

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813834.6

C12N 15/31
C07K 14/21 C07K 16/12
A61K 39/02 A61K 39/395
A61K 48/00 G01N 33/569

[43] 公开日 2003 年 1 月 15 日

[11] 公开号 CN 1391610A

[22] 申请日 2000.7.31 [21] 申请号 00813834.6

[30] 优先权

[32] 1999.8.3 [33] GB [31] 9918208.1

[86] 国际申请 PCT/EP00/07360 2000.7.31

[87] 国际公布 WO01/09334 英 2001.2.8

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.3

[71] 申请人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

[72] 发明人 J·通纳德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 姜建成

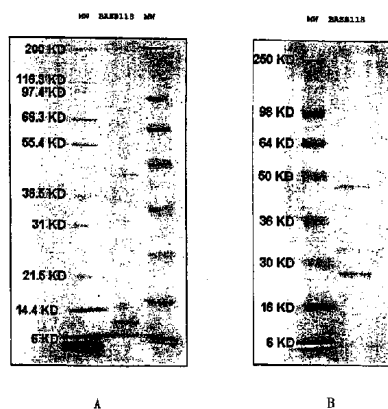
权利要求书 2 页 说明书 45 页 序列表 3 页
PCT/RO/134 表 1 页 附图 1 页

[54] 发明名称 粘膜炎莫拉氏菌的 BASB118 多肽和多核苷酸

[57] 摘要

本发明提供了 BASB118 多肽和编码 BASB118 多肽的多核苷酸, 以及通过重组技术生产这些多肽的方法。并且提供了诊断的、预后的和治疗的用途。

A: 考马斯亮兰染色的纯化BASB118 SDS-聚丙烯酰胺凝胶
B: 纯化BASB118 (抗-His抗体) Western-印迹



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

1. 分离的多肽，该多肽包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 2 全长上有至少 85% 的同一性。
2. 如权利要求 1 中所述的分离的多肽，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 2 全长上有至少 95% 的同一性。
3. 如权利要求 1 中所述的分离的多肽，该多肽包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。
4. SEQ ID NO: 2 的分离的多肽。
5. 如权利要求 1 - 4 中任一权利要求所述的多肽的免疫原性片段，其中该免疫原性片段的免疫原性基本上与 SEQ ID NO: 2 多肽相同。
6. 如权利要求 1 - 5 中任一权利要求所述的多肽，其中该多肽是更大的融合蛋白的一部分。
7. 编码如权利要求 1 - 6 中任一权利要求所述多肽的分离的多核苷酸。
8. 分离的包含编码多肽的核苷酸序列的多核苷酸，该多肽与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 2 全长上有至少 85% 的同一性；或者与该分离的多核苷酸互补的核苷酸序列。
9. 分离的多核苷酸，该多核苷酸与编码 SEQ ID NO: 2 多肽的核苷酸序列在全部编码区域上有至少 85% 的同一性；或者与该分离的多核苷酸互补的核苷酸序列。
10. 分离的多核苷酸，该多核苷酸包含的核苷酸序列与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 1 全长上有至少 85% 的同一性；或者与该分离的多核苷酸互补的核苷酸序列。
11. 如权利要求 7 - 10 中任一权利要求所述的分离的多核苷酸，其与 SEQ ID NO: 1 有至少 95% 的同一性。
12. 分离的多核苷酸，该多核苷酸包含编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的核苷酸序列。
13. 包含 SEQ ID NO: 1 多核苷酸的分离的多核苷酸。
14. 分离的多核苷酸，该多核苷酸包含编码 SEQ ID NO: 2 多肽的核苷酸序列，它是通过在严格杂交条件下使用具有 SEQ ID NO: 1 序列或者其片段的标记探针筛选适当的文库得到的。
15. 表达载体或者活的重组微生物，它们包含根据权利要求 7 -

14 中任一权利要求的分离的多核苷酸。

16. 包含权利要求 15 的表达载体的宿主细胞, 或者表达分离的多肽的该宿主细胞的亚细胞部分或者膜, 该分离的多肽包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列有至少 85% 的同一性。

5 17. 生产权利要求 1 - 6 多肽的方法, 该方法包括在足够生产该多肽的条件下培养权利要求 16 的宿主细胞, 以及从培养基中回收所述多肽。

18. 表达权利要求 7 - 14 中任一权利要求的多核苷酸的方法, 该方法包括用含有至少一种所说的多核苷酸的表达载体转化宿主细胞,
10 以及在足够表达所说的任一多核苷酸的条件下, 培养该宿主细胞。

19. 疫苗组合物, 其含有有效量的权利要求 1-6 中任一权利要求的多肽和药学可接受载体。

20. 疫苗组合物, 其含有有效量的权利要求 7 - 14 中任一权利要求的多核苷酸和药物有效载体。

15 21. 根据权利要求 19 或者 20 中任一权利要求的疫苗组合物, 其中该组合物含有至少一种其他粘膜炎莫拉氏菌抗原。

22. 对如权利要求 1 - 6 中任一权利要求所述的多肽或者免疫片段有免疫特异性的抗体。

23. 诊断粘膜炎莫拉氏菌感染的方法, 包括鉴定如权利要求 1 - 6
20 中任一权利要求所述的多肽, 或者对所说多肽有免疫特异性的抗体, 这些多肽或者抗体出现在怀疑有这种感染的动物体的生物样品中。

24. 含有免疫有效量的如权利要求 1 - 6 中任一权利要求所述的多肽的组合物在制备用于在动物中产生免疫应答的药物中的用途。

25 25. 含有免疫有效量的如权利要求 7 - 14 中任一权利要求所述的多核苷酸的组合物在制备用于在动物中产生免疫应答的药物中的用途。

26. 在治疗具有粘膜炎莫拉氏菌疾病的人体中有效的治疗组合物, 该组合物含有至少一种直接针对权利要求 1 - 6 多肽的抗体和合适的药物载体。

30

粘膜炎莫拉氏菌的 BASB118 多肽和多核苷酸

发明领域

5 本发明涉及多核苷酸（此处称作“BASB118 多核苷酸”），其编码的多肽（此处称作“BASB118”或者“BASB118 多肽”），重组材料及其制备方法。另一方面，本发明涉及使用这些多肽和多核苷酸的方法，包括针对细菌感染的疫苗。另一方面，本发明涉及检测某些病原体感染的诊断分析。

10 发明背景

粘膜炎莫拉氏菌（*Moraxella catarrhalis*）（也称作粘膜炎布兰汉球菌 *Branhamella catarrhalis*）是革兰氏阴性菌，常常从人体上呼吸道分离得到。它是造成几种病变的原因，主要有幼儿和儿童中耳炎，和老年人肺炎。它也是造成鼻窦炎和医院感染的原因，并且不太经常的造成入侵性疾病。

15 中耳炎在病例数目和其潜在后遗症来说，都是一种重要的儿童疾病。美国每年有超过 350 万病例报道，据估计 80% 的儿童在 3 岁之前都经历过至少一种耳炎症状（Klein, JO (1994) 临床感染疾病（*Clin. Inf. Dis*） 19: 823）。除了未治疗的或者变成慢性的之外，该疾病可以造成暂时的（对于内耳液体积存的情况）或者永久的（如果听觉神经受损）听力损伤。对于幼儿，这样的听力损伤可能造成迟缓说话学习。

20 从有中耳炎的儿童中耳中，主要分离出 3 种细菌菌种：肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*），无型流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）（NTHi）和粘膜炎莫拉氏菌。它们出现在 60-90% 的病例中。一篇近期研究的评论显示，肺炎链球菌和 NTHi 都出现在大约 30% 的中耳炎病例中，粘膜炎莫拉氏菌出现在大约 15% 的中耳炎病例中（Murphy, TF (1996) 微生物学综述（*Microbiolo. Rev.*） 60: 267）。也可以从中耳中分离出其他细菌（B 型流感嗜血杆菌，化脓链球菌等），但是频率很低（2% 或者更低的病例）。

30 流行病学数据显示，对于在中耳中发现的病原体来说，在上呼吸道定居是发生耳炎的绝对前提；而其他条件对于引起疾病也是需要的（Dickinson, DP 等 (1998) 传染病学杂志（*J. Infect. Dis.*） 158:

205, Faden, HL 等 (1991) *Ann. Otorhinol. Laryngol.* 100: 612)。这对于引发细菌通过耳咽管移植到中耳是重要的,接着便开始发炎过程。今天这些因素是已知的。假定,例如,免疫系统在病毒感染后的暂时性异常,可能造成不能控制呼吸道定居 (Faden, HL 等 (1994) 5 传染病学杂志 (*J. Infect. Dis.*) 169: 1312)。另一种解释是,暴露于环境因素使得有些儿童具有更重要的定居,因为中耳病原体的持续存在,使得他们随后变得易发生中耳炎 (Murphy, TF (1996) 微生物学综述 (*Microbiolo. Rev.*) 60: 267)。

10 粘膜炎莫拉氏菌免疫反应的特征很少。依次从 0-2 岁婴儿鼻咽分离的菌株的分析显示,抗他们频繁的进行和排除新菌株。这表明被定居的儿童,可以增加抗该细菌有效的免疫反应 (Faden, HL 等 (1994) 传染病学杂志 (*J. Infect. Dis.*) 169: 1312)。

在大多数被试成年人中鉴定出细菌抗体 (Chapman, AJ 等 (1985) 传染病学杂志 (*J. Infect. Dis.*) 151: 878)。粘膜炎莫拉氏菌菌株,在抵抗血清杀菌活性能力上有各种变化:一般的,从患病个体分离的细菌,比从仅被定居的个体分离的细菌具有更强的抵抗性 (Hol, C 等 (1993) 论坛 (*Lancet*) 341: 1281, Jordan, KL 等 (1990) 美国药 15 学杂志 (*Am. J. Med.*) 88 (增刊. 5A): 28S)。因此,血清抗性可以被看作细菌的一个毒性因素。在从中耳炎恢复的儿童的血清中观测到 20 到调理活性。

除了 OMP B1, 84 kDa 蛋白质,该蛋白质的表达受铁的调节,并且可以被肺炎患者的血清识别 (Sethi, S, 等 (1995) 感染·免疫 (*Infect. Immun.* 63: 1516), 以及除 UspA1 和 UspA2 (Chen D. 等 (1990), 感染·免疫 (*Infect. Immun.*) 67: 1310) 之外,被人体中这些不 25 同免疫反应作为目标的抗原还没有得到鉴定。

出现在粘膜炎莫拉氏菌表面的许多其他膜蛋白,可以通过生物化学方法表现其特征,或者对于它们在诱导保护性免疫方面的潜在本质 (综述参见 Murphy, TF (1996) 微生物学综述 (*Microbiol. Rev.*) 60: 267) 进行表征。在鼠的肺炎模型中,针对它们 (UspA, CopB) 增 30 加的抗体的出现,促进肺部感染更快的清除。另一种多肽 (OMP CD) 在粘膜炎莫拉氏菌菌株中高度保守,并且与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的一种膜空蛋白具有同源性,证明它可

以在动物模型中有效地对抗该细菌。

在过去几十年中，粘膜莫拉氏菌感染的频率有惊人的增加。这归因于多种抗生素抗性菌株的出现，以及具有弱化免疫系统人群的增加。分离出抵抗部分或者全部标准抗生素的粘膜莫拉氏菌菌株已经不再罕见。这一现象造成未能满足的医疗需要，以及对新的抗微生物

发明概述

本发明涉及 BASB118，特别是涉及 BASB118 多肽和 BASB118 多核苷酸、重组材料及其制备方法的。另一方面，本发明涉及使用这些多肽和多核苷酸的方法，其中包括微生物疾病的预防和治疗。另一方面，本发明涉及微生物感染相关疾病检测的诊断分析和这种感染相关条件，例如检测 BASB118 多核苷酸或者多肽表达或者活性的分析。

通过阅读以下描述和阅读本公开内容的其他部分，在本公布发明的精神和范畴内的各种变化和更改，对于技术熟练者来说是很明显的。

发明描述

本发明涉及 BASB118 多肽和多核苷酸，以下有更详细的描述。本发明特别涉及粘膜莫拉氏菌的 BASB118 多肽和多核苷酸，其特征是一种含有信号序列的脂蛋白，该信号序列是脂蛋白的特征，因此预测它在表面表达。本发明尤其涉及这样的 BASB118，该 BASB118 具有分别列在 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 中的核苷酸和氨基酸序列。在序列表 (Sequence Listing) 中“DNA”下引用的序列，被理解为代表本发明实施方案的一个实施例，因为熟悉常规技术者可以认识到，这些序列一般可以有效地用于多核苷酸中，包括核糖多核苷酸。

多肽

本发明的一个方面提供了粘膜莫拉氏菌的多肽，在此处被称作“BASB118”和“BASB118 多肽”，和其生物学上、诊断上、预防上、临床上或者治疗上有用的变体，以及含有这些成分的组合物。

本发明进一步提供：

(a) 分离的多肽，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列有至少 85% 同一性，优选的有至少 90% 同一性，更优选的有至少 95% 同一性，最优选的有至少 97-99% 的同一性或者完全相同；

(b)分离的多核苷酸编码的多肽，该分离的多核苷酸的多核苷酸序列与 SEQ ID NO:1 在 SEQ ID NO:1 全长上有至少 85%同一性，优选的有至少 90%同一性，更优选的有至少 95%同一性，最优选的有至少 97-99%的同一性或者完全相同；

5 (c)分离的多核苷酸编码的多肽，该分离的多核苷酸的多核苷酸序列编码的多肽的氨基酸序列，与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列有至少 85%同一性，优选的有至少 90%同一性，更优选的有至少 95%同一性，最优选的有至少 97-99%的同一性或者完全相同。

10 SEQ ID NO:2 提供的 BASB118 多肽，是粘膜炎莫拉氏菌 MC2931 (ATCC43617) 菌株的 BASB118 多肽。

本发明也提供了 BASB118 多肽的免疫原性片段，即 BASB118 多肽的邻接部分，其具有与具有 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的多肽相同的或者基本相同的免疫活性；也就是说，该片段（如果需要可以与载体结合）能够引起识别 BASB118 多肽的免疫反应。这样的免疫原性片段可以包括，例如缺少 N-末端前导序列、和/或跨膜区域和/或 C-末端锚定区域的 BASB118 多肽。在一个优选的方面，根据本发明的 BASB118 的免疫原性片段包括这样一种多肽的几乎全部细胞外区域，该多肽与 SEQ ID NO:2 在 SEQ ID NO:2 全长上，有至少 85%同一性，优选的有至少 90%同一性，更优选的有至少 95%同一性，最优选的有至少 97-99%的同一性。

20 片段是含有氨基酸序列的多肽，它与本发明任何多肽氨基酸序列的一部分完全相同，而不是与全部氨基酸序列相同。至于 BASB118 多肽，片段可以是“游离状态”，或者是包含在更大的多肽之中，它们形成更大的多肽的一部分或者一个区域，最优选的是作为单个更大多肽的单独连续区域。

30 优选的片段包括，例如，具有 SEQ ID NO:2 氨基酸序列或者其变体的一部分的截短的多肽，例如包括氨基-和/或羧基-末端氨基酸序列的残基连续系列。通过宿主细胞产生的或者宿主细胞内的本发明多肽的降解形式，也是优选的。更优选的是具有结构或者功能特征的片段，例如含有 α -螺旋或者 α -螺旋形成区域的片段、含有 β -折叠和 β -折叠形成区域的片段、含有转角和转角形成区域的片段、含有卷曲和卷曲形成区域的片段、含有亲水区域的片段、含有疏水区域的片段、含

有 α 两亲性区域的片段、含有 β 两亲性区域区域的片段、含有柔性区域的片段、含有表面形成区域的片段、含有底物结合区域的片段以及含有高抗原索引区域的片段。

更优选的片段包括这样的分离的多肽，该分离多肽的氨基酸序列含有 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的至少 15, 20, 30, 40, 50 或者 100 个连续氨基酸，或者这样的分离的多肽，该多肽的氨基酸序列含有从 SEQ ID NO:2 氨基酸序列剪切或者缺失的至少 15, 20, 30, 40, 50 或者 100 个连续氨基酸。

本发明多肽的片段可以用于通过肽合成制备相应的全长多肽；因此，这些片段可以用作制备本发明全长多肽的中间体。

其中的几个，5-10, 1-5, 1-3, 1-2 或者 1 个氨基酸以任意组合被替换、缺失或者添加的变体是特别优选的。

本发明的多肽或者免疫原性片段，可以是“成熟”蛋白的形式，或者可以是像前体或者融合蛋白这样更大蛋白的一部分。包含一段额外的氨基酸序列经常是有利的，这包括分泌或者前导序列、前序列、象多聚组氨酸这样有助于纯化的序列，或者在重组制备中用于稳定的额外序列。另外，也可以考虑添加提高最终分子免疫原性潜力的外源多肽或者脂质尾部或者多核苷酸序列。

一方面，本发明涉及遗传工程可溶性融合蛋白，该蛋白含有本发明的多肽或者其片段，以及免疫球蛋白各种亚类 (IgG, IgM, IgA, IgE) 重链或者轻链恒定区的各种部分。优选的免疫球蛋白是，人体 IgG，特别是 IgG1 重链的稳定部分，融合发生在铰链区。在一个特别优选的实施方案中，可以通过与剪切序列结合而简单地除去 Fc 部分，该剪切序列可以被凝血因子 Xa 剪切。

另外，本发明涉及通过遗传工程制备这些融合蛋白的方法，并且涉及其药物筛选、诊断和治疗的用途。本发明的另一方面涉及编码这种融合蛋白的多核苷酸。融合蛋白技术的实施例可以在国际专利申请 W094/29458 和 W094/22914 中找到。

蛋白质可以化学结合，或者作为重组融合蛋白表达，这与非融合蛋白相比，可以允许提高表达系统生产的水平。融合配偶体可以有助于提供 T 辅助细胞抗原决定簇 (免疫融合配偶体)，特别是人体识别的 T 辅助细胞抗原决定簇，或者有助于以比天然重组蛋白更高的产量

表达蛋白质（表达增强子）。优选的融合配偶体既是免疫融合配偶体，又是表达增强配偶体。

融合配偶体包括来自流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）的蛋白 D 和来自流感病毒 NS1（血凝素）的非结构蛋白。另一种融合配偶体是称为 LytA 的蛋白。优选使用分子的 C 末端部分。LytA 来自肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*），它合成 N-乙酰-L-丙氨酸酰胺酶 LytA（lytA 基因编码 {Gene, 43 (1986) 265-272 页}），一种特异性降解肽聚糖主链某些键的自溶素。LytA 蛋白的 C 末端区域负责与胆碱或者某些胆碱类似物结合，例如 DEAE。该性质被用于开发可用于表达融合蛋白的大肠杆菌 C-LytA 表达质粒。对于在氨基末端含有 C-LytA 片段的杂合蛋白的纯化，已有描述 {生物技术 (Biotechnology): 10, (1992) 795-798 页}。可以使用 LytA 分子的重复部分，该重复部分位于 C 末端起始于 178 残基，例如残基 188-305。

本发明也包括前述多肽的变体，即通过保守氨基酸替换而与目标对象不同的多肽，保守氨基酸替换是指用另一个具有相似性质的残基替换一个残基。典型的这种替换发生在丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸之间；丝氨酸和苏氨酸之间；酸性残基天冬氨酸和谷氨酸之间；天冬酰胺和谷氨酰胺之间；碱性残基赖氨酸和精氨酸残基之间；或者芳香族残基苯丙氨酸和酪氨酸之间。

本发明的多肽可以用任何合适的方法制备。这些多肽包括分离的天然存在的多肽、重组产生的多肽、合成产生的多肽，或者组合这些方法产生的多肽。制备这些多肽的方法，在技术上是熟知的。

本发明的多肽最优选的是来自粘膜炎莫拉氏菌，然而，也可以优选从同一分类学属的其他生物体获得。例如，本发明多肽也可以从同一分类学科或者目的生物体获得。

多核苷酸

本发明的一个目标是提供编码 BASB118 多肽的多核苷酸，特别是编码此处称作 BASB118 多肽的多核苷酸。

在本发明一个特别优选的实施方案中，该多核苷酸含有编码具有 SEQ ID NO: 1 中列出序列的 BASB118 多肽的区域，该区域包含全长基因或者其变体。

SEQ ID NO:1 提供的 BASB118 多核苷酸, 是来自粘膜炎莫拉氏菌 MC2931 (ATCC 43617) 菌株的 BASB118 多核苷酸。

本发明的另一方面提供了分离的编码和/或表达 BASB118 多肽和多核苷酸的核酸分子, 特别是粘膜炎莫拉氏菌 BASB118 多肽和多核苷酸, 例如包括, 未加工 RNA、核酶 RNA、mRNA、cDNA、基因组 DNA、B-DNA 和 Z-DNA。本发明的其他实施方案包括生物学上、诊断上、预防上、临床上或者治疗上有用的多核苷酸和多肽, 以及其变体, 以及含有它们的组合物。

本发明的另一个方面涉及分离的多核苷酸、与其有紧密关系的多核苷酸及其变体, 该多核苷酸包括至少一条编码 BASB118 多肽的全长基因, 该 BASB118 多肽具有 SEQ ID NO:2 推导出的氨基酸序列。

在本发明另一个特别优选的实施方案中, 来自粘膜炎莫拉氏菌的 BASB118 多肽含有或者由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或者其变体组成。

使用此处提供的信息, 例如 SEQ ID NO:1 列出的多核苷酸序列, 使用标准克隆或者筛选方法, 例如, 那些使用粘膜炎莫拉氏菌 Catlin 细胞作为起始物质, 接着可以获得全长克隆的, 克隆或者测序细菌染色体 DNA 片段的方法, 可以获得编码 BASB118 多肽的本发明多核苷酸。例如, 为了获得本发明的多核苷酸序列, 例如 SEQ ID NO:1 给出的多核苷酸序列, 典型的是使用放射性标记的来自部分序列的寡聚核苷酸, 优选的是 17-mer 或者更长, 探测粘膜炎莫拉氏菌 Catlin 在大肠杆菌或者其他合适宿主中的染色体 DNA 克隆文库。然后, 使用严格杂交条件, 可以辨别出携带有与探针 DNA 一致的 DNA 的克隆。使用由原始多肽或者多核苷酸序列设计的测序引物, 对杂交鉴定的个体克隆进行测序, 可以两个方向扩展多核苷酸序列, 以确定全长基因序列。例如, 可以使用由质粒克隆制备的变性双链 DNA, 方便的进行测序。合适的技术描述于 Maniatis, T., Fritsch, E. F. 和 Sambrook 等, 分子克隆, 实验手册 (MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL), 第二版, ;冷泉港实验出版社. 冷泉港, 纽约 (1989) (特别参见杂交筛选 1.90 和对变性的双链 DNA 模板的测序 13.70 (Screening By Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70))。也可以进行基因组 DNA 直接测序得到全长基因序列。本发明说明, SEQ ID NO:1 列出的多核苷酸发现于来自

粘膜炎莫拉氏菌的 DNA 文库。

另外，SEQ ID NO:1 列出的 DNA 序列含有编码一种蛋白质的可读框，该蛋白质具有大约 SEQ ID NO:2 列出的氨基酸残基数目，可以使用本领域技术人员公知的氨基酸残基分子量计算该蛋白质的推导出的分子量。

SEQ ID NO:1 的多核苷酸，在 SEQ ID NO:1 核苷酸编号 1 的起始密码子和开始于核苷酸编号 1159 的终止密码子之间，编码 SEQ ID NO:2 的多肽。

另一方面，本发明提供含有或者由以下序列组成的分离的多核苷酸：

(a) 多核苷酸序列，该序列与 SEQ ID NO:1 在 SEQ ID NO:1 全长上有至少 85% 同一性，优选的有至少 90% 同一性，更优选的有至少 95% 同一性，甚至更优选的有至少 97-99% 的同一性或者完全相同；或者

(b) 编码多肽的多核苷酸序列，该多肽与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:2 全长上，有至少 85% 同一性，优选的有至少 90% 同一性，更优选的有至少 95% 同一性，甚至更优选的有至少 97-99% 的同一性或者 100% 完全相同。

本发明编码多肽的多核苷酸，包括来自粘膜炎莫拉氏菌以外其他菌种的同源物和直向同源物，可以通过包括以下步骤的方法获得：在严格杂交条件下（例如，使用温度范围 45 - 65°C，SDS 浓度 0.1 - 1%），使用包含或者由 SEQ ID NO:1 序列或者其片段组成的标记或者可探测探针，筛选合适的文库；分离含有该多核苷酸序列的全长基因和/或基因组克隆。

本发明提供在其全长上与 SEQ ID NO:1 编码序列（可读框）一致的多核苷酸序列。本发明也提供了成熟多肽或者其片段的编码序列的本身，或者阅读框架中成熟多肽或者其片段的编码序列和另一段编码序列，例如编码前导或者分泌序列、前蛋白序列、或者原蛋白序列、或者前原蛋白序列的序列。本发明多核苷酸也含有至少一段非编码序列，例如，包括但是不仅仅局限于，至少一段 5' 和 3' 非编码序列，例如转录但是不翻译的序列，终止信号（例如依赖 rho 的和依赖 rho 的终止信号），核糖体结合位点，Kozak 序列、稳定 mRNA 的序列、内含子和多聚腺苷酸信号。多核苷酸序列也可以包含编码附加氨基酸的

额外编码序列。例如，可以编码有助于融合多肽纯化的标记序列。在本发明某些实施方案中，标记序列是 6 组氨基酸，如在 pQE 载体 (Qiagen, Inc) 中提供的，描述于 Gentz 等，美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA) 86: 821-824 (1989)，或者 HA 肽标记 (Wilson 等，细胞 (Cell) 37: 767 (1984))，它们都可以用于纯化与之融合的多肽序列。本发明的多核苷酸，也包括但是不仅仅局限于，含有结构基因和其控制基因表达的天然相关序列的多核苷酸。

编码 SEQ ID NO: 2 的 BASB118 多肽的核苷酸序列，可以与包含在 SEQ ID NO: 1 的 1 至 1158 核苷酸中的多肽编码序列一致。另外，它也可以是这样的序列，该序列作为遗传密码冗余 (简并) 的结果，也编码 SEQ ID NO: 2 的多肽。

如此处所用的术语“编码多肽的多核苷酸”包含这样的多核苷酸，该多核苷酸包括编码本发明多肽的序列，特别是细菌多肽，更特别是具有 SEQ ID NO: 2 中列出氨基酸序列的粘膜炎莫拉氏菌 BASB118 多肽。该术语也包含这样的多核苷酸，该多核苷酸包括编码多肽 (例如，被整合噬菌体、整合插入序列、整合载体序列、整合转座子序列中断的多核苷酸，或者由于 RNA 编辑或者基因组 DNA 重组中断的多核苷酸) 的单独连续区域或者不连续区域，以及额外区域，也含有编码和/或非编码序列。

本发明进一步涉及此处描述的多核苷酸的变体，这些多核苷酸变体编码具有 SEQ ID NO: 2 推导出的氨基酸序列多肽的变体。本发明多核苷酸的片段也可以用于，例如合成本发明全长多核苷酸。

更加特别优选的实施方案，是编码 BASB118 变体的多核苷酸，该变体具有 SEQ ID NO: 2 BASB118 多肽的氨基酸序列，其中若干、许多、5-10、1-5、1-3、2、1 或者没有氨基酸残基以任何组合被替换、修饰、缺失和/或添加。特别优选的是不改变 BASB118 多肽的性质和活性的沉默替换，添加和缺失。

本发明另一个优选的实施方案是这样的多核苷酸以及与这种多核苷酸互补的多核苷酸，该多核苷酸在其全长上，与编码具有 SEQ ID NO: 2 列出氨基酸序列的 BASB118 多肽的多核苷酸有至少 85% 的同一性。另外，最优选的是含有这样区域的多核苷酸及其互补多核苷酸，该区域在其全长上与编码 BASB118 多肽的多核苷酸有至少 90% 的同一性。在

这点上，在其全长上与编码 BASB118 多肽的多核苷酸有至少 95%同一性的多核苷酸是特别优选的。另外，在那些至少有 95%同一性的多核苷酸中有至少 97%同一性的那些多核苷酸是高度优选的，其中那些至少有 98%和至少有 99%同一性的那些多核苷酸是特别高度优选的，至少有 5 99%同一性的是更加优选的。

优选的实施方案是编码多肽的多核苷酸，该多肽具有与 SEQ ID NO:1 的 DNA 编码的成熟多肽基本相同的生物功能或活性。

根据本发明某些优选的实施方案，提供了与 BASB118 多核苷酸序列杂交的多核苷酸，例如 SEQ ID NO:1 多核苷酸，特别是在严格杂交 10 条件下。

本发明此外还涉及与此处提供的多核苷酸序列杂交的多核苷酸。在这点上，本发明特别涉及在严格杂交条件下，和此处提供的多核苷酸序列杂交的多核苷酸。如此处所用的，术语“严格条件”和“严格杂交条件”是指，只有当两条序列之间有至少 95%同一性，优选的有至少 15 97%同一性时，发生的杂交。严格杂交条件的一个特定实施例是，在含有以下组分的溶液中 42°C 孵育过夜：，50%甲酰胺，5x SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)，50 mM 磷酸钠 (pH6.7)，5x Denhardt's 溶液，10%硫酸右旋糖苷，20 mg/ml 变性剪切鲑鱼精子 DNA，然后用 0.1x SSC 在大约 65°C 清洗杂交载体。杂交和清洗条件是熟知的，在 20 Sambrook 等 分子克隆：实验手册，第二版，冷泉港、纽约 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.)，(1989)中有举例说明，特别是在其第 11 章。用本发明提供的多核苷酸序列也可以使用溶液杂交。

本发明也提供多核苷酸，该多核苷酸含有或者由这样的多核苷酸 25 序列组成，该序列是在严格杂交条件下，使用探针，该探针具有所说的列在 SEQ ID NO:1 中的多核苷酸序列或者其片段的序列，针对 SEQ ID NO:1 列出的多核苷酸序列，筛选含有全部基因的合适文库而得到的；以及分离该多核苷酸序列。用于获得该多核苷酸的片段包括，例如此处其他部分详细描述探针和引物。

正如此处其他部分关于本发明多核苷酸分析所讨论的，例如，本 30 发明的多核苷酸，可以用作 RNA、cDNA 和基因组 DNA 的杂交探针，以分离编码 BASB118 的全长 cDNA 和基因组克隆，分离与 BASB118 基因有

高度同一性的，特别是高度序列同一性的其他基因的 cDNA 和基因组克隆。这些探针通常含有至少 15 个核苷酸残基或者碱基对。优选的，这些探针具有至少 30 个核苷酸残基或者碱基对，并且可以具有至少 50 个核苷酸残基或者碱基对。特别优选的探针具有至少 20 个核苷酸残基或者碱基对，并且具有少于 30 个核苷酸残基或者碱基对。

用 SEQ ID NO:1 提供的 DNA 序列合成寡聚核苷酸探针，用该探针进行筛选，可以分离得到 BASB118 基因的编码区域。然后，使用具有与本发明基因序列互补序列的标记寡聚核苷酸，筛选 cDNA、基因组 DNA 或者 mRNA 文库，以确定探针与文库中的哪些成员杂交。

有几种可以使用的，并且是本领域技术人员公知的方法，用于获得全长 DNA，或者扩展短 mRNA，例如那些基于 cDNA 末端快速扩增方法 (Rapid Amplification of cDNA ends) (RACE) (参见例如，Frohman, 等, PANS USA 85: 8998-9002, 1988) 的方法。新近的技术修改，例如以 Marathon™ 技术 (Clontech Laboratories Inc.) 为例，很大程度上简化了对较长 cDNA 的搜寻。在 Marathon™ 技术中，从由选定组织中提取的 mRNA 及与每个末端连接的“连接物”序列中，可以制备 cDNA。然后使用基因特异的和连接物特异的寡聚核苷酸引物组合，进行核酸扩增 (PCR)，以扩增 DNA “缺失的” 5' 端。接着，使用“嵌套”引物重复 PCR 反应，嵌套引物是指为了扩增产物间退火而设计的引物 (典型的是连接物特异引物，它在连接物序列的 3' 以外退火，以及基因特异的引物，它在所选基因序列的 5' 以外退火)。随后，可以通过 DNA 测序分析该反应的产物，并且可以通过把产物直接与已存在的 DNA 连接产生完全序列，或者使用用于 5' 引物设计的新序列信息进行单独的全长 PCR，可以构建全长 DNA。

正如此处关于多核苷酸分析所进一步讨论的，本发明的多核苷酸和多肽可以用作，例如疾病治疗和诊断发现的研究试剂和材料，特别是人体疾病。

那些来自序列 SEQ ID NO:1 的寡聚核苷酸的本发明多核苷酸，可以用于此处描述的方法中，以确定此处被鉴定的全部或者部分多核苷酸是在感染组织的细菌中转录的，优选的方法是 PCR。已知这些序列也可以用于诊断病原体达到的感染阶段和感染类型。

本发明也提供编码多肽的多核苷酸，该是成熟蛋白质加额外的氨

基或者羧基端氨基酸，或者成熟多肽的内部氨基酸（例如，当成熟形式有多于一条多肽链时）。这些序列可以在蛋白质从前体到成熟形式的加工过程中发挥作用，可以使得蛋白质运输发生，可以增长或者缩短蛋白质半寿期或者可以有利于蛋白质分析或者制备的操作，以及其他作用。正如通常体内的情形，额外氨基酸可以被细胞酶类从成熟蛋白质加工除去。

对于本发明的每一条和所有的多核苷酸，都提供了与其互补的多核苷酸。优选的，这些互补多核苷酸与每一条与之互补的多核苷酸完全互补。

10 前体蛋白质，具有与一条或者多条原序列融合的多肽成熟形式，可以是多肽的失活形式。当除去这些原序列时，这些失活前体通常被激活。在激活之前，可以除去部分或者全部的原序列。通常这些前体被称作原蛋白。

除了标准的核苷酸的 A, G, C, T/U 表示之外，术语“N”也可以用于描述本发明的某些多核苷酸。“N”是指在 DNA 或者 RNA 序列中，出现在指定位置的四个 DNA 或者 RNA 核苷酸的任意一个，除了优选的，当结合邻近核苷酸位置，阅读正确的阅读框架时，N 不是这样的一个核酸，该核酸具有在这些阅读框架中产生成熟前终止子的作用。

20 总之，本发明多核苷酸可以编码成熟蛋白质，成熟蛋白质加前导序列（可以称作前蛋白），具有一条或者多条原序列的成熟蛋白质前体，这些原序列不是前蛋白质的前导序列，或者前原蛋白质，它是原蛋白质的前体，具有前导序列和一条或者多条原序列，这些序列通常在产生多肽活性和成熟形式的过程中被除去。

25 根据本发明的一个方面，提供了本发明多核苷酸用于治疗 and 预防目的用途，特别是遗传免疫。

30 本发明多核苷酸在遗传免疫中的用途，优选的使用合适的递送方法，例如肌肉直接注射质粒 DNA (Wolff 等, 人类分子遗传学 (Hum Mol Genet) (1992) 1: 363, Manthorpe 等, 人类基因治疗 (Hum. Gene Ther.) (1983) 4: 419), 递送与特殊蛋白质载体结合的 DNA (Wu 等, 生物化学杂志 (J Biol Chem.) (1989) 264: 16985), DNA 与磷酸钙共沉淀 (Benvenisty & Reshef, PNAS USA, (1986) 83: 9551), 把 DNA 包装于各种形式的脂质体中 (Kaneda 等, 科学 (Science) (1989)

243: 375), 颗粒轰击 (Tang 等, 自然 (Nature) (1992) 356: 152, Eisenbraun 等, DNA 细胞生物学 (DNA Cell Biol) (1993) 12: 791) 以及使用逆转录克隆载体的体内感染 (Seeger 等, PNAS USA (1984) 84: 5849)。

5 载体, 宿主细胞, 表达系统

本发明也涉及含有本发明一条或者多条多核苷酸的载体, 经遗传工程操作具有本发明载体的宿主细胞, 以及通过重组技术制备本发明多肽。使用来自本发明 DNA 构建体的 RNA, 也可以使用无细胞翻译系统生产这些蛋白质。

10 本发明重组多肽, 可以使用本领域技术人员公知的方法, 从含有表达系统的遗传工程宿主细胞制备。因此, 另一方面, 本发明涉及含有本发明一条或者多条多核苷酸的表达系统, 经遗传工程操作具有这些表达系统的宿主细胞, 以及通过重组技术制备本发明多肽。

对于本发明多肽的重组制备, 宿主细胞可以经遗传操作而结合本
15 发明表达系统或者其部分或者多核苷酸。可以通过描述于很多标准实验室手册的方法, 例如 Davis, 等, 分子生物学基础方法 (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY), (1986) 和 Sambrook, 等, 分子克隆: 实验手册 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL), 第二版, 冷泉港实验出版社, 冷泉港, N. Y. (1989), 例如磷酸钙转染、
20 DEAE-右旋糖苷介导的转染、转位、微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、刮擦装载、弹道引入以及感染, 有效地把多核苷酸导入宿主细胞。

合适宿主细胞的代表性实施例包括, 细菌细胞, 例如链球菌、葡萄球菌、肠球菌、大肠杆菌、链霉菌、蓝藻类细菌、枯草芽孢杆菌、
25 脑膜炎奈球菌和粘膜炎莫拉氏菌细胞; 真菌, 例如酵母、克鲁维酵母菌、酿酒酵母、担子菌、白色念珠菌和曲霉菌细胞; 昆虫细胞, 例如 Drosophila S2 和 Spodoptera Sf9 细胞; 动物细胞, 例如 CHO、COS、Hela、C127、3T3、BHK、293、CV-1 和 Bowes 黑色素瘤细胞; 以及植物细胞, 例如裸子植物和被子植物细胞。

30 各种各样的表达系统可以用于生产本发明多肽。这些载体其中包括, 染色体来源的、附加体来源的和病毒来源的载体, 例如来自细菌质粒的载体, 来自噬菌体的载体, 来自转座子的载体, 来自酵母附加

体的载体，来自插入元件的载体，来自酵母染色体元件的载体，来自例如杆状病毒、像 SV40 这样的乳多空病毒、痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒、假狂犬病病毒、细小核糖核酸病毒、逆转录病毒和甲病毒这些病毒的载体，以及来自它们组合的载体，例如那些来自质粒和噬菌体遗传元件的载体，像是粘粒和噬菌粒。表达系统构建体可以含有调节并引起表达的控制区域。通常，在宿主细胞中适合维持、繁殖或者表达多核苷酸和/或表达多肽的任何系统或者载体，都可以在这点上用于表达。可以通过各种熟知的和常规的技术，把合适的 DNA 序列插入表达系统，例如，像是列在 Sambrook, 等, 分子克隆, 实验手册(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL)，(上文)中的那些。

在真核细胞重组表达系统中，为了把翻译的蛋白质分泌到内质网内腔、周质空间或者细胞外环境中，可以将合适的分泌信号结合到表达多肽上。这些信号对于多肽可以是内源的，或者是异源信号。

使用熟知的方法，包括硫酸铵或者乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或者阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析，可以从重组细胞培养物中回收和纯化本发明多肽。最优选的是使用金属离子亲和层析(IMAC)用于纯化。当多肽在细胞内合成、分离和或者纯化过程中变性时，可以使用熟知的关于蛋白质再折叠的技术，再生其活性构象。

表达系统也可以是重组的活微生物，例如病毒或者细菌。感兴趣的基因可以被插入活的重组病毒或者细菌的基因组中。接种或者体内感染这些活的载体，可以引起抗原的体内表达，以及诱导免疫应答。用于这一目的病毒和细菌举例来说有：痘病毒(例如牛痘，禽痘，canarypox)，甲病毒(新培斯病毒, Semliki Forest 病毒, Venezuelan Equine Encephalitis 病毒)，腺病毒，腺相关病毒，细小核糖核酸病毒(脊髓灰质炎病毒，鼻病毒)，疱疹病毒(水痘-带状疱疹病毒等)，这些病毒和细菌可以是毒性的，或者为了得到活的疫苗而以各种方式减毒的。这些活疫苗也组成了本发明的一部分。

诊断、预后、血清型和突变分析

本发明也涉及用作诊断试剂的本发明 BASB118 多核苷酸和多肽的用途。真核细胞中，特别是哺乳动物中，尤其是人体中，BASB118 多核苷酸和/或多肽的检测，为疾病诊断、疾病阶段的诊断或者感染生物

体对于药物的反应，提供了诊断方法。在核酸或者氨基酸水平上，使用各种熟知的方法以及此处提供的方法，可以检测真核细胞，特别是哺乳动物，尤其是人体，特别是感染了或者怀疑被感染了含有 BASB118 基因或者蛋白质生物体的那些人体。

5 可以从推定被感染的和/或已经被感染的个体机体物质中，获得用于预后、诊断或者其他分析的多肽和多核苷酸。这些来源的多核苷酸，特别是 DNA 或者 RNA，可以直接用于检测，或者可以通过使用 PCR 或者其他任何分析前扩增技术进行酶促扩增。RNA，特别是 mRNA，cDNA 和基因组 DNA，也可以以相同的方式使用。通过生物体所选多核苷酸的
10 基因型分析，使用扩增，可以表征个体感染的或者固有的微生物菌种或者菌株的特征。通过与选自亲缘微生物对照序列基因型的比较得到的扩增产物大小的变化，可以检测缺失与插入，亲缘微生物优选的是同一属中不同的种，或者同一种中不同菌株。通过扩增 DNA 与标记 BASB118 多核苷酸序列的杂交，可以鉴定点突变。通过分别对 DNA 或
15 者 RNA 使用 Dnase 或者 Rnase 消化，或者通过测定融化温度或者复性动力学的不同，可以区分完全或者很大程度上匹配的序列与不完全或者很大程度上不匹配的双螺旋。通过多核苷酸片段在凝胶中，与对照序列相比电泳迁移率的变化，也可以检测多核苷酸序列的不同。这可以使用或者不使用变性剂进行。通过直接 DNA 或者 RNA 测序，也可以
20 检测多核苷酸的不同，参见例如，Myers 等，科学 (Science)，230: 1242 (1985)。通过核酸酶保护分析，例如 Rnase、V1 和 S1 保护分析，或者化学剪切方法，也可以显示特殊位置的序列改变。参见例如，Cotton 等，美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA)，85: 4397-4401 (1985)。

25 在另一个实施方案中，可以构建含有 BASB118 核酸序列或者其片段的一批寡核苷酸探针，进行有效筛选，例如，遗传突变、血清型、分类学分类或者鉴定的筛选。阵列技术方法是熟知的，具有全面的适用性，并且可以用于各种分子遗传学问题，包括基因表达、遗传连锁和遗传多样性 (参见例如，Chee 等，科学 (Science)，274: 610
30 (1996))。

因此，本发明的一个方面涉及含有以下组分的诊断试剂盒：

(a) 本发明的多核苷酸，优选的是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列，或

者其片段;

(b) 与 (a) 的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

(c) 本发明的多肽, 优选的是 SEQ ID NO: 2 的多肽, 或者其片段;
或者

5 (d) 本发明多肽的抗体, 优选的是 SEQ ID NO: 2 多肽的抗体。

更明白在任何这种试剂盒中, (a), (b), (c), (d) 可以含有大量成分。其中, 这种试剂盒在诊断疾病或者疾病易感性中是有用的。

本发明也涉及本发明多核苷酸作为诊断试剂的用途。本发明多核苷酸的突变形式, 优选的是 SEQ ID NO: 1 的突变形式, 其与疾病或者致病性有关, 为诊断提供了一种诊断工具, 该工具可以增加或者确定疾病诊断、疾病过程预后、疾病阶段确定、或者疾病易感性, 这是由于多核苷酸的低表达、过量表达或者变化表达引起的。在多核苷酸水平上, 通过各种技术, 例如此处其他部分描述的那些技术, 可以检测携带有这些多核苷酸突变体的微生物, 特别是有感染力的微生物。

15 在多核苷酸或者多肽水平上, 通过各种技术, 例如血清分型技术, 也可以检测携带有本发明多核苷酸和/或多肽突变体或者多态性(等位基因变体)的微生物细胞。例如, 可以使用 RT-PCR 检测 RNA 突变。特别优选的是结合自动检测系统使用 RT-PCR, 例如像是 GeneScan 这样的。RNA, cDNA 或者基因组 DNA 也可以用于同样的目的, PCR。作为一个实施例, 可以使用与编码 BASB118 多肽的多核苷酸互补的 PCR 引物, 鉴定和分析突变体。

25 本发明进一步提供从 5' 和/或 3' 端除去 1, 2, 3 或者 4 个核苷酸的引物。其中, 这些引物可以用于扩增分离的 BASB118 DNA 和/或 RNA, 这些分离的核酸来自个体样品, 例如机体物质。可以使用引物扩增从感染个体分离的多核苷酸, 从而多核苷酸可以用于各种阐明多核苷酸序列的技术。按这种方法, 可以检测多核苷酸序列的突变, 并且可以使用这些突变诊断和/或预后感染或者其阶段或者过程或者血清型和/或把感染病因分类。

30 本发明进一步提供了诊断疾病的方法, 优选的是细菌感染, 更优选的是粘膜炎莫拉氏菌造成的感染, 该方法包括, 从来自个体的样品, 例如来自机体物质的样品, 确定具有 SEQ ID NO: 1 序列多核苷酸提高的表达水平。可以使用任何技术上熟知的多核苷酸定量方法, 例如,

像是扩增、PCR、RT-PCR、RNA 酶保护、Northern 杂交、分光法和其他杂交方法，测量 BASB118 多核苷酸增高的或者减少的表达。

另外，依照本发明用于检测 BASB118 多肽相对于正常对照组织样品过量表达的诊断分析，可以用于检测，例如感染的存在。用于确定
5 来自宿主样品，例如来自机体物质样品中的 BASB118 多肽水平的分析技术，对于本领域技术人员是公知的。这些分析方法包括放射免疫分析、竞争结合分析、Western 杂交分析、抗体夹心分析、抗体检测和 ELISA 分析。

本发明多核苷酸可以用作多核苷酸分析的组分，优选的是高密度
10 阵列或者格栅(grid)。这些高密度阵列对于诊断和预后目的特别有用。例如，使用得自或者来自机体样品的探针，各自含有不同基因的一系列点，并且进一步含有本发明一条或者多条多核苷酸，可以用于探测，例如使用杂交或者核酸扩增，以确定特殊多核苷酸序列或者相关序列在个体中的存在。这种存在可以指示病原体的存在，特别是粘
15 膜炎莫拉氏菌，并且在疾病或者疾病过程的诊断和/或预后中也是有用的。含有许多 SEQ ID NO:1 序列多核苷酸变体的格栅是优选的。含有许多编码 SEQ ID NO:2 多肽序列的多核苷酸序列变体的格栅，也是优选的。

抗体

20 本发明的多肽和多核苷酸或者其变体，或者表达这些物质的细胞，都可以用作产生分别对这些多肽或者多核苷酸具有免疫特异性抗体的免疫原。术语“免疫特异性”是指，抗体与本发明多肽的亲合力，比它与已知技术中的其他相关多肽的亲合力强很多。

在本发明的某些优选实施方案中，提供了抗 BASB118 多肽或者多
25 核苷酸的抗体。

通过操作本发明多肽和/或多核苷酸，或者其带有抗原决定簇的片段，其类似物，或者表达它们的细胞，使用常规技术，在动物中，优选的是非人类的动物，可以得到针对本发明多肽或者多核苷酸产生的
30 抗体。为了制备单克隆抗体，可以使用任何提供通过连续细胞系培养产生抗体的本领域已知的技术。实施例包括各种各样的技术，例如 Kohler, G. 和 Milstein, C., 自然(Nature) 256: 495-497 (1975); Kozbor 等, 今日免疫学(Immunology Today) 4: 72 (1983); Cole

等, pg. 77-96 单克隆抗体和癌症治疗 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY), Alan R. Liss, Inc. (1985)中的那些技术。

生产单链抗体的技术 (美国专利 No. 4,946,778) 适合生产本发明多肽或者多核苷酸的单链抗体。并且, 转基因小鼠, 或者其他生物体或者动物, 例如其他哺乳动物, 可以用于表达对本发明多肽或者多核苷酸免疫特异的人源抗体。

另外, 也可以使用噬菌体展示技术, 从为含有抗-BASB118 而筛选的 PCR 扩增的人体淋巴细胞 v-基因库中, 或者天然文库中, 选择具有与本发明多肽结合活性的抗体基因 (McCafferty, 等, (1990), 自然 (Nature) 348, 552-554; Marks, 等, (1992) 生物技术 (Biotechnology) 10, 779-783)。通过例如链改组也能改善这些抗体的亲和性 (Clackson 等, (1991) 自然 (Nature) 352: 628)。

上述抗体可以用于分离或者鉴定表达本发明多肽或者多核苷酸的克隆, 例如通过亲和层析纯化多肽或者多核苷酸。

因此, 在其中, 可以使用抗 BASB118-多肽或者 BASB118-多核苷酸的抗体治疗感染, 特别是细菌感染。

多肽变体包括, 抗原等价物变体、抗原决定簇等价物变体或者免疫等价物变体, 构成本发明的一个特殊方面。

优选的, 修饰抗体或者其变体, 使之在个体中免疫原性更小。例如, 如果个体是人体, 抗体可以最优选的被“人源化”, 其中互补决定区或者来自杂交瘤抗体的区域已经被移植到人体单克隆抗体中, 例如描述于 Jones 等 (1986), 自然 (Nature) 321, 522-525 或者 Tempest 等, (1991) 生物技术 (Biotechnology) 9, 266-273 中的。

拮抗剂和激动剂 - 分析和分子

本发明多肽和多核苷酸可以用于估定, 在例如细胞、无细胞制备物、化学库和天然产物混合物中, 小分子底物与配体的结合。这些底物和配体可以是天然底物和配体, 或者是结构或者功能类似物。参见例如, Coligan 等, 当代免疫学方法 (Current Protocols in Immunology) 1(2): 第 5 章 (1991)。

依靠直接或者间接与候选化合物结合的标记, 筛选方法可以简单地测定候选化合物与多肽或者多核苷酸的结合, 或者与带有多肽或者多核苷酸的细胞或者膜结合, 或者与多肽的融合蛋白结合。另外, 筛

选方法可以包括与标记竞争物的竞争。另外，使用适合于含有多肽或者多核苷酸细胞的检测系统，这些筛选方法，可以检验候选化合物是否会导致通过激活或者抑制多肽或者多核苷酸而产生信号。通常在已知激动剂存在时分析活性抑制剂，并且通过已知激动剂的存在，观测激动剂对于活性的作用。在激动剂或者抑制剂不存在的情况下，通过检验候选化合物是否导致多肽或者多核苷酸活性的抑制，视情况而定，组成型活性多肽和/或组成型表达多肽和多核苷酸，可以用于对相反激动剂或者抑制剂的筛选方法。另外，筛选方法可以简单地包括这些步骤：在含有多肽或者多核苷酸的溶液中混合候选化合物以形成混合物，测定混合物中 BASB118 多肽和/或多核苷酸的活性，以及相对于标准，比较混合物中 BASB118 多肽和/或多核苷酸的活性。如此处所描述的融合蛋白，例如由 Fc 部分和 BASB118 多肽制造的那些融合蛋白，也可以用于高产筛选分析，该高产筛选分析可以鉴定本发明多肽的拮抗剂，以及系统发生和/或功能相关多肽的拮抗剂(参见 D. Bennett 等，分子识别杂志 (J Mol Recognition), 8: 52-58 (1995); 和 K. Johanson 等，生物化学杂志 (J Biol Chem), 270(16): 9459-9471 (1995))。

与本发明多肽结合和/或相互作用的多核苷酸、多肽和抗体，也可以用于配置筛选方法，该筛选方法用于检测添加的化合物对于细胞中 mRNA 和/或多肽产生的作用。例如，可以构建 ELISA 分析，使用单克隆或者多克隆抗体，通过本领域已知的标准方法来测量多肽的分泌或者细胞结合水平。这可以用于从适合操作的细胞或者组织中，发现抑制或者增强多肽生产的物质（也分别称作拮抗剂和激动剂）。

本发明也提供了筛选化合物的方法，特别是那些抑菌的和/或杀菌的化合物，该方法可以鉴定那些增强（激动剂）或者阻滞（拮抗剂）BASB118 多肽或者多核苷酸功能的化合物。筛选技术可以包括高产量技术。例如，为了筛选激动剂或者拮抗剂，在可能是 BASB118 激动剂或者拮抗剂的候选分子存在或者不存在地情况下，孵育含有 BASB118 多肽和该多肽标记底物或者配体的合成反应混合物、像膜这样的细胞区室、细胞包膜或者细胞壁、或者它们的制备物。候选分子激动或者拮抗 BASB118 多肽的能力，反映在标记配体结合的减少或者从该底物产生产物产量的减少。义务结合分子，即不诱导 BASB118 多肽作用

5 的分子，最有可能是好的拮抗剂。结合好的分子，并且视情况而定，可以增加从底物产生产物的速率、增加信号传导、或者增加化学通道活性的分子，是激动剂。速率的测定，或者视情况而定，从底物产生产物的效率、信号传导、或者化学通道活性的测定，都可以使用报告系统得以增强。在这点上有用的报告系统，包括但是不仅仅局限于，比色分析、转化成产物的标记底物、负责改变 BASB118 多核苷酸或者多肽活性的报告基因、以及本领域已知的结合分析。

10 BASB118 激动剂分析的另一个实施例是竞争分析，该分析在合适条件下，为了竞争抑制分析，结合 BASB118 和 BASB118 结合分子的潜在激动剂，重组 BASB118 结合分子，天然底物或者配体，或者底物或者配体的模拟物。BASB118 可以使用例如放射性或者比色混合物标记，例如可以准确确定与结合分子结合的 BASB118 分子或者转化为产物的 BASB118 分子，从而估定潜在拮抗剂的效力。

15 潜在拮抗剂其中包括，与本发明多核苷酸和/或多肽结合，并从而抑制或者消除其活性或者表达的有机小分子、肽、多肽和抗体。潜在拮抗剂，也可以是像是与结合分子在相同位点结合的紧密相关蛋白质或者抗体这样的有机小分子、肽、多肽和抗体，例如这样的结合分子，该分子不诱导 BASB118 诱导的活性，从而通过排除 BASB118 多肽和/或多核苷酸的结合，阻止 BASB118 多肽和/或多核苷酸的功能或者表达。

20 潜在拮抗剂包括这样的小分子，该小分子结合并且占据多肽的结合位点，从而与细胞结合分子结合，以致阻止正常生物活性。小分子的实施例包括但是不仅仅局限于，有机小分子、肽和肽相似分子。其他潜在拮抗剂包括反义分子（关于这些分子的描述，参见 Okano, 神经化学杂志 (J. Neurochem.) 56: 560 (1991); 寡脱氧核苷酸作为基因表达的反义抑制剂 (OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION), CRC Press, Boca Raton, FL (1998)。优选的潜在拮抗剂包括与 BASB118 相关的化合物或者 BASB118 变体。

30 另一方面，本发明涉及遗传工程可溶性融合蛋白，该融合蛋白包含本发明多肽或者其片段，以及免疫球蛋白各亚类 (IgG, IgM, IgA, IgE) 重链或者轻链恒定区各个部分。优选的免疫球蛋白是，人体 IgG,

特别是 IgG1 重链的稳定部分，融合发生在铰链区。在一个特别优选的实施方案中，可以通过与剪切序列结合而简单地除去 Fc 部分，该剪切序列可以被凝血因子 Xa 剪切。另外，本发明涉及通过遗传工程制备这些融合蛋白的方法，并且涉及其药物筛选、诊断和治疗的用途。本发
5 明的另一方面涉及编码这种融合蛋白的多核苷酸。融合蛋白技术的实施例可以在国际专利申请 Nos. W094/29458 和 W094/22914 中找到。

此处提供的每条多核苷酸序列，都可以用于发现和开发抗菌化合物。编码的蛋白质，一旦表达，便可以用作筛选抗菌药物的目标。另外，这样的多核苷酸可以用于构建控制感兴趣编码序列表达的反义序
10 列，该多核苷酸编码被编码蛋白质氨基末端区域，或者核糖体结合序列，或者有助于各个 mRNA 翻译的序列。

本发明也提供了，本发明的多肽、多核苷酸、激动剂或者拮抗剂在干扰病原体与真核的导致感染后遗症的宿主之间初始物理相互作用中的用途，优选的是哺乳动物的这种宿主。特别的，本发明分子可以
15 用于：阻止细菌粘着，特别是革兰氏阳性和/或革兰氏阴性细菌与真核的，优选的是哺乳动物的细胞外基质蛋白内藏装置之间，或者与伤口处的细胞外基质蛋白之间的粘着；阻止真核的，优选的是哺乳动物的细胞外基质蛋白与介导组织损伤的细菌 BASB118 蛋白之间的细菌粘着，和/或；通过植入内藏装置或者通过其他手术技术，阻止初始感染的致病原因的正常发展。
20

同样依照本发明的另一方面，提供了 BASB118 激动剂和拮抗剂，优选的是抑菌的或者杀菌的激动剂和拮抗剂。

本发明的激动剂和拮抗剂可以用于，例如阻止、抑制和/或治疗疾病。

25 另一方面，本发明涉及本发明多肽的 mimotope. mimotope 是一段肽序列，与天然肽（在序列上或者结构上）有充分的相似性，它能够被识别天然肽的抗体所识别；或者当与合适的载体结合时，能够产生可识别天然肽的抗体。

可以为了特殊的目的，通过添加、缺失或者替换所选择氨基酸，
30 可以设计肽的 mimotope。因此，为了使与蛋白质载体的结合容易，可以对肽进行修饰。例如，对某些化学结合方法来说，包含末端半胱氨酸是值得做的。另外，对结合到蛋白质载体上的肽来说，在肽的结合

末端包含疏水末端也是值得做的，这样肽游离的未结合末端保持与载体蛋白质表面的结合。因此，肽以这样的构像存在，该构像与在全部天然分子环境中发现的构像最相似。例如，可以改变肽使之具有 N-末端半胱氨酸和 C-末端酰胺化疏水尾部。另外，可以对一个或者多个氨基酸的 D-立体异构体形式进行添加或者取代，从而创造有益的衍生物，例如增加肽的稳定性。

另外，可以使用抗体鉴定肽的 mimotope，使用像是噬菌体展示技术 (EP 0 552 267 B1) 这样的技术，这些抗体自身可以与本发明多肽结合。该技术产生大量与天然肽结构相似的肽序列，并且因此能够结合抗天然肽的抗体，但是它们自身没有必要与天然多肽共有很大程度的序列同源性。

疫苗

本发明另一方面涉及在个体中诱导免疫反应的方法，特别是在哺乳动物中，优选的是在人体中，该方法包括对个体接种 BASB118 多核苷酸和/或多肽或者其片段或者变体，足以产生保护该个体免于感染的抗体和/或 T 细胞免疫反应，特别是细菌感染和最特别的是粘膜炎莫拉氏菌感染。也提供了这样的方法，由此这种免疫反应减慢细菌的复制。而本发明的另一方面，涉及在个体中诱导免疫反应的方法，为了在体内表达 BASB118 多核苷酸和/或多肽或者其片段或者变体，为了保护该个体免除疾病，优选的是人体，无论该疾病是否已经在个体中建立，诱导免疫反应，例如产生抗体和/或 T 细胞免疫反应，包括例如产细胞因子 T 细胞或者细胞毒性 T 细胞，该方法包括给这些个体递送核酸载体、序列或者核酶，以指导 BASB118 多核苷酸和/或多肽或者其片段或者变体表达。施用这些基因的一个实施例是，将其作为颗粒的包被或者其他东西，加速其进入所需细胞。这些核酸载体可以包括 DNA、RNA、核酶、修饰核酸、DNA/RNA 杂交体、DNA-蛋白质复合体或者 RNA-蛋白质复合体。

本发明的另一方面涉及免疫组合物，当被导入个体，特别是人体时，该组合物能够在其中诱导免疫反应，在该个体中，诱导针对 BASB118 多核苷酸和/或由此编码多肽的免疫反应，其中该组合物包括重组 BASB118 多核苷酸和/或由其编码的多肽，和/或包括编码并表达该 BASB118 多核苷酸、由其编码的多肽、或者本发明的其他多肽的抗原

的 DNA 和/或 RNA。免疫反应可以用于治疗或者疾病预防，并且可以采取抗体免疫和/或细胞免疫的形式，例如由 CTL 或者 CD4+ T 细胞发生的细胞免疫。

5 BASB118 多肽或者其片段，可以与辅蛋白或者化学部分融合，这些辅蛋白或者化学部分虽然自身可以或者不可以产生抗体，但是能够稳定第一蛋白，并且产生具有抗原性和/或免疫原性，以及优选的保护特性的融合或者修饰蛋白。因此融合重组蛋白，优选的进一步包含抗原性辅蛋白，例如来自流感嗜血杆菌的脂蛋白 D，谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 或者 β -半乳糖苷酶，或者可以稳定蛋白质和有助于其生产与
10 纯化的其他任何相关的大的辅蛋白。另外，从对接受蛋白的生物体免疫系统提供全身性刺激来说，辅蛋白可以作为佐剂。辅蛋白可以结合到第一蛋白的氨基端或者羧基端。

根据本发明的疫苗组合物中，BASB118 多肽和/或多核苷酸，或者其片段，或者其 mimotope，或者其变体，都可以存在于载体中，例如
15 像是活的细菌载体那样的前述活的重组载体。

BASB118 多肽的非活载体也是合适的，例如细菌外膜囊泡或者“泡 (bleb)”。OM 泡来自革兰氏阴性菌双层膜外膜，并且被记载于许多革兰氏阴性细菌中 (Zhou, L 等 1998. FEMS 微生物快报 (FEMS Microbiol. Lett.) 163: 223-228)，包括 *C. trachomatis* 和 *C. psittaci*。被报道可以产生泡的细菌病原体的一份不详尽清单也包括：
20

百日咳博德特氏杆菌，布氏疏螺旋体，马尔他布鲁氏菌，绵羊布鲁化菌，大肠埃希氏杆菌，流感嗜血杆菌，侵肺军团菌，粘膜莫拉氏菌，淋病奈瑟氏球菌，脑膜炎奈瑟氏球菌，铜绿假单胞菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌。
25

泡具有可以提供天然构象外膜蛋白的优势，因此对于生产疫苗特别有用。通过工程改造细菌，从而改变一种或者多种外膜分子的表达，泡也可以经改进而用作疫苗用途。因此，可以引导或者上调 (例如，通过改变启动子)，例如所需免疫原性蛋白在外膜的表达，例如 BASB118
30 多肽。另外，也可以下调不相关 (例如，非保护性抗原，或者免疫显性但是易变的蛋白质) 或者有害的 (例如，毒性分子，像是 LPS，或者自身免疫反应的潜在诱导物) 外膜蛋白的表达。这些方法在下面有更

详细的讨论。

BASB118 基因两侧非编码区域，含有对于基因表达重要的调节元件。这种调节发生在转录和翻译水平上。在基因可读框的上游或者下游的这些区域的序列，可以通过 DNA 测序得到。这些序列信息允许确定潜在的调节基元，例如不同的启动子元件、终止子序列、诱导序列元件、阻抑物、负责相转变的元件、核糖体结合序列、具有潜在二级结构的参与调节的区域，以及其他类型的调节基元或者序列。该序列是本发明的另一个方面。

这些序列信息允许调节 BASB118 基因的天然表达。通过改变启动子、核糖体结合序列、潜在的阻抑物或者操纵基因元件、或者其他相关元件，可以实现基因表达的正调节。同样的，通过相似类型的调节，可以实现表达的负调节。另外，通过改变相改变序列，可以把基因的表达置于相改变的控制之下，或者将其与该调节分开。在另一种方法中，基因表达可被置于一个或者多个调节表达的诱导元件的控制之下。这种调节的实施例包括，但是不仅仅局限于，通过温度变化调节，添加与所选糖类或者其衍生物相似的诱导底物，微量元素、维生素、辅因子、金属离子，等等。

上述这些调节，可以通过几种不同的方法导入。参与基因表达的序列调节，可以通过随机突变，及随后筛选所需的表型，而在体内进行。另一种方法包括，分离感兴趣的区域，通过随机诱变或者定点替换、插入或者缺失突变，对该区域进行修饰。然后，通过同源重组可以把调节区域再次导入细菌基因组，并且可以估计它对基因表达的作用。在另一种方法中，可以使用感兴趣区域的序列知识，替换或者缺失全部或者部分天然调节序列。在这种情况下，为了从其他基因，来自不同基因的调节元件组合，合成调节区域，或者任何其他调节区域，获得调节元件，或者为了缺失野生型调节序列的所选部分，需要分离并修饰目标调节区域。这些经修饰的序列，通过同源重组可以被再次导入细菌基因组。可用于基因表达正调节的优选启动子的一份不详尽清单包括，来自淋病奈瑟氏球菌 (*N. meningitidis*) 或者脑膜炎奈瑟氏球菌 (*N. gonorrhoeae*) 的启动子 *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *1st*, *hpuAB*; 来自粘膜炎莫拉氏菌 (*M. Catarrhalis*) 的启动子 *ompCD*, *copB*, *lbpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; *TbpB*; 来自流感嗜血杆菌的启动

子 p1, p2, p4, p5, p6, 1pD, tbpB, D15, Hia, Hmw1, Hmw2。

在一个实施例中，通过将其启动子与一个更强的启动子进行交换（通过分离基因的上游序列，对该序列进行体外修饰，并通过同源重组将其再次引入基因组），可以调节基因表达。在细菌中，以及在从
5 细菌脱落（或者制得）的外膜囊泡中，都可以获得上调的表达。

在另一个实施例中，所述方法可以用于产生重组细菌菌株，该菌株可以增强疫苗应用的特性。这些菌株可以是，但是不仅仅局限于，减毒菌株，提高所选抗原的表达的菌株，敲除（或者减少表达）干扰免疫反应基因的菌株，可以调节免疫优势蛋白质表达的菌株，可以调
10 节外膜囊泡脱落的菌株。

因此，本发明也提供了 BASB118 基因的一段经修饰上游区域，该经修饰上游区域含有改变位于外膜的 BASB118 蛋白表达水平的异源调节元件。根据本发明的这一方面，上游区域包括 BASB118 基因的上游序列。该上游区域直接起始于 BASB118 基因的上游，通常延续到基因
15 ATG 起始密码子上游小于大约 1000 bp 处。在基因位于多顺反子序列（操纵子）中的情况下，上游区域可以直接起始于感兴趣基因之前，或者操纵子中第一个基因之前。优选的，根据本发明的这一方面，经修饰的上游区域包含位于 ATG 上游 500 至 700 bp 之间的异源启动子。

因此，本发明提供了在经修饰细菌泡中的 BASB118 多肽。本发明
20 进一步提供了经修饰的宿主细胞，该细胞能够产生基于非活性膜的泡载体。本发明进一步提供了含有 BASB118 基因的核酸载体，该 BASB118 基因具有含有异源调节元件的经修饰上游区域。

本发明进一步提供了，根据本发明制备宿主细胞和细菌泡的方法。

25 本发明也提供了组合物，特别是疫苗组合物，以及包括本发明多肽和/或多核苷酸和免疫刺激 DNA 序列的方法，例如那些描述在 Sato, Y 等科学 (Science) 273: 352 (1996) 中的方法。

本发明也提供了，在粘膜莫拉氏菌感染的动物模型中，遗传免疫试验所使用的多核苷酸构建中，使用所述多核苷酸或者其特殊片段的方法，这些多核苷酸或者其特殊片段编码细菌细胞表面蛋白的非变
30 化区域。这些试验，用于鉴定能够激发预后或者治疗免疫反应的蛋白质抗原决定簇特别有效。为了开发用于哺乳动物，特别是人体中，细

菌感染的预防物质或者治疗疗法，特别是粘膜炎莫拉氏菌感染，该方法被认为，为随后有特殊价值的单克隆抗体作了准备，该单克隆抗体来自成功抵抗或者清除感染的动物的必需器官。

5 本发明也包括疫苗制剂，该制剂包含结合合适载体的本发明的免疫原性重组多肽和/或多核苷酸，合适载体例如药学可接受载体。因为多肽和多核苷酸在胃中可以降解，所以它们优选的进行非肠道用药，包括例如，皮下、肌内、静脉内或者皮内用药。适合非肠道用药的制剂包括，消毒的含水或者不含水注射溶液，这些溶液可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌化合物和溶质，其中溶质使制剂与个体的体液等渗，
10 优选的是血液；消毒的含水或者不含水的悬浮液，该悬浮液可以包括悬浮剂或者增稠剂。制剂可以是单剂量或者剂量的包装，例如，密封的安瓿和小瓶，并且可以在冻干的条件下储存，只需在使用前加入消毒的液体载体。

15 本发明的疫苗制剂也包括用于增强制剂免疫原性的佐剂系统。优选的佐剂系统优先激发 TH1 型反应。

免疫应答可以概括的划分为两个极端种类，即体液或者细胞介导的免疫应答（其传统特征分别是保护机制的抗体效应物和细胞效应物）。应答的这些种类分别称作 TH1-型应答（细胞介导应答）和 TH2-型免疫应答（体液应答）。

20 极端 TH1-型免疫应答的特征是，产生抗原特异的单元型限制的细胞毒性 T 淋巴细胞，以及天然杀伤细胞应答。鼠的 TH1-型应答的特征通常是，产生 IgG2a 亚型抗体，相应于人体中的 IgG1 型抗体。TH2-型免疫应答的特征是，产生大范围的免疫球蛋白同种型，包括鼠中的 IgG1、IgA 和 IgM。

25 发展这两种类型免疫应答背后的驱动力，可以认为是细胞因子。高水平的 TH1-型细胞因子，倾向于促成针对所给抗原的细胞介导免疫应答的诱导，而高水平的 TH2-型细胞因子，倾向于促成针对所给抗原的体液免疫应答的诱导。

30 TH1 和 TH2-型免疫应答的划分不是绝对的。实际中，个体忍受的免疫应答可以被描述为 TH1 占优势或者 TH2 占优势。然而，按照 Mosmann 和 Coffman 描述的鼠 CD4⁺ T 细胞克隆（Mosmann, T. R. 和 Coffman, R. L. (1989) TH1 和 TH2 细胞：导致不同功能性质的细

胞因子分泌的不同模式 (TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.) 免疫学综述年报 (Annual Review of Immunology), 7, p145-173) 考虑细胞因子家族, 常常是很合适的。惯例的, TH1-型应答是与 T-淋巴细胞产生 INF- γ 和 IL-2 联系在一起的。其他经常与 TH1-型免疫应答诱导直接相关的细胞因子, 不是 T-细胞产生的, 例如 IL-12。相反的, TH2-型应答与 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-13 的分泌是相关的。

已知某些疫苗佐剂特别适合于刺激 TH1 或者 TH2-型细胞因子应答。接种疫苗或者感染之后, 免疫应答 TH1:TH2 平衡传统的最好指标包括, 用抗原重复刺激之后, 体外直接测定 T 淋巴细胞产生的 TH1 或者 TH2 细胞因子, 和/或测定抗原特异性抗体应答的 IgG1:IgG2a 比率。

因此, TH1-型佐剂是这样的佐剂, 它在体外用抗原重复刺激时, 优先刺激分离的 T-细胞群体产生高水平的 TH1-型细胞因子, 并且促进 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞的发育和与 TH1-型同种型相关的抗原特异性免疫球蛋白应答的发展。

能够优先刺激 TH1 细胞应答的佐剂, 描述于国际专利申请 No. WO 94/00153 和 WO 95/17209。

3 去氧-酰化单磷酸脂 A (3D-MPL) 是一种这样的佐剂。这是从 GB 2220211 (Ribi) 已知的。化学上, 它是具有 4, 5 或者 6 酰化链的 3 去氧-酰化单磷酸脂 A 的混合物, Ribi Immunochem. Mantana 制造。3 去氧-酰化单磷酸脂 A 的优选形式公布于欧洲专利 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA)。

优选的, 3D-MPL 颗粒是足够小的, 小到可以通过 0.22 微米膜除菌 (欧洲专利 0 689 454)。3D-MPL 以每剂量 10 μ g-100 μ g 的范围优选 25-50 μ g 出现, 其中抗原典型的是出现在每剂量 2-50 μ g 范围。

另一种优选的佐剂包含 QS21, 来自 Quillaja Saponaria Molina 树皮的一种 Hplc 纯化的无毒部分。可以选择将其与 3 去氧-酰化单磷酸脂 A (3D-MPL) 混合, 也可以选择连同载体一起使用。

生产 QS21 的方法公开于美国专利 No. 5, 057, 540。

含有 QS21 的无反应原性佐剂配方, 在前面有描述 (WO 96/33739)。含有 QS21 和胆固醇的该配方, 当与抗原一起配制时, 表明是成功的 TH1

刺激佐剂。

优先刺激 TH1 细胞应答的其他佐剂，包括免疫调节寡聚核苷酸，例如在 WO 96/02555 中公开的未甲基化 CpG 序列。

也涉及不同 TH1 刺激佐剂的组合，例如那些在上文提到的，提供
5 TH1 细胞应答优先刺激剂的佐剂。例如，QS21 可以与 3D-MPL 一起配制。QS21 : 3D-MPL 的比率，典型的是在 1:10 和 10:1 之间，优选的是在 1 : 5 和 5 : 1 之间，经常基本上是 1 : 1。最佳增效作用的优选范围是 3D-MPL : QS21 是 2.5 : 1 至 1 : 1。

10 优选地，根据本发明的疫苗组合物中也存在载体。载体可以是水包油乳状液，或者铝盐，例如磷酸铝或者氢氧化铝。

优选的水包油乳状液包含可以可代谢的油，例如角鲨烯、 α 生育酚和 Tween 80。根据本发明一个特别优选的方面，疫苗组合物中的抗原，结合了在该乳状液中的 QS21 和 3D-MPL。另外，水包油乳状液可以含有 span 85 和/或卵磷脂和/或辛酸甘油酯。

15 对于人体用药来说，在疫苗中存在的 QS21 和 3D-MPL 典型地是，每剂量在 $1\ \mu\text{g} - 200\ \mu\text{g}$ 范围内，例如 $10 - 100\ \mu\text{g}$ ，优选的是在 $10\ \mu\text{g} - 50\ \mu\text{g}$ 。典型的水包油含有 2 - 10% 的角鲨烯，2 - 10% 的 α 生育酚，以及 0.3 - 3% 的 tween 80。优选的角鲨烯 : α 生育酚比率是等于或者小于 1，这便提供了更稳定的乳状液。Span 85 可以出现在 1%
20 的水平上。有些情况下，本发明疫苗进一步含有稳定剂是有利的。

无毒的水包油乳状剂，优选的在水质载体中，含有无毒的油，例如角鲨烯或者角鲨烯，乳化剂，例如 Tween 80。水质载体可以是，例如磷酸缓冲盐水。

一种特别有效的佐剂配方，在水包油乳状液中含有 QS21、3D-MPL
25 和生育酚，描述于 WO 95/17210。

本发明也提供多价疫苗组合物，它含有本发明疫苗配方与其他抗原的组合，特别是用于治疗癌症、自身免疫疾病和相关疾病的抗原。这种多价疫苗组合物可以包括如在上文中描述的 TH-1 诱导佐剂。

30 本发明被描述为是关于某些 BASB118 多肽和多核苷酸的，可以理解为这覆盖了天然存在的多肽和多核苷酸片段，以及经过添加、缺失和替换，但是基本上没有影响重组多肽或者多核苷酸免疫原性的相似多肽和多核苷酸。

组合物、试剂盒和用药

本发明的另一方面提供了，包含给单细胞或者多细胞生物体用药的 BASB118 多核苷酸和/或 BASB118 多肽的组合物。

5 本发明也涉及含有此处讨论的多核苷酸和/或多肽或者它们的激动剂或者拮抗剂的组合物。本发明的多肽和多核苷酸可以与用于细胞、组织或者生物体的未消毒或者消毒的载体结合使用，例如适用于个体给药的合适配药载体。这些组合物含有，例如，介质添加剂或者有效治疗剂量的本发明多肽和/或多核苷酸，以及药物可接受载体或者赋形剂。这些载体包括，但是不仅仅局限于，盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇以及它们的组合。制剂应该适合用药方式。本发
10 明进一步涉及诊断的和药物的包和试剂盒，这种包和试剂盒，包含一个或者多个装有一种或者多种本发明前述组合物中成分的容器。

本发明的多肽、多核苷酸和其他化合物，可以单独使用或者与其他化合物结合使用，例如治疗化合物。

15 可以以任何有效方便的方式对药物组合物进行用药，这些方式在其中包括，例如，局部的、口服的、肛门的、阴道的、静脉内的、腹膜内的、肌肉内的、皮下的、鼻内的或者真皮下的给药途径。

在治疗中或者作为预防药，活性药剂可以作为可注射组合物给个体用药，例如作为消毒的水分散剂，优选的是等渗的。

20 另一方面，本发明提供了这样的药物组合物，该药物组合物包含治疗有效剂量多肽和/或多核苷酸，例如本发明多肽和/或多核苷酸的可溶性形式，激动剂或者拮抗剂肽或者小分子化合物，并且结合药物可接受载体或者赋形剂。这些载体包括，但是不仅仅局限于，盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇以及它们的组合。本发明进一步
25 涉及诊断的和药物的包和试剂盒，这种包和试剂盒，包含一个或者多个装有一种或者多种本发明前述组合物中成分的容器。本发明的多肽、多核苷酸和其他化合物，可以单独使用或者与其他化合物结合使用，例如治疗化合物。

30 组合物要适合给药途径，例如全身或者口服途径。全身给药的优选方式包括注射，典型的是静脉注射。也可以使用其他注射途径，例如皮下的、肌肉内的或者腹膜内的。全身用药的其他方式，包括使用渗透剂的粘膜渗透和皮肤渗透用药，渗透剂例如胆盐或者梭链孢酸或

者其他去垢剂。另外，如果本发明的多肽或者其他化合物可以用于肠道或者胶囊配方，那么口服用药也是可以的。这些化合物的用药也可以是局部的，以药膏、软膏、凝胶、溶液、粉末以及其他类似的形式。

给哺乳动物，特别是人体用药，活性药剂的每日剂量水平预期是
5 0.01 mg/kg 至 10 mg/kg，典型的大约是 1 mg/kg。无论如何，应该由医生来确定实际剂量，该剂量最适合于个体并且随年龄、体重和特殊个体的反应而变化。上述剂量是一般情况的实施例。当然，也存在适合更高或者更低剂量范围的个体情况，这些也在本发明的范围之内。

所需的剂量范围依赖于多肽的选择、用药途径、配方性质、受治
10 疗者条件的性质，以及主治医师的判断。然而，合适剂量在 0.1-100 μ g/kg 受治疗者的范围内。

疫苗组合物常规是以可注射形式存在的。常规佐剂可以用于增强免疫应答。疫苗合适的剂量单位是 0.5-5 微克/kg 抗原，该剂量优选的是给药 1-3 次，并间隔 1-3 周。在所指出的剂量范围内，不会观测
15 到本发明化合物有害的毒性作用，这些有害的毒性作用会妨碍对合适个体的用药。

然而，由于所用到的各种化合物以及各种用药途径的不同效能，可以预期所需剂量可以有很大的变化。例如，可以预期口服用药比静脉注射用药需要更高的剂量。可以使用最优化的标准经验程序，调节
20 这些剂量水平的变化，这在技术上是理解的。

序列数据库，有形介质中的序列，以及运算法则

多核苷酸和多肽序列，可以构成有价值的信息资源，用该资源可以确定它们的 2-维和 3-维结构，并且可以进一步鉴定类似同源物的序列。通过把这些序列储存在计算机可读的介质中，然后在已知的大分子结构程序中使用这些已储存的数据，或者使用熟知的搜索工具搜索
25 序列数据库，例如 GCG 程序包，可以使这些方法更容易。

本发明也提供了序列或者链性质分析的方法，特别是对遗传序列或者编码蛋白质的序列。序列分析优选的方法包括，例如，序列同源分析方法，像是鉴定分析和相似性分析，DNA、RNA 和蛋白质结构分析，
30 序列汇编，生物分类学分析，序列基元分析，可读框确定，核酸碱基 calling，密码子使用分析，核酸碱基修整，以及测序色谱峰分析。

提供了一种基于计算机的方法进行同源性鉴定。该方法包括以下

步骤：在计算机可读介质中提供含有本发明多核苷酸序列的第一多核苷酸序列；将该第一多核苷酸序列，与至少一条用于鉴定同源性的第二多核苷酸或者多肽序列进行比较。

也提供了一种基于计算机的方法进行同源性鉴定，该方法包括以下步骤：在计算机可读介质中提供含有本发明多肽序列的第一多肽序列；将该第一多肽序列，与至少一条用于鉴定同源性的第二多核苷酸或者多肽序列进行比较。

本说明书描述中所引用的所有的出版物和参考文献，包括但是不仅仅局限于专利和专利申请，在此处通过引用全部结合在一起，这如同每一种出版物或者参考文献，在此处作为完全公开，都明确并且单独的被指出是通过引用而被结合的。任何本申请声明对其有优先权的专利申请，也用以上所述对出版物和参考文献的方式，通过引用被完全的结合于此。

定义

“同一性”，如本领域公知的，是指两条或者多条多肽序列之间或者两条或者多条多核苷酸序列之间的关系，视情况而定，可以通过序列比较测定。在技术上，“同一性”也指多肽或者多核苷酸序列之间序列相关性的程度，视情况而定，可以由这些序列链之间的匹配测定。“同一性”可以通过已知方法容易地计算，包括但是不仅仅局限于，描述于计算机分子生物学 (Computational Molecular Biology), Lesk, A. M., 编著, 牛津大学出版社, 纽约, 1988; 生物计算机处理：信息学和基因组课题 (Biocomputing: Informatics and Genome Projects), Smith, D. W., 编著, Academic Press, New York, 1993; 序列数据的计算机分析 (Computer Analysis of Sequence Data), 第 I 部分 Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编著, Humana Press, New Jersey, 1994; 分子生物学中的序列分析 (Sequence Analysis in Molecular Biology), Von Heine, G., Academic Press, 1987; 和序列分析引物 (Sequence Analysis Primer), Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编著 M Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo, H., 和 Lipman, D., SIAM 应用数学杂志 (J. Applied Math,), 48: 1073 (1988) 中的那些方法。设计测定同一性的方法，以便给出被测试序列之间最大的匹配。另外，测定同一性的方法编码于公开提供的计算机

程序中。测定两条序列之间同一性的计算机程序方法，包括，但是不仅仅局限于，GCG 程序包中的 GAP 程序 (Devereux, J., 等, 核酸研究 (Nucleic Acids Reseach) 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S. F. 等, 分子生物学杂志 (J. Molec. Biol.) 215: 403-410 (1990)), 以及 FASTA (Pearson 和 Lipman 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85; 2444-2448 (1988))。BLAST 程序家族，由 NCBI 和其他来源公开提供 (BLAST Manual, Altschul, S., 等, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 215: 403-410 (1990))。10 熟知的 Smith Waterman 运算法则也可以用于测定同一性。

多肽序列比较的参数包括以下这些：

运算法则：Needleman 和 Wunsch, 分子生物学杂志 (J. Mol Biol.) 48: 443-453 (1970)

比较介质：Henikoff 和 Henikoff 的 BLOSSUM62
15 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) 89: 10915-10919 (1992)

空位处罚：8

空位长度处罚：2

一个使用这些参数的有用程序，由 Genetics Computer Group,
20 Madison WI 作为 “gap” 程序公开提供。上述参数是肽序列比较的缺省参数 (连同末端空位没有处罚)。

多核苷酸序列比较的参数包括以下这些：

运算法则：Needleman 和 Wunsch, 分子生物学杂志 (J. Mol Biol.) 48: 443-453 (1970)

25 比较介质：匹配= +10, 不匹配= 0

空位处罚：50

空位长度处罚：3

提供：来自 Genetics Computer Group, Madison WI 的 “gap” 程序。这些是核酸序列比较的缺省参数。

30 多核苷酸和多肽 “同一性” 的优选含义，视情况而定，在以下 (1) 和 (2) 中提供。

(1) 多核苷酸实施方案，进一步包括包含这样多核苷酸序列的

分离的多核苷酸，该多核苷酸序列与 SEQ ID NO:1 对照序列有至少 50，60，70，80，85，90，95，97 或者 100% 的同一性，其中该多核苷酸序列可以与 SEQ ID NO:1 对照序列一致，或者与对照序列比较，包括某一特定整数数目的核苷酸改变，其中这种改变选自至少一个核苷酸
5 缺失、替换，包括转变和颠换，或者插入，而且其中这种改变可以发生在对照核苷酸序列的 5' 或者 3' 末端位置，或者末端位置间的任何位置，或者单独散布在对照序列核苷酸之间，或者以一个或者多个连续基团散布于对照序列中，并且这样确定该核苷酸改变的数目，即用 SEQ ID NO:1 中总核苷酸数，乘以定义百分同一性的整数除以 100，然后从
10 SEQ ID NO:1 总核苷酸数中减去该乘积，或者：

$$n_n < x_n - (x_n \cdot y)$$

其中 n_n 是核苷酸改变的数目， x_n 是 SEQ ID NO:1 中总核苷酸数， y 对于 50% 是 0.50，对于 60% 是 0.60，对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85，对于 90% 是 0.90，对于 95% 是 0.95，对于 97% 是 0.97，
15 对于 100% 是 1.00， \cdot 是乘法算子的符号，其中 x_n 和 y 的任何非整数乘积，在将其从 x_n 中减去之前，按去尾法变为整数。编码 SEQ ID NO:2 多肽的多核苷酸序列的改变，可以产生该编码序列中的无义、错义或者阅读框架漂移突变，并从而改变已发生这些改变的多核苷酸编码的多肽。

20 通过实施例的方式，本发明多核苷酸序列，可以与 SEQ ID NO:1 对照序列一致，即可以是 100% 的一致，或者与对照序列相比较，包括某一特定整数数目的核苷酸改变，从而百分比同一性小于 100% 同一性。这种改变选自至少一个核苷酸缺失、替换，包括转变和颠换，或者插入，而且其中这种改变可以发生在对照多核苷酸序列的 5' 或者 3'
25 末端位置，或者末端位置间的任何位置，或者单独散布在对照序列核酸之间，或者以一个或者多个连续基团散布于对照序列中。给定百分同一性的核酸改变的数目，由下列方法确定，即用 SEQ ID NO:1 中总核苷酸数，乘以定义百分同一性的整数除以 100，然后从 SEQ ID NO:1 总核苷酸数中减去该乘积，或者：

$$30 \quad n_n < x_n - (x_n \cdot y)$$

其中 n_n 是核苷酸改变的数目， x_n 是 SEQ ID NO:1 中总核苷酸数， y 是，例如对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85 等等， \cdot 是

乘法算子的符号，其中 x_n 和 y 的任何非整数乘积，在将其从 x_n 中减去之前，按去尾法变为整数。

(2) 多肽实施方案，进一步包括包含这样多肽的分离的多肽，该多肽序列与 SEQ ID NO: 2 对照多肽序列有至少 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 或者 100% 的同一性，其中该多肽序列可以与 SEQ ID NO: 2 对照序列一致，或者与对照序列比较，包括某一特定整数数目的氨基酸改变，其中这种改变选自至少一个氨基酸缺失、替换，包括保守和非保守替换，或者插入，而且其中这种改变可以发生在对照多肽序列的氨基-或者羧基-末端位置，或者末端位置间的任何位置，或者单独散布在对照序列氨基酸之间，或者以一个或者多个连续基团散布于对照序列中，并且这样确定该氨基酸改变的数目，即用 SEQ ID NO: 2 中总氨基酸数，乘以定义百分同一性的整数除以 100，然后从 SEQ ID NO: 2 总氨基酸数中减去该乘积，或者：

$$n_a < x_a - (x_a \cdot y)$$

其中 n_a 是氨基酸改变的数目， x_a 是 SEQ ID NO: 2 中总氨基酸数， y 对于 50% 是 0.50，对于 60% 是 0.60，对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85，对于 90% 是 0.90，对于 95% 是 0.95，对于 97% 是 0.97，对于 100% 是 1.00， \cdot 是乘法算子的符号，其中 x_a 和 y 的任何非整数乘积，在将其从 x_a 中减去之前，按去尾法变为整数。

通过实施例的方式，本发明多肽序列，可以与 SEQ ID NO: 2 对照序列一致，即可以是 100% 的一致，或者与对照序列相比较，包括某一特定整数数目的氨基酸改变，从而百分比同一性小于 100% 同一性。这种改变选自至少一个氨基酸缺失、替换，包括保守和非保守替换，或者插入，而且其中这种改变可以发生在对照多肽序列的氨基-或者羧基-末端位置，或者末端位置间的任何位置，或者单独散布在对照序列氨基酸之间，或者以一个或者多个连续基团散布于对照序列中。给定 % 同一性的氨基酸改变的数目，由下列方法确定，即用 SEQ ID NO: 2 中总氨基酸数，乘以定义百分同一性的整数除以 100，然后从 SEQ ID NO: 2 总氨基酸数中减去该乘积，或者：

$$n_a < x_a - (x_a \cdot y)$$

其中 n_a 是氨基酸改变的数目， x_a 是 SEQ ID NO: 2 中总氨基酸数， y 是，例如对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85 等等， \cdot 是

乘法算子的符号，其中 x_n 和 y 的任何非整数乘积，在将其从 x_n 中减去之前，按去尾法变为整数。

“个体”，当用在此处关于生物体时，是指多细胞真核生物，包括但是不仅仅局限于，后生动物、哺乳动物、ovid、牛、猿、灵长类
5 和人。

“分离的”是指“经过人手”使之从其天然状态改变，即，如果它存在于自然状态，将它从其原始环境中改变或者移动，或者既改变也移动。例如，如该术语此处所用的，天然存在于活的生物体中的多核苷酸或者多肽不是“分离的”，但是从其天然状态共存物质中分离
10 出的同样的多核苷酸或者多肽就是“分离的”。另外，通过转化、遗传操作或者其他任何重组方法，导入生物体的多核苷酸或者多肽是“分离的”，即便它仍然存在于该生物体中，该生物体可以是活的或者死的。

“多核苷酸”通常是指任何多核糖核苷酸或者多脱氧核糖核苷酸，可以是未修饰的 RNA 或者 DNA，或者修饰的 RNA 或者 DNA，包括单
15 链和双链区域。

“变体”是指不同于对照多核苷酸或者多肽，但是保留基本性质的多核苷酸或者多肽。多核苷酸的典型变体，其核苷酸序列不同于别的对照多核苷酸。变体核苷酸序列的改变，可以或者可以不改变对照
20 多核苷酸编码多肽的氨基酸序列。如下所述，核苷酸改变，可以导致对照序列所编码多肽的氨基酸替换、添加、缺失、融合和截短。多肽的典型变体，其氨基酸序列不同于别的对照多肽。通常，不同是有限的，从而使得对照多肽序列和变体，总的来说非常类似，并且在许多区域是一致的。变体可以在氨基酸序列上，通过一个或者多个任意组
25 合的替换、添加、缺失，而与对照多肽有所不同。替换或者插入的氨基酸残基，可以是或者可以不是遗传密码子编码的。多核苷酸或者多肽的变体可以是天然存在的，例如等位基因变体，或者它也可以是已知非天然存在的。多核苷酸和多肽的非天然存在变体，可以通过突变技术或者通过直接合成制得。

“疾病”是指由细菌感染造成的或者与细菌感染相关的任何疾
30 病，包括，例如，婴儿和儿童的中耳炎、老年人肺炎、鼻窦炎、医院感染和入侵性疾病、导致失聪的慢性中耳炎、中耳液体积存、听觉神经

受损、耽误语言学习、上呼吸道感染和中耳发炎。

实施例

以下实施例使用标准技术实现，除了另外详细描述的外，这些技术对于本领域技术人员来说是熟知的和常规的。实施例是说明性的，但是并不限制本发明。

5 实施例 1: 粘膜炎莫拉氏菌 ATCC 43617 菌株 BASB118 基因的 DNA 测序

粘膜炎莫拉氏菌 ATCC 43617 菌株 (也称作 MC2931 菌株) BASB118 基因的 DNA 序列，显示在 SEQ ID NO:1。BASB118 多核苷酸序列的翻译，显示在 SEQ ID NO:2。

10 实施例 2: 表达重组 BASB118 的质粒的构建

A: BASB118 克隆

用遗传工程分别向 MC-Lip10-Fn/t-RI (5' - AGG CAG AGG GAA TTC ATG CAT AAA ATG TAT CCT ACT AGT A - 3') [SEQ ID NO: 3] 正向扩增引物和 MC-Lip10RCh/t-Sal1 (5' - AGG CAG AGG GTC GAC TTA ATG
15 GTG ATG GTG ATG GTG GCT TAA TCG GTG ACG CTT GGC GGT CG - 3') [SEQ ID NO: 4] 反向扩增引物引入 EcoRI 和 SalI 限制性位点，允许把 PCR 产物定向克隆到大肠杆菌表达载体 pTLZ2 中，从而使 BASB118 蛋白能够作为在 C-末端含有 (His)₆ 亲和层析标记的融合蛋白而表达。根据制造商的说明书，可以通过使用基于硅胶的 spin 柱 (QiaGen)
20 的扩增反应，纯化 BASB118 PCR 产物。为了产生克隆所需的 EcoRI 和 SalI 末端，如制造商所 (Life Technologies) 推荐的，应随后用 EcoRI 和 SalI 限制性酶完全消化 PCR 产物。在第一步限制性消化之后第二步酶消化之前，用上述 spin 柱除盐并用无菌水洗脱，纯化 PCR 产物。在
25 与 pTLZ2 质粒连接之前，再次使用基于硅胶的 spin 柱纯化被消化的 DNA 片段。

B: 表达载体的产生

为了制备用于连接的 pTLZ2 表达质粒，类似的用 EcoRI 和 SalI 完全消化该质粒，然后按照制造商的指导，用牛肠磷酸酶 (CIP, ~0.02 单位/pmol 5'端, Life Technologies) 进行处理，以避免自身连接。
30 使用超过准备好的载体大约 5 倍摩尔的消化片段，设计连接反应。使用本领域熟知的方法，用 T4 DNA 连接酶 (~2.0 单位/反应, Life Technologies) 催化标准的 ~20 μl 连接反应 (~16℃, ~16 小时)。

根据本领域熟知的方法，使用连接的一个等分试样（ $\sim 5 \mu\text{l}$ ）转化电感受态 JM109 细胞。在 $\sim 1 \text{ ml}$ LB 肉汤培养基中 37°C 生长 $\sim 2\text{--}3$ 小时，将转化细胞涂布在含有氨苄青霉素（ $100 \mu\text{g/ml}$ ）的 LB 琼脂平板上。抗生素包含在筛选中。平板在 37°C 培养 ~ 16 小时过夜。使用消毒牙签

5 挑选单个的 ApR 克隆，用其“补丁”接种新鲜的 LB ApR 平板和 $\sim 1.0 \text{ ml}$ LB ApR 肉汤培养基。补丁平板和培养基在标准孵育箱（平板）或者水浴摇床中 37°C 培养过夜。使用基于全细胞的 PCR 分析，检验含有 BASB118 DNA 插入的转化物。此处，把 $\sim 1.0 \text{ ml}$ 过夜的 LB ApR 肉汤培养基转移到 1.5 ml 的聚丙烯管中，Beckmann 微型离心机（ ~ 3 分钟，

10 室温， $\sim 12,000 \times g$ ）离心收集细胞。细胞沉淀悬浮于 $\sim 200 \mu\text{l}$ 无菌水中，使用 $\sim 10 \mu\text{l}$ 等分试样，进行终体积为 $\sim 50 \mu\text{l}$ 的含有 BASB118 正向和反向扩增引物的 PCR 反应。除了使用 ~ 5.0 单位的 Tag 聚合酶以外，PCR 反应成分的终浓度，基本上与实施例 2 中所说明成分的浓度相同。初始 95°C 的变性步骤增加到 3 分钟，以确保细菌细胞的热破碎

15 和质粒 DNA 的连接。使用 ABI Model 9700 热循环控制器和 32 个循环的 3 步热扩增过程，即 95°C ，45 秒， $55\text{--}58^\circ\text{C}$ ，45 秒， 72°C ，1 分钟，扩增来自溶解转化子样品的 BASB118 片段。热扩增之后，用琼脂糖凝胶电泳（Tris-乙酸-EDTA（TAE）缓冲液中含有 0.8% 琼脂糖）分析反应的 $\sim 20 \mu\text{l}$ 等分试样。凝胶电泳和溴乙啶染色之后，用紫外线照明观

20 测 DNA 片段。DNA 分子大小标准（1 Kb 序列梯，Life Technologies）与被测样品一起平行电泳，并用于估计 PCR 产物的大小。鉴定产生预期大小 PCR 产物的转化物为含有 BASB118 表达结构的菌株。接下来分析含有表达质粒的菌株是否可以诱导表达重组 BASB118。

25 C: PCR-阳性转化物的表达分析

对于上述鉴定的每一个 PCR-阳性转化物，使用来自补丁平板的细胞，接种含有氨苄青霉素（ $100 \mu\text{g/ml}$ ）的 $\sim 5.0 \text{ ml}$ LB 肉汤培养基，并在 37°C 摇动（ $\sim 250 \text{ rpm}$ ）培养过夜。在含有 $\sim 25 \text{ ml}$ LB Ap 肉汤培养基的 125 ml 锥形烧瓶中，接种等分试样的过夜种子培养基（ ~ 1.0

30 ml ），并在 37°C 摇动培养（ $\sim 250 \text{ rpm}$ ），直到培养物的浊度达到 $\text{O.D. } 600 \sim 0.5$ ，即中对数阶段（通常是大约 $1.5\text{--}2.0$ 小时）。这时，把大约一半培养物（ $\sim 12.5 \text{ ml}$ ）转移到第二个锥形烧瓶中，加入 IPTG

(无菌水制备的 1.0 M 储存液, Sigma) 至终浓度 1.0 mM 诱导重组 BASB118 蛋白的表达。继续在 37℃ 摇动培养 IPTG-诱导的和非 IPTG-诱导的培养物 ~ 4 小时。在诱导期过后, 取出诱导和非诱导培养物的样品 (~1.0 ml), 用微型离心机室温 ~ 3 分钟离心收集细胞。单个的细胞沉淀悬浮于 ~ 50 ml 无菌水中, 然后与含有 2-巯基乙醇的等体积 2X Laemmli SDS-PAGE 样品缓冲液混合, 置于沸水浴 ~ 3 分钟变性蛋白质。把等体积 (~15 μ l) 粗 IPTG-诱导和非诱导的细胞溶解物, 加样到完全相同的两块 12% Tris/甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶 (1 mm 厚的 Mini-凝胶, Novex)。在常规条件下, 使用标准 SDS/Tris/甘氨酸电泳缓冲液 (BioRad) 电泳诱导的和非诱导的细胞溶解样品, 同时电泳预染色的分子量标记 (SeeBlue, Novex)。电泳之后, 一块胶用考马斯亮蓝 R250 (BioRad) 染色, 然后脱色至可以看见新的 BASB118 IPTG-诱导蛋白。第二块胶使用 BioRad Mini-Protean II 印迹仪器和 Towbin's 甲醇 (20%) 转移缓冲液, 在 4℃ ~ 2 小时电印迹至 PVDF 膜 (孔尺寸 0.45 微米, Novex)。根据本领域熟知的方法进行膜阻断和抗体孵育。使用单克隆抗-PGS (His)3 抗体, 紧接着使用结合 HRP (QiaGen) 的兔抗鼠第二抗体, 确定 BASB118 重组蛋白的表达和特性。使用 ABT 不溶底物或者使用 Amersham ECL 化学发光系统的 Hyperfilm, 可以看见抗-His 抗体的反应模式。

20 实施例 3: 重组 BASB118 的生产

细菌菌株

含有编码粘膜炎莫拉氏菌 BASB118 的质粒 (pTLZ2) 的大肠杆菌 JM109 重组表达菌株, 被用于生产用于纯化重组蛋白的细胞质。表达菌株被培养在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素 (“Ap”) 的 LB 琼脂平板上, 以确保维持 pTLZ2。对于 -80℃ 低温储藏, 在含有相同浓度抗生素的 LB 肉汤培养基中繁殖菌株, 然后与含有 30% (w/v) 甘油的相同体积的 LB 肉汤培养基混合。

培养基

用于重组蛋白质生产的发酵培养基, 由含有 100 μ g/ml Ap 的 2X YT 肉汤 (Difco) 组成。在发酵罐中, 以 0.25 ml/L 向培养基添加消泡剂 (Antifoam 204, Sigma)。为了诱导表达重组 BASB118 蛋白, 在发酵罐中加入 IPTG (异丙基- β -D 硫代吡喃半乳糖苷) (终浓度 1

mM)。

发酵

含有 50ml 工作体积的 500-ml 种子锥形烧瓶，用 0.3 ml 速融冷冻培养物，或者用选出的琼脂平板培养物的几个克隆进行接种，在摇动
5 平台上 (Innova 2100, New Brunswick Scientific)，以 150rpm， $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养大约 12 个小时。然后，该种子培养物被用于接种含有 2X YT 肉汤和 Ap 抗生素的 5-L 工作体积的发酵罐。发酵罐 (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) 在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，换气量 0.2 - 0.4 VVM, Rushton 叶轮 250 rpm 的条件下进行操作。在锥形烧瓶种子培养或者
10 发酵罐中都不控制 pH。发酵过程中，发酵罐中的 pH 在 6.5 到 7.3 范围内。当培养物到达中对数期时 (~ 0.7 O.D. 600 单位) 时，在发酵罐中添加 IPTG (无菌水制备的 1.0 M 储存液)。诱导细胞 2 - 4 小时，然后使用 28RS Heraeus (Sepatech) 或者 RC5C 超速离心机 (Sorvall Instruments) 进行离心收集。细胞粘糊在处理之前储存于 -20°C 。

化学物质和材料

咪唑、盐酸胍、Tris (羟甲基) 和 EDTA (乙二胺四乙酸)，是生物技术级或者更高级别的，都来自 Ameresco Chemical, Solon, Ohio. Triton X-100 (t-聚乙二醇辛基苯基醚)、Triton X-144 和磷酸二氢钠是试剂级或者更高级别的，来自 Sigma Chemical Company,
20 St. Louis, Missouri. 冰醋酸和盐酸来自 Mallincrodt Baker Inc., Phillipsburg, New Jersey. 甲醇来自 Fisher Scientific, Fairlawn, New Jersey. Pefabloc®SC (4-(2-氨基乙基)-苯磺酰基氟化物)、完全蛋白酶抑制剂鸡尾酒片剂和 PMSF (苯甲基磺酰氟) 来自 Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Indiana. 抑氨肽酶素、
25 抑胃肽和 E-64 蛋白酶抑制剂来自 Calbiochem, LaJolla, California. Dulbecco's 磷酸缓冲盐水 (1x PBS) 来自 Quality Biological, Inc., Gaithersburg, Maryland. Dulbecco's 磷酸缓冲盐水 (10x PBS) 来自 Bio Whittaker, Walkersville, Maryland. 无牛血清白蛋白的五-His 抗体来自 QiaGen, Valencia,
30 California. 过氧化物酶结合的 AffiniPure 山羊抗小鼠 IgG 来自 Jackson Immuno Research, West Grove, Penn. AEC single 溶液来自 Zymed, South San Francisco, California. 所有其他化学试

剂都是试剂级或者更高级别的。

Ni 螯合 Sepharose Fast Flow 树脂来自 Pharmacia, Sweden, California。预制 Tris-甘氨酸 4-20%和 10-20%聚丙烯酰胺凝胶, 所有的电泳缓冲液和溶液, SeeBlue 预染标准, Multi-Colored 标准和
5 PVDF 转移膜都来自 Novex, San Diego, California。SDS-PAGE 银染试剂盒来自 Daiichi Pure Chemicals Company Limited, Tokyo, Japan。考马斯染液来自 BioRad Laboratories, Hercules, California。Acrodisc® PF 0.2 m 注射过滤器来自 Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan。GD/X 25mm 一次性注射过滤器来自
10 Whatman Inc., Clifton, New Jersey。透析管 8,000 MWC0 来自 BioDesign Inc. Od New York, Carmal New York。BCA Protein Assay Regents 和 Snake Skin 透析管 3,500 MWC0 来自 Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois。

实施例 4: 来自大肠杆菌的重组 BASB118 的纯化

15 提取纯化

细胞粘糊在室温融化 30 到 60 分钟。细胞粘糊破碎之后, 用含有 1% Triton X-114 的冰冷 PBS 分相提取物。

除去细胞碎片, 提取物升温至 37℃, 并且用离心进行相分配。

然后, 感兴趣部分经过一镍螯合的 Sepharose Fast Flow 树脂,
20 用含有 10% 甘油和 0.05% Triton X-100 的 PBS (pH 7.5) 平衡。用含有 200 mM 咪唑的相同缓冲液洗脱蛋白质。含有洗脱蛋白质的部分, 用含有 2 mM EDTA, 10 mM 氯化钠和 0.05% Triton X-100 的四倍体积的 50 mM Tris 缓冲液 (pH 7.5) 稀释, 然后通过 DEAE-Sepharose FF 树脂。收集流出物。分析表明, 制备物含有 7 种主要污染蛋白质。
25 因此, 样品再次通过镍螯合的 Sepharose FF 树脂, 用含有 10% 甘油和 0.05% Triton X-100 的 PBS (pH 7.5) 平衡。用含有 200 mM 咪唑的相同缓冲液洗脱蛋白质。该制备物在含有 1% Triton X-100 的 PBS (pH 7.4) 中透析, 然后用 3 kD 截留量的搅拌池 (stir-cell) 浓缩。

30 如图 1-A 所示, 在 SDS-PAGE 分析中, 纯化的 BASB118 蛋白质表现为五条带和两条额外的小带。五条主带对于针对 6-组氨酸基元的小鼠单克隆抗体有活性 (图 1-B)。纯度估计在 50% 左右。

生物化学性质

SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析

纯化的重组 BASB118 蛋白在 4-20% 聚丙烯酰胺凝胶上进行分离，然后如前所述在 100 V，1 小时电泳转移至 PVDF 膜上 (Thebaine 等 5 1979, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 76: 4350-4354)。然后，用含有 5% 脱脂奶粉的 25 ml Dulbecco's 磷酸缓冲盐水对 PVDF 膜进行预处理。随后所有的孵育都使用该预处理缓冲液进行。

用 25 ml 未免疫的或者免疫的血清或者抗-His 免疫血清的 1:500 10 稀释液，室温孵育 PVDF 膜 1 小时。然后用清洗缓冲液 (含有 150 mM 氯化钠和 0.05% Tween-20 的 20 mM Tris 缓冲液, pH7.5) 清洗 PVDF 膜 2 次。用 25 ml 氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 的 1:5000 稀释液，室温孵育 PVDF 膜 30 分钟。然后用清洗缓冲液清洗 PVDF 膜 4 次， 15 并用 Zymed (San Francisco, CA) 提供的 3-氨基-9-乙基吡啶和过氧化脲分别显影 10 分钟。

实施例 5: 重组 BASB118 抗血清的产生

直接针对 BASB118 蛋白的多价抗血清，是通过用纯化的重组 BASB118 蛋白免疫接种两只兔子产生的。每只动物总共进行 3 次皮下 20 免疫，每次注射大约 10 μ g BASB118 蛋白，间隔大约 21 天。在第一次免疫前 (“前取血”)、第 49 天、第 56 天对动物取血。

使用重组 BASB118 蛋白 (4 μ g /孔) ELISA 测定抗-BASB118 蛋白的效价。该效价被定义为，通过使用 XL Fit 软件的 4-参数逻辑模型计算出的效价的中点。兔血清免疫后的效价是 1:2000。

25 实施例 6: 免疫特性: BASB118 的表面暴露

使用福尔马林杀死的粘膜炎莫拉氏菌 14, 358, 216, 2926 菌株完整细胞 (20 μ g /孔)，通过 ELISA 测定抗-BASB118 蛋白的效价。该效价被定义为，通过使用 SoftMax Pro 软件的 4-参数逻辑模型计算出的效价的中点。

30 观测到的兔免疫血清效价 (分别是 1:312, 1:1290, 1:284, 1:513) 表明，BASB118 蛋白发现于粘膜炎莫拉氏菌细胞的表面。

实施例 7: 免疫特性: 杀菌活性

测定抗-BASB118 抗体的补体介导的细胞毒性活性，以测定如上所述制备的 BASB118 抗血清的免疫效力。测定了免疫前血清和抗-BASB118 抗血清在介导补体杀死粘膜炎莫拉氏菌中的活性。在 Mueller Hinton 平板上，36℃下生长粘膜炎莫拉氏菌菌株 24 小时。把几个菌落接种到 125 ml 锥形烧瓶的 15 ml BHI 中。培养物在 200 rpm 生长大约 4 小时，直到 $A_{620} = 0.4$ 。经过一次清洗之后，粘糊悬浮于 HBSS，菌株稀释至每毫升 28500 CFU。在 96-孔板的第一个孔里加入五十(50) μ l 免疫前血清和抗-BASB118 血清(56℃灭活 30 分钟)，在同一行的其他孔里加入 HBSS 的两倍系列稀释液。随后加入二十五(25) μ l 稀释的活粘膜炎莫拉氏菌，混合物室温培养 15 分钟。按照事先在毒性分析中确定的工作稀释液，在每个孔中加入幼兔补体 (Pel freez, clinical systems, Brown Deer, WI, UAS)。

盖上微量平板，37℃下 200 rpm 培养 1 小时。每个测试包括补体对照(没有血清的孔，该血清含有活性的或者灭活的补体源)，阳性对照(含有已知杀菌抗体效价血清的孔)，培养物对照(没有血清和补体的孔)和血清对照(没有补体的孔)。

兔抗血清的杀菌效价(同源菌株 50%致死) $< 1:35$ (免疫前) $> 1:300$ (免疫的)。

实施例 8: BASB118 疫苗的功效: 在小鼠中增强肺部清除粘膜炎莫拉氏菌

小鼠的模型是基于接种鼠的标准鼻内激发之后的粘膜炎莫拉氏菌肺部感染分析。按照 10 μ g 剂量用 100 μ l 疫苗皮下免疫 6 只 BALB/c 鼠群体(雌性，6 周龄)，2 周后加强。加强一周后，在麻醉情况下(用氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉剂的结合麻醉小鼠，0.24 mg 甲苯噻嗪 (Rompun) 和 0.8 mg 氯胺酮 (Imalgene) /100 μ l)，通过在左鼻孔滴注 50 μ l 细菌悬浮液 (5×10^5 CFU/50 μ l)，对小鼠进行激发。激发之后 4 小时处死鼠，无菌条件下摘出肺脏，单个进行匀浆。涂布 20 μ l 的 5 个系列匀浆物稀释液之后，通过计数 Mueller-Hinton 琼脂平板上生长的菌落，确定 CFU/肺脏的 \log_{10} 加权平均值。计算每一组的 CFU/肺脏的 \log_{10} 加权平均值的算数平均值，以及标准偏差。

在假定方差等式(经过 Brown and Forsythe's 测试检验)和正规性等式(经过 Shapiro-Wilk 测试检验)之后，通过使用 1-途径 ANOVA，对结果进行统计分析。使用 Dunnet 测试、Tukey's studentised 范围

测试 (HSD) 和 Student-Newman-Keuls 测试, 分析组之间的差异。

在该试验中, 小鼠的分组用吸附在 A1P04 上的 BASB118 (100 μ g A1P04 上的 10 μ g BASB118) 进行免疫, 或者用吸附在 A1P04 上的粘膜炎莫拉氏菌 ATCC 43617 菌株的死的全细胞 (kwc) 制备物 (100 μ g A1P04 上的 5×10^8 个细胞) 进行免疫, 或者用没有抗原的 100 μ g A1P04 进行免疫。用 5×10^5 CFU 活的粘膜炎莫拉氏菌 ATCC 43617 细菌菌株对鼠进行攻击。

对每一组计算攻击 4 小时后的 CFU/肺脏的 log₁₀ 加权平均值和标准偏差。攻击 4 小时后假装免疫小鼠的 log₁₀ CFU/肺脏是 5.66 (+/- 0.18)。

与对照组比较, kwc 制备物引起明显的肺部清除 (log 差异 1.3)。在肺部清除中, BASB118 疫苗与对照组比较引起 0.43 的 log 差异, 这与对照有相当大的差异。

保藏材料

含有粘膜炎莫拉氏菌 Catlin 菌株的保藏物, 在 1997 年 6 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (此处的“ATCC”), 保藏号 43617。该保藏物被描述为粘膜炎氏布兰汉氏球菌 (*Branhamella catarrhalis*) (Frosch and Kollle), 是由粘膜炎莫拉氏菌分离株构建的冻干的 1.5-2.9 kb 插入文库, 该种群是从患有慢性支气管炎的煤矿工人气管吸出物中得到的。该保藏物在抗微生物物质化学治疗 (Antimicrob. Agents Chemother.) 21: 506-508 (1982) 中有描述。

粘膜炎莫拉氏菌菌株保藏物, 在此处称作“保藏菌株”或者“保藏菌株的 DNA”。

保藏菌株含有全长的 BASB118 基因。

包括插入在 pQE30 中的粘膜炎莫拉氏菌 DNA 的 pMC-ORF1/2 载体保藏物, 在 1999 年 2 月 12 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (此处的“ATCC”), 保藏号 207118。

当与此处的任何序列描述有冲突时, 保藏菌株/克隆中包含的多核苷酸序列, 及其编码的任何多肽的氨基酸序列是控制查对的。

保藏菌株的保藏物, 符合国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约 (Budapest Treaty on the International Recognition

of Deposit of Micro-organisms for Purpose of Patent Procedure)。保藏菌株在保护专利的前提下，不可取消地并且没有限制和条件地准许公众公开使用。保藏菌株只是为那些本领域技术人员提供方便，而不是例如 35 U. S. C. § 112 要求的那些实施所需要的保藏物的许可。

序列信息**BASB118 多核苷酸和多肽序列****SEQ ID NO: 1****5 来自 ATCC43617 菌株的粘膜炎莫拉氏菌 BASB118 的多核苷酸序列**

ATGCATAAAATGTATCCTACTAGTATTTTATTGTGTGCCGTGGTTTTGTCAGGCTGTGAT
 GCAGTCAAGCAGACCATCACAGACAAACCTACGCTCAGCGATGCCCAAATCACCAAATTA
 ATCCCCAAGCGTGTCAATAACGCCAAGCTATGGGCAACTGATATTGGCGATATTTTTGAT
 GAATTATCACTACCGAAAACCGCACAAAATATCTGTACCGCTATCGCTGTCATTGACCAA
 GAATCAAATTTTCATGCCGATCCCAGCGTCCCAAACCTAGGCAATGCTGCCCTAAAGCC
 ATTGATGACAAGCTAGAAGATAAACTTGGTAAAAATATGGCAGGCGTATTTTCGCAACATG
 CTTGAGACACGCCCAACGCCAAAAACAACCTTCATCAAACAAATCAAAGCTGTAAAAACC
 GAAAAACAGCTTGATGAGCTATACCGAGAGATTTTGGATTATTTTACCAGAACCATAAAA
 ATAGCCCCTTTAACCAACATCACAAAACCTCTCAGGACAAGGCATTGATGAACGCATCAAC
 CCTGTCAACAACTTGGTCTATGCAGGTACATATCGACTACGCACGAGCACATCGCCGT
 GCCAGCATGAGCGATCGGGATTTGCGTGCCGATTTATACACACGCTATGGCGGGCTTTAT
 TACGGCATAACATCGATTAATGGTATATCAGGCAAATATGACAAGCCTTTATACCGTTTT
 GCTGATTATAATTCGGGTATGATTTCAAGCCGAAATGCTGCCTTTCAGCAGCGGATCGCT
 ACTTTAAGTGGTGAAAGCTTAGCCATTGATGGAGATTTATTGCTTTATAAAGATGGCAGC
 CCCATAAGCAAATATCCTCTACCGAAACTGCCGCCATCGCTTTACTTGCTACCGCATCA
 AAACCCATCAACGCACAACAAATCCGATCTGATTTTAAAAAAGAAAAACTCGTGATTTT
 GAAAAACCATCACTTATCGTGCCGGTGAATGATATGTTTGGCAGTAAATTTGGGCGAGAG
 CCTACTTATGCCATTATGCCAAAAGTGTGATTTTCAAGGGCCCAAGCTTAGCCGAGACTTT
 GATACCAATTGGTTTTGCCACCCGTGTCAATGAACGCTATCAAACCTGCATCACGACCGCC
 AAGCGTCACCGATTAAGCTAA

SEQ ID NO: 2**由 SEQ ID NO: 1 推导出的 BASB118 多肽序列**

MHKMYPTSILLCAVVLSGCDAVKQITIDKPTLSDAQITKLIPKRVNNAKLWATDIGDIFD
 ELSLPKTAQNICTAIAVIDQESNFHADPSVFNLGNAALKAIIDDKLEDKLGKNMAGVFRNM
 LETRPTPKNNFIKQIKAVKTEKQLDELYREIFDYFTRTYKIAPLTNITKLSGQGIDERIN
 PVTTLGSMQVHIDYARAHRRASMSDRDLRADLYTRYGGLYYGIHRLMVYQANYDKPLYRF
 ADYNSGMYSSRNAAFQORIALTSGESLAIDGDLLEYKDGSPISKISSTETAIALLATAS
 KPINAQQIRSDFKKEKTRDFEKTITYRAVNDMFASKFGREPTYAIMPKVVISGPKLSRDF
 DTNWFATRNVNERYQTCITTAKRHRLS

SEQ ID NO:3

AGG CAG AGG GAA TTC ATG CAT AAA ATG TAT CCT ACT AGT A

SEQ ID NO:4

AGG CAG AGG GTC GAC TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GCT TAA TCG
 GTG ACG CTT GGC GGT CG

wq 申请人或代理人挡 案号	国际申请号
-------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A. 对说明书第 43 页，第 15 行所述的微生物的说明	
B. 保藏事项	
保藏单位名称	美国典型培养物保藏中心
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110 — 2209, UNITED STATE OF AMERICA	
保藏日期	1997 年 6 月 21 日，1999 年 2 月 12 日
保藏编号	43617 / 207118
C. 补充说明 (必要时)	
就这些谋求欧洲专利的指定事项而言，仅通过将这一样品递交该样品请求人指定的专门机构，保藏的微生物的样品即为可得，直至欧洲专利授权公开，或直至本申请被驳回或撤回，。	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别，例如：“保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期:
授权官员

序列表

<110> SmithKline Beecham Biologicals SA

<120> 新化合物

<130> BM45409

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1161

<212> DNA

<213> 粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)

<400> 1

```

atgcataaaa tgtatcctac tagtatttta ttgtgtgccg tggttttgtc aggctgtgat      60
gcagtcaagc agaccatcac agacaaacct acgctcagcg atgcccaaat caccaaatta      120
atccccaagc gtgtcaataa cgccaagcta tgggcaactg atattggcga tatttttgat      180
gaattatcac taccgaaaac cgcacaaaat atctgtaccg ctatcgctgt cattgaccaa      240
gaatcaaatt ttcattgccg tcccagcgtc ccaaacttag gcaatgctgc cctaaaagcc      300
attgatgaca agctagaaga taaacttggt aaaaatatgg caggcgtatt tcgcaacatg      360
cttgagacac gcccaacgcc aaaaaacaac ttcattcaaac aatcaaagc tgtaaaaacc      420
gaaaaacagc ttgatgagct ataccgagag atttttgatt attttaccag aacctataaa      480
atagcccctt taaccaacat cacaaaactc tcaggacaag gcattgatga acgcatcaac      540
cctgtcacia cacttggttc tatgcaggta catatcgact acgcacgagc acatcgccgt      600
gccagcatga gcgatcggga tttgcgtgcc gatttataca cacgctatgg cgggctttat      660
tacggcatac atcgattaat ggtatatcag gcaaattatg acaagccttt ataccgtttt      720
gctgattata attcgggtat gtattcaagc cgaaatgctg cctttcagca gcggatcgct      780
actttaagtg gtgaaagctt agccattgat ggagatttat tgctttataa agatggcagc      840
cccataagca aaatatcctc taccgaaact gccgccatcg ctttacttgc taccgcatca      900
aaacccatca acgcacaaca aatccgatct gattttaaaa aagaaaaaac tcgtgatatt      960
gaaaaaacca tcaactatcg tgcggtgaat gatatgtttg ccagtaaatt tgggcgagag      1020
cctacttatg ccattatgcc aaaagttgtc atttcagggc ccaagcttag ccgagacttt      1080
gataccaatt ggtttgccac ccgtgtcaat gaacgctatc aaacctgcat cacgaccgcc      1140
aagcgtcacc gattaagcta a

```

1161

<210> 2

<211> 386

<212> PRT

<213>粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)

```

<400> 2
Met His Lys Met Tyr Pro Thr Ser Ile Leu Leu Cys Ala Val Val Leu
  1           5           10           15
Ser Gly Cys Asp Ala Val Lys Gln Thr Ile Thr Asp Lys Pro Thr Leu
  20           25           30
Ser Asp Ala Gln Ile Thr Lys Leu Ile Pro Lys Arg Val Asn Asn Ala
  35           40           45
Lys Leu Trp Ala Thr Asp Ile Gly Asp Ile Phe Asp Glu Leu Ser Leu
  50           55           60
Pro Lys Thr Ala Gln Asn Ile Cys Thr Ala Ile Ala Val Ile Asp Gln
  65           70           75           80
Glu Ser Asn Phe His Ala Asp Pro Ser Val Pro Asn Leu Gly Asn Ala
  85           90           95
Ala Leu Lys Ala Ile Asp Asp Lys Leu Glu Asp Lys Leu Gly Lys Asn
  100          105          110
Met Ala Gly Val Phe Arg Asn Met Leu Glu Thr Arg Pro Thr Pro Lys
  115          120          125
Asn Asn Phe Ile Lys Gln Ile Lys Ala Val Lys Thr Glu Lys Gln Leu
  130          135          140
Asp Glu Leu Tyr Arg Glu Ile Phe Asp Tyr Phe Thr Arg Thr Tyr Lys
  145          150          155          160
Ile Ala Pro Leu Thr Asn Ile Thr Lys Leu Ser Gly Gln Gly Ile Asp
  165          170          175
Glu Arg Ile Asn Pro Val Thr Thr Leu Gly Ser Met Gln Val His Ile
  180          185          190
Asp Tyr Ala Arg Ala His Arg Arg Ala Ser Met Ser Asp Arg Asp Leu
  195          200          205
Arg Ala Asp Leu Tyr Thr Arg Tyr Gly Gly Leu Tyr Tyr Gly Ile His
  210          215          220
Arg Leu Met Val Tyr Gln Ala Asn Tyr Asp Lys Pro Leu Tyr Arg Phe
  225          230          235          240
Ala Asp Tyr Asn Ser Gly Met Tyr Ser Ser Arg Asn Ala Ala Phe Gln
  245          250          255
Gln Arg Ile Ala Thr Leu Ser Gly Glu Ser Leu Ala Ile Asp Gly Asp
  260          265          270
Leu Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Ser Pro Ile Ser Lys Ile Ser Ser Thr
  275          280          285
Glu Thr Ala Ala Ile Ala Leu Leu Ala Thr Ala Ser Lys Pro Ile Asn
  290          295          300
Ala Gln Gln Ile Arg Ser Asp Phe Lys Lys Glu Lys Thr Arg Asp Phe
  305          310          315          320
Glu Lys Thr Ile Thr Tyr Arg Ala Val Asn Asp Met Phe Ala Ser Lys
  325          330          335
Phe Gly Arg Glu Pro Thr Tyr Ala Ile Met Pro Lys Val Val Ile Ser
  340          345          350

```

Gly Pro Lys Leu Ser Arg Asp Phe Asp Thr Asn Trp Phe Ala Thr Arg
 355 360 365
 Val Asn Glu Arg Tyr Gln Thr Cys Ile Thr Thr Ala Lys Arg His Arg
 370 375 380
 Leu Ser
 385

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 3

aggcagaggg aattcatgca taaaatgtat cctactagta 40

<210> 4

<211> 62

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 4

aggcagaggg tcgacttaat ggtgatggtg atggtggctt aatcggtgac gcttgccggt 60
 cg 62

图1-A: 考马斯亮兰染色的纯化BASB118 SDS-聚丙烯酰胺凝胶

图1-B: 纯化BASB118 (抗-His抗体) Western-印迹

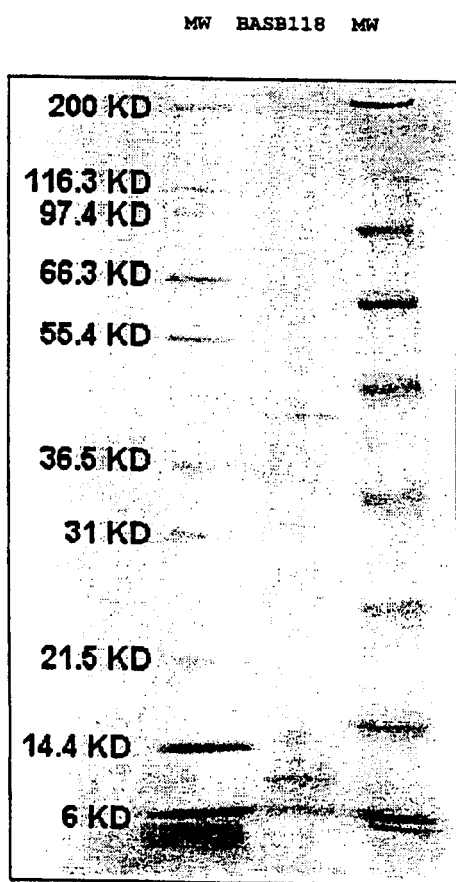


图 1A

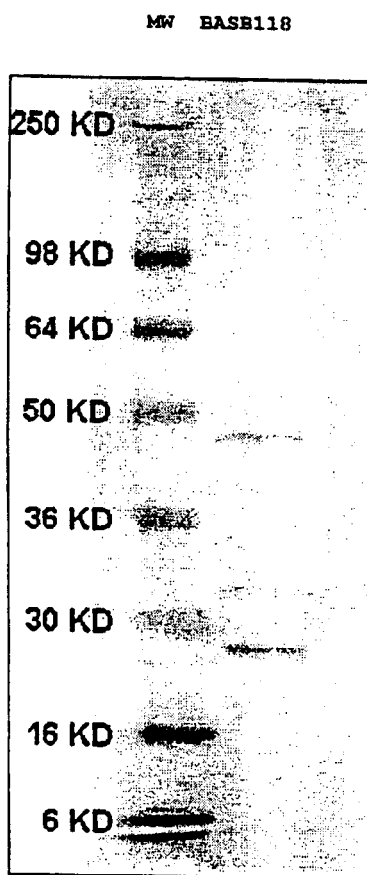


图 1B

专利名称(译)	粘膜炎症莫拉氏菌的BASB118多肽和多核苷酸		
公开(公告)号	CN1391610A	公开(公告)日	2003-01-15
申请号	CN00813834.6	申请日	2000-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆生物有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆生物有限公司		
[标]发明人	J·通纳德		
发明人	J·通纳德		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/21 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569 A61K39/02		
CPC分类号	C07K14/212 A61K48/00 A61K39/00		
代理人(译)	罗宏 姜建成		
优先权	1999018208 1999-08-03 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了BASB118多肽和编码BASB118多肽的多核苷酸，以及通过重组技术生产这些多肽的方法。并且提供了诊断的、预后的和治疗的用途。

A: 考马斯亮蓝染色的纯化BASB118 SDS-聚丙烯酰胺凝胶
B: 纯化BASB118 (抗-His抗体) Western-印迹

