

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/195

A61K 39/02

//C12R1 : 42, C12R1 : 19



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03808686.7

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1646560A

[22] 申请日 2003.2.13 [21] 申请号 03808686.7

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 20 [33] DE [31] 10208175.1

[86] 国际申请 PCT/DE2003/000469 2003. 2. 13

[87] 国际公布 WO2003/070987 德 2003. 8. 28

[85] 进入国家阶段日期 2004. 10. 18

[71] 申请人 乌尔夫·R·拉普

地址 德国乌兹伯格

[72] 发明人 W·格贝尔 I·根特谢夫

S·斯普伦

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

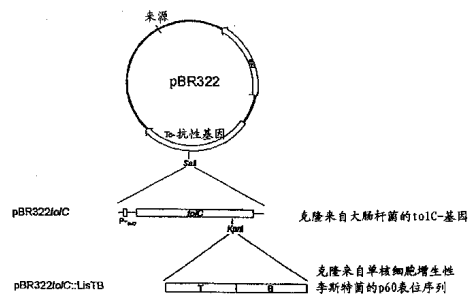
代理人 温宏艳 徐雁漪

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称 编码 To1C 和确定的氨基酸序列的核苷酸序列

[57] 摘要

本发明涉及编码 To1C 和确定的氨基酸序列的核苷酸序列, 该确定的氨基酸序列插在允许的 To1C 的膜外区域, 本发明还涉及该核苷酸序列的多种应用, 特别是含有这种核苷酸序列的细菌。



1. 编码 TolC 和确定的氨基酸序列的核苷酸序列，其中该确定的氨基酸序列插在允许的 TolC 的膜外区域中。

2. 根据权利要求 1 的核苷酸序列，其中 TolC 是按照 ACCESSION X54049 的蛋白或者优选其 N-末端部分序列或者该蛋白或部分序列的突变体，且其中对于该 N-末端部分序列或突变体保持转运功能。

3. 根据权利要求 1 或 2 的核苷酸序列，其中该确定的氨基酸序列插在间隔序列的单侧或双侧。

4. 根据权利要求 1 至 3 之一的核苷酸序列，其中该确定的氨基酸序列插在 TolC 的 N-末端区域，特别在氨基酸 52 至 61 和/或 257 至 279 (各自与 TolC 蛋白有关) 区域。

5. 质粒，其含有根据权利要求 1-4 之一的核苷酸序列。

6. 蛋白或肽，其根据权利要求 1-4 之一的核苷酸序列编码。

7. 包含根据权利要求 1-4 之一的核苷酸序列的细菌，其中 TolC 引起细菌膜上确定的氨基酸序列的转运。

8. 根据权利要求 7 的细菌，其中该确定的氨基酸序列表示肽、蛋白、活性物质、抗原、抗体或配体。

9. 根据权利要求 7 或 8 之一的细菌，其选自“沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、志贺菌 (*Shigella* spp.) 和耶尔森菌 (*Yersinia* spp.)”。

10. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 7-9 之一的细菌和任选的至少一种生理学上可接受的载体物质，其中所述的确定的氨基酸序列是按照在生物体内欲结合的给定物质进行选择的。

11. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 7-9 之一的细菌和任选的至少一种生理学上可接受的载体物质，其中该确定的氨基酸序列是免疫序列。

12. 包含根据权利要求 7-9 之一的细菌的诊断试剂盒，其中该确定的氨基酸序列与待测定的标记物特异性结合。

13. 包含根据权利要求 7-9 之一的细菌的制备性结合物质，其中该确定的氨基酸序列与从溶液中分离的靶物质特异性结合。

编码 TolC 和确定的氨基酸序列的核苷酸序列

发明领域

- 5 本发明涉及一种编码 TolC 的核苷酸序列、一种包含这种核苷酸序列的质粒，一种由这种核苷酸序列编码的蛋白或肽，一种包含这种核苷酸序列的细菌以及这种细菌的多种应用。

背景技术和现有技术

- 10 在病毒力减毒中，细胞内繁殖的细菌可以作为活疫苗诱导持久的免疫。迄今已具体将伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhi*) TY1a (Levine 等人, *Lancet* 1: 1049-1052, 1987)、分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) BCG (Fine 和 Rodrigues, *Lancet* 335: 1016-1020, 1990) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) (Levine and Kaper, *Vaccine* 11 :
15 207-212, 1993) 用作活疫苗。

- 例如已将单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*) 和寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhi*) 以及 BCG 类的变体用作良好的易消化抗斑疹伤寒和结核病的活疫苗。这些细菌，包括其弱
20 化的突变体是一般性免疫刺激，可以引起良好的细胞免疫应答并且本身可用作疫苗载体。

- 这些细菌作为疫苗载体的优点是，它们首先诱导所谓的 Th1 免疫应答 (Hess and Kaufmann, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23: 165-173, 1999)。这些免疫应答的特征是细胞毒性淋巴细胞 (CTL) 以及
25 特定的 IFN- γ 分泌性 CD4+ T-细胞 (即 T-辅助细胞, Th) 的存在，出自 (Abbas 等人, *Nature* 383: 787-793, 1996)。

- 例如单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 特定程度地刺激 TH1 细胞的活化和细胞毒性 T-淋巴细胞 (CTL) 的增殖。这些细菌提供分泌的抗原，后者直接进入提供抗原的细胞的胞质中 (APC; 巨噬
30 细胞和树状细胞)，这些细胞本身抑制共同刺激的分子并导致有效刺激 T 细胞。李斯特菌部分降低噬菌体相容性，因此由这些载体细菌产生的抗原一方面可以在 MHC 类 II 分子中呈递并由此诱导 T-辅助细胞。另一

方面李斯特菌从噬菌体内释放出后在 APCs 的胞质溶胶中复制；因而由这些细菌产生和分泌的抗原优选经 MHC 类 I 途径呈递，因此将诱导抗这些抗原的 CTL 应答。此外可以表明，通过李斯特菌与巨噬细胞、自然杀伤细胞 (NK) 和嗜中性粒细胞之间的相互作用诱导这些细胞因子的表达 (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-12; Unanue, Curr. Opin. Immunol., 9: 35-43, 1997; Mata and Paterson, J Immunol. 163: 1449-14456, 1999), 由此表明抗肿瘤效果。

因此，重组细菌能够保护抗异源肿瘤 (Medina 等人, Eur. J. Immunol. 29: 693-699, 1999; Pan 等人, Cancer Res. 59: 5264-5269, 1999; Woodlock 等人., J Immunother. 22: 251-259, 1999; Paglia 等人, Blood 92: 3172-3176, 1998; Paglia 等人, Eur. J. Immunol. 27: 1570-1575, 1997; Pan 等人, Nat. Med. 1: 471-477, 1995; Pan 等人, Cancer Res. 55: 4776-4779, 1995)。

因此通过提供转导表达肿瘤抗原的单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*), 可以抗原特异性地抑制实验性肿瘤的生长 (Pan 等人, Nat. Med. 1: 471-477, 1995; Cancer Res. 59: 5264-5269, 1999; Voest 等人, Natl. Cancer Inst. 87: 581-586, 1995; Beatty and Paterson, J. Immunol. 165: 5502-5508, 2000)。

已引入编码肿瘤抗原的核苷酸序列的病毒减毒的肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 在口服后可以作为抑制肿瘤抗原的细菌载体导致针对不同的实验肿瘤的特异性保护作用 (Medina 等人, Eur. J. Immunol. 30: 768-777, 2000; Zoller und Christ J. Immunol. 166: 3440-34450, 2001; Xiang 等人, PNAS 97: 5492-5497, 2000)。

重组沙门氏菌也有效地作为抗病毒感染 (HPV; Benyacoub 等人, Infect. Immun. 67: 3674-3679, 1999) 的预防疫苗并用于治疗固定肿瘤病毒 (HPV) 的小鼠肿瘤 (Revaz 等人, Virology 279: 354-360, 2001)。

为用作疫苗载体，提出以下方法：通过在这些细菌的细胞膜上往细菌内引入核酸序列来抑制表达产物或者通过这些细菌来分泌表达产物。这些方法的基础是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 溶血素系统 HlyAs, 它产生来自革兰氏阴性菌的 I 型分泌系统的原型。借助 HlyAs 产生分泌载体，从而可以有效地将肠道沙门氏菌 (*Salmonella*

enterica)、小肠结肠炎耶氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 内的蛋白抗原带出。这样的分泌载体包含在 HlyA-信号肽、溶血素分泌器、hlyB 和 hlyD 以及 hly 特异性启动子的核苷酸序列上偶联的任何蛋白抗原的 cDNA。例如借助这些分泌载体可以抑制这些细菌表面的蛋白。这种基因修饰的细菌作为疫苗比通过引入核酸而受抑制的蛋白保持其细胞系的细菌更好地诱导免疫保护作用的提高 (Donner 等人, EP 1015023 A ; Gentshev 等人, Gene 179: 133-140, 1996; Vaccine 19: 2621-2618, 2001; Hess 等人 PNAS 93: 1458-1463, 1996)。但是, 此系统的缺点是通过使用 Hly-特异性启动子由细菌抑制的蛋白的数量小。

例如, 细菌中的其它转运系统是: i) 新月形柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 的 S-层蛋白 (Rsa A) 的转运信号, 其一对于分泌和膜结合性表达—使用 C-末端 RsaA-转运信号 (Umelo-Njaka 等人, Vaccine 19: 1406-1415, 2001) 和 ii) 单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的 Internalin A 的转运信号。分泌需要 N-末端转运信号, 而膜结合性表达需要 N-末端转运信号和包含负责细胞壁固定的 LPXTG-基元的 C-末端部分 (Dhar 等人, Biochemistry 39: 3725-3733, 2000)。

其它相关的是得自大肠杆菌 (*E. coli*) 的完整膜蛋白 TolC 是已知的。这是一种大肠杆菌 (*E. coli*) 外膜的多功能、成孔蛋白, 例如其功能除了近似大肠杆菌素 E1 的吸收 (Morona 等人, J. Bacteriol. 153: 693-699, 1983) 和大肠杆菌素 V 的分泌 (Fath 等人, J. Bacteriol. 173: 7549-7556, 1991), 还用作 U3 噬菌体的受体 (Austin 等人, J. Bacteriol. 172: 5312-5325, 1990)。这些蛋白不仅见于大肠杆菌 (*E. coli*), 还见于多数革兰氏阴性菌 (Wiener, Structure Fold. Des., 8: 171-5, 2000)。

TolC 蛋白的结晶结构表明, 它作为均三聚体形成长度为大约 120 埃的隧道, 均二聚体的最大部分, 隧道区位于周质, 且在细菌表面上仅有二个小环 (氨基酸 52-61 和 257-279) (Koronakis 等人, Nature 405: 914-919, 2000)。Niki 等人, Nucleotide sequence of the tolC gene of *Escherichia coli*, Nucleic Acids Res. 18 (18), 5547 (1990) 公开了, tolC 基因具有该核苷酸序列。TolC 是来自至少四个不

同细菌输出系统的部分，借此它形成膜隧道，通过膜隧道可以输出细菌蛋白。例如在该 HlyA 转运系统中，HlyD 和 TolC 周质末端之间的连接允许将来自 HlyD 的溶血素在 TolC 膜隧道中输出 (Gentschev 等人, Trends in Microbiology 10: 39-45, 2002)。

5

发明内容

本发明技术问题

本发明基于描述转运系统的技术目的，借助于该转运系统可以提供在外部细胞膜上具有较高效力的表达产物。

10

本发明的基本概念和优选的实施方式

为达到这个技术目的，本发明教导一种编码 TolC 和确定的氨基酸序列的核苷酸序列，其中该确定的氨基酸序列插在允许的 TolC 的膜外区域。

15

利用本发明产生一种新的革兰氏阴性菌的转运系统，与现有技术的转运系统相比，借助它可以更大量的通过细菌内的基因抑制的蛋白转运到细菌外部细胞膜上。令人惊奇的是，与现有技术的转运系统相比，大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 TolC-蛋白的转运系统允许强大得多的 (任意的) 肽或蛋白的膜永久性表达，并且这是对于大量的革兰氏阴性细菌。因而仅通过 TolC 完成该确定的氨基酸序列或基因产物的膜永久性表达。

20

确定的氨基酸序列可以是任何给定的肽或蛋白、任何药理学活性物质、任何抗原、任何抗体或任何配体。

25

TolC 可以是根据用于清楚指示出处的 ACCESSION X54049 的 (野生型) TolC 蛋白，或者其 (优选 N-末端) 部分序列或该蛋白的突变体或部分序列，其中对于该部分序列或突变体，保持转运功能。N-末端部分序列在此称为起始于 TolC 蛋白的 N-末端区域氨基酸 1-50 并终止于环的 C-末端的任何部分序列，其处在细菌表面。因此优选 TolC 的 N-末端转运信号和蛋白的中心部分，它形成 TolC 的细胞外区域。突变体可以包括插入、缺失或取代，只要它的转运功能没有因此明显降低。

30

对于特定的应用情况，建议确定的氨基酸序列插在间隔序列的单侧或双侧。但是仅当在特定的空间结构中提供确定的氨基酸序列时才是

有益的，例如在抗原的情况下，然而这通过确定的氨基酸序列本身则在理想程度上并不产生，由于空间或构象的原因。因此尤其可以通过天然地连接于该确定的氨基酸序列之后的序列构建间隔序列，由此使确定的氨基酸序列如同天然抗原一样折叠。然而间隔序列也可以是人造的，只要借此得到期望的确定氨基酸序列的呈递和/或折叠。这利用理论方法并考虑 TolC 的插入位置的空间状况很容易计算。

详细地讲，特别优选确定的氨基酸序列具体插在 TolC 的 N-末端区域，特别是氨基酸 52-61 和/或 257-279 (各自指 TolC 蛋白) 区域。

此外，本发明的主题是包含本发明的核苷酸序列的质粒和由本发明的核苷酸序列编码的蛋白或肽。

此外，本发明教导包含本发明的核苷酸序列的细菌，其中 TolC 导致确定的氨基酸序列转运到细菌膜上。换句话说，TolC 蛋白导致在细菌内发生基因产物的膜永久性表达。因此本发明的主题还是一种革兰氏阴性菌，它包含至少一个核苷酸序列，该序列编码至少一个确定的氨基酸序列，并编码至少一种大肠杆菌 (*E. coli*) TolC-基因产物。此大肠杆菌 (*E. coli*) TolC-基因产物优选野生型。本发明的主题还是突变大肠杆菌 (*E. coli*) TolC 基因产物，其中保持了转运信号活性。优选细菌选自下列：“沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、志贺菌 (*Shigella* spp.) 和耶尔森菌 (*Yersinia* spp.)”。

本发明的核苷酸序列和细菌可以于各种应用。例如，本发明还教导一种包含本发明的细菌和任选的至少一种生理学上可接受的载体物质的药物组合物，其中该确定的氨基酸序列按照在生物体内结合的给定的物质进行选择。通过这种药物组合物，可以结合并因此抑制干扰正常细胞代谢的物质，例如外源毒物或突变引起的内源物质，如 (Octagons)。此外，通过结合某种细胞靶物质，可以经过除去正常的复合体参与者或者由于病理状态而正调节的复合体参与者来调节代谢过程。因此，例如通过抑制确定的联系来负调节与其相关的穿梭。此方法又可以用于正调节其它相关方法。据此而言，该确定的氨基酸序列只需要根据欲被高度特异性抑制的靶分子来选择。因此这种药物组合物最终用于治疗目的。

对于接种目的来说适合的药物组合物包含本发明的细菌和任选的至少一种生理学上可接受的载体物质，其中该确定的氨基酸序列是一种免疫序列。免疫序列在生物体内刺激抗天然抗原的抗体的产生，它作为部分序列包含免疫序列或由免疫序列组成。

5 为诊断目的，本发明教导一种包含权利要求 7-9 之一的细菌的诊断试剂盒，其中该确定的氨基酸序列特异性地结合待测定的标记物。如果，例如，从生物体取组织或液体试样，并在必要时在进行分离不期望的试样组分的预处理之后，将这些试样与细菌一起培养，以可以检测在确定的氨基酸序列的结合事件，并且就结合事件的情况，检测
10 到与确定的氨基酸序列特异性结合的物质包含在试样中。因此结合事件的检测可以是各种本领域普通技术人员公知的方法。

最后，本发明教导一种包含本发明细菌的制备性结合物质，其中该确定的氨基酸序列与从溶液中分离的靶物质特异性结合。借助这种结合物，不希望的物质可以一方面具体地从溶液中除去，这是通过使
15 溶液与细菌一起培养，并在分离之后除去细菌进行的。另一方面可以以相应的方式完成分离或者富集靶物质，即培养之后从细菌中洗脱出靶物质。为此，本发明也可用于分离和/或富集抗原、抗体、肽、蛋白或配体。

20 附图说明

图 1: 来源 pBR322;

Tc 抗性基因;

克隆来自大肠杆菌的 *tolC* 基因;

克隆来自单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*)

25 的 p60 表位序列。

具体实施方式

实施例

实施例 1 : TolC 载体的构建

30 来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的 *tolC* 基因，包括它们的野生型启动子，通过 PCR (1 分 94°C, 1 分 66°C, 1 分 30 s 72°C) 用来自质粒 pAX629 (*C. Wandersman*, Institute Pasteur, Paris) 寡核苷酸 5'TolC (5'-

TAACGCCCTATGTCGACTAACGCCAACCTT-3) 和 3'To1C (5-AGAG-GATGTCGACTCGAAATTGAAGCGAGA-3') 扩增。由此在两端引入附加的 Sa1I-界面。用限制内切核酸酶 Sa1I 消化纯化的 PCR 产物 (QIA 快速 PCR 纯化试剂盒-Qiagen, Hilden, Germany) 并克隆到用 Sa1I-事先分离的载体 pBR322 中。如此构建的载体称为 pBR322to1C。然后在更多相关的试验中研究克隆的 to1C 基因的功能。

实施例 2: 在 To1C 蛋白序列中插入抗原序列

在编码细胞外环之一的 to1C-序列中, 确定一种 KpnI-界面。这用于克隆单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的 p60-蛋白的抗原性肽序列 (iap 基因), 并允许在成熟 To1C-蛋白的氨基酸 271 之后插入外来抗原。

编码 p60-蛋白的 B-细胞表位 (氨基酸 291-301) 和 CD4-限制 T-细胞表位 (氨基酸 301-312) 的 iap-序列作为 KpnI 片断被克隆到事先除去 KpnI 的载体 pBR322to1C 中 (图 1)。将如此形成的质粒称为 pBR322to1C: :LisTB。

图 1 表示在载体 pBR322 上向野生型、质粒编码的大肠杆菌 (*E. coli*) to1C 基因中插入 p60-特异性表位序列的克隆策略。它们是: bla-氨苄青霉素抗性基因; Tc-四环素; T-单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) p60-T-细胞表位 (AS 301-312); B-单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) p60 B 细胞表位 (AS 291-301); Pto1C-野生型大肠杆菌 (*E. coli*) to1C-启动子。

实施例 3: 在革兰氏阴性菌 (大肠杆菌 (*Escherichia coli*)) 膜上表达抗原

用 Western 印迹法检测 To1C-蛋白内来自单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 的 p60-蛋白的表位的表达。为此, 来自大肠杆菌 (*E. coli*) CC118to1C、大肠杆菌 (*E. coli*) CC118to1C/pBR322to1C 和大肠杆菌 (*E. coli*) CC118to1C/pBR322to1C: :LisTB 的细胞裂解物蛋白在随后的对数期分离。该应用的完全细胞蛋白相当于大约 100 百万个细菌。在 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中分离蛋白, 并检测嵌合体 To1C-蛋白的表达或插入表位的表达, 一方面, 用抗 To1C-蛋白的多克

隆血清和另一方面用单克隆抗体 K317 (Rowan 等人, J. Clin. Microbiol. 38: 2643-2648, 2000), 后者特异性地直接对抗来自单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 的 B-细胞表位 (图 2B)。

正如可以预期的那样, 在大肠杆菌 (*E. coli*) CC118tolC 的细胞裂解物中不能检测到 TolC-蛋白, 这可归因于此菌株中染色体 tolC 基因的突变 (Schlor 等人, Mol. Gen. Genet. 256: 306-319, 1997)。pBR322tolC 的互补导致这些菌株中发生 52 kDa 大 TolC-蛋白表达。TolC-蛋白中单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 表位的插入不影响 TolC 的表达, 并导致大约 3kDa 的嵌合体蛋白大小的轻微修饰。

大肠杆菌 (*E. coli*) CC118tolC/pBR322tolC::ListB 上的 p60-特异性表位的表达可以用单克隆 p60-抗体 K317 证明。

实施例 4: 检测单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) p60-表位在肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) SM6T (tolC) 中的暴露定位

由于 TolC 细胞外环中的二个李斯特菌 p60 表位插在成熟蛋白的氨基酸 271 之后, 因此它应以暴露的方式存在于肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T 的表面 (Stone 等人, Mol. Microbiol. 17: 701-712, 1995)。肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T 中该 p60-特异性表位的确定的细胞外定位通过间接免疫荧光法检查。将各 25 μ l 的肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T/pBR322tolC 和肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) SM6T/pBR322tolC::ListB 的过夜培养物滴到目标载体上并风干。单克隆 p60-抗体 K317 (1:200) 将细胞着色, 然后检测与 FITC 标记的第二抗小鼠血清结合的结合抗体 (Dianova, Germany, Arbeitstitel: 1:40)。

荧光显微镜分析证实单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 特异性表位在菌株肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T/pBR322tolC::ListB 的细胞外定位。

实施例 5: 用革兰氏阴性菌进行免疫试验并在用野生型单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 感染之后分析保护性免疫应答

为了确定在小鼠的李斯特菌病模型中，单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 是否导致来自 p60-蛋白的 T-细胞表位的显露表达而导致的保护作用，通过口服剂量为 1×10^7 的肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T/pBR322tolC::*ListB* 使 8 只六周龄的雌性 Balb/c-小鼠 (Charles River, Sulzfeld, Germany) 免疫。为进行对照，通过口服肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T 使 5 只雌性小鼠免疫。3 周后用相同的细菌剂量使动物第二次免疫。

在第一次免疫后 5 周用免疫印迹检查免疫结果，在其上应用来自单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的上清液蛋白。由此可以检测在用肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T/pBR322tolC::*ListB* 免疫的小鼠血清中的抗 p60 特异性抗体。

在第二次免疫后 3 周，用 5×10^4 个单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) EGD, 5 折叠的 LD_{50} 静脉内感染动物。在此期间在用单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) EGD 静脉内感染后，用肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) SM6T/pBR322tolC::*ListB* 免疫的 Balb/c-小鼠的存活率计为 88%，比对照组存活率仅低 20%。

这样在减毒肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) 载体菌株 SM6T 中的 TolC 的细胞外环内的 p60-特异性表位的表达导致诱导单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)-特异性免疫应答，它能用于保护 Balb/c 小鼠对抗通常致命的感染。因此可以用 Western 印迹法检测来自 p60 蛋白的抗 B-细胞表位的抗体的诱导作用。显然，抗体参与的免疫反应已导致了这里观察到的使小鼠免于单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 的其它致命感染的保护作用。

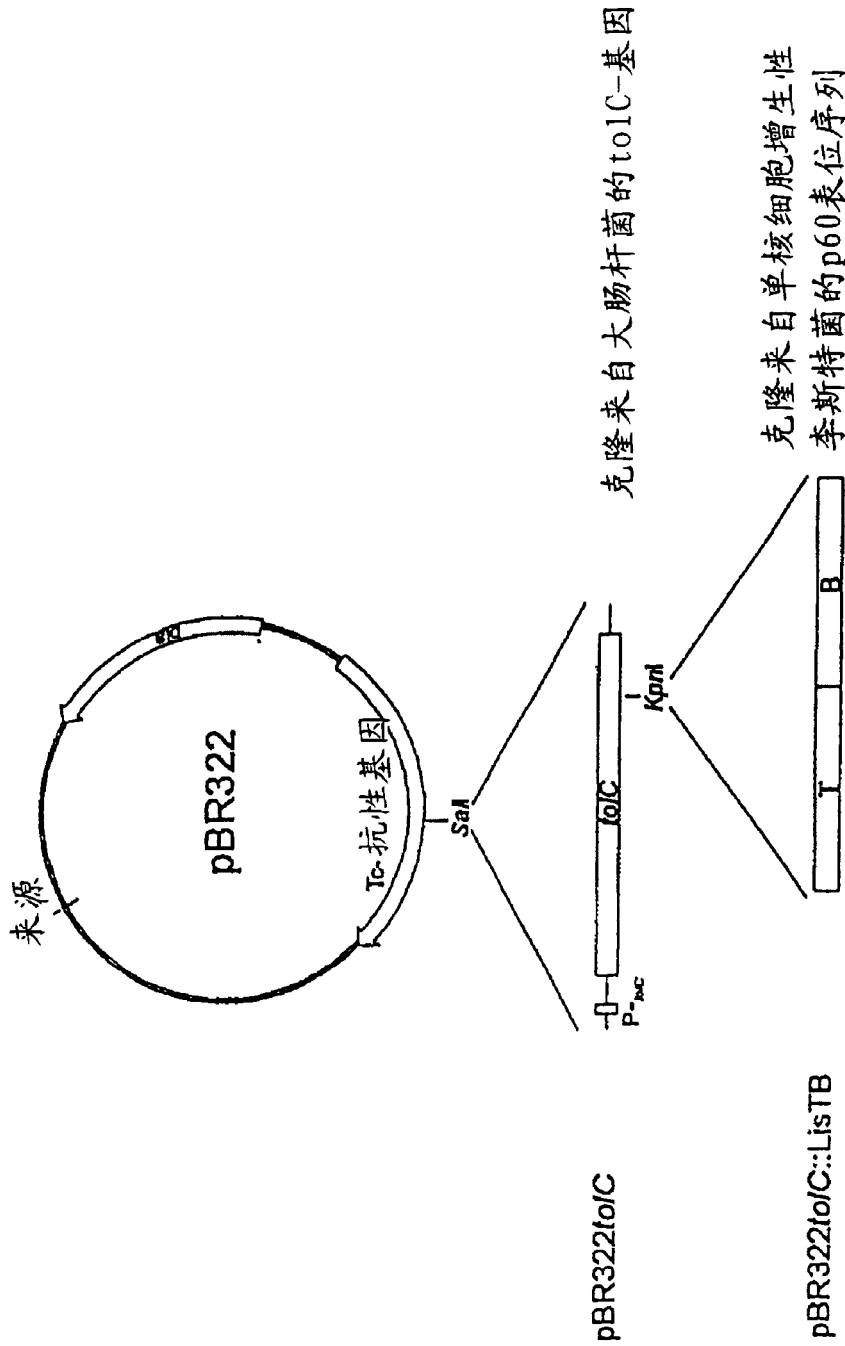


图 1

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 编码To1C和确定的氨基酸序列的核苷酸序列 | | |
| 公开(公告)号 | CN1646560A | 公开(公告)日 | 2005-07-27 |
| 申请号 | CN03808686.7 | 申请日 | 2003-02-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 乌尔夫·R·拉普 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 乌尔夫·R·拉普 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 乌尔夫·R·拉普 | | |
| [标]发明人 | W格贝尔 I根特谢夫 S斯普伦 | | |
| 发明人 | W·格贝尔 I·根特谢夫 S·斯普伦 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K39/00 A61K39/108 A61K39/112 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/245 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/31 A61K39/02 | | |
| CPC分类号 | A61K2039/523 C12R1/42 C07K14/195 C12R1/19 A61P31/00 A61P31/04 | | |
| 优先权 | 10208175 2002-02-20 DE | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及编码To1C和确定的氨基酸序列的核苷酸序列，该确定的氨基酸序列插在允许的To1C的膜外区域，本发明还涉及该核苷酸序列的多种应用，特别是含有这种核苷酸序列的细菌。

