

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/31

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/63 C07K 14/21

C07K 19/00 A61K 39/02

G01N 33/569



[21] 申请号 02812216.X

[43] 公开日 2005 年 2 月 16 日

[11] 公开号 CN 1582336A

[22] 申请日 2002.6.18 [21] 申请号 02812216.X

[30] 优先权

[32] 2001. 6.18 [33] US [31] 60/298,403

[32] 2001.10.19 [33] US [31] 60/330,095

[86] 国际申请 PCT/CA2002/000911 2002.6.18

[87] 国际公布 WO2002/102836 英 2002.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.18

[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·哈枚尔

B·R·布罗德德尔 S·利欧克斯

G·莱布兰克 J·科特尔

[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 刘晓东

权利要求书 6 页 说明书 34 页 序列表 6 页
附图 2 页

[54] 发明名称 粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)抗原

[57] 摘要

本发明涉及可用于预防、诊断的和/或治疗目的
的粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)多肽。

(SEQ ID NO: 2)

1 MTAKKDRSTN LSKICKHCF FTSSLIATLA MGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51 ADGGIILAND SINTVRMSKY QSPAPDGIKI IPANQTLLNL DTAVIVSHIF
101 VDAQDEVSKG DALLGYETHL ESLPSEVTTL PAFPGVVRH VFAMTQGYD
151 ANTFLEIHD ISQLKFISYL SSALMNDTKL GDAVTFGVGG IAHVQQLSQV
201 NVSEQNPKLI EVRVITEPNP DEKPKDLLGR RVVGHIDYGG IQGVMMPPSS
251 AVYDSDLNIL ALDGFDRPPH KPDAPIDGYV WVVQDQHRLS LSPVKVLEYH
301 PKTQQFLVQG ITEDSLVATV PLPRDAHDKP VKVY*

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

1. 包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸:

(a) 编码与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽的多核苷酸, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 或其片段或类似物的序列;

(b) 编码与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽的多核苷酸, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 或其片段或类似物的序列;

(c) 编码与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽的多核苷酸, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 或其片段或类似物的序列;

(d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 或其片段或类似物序列的多肽的多核苷酸;

(e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸;

(f) 编码多肽含表位部分的多核苷酸, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 或其片段或类似物的序列;

(g) 包含选自 SEQ ID No: 1 或 3 或其片段或类似物的序列的多核苷酸;

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

2. 包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸:

(a) 编码与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽的多核苷酸, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(b) 编码与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽的多核苷酸, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(c) 编码与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽的多核苷酸, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽的多核苷酸;

(e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽具

有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸;

(f) 编码多肽含表位部分的多核苷酸, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(g) 包含选自 SEQ ID No: 1 或 3 的序列的多核苷酸;

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

3. 权利要求 1 的多核苷酸, 其中所述多核苷酸是 DNA。

4. 权利要求 2 的多核苷酸, 其中所述多核苷酸是 DNA。

5. 权利要求 1 的多核苷酸, 其中所述多核苷酸是 RNA。

6. 权利要求 2 的多核苷酸, 其中所述多核苷酸是 RNA。

7. 在严谨条件下与下列序列杂交的分离的多核苷酸:

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中所述多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4、或其片段或类似物的序列。

8. 权利要求 1 的多核苷酸, 其在严谨条件下可与下列序列杂交:

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中所述多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4、或其片段或类似物的序列。

9. 权利要求 2 的多核苷酸, 其在严谨条件下可与下列序列杂交:

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中所述多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列。

10. 权利要求 1 的多核苷酸, 其在严谨条件下可与下列序列杂交:

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中所述多肽包含来自包含选自 SEQ ID No: 2 或 4、或其片段或类似物的序列的多肽的至少 10 个连续的氨基酸残基。

11. 权利要求 2 的多核苷酸, 其在严谨条件下可与下列序列杂交:

(a) 编码多肽的 DNA 序列, 或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中所述多肽包含来自包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽的至少 10 个连续的氨基酸残基。

12. 包含权利要求 1 的多核苷酸的载体, 其中所述 DNA 与表达控制区有效连接。

13. 包含权利要求 2 的多核苷酸的载体, 其中所述 DNA 与表达控制区有效连接。

14. 利用权利要求 12 的载体转染的宿主细胞。

15. 利用权利要求 13 的载体转染的宿主细胞。

16. 产生多肽的方法, 其包含在适于表达所述多肽的条件下培养权利要求 14 的宿主细胞。

17. 产生多肽的方法, 其包含在适于表达所述多肽的条件下培养

权利要求 15 的宿主细胞。

18. 包含选自下列多肽的分离的多肽:

(a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽, 该第二种多肽具有选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的氨基酸序列;

(b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽, 该第二种多肽具有选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的氨基酸序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽, 该第二种多肽具有选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的氨基酸序列;

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列的多肽;

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 多肽的含表位部分, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除 N 端甲硫氨酸残基;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除分泌氨基酸序列。

19. 包含选自下列多肽的分离的多肽:

(a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽, 该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的氨基酸序列;

(b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽, 该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的氨基酸序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽, 该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的氨基酸序列;

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽;

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽具有结合特异性抗体的多肽;

(f) 多肽的含表位部分, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除 N 端甲硫氨酸残基;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除分泌氨基酸序列。

20. 包含两种或多种具有选自 SEQ ID NO: 2、4 或其片段或类似物的序列的多肽的嵌合多肽, 只要将所述多肽连接成嵌合多肽。

21. 包含两种或多种具有选自 SEQ ID NO: 2 或 4 的序列的多肽的嵌合多肽, 只要将所述多肽连接成嵌合多肽。

22. 药物组合物, 其包含权利要求 18-21 任一项中的多肽以及药物可接受的载体、稀释剂或佐剂。

23. 预防性或治疗性治疗易受莫拉氏菌感染宿主中的莫拉氏菌感染的方法, 其包含给予所述宿主预防或治疗量的权利要求 22 的组合物。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述宿主是新生儿、婴儿或儿童。

25. 权利要求 23 的方法, 其中所述宿主是无免疫应答的宿主。

26. 权利要求 23 的方法, 其中所述宿主是成年人。

27. 治疗性或预防性治疗中耳炎、鼻窦炎、持续性咳嗽、急性喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎和侵袭性疾病的方法, 其包含给予所述宿主治疗或预防量的权利要求 22 的组合物。

28. 诊断易受莫拉氏菌感染宿主的莫拉氏菌感染的方法，其包含

(a)从宿主获得生物样品；

(b)将该生物样品与对权利要求 18-21 任一项的多肽具有反应性的抗体或其片段温育，以形成混合物；以及

(c)检测混合物中表示存在莫拉氏菌的特异性结合的抗体或片段。

29. 在包含或怀疑包含莫拉氏菌抗原的特异性抗体的生物样品中检测所述抗体的方法，其包含

(a)从宿主获得生物样品；

(b)将该生物样品与权利要求 18-21 任一项的一种或多种多肽或其片段温育，以形成混合物；以及

(c)检测混合物中表示存在莫拉氏菌特异性抗体的特异性结合的抗原或片段。

30. 权利要求 22 的药物组合物在制备预防性或治疗性治疗莫拉氏菌感染的药物中的用途。

31. 试剂盒，包含权利要求 18-21 任一项的多肽，用于检测或诊断莫拉氏菌感染。

粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)抗原

发明领域

本发明涉及可能用来预防、诊断和/或治疗粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)(*Moraxella (Branhamella) catarrhalis*)感染的多肽,特别是粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)的多肽。

发明背景

粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)是引起人呼吸道感染的革兰氏阴性双球菌。如今认为粘膜炎莫拉氏菌是继肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)之后,引起婴幼儿中耳炎的第三个最常见病因。粘膜炎莫拉氏菌也与几种其它类型的感染有关,包括鼻窦炎、持续性咳嗽、成人急性喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎、以及无免疫应答宿主中的侵袭性疾病。

大约 90%的粘膜炎莫拉氏菌菌株耐受抗生素(β -内酰胺酶阳性),而且复发性中耳炎发病率高,因此有必要开发保护宿主防止粘膜炎莫拉氏菌感染的疫苗。粘膜炎莫拉氏菌感染诱导针对细菌细胞表面上抗原的免疫应答。但其中许多表面蛋白质尚未鉴定,也未确定防止不同菌株感染的免疫应答。

为开发保护宿主防止粘膜炎莫拉氏菌感染的疫苗,主要致力于外膜蛋白质,例如称为泛在的表面蛋白质 A (UspA) 高分子量蛋白质。因其单克隆抗体和多克隆抗体在小鼠肺清除模型中均显示杀菌和保护作用,人们认为该蛋白质是有希望的候选疫苗。然而,该蛋白质在不同粘膜炎莫拉氏菌菌株间的变异较强。除该蛋白质以外,人们注意到其它的粘膜炎莫拉氏菌蛋白质可作为可能的候选疫苗。具有保守性表

位转铁蛋白结合蛋白暴露于细菌表面。

然而，不同菌株之间蛋白质的抗体交叉反应性程度存在差异。其它研究者还关注 45-kDa 蛋白质 CD (OMP CD)。该蛋白质在粘膜炎莫拉氏菌菌株间高度保守，但慢性阻塞性肺病的成年人对 OMP CD 的免疫应答具有变异性。

因此，仍亟需可用于预防、诊断和/或治疗粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)感染的粘膜炎莫拉氏菌多肽。

发明概述

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 70% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面涉及包含选自 SEQ ID Nos: 2、4 或其片段或类似物的序列的多肽。

其它方面提供了由本发明多核苷酸编码的多肽、药物组合物、包含有效连接表达控制区的本发明多核苷酸的载体、利用所述载体转染的宿主细胞以及包含在适于表达的条件下培养所述宿主细胞的多肽产生方法。

附图简述

图 1 代表来自粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC6 基因的 DNA 序列；SEQ ID NO: 1。下划线部分序列代表前导肽编码区。

图 2 代表来自粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC6 多肽的氨基酸序列；SEQ ID NO: 2。下划线序列代表 39 个氨基酸残基的前

导肽。

图3代表来自粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC7 基因的 DNA 序列；SEQ ID NO: 3。下划线部分序列代表前导肽编码区。

图4代表来自粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC7 多肽的氨基酸序列；SEQ ID NO: 4。下划线序列代表 21 个氨基酸残基的前导肽。

发明详述

本发明提供纯化和分离的多核苷酸，其编码可用于防止、诊断和/或治疗莫拉氏菌感染的莫拉氏菌多肽。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 70% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 80% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 95% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 70% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 80% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 95% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列。

本发明一方面涉及包含选自 SEQ ID Nos: 2、4 或其片段或类似物的氨基酸序列的多肽。

本发明一方面涉及包含选自 SEQ ID Nos: 2 或 4 的氨基酸序列的多肽。

本发明一方面涉及具有选自 SEQ ID Nos: 2、4 或其片段或类似物的氨基酸序列特征的多肽。

本发明一方面涉及具有选自 SEQ ID Nos: 2 或 4 的氨基酸序列特征的多肽。

本发明一方面提供了编码多肽带有表位部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码多肽含表位部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2 或 4 的序列。

本发明一方面涉及多肽含表位部分，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面涉及多肽含表位部分，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2 或 4 的序列。

本发明一方面提供了包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸：

- (a) 编码与第二种多肽具有至少 70% 同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列；
- (b) 编码与第二种多肽具有至少 80% 同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列；
- (c) 编码与第二种多肽具有至少 95% 同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列；
- (d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物序列的多肽的多核苷酸；
- (e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 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的多核苷酸；
- (f) 编码多肽含表位部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列；
- (g) 包含选自 SEQ ID No: 1、3 或其片段或类似物的序列的多核苷酸；
- (h) 与(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)中的多核苷酸互补的多核苷酸。

本发明一方面提供了包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸：

- (a) 编码与第二种多肽具有至少 70% 同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列；
- (b) 编码与第二种多肽具有至少 80% 同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列；
- (c) 编码与第二种多肽具有至少 95% 同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列；
- (d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽的多核苷酸；

- (e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸;
- (f) 编码多肽含表位部分的多核苷酸, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;
- (g) 包含选自 SEQ ID No: 1 或 3 的序列的多核苷酸;
- (h) 与(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)中的多核苷酸互补的多核苷酸。

本发明一方面提供了包含选自下列多肽的分离的多肽:

- (a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列;
- (b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列;
- (c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列;
- (d) 包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列的多肽;
- (e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;
- (f) 多肽含表位部分, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的序列;
- (g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除 N 端甲硫氨酸残基;
- (h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除分泌氨基酸序列。

本发明一方面提供了包含选自下列多肽的分离的多肽:

- (a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;
- (b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽, 该第二种多肽包

含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽, 该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽;

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 多肽含表位部分, 该多肽包含选自 SEQ ID No: 2 或 4 的序列;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除 N 端甲硫氨酸残基;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽, 其中去除分泌氨基酸序列。

本领域技术人员应当理解, 本发明包括编码本专利申请此处所述多肽的类似物例如突变体、变体、同源物和衍生物的 DNA 分子, 即多核苷酸及其互补序列。本发明也包括本发明的 DNA 分子对应的 RNA 分子。除 DNA 和 RNA 分子以外, 本发明包括相应的多肽以及特异性结合该多肽的单克隆抗体。

在另一实施方案中, 本发明的多肽是抗原性的。

在另一实施方案中, 本发明的多肽是免疫原性的。

在另一实施方案中, 本发明的多肽可以激发宿主的免疫应答。

在另一实施方案中, 本发明也涉及能够产生对上述本发明多肽具有结合特异性的抗体的多肽。

“具有结合特异性”的抗体是识别并结合所选择多肽、而基本上不识别并结合样品中(例如, 天然包括所选肽的生物样品)其它分子的抗

体。以所选多肽为抗原，使用 ELISA 分析可以测定其特异性结合。

根据本发明，生物学研究中的"保护"定义为显著提高存活曲线、存活率或存活时间。分别使用对数秩和检验比较存活曲线，以及 Fisher 精确检验比较存活率和至死天数的统计分析，可用来计算 P 值并确定两组之间的差异是否在统计上有显著意义。P 值 0.05 被认为不显著。

本发明另一方面提供了本发明多肽的抗原性/免疫原性片段、或其类似物。

本发明的片段应该包括一种或多种这样的表位性区域，或与这样的区域基本类似，以保留其抗原性/免疫原性性质。因此，对于本发明的片段而言，同一性程度也许关系不大，因为它们可能与此处所述多肽、或其类似物的特定部分具有 100% 的同一性。本发明进一步提供了具有本发明多肽序列的至少 10 个连续氨基酸残基的片段。在一个实施方案中，至少 15 个连续的氨基酸残基。在一个实施方案中，至少 20 个连续的氨基酸残基。

技术人员应当理解，本发明多肽的类似物也应用于本发明范围内，即作为抗原性/免疫原性物质。因此，举例来说，本发明包括包含一种或多种添加、缺失、置换等的蛋白质或多肽。

此处所用本发明多肽的"片段"、"类似物"或"衍生物"包括其中一个或多个氨基酸残基被替换为保守性或非保守性氨基酸残基(优选保守性)、并可能天然或非天然存在的多肽。在一个实施方案中，本发明多肽的衍生物和类似物应与图示序列或其片段具有大约 80% 同一性。也就是说，80% 的残基相同。在另一实施方案中，多肽具有大于 80% 的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 85% 的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 90% 的同一性。在另一实施方案中，

多肽具有大于 95% 的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 99% 的同一性。在另一实施方案中，本发明多肽的类似物具有少于约 20 个氨基酸残基的置换、修饰或缺失，更优选少于 10 个。

这些置换是对多肽的二级结构和亲水性质影响极小的置换。优选本领域已知的保守性置换，即所置换的残基共有物理或化学性质，例如疏水性、大小、电荷或功能基团。其中包括例如 Dayhoff, M. 在 *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5, 1978 中以及 Argos, P. 在 *EMBO J.* 8, 779-785, 1989 中所述的置换。例如，属于下列各组之一的天然或非天然氨基酸代表保守性变化：

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.

优选的置换还包括相应 L-氨基酸的 D-对映异构体的置换。

在另一方法中，该类似物可以是融合多肽，例如通过有效标识目的蛋白质，引入使纯化更为容易的部分。可能需要去除"标签"，或可能该融合多肽自身保有充分可用的抗原性。

同源性百分比定义为同一性百分比加上相似性或氨基酸类型保守性百分比的总和。

在一个实施方案中，本发明多肽的类似物应与图示序列或其片段具有大约 70% 同一性。也就是说，70% 的残基相同。在另一实施方案中，多肽具有大于 80% 的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 85% 的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 90% 的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 95% 的同一性。在另一实施方案

中，多肽具有大于 99% 的同一性。在另一实施方案中，本发明多肽的类似物具有少于约 20 个氨基酸残基的置换、修饰或缺失，更优选少于 10 个。

在一个实施方案中，本发明多肽的类似物应与图示序列或其片段具有大约 70% 同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 80% 的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 85% 的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 90% 的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 95% 的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 99% 的同源性。在另一实施方案中，本发明多肽的类似物具有少于约 20 个氨基酸残基的置换、修饰或缺失，更优选少于 10 个。

人们可以利用诸如 CLUSTAL 程序比较氨基酸序列。该程序对氨基酸序列进行比较，通过在视情况而定的任一序列中插空(inserting spaces)找到最佳比对。有可能计算氨基酸同一性或同源性，进行最佳比对。类似 BLASTx 的程序可比对最长一段的相似序列，并为该匹配赋值。因此有可能实现比对，其中找到各具有不同得分的若干相似性区域。两种同一性分析均包含于本发明之内。

在另一方法中，该类似物或衍生物可能是融合多肽，例如通过有效标识目的蛋白质或多肽，引入使纯化更为容易的部分，可能需要去除"标签"，或可能该融合多肽自身保有充分可用的抗原性。

众所周知，有可能筛选抗原性多肽，以鉴定表位区，即决定该多肽抗原性或免疫原性的区域。进行这种筛选的方法为本领域所公知。因此，本发明的片段应该包括一种或多种这样的表位区，或与这种区域基本类似，以保留其抗原性/免疫原性性质。

因此，本发明片段的同一性程度也许并不相干，因为它们可能与

此处所述多肽、其类似物的特定部分具有 100% 同一性。

因此，对于类似物、衍生物和片段而言，重要的是它们至少具有所来源蛋白质或多肽的一定程度的抗原性/免疫原性。

本发明还包括与可改变该多肽生物学或药理学性质的其它化合物融合的多肽，提高半衰期的即聚乙二醇(PEG)；便于纯化的前导或分泌氨基酸序列；前原-和原-序列；以及(多)糖。

另外，当发现氨基酸区域具有多态性时，可能需要改变一种或多种特定氨基酸，以更有效摹拟不同莫拉氏菌株的不同表位。

此外，可以通过末端-NH₂ 的酰化作用(例如乙酰化、或巯基乙酸酰胺化、末端羧基酰胺化，例如利用氨或甲胺)修饰本发明的多肽，提供稳定性、提高疏水性，以连接或结合支持物或其它分子。

也包括该多肽片段和类似物的异型和同型多肽多聚体。这些多聚体形式包括，例如利用交联剂例如亲和素/生物素、戊二醛(gluteraldehyde)或二甲基 superimide 交联的一种或多种多肽。这种多聚体形式还包括通过重组 DNA 技术产生的多顺反子 mRNA 制备的包含两个或多个串联或颠倒的连续序列的多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含一种或多种本申请附图中定义的多肽、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个或多个多肽的嵌合多肽，其中的多肽具有选自 SEQ ID NO: 2、4 或其片段或类似物的序列；只要将该多肽连接成嵌合多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含两个或多个多肽的嵌合多肽，其中的多肽具有选自 SEQ ID NO: 2 或 4 的序列，只要将该多肽连接成嵌合多肽。

本发明多肽的片段、类似物或衍生物优选包含至少一个抗原性区域，即至少一个表位。

为了形成抗原性聚合物(即合成的多聚体)，可以使用具有双卤代乙酰基(bishaloacetyl)、硝基芳基卤(nitroarylhalides)等的多肽，这些试剂对巯基具有特异性。因此，不同多肽的两个巯基之间的连接可能是单键或可能由至少 2 个、一般至少 4 个、不多于 16 个、但通常不多于约 14 个碳原子的连接基团组成。

在特定实施方案中，本发明的多肽片段和类似物不包含甲硫氨酸(Met)起始残基。优选多肽不引入前导或分泌序列(信号序列)。可根据已建立的分子生物学技术确定本发明多肽的信号部分。一般而言，可能从莫拉氏菌培养物分离目的多肽，随后测序，以确定成熟蛋白质的起始残基，从而确定成熟多肽的序列。

应当理解，可以制备和/或使用无起始密码子(甲硫氨酸或缬氨酸)和/或无前导肽的多肽，以利于制备和纯化重组多肽。众所周知，克隆无编码前导肽序列的基因将使该多肽限于大肠杆菌细胞质中，便于回收(Glick, B. R. 和 Pasternak, J. J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. In "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA", 第二版, ASM Press, Washington DC, 109-143 页)。

本发明另一方面还提供了(i) 包含本发明多肽连同载体、稀释剂或佐剂物质的组合物；(ii) 包含本发明多肽和载体、稀释剂或佐剂

(adjuvant)的药物组合物; (iii)包含本发明多肽和载体、稀释剂或佐剂的疫苗; (iv)通过给予宿主免疫原有效量的本发明多肽, 引发免疫应答, 例如对莫拉氏菌的保护性免疫应答, 从而诱导宿主中针对莫拉氏菌的免疫应答的方法; 特别是(v)通过给予所需宿主预防性或治疗性剂量的本发明多肽, 而预防和/或治疗莫拉氏菌感染的方法。

本发明另一方面还提供了(i)包含本发明多核苷酸连同载体、稀释剂或佐剂物质的组合物; (ii)包含本发明多核苷酸和载体、稀释剂或佐剂的药物组合物; (iii)通过给予宿主免疫原有效量的本发明多核苷酸, 引发免疫应答, 例如对莫拉氏菌的保护性免疫应答, 从而诱导宿主中针对莫拉氏菌的免疫应答的方法; 特别是(iv)通过给予所需宿主预防性或治疗性剂量的本发明多核苷酸, 而预防和/或治疗莫拉氏菌感染的方法。

本发明多肽也可以在免疫之前耦联或缀合载体蛋白质, 例如破伤风毒素、白喉毒素、乙型肝炎病毒表面抗原、脊髓灰质炎病毒 VP1 抗原或任何其它病毒性或细菌性毒素或抗原、或任何合适蛋白质以刺激形成更强免疫应答。可以通过化学或遗传方法进行耦联或缀合。有关肽-载体缀合的更详细说明参见 Van Regenmortel, M. H. V., Briand J. P., Muller S., Plaué S., « Synthetic Polypeptides as antigens » in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 卷 19(ed.) Burdou, R. H. & Van Knippenberg P. H. (1988), Elsevier New York.

本发明另一方面提供了包含一种或多种本发明莫拉氏菌多肽与药物可接受佐剂的混合的药物组合物。合适的佐剂包括(1) 水包油型乳剂, 例如 MF59TM、SAFTM、RibiTM; (2) 弗氏完全或不完全佐剂; (3) 盐, 即 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 AlPO_4 、硅土、高岭土; (4) 皂甙衍生物, 例如 StimulonTM, 或其形成的颗粒例

如 ISCOMs (免疫刺激复合物); (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)诱导粘膜免疫的其它物质, 例如碳多核苷酸, 即多聚 IC 和多聚 AU, 去毒霍乱菌毒素(CTB)以及大肠杆菌热不稳定性毒素。佐剂的更详细说明参见 M. Z. I Khan 等人在 *Pharmaceutical Research*, 11 卷, 第一期(1994) 2-11 页中的综述、Gupta 等人在 *Vaccine*, 13 卷, 第 14 期 1263-1276 页(1995) 中的另一综述以及 WO 99/24578。优选的佐剂包括 QuilATM、QS21TM、AlhydrogelTM 和 AdjuphosTM。

可通过注射、快速输注、鼻咽吸收、皮肤吸收、或含服、或口服, 经肠胃外给予本发明的药物组合物。

本发明的药物组合物可用于预防莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌感染所致疾病和症状, 如 *Manual of Clinical Microbiology*, P. R. Murray (主编), E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover 和 R. H. Tenover. ASM Press, Washington, D. C. 第七版, 1999, 1773 页所述。在一个实施方案中, 本发明的药物组合物可用于治疗或预防中耳炎、鼻窦炎、持续性咳嗽、急性喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎。在一个实施方案中, 本发明的疫苗组合物可用于治疗或预防莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌感染所致疾病和症状。在另一实施方案中, 该莫拉氏菌感染是粘膜炎莫拉氏菌。

在特定实施方案中, 将药物组合物给予处于莫拉氏菌感染危险中的宿主, 例如新生儿、婴儿、儿童、老人以及免疫无免疫应答的宿主。

本申请所用术语"宿主"包括哺乳动物。在另一实施方案中, 该哺乳动物是人。在另一实施方案中, 该人为新生儿、婴儿或儿童。在另一实施方案中, 该人是成年人。

在特定实施方案中，将药物组合物给予处于莫拉氏菌感染危险中的宿主，例如新生儿、婴儿、儿童、老人以及免疫无应答的宿主。

药物组合物的单位剂型优选约 0.001 - 100 $\mu\text{g/kg}$ (抗原/体重)，更优选 0.01 - 10 $\mu\text{g/kg}$ ，最优选 0.1 - 1 $\mu\text{g/kg}$ ，1 - 3 次，免疫之间间隔约 1-6 周。

药物组合物的单位剂型优选约 0.1 μg - 10 mg，更优选 1 μg - 1 mg，最优选 10 - 100 μg ，1 - 3 次，免疫之间间隔约 1-6 周。

本发明另一个方面提供了编码多肽的多核苷酸，该多肽的特征在于，氨基酸序列包含 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物。

在一个实施方案中，多核苷酸如 SEQ ID No: 1、3 所示，其可能包括编码本发明多肽的开放阅读框架(ORF)。

应当理解，图示多核苷酸序列可以改变为仍编码本发明多肽的简并密码子。因此，本发明进一步提供可与此处上述的多核苷酸序列(或其互补序列)杂交的多核苷酸，序列之间具有 70% 同一性。在一个实施方案中，序列之间具有至少 80% 同一性。在一个实施方案中，序列之间具有至少 85% 同一性。在一个实施方案中，序列之间具有至少 90% 同一性。在另一实施方案中，多核苷酸在严谨条件下杂交，即具有至少 95% 同一性。在另一实施方案中，具有大于 97% 的同一性。

本领域技术人员很容易确定合适的严谨杂交条件(例如参见 Sambrook 等人,(1989) *Molecular cloning : A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, N. Y.; *Current Protocols in Molecular Biology*, (1999) Ausubel F. M. 等人编著, John Wiley & Sons, Inc., N. Y.)。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

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

其中所述多肽包含 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

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

其中所述多肽包含 SEQ ID No: 2 或 4。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

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

其中所述多肽包含来自包含 SEQ ID No: 2、4 或其片段或类似物的多肽的至少 10 个连续的氨基酸残基。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

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

其中所述多肽包含来自包含 SEQ ID No: 2 或 4 的多肽的至少 10 个连续的氨基酸残基。

在另一实施方案中，多核苷酸为如 SEQ ID No: 1、3 所示的多核苷酸，或为其片段或类似物，其编码本发明的多肽。

在另一实施方案中，多核苷酸为如 SEQ ID No: 1、3 所示的多核苷酸，其编码本发明的多肽。

本领域技术人员容易理解，多核苷酸包括 DNA 和 RNA。

本发明还包括与本申请所述多核苷酸互补的多核苷酸。

另一方面，编码本发明多肽的多核苷酸、或其片段、类似物或衍生物，可用于 DNA 免疫方法。也就是说，能够将它们引入可进行复制和表达的载体，通过注射，从而在体内产生抗原性多肽。例如，可将多核苷酸引入质粒载体，位于在真核细胞中起作用的 CMV 启动子控制之下。优选肌内注射该载体。

本发明另一方面提供了通过重组技术在宿主细胞中表达编码所述多肽的多核苷酸、并回收所表达的多肽产物、从而制备本发明多肽的方法。另外，可以根据已经建立的化学合成技术制备该多肽，即液相或固相合成寡肽，连接起来制备完整的多肽(区段连接)。

下列参考文献描述了获取并鉴定多核苷酸和多肽的一般方法：Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F. M. 等人编著, John Wiley and Sons, Inc. New York; *PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering*, White B. A. 编著, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 页; *Protein Purification, Principles and Practices*, Scopes R. K., Springer-Verlag, New York, 第三版, 1993, 380 页; *Current Protocols in Immunology*, Coligan J. E. 等人编著, John Wiley & Sons Inc., New York.

本发明提供了产生多肽的方法，其包含在适于表达所述多肽的条件下培养本发明的宿主细胞。

为进行重组制备，利用编码本发明多肽的载体转染宿主细胞，然后在适当改变的培养基中培养，以活化启动子、选择转化子或扩增基因。合适的载体可在所选宿主中存活并复制，包括染色体、非染色体以及合成 DNA 序列，例如细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒、联合质粒和噬菌体 DNA 得到的载体。可以使用限制性内切酶将多肽序列引入载体适当位点，使其有效连接包含启动子、核糖体结合位点(共有序列区域或 SD 序列)以及任选操纵子(控制元件)的表达控制区。可以根据已确立的分子生物学原理，选择适于指定宿主和载体的各个表达控制区元件(Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F. M.等人编著, John Wiley and Sons, Inc. New York)。合适的启动子包括但不限于 LTR 或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac、tac 或 trp 启动子以及噬菌体 λ P_L 启动子。载体优选引入复制起点以及选择标志，即氨苄青霉素抗性基因。合适的细菌性载体包括 pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 以及真核载体 pBlueBacIII、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXTI、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL。宿主细胞可能是细菌，即大肠杆菌(*E. coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、链霉菌(*Streptomyces*)；真菌，即黑曲霉(*Aspergillus niger*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulins*)；酵母，即糖酵母属(*Saccharomyces*)或真核细胞，即 CHO、COS。

在培养物中表达多肽后，一般离心收集细胞，然后利用物理或化学方法裂解(如果该表达多肽未分泌到培养基中)，保留得到的粗提物，

以分离目的多肽。根据多肽性质，利用已建立的技术从培养基或裂解物中纯化多肽，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、羟基磷灰石层析以及凝集素层析。可能使用 HPLC 完成最终纯化。

该多肽可能在有或没有前导或分泌序列的情况下表达。在前一种情况下，可能利用翻译后加工去除前导序列(参见 US 4,431,739; US 4,425,437 和 US 4,338,397)，或在纯化所表达的多肽之后，通过化学去除。

另一方面，本发明的莫拉氏菌多肽可用于莫拉氏菌感染、特别是莫拉氏菌感染的诊断检测。可能有若干诊断方法，例如，可以按照以下方法检测生物样品中的莫拉氏菌生物体：

- a) 从宿主获得生物样品；
- b) 将与本发明的多肽具有反应性的抗体或其片段与该生物样品温育，以形成混合物；以及
- c) 检测混合物中表示存在莫拉氏菌的特异性结合的抗体或片段。

另外，在包含或怀疑包含莫拉氏菌抗原的特异性抗体的生物样品中检测所述抗体的方法，可能如下进行：

- a) 从宿主获得生物样品；
- b) 将该生物样品与本发明的一种或多种多肽或其片段温育，以形成混合物；以及
- c) 检测混合物中表示存在莫拉氏菌的特异性抗体的特异性结合抗原或片段。

本领域技术人员应当承认，该诊断性检验可能具有几种形式，包括免疫学检验，例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定或乳胶凝集测定，可基本确定生物体中是否存在该蛋白质的特异性抗体。

编码本发明多肽的 DNA 序列也可能用来设计 DNA 探针，用于在怀疑包含莫拉氏菌的生物样品中检测这种细菌。本发明的检测方法包含：

- a) 从宿主获得生物样品；
- b) 将该生物样品与具有编码本发明多肽或其片段的 DNA 序列的一种或多种 DNA 探针温育，以形成混合物；以及
- c) 检测混合物中表示存在莫拉氏菌的特异性结合的 DNA 探针。

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，例如使用聚合酶链式反应，作为诊断莫拉氏菌感染的方法。探针可能使用常规技术合成并固定于固相上，或者利用可检测标志进行标记。本申请优选的 DNA 探针是寡聚体，其具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少约 6 个连续核苷酸互补的序列。

检测宿主中莫拉氏菌的另一诊断方法包含：

- a) 利用可检测标志标记与本发明多肽或其片段具有反应性的抗体；
- b) 给予宿主标记的抗体或片段；以及
- c) 检测宿主中表示存在莫拉氏菌的特异性结合的标记抗体或片段。

本发明另一方面在于本发明莫拉氏菌多肽作为免疫原在制备特异性抗体中的用途，用于诊断特别是治疗莫拉氏菌感染。利用适当的筛选方法，例如通过在测试模型中测定特定抗体被动防止莫拉氏菌感染的能力，可以确定合适的抗体。此处实施例所述小鼠模型就是动物模型的例子。该抗体可能是完整抗体或其抗原结合片段，并可能属于任何免疫球蛋白类型。该抗体或片段可能来源于动物，特别是哺乳动物，更特别是小鼠、大鼠或人。可能是天然抗体或其片段，或如果需要，

可能是重组抗体或抗体片段。术语重组抗体或抗体片段是指利用分子生物学技术制备的抗体或抗体片段。可能是多克隆的、或优选单克隆的抗体或抗体片段。可能特异性针对与莫拉氏菌多肽有关的多种表位，但优选特异性针对其中一种。

本发明一方面提供抗体在治疗和/或预防莫拉氏菌感染中的用途。

本发明另一方面在于针对本发明多肽的抗体在被动免疫中的用途。可以使用本申请所述抗体。

本发明另一方面在于通过给予宿主数量足以提供被动免疫的本发明多肽进行免疫、从而产生抗体的方法。

在另一实施方案中，本发明提供本发明的药物组合物在制备预防性或治疗性治疗莫拉氏菌感染的药物中的用途。

在另一实施方案中，本发明提供包含本发明多肽的试剂盒，用于检测或诊断莫拉氏菌感染。

除非另外定义，此处所用全部技术和科学术语与本发明所属领域技术人员通常理解的含义相同。此处提及的所有出版物、专利申请、专利及其它参考文献均全文引入以供参考。如有冲突，则按本说明书、包括其定义为准。此外，材料、方法和实施例仅为说明目的，而非意在限制。

实施例 1

本实施例阐明 BVH-MC6 基因及相应多肽的克隆和分子特征。

从粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热

循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC6 (SEQ ID NO : 1)基因编码区, 使用下列包含供加入限制性位点 NdeI (CATATG)和 XhoI (CTCGAG)的碱基突出端的寡聚物: DMAR598 (5'-TAAGGATACATATGACGGCCCATAAAGATCG-3'); DMAR599(5'-TATGCTCGAGGTATACTTTGACTGGCTTATCATGTG-3'). 使用 QIAgen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒, 按照厂家说明(Chatsworth, CA), 从琼脂糖凝胶中纯化 PCR 产物, 并用 NdeI 和 XhoI (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canada)消化。 pET21b(+)载体(Novagen, Madison, WI)经 NdeI 和 XhoI 消化, 利用 QIAgen (Chatsworth, CA) QIAquick 凝胶提取试剂盒, 从琼脂糖凝胶中纯化。将 NdeI-XhoI PCR 产物连接到 NdeI-XhoI pET21b(+)表达载体。按照 Simanis 方法(Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D. M. Glover (ed), 109-135 页), 将连接产物转化大肠杆菌株 DH5 α [Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_K - m_K +) deoR thi-1 supE44 λ^- gyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). 使用 QIAgen 试剂盒(Chatsworth, CA)纯化包含 BVH-MC6 基因的重组 pET21b(+)质粒(rpET21b(+)), 测序 DNA 插入序列 (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing 试剂盒, ABI, Foster City, CA).

表 1. 用于 PCR 扩增粘膜炎莫拉氏菌基因的寡核苷酸引物。

基因	引物 I.D.	限制性位点	载体	序列
BVH-MC6	DMAR598	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'- TAAGGATACATATGACGGC CCATAAAGATCG -3' (SEQ ID NO:5)
BVH-MC6	DMAR599	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'- TATGCTCGAGGTATACTTT GACTGGCTTATCATGTG - 3' (SEQ ID NO:6)
BVH-MC6	RIOS136	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'- GAGTGC GGATCCTGATGAC CGCCCAAAT-3' (SEQ ID NO:7)
BVH-MC6	RIOS137	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'- TGTATTAAGCTTTTAGTAT ACTTTGACTGGCTTATC- 3' (SEQ ID NO:8)
BVH-MC7	DMAR594	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'- CGGATATTCATATGTATCA GCGCTTTATCAATAC- 3' (SEQ ID NO:9)
BVH-MC7	DMAR691	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'- ATAGATCTCGAGAAATTGC CAAACAGTCACA-3' (SEQ ID NO:10)
BVH-MC7	RIOS134	<i>Bgl</i> III	pCMV-GH	5'- ACTATGAGATCTTGGGCAC CAAACCCATCAAGC- 3' (SEQ ID NO:11)
BVH-MC7	RIOS135	<i>Sal</i> I	pCMV-GH	5'- GATTATGTCGACTTAAAT TGCCAAACAGTCACAAC- 3' (SEQ ID NO:12)

已经确定, 编码 BVH-MC6 多肽的开放阅读框架(ORF)包含 1005 bp, 编码 334 个氨基酸残基的多肽, 其预测的 pI 为 5.46, 预测的分子量为 36662.14 Da. 使用 Spscan 软件(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)分析预测的氨基酸残基序列(SEQ ID NO: 2), 提示存在 39 个氨基酸残基的信号肽(MTAHKDRSTNLSKICLKHCFFTSSLIATLAMGLAMSACS), 在丝

氨酸和天冬氨酸残基间的切割位点处结束。

为利用 PCR 扩增证实存在 BVH-MC6 (SEQ ID NO:1)基因, 使用以下 4 个不同的粘膜炎莫拉氏菌株: 粘膜炎莫拉氏菌 ETSU C-2、ETSU T-25 和 ETSU 658 临床分离物由 East Tennessee State University 提供; 粘膜炎莫拉氏菌菌株 M-12 由 Centre de recherche en infectiologie du centre hospitalier de l'université Laval 提供。在这些实验中使用大肠杆菌 XL1 Blue MRF' 作为阴性对照。使用寡核苷酸引物 DMAR598 和 DMAR599 (表 1), 从 4 株粘膜炎莫拉氏菌菌株和对照大肠杆菌菌株的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA) 扩增 BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1) 基因。在 94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 1 分钟进行 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 分钟, 进行 PCR。在 1% 琼脂糖凝胶中分离 PCR 产物, 通过溴化乙锭染色观察。PCR 扩增结果如表 2 所示。分析扩增产物表明, BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1) 基因存在于所检测的所有 4 个粘膜炎莫拉氏菌菌株的基因组中。同样利用这些寡核苷酸引物 PCR 扩增对照的大肠杆菌 DNA, 未检测到产物。

表 2. PCR 扩增鉴定粘膜炎莫拉氏菌基因。

菌株类别	PCR 扩增鉴定	
	BVH-MC6	BVH-MC7
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
M-12	+	+
<u>E. coli</u>	-	-

实施例 2

本实施例阐明 BVH-MC7 基因及相应多肽的克隆和分子特征。

从粘膜炎症莫拉氏菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA) 扩增粘膜炎症莫拉氏菌 BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3) 基因编码区, 使用包含供加入限制性位点 NdeI (CATATG) 和 XhoI (CTCGAG) 的碱基突出端的下列寡聚物: DMAR594 和 DMAR691, 如表 1 所示。用来将 BVH-MC7 克隆到表达载体并测序的方法与实施例 1 类似。

已经确定, 编码 BVH-MC7 的开放阅读框架(ORF)包含 1179 bp, 编码 392 个氨基酸残基的多肽, 其预测的 pI 为 8.65, 预测的分子量为 41456.50 Da。使用 Spscan 软件(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)分析预测的氨基酸残基序列(SEQ ID NO: 4), 提示存在 21 个氨基酸残基的信号肽(MYQRFINTALVAALAVTMAGC), 在半胱氨酸和甘氨酸残基间的切割位点处结束。

使用寡核苷酸引物 DMAR594 和 DMAR691 进行 PCR 扩增以后, 显示在所检测的 4 个粘膜炎症莫拉氏菌菌株中存在 BVH-MC7 基因(表 2)。用来 PCR 扩增 BVH-MC7 基因的方法与实施例 1 类似。同样利用这些寡核苷酸引物 PCR 扩增对照的大肠杆菌 DNA, 未检测到产物。

实施例 3

本实施例阐明在 CMV 质粒 pCMV-GH 中克隆粘膜炎症莫拉氏菌基因。

将粘膜炎症莫拉氏菌多肽 DNA 编码区插入质粒载体 pCMV-GH 中, 位于巨细胞病毒(CMV)启动子转录控制下的人生长激素(hGH)基因下游(Tang 等人, Nature, 1992,356:152)。该 CMV 启动子在大肠杆菌细胞

中是无功能质粒，但在将该质粒给予真核细胞后活化。该载体还引入了氨苄青霉素抗性基因。

从粘膜炎莫拉氏菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA) 扩增 BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1) 和 BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3) 基因无前导肽区的编码区，使用表 1 所示寡核苷酸引物，其中包含供加入限制性位点 BamHI (GGATCC)、BglII (AGATCT)、SalI (GTCGAC) 或 HindIII (AAGCTT) 的碱基突出端。使用 QIAGEN 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Chatsworth, CA)，从琼脂糖凝胶中纯化 PCR 产物，并用限制性内切酶 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfe, Canada) 消化。利用 BamHI、BglII、SalI 或 HindIII 消化 pCMV-GH 载体 (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)，并使用 QIAGEN 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Chatsworth, CA) 从琼脂糖凝胶中纯化。将消化的 DNA 片段连接到消化的 pCMV-GH 载体，产生位于 CMV 启动子控制下的 hGH-BVH-MC6 和 hGH-BVH-MC7 融合多肽。按照 Simanis 方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D. M. Glover (ed), 109-135 页)，将连接产物转化 大肠杆菌 株 DH5 α [$\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_K-m_K+) deoR thi-1 supE44 \lambda^- gyrA96 relA1$] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。使用 QIAGEN 试剂盒 (Chatsworth, CA) 纯化重组 pCMV 质粒，通过 DNA 测序证实 DNA 插入片段的核苷酸序列。

实施例 4

本实施例阐明 DNA 在激发对粘膜炎莫拉氏菌多肽抗原的免疫应答中的用途。

肌肉注射 100 μ l 的 50 μ g 表达粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)

的质粒 pCMV-GH-GM-CSF(Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) 和编码 BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1)、BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3)基因的 50 μ g 重组 pCMV-GH, 间隔 2 或 3 周, 进行 3 次, 免疫每组 8 只雌性 BALB/c 小鼠(Charles River, St-Constant, Québec, Canada)。给一组小鼠注射 50 μ g pCMV-GH-GM-CSF 和 50 μ g pCMV-GH, 作为对照。每次免疫之前以及第三次注射后七天, 从眼窝采集血样, 使用相应的 His-Tag 标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽作为包被抗原, 利用 ELISA 测定血清抗体反应。如实施例 5 所示制备并纯化这些 His 标签标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽。

实施例 5

本实施例阐明粘膜炎莫拉氏菌重组多肽的制备和纯化。

使用带有 BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1)和 BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3)基因的重组 pET21b(+)质粒, 电穿孔(Gene Pulser II 仪器, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada)转化大肠杆菌菌株 AD494 (DE3) [*Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR Δ malF3 F' [lac⁺ (lacI^q) pro] trxB :: Kan (DE3)*] (Novagen, Madison, WI)。在该大肠杆菌菌株中, 控制重组多肽表达的 T7 启动子由 T7 RNA 聚合酶(存在于 λ DE3 原噬菌体中)特异性识别, T7 RNA 聚合酶基因位于可由异丙基- β -d-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导的 lac 启动子控制之下。将 AD494(DE3)/rpET21b(+) 转化子在包含 100 μ g/ml 羧苄青霉素(Sigma-Aldrich, Canada Ltd., Oakville, Canada)的 LB 培养基中(蛋白胨 10 g/L、酵母抽提物 5 g/L、NaCl 10 g/L)、于 37°C、250 转/分振荡培养, 直至 A₆₀₀ 达到 0.5。为诱导 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽生成, 将细胞在终浓度 1 mM IPTG 存在下再培养 3 小时。离心沉淀 500 ml 培养物的诱导细胞, 冻于 -70°C。

根据 His•Tag 序列(6 个连续组氨酸残基)可结合固化于 His•Bind 金属螯合树脂的二价阳离子(Ni^{2+})的特性, 利用亲和层析从 IPTG 诱导的 AD494(DE3)/rpET21b(+)的可溶性细胞质组分中纯化该重组多肽。简言之, 从 IPTG 诱导的 500 mL 培养物中获得的沉淀细胞重悬于包含 1 mM PMSF 的裂解缓冲液(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM 咪唑, pH 7.9), 超声处理, 12,000 X g 离心 20 分钟, 去除碎片。将上清置于 Ni-NTA 琼脂糖柱(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada)。利用 250 mM 咪唑 - 500mM NaCl - 20 mM Tris pH 7.9 洗脱 His 标签标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽。通过对 PBS 4°C 透析, 从样品中去除盐和咪唑。利用 MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois)测定从大肠杆菌可溶组分中获得的重组多肽数量。

实施例 6

本实施例阐明该 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽与人腭扁桃体以及利用粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫后的小鼠血清的反应性。

如表 3 所示, 人腭扁桃体中的抗体可以在免疫印迹中识别 BVH-MC6 His 标签的重组多肽。表明与粘膜炎莫拉氏菌通常接触的人形成特异性针对这些多肽的抗体。这些特别的人类抗体可能与防护粘膜炎莫拉氏菌感染有关。此外, 免疫印迹还显示, 利用粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫小鼠的血清富含可在小鼠模型中诱导显著肺清除的膜蛋白质, 还形成可识别 BVH-MC7 His 标签的重组多肽的抗体。这些结果表明, 在保护小鼠抗感染的粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂中存在该蛋白质, 并可诱导与相应 BVH-MC7 His 标签的重组多肽反应的抗体。

表 3. 人腭扁桃体中的抗体以及利用粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫后的小鼠血清在免疫印迹中与粘膜炎莫拉氏菌 His 标签的融合重组多肽的反应性。

纯化的重组多肽 I.D. ¹	表观分子量 (kDa) ²	免疫印迹反应性	
		人腭扁桃体 ³	小鼠血清 ⁴
BVH-MC6	38	+	-
BVH-MC7	42	-	+

¹ 使用如实施例 5 所述制备并纯化的 His 标签的重组多肽进行免疫印迹。

² SDS-PAGE 之后估计 His 标签的重组多肽的分子量。

³ 为进行免疫印迹，不稀释人腭扁桃体的提取物。

⁴ 利用富含膜多肽的粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫后收集的小鼠血清合并，稀释 1/500，进行免疫印迹。这些小鼠可防止粘膜炎莫拉氏菌的攻击。

实施例 7

本实施例阐明 BVH-MC6 和 BVH-MC7 多肽可到达粘膜炎莫拉氏菌菌株的表面。

细菌在包含 0.25% 葡萄糖的脑心浸液(BHI)培养基中，于 37°C、8% CO₂ 环境下生长至 OD_{490nm} 为 0.650 (~ 10⁸ CFU/ml)。然后加入抗 BVH-MC6 或抗 BVH-MC7 或对照血清的稀释液，4°C 振摇温育 2 小时，使之与细胞结合。

样品用封闭缓冲液[包含 2% 牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)]洗涤 4 次，然后加入 1 ml 利用封闭缓冲液特定稀释的缀合荧光素(FITC)的山羊抗小鼠 IgG Fc (γ)片段。暗处振摇、室温再培养 60

分钟后,样品用封闭缓冲液洗涤4次,利用0.25%甲醛PBS缓冲液4℃固定18小时。细胞在PBS缓冲液中洗涤2次,重悬于0.5 ml PBS缓冲液中。细胞于4℃暗处保存,直至流式细胞术分析(Epics® XL; Beckman Coulter, Inc.)。流式细胞术分析表明, BVH-MC6 和 BVH-MC7 的特异性抗体可有效识别所检测的同源(ETSU C-2)粘膜炎莫拉氏菌菌株表面暴露的相应表位(表4)。已经确定,在所分析的10,000个莫拉氏菌细胞中,超过60%被BVH-MC6和BVH-MC7特异性血清中的抗体标记。此外,混合的BVH-MC6和BVH-MC7特异性血清中的抗体可附着于粘膜炎莫拉氏菌 ETSU 658 和 M-12 菌株表面(表4)。在后两种菌株各10,000个细胞中,还检测到多于90%的细胞可被特异性抗体标记。这些观察清楚表明, BVH-MC6 和 BVH-MC7 多肽可到达细胞表面,从而很容易被抗体识别。表明抗粘膜炎莫拉氏菌抗体在防止粘膜炎莫拉氏菌感染中具有重要作用。

表4. 评价 BVH-MC6 和 BVH-MC7 的特异性抗体附着于粘膜炎莫拉氏菌完整细胞的表面。

血清类别	菌株	荧光指数 ²	标记细胞的% ³
BVH-MC6 特异性血清混合物 ¹	ETSU C-2	17.1	78.6
	ETSU 658	23.9	93.6
	M-12	28.8	95.3
BVH-MC7 特异性血清混合物	ETSU C-2	14.1	63.8
	ETSU 658	16.9	91.3
	M-12	20.6	93.0
阴性对照血清混合物 ⁴	ETSU C-2	1	1
	ETSU 658	1	1
	M-12	1	11.3
阳性对照血清 ⁵	ETSU C-2	35.3	91.9
	ETSU 658	23.4	96.0
	M-12	16.5	84.0

¹ 小鼠皮下注射与 10 µg QuilA 佐剂(Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada)混合的 20 µg 纯化的重组多肽, 间隔 2 周, 注射 3 次。血清按 1/50 稀释。

² 将利用免疫血清标记细胞后获得的荧光中间值除以利用对照小鼠血清获得的荧光值, 计算荧光指数。荧光值为 1 表示在完整莫拉氏菌细胞表面未结合抗体。

³ 标记细胞占 10,000 个分析细胞的%

⁴ 合并从未免疫或伪免疫(sham-immunized)小鼠收集的血清, 1/50 稀释, 作为该分析的阴性对照。

⁵ 利用 20 µg 纯化的粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU-C2 外膜多肽免疫小鼠, 将获得的血清 1/1000 稀释, 用作该分析的阳性对照。

实施例 8

本实施例阐明抗 BVH-MC6 小鼠血清的杀菌活性。

将细菌接种于巧克力琼脂平板, 在 37°C、8% CO₂ 环境下培养 18 小时。细菌细胞然后重悬于溶菌缓冲液[10% Hanks' 平衡盐溶液(HBSS)和 1% 水解酪蛋白, pH 7.3], 至 OD_{490nm} 为 0.25, 稀释到 8 x 10⁴ CFU/ml。混合 25 µl 细菌悬液、50 µl 稀释的热灭活待检血清和 15 µl HBSS, 37°C、8% CO₂ 下振荡(200 转/分)温育 15 分钟, 进行杀菌分析。然后加入终浓度 10% 的含补体的兔血清, 混合物于 37°C、8% CO₂ 下再振荡(200

转/分)温育 60 分钟。温育结束后将 10 μ l 分析混合物接种巧克力琼脂平板, 测定活细菌数。将平板于 37°C、8% CO₂ 环境下温育 18-24 小时。利用热灭活的、免疫前收集的小鼠血清和兔补体温育细菌, 作为对照。使用粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 评价血清的杀菌活性。按下列数学式确定裂解%:

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A = 细菌与免疫血清温育时得到的 CFU

B = 由放血前的血清得到的 CFU

在利用纯化的重组 BVH-MC6 蛋白质免疫的 7 只小鼠的血清中发现杀菌性抗体(表 5)。对照小鼠的血清没有记录到杀菌活性(数据略)。

表 5. 评价抗 BVH-MC6 小鼠血清的杀菌活性。

血清类别 ¹	裂解%
S1 ²	97.2
S2	9.7
S3	99.1
S4	98.8
S5	82.9
S6	94.6
S7	93.2
S8	70.9
阳性对照血清	76.0

¹ 小鼠 S1-S8 皮下注射与 10 μ g QuilA 佐剂 (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada) 混合的 20 μ g 纯化的重组蛋白质, 间隔 2 周, 注射 5 次。

² 按 1/50 稀释 BVH-MC6 免疫小鼠的每份血清。

³ 将利用 20 μ g 纯化的外膜蛋白质免疫小鼠获得的血清按 1/50 稀

释，用作该分析的阳性对照。

实施例 9

本实施例阐明免疫诱导的对小鼠对粘膜炎莫拉氏菌感染的保护作用。

利用 10% QuilA 佐剂(Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada)和 20 µg 亲和纯化的 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽、或只用 QuilA 佐剂的 PBS 溶液作为对照，皮下免疫每组 10 只雌性 BALB/c 小鼠(Charles River)，免疫 3 次，间隔 2 周。在每次免疫前第 0、14 和 28 天、以及第三次注射 14 天以后(第 42 天)，从眼窝采集血样。一周以后，利用大约 1×10^5 CFU 的粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 肺内攻击小鼠。将粘膜炎莫拉氏菌攻击接种物接种于巧克力琼脂板块，以测定 CFU，确证攻击剂量。感染 5 小时以后，通过腹膜内注射戊巴比妥钠(EuthanylTM)处死小鼠。切下完整的肺，在组织匀浆器中匀浆。通过接种系列稀释的肺匀浆液，测定 CFU，评价其细菌清除作用。

实施例 10

本实施例阐明利用纯化的重组 BVH-MC6 免疫诱导的对小鼠对粘膜炎莫拉氏菌感染的保护作用。

利用 10% QuilA 佐剂(Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada)和 20 µg 亲和纯化的 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组 BVH-MC6 多肽、或单独 QuilA 佐剂的 PBS 溶液作为对照，皮下免疫每组 8 只雌性 BALB/c 小鼠(Charles River)，免疫 5 次，间隔 2 周。在每次免疫前第 0、14、28、42 和 56 天、以及第 5 次注射后 14 天(第 70 天)，从眼窝采集血样。一周以后，利用大约 9×10^5 CFU 的粘膜炎莫拉氏菌异种菌株 ETSU 658 肺内攻击小鼠。将粘膜炎莫拉氏菌攻击接种物接种于巧克力琼脂板块，以测定 CFU，确证攻击剂量。感染 5 小

时以后, 通过腹膜内注射戊巴比妥钠(Euthanyl™)处死小鼠。切下完整的肺, 在组织匀浆器中匀浆。通过接种系列稀释的肺匀浆液, 测定CFU, 评价其细菌清除作用。如表6所示, 从免疫小鼠中回收的细菌比平行攻击的对照组少60%。因此, 利用重组BVH-MC6多肽免疫可促进从小鼠肺中快速清除异种粘膜炎莫拉氏菌菌株。

表6. 利用纯化的重组BVH-MC6多肽免疫小鼠的肺部清除莫拉氏菌

从对照组回收的细菌 (肺匀浆物的CFU/ml) ^a	从BVH-MC6组回收的细菌 (肺匀浆物的CFU/ml) ^b	细菌清除 (%) ^c
$1.86 \times 10^5 \pm 1.01 \times 10^5$	$7.44 \times 10^4 \pm 2.17 \times 10^4$	60

^a 7只小鼠的平均值±标准差。

^b 8只小鼠的平均值±标准差。

^c 利用 9×10^5 CFU 的细菌肺内攻击小鼠, 攻击5小时后从肺中回收存活细菌。数字为免疫小鼠与对照相比, 清除细菌的百分比。

<110> Shire Biochem Inc.

<120> 粘膜炎莫拉氏菌（布兰汉氏菌属）抗原

<130> 74872-84

<150> US 60/298,403

<151> 2001-06-18

<150> US 60/330,095

<151> 2001-10-19

<160> 12

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1005

<212> DNA

<213> 粘膜炎莫拉氏菌(Moraxella catarrhalis)

<400> 1

```

atgacggccc ataaagatcg gtcaaccaac ctctcaaaaa tatgcttaaa acattgtttt      60
ttcacatcaa gtctcatcgc cacattggca atgggggttg cgatgagtgc ttgtagtgat      120
gaccgccc aaatcccctat aatcaaacct gctgatgatg gcatcatact taataaaagac      180
agcatcatga cegtcaagat gtccaaatat cagccaagtt ttgcctttga tggtaaaatt      240
atcccagcca atcagaccct attaaatctt gatactgctg tgatcgttga gcataatttt      300
gttgatgcag gtgatgaggt ttccaaaggc gatgcactac ttgggttattt caccatttta      360
gaatctttgc ccagcgaagt tactaccctg cctgcgccat ttgatggggt ggttcatcgt      420
gtctttgccc acacagatca gcactatgat gccaatacgc cattaattga gattcatgat      480
atttctcaat taaaattcat cagctatttg tcttctgcac tgatgaatga taccaaattg      540
ggcgatgcgg taacttttgg ggttgatggg attgctcatg ttggacagat tagccaagtg      600
aatgtcagtg aacaaaaccc caaactcatt gaagtaacatg tcatcatcga acccaatcct      660
gatgaaaagc ccaaagatct gcttggggcg cggtgtggttg ggcatattga ttatggacaa      720
atccaagttg gggtcatgat gccacgagc gctgtttatg acagcgattt gaatatctta      780
gcgttagatg gatttgataa gccaccacat aagccagatg ctccgattga tggctatggt      840
tggtgcgtaa aacaagacca ccgactgtcc ctgtcccctg taaaagtttt ggaataccat      900
cccaaaactc agcaattttt agtgcaagggt atcaccgaag acagtcttgt tgccacagtg      960
cccttaccaa aagacgcaca tgataagcca gtcaaagtat actaa      1005

```

<210> 2

<211> 334

<212> PRT

<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 2

```

Met Thr Ala His Lys Asp Arg Ser Thr Asn Leu Ser Lys Ile Cys Leu
1           5           10           15

Lys His Cys Phe Phe Thr Ser Ser Leu Ile Ala Thr Leu Ala Met Gly
20           25           30

Leu Ala Met Ser Ala Cys Ser Asp Asp Arg Pro Lys Ser Pro Ile Ile
35           40           45

Lys Pro Ala Asp Asp Gly Ile Ile Leu Asn Lys Asp Ser Ile Met Thr
50           55           60

```

Val Lys Met Ser Lys Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Phe Asp Gly Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Pro Ala Asn Gln Thr Leu Leu Asn Leu Asp Thr Ala Val Ile Val
 85 90 95
 Glu His Ile Phe Val Asp Ala Gly Asp Glu Val Ser Lys Gly Asp Ala
 100 105 110
 Leu Leu Gly Tyr Phe Thr His Leu Glu Ser Leu Pro Ser Glu Val Thr
 115 120 125
 Thr Leu Pro Ala Pro Phe Asp Gly Val Val His Arg Val Phe Ala His
 130 135 140
 Thr Asp Gln His Tyr Asp Ala Asn Thr Pro Leu Ile Glu Ile His Asp
 145 150 155 160
 Ile Ser Gln Leu Lys Phe Ile Ser Tyr Leu Ser Ser Ala Leu Met Asn
 165 170 175
 Asp Thr Lys Leu Gly Asp Ala Val Thr Phe Gly Val Asp Gly Ile Ala
 180 185 190
 His Val Gly Gln Ile Ser Gln Val Asn Val Ser Glu Gln Asn Pro Lys
 195 200 205
 Leu Ile Glu Val His Val Ile Ile Glu Pro Asn Pro Asp Glu Lys Pro
 210 215 220
 Lys Asp Leu Leu Gly Arg Arg Val Val Gly His Ile Asp Tyr Gly Gln
 225 230 235 240
 Ile Gln Val Gly Val Met Met Pro Ser Ser Ala Val Tyr Asp Ser Asp
 245 250 255
 Leu Asn Ile Leu Ala Leu Asp Gly Phe Asp Lys Pro Pro His Lys Pro
 260 265 270
 Asp Ala Pro Ile Asp Gly Tyr Val Trp Val Val Lys Gln Asp His Arg
 275 280 285
 Leu Ser Leu Ser Pro Val Lys Val Leu Glu Tyr His Pro Lys Thr Gln
 290 295 300
 Gln Phe Leu Val Gln Gly Ile Thr Glu Asp Ser Leu Val Ala Thr Val
 305 310 315 320
 Pro Leu Pro Lys Asp Ala His Asp Lys Pro Val Lys Val Tyr
 325 330

<210> 3
 <211> 1179
 <212> DNA
 <213> 粘膜炎症莫拉氏菌

<400> 3
 atgtatcagc gctttatcaa taccgcattg gttgcagctt tggcggtaac tatggcaggt 60
 tgtggcacca aagccatcaa gccaaccgaa cgcaagcctg ccaaattggt taatattcag 120
 acgccagtcg ctgtattaac acaggtatca agtatccgct tggatcaagg tcgatctggc 180
 ttttagtcgtc gtaataccaa cctaagaaag gatgttattg atttacaagt tgcaccgttg 240

```

gcagatggta tgattgcagc aagtcgcagt ggtatcgta gtggttacat gggatgaatcg 300
attgcttggc aatataatgc tgaagatgtg atcactggcg gtgtcgggtat tgatgatcaa 360
ggtagtggtg cggtcattgg tacgcgttca gggaaattaa ttgcattaga tgctcgacaca 420
gggtgcagcac gctgggtagt agaattggct tcttctagtt tggcaccagc attgattagt 480
gggtgataaag tgattgtcat cactaacagt ggtacgattt ttggattgga tattaatagt 540
gggtgcgacag tttggcagta tgcactcag gtaccaaata ccagtgtgcg tggatatggca 600
aagcctttgg cgcttgatgc tcgcacggta ttgattgggt gtgctgatgg gcgtattcat 660
gcactagata ccattgacagg tgcaccagtg tggactcgcc gtgtgggact ggcgatgggt 720
tctggagaaa ttgatcagct gcgtgatatt gatgggacac cgaccgtcgt agatcattat 780
ctatacgtcg ccagctacag cggacaatta gctggggttg atatgacaac agggcggtacc 840
atgtttgtca gcgagctatc tagcacaaa aagctgacca ctttggctga tgctgtcatc 900
ggtagtagca ctgatgggtga tgtgggtgcc ttttaaccgaa tgactggcga gaagctttgg 960
gaaaatcatg atctaaaata tcgtggattg accaatcctg caaccatcgg cacttatatt 1020
gctgttgggg atgcagatgg tgtggtacat attttaaate atcaaggta aattatcagc 1080
cgagccaata ccaaagggtg tttgaccaac ttaactgtga tcaataatcg cttatatgcc 1140
caatcagcag atggcggtgt gactgtttgg caattttaa 1179

```

<210> 4
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> 粘膜炎莫拉氏菌

```

<400> 4
Met Tyr Gln Arg Phe Ile Asn Thr Ala Leu Val Ala Ala Leu Ala Val
1 5 10 15

Thr Met Ala Gly Cys Gly Thr Lys Ala Ile Lys Pro Thr Glu Arg Lys
20 25 30

Pro Ala Lys Leu Val Asn Ile Gln Thr Pro Val Ala Val Leu Thr Gln
35 40 45

Val Ser Ser Ile Arg Leu Asp Gln Gly Arg Ser Gly Phe Ser Arg Arg
50 55 60

Asn Thr Asn Leu Arg Lys Asp Val Ile Asp Leu Gln Ile Ala Pro Leu
65 70 75 80

Ala Asp Gly Met Ile Ala Ala Ser Arg Ser Gly Ile Val Ser Gly Tyr
85 90 95

Met Gly Glu Ser Ile Ala Trp Gln Tyr Asn Ala Glu Asp Val Ile Thr
100 105 110

Gly Gly Val Gly Ile Asp Asp Gln Gly Ser Val Ala Val Ile Gly Thr
115 120 125

Arg Ser Gly Lys Leu Ile Ala Leu Asp Ala Arg Thr Gly Ala Ala Arg
130 135 140

Trp Val Val Glu Leu Ala Ser Ser Ser Leu Ala Pro Ala Leu Ile Ser
145 150 155 160

Gly Asp Lys Val Ile Val Ile Thr Asn Ser Gly Thr Ile Phe Gly Leu
165 170 175

Asp Ile Asn Ser Gly Ala Thr Val Trp Gln Tyr Ala Thr Gln Val Pro
180 185 190

Asn Thr Ser Val Arg Gly Met Ala Lys Pro Leu Ala Leu Asp Ala Arg
195 200 205

```

Thr Val Leu Ile Gly Gly Ala Asp Gly Arg Ile His Ala Leu Asp Thr
 210 215 220
 Met Thr Gly Ala Pro Val Trp Thr Arg Arg Val Gly Leu Ala Met Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Glu Ile Asp Gln Leu Arg Asp Ile Asp Gly Thr Pro Thr Val
 245 250 255
 Val Asp His Tyr Leu Tyr Ala Ala Ser Tyr Ser Gly Gln Leu Ala Gly
 260 265 270
 Phe Asp Met Thr Thr Gly Arg Thr Met Phe Val Ser Glu Leu Ser Ser
 275 280 285
 Thr Lys Lys Leu Thr Thr Leu Ala Asp Ala Val Ile Gly Ser Ser Thr
 290 295 300
 Asp Gly Asp Val Val Ala Phe Asn Arg Met Thr Gly Glu Lys Leu Trp
 305 310 315 320
 Glu Asn His Asp Leu Lys Tyr Arg Gly Leu Thr Asn Pro Ala Thr Ile
 325 330 335
 Gly Thr Tyr Ile Ala Val Gly Asp Ala Asp Gly Val Val His Ile Leu
 340 345 350
 Asn His Gln Gly Gln Ile Ile Ser Arg Ala Asn Thr Lys Gly Ala Leu
 355 360 365
 Thr Asn Leu Thr Val Ile Asn Asn Arg Leu Tyr Ala Gln Ser Ala Asp
 370 375 380
 Gly Val Val Thr Val Trp Gln Phe
 385 390

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 5
 taaggataca tatgacggcc cataaagatc g

31

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

<220>
 <223> 引物

<400> 6
 tatgctcgag gtatactttg actggcttat catgtg

36

<210>	7	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
	gagtgcggat cctgatgacc gcccaaaat	29
<210>	8	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
	tgtattaagc ttttagtata ctttgactgg cttatc	36
<210>	9	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	9	
	cggatattca tatgtatcag cgctttatca atac	34
<210>	10	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	10	
	atagatctcg agaaattgcc aaacagtcac a	31
<210>	11	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	11	
	actatgagat cttgggcacc aaagccatca agc	33
<210>	12	
<211>	36	

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 12

gattatgtcg acttaaaatt gccaaacagt cacaac

36

图1 (SEQ ID NO: 1)

```

1  ATGACGGCCC ATAAAGATCG GTCAACCAAC CTCTCAAAAA TATGCTTAAA
51  ACATTGTTT TTACATCAA GTCTCATCGC CACATTGGCA ATGGGGTTGG
101 CGATGAGTGC TTGTAGTGAT GACCGCCCAA AATCCCCTAT AATCAAACCT
151 GCTGATGATG GCATCATACT TAATAAAGAC AGCATCATGA CCGTCAAGAT
201 GTCCAAATAT CAGCCAAGTT TTGCCTTTGA TGGTAAAATT ATCCAGCCA
251 ATCAGACCCCT ATTAAATCTT GATACTGCTG TGATCGTTGA GCATATTTTT
301 GTTGATGCAG GTGATGAGGT TTCCAAAGGC GATGCACTAC TTGGTTATTT
351 CACCCATTTA GAATCTTTGC CCAGCGAAGT TACTACCCTG CCTGCGCCAT
401 TTGATGGGGT GGTTCATCGT GTCTTTGCCC ACACAGATCA GCACTATGAT
451 GCCAATACGC CATTAATGA GATTCATGAT ATTTCTCAAT TAAATTCAT
501 CAGCTATTTG TCTTCTGCAC TGATGAATGA TACCAAATTG GCGGATGCGG
551 TAACTTTTGG GGTGATGGT ATTGCTCATG TTGGACAGAT TAGCCAAGTG
601 AATGTCAGTG AACAAAACCC CAAACTCATT GAAGTACATG TCATCATCGA
651 ACCCAATCCT GATGAAAAGC CCAAAGATCT GCTTGGGCGG CGTGTGGTTG
701 GGCATATTGA TTATGGACAA ATCCAAGTTG GGGTCATGAT GCCCAGCAGC
751 GCTGTTTATG ACAGCGATTT GAATATCTTA GCGTTAGATG GATTTGATAA
801 GCCACCACAT AAGCCAGATG CTCCGATTGA TGGCTATGTT TGGGTCGTAA
851 AACAAAGACCA CCGACTGTCC CTGTCCCCTG TAAAAGTTTT GGAATACCAT
901 CCCAAAACCTC AGCAATTTTT AGTGCAAGGT ATCACCGAAG ACAGTCTTGT
951 TGCCACAGTG CCCTTACCAA AAGACGCACA TGATAAGCCA GTCAAAGTAT
1001 ACTAA

```

图2 (SEQ ID NO: 2)

```

1  MTAHKDRSTN LSKICLKHCF FTSSLIATLA MGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51  ADDGIILNKD SIMTVKMSKY QPSFAFDGKI IPANQTLNL DTAVIVEHIF
101 VDAGDEVSKG DALLGYFTHL ESLPSEVTTL PAPFDGVVHR VFAHTDQHYD
151 ANTPLIEIHD ISQLKFISYL SSALMNDTKL GDAVTFGVGD IAHVGQISQV
201 NVSEQNPCLI EVHVIEPNP DEKPKDLLGR RVVGHIDYGQ IQVGVMMPSS
251 AVYDSDLNIL ALDGFDPKPPH KPDAPIDGYV WVKQDHRLS LSPVKVLEYH
301 PKTQQFLVQG ITEDSLVATV PLPKDAHDKP VKVY*

```

图3 (SEQ ID NO: 3)

```

1  ATGTATCAGC GCTTTATCAA TACCGCATTG GTTGCAGCTT TGGCGGTAAC
51  TATGGCAGGT TGTGGCACCA AAGCCATCAA GCCAACCGAA CGCAAGCCTG
101 CCAAATTGGT TAATATTTCAG ACGCCAGTCG CTGTATTAAC ACAGGTATCA
151 AGTATCCGCT TGGATCAAGG TCGATCTGGC TTTAGTCGTC GTAATACCAA
201 CCTAAGAAAG GATGTTATTG ATTTACAAAT TGCACCGTTG GCAGATGGTA
251 TGATTGCAGC AAGTCGCAGT GGTATCGTCA GTGGTTACAT GGGTGAATCG
301 ATTGCTTGGC AATATAATGC TGAAGATGTG ATCACTGGCG GTGTCGGTAT
351 TGATGATCAA GGTAGTGTGG CGGTCATTGG TACGCGTTCA GGGAAATTAA
401 TTGCATTAGA TGCTCGCACA GGTGCAGCAC GCTGGGTAGT AGAATTGGCT
451 TCTTCTAGTT TGGCACCAGC ATTGATTAGT GGTGATAAAG TGATTGTCAT
501 CACTAACAGT GGTACGATTT TTGGATTGGA TATTAATAGT GGTGCGACAG
551 TTTGGCAGTA TGCCACTCAG GTACCAAATA CCAGTGTGCG TGGTATGGCA
601 AAGCCTTTGG CGCTTGATGC TCGCACGGTA TTGATTGGTG GTGCTGATGG
651 GCGTATTCAT GCACTAGATA CCATGACAGG TGCACCAAGT TGGACTCGCC
701 GTGTGGGACT GCGGATGGGT TCTGGAGAAA TTGATCAGCT GCGTGATATT
751 GATGGGACAC CGACCGTCGT AGATCATTAT CTATACGCTG CCAGCTACAG
801 CGGACAATTA GCTGGGTTTG ATATGACAAC AGGGCGTACC ATGTTTGTCA
851 GCGAGCTATC TAGCACCAA AAGCTGACCA CTTTGGCTGA TGCTGTCATC
901 GGTAGTAGCA CTGATGGTGA TGTGGTTGCC TTTAACCGAA TGACTGGCGA
951 GAAGCTTTGG GAAAATCATG ATCTAAAATA TCGTGGATTG ACCAATCCTG
1001 CAACCATCGG CACTTATATT GCTGTTGGGG ATGCAGATGG TGTGGTACAT
1051 ATTTTAAATC ATCAAGGTCA AATTATCAGC CGAGCCAATA CCAAGGTGC
1101 TTTGACCAAC TTAACGTGTA TCAATAATCG CTTATATGCC CAATCACAG
1151 ATGGCGTTGT GACTGTTTGG CAATTTTAA

```

图4 (SEQ ID NO: 4)

```

1  MYQRFINTAL VAALAVTMAG CGTKAIKPTE RKPAKLVNIQ TPVAVLTQVS
51  SIRLDQGRSG FSRRTNLRK DVIDLQIAPL ADGMIAASRS GIVSGYMGES
101 IAWQYNAEDV ITGGVGIDDQ GSAVAVIGTRS GKLIALDART GAARWVVELA
151 SSSLAPALIS GDKVIVITNS GTIFGLDINS GATVWQYATQ VPNTSVRGMA
201 KPLALDARTV LIGGADGRIH ALDTMTGAPV WTRRVGLAMG SGEIDQLRDI
251 DGTPTVVVDHY LYAASYSQQL AGFDMTTGRT MFVSELSSTK KLTTLADAVI
301 GSSTDGDVVA FNRMTGEKLW ENHDLKYRGL TNPATIGTYI AVGDADGVVH
351 ILNHQGOIIS RANTKGALTN LTVINNRLYA QSADGVVTWV QF*

```

专利名称(译)	粘膜炎症莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)抗原		
公开(公告)号	CN1582336A	公开(公告)日	2005-02-16
申请号	CN02812216.X	申请日	2002-06-18
[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哈枚尔 BR布罗德德尔 S利欧克斯 G莱布兰克 J科特尔特		
发明人	D·马丁 J·哈枚尔 B·R·布罗德德尔 S·利欧克斯 G·莱布兰克 J·科特尔特		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/21 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12N15/74 C12P21/02 G01N33/569 C12N15/63		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K14/212 A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P27/02 A61P27/16		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	60/298403 2001-06-18 US 60/330095 2001-10-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
本发明涉及可用于预防、诊断的和/或治疗目的的粘膜炎症莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)多肽。

(SEQ ID NO: 2)

```

1  MTAKKDRSTN LSKICLWHP P2SSLIATLA WGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51  ADDGILWKO SIMTVKMSKY QPSFAFDGKI IPANQTLNL DTAVIVEHIF
101 VDAGDEVSKO DALLGYTHL ESLPSEVTTL PAPFDGVVHR VFAHTDQHYD
151 ANTEFLIEINQ ISQLFI1SYL SSALMNDTKL GDAVTFQVVG IAHVGQISQV
201 NVSEQNPKLI EVHV1IEPNP DEKPKDLGR RVVGMDVVGQ IQVGWNPSS
251 AVYDSOLNLL ALDGFDPKPPH KFDAPIDGTV WVKQDHRIS LSPVKVLEYH
301 PKTQOFLVQG ITEDSLVATV PLPKDANCKP VKVY1

```