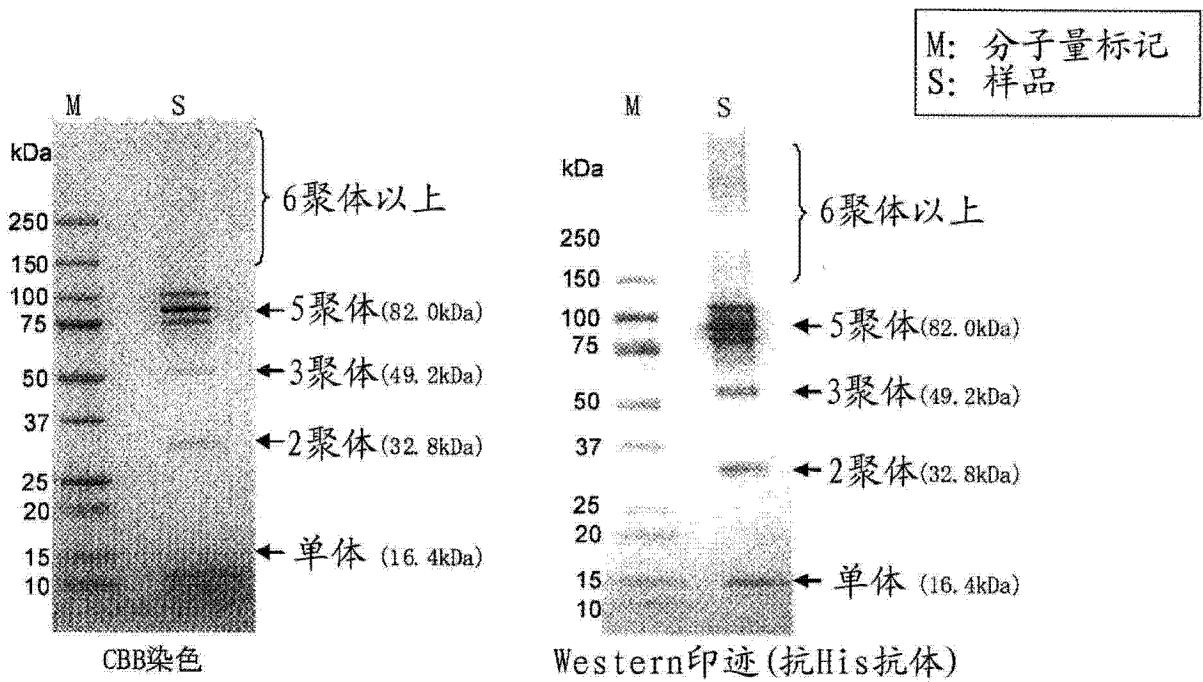
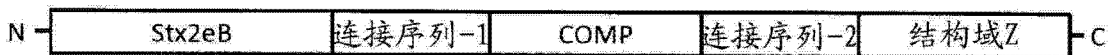


图 3



N: 氨基末端, C: 羧基末端, 连接序列-1: (GP)₂GH₆(G₄S)₃, COMP: 软骨寡聚基质蛋白的5聚体形成结构域, 连接序列-2: (GP)₂G₄SH₆G₄S(GP)₂, 结构域Z: 免疫球蛋白结合结构域Z。

图 4

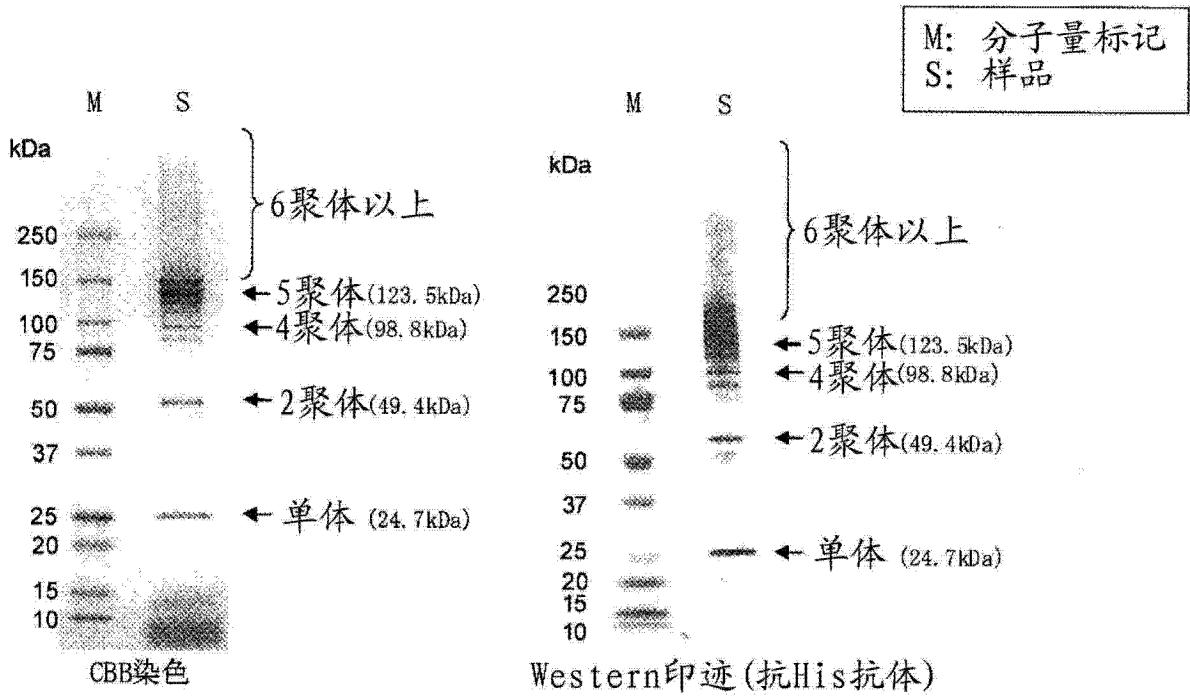
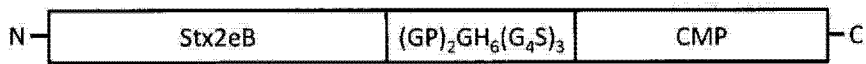


图 5



N: 氨基末端, C: 羧基末端, (GP)₂GH₆(G₄S)₃: 连接序列, CMP: 软骨基质蛋白的3聚体形成结构域。

图 6

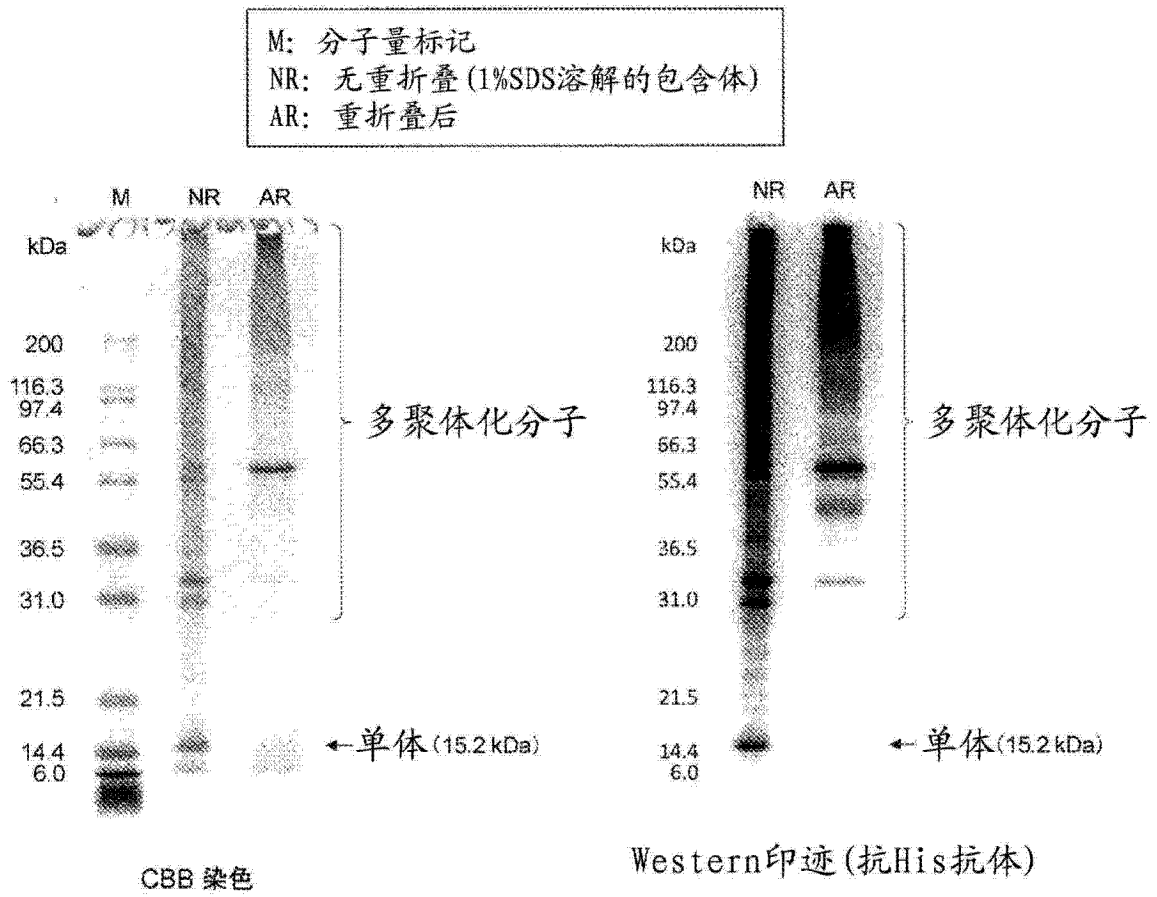


图 7

专利名称(译)	用于预防猪水肿病的疫苗		
公开(公告)号	CN104755619A	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201380055095.0	申请日	2013-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	佳特泰斯创新株式会社		
申请(专利权)人(译)	一般财团法人化学及血清疗法研究所 佳特泰斯创新株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	一般财团法人化学及血清疗法研究所 佳特泰斯创新株式会社		
[标]发明人	横川显治 胁贵志 本田容子 上藤洋敬 濑胁智满 新川武 原国哲也 宫田健		
发明人	横川显治 胁贵志 本田容子 上藤洋敬 濑胁智满 新川武 原国哲也 宫田健		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/395 A61K47/42 A61K47/48 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/395 C07K14/47 C07K16/12 C07K16/14 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0258 C07K14/245 C07K2319/55 C07K2319/73 C07K2319/21 A61K2039/552 A61P31/04 C07K16/1232 C07K2317/76 Y02A50/474 A61K39/0005 A61K2039/53 C07K14/435 C07K16/18		
代理人(译)	洪欣		
优先权	2012233224 2012-10-22 JP		
其他公开文献	CN104755619B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是对预计发生猪水肿病的农场提供可以预防猪水肿病的疫苗。满足该目的的疫苗是具有卷曲螺旋形成单元的多肽与Stx2eB结合而得的融合蛋白或所述融合蛋白的多聚体，通过用该疫苗对猪免疫，能够诱导高效中和抗体并抵御猪水肿病的发病。

抗原	佐剂	个体编号				
		1	2	3	4	5
安慰剂(PBS)	ImjectAlum	<1	<1	<1	<1	<1
Stx2eB-His	ImjectAlum	<1	<1	<1	<1	<1
Stx2eB-His-COMP	ImjectAlum	>64	>64	32	32	8
Stx2eB-His-COMP	IFA	>64	>64	>64	8	16