

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/02

C07K 14/21 C12N 15/31

C12N 1/21 G01N 33/569



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816921.2

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549727A

[22] 申请日 2002.8.27 [21] 申请号 02816921.2

[30] 优先权

[32] 2001.8.27 [33] US [31] 60/314,634

[86] 国际申请 PCT/CA2002/001315 2002.8.27

[87] 国际公布 WO2003/018052 英 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.27

[71] 申请人 希雷生物化学有限公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 D·马丁 J·哈梅尔

B·R·布罗德 尔 S·理欧克斯

J·库图尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 5 页 说明书 29 页 序列表 8 页  
附图 2 页

[54] 发明名称 粘膜炎莫拉氏(布拉汉氏)菌多肽及  
相应 DNA 片段

[57] 摘要

本发明涉及可用于预防、诊断和/或治疗用途  
的粘膜炎莫拉氏(布拉汉氏)菌多肽。

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

1. 一种分离的多聚核苷酸，包含选自下列的多聚核苷酸：

(a) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多聚核苷酸；

(b) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多聚核苷酸；

(c) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多聚核苷酸；

(d) 编码包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的多聚核苷酸；

(e) 编码的多肽能引发对包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多聚核苷酸；

(f) 编码多肽的带有抗原决定部位的部分的多聚核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列；

(g) 包含选自 SEQ ID NOS: 1, 3 或其片段或类似物的序列的多聚核苷酸；

(h) 与 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 或 (g) 中的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸。

2. 一种分离的多聚核苷酸，包含选自下列的多聚核苷酸：

(a) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多聚核苷酸；

(b) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多聚核苷酸；

(c) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多聚核苷酸；

(d) 编码包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的多聚核苷酸；

(e) 编码的多肽能引发对包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的

多肽具有结合特异性的抗体的多聚核苷酸；

(f) 编码多肽的带有抗原决定部位的部分的多聚核苷酸, 该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 的序列；

(g) 包含选自 SEQ ID NOS: 1 或 3 的序列的多聚核苷酸；

(h) 与 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 或 (g) 中的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸。

3. 权利要求 1 中的多聚核苷酸, 其中该多聚核苷酸为 DNA。

4. 权利要求 2 中的多聚核苷酸, 其中该多聚核苷酸为 DNA。

5. 权利要求 1 中的多聚核苷酸, 其中该多聚核苷酸为 RNA。

6. 权利要求 2 中的多聚核苷酸, 其中该多聚核苷酸为 RNA。

7. 一种分离的多聚核苷酸, 其在严紧条件下与以下任一杂交：

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或者

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列。

8. 权利要求 1 中的多聚核苷酸, 其在严紧条件下与以下任一杂交：

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或者

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补的序列；

其中该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列。

9. 权利要求 2 中的多聚核苷酸, 其在严紧条件下与以下任一杂交：

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或者

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 的序列。

10. 权利要求 1 中的多聚核苷酸, 其在严紧条件下与以下任一杂交：

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或者

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含至少 10 个连续的氨基酸残基, 后者来源于包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽。

11. 权利要求 2 中的多聚核苷酸, 其在严紧条件下与以下任一杂

交:

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或者

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中该多肽包含至少 10 个连续的氨基酸残基, 后者来源于包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽。

12. 一种包含权利要求 1 中多聚核苷酸的载体, 其中所述 DNA 可操作地连接于表达控制区。

13. 一种包含权利要求 2 中多聚核苷酸的载体, 其中所述 DNA 可操作地连接于表达控制区。

14. 一种转染有权利要求 12 的载体的宿主细胞。

15. 一种转染有权利要求 13 的载体的宿主细胞。

16. 一种生产多肽的方法, 其包括在适于表达所述多肽的条件下培养根据权利要求 14 的宿主细胞。

17. 一种生产多肽的方法, 其包括在适于表达所述多肽的条件下培养根据权利要求 15 的宿主细胞。

18. 一种分离的多肽, 其包含选自下列的多肽:

(a) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多肽;

(b) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多肽;

(c) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多肽;

(d) 包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽;

(e) 能引发对包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的带有抗原决定部位的部分;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 或 (f) 中的多肽, 其

中 N-末端的甲硫氨酸残基已缺失;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽,其中分泌相关的氨基酸序列已缺失。

19. 一种分离的多肽,其包含选自下列的多肽:

(a) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多肽;

(b) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多肽;

(c) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多肽;

(d) 包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽;

(e) 能引发对包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的带有抗原决定部位的部分;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽,其中 N-末端的甲硫氨酸残基已缺失;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽,其中分泌相关的氨基酸序列已缺失。

20. 一种包含两或多种具有选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的嵌合多肽;只要这些多肽相连形成一条嵌合多肽。

21. 一种包含两或多种具有选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的嵌合多肽;只要这些多肽相连形成一条嵌合多肽。

22. 包含根据权利要求 18 至 21 任一项的多肽以及可药用的载体、稀释剂或辅助剂的药物组合物。

23. 一种在易受莫拉氏菌感染的宿主中对莫拉氏菌感染进行预防性或治疗性处理的方法,包含对上述宿主施用预防或治疗量的根据权利要求 22 的组合物。

24. 一种根据权利要求 23 的方法,其中宿主为新生儿、婴幼儿或

儿童。

25. 一种根据权利要求 23 的方法，其中宿主为免疫妥协的宿主。

26. 一种根据权利要求 23 的方法，其中宿主为成年人。

27. 一种对中耳炎、鼻窦炎、持续性咳嗽、急性咽喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎和侵袭性疾病进行预防性或治疗性处理的方法，该方法包含对上述宿主施用预防或治疗量的根据权利要求 22 的组合物。

28. 一种在易受莫拉氏菌感染的宿主体内诊断莫拉氏菌感染的方法，包含

(a) 从宿主中获得生物学样品；

(b) 将对根据权利要求 18 至 21 任一项的多肽具有反应活性的抗体或其片段与生物学样品一起孵育以形成混合物；并且

(c) 检测混合物中特异性结合的抗体或结合的片段，这指示莫拉氏菌的存在。

29. 一种在包含或疑似包含特异于莫拉氏菌抗原的抗体的生物学样品中检测上述抗体的方法，其包含

(a) 从宿主中获得生物学样品；

(b) 将一种或多种根据权利要求 18 至 21 任一项的多肽或其片段与生物学样品一起孵育以形成混合物；并且

(c) 检测混合物中特异性结合的抗原或结合的片段，这指示莫拉氏菌的存在。

30. 根据权利要求 22 的药物组合物在制造用以预防性或治疗性处理莫拉氏菌感染的药物中的用途。

31. 包含根据权利要求 18 至 21 任一项的多肽的试剂盒，其用于检测或诊断莫拉氏菌感染。

## 粘膜炎莫拉氏（布拉汉氏）菌多肽 及相应 DNA 片段

### 发明领域

本发明涉及可用于预防、诊断和/或治疗粘膜炎莫拉氏（布拉汉氏）菌（*Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*) 感染的多肽，特别是粘膜炎莫拉氏（布拉汉氏）菌的 SMC-1 和 SMC-2 多肽。

### 发明背景

粘膜炎莫拉氏（布拉汉氏）菌为革兰氏阴性双球菌，可引起人体呼吸道感染。目前认为在婴幼儿和儿童中，粘膜炎莫拉氏菌是仅次于肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）和流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）引起中耳炎的第三常见致病因。粘膜炎莫拉氏菌还和其他几种类型的感染有关，其中包括鼻窦炎、持续性咳嗽、急性咽喉炎、化脓性角膜炎和新生儿结膜炎。

由于近 90% 的粘膜炎莫拉氏菌株系对抗生素具有抗性（ $\beta$ -内酰胺酶阳性），而且复发的中耳炎具有高发病率，因而有必要开发一种能使宿主免受粘膜炎莫拉氏菌感染的疫苗。由粘膜炎莫拉氏菌引起的感染诱导产生针对细菌细胞表面抗原的免疫应答。然而，许多这些表面蛋白质尚未得到鉴定，而且对防护不同株系感染的免疫反应也没有确定。

为了开发一种能使宿主免受粘膜炎莫拉氏菌感染的疫苗，人们主要集中对外膜蛋白质进行尝试，此类蛋白质如名为遍在的表面蛋白质 A (UspA) 的高分子量蛋白质。该蛋白质被认为是有价值的疫苗备选物，因为在鼠类肺部清除模型中其单克隆抗体和多克隆抗体均表现为具有杀菌和防护功效。然而，该蛋白质对不同的粘膜炎莫拉氏菌株系表现

出强烈的差异。除该蛋白质以外，其他粘膜炎莫拉氏菌蛋白质作为潜在疫苗备选物也引发了兴趣。铁传递蛋白结合蛋白暴露于细菌表面，具有保守的抗原决定部位。然而，从一个株系到另一株系蛋白质间存在抗体交叉反应性程度上的偏差。其他一些研究者还关注于 45kDa 的蛋白质 CD (OMP CD)。该蛋白质在粘膜炎莫拉氏菌各株系中高度保守，然而患有慢性梗阻性肺病的成年人中表现出对 OMP CD 的免疫应答的差异性。

因此对用于预防、诊断和/或治疗粘膜炎莫拉氏(布拉汉氏)菌感染的粘膜炎莫拉氏菌多肽仍然存在仍未满足的需求。

### 发明概述

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 70% 同一性。

从一方面来看，本发明涉及包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽。

从另一方面来看，提供由本发明的多聚核苷酸编码所得的多肽、药物组合物、包含可操作地与表达控制区相连接的本发明多聚核苷酸的载体，以及转染上述载体的宿主细胞和包含在适于表达的条件下培养上述宿主细胞以生产多肽的方法。

### 发明简述

图 1 出示来源于粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 SMC-1 基因的 DNA 序列；SEQ ID NOS: 1。序列下划线部分表示编码引导肽的区域。

图 2 出示来源于粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 SMC-1 多肽的氨基酸序列；SEQ ID NOS: 2。序列下划线部分表示 35 个氨基酸残基的引导肽。

图 3 出示来源于粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 SMC-2 基因的 DNA 序列；SEQ ID NOS: 3。序列下划线部分表示编码引导肽的区域。

图 4 出示来源于粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 SMC-2 多肽的氨基酸序列；SEQ ID NOS: 4。序列下划线部分表示 47 个氨基酸残基的引导肽。

### 发明详述

本发明提供分离和纯化的多聚核苷酸，其编码的莫拉氏菌多肽可用于预防、诊断和/或治疗莫拉氏菌感染。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 70% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 80% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 95% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 98% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 70% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 80% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 95% 同一性。

从一方面来看，本发明提供一种分离的多聚核苷酸，其编码的多肽与包含 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 98% 同一性。

从一方面来看，本发明涉及包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的氨基酸序列的多肽。

从一方面来看,本发明涉及包含选自 SEQ ID NOS: 2 和 4 的氨基酸序列的多肽。

从一方面来看,本发明涉及的多肽特征为其氨基酸序列包含 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物。

从一方面来看,本发明涉及的多肽特征为其氨基酸序列包含 SEQ ID NOS: 2, 或 4。

从一方面来看,本发明提供一种多聚核苷酸,其编码包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分。

从一方面来看,本发明提供一种多聚核苷酸,其编码的抗原决定部位带有包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的一部分。

从一方面来看,本发明涉及包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分。

从一方面来看,本发明涉及包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分。

从一方面来看,本发明提供一种分离的多聚核苷酸,其包含选自下列的多聚核苷酸:

(a) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多聚核苷酸;

(b) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多聚核苷酸;

(c) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多聚核苷酸;

(d) 编码的多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多聚核苷酸;

(e) 编码的多肽能引发具有与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的结合特异性的抗体的多聚核苷酸;

(f) 编码包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分的多聚核苷酸;

(g) 包含选自 SEQ ID NOS: 1, 3 或其片段或类似物的序列的多聚核苷酸;

(h) 与 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 或 (g) 中的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸。

从一方面来看, 本发明提供一种分离的多聚核苷酸, 其包含选自以下的多聚核苷酸:

(a) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多聚核苷酸;

(b) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多聚核苷酸;

(c) 编码的多肽与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多聚核苷酸;

(d) 编码的多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多聚核苷酸;

(e) 编码的多肽能引发具有与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的结合特异性的抗体的多聚核苷酸;

(f) 编码包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分的多聚核苷酸;

(g) 包含选自 SEQ ID NOS: 1, 3 的序列的多聚核苷酸;

(h) 与 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 或 (g) 中的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸。

从一方面来看, 本发明提供一种分离的多肽, 其包含选自下列的多肽:

(a) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多肽;

(b) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多肽;

(c) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多肽;

(d) 包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽;

(e) 能引发具有与包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的结合特异性的抗体的多肽;

(f) 包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 或 (f) 中的多肽, 其中 N-末端的甲硫氨酸残基已缺失;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 或 (f) 中的多肽, 其中分泌相关的氨基酸序列已缺失。

从一方面来看, 本发明提供一种分离的多肽, 其包含选自以下的多肽:

(a) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 70% 同一性的多肽;

(b) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 80% 同一性的多肽;

(c) 与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的第二多肽有至少 95% 同一性的多肽;

(d) 包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽;

(e) 能引发具有与包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的结合特异性的抗体的多肽;

(f) 包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的带有抗原决定部位的一部分;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 或 (f) 中的多肽, 其中 N-末端的甲硫氨酸残基已缺失;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 或 (f) 中的多肽, 其中分泌相关的氨基酸序列已缺失。

本领域技术人员会意识到本发明包含 DNA 分子, 即多聚核苷酸序

列及其互补序列，其编码类似物，诸如由本专利申请在此描述的这些多肽的突变体、变体、同源物和衍生物。本发明还包括与本发明 DNA 分子相应的 RNA 分子。除 DNA 和 RNA 分子以外，本发明还包括相应的多肽和特异地与该多肽结合的单特异性抗体。

在另一个实施方案中，本发明的多肽为抗原性的。

在另一个实施方案中，本发明的多肽为免疫原性的。

在另一个实施方案中，本发明的多肽能引发宿主中的免疫应答。

在另一个实施方案中，本发明还涉及能引发具有与上述本发明的多肽的结合特异性的抗体的多肽。

“具有结合特异性”的抗体指抗体识别并与所选的多肽结合，但是基本不识别和结合样品例如生物学样品中的其他分子。可以使用 ELISA 分析测量特异性结合，其中所选的多肽用作抗原。

依据本发明，生物学研究中的“保护”定义为存活曲线、速率或时期上的显著增加。分别使用对数级检测比较生存曲线和用 Fisher 精密测试 (exact test) 比较生存速率和到死亡为止的天数来进行统计学分析，可能有助于计算 P 值并确定两组之间的差异是否具有统计学上的显著性。通常认为 0.05 的 P 值不具有显著性。

从本发明的另一方面来看，提供了本发明多肽的抗原性/免疫原性片段，或其类似物。

本发明中的片段应当包括一个或更多该抗原决定部位区域或者与该区域充分相似以保持其抗原性/免疫原性特性。因此，对于依据于本发明的片段，其同一性程度是相对的，因为按照此处所述可以和多肽或者其类似物的特定部分完全同一。本发明还提供来源于本发明多肽序列的具有至少 10 个连续的氨基酸残基的片段。在一个实施方案中，有至少 15 个连续的氨基酸残基。在一个实施方案中，有至少 20 个连续的氨基酸残基。

本领域技术人员会意识到本发明多肽的类似物还可在本发明中使用，即作为抗原性/免疫原性物质。因此，例如包含一个或多个添加、缺失、替换等的蛋白质或多肽也包含在本发明中。

在此处所使用的，本发明多肽的“片段”、“类似物”或者“衍生物”包括其中用保守或非保守氨基酸残基（优选保守的）替换一个或多个氨基酸残基的多肽，该多肽可能是天然的或非天然的。在一个实施方案中，本发明多肽的衍生物和类似物与图或者片段中所示那些序列有约70%同一性。也就是，70%的残基相同。在另一实施方案中，多肽会具有高于80%的同一性。在另一实施方案中，多肽会具有高于85%的同一性。在另一实施方案中，多肽会具有高于90%的同一性。在另一实施方案中，多肽会具有高于95%的同一性。在另一实施方案中，多肽会具有高于99%的同一性。在另一实施方案中，本发明多肽的类似物只取代、修饰或删除少于20个氨基酸残基，甚至在更优选条件下少于10个。

这些取代对多肽的二级结构和亲水性质具有最低限度的影响。本领域已知优选的取代为保守取代，即替换的残基具有相同的物理或化学特性，例如亲水性、大小、电荷或官能团。这些包括了由 Dayhoff, M. in Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 和 Argos, P. in EMBO J. 8, 779-785, 1989 中所描述的取代。举例来说，无论是天然的还是非天然的氨基酸，归属于以下组之一的代表保守取代：

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his;

以及 phe, tyr, trp, his.

优选的取代还包括 D-对映异构体将相应 L-氨基酸取代。

在另一种方法中，类似物可为融合多肽，所结合的部分可使得纯化更为简单，例如通过有效地将所需多肽进行标记。有可能必须将标记去除，或者可能出现融合肽段自身保留了充分的抗原性质的情况。

同源性百分比定义为同一性的百分比数额与氨基酸类型的相似性或者保守性的百分比数额之和。

在一种实施方案中，本发明多肽的类似物与图中或片段所示的序列有约 70% 同源性。在另一实施方案中，多肽会具有高于 80% 的同源性。在另一实施方案中，多肽会具有高于 85% 的同源性。在另一实施方案中，多肽会具有高于 90% 的同源性。在另一实施方案中，多肽会具有高于 95% 的同源性。在另一实施方案中，多肽会具有高于 99% 的同源性。在另一实施方案中，本发明多肽的类似物只取代、修饰或删除少于 20 个氨基酸残基，更优选条件下少于 10 个。

可以使用诸如 CLUSTAL 这样的程序对氨基酸序列进行比较。该程序对氨基酸序列进行比较并通过适当地在两序列中插入空格找到优化的比对。可以为优化比对进行氨基酸同一性或同源性计算。类似 BLASTx 的程序会比对出最长的相似序列串并对匹配度赋值。从而可以对发现有相似性的几个区域进行比较，每个区域有不同的分值。本发明中安排有两种同一性分析。

在另一种方法中，类似物或衍生物可以为结合了利于纯化的部分的融合多肽，例如由对所需蛋白质或多肽进行有效标记而实现，可能有必要去除“标记”，或者可能会出现融合肽段自身充分保留有用的抗原特性的情况。

众所周知有可能通过筛选抗原性多肽来确定抗原决定部位区域，即决定多肽抗原性或免疫原性的区域。本领域中进行此类筛选的方法广为人知。因此，本发明中的片段应该包括一个或多个此类抗原决定部位区域或与该区域充分相似并保留其抗原性/免疫原性特性。

从本发明另一方面来看，提供本发明蛋白质或多肽的抗原性/免疫原性片段，或者其类似物或衍生物。

因此，对类似物、衍生物和片段而言，重要的是它们至少在一定程度上具有衍生出它们的蛋白质或多肽的抗原性/免疫原性。

同样还包括融合有其他化合物以改变其生物学或药理学性质的多肽，即用于延长半衰期的聚乙二醇 (PEG)；为便于纯化加上的引导或分泌相关的氨基酸序列；原前-和前-序列；以及 (多) 糖。

此外，在发现具有多态性的氨基酸区域情况下，可有利地改变一

个或多个特定氨基酸以更有效地模仿不同莫拉氏菌株系的不同抗原决定部位。

此外，本发明中的多肽可通过对末端胺基酰化进行修饰（例如乙酰化、巯基乙酸酰胺化或如用氨或甲胺进行的末端羧基酰胺化）以提供稳定性、亲水性的增加，利于与支持物或其他分子连接或结合。

多肽片段和类似物的异和同多肽多聚体也包括在内。该多聚体形式包括例如一个或多个以例如生物素结合蛋白/生物素、戊二醛或 dimethylsuperimidate 之类的交联剂交联的多肽。该多聚体形式还包括包含两或多种前后串连或反向相连的序列的多肽，该多肽从由重组 DNA 技术产生的多顺反子 mRNA 生成。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含如本申请图中所示的一个或多个多肽或其片段或类似物的嵌合多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含两或多种具有选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽的嵌合多肽；只要这些多肽相连形成一条嵌合多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含两或多种具有选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽的嵌合多肽；只要这些多肽相连形成一条嵌合多肽。

优选，本发明多肽的片段、类似物或衍生物包含至少一个抗原性区域，即至少一个抗原决定部位。

为了实现形成抗原性多聚体（即合成的多聚体），给多肽加上二卤乙酰基（bishaloacetyl）、硝基芳香卤化物等，带此类试剂具有对含硫基团的特异性。因此，不同多肽间两个巯基的连接可能形成一个单键，或者由含至少两个碳原子的连接基团组成，典型的常为至少 4 个，而且不超过 16 个，但是通常不超过 14 个碳原子。

在一个特定实施方案中，本发明的多肽片段和类似物不包含如甲硫氨酸（Met）或缬氨酸的起始残基。优选，多肽不结合引导或分泌序列（信号序列）。本发明多肽的信号部分可以根据已有的分子生物学技术测定。通常，目的多肽可以从莫拉氏菌培养物中分离，随后可测

序确定成熟蛋白质的起始残基以及成熟多肽的序列。

需知可以在没有起始密码子（甲硫氨酸或缬氨酸）和/或没有引导肽的情况下生产和/或使用多肽以协助生产和纯化重组多肽。已经知道在没有编码引导肽的序列的情况下克隆基因可以使多肽限制在大肠杆菌(*E. coli*)的细胞质内,从而利于其回收(Glick, B. R. 和 Pasternak, J. J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. 在“Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA”中,第二版,ASM Press, Washington DC, p. 109-143)。

从本发明另一方面来看,还提供(i)包含本发明多肽以及载体、溶剂或辅助剂的物质的组合物;(ii)包含本发明多肽以及可药用的载体、稀释剂或辅助剂的药物组合物;(iii)包含本发明多肽以及可药用载体、稀释剂或辅助剂的疫苗;(iv)一种诱导宿主体内对莫拉氏菌的免疫反应的方法,通过给宿主施用免疫原性有效量的本发明多肽来引起免疫应答,例如针对莫拉氏菌的保护性免疫应答;以及特别是(v)一种预防和/或治疗莫拉氏菌感染的方法,通过给有需求的宿主施用预防或治疗量的本发明多肽来实现。

从本发明另一方面来看,还提供(i)包含本发明多聚核苷酸以及载体、稀释剂或辅助剂的物质的组合物;(ii)包含本发明多聚核苷酸以及可药用的载体、稀释剂或辅助剂的药物组合物;(iii)一种诱导宿主体内针对莫拉氏菌的免疫反应的方法,通过给宿主施用产生免疫原性有效量的本发明多聚核苷酸来引起免疫应答,例如针对莫拉氏菌的保护性免疫应答;以及特别是(iv)一种预防和/或治疗莫拉氏菌感染的方法,通过给有需求的宿主施用预防或治疗量的本发明多聚核苷酸来实现。

在免疫作用之前,本发明多肽还可与载体蛋白质偶联或缀合,载体蛋白质诸如破伤风毒素、白喉毒素、B型肝炎病毒表面抗原、脊髓灰质炎病毒VP1抗原或任何其他病毒或细菌毒素或抗原或者是任何适

于刺激形成更强免疫应答的蛋白质。这种偶联或缀合可以通过化学或遗传手段完成。在 Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plau é S. 的《Synthetic Polypeptides as antigens》in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 19 (ed.) Burdou, R.H. 和 Van Knippenberg P.H. (1988), Elsevier New York 中有对肽载体缀合更为详细的描述。

从本发明另一方面来看, 提供包含与可药用的辅助剂混和的一或多种本发明莫拉氏菌多肽的药物组合物。合适的辅助剂包括(1)水包油, 如 MF59<sup>TM</sup>, SAF<sup>TM</sup>, Ribi<sup>TM</sup>; (2) 弗氏完全或不完全佐剂; (3) 盐, 即  $AlK(SO_4)_2$ 、 $AlNa(SO_4)_2$ 、 $AlNH_4(SO_4)_2$ 、 $Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$ 、二氧化硅、高岭土; (4) 皂苷衍生物如 Stimulon<sup>TM</sup> 或者由其生成的诸如 ISCOMs (免疫刺激复合物) 之类颗粒; (5) 细胞因子, 例如白细胞介素、干扰素、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF); (6) 其他物质比如碳多聚核苷酸, 即用于诱导粘膜免疫的多聚 IC 和多聚 AU、去毒的霍乱毒素(CTB) 和大肠杆菌热变毒素。在 M. Z. I Khan 等人在 Pharmaceutical Research, vol. 11, No. 1 (1994) pp2-11 的综述和另一篇 Gupta 等人在 Vaccine Vol. 13, No. 14, pp1263-1276 (1995) 的综述和 W099/24578 中有对辅助剂更为详细的描述。优选辅助剂包括 QuilA<sup>TM</sup>、QS21<sup>TM</sup>、Alhydrogel<sup>TM</sup> 和 Adjuphos<sup>TM</sup>。

本发明的药物组合物可通过注射、快速输液、鼻咽吸收、皮肤吸收或口腔或口咽吸收在肠胃外施用。

术语“药物组合物”的含义还包括抗体。在本发明中, 还提供一种或多种具有针对本发明多肽的结合特异性的抗体, 在治疗或预防莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌介导的疾病和症状中的用途。

本发明的药物组合物用于治疗或预防如 E. J. Baron, M. A. Pfaller, F.C. Tenover 和 R.H. Yolken 所著 Manual of Clinical Microbiology, P.R. Murray (Ed, in chief), ASM Press, Washington, D.C. 1999 第七版 1773p 中所描述的莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌介导的疾病和症状。在一个实施方案中, 本发明的药物组合物用于对中

耳炎、鼻窦炎、持续性咳嗽、急性咽喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎 (conjunctivitis neonatorum) 和侵袭性疾病的预防性和治疗性处理, 包括对宿主施用预防或治疗量的本发明组合物。在一个实施方案中, 本发明的药物组合物用于治疗或预防莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌介导的疾病和症状。在另一实施方案中, 莫拉氏菌感染为粘膜炎莫拉氏菌感染。

在另一实施方案中, 本发明提供一种对易受莫拉氏菌感染的宿主进行针对莫拉氏菌感染的预防性或治疗性处理的方法, 包括对宿主施用预防或治疗量的本发明组合物。

在本申请中所使用的术语“宿主”包括哺乳动物。在另一实施方案中, 哺乳动物指人。在另一实施方案中, 人指的是新生儿、婴幼儿和儿童。在另一实施方案中, 人指的是成年人。

在一个特殊实施方案中, 药物组合物施用于那些有风险受莫拉氏菌感染的宿主, 例如婴幼儿、上了年纪以及免疫妥协的宿主。

优选药物组合物为单位剂量形式, 其为约 0.001 至 100 $\mu$ g/kg (抗原/体重), 且更优选为 0.01 至 10 $\mu$ g/kg 以及最优选为 0.1 至 1 $\mu$ g/kg, 施用一至三次, 每次免疫间有约 1 至 6 周的间隔。

优选药物组合物为单位剂量形式, 其为约 0.1 $\mu$ g 至 10mg, 且更优选为 1 $\mu$ g 至 1mg 以及最优选为 10 至 100 $\mu$ g, 施用一至三次, 每次免疫间有约 1 至 6 周的间隔。

从另一方面来看, 发明提供编码特征为其氨基酸序列包含 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的多肽的多聚核苷酸。

在一个实施方案中, 多聚核苷酸为在 SEQ ID Nos: 1, 3 中所示可能包括开放阅读框 (ORF) 的那些序列, 其编码本发明的多肽。

需知在图中所示的多聚核苷酸序列可由简并密码子替换但仍然编码本发明的多肽。相应地本发明另外提供与上述多聚核苷酸序列 (或者上述序列的互补序列) 杂交的在序列之间有 70% 同一性的多聚核苷酸。在一个实施方案中, 序列之间至少有 80% 同一性。在一个实施方案中, 序列之间至少有 85% 同一性。在一个实施方案中, 序列之间至

少有 90% 同一性。在另一实施方案中，多聚核苷酸在严紧条件能杂交，即具有至少 95% 同一性。在另一实施方案中，同一性高于 97%。

杂交的适合的严紧条件可以很容易地由本领域技术人员进行确定（示例参见 Sambrook 等人, (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology*, (1999), Ausubel F.M. 等人编辑, John Wiley & Sons, Inc., N.Y.）。

在另一实施方案中，本发明提供的多聚核苷酸在严紧条件下与以下任一杂交：

- (a) 编码多肽的 DNA 序列，或者
- (b) 编码的多肽 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列。

在另一实施方案中，本发明提供的多聚核苷酸在严紧条件下与以下任一杂交：

- (a) 编码多肽的 DNA 序列，或者
- (b) 编码的多肽 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列。

在另一实施方案中，本发明提供的多聚核苷酸在严紧条件下与以下任一杂交：

- (a) 编码多肽的 DNA 序列，或者
- (b) 编码的多肽 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含至少 10 个连续的氨基酸残基，其来源于包含选自 SEQ ID NOS: 2, 4 或其片段或类似物的序列的多肽。

在另一实施方案中，本发明提供的多聚核苷酸在严紧条件下与以下任一杂交：

- (a) 编码多肽的 DNA 序列，或者
- (b) 编码的多肽 DNA 序列的互补序列；

其中该多肽包含至少 10 个连续的氨基酸残基，其来源于包含选自 SEQ ID NOS: 2 或 4 序列的多肽。

在另一实施方案中，多聚核苷酸编码 SEQ ID NOS: 2, 4 中所示的本发明多肽。

在另一实施方案中，多聚核苷酸为 SEQ ID NOS: 1, 3 中所示编码本发明多肽的多聚核苷酸。

本领域的技术人员很容易理解到，多聚核苷酸包括了 DNA 和 RNA。本发明还包括与本申请中所描述的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸。

从另一方面来看，提供了一种通过重组技术由在宿主细胞中表达编码上述多肽的多聚核苷酸并将表达的多肽产物回收的生产本发明多肽的方法。或者，多肽还可以根据现有的化学合成技术进行生产，即液相或者固相合成寡聚核苷酸，将其连接起来生产出完整多肽（嵌段连接）。

以下参考文献中描述了获得和测定多聚核苷酸和多肽的常规方法：Sambrook 等人，Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, , Ausubel F.M. 等人编辑，John Wiley & Sons, Inc., N.Y.; PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering, Edited by White B. A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 页; Protein Purification, Principles and Practices, Scopes R. K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 页; Current Protocols in Immunology, Edited by Coligan J.E. 等人，John Wiley & Sons Inc., New York.

本发明提供转染有含本发明多聚核苷酸的载体的宿主细胞。

本发明提供一种生产多肽的方法，其包括在适于表达上述多肽的条件下培养本发明的宿主细胞。

重组生产中，宿主细胞被转染有编码本发明多肽的载体，随后在营养培养基中培养，培养基经过调整以适于活化启动子、选择转化株或扩增基因。合适的载体可在所选宿主体内生存和复制，并包含染色体、非染色体和合成 DNA 序列，例如细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病

毒、酵母质粒和来源于质粒和噬菌体 DNA 重组的载体。使用限制性酶可将多肽序列插入到载体中合适的位点上，从而操作性地与包含启动子、核糖体结合位点（共有序列或 Shine-Dalgarno 序列）和可选的操纵子（调控元件）的表达控制区相连。对于指定的宿主和载体，人们可以根据现有分子生物学原理（Sambrook 等人，Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, , Ausubel F.M. 等人编辑，John Wiley & Sons, Inc., New York）选择适合的个别的表达控制区的组成部分。合适的启动子包括但不只限于 LTR 或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac、tac 或 trp 启动子以及  $\lambda$  噬菌体  $P_L$  启动子。优选，除了包括选择标记即氨卞青霉素抗性基因以外，载体还会包括一个复制起始点。合适的细菌载体包括 pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、PNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、PKK233-3、pDR540、pRIT5 和真核载体 pBlueBacIII、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL。宿主细胞可为细菌，即如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、链霉菌（*Streptomyces*）；真菌即如黑曲霉（*Aspergillus niger*）、构巢曲霉（*Aspergillus nidulins*）；酵母，即糖酵母属（*Saccharomyces*）或真核生物即 CHO、COS。

在培养物中表达多肽时，一般离心收获细胞，然后用物理或化学方法破碎（如果所表达的多肽没有分泌到培养基中）并且保留所得的粗提取物以分离目的多肽。依据多肽的特性可以通过现有技术实现从培养基或溶菌产物纯化多肽，即使用硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、羟磷灰石层析和植物凝集素层析。最终的纯化可通过 HPLC 实现。

多肽可以在引导或分泌序列存在或不存在的情况下表达。前一种情况下引导肽需要用翻译后处理去除（参见 US 4,431,739; US 4,425,437; 以及 US 4,338,397），或者在纯化所表达的多肽之后用化学方法去除。

从另一方面来看，本发明的莫拉氏菌多肽可用于莫拉氏菌感染的诊断检测，尤其是莫拉氏菌感染。

有几种可能的诊断方法，例如在生物学样品中检测莫拉氏菌个体，或在易受莫拉氏菌感染的宿主体内诊断莫拉氏菌感染，可以进行以下过程：

- (a) 从宿主中获得生物学样品；
- (b) 将具有同本发明莫拉氏菌多肽的反应性的抗体或片段与生物学样品一起孵育以形成混合物；并且
- (c) 检测混合物中特异性结合的抗体或结合片段，这指示莫拉氏菌的存在。

或者，对于在包含或疑似包含针对莫拉氏菌抗原特异的抗体的生物学样品中检测上述抗体的方法可按照以下过程进行：

- (a) 从宿主中获得生物学样品；
- (b) 将一种或多种本发明的莫拉氏菌多肽或其片段与生物学样品一起孵育以形成混合物；并且
- (c) 检测混合物中特异性结合的抗原或结合的片段，这指示莫拉氏菌的存在。

本领域技术人员会承认该诊断检测可具有多种形式，包括例如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射性免疫测定或者乳胶粘着测定的免疫学检测，本质上都是为了检测在个体中是否存在对所述蛋白质特异的抗体。

利用编码本发明多肽的 DNA 序列设计 DNA 探针可用于在疑似包含莫拉氏菌的生物学样品中检测莫拉氏菌的存在。本发明的检测方法包括：

- (a) 从宿主中获得生物学样品；
- (b) 将一种或多种具有编码本发明多肽或其片段的 DNA 序列的 DNA 探针与生物学样品一起孵育以形成混合物；并且
- (c) 检测混合物中特异性结合的 DNA 探针，这指示莫拉氏菌的存在。

本发明的 DNA 探针还可用于检测循环中的莫拉氏菌，即样品中的莫拉氏菌核酸，作为一种诊断莫拉氏菌感染的方法，例如使用多聚酶链式反应。探针可使用常规方法合成，并可固定在固相载体上，或者使用可探测的标记进行标记。本申请优选的 DNA 探针为其有与本发明莫拉氏菌多肽的至少 6 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。在另一实施方案中，优选的 DNA 探针为具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少 15 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。在另一实施方案中，优选的 DNA 探针为具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少 30 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。在另一实施方案中，优选的 DNA 探针为具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少 50 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。

另一检测宿主中莫拉氏菌的诊断方法包括：

- (a) 用可探测的标记将与本发明多肽或片段有反应活性的抗体标记；
- (b) 将标记的抗体或标记的片段施用于宿主；并且
- (c) 检测宿主中特异性结合的标记抗体或标记片段，这指示莫拉氏菌的存在。

本发明另一方面为本发明的莫拉氏菌多肽作为免疫原在生产用于诊断以及特别是治疗莫拉氏菌感染的特异性抗体中的用途。使用合适的筛选方法可以确定合适的抗体，例如通过测量检测模型中特定抗体对莫拉氏菌感染的被动保护能力。此处实施例中所描述的一个动物模型的例子为小鼠模型。抗体可为完整的抗体或为其抗原结合片段，并且可属于任一免疫球蛋白类型。抗体或片段可以来源于动物，特别是来源于哺乳动物，更具体的为来源于鼠、大鼠或人类。其可为天然抗体或其片段，或在需要时为重组抗体或抗体片段。术语重组抗体或抗体片段指使用分子生物学技术生产的抗体或抗体片段。抗体或抗体片段可为多克隆的，或优选为单克隆的。抗体可对莫拉氏菌多肽相关的多个抗原决定部位具有特异性，但优选只对一个抗原决定部位有特异性。

从一个方面来看，本发明提供抗体在预防和/或治疗莫拉氏菌感染

中的用途。

另一方面，本发明提供一种在对莫拉氏菌感染易感的宿主中对莫拉氏菌感染进行预防性或治疗性处理的方法，包括对宿主施用预防性或治疗量的本发明药物组合物。

另一方面，编码本发明多肽或其片段、类似物或衍生物的多聚核苷酸可用于DNA免疫接种方法。也就是说，可将其插入到注射后可复制和表达的载体上从而在体内产生抗原性多肽。举例来说，多聚核苷酸可以插入受CMV启动子调控的质粒载体中，该启动子可在真核细胞中产生作用。优选将该载体进行肌肉注射。

本发明的另一方面是针对本发明多肽的抗体在被动免疫中的用途，在此由本发明的多肽引发的抗体以足够量施用于宿主以提供被动免疫。可以使用本申请中所描述的抗体。使用适当的筛选方法可以确定合适的抗体，例如通过测量检测模型中特定抗体对莫拉氏菌感染的被动保护能力而确定。此处实施例中所描述的一个动物模型的例子为小鼠模型。抗体可为完整的抗体或为其抗原结合片段，并且可属于任一免疫球蛋白类型。抗体或片段可以来源于动物，特别是来源于哺乳动物，更具体的为来源于鼠、大鼠或人类。可为天然抗体或其片段，或在需要时可为重组抗体或抗体片段。术语重组抗体或抗体片段指使用分子生物学技术生产的抗体或抗体片段。抗体或抗体片段可为多克隆的，或优选为单克隆的。抗体可对莫拉氏菌多肽上相关的多个抗原决定部位具有特异性，但优选只对一个抗原决定部位有特异性。

对本发明的多聚核苷酸在基因免疫接种的应用中优选使用合适的施用方法或系统，例如直接肌肉注射质粒DNA[Wolf等人 HMG (1992) 1: 363; Turnes等人, Vaccine (1999), 17: 2089; Le等人, Vaccine (2000) 18: 1893; Alves等人, Vaccine (2001) 19: 788], 注射带有或不带有辅助剂的质粒DNA[Ulmer等人, Vaccine (1999) 18: 18; MacLaughlin等人, J. Control Release (1998) 56: 259; Hartikka等人, Gene Ther. (2000) 7: 1171-82; Benvenisty and Reshef, PNAS USA (1986) 83: 9551; Singh等人, PNAS USA (2000) 97: 811], 通

过递送复合特异性载体的 DNA 靶向细胞 [Wa 等人, *J Biol Chem* (1989) 264: 16985; Chaplin 等人, *Infect. Immun.* (1999) 67: 6434], 注射以不同形式脂质体复合或封装的质粒 [Ishii 等人, *AIDS Research and Human Retroviruses* (1997) 13: 142; Perrie 等人, *Vaccine* (2001) 19: 3301], 用不同的轰击方法施用 DNA [Tang 等人, *Nature* (1992) 356:152; Eisenbraun 等人, *DNA Cell Biol* (1993) 12: 791; Chen 等人, *Vaccine* (2001) 19: 2908], 以及以活载体形式施用 DNA [Tubulekas 等人, *Gene* (1997) 190: 191; Pushko 等人, *Virology* (1997) 239: 389; Spreng 等人, *FEMS* (2000) 27: 299; Dietrich 等人, *Vaccine* (2001) 19: 2506]。

从一个方面来看, 本发明提供抗体在预防和/或治疗莫拉氏菌感染中的用途。

在另一实施方案中, 本发明提供本发明的药物组合物在用于莫拉氏菌感染的预防性或治疗性处理药物制造中的用途。

从一个方面来看, 本发明提供包含本发明多肽的用于检测或诊断莫拉氏菌感染的试剂盒。

除非另有说明, 此处使用的所有技术和科技术语的含义与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义同一。此处所涉及的所有出版物、专利申请、专利以及其他参考文献均完整引为参考文献。对于冲突的地方, 由包括定义在内的本发明书控制。另外, 材料、方法以及实施例仅为示例性质, 并无特定限制。

#### 实施例 1

本实施例阐明 SMC-1 基因以及相应多肽的克隆和分子特性。

从粘膜莫拉氏菌株 ETSU C-2 基因组 DNA 上用 PCR 方法 (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) 扩增粘膜莫拉氏菌 SMC-1 (SEQ ID NO: 1) 的编码区, 扩增使用包含用于添加限制性酶切位点 *NcoI* (CCATGG) 和 *XhoI* (CTCGAG) 碱基扩展区的寡聚核苷酸: RIOS30 (5' -TATGTACCATGGCTGAACTCAATACCAGCCGTTCA-3') 和 RIOS31 (5'

-GGCATGCTCGAGGTAATCATGTCTCCAAGCATTTTG-3' )。根据制造商的说明使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Chatsworth, CA) 从琼脂糖凝胶中纯化 PCR 产物, 并用 *NcoI* 和 *XhoI* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canada) 消化。用 *NcoI* 和 *XhoI* 消化 pET21d (+) 载体 (Novagen, Madison, WI) 并使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中纯化产物。将 *NcoI*-*XhoI* PCR 产物和 *NcoI*-*XhoI* pET21d (+) 表达载体相连。根据 Simanis 的方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135) 将连接产物转化到大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  中 [ $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* ( $r_k-m_k+$ ) *deoR thi-1 supE44*  $\lambda^-$  *gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。使用 Qiagen 试剂盒纯化包含 SMC-1 基因的重组 pET21d (+) 质粒 (r pET21d (+)) 并对 DNA 插入序列测序 (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing 试剂盒, ABI, Foster City, CA)。

表格 1. PCR 扩增粘膜炎莫拉氏菌基因所用的寡聚核苷酸引物。

基因	引物 I. D. (识别号)	限制性酶 切位点	载体	序列 (SEQ ID No)
SMC-1	RIOS30	<i>NcoI</i>	pET21d (+)	5' -TATGTACCATGGCTGAACTCAATACCAGCCGTTCA -3' (SEQ ID No: 5)
SMC-1	RIOS31	<i>XhoI</i>	pET21d (+)	5' -GGCATGCTCGAGGTAATCATGTCTCCAAGCATTTTG-3' (SEQ ID No: 6)
SMC-1	RIOS187	<i>BglIII</i>	PCMV-GH	5' -GGCAGATCTTGAACTCAATACCAGCCGTTCA -3' (SEQ ID No: 7)
SMC-1	RIOS188	<i>SalI</i>	PCMV-GH	5' -ACGCGTCGACTTAGTAATCATGTCTCCAAGCAT -3' (SEQ ID No: 8)
SMC-2	RIOS20	<i>NdeI</i>	pET21d (+)	5' -CGTACCAGCACATATGAATAAACAACGCAATCAA -3' (SEQ ID No: 9)
SMC-2	RIOS21	<i>XhoI</i>	pET21d (+)	5' -GCCCATCTCGAGTTGCGATTCTGTCTCTGCC -3' (SEQ ID No: 10)
SMC-2	RIOS189	<i>BamHI</i>	pCMV-GH	5' -CGAGGATCCTAATAAACAACGCAATCAAAC -3' (SEQ ID No: 11)
SMC-2	RIOS190	<i>HindIII</i>	pCMV-GH	5' -CAGAAGCTTTTATTGCGATTCTGTCTCTGCC -3' (SEQ ID No: 12)

已经确定编码 SMC-1 多肽的开放阅读框 (ORF) 含 2781-bp (碱基对) 并编码有 926 个氨基酸残基的多肽, 预测 pI 为 6.31, 预测分子量为 104054.84Da. 使用 Spscan 软件 (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) 对预测的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO: 2) 进行分析, 结果表明存在 35 个氨基酸残基的信号肽 (MHTAHHRSKTYLTTAIRYALFGIASLPFVIPTYA), 信号肽终止于位于丙氨酸和谷氨酸残基之间的切割点。

为了确定通过 PCR 扩增后 SMC-1 基因 (SEQ ID NO: 1) 的存在, 使用了由 East Tennessee State University (东田纳西州立大学) 提供的粘膜炎莫拉氏菌的 3 个不同的菌株: 粘膜炎莫拉氏菌 ETSU C-2、ETSU T-25 以及 ETSU 658 临床分离株。实验中使用大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 作为负对照。SMC-1 基因 (SEQ ID NO: 1) 从 3 个粘膜炎莫拉氏菌和作对照的大肠杆菌菌株的基因组 DNA 上用 PCR 方法 (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) 扩增, 使用寡聚核苷酸引物 RIOS30 和 RIOS31 (表格 1)。PCR 进行过程包括 94°C 下 15 秒 5 个循环, 47°C 下 30 秒以及 68°C 下 3 分钟, 随后是 30 个循环的 94°C 下 15 秒、63°C 下 30 秒和 68°C 下 3 分钟, 最后为 68°C 下 5 分钟延伸时期。在 1% 的琼脂糖凝胶中对 PCR 产物按分子大小进行分离, 并用溴乙啶染色观察。表格 2 出示了 PCR 扩增的结果。对扩增产物的分析表明在所检测的 3 种粘膜炎莫拉氏菌菌株中均存在 SMC-1 基因 (SEQ ID NO: 1)。而在作对照的大肠杆菌 DNA 中用这些寡聚核苷酸引物进行同样的 PCR 扩增时没有检测到此类产物。

表格 2. 通过 PCR 扩增确定粘膜炎莫拉氏菌的基因。

菌株识别号	通过 PCR 扩增验证结果	
	SMC-1	SMC-2
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
大肠杆菌	-	-

## 实施例 2

本实施例阐明 SMC-2 基因以及相应多肽的克隆和分子特性。从粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 基因组 DNA 上用 PCR 方法 (DNA Thermal Cyclor GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) 扩增粘膜炎莫拉氏菌 SMC-2 (SEQ ID NO: 3) 的编码区, 扩增使用包含用于添加限制性酶切位点 *NcoI* (CCATGG) 和 *XhoI* (CTCGAG) 的碱基扩展区的寡聚核苷酸: RIOS20 和 RIOS21, 二者已在表格 1 中列出。将 SMC-2 基因克隆到表达载体并进行测序的方法与实施例 1 中所描述的方法类似。

已经确定编码 SMC-2 的开放阅读框 (ORF) 含 957-bp (碱基对) 并编码有 318 个氨基酸残基的多肽, 预测 pI 为 5.78, 预测分子量为 35954.10Da。使用 Spscan 软件 (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) 对预测的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO: 4) 进行分析, 结果表明存在 47 个氨基酸残基的信号肽 (VGKIMSKIPMMNEKYFRRQALYWLIAAAIMAGLWLIVWLTSSVPAMI), 信号肽终止于位于异亮氨酸和天冬氨酸残基之间的切割点。

使用寡聚核苷酸引物 RIOS20 和 RIOS21 进行 PCR, 结果表明在 3 个受检测粘膜炎莫拉氏菌菌株中存在 SMC-2 基因。对 SMC-2 基因使用的 PCR 扩增方法与实施例 1 中所用的相似。而在作对照的大肠杆菌 DNA 中用这些寡聚核苷酸引物进行同样的 PCR 扩增时没有检测到此类产物。

## 实施例 3

本实施例阐明粘膜炎莫拉氏菌基因在 CMV 质粒 pCMV-GH 中的克隆。

将粘膜炎莫拉氏菌多肽的 DNA 编码区同相位地插入到载体 pCMV-GH (Tang 等人, Nature, 1992, 356: 152) 中受质粒巨细胞病毒 (CMV) 启动子转录调控的人类生长激素 (hGH) 基因的下游。CMV 启动子在大肠杆菌细胞中不具备功效, 但在施用于真核细胞时表现出活性。载体上还插入了氨卞青霉素抗性基因。

从粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 上将不含引导肽的 SMC-1 (SEQ ID NO: 1) 和 SMC-2 (SEQ ID NO: 3) 编码区通过 PCR 扩增, 扩增使用包含用于添加限制性酶切位点 *Bam*HI (GGATCC)、*Bgl*III (AGATCT)、*Sal*I (GTCGAC) 或 *Hind*III (AAGCTT) 碱基扩展区的寡聚核苷酸, 表格 1 中已列出。使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 将 PCR 产物从琼脂糖凝胶中纯化, 并用限制性酶消化 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc)。pCMV-GH 载体 (Dr. Stephen A. Johnson 的实验室, 德州大学生化系 Dallas, Texas) 用 *Bam*HI、*Bgl*III、*Sal*I 或 *Hind*III 消化并使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中纯化。将消化的 DNA 片段和消化后的 pCMV-GH 载体连接生成在 CMV 启动子调控下的 hGH-SMC-1 和 hGH-SMC-2 融合多肽。根据 Simanis 的方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135) 将连接产物转化到大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  中 [ $\phi$ 80d/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>+) *deoR thi-1 supE44*  $\lambda^-$  *gyrA96 relA1*] (Gibco BRL)。使用 Qiagen 试剂盒将重组 pCMV 质粒纯化, 并通过 DNA 测序确证插入 DNA 片段的核酸序列。

#### 实施例 4

本实施例阐明 DNA 在引发对粘膜炎莫拉氏菌多肽抗原的免疫应答中的用途。

8 只一组雌性 BALB/c 小鼠 (Charles River, St-constant, Qu ébec, Canada) 通过间隔两周或三周三次肌肉注射 100 $\mu$ l 进行免疫, 其中含 50 $\mu$ g 编码 SMC-1 (SEQ ID NO: 1) 和 SMC-2 (SEQ ID NO: 3) 基因的重组 pCMV-GH, 并加有 50 $\mu$ g 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) - 表达质粒 pCMV-GH-GM-CSF (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)。作为对照, 对一组小鼠注射 50 $\mu$ g pCMV-GH 并加有 50 $\mu$ g pCMV-GH-GM-CSF。每次免疫之前以及第三次注射后七天从眼眶窦收集血样。通过使用相应 His-标签标记的粘膜炎莫拉氏菌重

组多肽作为包被抗原用 ELISA 检测血清抗体反应。实施例 5 中出示对该 His-标签标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽的生产和纯化。

### 实施例 5

本实施例阐明对粘膜炎莫拉氏菌重组多肽的生产和纯化。

将带有 SMC-1 (SEQ ID NO: 1) 和 SMC-2 (SEQ ID NO: 3) 基因的重组质粒 pET21 通过电穿孔 (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada) 转化到大肠杆菌菌株 AD494 (DE3) [ $\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR \Delta malF3 F' [lac^+ (lacI^q) pro] trxB::Kan$  (DE3)] (Novagen) 中。在该大肠杆菌菌株中, T7 启动子控制表达的重组多肽由 T7 RNA 聚合酶 (在  $\lambda$ DE3 前噬菌体上携带) 特异性识别, 该酶的基因由受异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导的 lac 启动子调控。转化体 AD494 (DE3) /rpET21 在 250rpm37°C 下在每毫升包含 100 $\mu$ g 羧苄青霉素 (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) 的 LB 肉汤 (蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, 氯化钠 10g/L) 中振荡培养至  $A_{600}$  值达到 0.5。为了诱导生成 His-标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽, 在加入终浓度为 1mM 的 IPTG 后将细胞再孵育 3 个小时。500 毫升培养液中的受诱导细胞通过离心沉淀并在 -70°C 冷冻。

通过亲和层析从 IPTG-诱导的 AD494 (DE3) /rpET21 的可溶性细胞质部分中纯化重组多肽, 依据 His-标签序列 (6 个连续的组氨酸残基) 与 His-结合金属整合树脂上固定化的二价阳离子 ( $Ni^{2+}$ ) 结合的特性。简而言之, 将从 500 毫升 IPTG 诱导后的培养液中沉淀得到的细胞在包含 1mM PMSF 的裂解缓冲液 (20mM Tris, 500mM 氯化钠, 10mM 咪唑, pH7.9) 中重新悬浮, 超声波裂解后并在 12,000  $\times$ g 离心 20 分钟去除细胞残骸。上清液加至 Ni-NTA 琼脂糖柱 (Qiagen)。用 250mM 咪唑 500mM 氯化钠 20mM Tris pH7.9 的液体洗脱 His-标签标记的粘膜炎莫

拉氏菌重组多肽。在 4°C 用 PBS 透析去除样品中的盐和咪唑。从大肠杆菌可溶性部分中获得的重组多肽的量通过 MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois) 测定。

### 实施例 6

本实施例阐明 His-标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽与人腭扁桃体中抗体的反应活性。

如表格 3 所示, 通过存在于人腭扁桃体中的抗体在免疫印迹中对 SMC-1 和 SMC-2 的 His-标记的重组多肽进行识别。结果表明经常接触粘膜炎莫拉氏菌的人确实生成了对这些多肽特异作用的抗体。这些特异性的人的抗体可能用于防护粘膜炎莫拉氏菌感染。

表格 3. 免疫印迹中人腭扁桃体中的抗体对粘膜炎莫拉氏菌 His-标记的融合重组多肽的反应活性。

纯化的重组多肽识别号 <sup>1</sup>	表观分子量 (kDa) <sup>2</sup>	免疫印迹中与腭扁桃体中的抗体的反应活性 <sup>3</sup>
SMC-1	104	+
SMC-2	36	+

<sup>1</sup> 将如实施例 5 中所述生产并纯化的 His-标记重组多肽用于免疫印迹。

<sup>2</sup> 通过 SDS-PAGE 测定 His-标记重组多肽的分子量。

<sup>3</sup> 人腭扁桃体的提取物未经稀释以用于免疫印迹。

### 实施例 7

本实施例阐明在粘膜炎莫拉氏菌株表面的 SMC-1 和 SMC-2 多肽对抗体的可接近性。

细菌在包含 1% 右旋葡萄糖的脑心浸液 (BHI) 肉汤及含 8% CO<sub>2</sub> 的空气中 37°C 培养至 OD<sub>490nm</sub> 值为 0.650 (约 10<sup>8</sup>CFU/ml)。随后加入抗-SMC-1 或抗-SMC-2 或者对照血清的稀释液, 并使之与细胞结合, 细胞

在振荡下 4°C 孵育 2 小时。用封闭缓冲液[含 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS)]清洗样品 4 次, 然后加入 1ml 特意用封闭缓冲液稀释的山羊耦连荧光素 (FITC) 的抗-鼠 IgG Fc ( $\gamma$ ) 片段。在室温下振荡避光再孵育 60 分钟后, 用封闭缓冲液清洗样品 4 次, 并用含 0.25% 甲醛的 PBS 缓冲液在 4°C 固定 18 小时。将细胞离心并用 0.5 毫升 PBS 缓冲液重新悬浮。细胞在流式细胞仪 (Epics® XL; Beckman Coulter, Inc.) 分析之前一直保持 4°C 避光。流式细胞仪分析表明 SMC-1 和 SMC-2 特异性抗体有效地识别在所测试的同源的 (ETSU C-2) 粘膜莫拉氏菌株 (表格 4) 相应的表面暴露的抗原决定部位。已经测定在分析的 10,000 个莫拉氏菌细胞中超过 89% 标记了 SMC-1 和 SMC-2 特异性血清中的抗体。另外在 SMC-1 和 SMC-2 特异性血清池中的抗体附着于粘膜莫拉氏菌 ETSU 658 菌株 (表格 4) 的表面。而且测定发现本株系的 10,000 个细胞中, 获得特异性抗体标记的细胞超过 90%。这些发现明确地证明了 SMC-1 和 SMC-2 多肽在表面是可接近的, 在表面可易于被抗体识别。抗-粘膜莫拉氏菌抗体在对粘膜莫拉氏菌感染的防护中扮演了重要的角色。

表格 4. 评价 SMC-1 和 SMC-2 特异性抗体在完整粘膜莫拉氏菌细胞表面上的附着。

血清识别号	菌株	荧光指数 <sup>2</sup>	标记细胞的百分比 <sup>3</sup>
SMC-1-特异性血清池 <sup>1</sup>	ETSU C-2	19.8	96.1
	ETSU 658	15.2	93.1
SMC-2-特异性血清池	ETSU C-2	11.0	89.8
	ETSU 658	11.9	90.5
负对照血清池 <sup>4</sup>	ETSU C-2	1.0	1.0
	ETSU 658	1.0	1.0
正对照血清 <sup>5</sup>	ETSU C-2	25.0	97.4
	ETSU 658	19.6	93.3

<sup>1</sup> 间隔两周一共 5 次对小鼠用混有 10 $\mu$ g QuilA 辅助剂 (Cedarlane

实验室, Hornby, Canada) 的 20 $\mu$ g 纯化的重组多肽进行皮下注射。血清稀释 50 倍。

<sup>2</sup> 计算的荧光指数来源于用免疫血清标记细胞后获得的荧光值的中值除以对照小鼠血清所得的荧光值。荧光值为 1 表明在完整粘膜炎莫拉氏菌细胞表面上未结合有抗体。

<sup>3</sup> % 为 10,000 个受分析的细胞中标记的细胞。

<sup>4</sup> 存积从未免疫或假阳性免疫的小鼠中收集的血清, 稀释 50 倍, 用作本检测的负对照。

<sup>5</sup> 用来源于粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU-C2 的 20 $\mu$ g 纯化的外膜多肽免疫小鼠, 从该小鼠中获得的血清样品稀释 1000 倍作为本检测的正对照。

### 实施例 8

本实施例阐明抗-SMC-1 和抗-SMC-2 小鼠血清的杀菌活性。

将细菌涂布在巧克力琼脂平板上并在含 8% CO<sub>2</sub> 的空气中于 37°C 培养 16 小时。然后用溶菌缓冲液 [10% Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 和 1% 水解酪蛋白, pH 值 7.3] 将细菌细胞重新悬浮至 OD<sub>490nm</sub> 值为 0.25, 并稀释至 8 × 10<sup>4</sup> CFU/ml。将 25 $\mu$ l 菌悬浮液与 50 $\mu$ l 稀释的热失活检测血清以及 15 $\mu$ l HBSS 混和, 在 8% CO<sub>2</sub> 中 37°C 振荡 (200rpm) 孵育 15 分钟进行杀菌检测。然后加入兔的含补体的血清至终浓度 10%, 然后在 8% CO<sub>2</sub> 气氛于 37°C 再孵育 60 分钟。在孵育结束时, 将 10 $\mu$ l 检测混和液涂布在巧克力琼脂平板上以检测存活细菌数量。平板在 8% CO<sub>2</sub> 中 37°C 培养 18-24 小时。将细菌与从免疫前小鼠中收集的热失活血清和兔补体一起孵育组成对照。和对照相比造成杀死 50% 或更多细菌的最高血清稀释度决定了杀菌滴度。使用粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU 658 评价血清的杀菌活性。对粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU 658 的杀菌活性以从用 20 $\mu$ g 纯化的重组 SMC-1 或 SMC-2 多肽免疫 5 次的小鼠中收集的血清进行测定。

### 实施例 9

本实施例阐明由免疫接种诱导小鼠对粘膜炎莫拉氏菌感染的防护。

使用带有 10% QuilA 辅助剂 (Cedarlane Laboratories Ltd) 的 20 $\mu$ g 亲和纯化的 His-标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽对 10 只一组雌性 BALB/c 小鼠 (Charles River) 间隔两周地皮下免疫 5 次, 或用只含 QuilA 辅助剂的 PBS 免疫作为对照。在每次免疫之前的第 0、14、28、42 和 56 天以及第五次注射后的第 14 天 (第 70 天) 从眼眶窝收集血样。一周之后在肺内施用药约  $1 \times 10^6$  CFU 的粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU 658 对小鼠进行免疫攻击。将粘膜炎莫拉氏菌接种体的样品涂布于巧克力琼脂平板以测定 CFU 值来确定免疫攻击剂量。腹腔注射戊巴比妥钠 (Euthanyl™) 5 小时后将小鼠杀死。将完好的肺切除并用组织匀浆器匀浆。通过连续稀释涂布平板测定肺匀浆中细菌的清除程度以确定 CFU 值。

<110> Shire Biochem Inc.

<120> 粘膜炎莫拉氏（布拉汉氏）菌多肽及相应 DNA 片段

<130> 74872-86

<150> US 60/314,634

<151> 2001-08-27

<160> 14

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 2781

<212> DNA

<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 1

```

atgcacaccg ctcatcacca tcgctcaaag acatatttga ctaccgctat tcgttacgca      60
ctatttggtg tccagcttt gccatttggc ataccaactt atgcagaact caataccagc      120
cgttcactga cagtcgctgg tgctgacagc tcaaaaaatt tgctgatac accaaatacc      180
aaacccaata ctgtcttagc cttagacgcc catctacaaa gtcagatga tactgccaat      240
gcctttgatg gctttgattt tgaagttatc acacagcagg cagccgagca gacaagcagt      300
caagcaaatc aaggcaatca tcagatgagc cagcttgacg cctttgctag taagtcagac      360
aatccaagtt taaacactgc caggctgacg gataagcatg atacaccctc tgccagtata      420
agcttagcca aattagccga aaactacatc attaatccg atccagacgc tcatcgcttg      480
cagggtatgt ggatgcagcc aatccacca gcaacacaca caaacgcccc taccaccca      540
aaactggatg aaaatggtaa tccgattaca gaagatggta tttttgctca agctgattat      600
ggatattatg acgctcaaac ttatgccgaa ctgtctggca atgtcattat ggaacaaaac      660
ggtcggcggt taaccgctga taagcttact ttagacaccc aaacagggca agccactgag      720
tcaggctcaag tacaatttag tgatggcggg gcaagtgatc acagtgctgg cattattggc      780
atggctgaaa acttagtata ccatacagat ggtcagacag cgaccgcaca agatgttgct      840
tttgaagca ctaccatcaa tgctcacggt tatgocagtc aaatggataa aataagcagt      900
agcgaatata ggcctcaaca tgcctatgct accactgctc caccacaga acgcaaatgg      960
tacttagata ctgatagcat tgatatcaat accgatacag gtcgtgctat cgccaaaaat      1020
accaccttgc gtatcaaaaa agtacctgct ttttacctgc cctattttaa ctttccgatc      1080
gatgctcgct gctcttctgg atttttatta ccatcaatgg gatttgggtc atcggacagt      1140
tttgaatata gtacgcctta ttatctgaat ttggcaccag attatgatgc aaccattacg      1200
ccaactgtat ttactaaccg caatcctatg ctgactggcg aatttcgcta tctgacccaa      1260
gattatggat caggggtggt gactgcttcg tatcttccaa aagatcagca atatcatgat      1320
aaagaccgta gccgaatata atttgatcat acatggcaac ccaagcagtt tgataaaatt      1380
accacttacg cacaatatca atctgcttct gatgccaatt atttatcaga ctttaatgcc      1440
ttgggtggtg agagtgctaa gctaaatcta ccaagacgca tcggcacaag cttcttggat      1500
gaaaatgtct cagctgattt aagatttgaa gattttcagc gtttagacgg ttttggctta      1560
gatggctggc caattacaga caaagataga ccatatgcac gcctaccaca gctatcggtc      1620
aactatcggt tcctcgcat atggatgggt acaccacagc gtcttgaact ggggtggtatt      1680
cataattctg cctatttcaa aaaatccatt aaagataact ctgaaccaga aaaaagcggg      1740
ggtagaatat ttaaccaatt cacagccagt tatccactgc ttcgctcttg gggttatttg      1800
acgccaaaac ttagcctgac acatctatat accagctatg acgaagacag cttagccgac      1860
caaaatatcg ctaagaaaaa tggctcgccat tcggtatttg caccgacggg cagcttggat      1920
gctgggctat tttttgaaaa agcgggtgca ccatttggca tgcatcaaga tacaggtggc      1980
tatcaagtac tgacaccaag attacactat acttacacgc cttttaaaga tcaacacaat      2040
gtaccaaatt ttgagacaaa aattgcacag ctttagctatg agcagctttt gaacaataac      2100
tggttttttg gtcatgatcg cattcaagat ttacacgcgc tcacgcctgc agtcagctac      2160
cgttatatag ataaaaatgg caggacacgc tttgaaggcg ggatcgcaga acagatttta      2220
ttgagtcata tccgtgttgg tatcaatgac agcgaagct atagcagcag aagctctggt      2280
ttggctggc aagccagcct acagccaaaa gacaatttat ggtttgatgc atcaggttca      2340
tttagaacia attatgattt gagcagttat gtggcacaia ttcgctatcg tccaagtgat      2400

```

```

cgtaagttat ttaacctagg tattgtcaaa agaaaagaaa atcgtgcttt taatcaatca 2460
gcattatcag catatactgc ctccgccatt tttccaatca ataatcgctg gcgtatgatg 2520
ggtaactac aatacgacta caacttagat tatgtcatgg attccttgat ggggctaaat 2580
tatgaagatt gctggttatgg tttgtcaatc tatgcaagac gctatcgtga tgctttcaat 2640
ccacatttat cacctgatac tgcagtaatg gcagaagttc gcctaaacgg tatcgggtggc 2700
ggcggtcggt tgaatcgact tttgagcgaa aaggtagctag gctatgatca ggttcgaat 2760
gcttggagac atgattacta a 2781

```

<210> 2

<211> 926

<212> PRT

<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 2

```

Met His Thr Ala His His His Arg Ser Lys Thr Tyr Leu Thr Thr Ala
1          5          10          15

Ile Arg Tyr Ala Leu Phe Gly Ile Ala Ser Leu Pro Phe Val Ile Pro
20          25          30

Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Thr Ser Arg Ser Leu Thr Val Val Gly Ala
35          40          45

Asp Ser Ser Lys Asn Leu Pro Asp Thr Pro Asn Thr Lys Pro Asn Thr
50          55          60

Val Leu Ala Leu Asp Ala His Leu Gln Ser His Asp Asp Thr Ala Asn
65          70          75          80

Ala Phe Asp Gly Phe Asp Phe Glu Val Ile Thr Gln Gln Ala Ala Glu
85          90          95

Gln Thr Ser Ser Gln Ala Asn Gln Gly Asn His Gln Met Ser Gln Leu
100         105         110

Asp Ala Phe Ala Ser Lys Ser Asp Asn Pro Ser Leu Asn Thr Ala Arg
115         120         125

Leu Thr Asp Lys His Asp Thr Pro Ser Ala Ser Lys Ser Leu Ala Lys
130         135         140

Leu Ala Glu Asn Tyr His Ile Lys Ser Asp Pro Asp Ala His Arg Cys
145         150         155         160

Gln Gly Met Trp Met Gln Pro Ile His Gln Ala Thr His Thr Asn Arg
165         170         175

Pro Thr Thr Pro Lys Leu Asp Glu Asn Gly Asn Pro Ile Thr Glu Asp
180         185         190

Gly Ile Phe Ala Gln Ala Asp Tyr Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Thr Tyr
195         200         205

Ala Glu Leu Ser Gly Asn Val Ile Met Glu Gln Asn Gly Arg Arg Val
210         215         220

Thr Ala Asp Lys Leu Thr Leu Asp Thr Gln Thr Gly Gln Ala Thr Ala
225         230         235         240

Ser Gly Gln Val Gln Phe Ser Asp Gly Gly Ala Ser Asp His Ser Ala
245         250         255

```

Gly Ile Ile Gly Met Ala Glu Asn Leu Val Tyr His Thr Asp Gly Gln  
 260 265 270  
 Thr Ala Thr Ala Gln Asp Val Ala Phe Ala Ser Thr Thr Ile Asn Ala  
 275 280 285  
 His Gly Tyr Ala Ser Gln Met Asp Lys Ile Ser Ser Ser Glu Tyr Arg  
 290 295 300  
 Leu Gln His Val Met Phe Thr Thr Cys Pro Pro Thr Glu Arg Lys Trp  
 305 310 315 320  
 Tyr Leu Asp Thr Asp Ser Ile Asp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Arg Ala  
 325 330 335  
 Ile Ala Lys Asn Thr Thr Leu Arg Ile Lys Lys Val Pro Val Phe Tyr  
 340 345 350  
 Leu Pro Tyr Phe Asn Phe Pro Ile Asp Ala Arg Arg Ser Ser Gly Phe  
 355 360 365  
 Leu Leu Pro Ser Met Gly Phe Gly Ala Ser Asp Ser Phe Glu Ile Ser  
 370 375 380  
 Thr Pro Tyr Tyr Leu Asn Leu Ala Pro Asp Tyr Asp Ala Thr Ile Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Thr Val Phe Thr Asn Arg Asn Pro Met Leu Thr Gly Glu Phe Arg  
 405 410 415  
 Tyr Leu Thr Gln Asp Tyr Gly Ser Gly Val Leu Thr Ala Ser Tyr Leu  
 420 425 430  
 Pro Lys Asp Gln Gln Tyr His Asp Lys Asp Arg Ser Arg Ile Gln Phe  
 435 440 445  
 Asp His Thr Trp Gln Pro Lys Gln Phe Asp Lys Ile Thr Thr Tyr Ala  
 450 455 460  
 Gln Tyr Gln Ser Val Ser Asp Ala Asn Tyr Leu Ser Asp Phe Asn Ala  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Val Glu Ser Ala Lys Leu Asn Leu Pro Arg Arg Ile Gly Thr  
 485 490 495  
 Ser Phe Leu Asp Glu Asn Val Ser Ala Asp Leu Arg Phe Glu Asp Phe  
 500 505 510  
 Gln Arg Leu Asp Gly Phe Gly Leu Asp Gly Arg Pro Ile Thr Asp Lys  
 515 520 525  
 Asp Arg Pro Tyr Ala Arg Leu Pro Gln Leu Ser Val Asn Tyr Arg Leu  
 530 535 540  
 Pro Arg Ile Trp Met Gly Thr Pro Ser Gly Leu Glu Leu Gly Gly Ile  
 545 550 555 560  
 His Asn Ser Ala Tyr Phe Lys Lys Ser Ile Lys Asp Asn Ser Glu Pro  
 565 570 575  
 Glu Lys Ser Gly Gly Arg Ile Phe Asn Gln Phe Thr Ala Ser Tyr Pro  
 580 585 590



<210> 3  
 <211> 957  
 <212> DNA  
 <213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 3  
 gtgggtaaaa ttatgtcaaa aattcccatg atgaatgaaa agtattttcg tcgctcaggca 60  
 ctttattggg tgattgcggc ggctatcatg gcaggcttgt ggttgattgt ttggttgacc 120  
 agctccgtac cagcaatgat taataaaciaaacgccaatc aaacatcgtc ctatggtgcg 180  
 acattgccga ccacaatcac agcgttaaag gagcttgatc atggttgtaa gcccatggat 240  
 aattcggcac ttgtgcgaga cttacgcaac tatccacctg aatttaagga caaagtttat 300  
 ttaaatggta ttagtggtcg ttataccatt gagctgatgg atgttaccga aatgaagtt 360  
 atcgtggatt atctaaacag ccgagaagat cgtaacaatt ttgcttattt tcgctatact 420  
 gatgccaatg ataataagcg atatgtactg acttatggta aatttaccag tccagctgat 480  
 gcagaatctg ctttgcaaac cgtaaatttt agactgccaa aatcagtgat acaaaagacc 540  
 accaaaatct ctgagttggg cgcagtaatg gacaattatg aattgggtca agatgtggtg 600  
 gatttggcag acttccagcc tcgcccagtt cgctcgcaag cgacgcgtac cgaattcca 660  
 gtcaaagcgg ccacgccagc agatgaagaa ttggcacgcc taagccgtga gcgtgcatta 720  
 caaacacaaa tttcccagca aactgagtcg gtcaggcagc cgactgattt ggatatccaa 780  
 aacgatatca atcgtttgtc taatcaaaga tctcaagtca gctctagcga tttgcctatg 840  
 gcaccaactg cagcccaca gtcaccgcag caaacagccg atatagtacc caaaaatgaa 900  
 atatctaaag gcactgcacc aacccaaagc cattcggcag agacagaatc gcaataa 957

<210> 4  
 <211> 318  
 <212> PRT  
 <213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 4  
 Val Gly Lys Ile Met Ser Lys Ile Pro Met Met Asn Glu Lys Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Gln Ala Leu Tyr Trp Leu Ile Ala Ala Ala Ile Met Ala Gly  
 20 25 30  
 Leu Trp Leu Ile Val Trp Leu Thr Ser Ser Val Pro Ala Met Ile Asn  
 35 40 45  
 Lys Gln Asn Ala Asn Gln Thr Ser Ser Tyr Val Ala Thr Leu Pro Thr  
 50 55 60  
 Thr Ile Thr Ala Leu Asn Glu Leu Asp His Val Val Lys Pro Met Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Ser Ala Leu Val Arg Asp Leu Arg Asn Tyr Pro Pro Glu Phe Lys  
 85 90 95  
 Asp Lys Val Tyr Phe Asn Gly Ile Ser Gly Arg Tyr Thr Ile Glu Leu  
 100 105 110  
 Met Asp Val Thr Glu Asn Glu Val Ile Val Asp Tyr Leu Asn Ser Arg  
 115 120 125  
 Glu Asp Arg Asn Asn Phe Ala Tyr Phe Arg Tyr Thr Asp Ala Asn Asp  
 130 135 140  
 Asn Lys Arg Tyr Val Leu Thr Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Pro Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Ser Ala Leu Gln Thr Val Asn Phe Arg Leu Pro Lys Ser Val  
 165 170 175

Ile Gln Lys Thr Thr Lys Ile Ser Glu Leu Val Ala Val Met Asp Asn  
 180 185 190

Tyr Glu Leu Gly Gln Asp Val Val Asp Leu Ala Asp Phe Gln Pro Arg  
 195 200 205

Arg Val Arg Leu Gln Ala Thr Arg Thr Glu Ile Pro Val Lys Ala Ala  
 210 215 220

Thr Pro Ala Asp Glu Glu Leu Ala Arg Leu Ser Arg Glu Arg Ala Leu  
 225 230 235 240

Gln Thr Gln Ile Ser Gln Gln Thr Glu Ser Val Arg Gln Pro Thr Asp  
 245 250 255

Leu Asp Ile Gln Asn Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asn Gln Arg Ser Gln  
 260 265 270

Val Ser Ser Ser Asp Leu Pro Met Ala Pro Thr Ala Arg Pro Gln Ser  
 275 280 285

Pro Gln Gln Thr Ala Asp Ile Val Pro Lys Asn Glu Ile Ser Lys Gly  
 290 295 300

Thr Ala Pro Thr Gln Ser His Ser Ala Glu Thr Glu Ser Gln  
 305 310 315

<210> 5  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 引物

<400> 5  
 tatgtaccat ggctgaactc aataccagcc gttca 35

<210> 6  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 引物

<400> 6  
 ggcatgctcg aggtaatcat gtctccaagc attttg 36

<210> 7  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 引物

<400> 7  
 ggcagatctt ggaactcaat accagcggtt c 31

<210> 8	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
acgcgctcgac ttagtaatca tgtctccaag cat	33
<210> 9	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
cgtaccagca catatgaata aacaaaacgc caatcaa	37
<210> 10	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
gcccattctcg agttgcgatt ctgtctctgc c	31
<210> 11	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
cgaggatcct aataaacaaa acgccaatca aac	33
<210> 12	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 12	
cagaagcttt tattgcgatt ctgtctctgc c	31
<210> 13	
<211> 35	

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 13

tatgtaccat ggctgaactc aataccagcc gttca

35

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 14

ggcatgctcg aggtaatcat gtctccaagc attttg

36

图1

```

1  ATGCACACCG CTCATCACCA TCGCTCAAAG ACATATTTGA CTACCGCTAT TCGTTACGCA
61  CTATTTGGTA TCGCCAGTTT GCCATTTGTC ATACCAACTT ATGCAGAACT CAATACCAGC
121 CGTTCACTGA CAGTCGTTGG TGCTGACAGC TCAAAAAAAT TGCTGATAC ACCAAATACC
181 AAACCAATA CTGTCTTAGC CTTAGACGCC CATCTACAAA GTCATGATGA TACTGCCAAT
241 GCCTTTGATG GCTTTGATT TGAAGTTATC ACACAGCAGG CAGCCGAGCA GACAAGCAGT
301 CAAGCAAATC AAGGCAATCA TCAGATGAGC CAGCTTGACG CCTTTGCTAG TAAGTCAGAC
361 AATCCAAGTT TAAACACTGC CAGGCTGACG GATAAGCATG ATACACCCTC TGCCAGTAAA
421 AGCTTAGCCA AATTAGCCGA AAACCTACCAT ATTAAGTCCG ATCCAGACGC TCATCGTTGT
481 CAGGGTATGT GGATGCAGCC AATCCACCAA GCAACACACA CAAACCGCCC TACCACCCCA
541 AAACCTGGATG AAAATGGTAA TCCGATTACA GAAGATGGTA TTTTGTCTCA AGCTGATTAT
601 GGATATTATG ACGCTCAAAC TTATGCCGAA CTGCTGGCA ATGTCATTAT GGAACAAAAC
661 GGTCCGGCGT TAACCGCTGA TAAGCTTACT TTAGACACCC AAACAGGGCA AGCCACTGCG
721 TCAGCTCAAG TACAATTTAG TGATGGCGGT GCAAGTGATC ACAGTGCTGG CATTATTGGC
781 ATGGCTGAAA ACTTAGTATA CCATACAGAT GGTGACAGAG CGACCGCACA AGATGTTGCT
841 TTTGCAAGCA CTACCATCAA TGCTCACGGT TATGCCAGTC AAATGGATAA AATAAGCAGT
901 AGCGAATATC GGCTTCAACA TGTCATGTTT ACCACCTGTC CACCCACAGA ACGCAAATGG
961 TACTTAGATA CTGATAGCAT TGATATCAAT ACCGATACAG GTCGTGCTAT CGCCAAAAT
1021 ACCACCTTGC GTATCAAAA AGTACCTGTC TTTTACCTGC CCTATTTTAA CTTTCCGATC
1081 GATGCTCGTC GCTCTTCTGG ATTTTATTA CCATCAATGG GATTTGGTGC ATCGGACAGT
1141 TTTGAAATTA GTACGCCCTA TTATCTGAAT TTGGCACCAG ATTATGATGC AACCATTACG
1201 CCAACTGTAT TTACTAACC GCAATCCTATG CTGACTGGCG AATTTGTTA TCTGACCCAA
1261 GATTATGGAT CAGGGGTGTT GACTGCTTCG TATCTTCCAA AAGATCAGCA ATATCATGAT
1321 AAAGACCGTA GCCGAATACA ATTTGATCAT ACATGGCAAC CCAAGCAGTT TGATAAAATT
1381 ACCACTTACG CACAATATCA ATCTGTTTCT GATGCCAATT ATTTATCAGA CTTAATGCC
1441 TTGGGTGTTG AGAGTGCTAA GCTAAATCTA CCAAGACGCA TCGGCACAAG CTTCTTGGAT
1501 GAAAATGTCT CAGCTGATTT AAGATTTGAA GATTTTCAGC GTTTAGACGG TTTTGGCTTA
1561 GATGGTCCGC CAATTACAGA CAAAGATGAG CCATATGCAC GCCTACCACA CCGTCCGCTC
1621 AACTATCGTT TGCCCTCGCAT ATGGATGGGT ACACCCAGCG GTCTTGAACT GGGTGGTATT
1681 CATAATCTCT CCTATTTCAA AAAATCCATT AAAGATAACT CTGAACCAGA AAAAAGCGGT
1741 GGTAGAATAT TTAACCAATT CACAGCCAGT TATCCACTGC TTCGCTCTTG GGGTTATTTG
1801 ACGCCAAAC TTAGCCTGAC ACATCTATAT ACCAGCTATG ACGAAGACAG CTTAGCCGAC
1861 CAAAATATCG CTAAGAAAAA TGCTGCCCAT TCGGTATTTG CACCGACGGT CAGCTGGAT
1921 GCTGGGCTAT TTTTGA AAAAGCGGTGCA CCATTTGGCA TGCATCAAGA TACAGGTGGC
1981 TATCAAGTAC TGACACCAAG ATTACACTAT ACTTACACGC CTTTTAAAGA TCAACACAAT
2041 GTACCAAATT TTGAGACAAA AATTGCACAG CTTAGCTATG AGCAGCTTTT GAACAATAAC
2101 TGGTTTTTGG GTCATGATCG CATTCAAGAT TTACACGCCG TCACGCCTGC AGTCAGCTAC
2161 CGTTATATAG ATAAAATGGG CAGGACACGC TTTGAAGGCG GGATCGCAGA ACAGATTTTA
2221 TTGAGTCATA TCCGTGTTGG TATCAATGAC AGCGAAAGCT ATAGCAGCAG AAGCTCTGGT
2281 TTGGCATGGC AAGCCAGCCT ACAGCCAAA GACAATTTAT GGTTTGATGC ATCAGGTTCA
2341 TTTAGAACAA ATTATGATTT GAGCAGTATT GTGGCACAAA TTCGCTATCG TCCAAGTGAT
2401 CGTAAGTTAT TTAACCTAGG TATTGTCAA AGAAAAGAAA ATCGTGCTTT TAATCAATCA
2461 GCATTATCAG CATATACTGC CTCCGCCATT TTTCCAATCA ATAATCGCTG GCGTATGATG
2521 GGTCAACTAC AATACGACTA CAACCTAGAT TATGTCATGG ATTCTTTGAT GGGCTAAAT
2581 TATGAAGATT GCTGTTATGG TTTGTCAATC TATGCAAGAC GCTATCGTGA TGCTTCAAT
2641 CCACATTTAT CACCTGATAC TGCAGTAATG GCAGAAGTTC GCCTAAACGG TATCGGTGGC
2701 GGCGGTCGTT TGAATCGACT TTTGAGCGAA AAGGTACTAG GCTATGATCA GGTTCGAAAT
2761 GCTTGGAGAC ATGATTACTA A (SEQ ID No : 1)

```

图 2

```

1  MHTAHHRSK TYLTTAIRYA LFGIASLPFV IPTYAE LN TS RSLTVVGADS SKNLPDTPNT
61  KPNTVLALDA HLQSHDDTAN AFDGDFEVI TQAAEQ TSS QANQGNHOMS QLDAFASKSD
121 NPSLNTARLT DKHDTPSASK SLAKLAENYH IKSDPDAHRC QGMWMOPIHQ ATHNRP TTP
181 KLDENGNPIT EDGIFAQADY GYYDAQTYAE LSGNVIMEQN GRRVTADKLT LDTQTGQATA
241 SGQVQFSDGG ASDHSAGIIG MAENLVYHTD GQTATAQDVA FASTTINAHG YASQMDKISS
301 SEYRLOHVMF TTCPPTERKW YLDTDSIDIN TDTGRAIAKN TTLRIKKVPV FYLPYFNFI
361 DARRSSGFLL PSMGFGASDS FEISTPYL N LAPDYDATIT PTVFTNRNPM LTGEFRYL TQ
421 DYGSGVLTAS YLPKDQQYHD KORSRIQFDH TWQPKQFDKI TTYAQYQSVS DANYLSDFNA
481 LGVESAKLNL PRRIGTSFLD ENVSADLRFE DFQRLDGFGL DGRPITDKDR PYARLPQLSV
541 NYRLPRIWMG TPGLELGGI HNSAYFKKSI KDNSEPEKSG GRIFNQFTAS YPLLRSWGYL
601 TPKLSLTHLY TSYDEDSLAD QNIAKKNRHS SVFAPTVSLD AGLFFEKAGA PFGMHQDTGG
661 YQVLTPLRLHY TYTPFKDQHN VPNFETKIAQ LSYEQLLNNN WFLGHDRIQD LHAVTPAVSY
721 RYIDKMGTRR FEGGIAEQIL LSHIRVGIND SESYSSRSSG LAWQASLQPK DNLWFDASGS
781 FRTNYDLSSI VAQIRYRPSD RKLFLNGIVK RKENRAF NQS ALSAYTASAI FPI NNRWRMM
841 GQLQYDYNLD YVMSLMLGLN YEDCCYGLSI YARRYRDAFN PHLSPDTAVM AEVRLNGIGG
901 GGRLNRL LSE KVLGYDQVRN AWRHDY* (SEQ ID No : 2)

```

图 3

```

1  GTGGGTAAAA TTATGTCAA AATCCCATG ATGAATGAAA AGTATTTTCG TCGTCAGGCA
61  CTTTATTGGT TGATGCGGC GGCTATCATG GCAGGCTTGT GGTGATTGT TTGGTTGACC
121 AGCTCCGTAC CAGCAATGAT TAATAACAA AACGCCAATC AAACATCGTC CTATGTTGCG
181 ACATTGCCGA CCACAATCAC AGCGTAAAT GAGCTTGATC ATGTTGT TAA GCCCATGGAT
241 AATTCGGCAC TTGTGCGAGA CTTACGCAAC TATCCACCTG AATTTAAGGA CAAAGTTTAT
301 TTTAATGGTA TTAGTGGTCC TTATACCATT GAGCTGATGG ATGTTACCGA AAATGAAGTT
361 ATCGTGGATT ATCTAAACAG CCGAGAAGAT CGTAACAATT TTGCTTATTT TCGCTATACT
421 GATGCCAATG ATAATAAGCG ATATGTACTG ACTTATGGTA AATTTACCAG TCCAGCTGAT
481 GCAGAATCTG CTTTGCAAAC CGTAAATTTT AGACTGCCAA AATCAGTGAT ACAAAGACC
541 ACCAAAATCT CTGAGTTGGT CGCAGTAATG GACAATTATG AATTGGGTCA AGATGTGGTG
601 GATTTGGCAG ACTTCCAGCC TCGCCGAGT CGCCTGCAAG CGACGCGTAC CGAAATCCA
661 GTCAAAGCGG CCACGCCAGC AGATGAAGAA TTGGCACGCC TAAGCCGTGA GCGTGCATTA
721 CAAACACAAA TTTCCAGCA AACTGAGTCG GTCAGGCAGC CGACTGATTT GGATATCCAA
781 AACGATATCA ATCGTTTGT C TAATCAAAGA TCTCAAGTCA GCTCTAGCGA TTTGCCTATG
841 GCACCAACTG CACGCCACA GTCACCGCAG CAAACAGCCG ATATAGTACC CAAAATGAA
901 ATATCTAAG GCACTGCACC AACCCAAAGC CATTCGGCAG AGACAGAATC GCAATAA
(SEQ ID No : 3)

```

图 4

```

1  VGKIMSKIPM MNEKYFRRQA LYWLIAAIM AGLWLVWLT SSV PAMINKQ NANQTS SYVA
61  TLPTTITALN ELDHVVKPMD NSALVRDLRN YPPEFKDKVY FNGISGRYTI ELM DVTENEV
121 IVDYLSNRED RNNEAYFRYT DANDNKRYVL TYGKFTSPAD AESALQTVNF RLPKSVIQT
181 TKISELVAVM DNYELGQDVV DLADFP RRV RLQATRTEIP VKAATPADEE LARLSRERAL
241 QTQISQQTES VRQPTDLDIQ NDINRLSNQR SQVSSDLPM APTAR PQSPQ QTADIVPKNE
301 ISKGTAPTQS HSAETESQ* (SEQ ID No : 4)

```

专利名称(译)	粘膜炎莫拉氏(布拉汉氏)菌多肽及相应DNA片段		
公开(公告)号	<a href="#">CN1549727A</a>	公开(公告)日	2004-11-24
申请号	CN02816921.2	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
[标]发明人	D马丁 J哈梅尔 BR布罗德德		
发明人	D·马丁 J·哈梅尔 B·R·布罗德德 S·理欧克斯 J·库图尔		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 A61P37/02 C07K14/195 C07K14/21 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569 A61K39/02		
CPC分类号	Y10S435/975 C07K14/212 A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 A61P37/02 A61P37/04		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	60/314634 2001-08-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及可用于预防、诊断和/或治疗用途的粘膜炎莫拉氏(布拉汉氏)菌多肽。

图 1

```

1  AAGGAGAGCCG CTCATCAGCA TCGTCGAAAG ACPATATTGA CTACCGCTAT TCGTTACGCA
61  GATTTGAFB TCCGCGHFTT GCGATTSTTT ATCCGACCTT ATGCGGAACT CANTACCAGC
121  GPTTCACAGA CAGTGGTGG TCGTAGACAG TCAAAAATTT TGCCTGATAC ACCAAAAGCC
181  AAACCCGATA CTGCTGTGCG CTAGAGCCGC CATCTACAAA GTCACTGATGA TACTGCCAAT
241  GCTTTTGATG GCTTTGATTT TGAATTTAC AGCAGACAGG CAGCGGACGA GAGGAGGCGT
301  CAAGCAAAATC AAGGCAATCA TCAATATGAG CAGCTTACCG CTTTCTCATG TAAATCGAAT
361  ATCCAGATTT TAAACACATGC CAGGCTGACG GATAAGCATG ATACAGCCCTC TCCGATGAAA
421  AGCTTAGCCA AATTAGCCGA AAATCAACAT ATTAAGTCCG ATCCGAGCCG TCACTGATGT
481  CAGGATATGT GGAATGAGCC AATCCAGAAA GCACACAGCA GAAACCGCCC TACCAACCCA
541  AAACCTGGATC AATATGEPAA TCCGATPACA GAAGATGATA TTTTTCCTCA AGCGATAT
601  GGATATTATG ACCGTCAAAC TTATCCGAAA CTGTCTGCGA ATGTCAATTG GGACAAAAC
661  GGTTCGCGTG TACCGCTBA TACTCTTACT TTAGACACCC AATACAGGCA ABCCTCTGCG
721  TCGAGTCAAG TACCAATTAG TGAATGGCGT GCAAGTGATC ACAGTTCGCG CATATTGGC
781  ATGCTGAAA ACTTAGTATA CCAATACAGT GGTTCAGACG CAGCCGACGA AGATPTTGT
841  TTTTCAGACA CTACCATCA TCTCAAGGTT TATGCCAGTC AATATGATAA AATACAGAT
901  AGCGAATATC GGCCTCAACA TGTATGTTT ACCACTGTTC CACCCACAGA ACGCAAAATG
961  TACTTAGATA CTAAATAGAT TGAATCAAT ACCGATACAG GTCTGTCTAT GCGCAAAAT
1021  ACCACCTTGC GTATCAAAA AGTACCTGTC TTTTACCTGC CCTATTTAA CTTCGATC
1081  GATGCTGCTC GCTCTCTGAG ATTTTATPAA CCAATCAATG GATTTGATGC ATCGAGAT
1141  TTGAAATTA GTACCCCTTA TTATCTGAA TTTGCGCAG TATATGATGC AAGCAATAG
1201  CCAACTGTAT TTACTAACCG CAATCCATG CTGACTGCGG AATTTGTTA TCTGACCAA
1261  GATTAATGAT CAGGCGTGT GACTCTGCG TATCTTCAA AAGATCAGCA ATATCAAT
1321  AAGAGCCGTA GCCGAATCA ATTGATCAT ACAATGCCA CCAAGCAGTT TGAATAAAT
1381  ACCACTTAGC CACAATATCA ATCTGTTCT GATGCCAAT ATTATCAGA CTTAATGCG
1441  TTGGTGTG AGATGCTPAA GCTAATCTA CCAAGACAGA TCGGACAGAG CTTTGTGAT
1501  GAAATGCTT CAGCTGATTT AAGATTGAA GATTTTCAGC GTTATAGCG TTTTGGCTA
1561  GATGTEGCG CATATACAGA CAAGATAGA CCAATGCMC GCTACAGCA GCTATCGATC
1621  AACTATCGTT TGCCCTGCAAT ATGATGGGT ACACCCAGC GTCTTGAAT GGGTGTATT
1681  CATAATTCGT CCTATTTCAA AAAATCCAT AAAGATPACT CTGACCCAGA AAAAGCGGT
1741  GGTGAAATP TTAGCCATP CAGACCGAT TATCCATGCT TCGCTATG GGGTATTG
1801  ACAGCAAAAC TTAGCCTGAC ACATATATAT ACCAGTATG ACGAGACAG CTTAGCCGAC
1861  CAATATATG CTAGAAATA GGTCCGCAAT TCGATATTG CAGCCAGCT CAGCTGGAT
1921  GCTGGGCTAT TTTTGA AAAAGCGGTGCA CCAATTGGCA TGCATCAGA TACATGTC
1981  TATCAAGTAC TGACCCAAAG ATTAGCATAT ACTTACAGCC CTTTTPAAGA TCAACACAT
2041  GTTACACAG CATATACAG CTCGCCATAT TTCTCATCA CTAGCTTGA AAGCAATAG
2101  TGGTTTTTGG GTCATATGCG CATTAAGAT TTACACGCG TCAAGCTGCG AGTCACATC
2161  GGTCAACAG AATGACATG CACTTAAAT TATCTTAAAT ATCTTTGAT GCGCTAAAT
2221  TTGATGATA TCCGTTGTTG TATCAATGAC AGCGAAGCT ATAGCAGAG AAGCTCTGAT
2281  TTGGCATGCG AAGCCAGCT ACAGSCAAA GACATTTAT GGTTTGATGC ATCAGGTTCA
2341  TTGAGACAA ATATGATTT GAGCGATTT GTGACAAA TCGCTATG TCCAGGATC
2401  GGTAAATAT TTAACCTAG TATTTCAA AAAAAAATA ATCGTCTT TAAATCAAT
2461  GATATACAG CATATACAG CTCGCCATAT TTCTCATCA ATATTCGCTG GGGTAAAT
2521  GGTCAACAG AATGACATG CACTTAAAT TTACACGCG TCAAGCTGCG AGTCACATC
2581  TATAAAGAT GCTGTTATG TTTGTCATC TATGACAGAC GCTATGATGA TGTCTCAAT
2641  GCGATTTAT CAGCTTATG TCGAATAG GCAAAATTC GCTATAGCG TATCGGCG
2701  GCGGCTGTT TGAATCACT TTAGCGAA AAGTACTAG GCTATGATA GTTTCAAA
2761  GCTTGGAGAC ATGATTACTA A (SEQ ID No : 1)

```