



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101400783 B

(45) 授权公告日 2013.03.20

(21) 申请号 200780008568.6

(22) 申请日 2007.03.07

(30) 优先权数据

60/780,827 2006.03.10 US

60/817,430 2006.06.30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.09.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/001942 2007.03.07

(87) PCT申请的公布数据

WO2007/104451 EN 2007.09.20

(73) 专利权人 巴斯德研究院里尔分院

地址 法国里尔

专利权人 法国国家健康与医学研究院

(72) 发明人 卡米尔·洛赫特

纳塔利·米耶尔卡雷克

阿内-索菲·德布里

多米尼克·拉兹 朱利·贝尔图

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

11243

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

C12N 1/36(2006.01)

A61K 39/10(2006.01)

(56) 对比文件

WO 03102170 A1, 2003.12.11, 摘要, 实施例 1-8, 权利要求 1-2.

Seema Mattoo et al. mechanism of bordetella pathogenesis. 《Frontiers in Bioscience》. 2001, 第 6 卷 e168-e186.

Seema Mattoo et al. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to bordetella pertussis and other bordetella subspecies. 《Clinical Microbiology Reviews》. 2005, 第 18 卷 (第 2 期), 326-382.

审查员 曹扣

权利要求书 1 页 说明书 26 页

序列表 13 页 附图 8 页

(54) 发明名称

包特氏菌减毒活菌株作为抗百日咳的单剂量疫苗

(57) 摘要

本发明提供了一种包特氏菌突变菌株,其至少含有突变的ptx基因,缺失的或突变的dnt基因以及异源ampG基因。该包特氏菌减毒突变菌株可以用于治疗或防止包特氏菌感染的免疫原组合物或疫苗。还提供了所述包特氏菌减毒突变菌株用于制备疫苗或免疫原组合物的应用,以及保护哺乳动物抵抗包特氏菌感染的方法。

1. 一种包特氏菌减毒菌株 BPZE1, 其于 2006 年 3 月 9 日保藏在法国微生物保藏中心 (C. N. C. M.), 保藏号为 I-3585。
2. 如权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 在制备抗包特氏菌菌种所引起感染的疫苗中的应用。
3. 一种免疫原组合物, 其含有权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1。
4. 根据权利要求 3 所述的免疫原组合物, 其还包含药物上可以接受的赋形剂、介质和 / 或载体。
5. 根据权利要求 4 所述的免疫原组合物, 其还包含佐剂。
6. 一种疫苗, 其含有权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1。
7. 根据权利要求 6 所述的疫苗, 其被配制用于鼻腔给药。
8. 一种试剂盒, 其含有权利要求 6 所述的疫苗以及说明书。
9. 如权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 在制备防止包特氏菌感染的疫苗中的应用。
10. 权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 在制备同时防止包特氏百日咳杆菌感染和副百日咳包特氏菌感染的疫苗中的应用。
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其中, 所述疫苗通过注射或吸入经皮下 (s. c.)、皮内 (i. d.)、肌肉 (i. m.)、静脉 (i. v.)、口服或鼻腔来进行给药。
12. 根据权利要求 9 或 10 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其中所述疫苗被鼻腔给药。
13. 根据权利要求 9 或 10 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其中, 所述疫苗被给药于需要抗包特氏菌感染的快速保护性免疫的哺乳动物。
14. 根据权利要求 13 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其中, 所述疫苗被给药于新生儿。
15. 根据权利要求 13 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其中, 所述疫苗被给药于儿童。
16. 根据权利要求 9 或 10 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其中, 所述疫苗以单剂量给药一次。
17. 根据权利要求 9 或 10 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 的应用, 其包括 a) 给药权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 ; 以及 b) 使用相同的菌株或无细胞疫苗或二者的结合进行至少一次回忆。
18. 如权利要求 1 所述的包特氏菌减毒菌株 BPZE1 在制备疫苗中的应用, 所述疫苗用于在哺乳动物中提供粘膜应答和系统性应答以治疗包特氏菌感染。

## 包特氏菌减毒活菌株作为抗百日咳的单剂量疫苗

### 发明领域

[0001] 本发明涉及包特氏菌 (*Bordetella*) 突变菌株,其至少含有突变的 *ptx* 基因、缺失或突变的 *dnt* 基因以及异源的 *ampG* 基因。包特氏菌减毒突变菌株可以用于产生免疫性的组合物或疫苗用于治疗或防止包特氏菌感染。本发明还涉及包特氏菌减毒菌株用于制备疫苗或产生免疫性的组合物的应用,以及用于保护哺乳动物免受包特氏菌感染的方法。

### 背景技术

[0002] 百日咳 (*Pertussis*) 仍是全球死亡的主要原因,并且即使在疫苗高度覆盖的国家,其发病率也在逐渐提高。尽管所有年龄群都是易感染的,但其在婴儿中是最严重的,因为婴儿太年轻而不能受到目前可以利用的疫苗保护。

[0003] 在 20 世纪后半叶引入有效疫苗之前,百日咳 (*whooping cough*) 或百日咳 (*Pertussis*) 是引起高死亡率的严重儿童疾病。这些疫苗的成功引发关于该疾病被基本上得到控制的观点,然而据报道每年仍有 200,000 ~ 400,000 例百日咳相关的死亡,并且该疾病仍在由于传染性物质所引起死亡的病因中排第 6 位 [1]。尽管主要在发展中国家流行,但在包括美国的发达国家,该疾病又重新出现了 [2,3],在过去的 20 年中,美国的发病率已经提高了 5 倍 [4]。出乎意料的,在高疫苗覆盖的国家,百日咳的流行病学已经改变,在这些国家青少年和成年人的百日咳日益频繁 [5]。这可能是因为在青少年期日益减弱的疫苗介导的免疫。百日咳通常是非典型因此难以诊断的,并且通常在成年人中不是威胁生命的,因此,在许多病例中百日咳仍被忽视。然而,被感染的成年人构成了重要的储存宿主把该疾病传播到非常年轻的儿童,这些儿童太年轻而未被接种疫苗,因此有发展成具有高死亡率的严重疾病的风险。

[0004] 百日咳接种疫苗通常在 2 个月大时开始,而完全的保护需要以 1 ~ 2 个月为间隔的至少 3 次免疫接种。因此,在 6 个月大之前,使用目前可以利用的疫苗,婴儿不能完全被保护。为了降低非常年轻和大部分容易受到攻击的年龄组中百日咳的发病率,早期的免疫接种,可能在出生时,将是高度期望的。然而,在人类和动物模型中的大量研究显示,新生儿的免疫系统太不成熟,而不能有效地诱导疫苗介导的保护性免疫 [6,7]。与较大的儿童或成人相比,对于产生对百日咳的保护性免疫很重要的 Th1 应答的指示 [8],特别是 IFN- $\gamma$  的产生,似乎在人新生儿中显著降低 [9]。这一点也通过以下事实得以反映,即在儿童中使用百日咳疫苗,特别是非细胞疫苗 (aPV) 进行接种疫苗,仅能够在几个月 ( $\geq 6$  个月) 后产生显著量的抗原特异性 IFN- $\gamma$  [10]。

[0005] 包特氏百日咳杆菌 (*Bordetella Pertussis*) 的自然感染长期以来被认为诱导长期的强免疫性,其衰退比疫苗诱导的免疫性要晚得多 [5,11]。而且,包特氏百日咳杆菌的感染即使在非常年轻的儿童中 (1 个月大) 也诱导了可检测的抗原特异性 Th1 型免疫应答 [12]。这些观察结果暗示,可以通过经鼻途径以便尽可能模拟自然感染来施加的活疫苗,可以是比可利用的疫苗更吸引人的替代。

[0006] 现有技术中已知有许多进行接种疫苗的组合物用于治疗包特氏菌感染。然而,这

些用于治疗的生产免疫反应的组合物没有被用于治疗新生儿,或者未用于需要流行性的和快速保护性的免疫的病例中。

[0007] 因此法国专利 FR0206666 公开了缺失选自 PTX、DNT、AC 和 TCT 中至少两种毒素的包特氏菌菌株。该专利公开了通过加入强启动子,以及加入来自大肠杆菌 (*E. coli*) ampG 基因的 11 个末端氨基酸,从而过表达内源性 ampG 基因。

[0008] Mielcarek 等人在 Vaccine (2006 ;24S2 :S2/54-S2-55) 中公开了一种 PTX<sup>-</sup>,DTN<sup>-</sup> 和 TCT<sup>-</sup> 包特氏百日咳杆菌减毒菌株,用于小鼠的免疫接种。该参考文献公开了,为了降低气管细胞毒素的产生,ampG 基因需要被过表达。然而,通过进一步评测,作者认识到通过过表达 ampG 基因,气管细胞毒素有提高,而不是一开始认为的降低。

[0009] Mielcarek 等人在 Advance Drug Delivery Review 51 (2001) pgs. 55-69 中公开了,活疫苗在通过口服或经过经鼻途径给药时,能够诱导系统性和粘膜应答。

[0010] Roduit 等人在 Infection and Immunity (2002 Jul ;70 (7) :3521-8) 中描述了使用具有 DTP 组合物的包特氏菌突变菌株对新生儿和婴儿进行疫苗接种。

[0011] Mattoo 等人在 Frontiers of Bioscience 6, e168-e186 (2001) 中表示,使用大肠杆菌 ampG 基因替代包特氏菌中的内源 ampG 基因,其结果是降低了所产生的 TCT 的量。

[0012] 因此,尽管现有技术公开了多种类型的接种疫苗组合物,但其都不能解决提供能够为 6 个月以前的新生儿提供保护的疫苗或免疫原组合物的问题。而且,现有技术没有公开提供抗包特氏菌感染的保护性免疫的免疫原组合物或疫苗。现有技术没有公开提供抗包特氏菌感染的保护性免疫的免疫原组合物或疫苗,所述保护性免疫在接种疫苗后至少 2 个月内持续提高。

[0013] 因此,本发明的一个目的是解决现有技术的缺陷。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种减毒的活疫苗候选物或免疫原组合物,其通过对包特氏菌菌株例如包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 或副百日咳包特氏菌 (*B. paraPertussis*) 进行遗传减毒,以减少致病性,而维持繁殖和诱导保护性免疫的能力。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种疫苗或免疫原组合物,其在新生儿中单次鼻腔给药后诱导保护,这优于目前 aPV 所提供的保护。

[0016] 本发明的另一个目的是提供抗副百日咳包特氏菌以及包特氏百日咳杆菌感染的保护,这是在使用 aPV 接种疫苗后未观察到的。

[0017] 本发明的另一个目的是在新生儿中诱导抗包特氏菌感染的强保护性免疫。

[0018] 本发明的另一个目的是提供诱导黏膜和系统性免疫的疫苗或免疫原组合物。

[0019] 本发明的另一个目的是生产减毒的包特氏百日咳杆菌活菌株,其被作为在生命早期的单剂量鼻腔疫苗,其被称作 BPZE1。

[0020] 本发明的另一个目的是提供疫苗,其不仅能够用于为新生儿进行接种疫苗,而且可以用于在流行百日咳时对任何年龄的所有动物进行接种疫苗。

[0021] 本发明的另一个目的是提供抗包特氏菌感染的疫苗,其诱导快速的保护性免疫和/或在接种疫苗之后至少 2 个月内提高的保护性免疫。

[0022] 本发明的另一个目的是提供以相对低的生产成本提供抗包特氏菌感染的防止或治疗。

[0023] 正如本发明的发明内容、优选实施方式和权利要求的描述,本发明完成了这些和

其他的目的。

### 发明内容

[0024] 本发明提供了一种包特氏菌突变菌株,其至少含有突变的百日咳毒素 (ptx) 基因、缺失的或突变的皮肤坏死毒素 (dnt) 基因以及异源 ampG 基因。

[0025] 在另一个方面,本发明涉及免疫原组合物,其含有包特氏菌突变菌株,所述包特氏菌突变菌株至少含有突变的百日咳毒素 (ptx) 基因,缺失的或突变的皮肤坏死毒素 (dnt) 基因以及异源 ampG 基因。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了一种疫苗,其含有包特氏菌减毒菌株,所述包特氏菌减毒菌株至少含有突变的百日咳毒素 (ptx) 基因、缺失的或突变的皮肤坏死毒素 (dnt) 基因以及异源 ampG 基因。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了包特氏菌减毒菌株用于制备防止包特氏菌感染的疫苗的应用,所述包特氏菌减毒菌株至少含有突变的 ptx 基因、缺失的或突变的 dnt 基因以及异源 ampG 基因。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了包特氏菌减毒菌株用于制备疫苗的应用,所述包特氏菌减毒菌株至少含有突变的 ptx 基因,缺失的或突变的 dnt 基因以及异源 ampG 基因,所述疫苗用于诱导抗所述减毒的包特氏菌的优先通过 Th1 通路的免疫应答。

[0029] 还提供了保护哺乳动物免于包特氏百日咳杆菌 (*Bordetella Pertussis*) 以及副百日咳包特氏菌 (*Bordetella paraPertussis*) 感染所引起的疾病的方法,其包括将包特氏菌突变菌株给药于需要这种治疗的哺乳动物,所述包特氏菌突变菌株至少含有突变的 ptx 基因、缺失的或突变的 dnt 基因以及异源 ampG 基因。

[0030] 本发明的另一个方面是,一种提供抗包特氏菌感染的快速保护性免疫的方法,其包括将至少含有突变的 ptx 基因、缺失的或突变的 dnt 基因以及异源 ampG 基因的包特氏菌突变菌株给予需要这种治疗的哺乳动物。

[0031] 本发明的另一个方面是,一种提供抗包特氏菌感染的快速保护性免疫的方法,其包括将至少含有突变的 ptx 基因、缺失的或突变的 dnt 基因以及异源 ampG 基因的包特氏菌突变菌株给予需要这种治疗的哺乳动物,其中所述包特氏菌突变菌株,其中所述方法进一步在接种疫苗后至少 2 个月内提供了所述保护性免疫的提高。

[0032] 本发明的另一方面是,包特氏菌突变菌株用于制备治疗呼吸疾病的多价疫苗 (即用于防止或治疗多种病原体所引起感染的疫苗) 的方法,其中所述包特氏菌突变菌株至少含有突变的 ptx 基因、缺失的或突变的 dnt 基因以及异源 ampG 基因。

[0033] 本发明的另一方面是,发明的减毒包特氏菌菌株通过给药于需要抗包特氏菌感染的快速保护性免疫的哺乳动物的应用,其中所述保护性免疫在给药后至少 2 个月内提高。

[0034] 本发明的另一个方面是,提供哺乳动物中用于治疗或避免包特氏菌感染的粘膜应答和系统应答的方法。

### 附图说明

[0035] 图 1 是表示在 BPSM 和 BPZE1 培养物上清中所存在 TCT 的柱状图,其表示为每种菌株 3 份独立培养物的  $\text{nM}/\text{OD}_{540\text{nm}}$  平均值 ( $\pm$  标准误差)。

[0036] 图 2 是 BPSM(泳道 1) 和 BPZE1(泳道 2) 培养物上清中 PTX 产量的免疫印迹分析。在左侧空白处给出 kDa 为单位表达的 Mr 标记物的分子大小。

[0037] 图 3 是 BPSM(泳道 1) 和 BPZE1(泳道 2) 中 dnt 基因座的 Southern 印迹分析。如左侧空白处所显示的,分子大小标记物的长度是碱基对(bp)为单位表示的。

[0038] 图 4 是表示液体培养中 BPSM(黑线)和 BPZE1(虚线)生长速率的图表。

[0039] 图 5 是在液体培养基中生长 24 小时的 BPSM(左)和 BPZE1(右)的电子显微镜图片代表。

[0040] 图 6 是表示 BPSM(黑柱)和 BPZE1(白柱)与人肺上皮细胞 A549(左)和鼠巨噬细胞类 J774 细胞(右)的体外黏附的图。结果表示为来自 3 组不同实验的相对于在接种物中所存在细菌的结合细菌百分比的平均值。

[0041] 图 7 是表示鼻腔感染  $10^6$ CFU 的 BPZE1 或 BPSM 的成年小鼠肺部形成 BPSM 菌落(黑线)和 BPZE1 菌落(虚线)的图表。数据表达为每组 3~4 只小鼠的 CFU 平均值(±标准误差),并代表两组独立的实验。\*, $P = 0.004$ 。

[0042] 图 8 是来自 BPZE1 感染(上图)或 BPSM 感染(中图)成年小鼠与被提供 PBS 的对照(下图)的肺组织分析图。在感染 1 周后,无菌地取出肺,并在甲醛中固定。使用苏木精和曙红对切片进行染色并通过光学显微镜进行检测。

[0043] 图 9 是表示针对在(a)成年小鼠和(b)幼鼠中包特氏百日咳杆菌或在幼鼠中副百日咳包特氏菌(d)保护的图表。使用 BPSM(a和b)或副百日咳包特氏菌(d)对 BPZE1、aPV 或 PBS(未进行处理的)免疫的小鼠进行激发,并在 3 小时后(白色柱)和 7 天后(黑色柱)对肺 CFU 数目进行确定。结果表示为来自每组 3~4 只小鼠的 CFU 平均值(±标准误差),并代表 2 组独立的实验。(b,\*, $P = 0.009$ ;d,\*, $P = 0.007$ ) (c) 与对照相比,在 BPZE1 或 aPV 接种疫苗的成年小鼠中 BPSM 激发 3 小时后 CFU 数目。结果来自 3 组独立的实验,并表达为每只小鼠 CFU 相对于相同实验中未免疫组平均值的百分比。

[0044] 图 10 是表示 BPZE1 或 aPV 免疫所诱导免疫应答的柱状图。在 BPZE1 或 aPV 免疫的小鼠中 BPSM 激发之前(白色柱)和激发之后 1 周(黑色柱), (a) 抗 FHA IgG(H+L) 的滴度和 (b) IgG1/IgG2a 的比例。(c) 与对照(灰色柱)相比,在使用 BPZE1(黑色柱)或 aPV(白色柱)进行免疫之前 2 个月,FHA<sup>-</sup>、PTX<sup>-</sup> 或 ConA<sup>-</sup> 刺激的小鼠脾细胞所产生的 IFN- $\gamma$ :IL-5 比例。对于三次测试的每组 4 只小鼠,在每只小鼠中检测抗体和细胞因子,并将结果表达为平均值(±标准误差)。

[0045] 图 11 是百日咳毒素的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)(胰岛激活蛋白 S1)。最开始的 34 个氨基酸是信号肽序列,而 35~269 是成熟链。

[0046] 图 12 是皮肤坏死毒素的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0047] 图 13 是包特氏百日咳杆菌 AmpG 的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0048] 图 14 是大肠杆菌 AmpG 的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。

[0049] 本发明优选实施方式的描述

[0050] 这里所使用的缩写“PTX”是指百日咳毒素,其合成和分泌一种 ADP-核糖基化毒素。PTX 由六条多肽 S1~S5 构成,酶活性部分被称作 S1。PTX 具有一段 34 个氨基酸的信号肽序列,而成熟的肽链则由氨基酸 35~269 构成。PTX 是包特氏百日咳杆菌所表达的主要毒性因子。这些毒素的 A 部分表现出 ADP-核糖基转移酶活性,B 部分介导毒素与寄主细

胞受体的结合以及将 A 转移到其作用位点上 (57)。

[0051] 这里所使用的缩写“DNT”是指百日咳皮肤坏死毒素,是一种热不稳定毒素,如果经皮内注射,DNT 诱导小鼠以及其他实验动物的局部损伤。在以低剂量静脉注射时 (58~61),DNT 对小鼠是致命的。DNT 被认为是猪萎缩性鼻炎中发生鼻甲萎缩的毒性因子 (62,63)。

[0052] 这里所使用的缩写“TCT”是指气管细胞毒素,其是包特氏菌所合成的毒性因子。TCT 是肽聚糖片断,并且具有诱导产生白介素 -1 和一氧化氮合成酶的能力。TCT 具有引起纤毛郁积的能力,并对呼吸上皮细胞具有致命效应。

[0053] 术语“哺乳动物”包括任何哺乳类温血脊椎动物包括人,其特征在于皮肤上覆盖有毛,并且雌性动物具有产生乳汁的乳腺用于抚养幼崽。

[0054] 术语“减毒”的意思是弱化的,毒性差的包特氏菌菌株,其能够刺激免疫应答,并形成保护性免疫,但不会引起任何疾病。

[0055] 术语“快速保护性免疫”的意思是在本发明包特氏菌减毒突变菌株给药之后短时间内提供针对包特氏菌的免疫性。“短时间”是指在接种疫苗和激发之后 1 周。更具体的,现有病原体特异性的外周淋巴细胞、CD8<sup>+</sup> 细胞毒性效应分子 (CTL) 和 CD4<sup>+</sup> 辅助细胞快速扩张。CD4<sup>+</sup> 辅助细胞诱导 B 细胞成熟和抗体产生。因此,记忆库内的淋巴细胞准备好在后续感染时快速增殖。

[0056] 术语“包特氏菌菌株”包括选自包特氏百日咳杆菌 (*Bordetella Pertussis*)、副百日咳包特氏菌 (*Bordetella paraPertussis*) 和支气管败血性包特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 的菌株。

[0057] 用语“包特氏菌感染”的意思是下列三种菌株中至少一种所引起的感染:包特氏百日咳杆菌、副百日咳包特氏菌和支气管败血性包特氏菌。

[0058] “儿童”的意思是年龄在 6 个月~12 岁之间的人或哺乳动物。

[0059] 术语“新生儿”的意思是年龄在 1 天~24 周之间的人或哺乳动物。

[0060] 这里所使用的术语“治疗”不限于治愈疾病和除去病因,而是特别地覆盖治愈、缓解、除去或减轻所感兴趣疾病相关的症状,或者防止或降低寄主身体感染任何疾病或机能失常的可能。

[0061] 术语“保护”和“防止”这里被可以交换使用,并且意思是阻止包特氏菌的感染。

[0062] “预防疫苗”的意思是防止将来暴露所引起的包特氏菌感染。

[0063] “优先通过 Th1 途径”是表示 Th1 途径优先于 Th2 途径。

[0064] 术语“免疫原组合物”的意思是该组合物能够诱导免疫应答,并且因此是抗原。“免疫应答”的意思是免疫系统的任何反应。这些反应包括响应抗原的生物体免疫系统活性的变化,并且可以包括例如抗体产生、诱导细胞介导的免疫、补体激活或免疫耐受性的产生。

[0065] 更具体的,本发明提供了至少一种三突变包特氏菌菌株 (triple mutated *Bordetella* strain),其能够被用作免疫原组合物或疫苗。能够理解的是,所述至少三突变包特氏菌菌株含有突变的 *ptx* 基因、缺失的或突变的 *dnt* 基因以及异源 *ampG* 基因。所述异源 *ampG* 基因产物大量降低了所产生的气管细胞毒素的量。

[0066] 本发明不仅限于上述的三突变体。可以采取其他另外的突变,例如腺苷酸环化酶 (AC) 缺陷突变体 (64)、脂多糖 (LPS) 缺陷突变体 (65)、丝状血凝素 (FHA) (66) 以及任何 *bvg* 调节的组分 (67)。

[0067] 突变的起始菌株可以是任何包特氏菌菌株,包括包特氏百日咳杆菌、副百日咳包特氏菌和支气管败血性包特氏菌。在一个方式中,被用于获得包特氏菌突变菌株的起始菌株是包特氏百日咳杆菌。

[0068] 构建包特氏菌突变菌株是从将菌株中的包特氏菌 ampG 基因替换为异源 ampG 基因开始的。在本发明中,可以使用任何异源 ampG 基因。这些包括所有释放非常少量肽聚糖进入每代培养基中的革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌的例子包括但不限于大肠杆菌、沙门氏菌 (Salmonella)、肠杆菌 (Enterobacteriaceae)、假单胞菌 (Pseudomonas)、莫拉氏菌 (Moraxella)、螺杆菌 (Helicobacter)、嗜麦芽寡养单胞菌 (Stenotrophomonas)、军团菌 (Legionella) 等。

[0069] 通过将包特氏菌 ampG 基因替换为异源 ampG 基因,所得到菌株中产生的气管细胞毒素 (TCT) 的量低于残余 TCT 活性的 1%。在另一个实施方式中,所得到菌株所表达的 TCT 毒素的量在残余 TCT 活性的 0.6%~1%,或者残余 TCT 活性的 0.4%~3%,或者残余 TCT 活性的 0.3%~5%。

[0070] PTX 是对应包特氏百日咳杆菌感染系统性效应的主要毒性因子,以及主要保护性药物之一。由于其性能,自然 ptx 基因被突变版本所替换,以得到酶活部分 S1 编码无酶活的毒素,但是百日咳毒素的免疫原性能不受到影响。这可以通过将序列第 9 位的赖氨酸 (Lys) 替换为精氨酸 (Arg) 所达到。此外,第 129 位的谷氨酸 (Glu) 替换为甘氨酸 (Gly)。

[0071] 也可以作出其他突变,例如在美国专利 6,713,072 中所描述的,此处将美国专利 6,713,072 引入作为参考,以及任何已知的或其他能够将毒素活性降低到无法检测水平的突变。等位基因交换被用于首先缺失 ptx 操纵子,接着插入突变版本。

[0072] 最后,接着通过使用等位基因交换从包特氏菌菌株除去 dnt 基因。除了完全除去外,还能够通过点突变抑制酶活性。因为 DNT 是由 N 末端的受体结合区和 C 末端部分的催化区所构成的,因此将 Cys-1305 替换为 Ala-1305 的 dnt 基因中的点突变会抑制 DNT 的酶活性 (68)。DNT 已经被鉴定为支气管败血性包特氏菌中的重要毒素,并且通过注射极少量而显示致命活性 (26)。

[0073] 除了通过使用等位基因交换插入突变的 ptx 基因,以及被抑制或缺失的 dnt 基因外,还可以通过插入基因序列或质粒破坏基因的开放阅读框。在本发明中也可以应用该方法。

[0074] 本发明的三突变菌株被称作 BPZE1 菌株,并已经于 2006 年 3 月 9 日被保藏在法国巴黎的法国微生物保藏中心 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM),其保藏号为 CNCM I-3585。在 BPZE1 中所引入的突变导致强烈的减毒,但允许细菌形成菌落并保持。因此,在另一个实施方式中,本发明提供了 BPZE1,其能够在给药时诱导粘膜免疫和系统免疫。在另一个方面,BPZE1 被鼻腔给药。

[0075] 本发明的包特氏菌突变菌株可以用于免疫原组合物。这些免疫原组合物可以用于在哺乳动物中产生免疫应答,抗体应答和或优选 T 细胞应答。有利的,T 细胞应答是其保护哺乳动物抵抗包特氏菌感染或抵抗其后续疾病。

[0076] 本发明的包特氏菌突变菌株可以在疫苗或免疫原组合物中作为活菌株使用,或者化学或热灭活菌株使用。在一个方面中,活菌株被用于经鼻给药,而化学或热灭活的菌株可以用于系统或粘膜给药。



[0077] 在用于系统或局部给药时,免疫原组合物还可以含有药物上适当的赋形剂或载体和/或介质(vehicle)。所述药物上可以接受的介质包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液、蒸馏水、乳液如油/水乳液、各种类型的湿润剂无菌溶液等。

[0078] 本发明的免疫原组合物也可以含有佐剂(adjuvants)即任何能够促进或提高T细胞介导应答的物质或化合物,特别是针对本发明有效成分的CD4<sup>+</sup>-介导或CD8<sup>+</sup>-介导的免疫应答。赋形剂例如胞壁肽如MDP、IL-12、磷酸铝、氢氧化铝、Alum和/或Montanide®可以用于本发明免疫原组合物中。

[0079] 本领域技术人员可以理解的是,如果在疫苗或免疫原组合物中使用化学或热处理的包特氏菌突变菌株时,在免疫原组合物中使用赋形剂和乳液。

[0080] 本发明的免疫原组合物至少含有一种具有针对包特氏菌感染或包特氏菌感染毒害作用的预防效果的分子,例如核酸、蛋白质、多肽、载体或药物。

[0081] 本发明的免疫原组合物用于在被给予该组合物的寄主中引发T细胞免疫应答。上面所述的所有免疫原组合物可以被通过各种途径给药:皮下注射(s.c.)、皮内注射(i.d.)、肌肉注射(i.m.)或静脉注射(i.v.),口服给药和鼻腔给药或吸入。

[0082] 在为皮下注射而进行配制时,本发明的免疫原组合物或疫苗每注射剂量优选含有10 $\mu$ g~100 $\mu$ g的该包特氏菌菌株,更优选20 $\mu$ g~60 $\mu$ g/剂量,特别是在一次注射中大约50 $\mu$ g/剂量。

[0083] 在为鼻腔给药而进行配制时,以大约1 $\times$ 10<sup>3</sup>~1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细菌的剂量给药该包特氏菌菌株,这依赖于接受包特氏菌菌株的哺乳动物的体重和年龄。在另一个方式中,可以使用1 $\times$ 10<sup>4</sup>~5 $\times$ 10<sup>6</sup>的剂量。

[0084] 本发明的包特氏菌突变菌株可以用作减毒疫苗以保护免于未来的包特氏菌感染。关于这一点,本发明的优点是可以单剂量对哺乳动物给药,而保护可以持续超过2个月的时间,特别是超过6个月。可以将本发明的疫苗被给予新生儿,并保护免于百日咳的感染。这是特别关键的,因为对于低于1个月的婴儿,包特氏百日咳杆菌的死亡率是大约1.3%。

[0085] 而且,本发明的疫苗能够在流行的地方用于成年哺乳动物中或者超过60岁的老年人中,因为这些老年人的并发症风险可能比稍大的儿童或健康成年人要大。

[0086] 可以使用在免疫原组合物中所列出的生理赋形剂配制疫苗。例如,药物上可以接受的介质包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液、蒸馏水、乳液如油/水乳液、各种类型的湿润剂无菌溶液等。在疫苗中可以使用赋形剂例如胞壁肽如MDP、IL-12、磷酸铝、氢氧化铝、Alum和/或Montanide®。

[0087] 本发明的疫苗能够诱导针对FHA的高滴度血清IgG。抗原特异性细胞因子特征分析显示给药本发明包特氏菌减毒突变菌株引起强TH1应答。

[0088] 本发明的疫苗提供了针对包特氏菌感染的高水平保护,即高于90%的保护水平,特别是高于95%,更特别是高于99%(如实施例9详细描述,注射7天后所计算的)。接种疫苗后至少2个月,与未接种疫苗的(未进行处理的)小鼠相比,含有BPZE1菌株的疫苗的保护水平达到了99.999%。

[0089] 可以通过皮下注射(s.c.)、皮内注射(i.d.)、肌肉注射(i.m.)或静脉注射(i.v.)、口服给药和鼻腔给药或吸入给药疫苗。通常,给药疫苗是单剂量。或者,本发明疫苗给药是首次进行的(起始接种疫苗),接着是最后使用相同菌株、组合物或疫苗或非细胞

疫苗或其组合的一次回忆（后续给药）。

[0090] 在一个方面，完成疫苗的鼻腔给药或者吸入给药，这种给药类型成本低并且能够使本发明的减毒菌株在呼吸道形成菌落：上呼吸道（鼻子和鼻道、鼻窦和咽喉或咽部）和 / 或呼吸气道（喉咙或喉头、气管、支气管和细支气管）和 / 或肺（呼吸性细支气管、肺泡管、肺泡囊和肺泡）。

[0091] 以液体溶液、悬浮液、乳液、脂质体、霜剂、凝胶等多相组合物的形式完成免疫原组合物或疫苗的鼻腔给药。溶液和悬浮液以滴剂给药。也可以作为来自鼻喷瓶或从鼻吸入器的细薄雾给药溶液。将凝胶分配在含有所需剂量的小注射器中用于一次施加。

[0092] 溶液、悬浮液和粉末形式下的免疫原组合物或疫苗形成吸入剂；通过气雾剂或干粉吸入器给药这些制剂。使用吹入器或喷射器给药化合物粉末。

[0093] 本发明的另一方面是包特氏菌突变菌株用于制备治疗呼吸疾病的多价疫苗的应用，所述包特氏菌突变菌株至少含有突变的 *ptx* 基因、缺失的或突变的 *dnt* 基因以及异源 *ampG* 基因。关于这一点，上述的包特氏菌减毒突变菌株可以用作将异源抗原提供给呼吸粘膜的异源表达平台。因此，这些呼吸性病原体例如奈瑟氏菌 (*Neisseria*)、肺炎球菌 (*Pneumophila*)、耶尔森氏菌 (*yersinia*)、假单胞菌、分枝杆菌 (*mycobacteria*)、流感等能够使用 BPZE1 作为载体防止感染。

[0094] 本发明还包括这里所描述的包特氏菌减毒突变活菌株用于制备治疗或防止包特氏菌感染的疫苗的应用。关于这一点，所述疫苗可以用于同时治疗或防止包特氏百日咳杆菌和副百日咳包特氏菌的感染。

[0095] 本发明还包括疫苗用于在百日咳流行时提供快速保护性免疫的应用。

[0096] 本发明还包括疫苗用于提供快速保护性免疫的应用，所述免疫在接种疫苗后至少两个月内持续提高。

[0097] 还将疫苗或免疫原组合物提供在试剂盒中。该试剂盒含有疫苗或免疫原组合物和说明书用于提供免疫接种指导的说明书 (leaflet)。

[0098] 本发明还涉及诱导 T 细胞介导免疫应答的方法，特别是  $CD4^+$  介导的免疫应答或  $CD8^+$  介导的免疫应答，该方法包括在非人类哺乳动物或人中给药包特氏菌减毒活菌株。

[0099] 本发明的另一个实施方式是一种保护哺乳动物免于包特氏菌感染所引起疾病的方法，其包括将包特氏菌突变菌株给药于所述需要这样治疗的哺乳动物，所述包特氏菌突变菌株至少含有突变的 *ptx* 基因、缺失的或突变的 *dnt* 基因以及异源 *ampG* 基因。该方法包括治疗或防止感染包特氏百日咳杆菌和 / 或副百日咳包特氏菌。在一个方式中，在该方法中使用 BPZE1 菌株。

[0100] 本发明还包括一种提供抗包特氏菌感染的快速保护性免疫的方法，其包括将包特氏菌突变菌株给药于需要治疗的所述哺乳动物，所述包特氏菌突变菌株至少含有突变的 *ptx* 基因、缺失的或突变的 *dnt* 基因以及异源 *ampG* 基因。在一个方式中，在该方法中使用 BPZE1 菌株。

[0101] 而且，本发明的包特氏菌减毒突变活菌株诱导黏膜免疫以及系统性免疫。因此，在另一个方式中，本发明还涉及一种诱导粘膜免疫和系统性免疫的方法，其通过将包特氏菌减毒突变活菌株给药于需要该治疗的哺乳动物给药本发明的来进行诱导。在一个方式中，在该方法中使用 BPZE1 菌株。

[0102] 除了在防止和 / 或治疗包特氏菌感染中的作用外,本发明的突变菌株可以用作载体以携带至少另一种编码感兴趣的 RNA (例如反义 RNA) 或蛋白质的异源核酸序列。这意味着所述突变菌株除了异源 ampG 基因以外,还携带至少另一种异源核酸序列。在一个方式中,所述至少另一种异源核酸序列所编码的蛋白质是期望在呼吸道中表达的蛋白质。另一方式中,所感兴趣的蛋白质是抗原例如病毒、细菌或肿瘤抗原,针对所述抗原的免疫应答是期望的。因此,所述携带至少另一种异源核酸序列的包特氏菌突变菌株可以用作疫苗。上述为给药疫苗或免疫原组合物所提供的定义也应用于含有携带至少另一种异源核酸序列的包特氏菌突变菌株的疫苗。异源蛋白的例子是病原体的抗原,其中所述病原体造成与呼吸道相关的疾病感染:小儿麻痹症、流行性感(正粘病毒 (Orthomyxoviridae) 家族的流感病毒 (influenzavirus)) 或者肺炎球菌的抗原 (例如肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae))。

[0103] 已经对本发明的许多实施方式进行了描述。然而,应该理解的是,可以进行各种修改而不离开本发明的主旨和范围。

[0104] 实施例

[0105] 材料和方法

[0106] 实施例 1- 包特氏菌菌株和生长条件

[0107] 在本发明中所使用的包特氏百日咳杆菌菌株全部衍生自包特氏百日咳杆菌 BPSM[13], 副百日咳包特氏菌是菌株 12822 的抗链霉素衍生物 (由法国巴黎 Institut Pasteur 的 Dr. N. Guiso 惠赠)。所有的包特氏菌菌株都生长在鲍 - 金 (Bordet-Gengou) (BG) 琼脂培养基上 (Difco, Detroit, Mich.), 其补充了 1% 甘油、20% 去纤维蛋白的羊血和 100  $\mu$ g/ml 链霉素。为了进行细胞黏附检验,将指数生长的包特氏百日咳杆菌接种在 600nm 光密度为 0.15 的 2.5ml 改进 Stainer-Scholte 培养液中 [14], 其含有 1g/l 七 (2,6-二邻甲基)  $\beta$ -环糊精 (Sigma 公司) 并补充 65  $\mu$ Ci/ml L-[<sup>35</sup>S] 甲硫氨酸和 L-[<sup>35</sup>S] 半胱氨酸 (NEN, Boston, Mass.), 并在 37°C 下生长 24 小时。接着通过离心收获细菌,在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中清洗三次,并以期望的密度重悬浮在 RPMI1640 中 (Gibco, Grand Island, N. Y.)

[0108] 实施例 2 构建包特氏百日咳杆菌 BPZE1

[0109] 为了构建包特氏百日咳杆菌 BPZE1,通过等位基因交换将包特氏百日咳杆菌 ampG 基因替换为大肠杆菌 ampG。使用寡聚核苷酸 A:

[0110] 5'-TATAAATCGATATTCCTGCTGGTTTCGTTCTC-3' (SEQ ID No :5) 和 B:5'-TATAGCTAGC AAGTTGGGAAACGACACCAC-3' (SEQ ID No :6), 以及包特氏百日咳杆菌 BPSM[13] 基因组 DNA 作为模板,扩增命名为 met 的 PCR 片断,其定位于包特氏百日咳杆菌 ampG 基因上游的 49,149 位 ~ 49,990 位。将该 634-bp 片断插入到 Topo PCR II (In Vitrogen Life Technology 公司,格罗宁根 (Groningen), 荷兰) 中,接着作为 ClaI-NheI 片断切出,并插入到 ClaI- 和 NheI- 消化的一种含有大肠杆菌 ampG 基因的自杀载体 pBP23 中 [50], 在大肠杆菌 ampG 基因的 5' 和 3' 末端分别是 618bp 的包特氏百日咳杆菌 DNA (包特氏百日咳杆菌基因组的 50,474 ~ 51,092 位) 和 379bp 的包特氏百日咳杆菌 DNA (包特氏百日咳杆菌基因组的 52,581 ~ 52,960 位)。将所得到的质粒转入到大肠杆菌 SM10 [51], 接着将大肠杆菌 SM10 与 BPSM 接合,并根据描述,对两次连续的同源重组事件进行选择 [52]。通过下面的 PCR 筛选 10 个单独的菌落。将菌落悬浮在 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 中,95°C 下加热 20 分钟,并在 15,000  $\times$ g 下

离心 5 分钟。接着,将 1  $\mu$ l 悬浮液作为模板进行 PCR,该 PCR 中使用寡聚核苷酸 A 和 C:5'-TAAGAAGCAAATAAGCCAGGCATT-3' (SEQ ID No :7),确定大肠杆菌 ampG 的存在,并使用寡聚核苷酸 D:

[0111] 5'-TATACCATGGCGCCGCTGCTGGTGGTGGG-3' (SEQ ID No :8) 和 E:5'-TATATCTAGACGCTGGCCGTAACCTTAGCA-3' (SEQ ID No :9) 用于确认包特氏百日咳杆菌 ampG 的缺失。接着选择含有大肠杆菌 ampG 并缺少包特氏百日咳杆菌 ampG 的菌株,并对整个 ampG 基因座进行测序。接着将该菌株用于进一步改造。

[0112] 根据 [21] 所描述的,从该菌株染色体中去除 ptx 基因,接着使用编码无活性 PTX 的突变 ptx 进行替换。将来自 pPT-RE 含有突变 ptx 基因座的 EcoRI 片断 [16] 插入到 pJQ200mp18rps1 的 EcoRI 位点 [53]。接着在通过与大肠杆菌 SM10 接合后利用同源重组,将所得到的质粒整合到包特氏百日咳杆菌染色体的 ptx 基因座中。对所得到的包特氏百日咳杆菌菌株染色体中的 ptx 基因座进行测序,确认期望的突变的存在。通过免疫印迹分析毒素的产生,其使用对 PTX 的亚基 S1 特异性的单克隆抗体 IB7 [54] 和对 PTX 的亚基 S2 和 S3 特异性的 11E6 [55]。

[0113] 最后,在使用 BPSM 基因组 DNA 作为模板,寡聚核苷酸 F:5'-TATAGAATTCGCTCGGTTCGCTGGTCAAGG-3' (SEQ ID No :10) 和 G:5'-TATATCTAGAGCAATGCCGATTCATCTTTA-3' (SEQ ID No :11) 作为 dnt 上游区引物,H:5'-TATATCTAGAGCGGCCCTTTATTGCTTTTCC-3' (SEQ ID No :12) 和 I:5'-TATAAAGCTTCTCATGCACGCCGGCTTCTC-3' (SEQ ID No :13) 作为 dnt 下游区引物扩增 dnt 两侧区时,从所得到的包特氏百日咳杆菌中除去 dnt 基因。分别使用 EcoRI/XbaI 和 XbaI/HindIII 对所得到的 799-bp 和 712-bp DNA 片断进行消化,并使用 Fast Link 试剂盒 (Epicentre Biotechnologies 公司, Madison, WI) 连接起来。通过 PCR 使用寡聚核苷酸 F 和 I 扩增所连接的片断,并将 1505-bp 的 PCR 片断插入到 pCR2.1-Topo 中 (英杰 (Invitrogen) 公司),从所得到的质粒中重新分离为 EcoRI 片断并插入到 pJQmp200rpsL18 唯一的 EcoRI 位点。通过大肠杆菌 SM10 的结合,将所得到的质粒引入到包特氏百日咳杆菌中。使用对应 dnt 上游区的 PCR 片段作为探针,通过对 PvuII- 消化的包特氏百日咳杆菌基因组 DNA 进行 Southern 印迹,确认成功除去 dnt 基因。使用 DIG Easy Hyb 标记试剂盒 (Roche, Meylan, 法国) 对探针进行标记。通过 Dig- 标记的 DNA 分子标记物 III (Roche) 的迁移距离确定杂交带的大小。对该最终菌株中的 dnt 基因座 (命名为 BPZE1) 进行测序。

[0114] 实施例 3 分析 TCT 的产生

[0115] 为了对 TCT 的产生进行灵敏的定量,收集包特氏百日咳杆菌培养到对数期的培养上清液,并进行固相提取 [15],并使用异硫氰酸苯酯 (PITC, Pierce) 进行衍生。通过使用 C8 柱的反相 HPLC (Perkin Elmer) 分离所得到的硫氰酸苯酯 (PTC) 衍生物,并在 254nm 处进行检测。通过将峰值面积和洗脱时间与相同处理的 TCT 标准进行比较,确定每个样品中包特氏百日咳杆菌 PTC-TCT 的量。

[0116] 实施例 4 细胞黏附检验

[0117] 为了分析包特氏百日咳杆菌菌株的黏附性能,根据之前所描述的 [16],检测它们与人上皮细胞系 A549 (ATCC n° CCL-185) 和鼠巨噬细胞系 J774 (ATCC n° TIB-67) 的结合速率。

[0118] 实施例 5 透射电子显微镜

[0119] 根据之前所描述的 [17], 通过下列修饰使用单滴负染色程序。将  $20 \mu\text{l}$  大约  $10^9$  个细菌 /ml 的悬浮液吸附到涂碳镍网格 2 分钟 (400mesh ;ElectronMicroscopy Sciences 公司 (EMS), 华盛顿, PA)。该网格空气干燥 30 秒后, 使用  $20 \mu\text{l}$  12% 的磷钨酸 (pH7 ;EMS) 对网格进行染色 2 分钟, 并在空气干燥后在透射电子显微镜 (Hitachi7500, 日本) 下以 60 千伏和高分辨率进行检测。

[0120] 实施例 6 鼻腔感染和接种疫苗

[0121] 将 3 周和 8 周大的雌性 Balb/C 小鼠保持在没有特异性病原体的条件下, 并在 Institut Pasteur de Lill 动物研究委员会的指导下进行所有的实验。为小鼠鼻腔感染  $20 \mu\text{l}$  PBS 内的大约  $4 \times 10^6$  的细菌, 并根据之前的描述 [18], 检测肺中的 CFU 动力学。为了进行 aPv (Tetravac ;Aventis-Pasteur, 法国) 的疫苗接种, 对小鼠腹膜注射 (i. p.) 20% 的人剂量进行免疫, 并在一个月后使用相同的剂量进行增强。

[0122] 实施例 7 抗体确定

[0123] 收集血清, 并且根据之前所述 [18], 通过酶联免疫吸附检验 (ELISA) 确定抗体滴度。

[0124] 实施例 8 细胞因子检验

[0125] 在免疫后的不同时间点对来自个体小鼠的脾细胞检验体外细胞因子的产生, 其产生对应于热灭活包特氏百日咳杆菌 BPSM ( $10^6 \text{ cells/ml}$ ) ( $10^6$  个细胞 /ml)、 $5.0 \mu\text{g/ml}$  PTX (根据之前所述 [20] 从包特氏百日咳杆菌 BPGR4 所纯化的 [19], 并在  $80^\circ\text{C}$  下热失活 20 分钟)、 $5.0 \mu\text{g}$  丝状血凝素 (FHA, 根据之前所述 [22] 从包特氏百日咳杆菌 BPRA 纯化的 [21])、 $5 \mu\text{g/ml}$  刀豆球蛋白 A (Sigma 化学公司, St. Louis, Mo.) 或者作为对照的培养液。在  $37^\circ\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  中孵育 72 小时后, 从三批培养物中除去上清, 并通过免疫检验确定 IFN- $\gamma$  和 IL-5 含量 (BDOptEIA set, Pharmingen 公司)。

[0126] 实施例 9 鼻腔感染和接种疫苗 : 在第 1、2、3 和 4 周激发

[0127] 幼鼠 (3 周龄) 模型 [29] 用于将使用 BPZE1 的接种疫苗的效率与非细胞百日咳疫苗 (aPv) 的接种疫苗的效率进行比较。使用  $20 \mu\text{l}$  PBS 内大约  $1 \times 10^6$  BPZE1 菌株鼻腔感染雌性 Balb/C 小鼠。为了使用 aPv (Tetravac ;Aventis-Pasteur, 法国) 进行接种疫苗, 对小鼠腹膜注射人剂量的 20% 来进行免疫。在使用 BPZE1 或 aPv 接种疫苗后, 1、2、3、或 4 周, 使用毒性包特氏百日咳杆菌 BPSM/bctA-lacZ 菌株进行鼻腔激发 [53]。该菌株是衍生自 BPSM 的庆大霉素抗性菌株, 在含有  $10 \mu\text{g/ml}$  庆大霉素和  $100 \mu\text{g/ml}$  链霉素 (BGg) 的鲍-金 (Bordet-Gengou) (BG) 琼脂平板上, 其能够与 BPZE1 (庆大霉素敏感) 区别。对照组对应于使用 BPSM/bctA-lacZ 激发的空白小鼠。激发感染后一星期, 将肺无菌取出, 匀浆并铺在 BGg 平板上, 根据之前所述的进行 CFU 确定 [18]。

[0128] 使用 BPZE1 或 aPv 对小鼠进行疫苗接种, 并在接种疫苗 1、2、3 或 4 周后使用毒性包特氏百日咳杆菌进行激发。在 3 小时或 7 天后, 确定肺 CFU 计数。结果表示为来自每组 3 ~ 5 只小鼠的 CFU 平均值 ( $\pm$  标准误差)。将每次激发感染的保护水平计算为激发感染后 7 天, 每组 CFU 相对于非免疫组 CFU 平均数的平均百分比 (表 2 ~ 5)。

[0129] 实施例 10 统计分析

[0130] 使用非成对学生 t 检验 (unpaired Student' sttest) 和克鲁斯凯-沃利斯检验 (Kruskal-Wallis test), 如果适当的话接着进行 Dunn 试验后检验 (Dunn' spost-test)

(GraphPad Prism 程序),对结果进行分析。如果  $P \leq 0.05$ ,则认为差异显著。

[0131] 结果

[0132] 构建包特氏菌 BPZE1

[0133] 遗传定位三个毒性因子:气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTX) 和皮肤坏死毒素 (DNT)。

[0134] TCT 引起被感染寄主气管中纤毛细胞的破坏 [24, 25], 并可能因此参与咳嗽综合症。TCT 是革兰氏阴性细菌细胞壁中肽聚糖的分解产物, 其中通常细菌通过 AmpG 转运子将 TCT 内化到细胞质中以在细胞壁的生物合成中重新利用。包特氏百日咳杆菌 AmpG 在内化肽聚糖分解产物中效率低。因此, 我们将包特氏百日咳杆菌 AmpG 替换为大肠杆菌 ampG。所得到的菌株表达低于 1% 的残余 TCT 活性 (图 1)。

[0135] PTX 是对应包特氏百日咳杆菌感染的主要毒性因子, 其由被称作 S1 的酶活性部分以及负责与靶细胞受体结合的部分构成 (综述, 参见 26)。然而, 其还是主要的保护性抗原之一, 这促使我们将天然的 ptx 基因替换为编码无酶活毒素的突变版本。这通过将 S1 中的 Lys-9 替换为 Arg, Glu-129 替换为 Gly 来实现, 其中这两个关键的残基分别参与底物结合以及催化。等位基因交换被用于首先除去 ptx 操纵子, 接着加入突变的版本。通过免疫印迹分析评估在包特氏百日咳杆菌培养物上清中的相关毒素类似物的存在 (图 2)。

[0136] 最后, 等位基因交换被用于除去 dnt 基因 (图 3)。尽管 DNT 在包特氏百日咳杆菌毒性中的作用还不确定, 但其已经被鉴定为紧密相关的物种支气管败血性包特氏菌中的重要毒素, 并且显示了通过注射极少量后的致命活性 (综述, 参见 26)。

[0137] 体外鉴定包特氏百日咳杆菌 BPZE1

[0138] 由于 BPZE1 中的某些基因改变可能会潜在地影响细菌细胞壁的合成, 因此将 BPZE1 的大小和形状以及体外生长速率与亲代菌株 BPSM 进行比较。BPZE1 的生长速率与 BPSM 没有不同 (图 4), 并且通过电子显微镜分析明确了, 在 BPZE1 和 BPSM 之间没有监测到细菌形状或大小上的区别 (图 5)。然而, BPZE1 的细胞壁一直比 BPSM 的细胞壁薄一些。

[0139] 为了确定是否任何在 BPZE1 中目标毒素的缺失或改变会影响包特氏百日咳杆菌的黏附性能, 将 BPZE1 的附着速率与 BPSM 的附着速率进行比较, 使用人肺上皮细胞系 A549 和鼠巨噬细胞系 J774 作为两种细胞模型, 其通常用于研究包特氏百日咳杆菌的黏附。在两种菌株之间没有观察到与任何一种细胞系黏附的显著差异 (图 6)。

[0140] 包特氏百日咳杆菌 BPZE1 的减毒

[0141] 为了确定是否在包特氏百日咳杆菌 BPZE1 中引入突变导致减毒, 而仍允许生物体在呼吸道中形成菌落, 使用 BPZE1 或 BPSM 对 Balb/C 小鼠进行经鼻感染, 之后随着时间形成菌落。BPZE1 与 BPSM 一样, 能够形成菌落, 并保持在小鼠的肺中 (图 7)。然而, 在使用 BPSM 感染 7 天后观察到的繁殖峰一直在使用 BPZE1 感染的小鼠中没有观察到。使用单种毒素基因突变的菌株进行的研究显示这是由于 ptx 基因座的突变引起的 (数据未提供)。如果对肺检测组织病理学变化和炎症渗透, 则在感染 7 天后, 发现 BPSM 感染诱导强支气管周围血管渗透以及炎症细胞聚集, 这与支气管上皮细胞的强过度生长有关 (图 8)。相反, 在 BPZE1 感染的动物中没有观察到这些变化, BPZE1 感染的动物地组织学与接受 PBS 而不是细菌的对照小鼠的组织学类似。BPSM 感染诱导的炎症持续至少 2 个月 (数据未提供)。这些结果说明引入到 BPZE1 的突变导致了强烈的减毒, 但使细菌在肺部形成菌落并持续。

[0142] 使用 BPZE1 对成年小鼠进行鼻腔接种疫苗后的抗包特氏百日咳杆菌激发的保护

[0143] 为了评估 BPZE1 所提供的保护,将为 8 周龄 Ba1b/C 小鼠鼻腔单次给药该菌株对后续野生型激发菌株 BPSM 的形成菌落的影响与使用 1/5 人类剂量的 aPV 进行的两次腹腔注射免疫的影响进行比较。该 aPV 免疫方案已经被充分描述,最好与人临床样品中的百日咳疫苗效力相关 [27, 28]。如通过激发感染 7 天后肺中细菌菌落数目的全部清除所显示的,鼻腔单次给药 BPZE1 和通过两次腹腔注射 aPV 的免疫都提供了类似水平的保护 (图 9a)。在接受两次 PBS 注射而不是疫苗的对照小鼠中发现了高细菌负载。

[0144] 在为幼鼠使用 BPZE1 鼻腔免疫后针对包特氏百日咳杆菌的保护

[0145] 由于新型百日咳疫苗的主要目标是目前使用可利用疫苗不能被保护的幼婴,因此开发了幼鼠模型 (3 周龄) [29],并用于将使用 BPZE1 接种疫苗的效力与使用 aPV 接种疫苗的效力进行比较。单次经鼻给药 BPZE1 完全保护幼鼠抵抗激发感染 (图 9b),因为在激发后一周观察到肺中细菌的完全清除。相对地,激发感染后 1 周,在 aPV 接种疫苗的动物中仍残余实质量的细菌。BPZE-1 接种疫苗的和 aPV- 接种疫苗的小鼠之间细菌负载的差别是统计上显著的,这说明在幼鼠模型中,使用 BPZE1 的单次鼻腔给药提供了比两次系统性给药 aPV 好的保护。

[0146] 另外,与 aPV- 接种疫苗动物相比,如果小鼠已经被使用 BPZE1 进行免疫,则稳定观察到给药后 3 小时激发菌株细菌负载的大量下降 (图 9c),这说明使用 BPZE1 进行接种疫苗降低了对激发菌株感染的易感性。在 8 周的小鼠和幼鼠中都观察到了该效果。相反,与对照小鼠相比,aPV 在感染 3 小时后对细菌数目没有影响。

[0147] 在鼻腔接种疫苗 BPZE1 后的抗包特氏百日咳杆菌的保护

[0148] 关于儿童中包特氏百日咳杆菌感染有越来越多的关注,特别是在免疫的人群中 [30, 31]。副百日咳包特氏菌引起了更轻微的百日咳类综合症,其频率可能被大大低估。而且,副百日咳包特氏菌感染的发病率在过去几十年已经持续提高,可能是因为已知的百日咳疫苗对副百日咳包特氏菌具有非常低或者没有保护性效力 [32, 33]。相反,最近已经报道包特氏百日咳杆菌感染会进行保护抗副百日咳包特氏菌的感染 [34]。还使用幼鼠检验 BPZE1 的抗副百日咳包特氏菌的保护。然而,正如之前所报道的,两次给药 aPV 不提供针对副百日咳包特氏菌的任何保护,根据激发后 1 周接种疫苗的小鼠肺中副百日咳包特氏菌的低数目所检测的,单次鼻腔给药 BPZE1 提供了强保护 (图 9d)。

[0149] BPZE1 疫苗接种诱导的免疫应答

[0150] 尽管抗包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 感染的保护性免疫的机制还未完全了解,但是在小鼠中已经证明了 B 细胞与 IFN- $\gamma$  作用的明确证据 [28]。使用一次鼻腔剂量的 BPZE1 或两次腹腔注射给药 aPV 诱导了高滴度抗 FHA 的血清,包特氏百日咳杆菌的主要表面抗原 [35],这同样在 aPV 中出现 (图 10a)。在包特氏百日咳杆菌激发之后,在 BPZE1- 接种疫苗的动物和 aPV- 接种疫苗的动物中检测阳性回忆应答,表现为与包特氏百日咳杆菌感染之前初次应答相比,抗 FHA IgG 滴度的提高。抗 FHA IgG1/IgG2a 比例的检测显示这些比例在给药 aPV 之后比 BPZE1 接种疫苗之后高,其中抗 FHA IgG1/IgG2a 比例是 Th2 型应答的特征 (图 10b)。尽管在 aPV 接种疫苗的小鼠中激发后抗 FHA-IgG1/IgG2a 降低,但它仍保持了比 BPZE1 接种疫苗的动物在包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 激发后实质高的水平。

[0151] BPZE1 或 aPV 接种疫苗所诱导的包特氏百日咳杆菌抗原特异性细胞因子特征的分

析确认 BPZE1 给药促进比 aPV 接种疫苗强的 Th1 型应答。这是由使用 PHA 或 PT 或使用多克隆激活剂 ConA 刺激的脾细胞所产生的 IFN- $\gamma$  与 IL-5 的比例,在 BPZE1 接种疫苗的小鼠中比在 aPV 接种疫苗的小鼠中显著得高(图 10c)。

[0152] 一段时间内 BPZE1 的保护性免疫(1 周~4 周)

[0153] 如下表 1~5 中所示,尽管给药 aPV 提供了抗包特氏百日咳杆菌的有限保护(与第一周的未接种疫苗小鼠相比,细菌负载降低 75%),但针对在接种疫苗一周后进行的包特氏百日咳杆菌激发感染,单次鼻腔给药 BPZE1 也提供了高水平的保护(细菌负载降低 97.64%)。如果激发感染出现在接种疫苗后 2 周,与未接种疫苗的小鼠相比,则 BPZE1 诱导的保护水平达到了 99.99% 以上,并且显著优于 aPV 疫苗所诱导的保护(与未接种疫苗的小鼠相比,92% 大约)。因此, BPZE1 的抗包特氏百日咳杆菌激发的疫苗效率在接种疫苗 1 周后仍显著,并且在接下来的 2 个月中持续提高。

[0154]

接种疫苗和激发之间的时间	肺提取和激发之间的时间	Log <sub>10</sub> cfu /小鼠的肺		
		空白	aPv-接种疫苗	BPZE1-接种疫苗
1 周	3 小时	5.71 ± 0.03	5.8 ± 0.07	5.74 ± 0.01
	7 天	6.71 ± 0.06	5.97 ± 0.20	4.86 ± 0.35
2 周	3 小时	5.77 ± 0.10	5.60 ± 0.02	5.49 ± 0.05
	7 天	6.49 ± 0.08	5.31 ± 0.16	3.22 ± 0.33
3 周	3 小时	6.03 ± 0.11	5.88 ± 0.04	5.33 ± 0.08
	7 天	6.58 ± 0.09	5.62 ± 0.11	3.14 ± 0.38
4 周	3 小时	6.31 ± 0.01	6.15 ± 0.02	5.83 ± 0.05
	7 天	6.36 ± 0.04	5.21 ± 0.11	1.83 ± 0.46

[0155] 表 1:在幼鼠中抗包特氏百日咳杆菌激发的疫苗效力的动力学

[0156]



表 2. 在第 1 周, 与未接种疫苗的小鼠相比, aPv 接种疫苗和 BPZE 接种疫苗的小鼠的保护水平

未接种疫苗的小鼠	肺中的细菌数目	细菌的平均数目	残余细菌的百分比 <sup>(1)</sup>	残余细菌的平均百分比	保护水平
未接种疫苗的小鼠 1	4.7x10 <sup>6</sup>	5.36.10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 2	3.8x10 <sup>6</sup>				
未接种疫苗的小鼠 3	8.2x10 <sup>6</sup>				
未接种疫苗的小鼠 4	4.1x10 <sup>6</sup>				
未接种疫苗的小鼠 5	6 x10 <sup>6</sup>				
aPv 接种疫苗的小鼠					
aPv1	1.95 x10 <sup>6</sup>	36.38	25 %	75 %	
aPv2	2.9 x10 <sup>6</sup>	54.1			
aPv3	2.9 x10 <sup>5</sup>	5.41			
aPv4	3.6 x10 <sup>5</sup>	6.72			
aPv5	1.2 x10 <sup>6</sup>	22.39			
BPZE1 接种疫苗的小鼠					
BPZE1-1	3.2 x10 <sup>5</sup>	5.97	2.36 %	97.64 %	
BPZE1-2	2 x10 <sup>4</sup>	0.004			
BPZE1-3	6 x10 <sup>4</sup>	1.12			

(1) 残余细菌的百分比=每只特定小鼠的细菌的数目/所有未接种疫苗的小鼠的细菌的平均数目

[0157]

表 3: 在第 2 周, 与未接种疫苗的小鼠相比, aPv 接种疫苗和 BPZE 接种疫苗的小鼠的保护水平

未接种疫苗的小鼠	肺中的细菌数目	细菌的平均数目	残余细菌的百分比 <sup>(1)</sup>	残余细菌的平均百分比	保护水平
未接种疫苗的小鼠 1	5x10 <sup>6</sup>	3.34x10 <sup>6</sup>	残余细菌的百分比 <sup>(1)</sup>	残余细菌的平均百分比	保护水平
未接种疫苗的小鼠 2	3.6x10 <sup>6</sup>				
未接种疫苗的小鼠 3	1.7x10 <sup>6</sup>				
未接种疫苗的小鼠 4	2.4x10 <sup>6</sup>				
未接种疫苗的小鼠 5	4 x10 <sup>6</sup>				
aPv 接种疫苗的小鼠					
aPv1	9.5 x10 <sup>4</sup>	2.84	8.11 %	8.11 %	91.89 %
aPv2	2.9 x10 <sup>5</sup>	8.68			
aPv3	1 x10 <sup>5</sup>	2.99			
aPv4	6.8 x10 <sup>5</sup>	20.36			
aPv5	1.9 x10 <sup>5</sup>	5.69			
BPZE1 接种疫苗的小鼠					
BPZE1-1	9.5 x10 <sup>3</sup>	2.8 x10 <sup>-3</sup>	1.03 x10 <sup>-3</sup> %	1.03 x10 <sup>-3</sup> %	99.999 %
BPZE1-2	450	1.35 x10 <sup>-4</sup>			
BPZE1-3	3500	1.05 x10 <sup>-3</sup>			
BPZE1-4	500	1.5 x10 <sup>-4</sup>			

(1) 残余细菌的百分比=每只特定小鼠的细菌的数目/所有未接种疫苗的小鼠的细菌的平均数目

表 4: 在第 3 周, 与未接种疫苗的小鼠相比, aPv 接种疫苗和 BPZE 接种疫苗的小鼠的保护水平

未接种疫苗的小鼠	肺中的细菌数目	细菌的平均数目		
未接种疫苗的小鼠 1	1.8x10 <sup>6</sup>	4.04x10 <sup>6</sup>		
未接种疫苗的小鼠 2	5.75x10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 3	4.7x10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 4	3.2x10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 5	4.75 x10 <sup>6</sup>			
	肺中的细菌数目	残余细菌的百分比 (1)	残余细菌的平均百分比	保护水平
aPv 接种疫苗的小鼠				
aPv1	1.99 x10 <sup>5</sup>	4.94	11.26 %	88.74 %
aPv2	6 x10 <sup>5</sup>	14.85		
aPv3	6 x10 <sup>5</sup>	14.85		
aPv4	4.2 x10 <sup>5</sup>	10.40		
BPZE1 接种疫苗的小鼠				
BPZE1-1	3640	9.01 x10 <sup>-4</sup>	8.65 x10 <sup>-4</sup> %	99.999 %
BPZE1-2	9720	2.4 x10 <sup>-3</sup>		
BPZE1-3	300	7.43 x10 <sup>-5</sup>		
BPZE1-4	340	8.42 x10 <sup>-5</sup>		

(1) 残余细菌的百分比=每只特定小鼠的细菌的数目/所有未接种疫苗的小鼠的细菌的平均数目

[0159]

表 5: 在第 4 周, 与未接种疫苗的小鼠相比, aPv 接种疫苗和 BPZE 接种疫苗的小鼠的保护水平

未接种疫苗的小鼠	肺中的细菌数目	细菌的平均数目		
未接种疫苗的小鼠 1	2.1x10 <sup>6</sup>	2.36x10 <sup>6</sup>		
未接种疫苗的小鼠 2	2.2x10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 3	3.1x10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 4	2.6x10 <sup>6</sup>			
未接种疫苗的小鼠 5	1.8 x10 <sup>6</sup>			
	肺中的细菌数目	残余细菌的百分比 <sup>(1)</sup>	残余细菌的平均百分比	保护水平
aPv 接种疫苗的小鼠				
aPv1	2.52 x10 <sup>5</sup>	10.68	7.76 %	92.24 %
aPv2	3.28 x10 <sup>5</sup>	13.90		
aPv3	1.04 x10 <sup>5</sup>	4.41		
aPv4	8.4 x10 <sup>5</sup>	3.56		
aPv5	1.48x10 <sup>5</sup>	6.27		
BPZE1 接种疫苗的小鼠				
BPZE1-1	190	8.05 x10 <sup>-5</sup>	7.13 x10 <sup>-5</sup> %	99.999 %
BPZE1-2	0	0		
BPZE1-3	110	4.66 x10 <sup>-5</sup>		

(1) 残余细菌的百分比=每只特定小鼠细菌的数目/所有未接种疫苗的小鼠的细菌的平均数目

[0160] 百日咳是第一个传染性疾病,其发病率在高疫苗覆盖的国家持续增加。这种自相矛盾的状况可能与因为大量引入高度有效的疫苗而所观察到的流行病学改变有关。与接种

疫苗之前的时代不同,目前青少年和成人百日咳的病理越来越频繁。尽管在该年龄组通常不威胁生命,但包特氏百日咳杆菌感染的成人对于非常年轻的儿童的感染是非常重要的贮主,这些非常年轻的儿童太小而不能通过接种疫苗而得到保护。因此,特别期望早期,可能是在出生时接种疫苗,但会受到新生儿和婴儿不成熟的免疫系统的限制。然而,天然包特氏百日咳杆菌感染即使在生命早期也能够诱导婴儿中强 Th1 应答 [12] 的事实促使我们开发通过经鼻途径给药的包特氏百日咳杆菌减毒疫苗活菌株,从而作为目前可以利用的疫苗的替代。

[0161] 基于灵长类动物的感染实验, Huang 等人已经在 1962 年得到结论:抗百日咳的最终保护可能最好是遵循接种活包特氏百日咳杆菌 [36]。在兽医学中,包特氏菌减毒菌株已经被用于针对狗和小猪中博德杆菌病 (bordetellosis) 进行接种疫苗。支气管败血性包特氏菌减毒活菌株已经显示在经鼻给药后在狗中提供针对犬窝咳 (Kennel Cough) 的强保护 [37]。早在接种疫苗后 48 小时就观察到这种保护。使用支气管败血性包特氏菌减毒活菌株进行鼻腔接种疫苗也已经显示在两天大的小猪中提供抗萎缩性鼻炎的保护 [38],这说明减毒形式的包特氏菌活疫苗在新生动物中可以是高度活性的。

[0162] 之前将包特氏百日咳杆菌遗传减毒为活疫苗候选物的努力得到了非常有限的成功。根据用于对沙门氏菌 (*Salmonella*) 疫苗菌株成功减毒的策略 [39], Roberts 等人已经去除了包特氏百日咳杆菌的 *aroA* 基因 [40]。*aroA* 突变体的确是高度减毒的,但也丧失了鼻腔接种疫苗的动物的呼吸道内形成菌落的能力,并只有在重复高剂量给药才能诱导保护性免疫。我们利用关于包特氏百日咳杆菌毒性分子机理的知识,开发了高度减毒的 BPZE1 菌株。该菌株含有遗传改变,这导致三种主要毒素 PTX、TCT 和 DNT 的缺失或失活。与 *aroA* 突变体相反,该菌株能够在小鼠呼吸道内形成菌落,并在单次鼻腔给药后提供完全保护。在成年小鼠中的保护与通过两次给药 1/5 人剂量的 aPV 所诱导的保护没有区别。然而,在幼鼠中观察到了显著的区别,其中单次给药 BPZE1 完全保护,而 aPV 仅提供了部分保护。在难以使用目前可以利用的疫苗在生命早期诱导婴儿中的保护的前提下,这些结果为开发新型接种疫苗策略提供了希望,其可以用于非常年轻的儿童,甚至可能是在出生时。另外, BPZE1 保护抵抗副百日咳包特氏菌,而 aPV 则不能。因此,使用 BPZE1 也应该对由副百日咳包特氏菌在婴儿中造成的百日咳发病率有影响。

[0163] 尽管最近在很多国家使用新型的 aPV 替换最早开发的全细胞疫苗已经显著降低了使用全细胞疫苗所观察到的系统性副作用,但重复接种疫苗以获得保护的需仍没有消除。这导致不能够在非常年轻的儿童 (<6 个月) 获得保护,这提供了产生炎症疾病的最大风险。另外,广泛使用 aPV 已经显示了新的未预见的问题。重复给药 aPV 可能造成在注射点大范围的肿胀 [41],这是用全细胞疫苗则没有发现。在大约 5% 的案例中,这种肿胀会影响整个肢体,并持续 1 周以上。尽管该肿胀的机理还没有被确定,但是已经认为是由于初次免疫所诱导的高抗体水平所造成的 Arthus 超敏反应 [42]。然而,其也可能与 Th2 免疫应答的倾斜有关,因为与全细胞疫苗相比, aPV 给药在接种疫苗的儿童中诱导更多的 Th2 型细胞因子 [10],并造成 Th1 产生的延迟 (Mascart 等人,准备中)。Th1 功能的延迟成熟化已经与遗传倾向的个体中遗传性过敏症的风险有关 [33]。这两个机理不是相互排斥的。与 aPV 相比,对 BPZE1 给药的免疫应答会更不偏向于 Th2 一边,并且由于 BPZE1 被经粘膜给药,因此不会发生肿胀反应。

[0164] 使用减毒的活细菌作为疫苗提高了它们的生物安全性。因此,它们满足了基因修饰的生物适于释放到环境的规定和指导。这些规定和指导描述了许多需要满足的条款,包括危害鉴定和环境风险评估 [44]。潜在的病原性需要被认真考虑,特别是在免疫损伤的个体中,例如感染 HIV 的个体。包特氏百日咳杆菌的自然生物性是在这一点上特别令人感兴趣的。尽管 HIV 感染的对象中百日咳已经被偶尔描述,但是在 AIDS 患者中还是相当罕见的 [45]。因此,包特氏百日咳杆菌以它遗传减毒的形式被认为不会在感染 HIV 的儿童中造成重大问题,特别是如同对于许多疫苗,如果严重的 AIDS 是被排除的标准。包特氏百日咳杆菌形成菌落是特别限于呼吸上皮,而没有肺外细菌分布,这自然不包括 BPZE1 疫苗菌株的系统性菌血症。然而,如果发生了未预料的安全问题,也能够通过大环内酯抗生素例如红霉素消除该疫苗菌株,几乎所有的包特氏百日咳杆菌分离物都对红霉素高度敏感。

[0165] 与所有活疫苗一样,其它的考虑是可能将疫苗菌株释放到环境中,以及释放之后的事情。包特氏百日咳杆菌是严格的病原体,并且没有动物载体或贮主。而且,与支气管败血性包特氏菌不同,环境中野生型包特氏百日咳杆菌的存活是非常受到限制的 [46]。百日咳仅能够由咳嗽的个体传播,并且似乎没有无症状的带菌者 [47]。在本研究中所使用的小鼠模型中不能检验咳嗽。然而,由于 BPZE1 中基因改变的特征,特别是 TCT 的大幅降低以及 PTX 的遗传失活,该菌株被认为不诱导咳嗽。已经显示活性的 PTX 在咳嗽大鼠模型中对于咳嗽是必须的,尽管其机理还不知道 [48]。然而,如果疫苗菌株被传递给未接种疫苗的小鼠个体,最差也是将导致疫苗覆盖面的提高。因此,这些潜在危害的结果能够被认为可以忽略的,并且能够简单快速的被抗生素处理(如果必要的话)而控制。

[0166] 使用 BPZE1 的优点包括相对低的生产成本,使其对于发展中国家特别有吸引力,其不使用针的简单安全的给药模式以及其除了系统性免疫以外诱导粘膜免疫的潜力。尽管令人吃惊的是,抗百日咳的粘膜免疫还没有被大量研究,但是包特氏百日咳杆菌是严格粘膜病原体的事实,导致很可能粘膜免疫应答可以显著促进保护。目前还没有任何可以利用的疫苗诱导显著的粘膜应答。

[0167] 在接种疫苗中使用 BPZE1 的其他优点是:

[0168] - 在单次鼻腔给药 BPZE1 之后获得快速的保护性免疫应答,因此在接种疫苗后 1 周可以检测到诱导疫苗;

[0169] - 在接种疫苗后至少两个月内保护性疫苗持续提高;以及

[0170] - 完全的保护性免疫,因为在接种疫苗后 2 周获得了超过 99.999% 的保护水平。

[0171] 使用包特氏百日咳杆菌减毒活菌株进行粘膜接种疫苗提供了另一个优点。包特氏百日咳杆菌能够用于对呼吸粘膜的异源抗原的表达(综述,参见 49)。因此,使用 BPZE1 作为异源表达平台可以有助于产生针对多种呼吸道病原体的多价疫苗。然而,由于鼻腔给药 BPZE1 还诱导强系统免疫应答,如这里通过高水平的抗 FHA 抗体和抗原特异性 IFN- $\gamma$  产生所示,其还可以用于产生期望系统免疫应答期望的抗原。

[0172] 尽管本发明已经对各种优选的实施方式进行了描述,但本领域技术人员能够接受可以进行各种修饰、替换、省略和改变,而不离开本发明的范围。因此,本发明的范围是由后面的权利要求包括其等同物所限定的。

[0173] 参考文献

[0174] 1. WHO(2004) 世界健康报告 2004- 改变的历史 (The world health

report2004-changing history), Geneva, WHO.

[0175] 2. Das P(2002) 百日咳使世界后退 (Whooping cough makes global comeback). Lancet ii :322.

[0176] 3. Tan T, Trindade E, Skowronski D(2005) 百日咳的流行病学 (Epidemiology of Pertussis). Pediatr Infect Dis J 24 :S10-S18.

[0177] 4. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis. 可以从网络上获得 :<http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/pert.pdf>.

[0178] 5. Wirsing von **König** CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N(2002) 成人和婴儿的百日咳 (Pertussis of adults and infants). Lancet Infect Dis 2 : 744-750. 6. Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, 等人 (1991) 新生儿 T 细胞降低白介素 -4 和干扰素 - $\gamma$  的细胞和分子机理 (Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production by neonatal T cells). J Clin Invest 87 :194-202.

[0179] 7. Siegrist CA(2001) 新生儿和早期生命接种疫苗 (Neonatal and early life vaccinology). Vaccine. 19 :3331-3346.

[0180] 8. Mills KHG(2001) 对包特氏百日咳杆菌 (B. Pertussis) 的免疫 (Immunity to Bordetella Pertussis). Microbes Infect 3 :655-677.

[0181] 9. Lewis DB, Larsen A, Wilson CB(1986) 人新生儿中降低的干扰素 - $\gamma$  水平 (Reduced interferon- $\gamma$  mRNA levels in human neonates). J Exp Med 163 :1018-1023.

[0182] 10. Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Cassone A(1997) 使用全细胞或无细胞百日咳疫苗进行初次接种疫苗之后疫苗和抗原依赖性 I 型和 II 型细胞因子诱导 (Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination in infants with whole-cell or acellular Pertussis vaccines). Infect Immun 65 :2168-2174.

[0183] 11. Wirsing von **König** CH, Postels-Multani S, Bock HL, Schmitt HJ(1995) 成人中的百日咳 : 家庭暴露后的传播频率 (Pertussis in adults : frequency of transmission after household exposure). Lancet 346 :1326-1329.

[0184] 12. Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, 等人 (2003) 2 月大婴儿中包特氏百日咳杆菌 (B. Pertussis) 感染促进 I 型 T 细胞应答 (Bordetella Pertussis infection in 2-months-old infants promotes Type 1 T cell responses). J Immunol 170 :1504-1509.

[0185] 13. Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, 等人 (1994) 包特氏百日咳杆菌 (B. Pertussis) 丝状红血球凝集素黏附素的可以肝素抑制的植物凝集素活性 (Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of Bordetella Pertussis). Infect Immun 62 :769-778.

[0186] 14. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y(1983) 七-(2,6-O-二甲基)- $\beta$  环糊精对包特氏百日咳杆菌 (B. Pertussis) 产生百日咳毒素的影响 (Effect of heptakis(2,6-O-dimethyl)- $\beta$ -cyclodextrin on the production of Pertussis toxin by Bordetella Pertussis). Infect Immun 41 :1138-1143.

- [0187] 15. Cookson BT, Cho H-L, Herwaldt LA, Goldman WE (1989) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 纯化的气管细胞毒素的生物学活性和化学组成 (Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella Pertussis*). *Infect Immun* 57 :2223-2229.
- [0188] 16. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Locht C (2001) 百日咳毒素的 ADP-核糖基转移酶在包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 感染过程中与丝状红血球凝集素黏附素结合中的作用 (Role of ADP-ribosyltransferase activity of *Pertussis* toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella Pertussis* infection). *Infect Immun* 69 :6038-6043.
- [0189] 17. Collyn F, Lety MA, Nair S, Escuyer V, Ben Younes A, 等人 (2002) 耶尔森氏菌假结核病具有 IV 型纤毛基因, 其促进致病性 (*Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity). *Infect Immun* 70 : 619-620
- [0190] 18. Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, Pierce RJ, Locht C, 等人 (1997) 使用重组包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 进行鼻腔致敏用于降低针对异源抗原的系统性免疫 (Intranasal priming with recombinant *Bordetella Pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen). *Infect Immun* 65 : 544-550.
- [0191] 19. Locht C, Geoffroy MC, Renauld G (1992) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 丝状红血球凝集素和穗缘的共同辅助基因与 papC 和 papD 基因家族具有序列相似性 (Common accessory genes for the *Bordetella Pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families). *EMBO J* 11 :3175-3183.
- [0192] 20. Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B, Zhang YL (1983) 新型 ADP-核糖基转移酶的亲和纯化 (*Pertussis* toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase). *J Biol Chem* 258 :14647-14651.
- [0193] 21. Antoine R, Locht C (1990) S1 亚基的二硫键和羧基末端在组装和生物合成百日咳毒素中的作用 (Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of *Pertussis* toxin). *Infect Immun* 58 :1518-1526.
- [0194] 22. Menozzi FD, Gantiez C, Locht C (1991) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 丝状红血球凝集素与肝素的相互作用 (Interaction of the *Bordetella Pertussis* filamentous haemagglutinin with heparin). *FEMS Microbiol Lett* 62 :59-64.
- [0195] 23. Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F (2001) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*), 多方面的分子致病性 (*Bordetella Pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects). *Curr Opin Microbiol* 4 :82-89.
- [0196] 24. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, McDaniel ML, Goldman WE (1993) 一氧化氮介导包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 对呼吸上皮的气管细胞毒性损伤 (Nitric oxide mediates *Bordetella Pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory



epithelium). *Infect Agents Dis* 2 :173-177.

[0197] 25. Goldman WE, Cookson BT (1988) 包特氏菌气管细胞毒素的结构和功能 (Structure and functions of the *Bordetella tracheal cytotoxin*). *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl :187-191.

[0198] 26. Loch C, Antoine R (1999) *Bordetella Pertussis* protein toxins. In: Alouf JE, Freer JH, editors. 细菌蛋白毒素的综合原始资料 (Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins). Academic Press, pp. 130-146.

[0199] 27. Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P (1999) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 感染的鼻腔小鼠模型. 预测通过无细胞疫苗在人类婴儿中的保护 (Intranasal murine model of *Bordetella Pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines). *Vaccine* 17 :2366-2376.

[0200] 28. Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP (1998) 一种小鼠模型, 其中使用百日咳疫苗在儿童中的效率进行的校正显示激素和细胞介导的免疫在保护抵抗包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 中的补充作用 (A murine model in which protection correlates with *Pertussis* vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella Pertussis*). *Infect Immun* 66 :594-602.

[0201] 29. Roduit C, Bozzotti P, Mielcarek N, Lambef PH, Del Giudice G, 等人 (2002) 在小鼠模型中新生儿免疫对包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 的免疫和保护效力: 早期控制百日咳的证据 (Immunogenicity and protective efficacy of neonatal immunization against *Bordetella Pertussis* in a murine model: Evidence for early control of *Pertussis*). *Infect Immun* 70 :3521-3528.

[0202] 30. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J (1998) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 和副百日咳包特氏菌 (*Bordetella parapertussi*) 在免疫人群中所造成的百日咳 (Whooping cough caused by *Bordetella Pertussis* and *Bordetella paraPertussis* in an immunized population). *JAMA* 280 :635-637.

[0203] 31. Watanabe M, Nagai M (2004) 副百日咳包特氏菌 (*Bordetella parapertussi*) 引起的百日咳: 未解决的问题 (Whooping cough due to *Bordetella paraPertussis*: an unresolved problem). *Expert Rev Anti Infect Ther* 2 :447-454.

[0204] 32. Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, 等人 (1998) 儿童中副百日咳包特氏菌 (*Bordetella parapertussi*) 的感染: 分离物的流行病学、临床症状和分子特征 (*Bordetella paraPertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates). *J Clin Microbiol* 36 :999-1002.

[0205] 33. Liese JG, Renner C, Stojanov S, Belohradsky BH, Munich Vaccine Study Group. (2003) 在引入非细胞疫苗后, 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 和副百日咳包特氏菌 (*Bordetella parapertussi*) 感染的临床和流行病学特征 (Clinical and epidemiological picture of *B. Pertussis* and *B. paraPertussis* infections after introduction of acellular *Pertussis* vaccines). *Arch Dis Child* 88 :684-687.

- [0206] 34. Watanabe M, Nagai M(2001) 在呼吸感染的鼠模型中包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 和副百日咳包特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 的相互保护性免疫 (Reciprocal protective immunity against *Bordetella Pertussis* and *Bordetella para Pertussis* in a murine model of respiratory infection). *Infect Immun* 69 : 6981-6986.
- [0207] 35. Loch C, Bertin P, Menozzi FD, Renauld G(1993) 毒性包特氏菌所产生的丝状血细胞凝集素, 多方面的黏附素 (The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp). *Mol Microbiol* 9 :653-660.
- [0208] 36. Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chui WH, Lin ST, 等人 (1962) 实验百日咳 (Experimental whooping cough). *N Engl J Med* 266 :105-111.
- [0209] 37. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, Johnson RC(1981) 使用无毒支气管败血性包特氏菌进行狗的鼻腔疫苗接种 (Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica*: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis). *Am J Vet Res* 42 :1130-1132.
- [0210] 38. De Jong MF(1987) 通过鼻腔给药活的非 AR- 致病性支气管败血性包特氏菌疫苗防止小猪的萎缩性鼻炎 (Prevention of atrophic rhinitis in piglets by means of intranasal administration of a live non-AR-pathogenic *Bordetella bronchiseptica* vaccine). *Vet Q* 9 :123-133.
- [0211] 39. Hoiseh SK, Stocker BAD(1981) 依赖芳香化合物的 *Salmonella typhimurium* 作为活疫苗是无毒的 (Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines). *Nature* 291 :238-239.
- [0212] 40. Roberts M, Maskell D, Novotny P, Dougan G(1990) 体内构建和鉴定包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) *aroA* 突变体 (Construction and characterization *in vivo* of *Bordetella Pertussis aroA* mutants). *Infect Immun* 58 :732-739.
- [0213] 41. Rennels MB(2003) 在增强剂量白喉 - 破伤风 - 非细胞百日咳疫苗后扩大的肿胀反应 (Extensive swelling reactions occurring after booster doses of diphtheria-tetanus-acellular *Pertussis* vaccines). *Semin Pediatr Infect Dis* 14 : 196-198.
- [0214] 42. Robbins JB, Schneerson R, Trollfors B, Sato H, Sato Y, 等人 (2005) 白喉 - 破伤风类毒素 - 百日咳疫苗的白喉和百日咳组分需要是遗传灭活的突变毒素 (The diphtheria and *Pertussis* components of diphtheria-tetanus toxoids-*Pertussis* vaccine should be genetically inactivated mutant toxins). *J Infect Dis* 191 :81-88.
- [0215] 43. Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJU, Rose AH, 等人 (1992) 遗传性过敏症的遗传“风险”与出生后 T 细胞能力成熟化的延迟有关 (Genetic “risk” for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence). *Clin Exp Allergy* 22 :1093-1099.
- [0216] 44. Favre D, Viret JF(2006) 在欧洲法规的条件下, 口服重组活细菌疫苗的生物

安全性评估 (Biosafety evaluation of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of European regulation). *Vaccine*. May1 ;24(18) :3856-64.

[0217] 45. Cohn SE, Knorr KL, Gilligan PH, Smiley ML, Weber DJ(1993) 在人类免疫缺陷性病毒疾病中百日咳罕见 (Pertussis is rare in human immunodeficiencyvirus disease). *Am Rev Respir Dis*147 :411-413.

[0218] 46. Porter JF, Wardlaw AC(1993) 在湖水和缓冲盐水中不加入营养物, 支气管败血性包特氏菌的长期存活 (Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients). *FEMS Microbiol Lett*110 :33-36.

[0219] 47. Linnemann CCJr, Bass JW, Smith MHD(1968) 百日咳的载体状态 (The carrier state in Pertussis). *Am J Epidemiol*88 :422-427.

[0220] 48. Parton R, Hall E, Wardlaw AC(1994) 对包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 突变菌株的应答以及对百日咳咳嗽大鼠模型中接种疫苗的应答 (Responses to *Bordetella Pertussis* mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of Pertussis). *J Med Microbiol*40 :307-312.

[0221] 49. Mielcarek N, Alonso S, Locht C(2001) 使用活细菌载体的经鼻接种疫苗 (Nasal vaccination using live bacterial vectors). *Adv Drug Del Rev*51 :55-69.

[0222] 50. Lyon RS, Engle JT, Goldman WE. 手稿, 准备中 (Manuscript in preparation)

[0223] 51. Simon R, Priefer U, Pühler A(1983) 用于体内遗传工程的宽记住范围动员 : 革兰氏阴性细菌中的转位子突变 (A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria). *Bio/Technology*1 :784-791.

[0224] 52. Stibitz S(1994) 使用传统的相互选择的自杀载体用于等位基因交换 (Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange.) *Methods Enzymol* 235 :458-465.

[0225] 53. Antoine R, Huvent I, Chemlal K, Deray I, Raze D, 等人 (2005) TTT 的外周结合区参与信号传导 (The periplasmic binding protein of tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction). *J Mol Biol*351 :799-809.

[0226] 54. Sato H, Ito A, Chiba J, Sato Y(1984) 针对百日咳毒素的单克隆抗体 : 对毒素活性和百日咳感染的影响 (Monoclonal antibodies against Pertussis toxin : effect on toxin activity and Pertussis infections). *Infect Immun*46 :422-428.

[0227] 55. Sato H, Sato Y, Ito A, Ohishi I(1987) 单克隆抗体对百日咳毒素活性的影响 (Effect of monoclonal antibody to Pertussis toxin on toxin activity). *Infect Immun*55 :909-915.

[0228] 56. Tuomanen, E. 和 Weiss A. (1985) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 与人类纤毛呼吸道上皮细胞的两种黏附的鉴定 (Characterization of two adhesions of *Bordetella Pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells). *J. Infect. Dis.* 152 : 118-125.

[0229] 57. Locht, C., Antoine, R., Veithen A. 和 Raze D. 2000. 百日咳毒素 : 结构 - 功

能关系 (Pertussis Toxin :Structure-Function-Relationship). In Aktories K. Just I editors. Handbook of Experimental Pharmacology, Bacterial Protein Toxins, Springer, vol145, pp. 167-185.

[0230] 58. Horiguchi Y, Matsuda, H, Koyama H, Nakai T 和 Kume K. (1992) 支气管败血性包特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 皮肤坏死因子体内抑制小鼠的抗体应答 (*Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin suppresses in vivo antibody responses in mice). FEMS Microbiol. Lett. 69 :229-234.

[0231] 59. Bordet et Genysa (1909) L' endotoxine coquelucheuse ;Ann. Inst. Pasteur 23 :415-419.

[0232] 60. Iida & Okonogi (1971) 小鼠中包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 中的 Lieno 毒性 (Lieno toxicity of *Bordetella Pertussis* in mice) ;J. Med. Microbiol. 4 :51-61.

[0233] 61. R. Parton (1985) 小鼠中强的松对包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 毒性的影响 (Effect of prednisone on the toxicity of *B ordetela Pertussis* in mice), J. Med. Microbiol. 19 :391-400.

[0234] 62. Magyar 等人 (1988) 支气管败血性包特氏菌所造成的猪鼻甲萎缩症致病 (The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*), Vet. Microbiol. 3 :1719-1728.

[0235] 63. Roop 等人 (1987) 支气管败血性包特氏菌的毒性因子与传染性鼻咽的产生和实验中感染的新生小猪的肺炎有关 (Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atropic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine), Infect. Immun. 55 :217-222.

[0236] 64. Weiss & Goodman (1989) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 在幼鼠模型中的致命感染 (Lethal infection by *Bordetella Pertussis* mutants in the infant mouse model), Infect. Immun. 57 :3757-3764.

[0237] 65. Allan & Maskell (1996) 在包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 中生物合成脂多糖所需的遗传基因座的鉴定、克隆和突变 (The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella Pertussis*), Mol. Microbiol. 19 :37-52.

[0238] 66. Alonso 等人 (2002) 包特氏百日咳杆菌 (*B. Pertussis*) 丝状红血球凝聚素的 80KdN 末端部分 :黏附、免疫原性和保护作用 (Eighty kilodalton N-terminal moiety of *Bordetella Pertussis* filamentous hemagglutinin :adherence, immunogenicity, and protective role), Infection & Immunity, 70, 4142-4147.

[0239] 67. Cummings, C. A., Bootsma, H. J., Relman D. A. 和 Miller J. F. (2006) 复杂柔性调节子的包特氏菌种和株特异性控制 Species- and Strain-specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella BvgAS*. J. Bacteriol. 188 :1775-1785.

[0240] 68. Kashimoto T., Katahira J, Comejo WR, Masuda M, Fukuoh A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) 鉴定包特氏菌皮肤坏死毒素的功能区 (Identification of functional domains of *Bordetella dermonecrotizing toxin*). Infect. Immun. 67 (8) 3727-32.

## 序列表

<110> 巴斯德研究院里尔分院  
法国国家健康与医学研究院

<120> 包特氏菌减毒活菌株作为百日咳的单剂量疫苗

<130>B6728AA-JAZ/LV/KN

<140> 新 PCT 专利申请

<141>2007-03-06

<150>US 60/780, 827

<151>2006-03-10

<150>US 60/817, 430

<151>2006-06-30

<160>13

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>269

<212>PRT

<213> 包特氏百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)

<400>1

```

Met Arg Cys Thr Arg Ala Ile Arg Gln Thr Ala Arg Thr Gly Trp Leu
1           5           10           15
Thr Trp Leu Ala Ile Leu Ala Val Thr Ala Pro Val Thr Ser Pro Ala
           20           25           30
Trp Ala Asp Asp Pro Pro Ala Thr Val Tyr Arg Tyr Asp Ser Arg Pro
           35           40           45
Pro Glu Asp Val Phe Gln Asn Gly Phe Thr Ala Trp Gly Asn Asn Asp
           50           55           60
Asn Val Leu Asp His Leu Thr Gly Arg Ser Cys Gln Val Gly Ser Ser
65           70           75           80

```

Asn Ser Ala Phe Val Ser Thr Ser Ser Ser Arg Arg Tyr Thr Glu Val  
                   85                  90                  95  
 Tyr Leu Glu His Arg Met Gln Glu Ala Val Glu Ala Glu Arg Ala Gly  
                   100                  105                  110  
 Arg Gly Thr Gly His Phe Ile Gly Tyr Ile Tyr Glu Val Arg Ala Asp  
                   115                  120                  125  
 Asn Asn Phe Tyr Gly Ala Ala Ser Ser Tyr Phe Glu Tyr Val Asp Thr  
                   130                  135                  140  
 Tyr Gly Asp Asn Ala Gly Arg Ile Leu Ala Gly Ala Leu Ala Thr Tyr  
                   145                  150                  155                  160  
 Gln Ser Glu Tyr Leu Ala His Arg Arg Ile Pro Pro Glu Asn Ile Arg  
                   165                  170                  175  
 Arg Val Thr Arg Val Tyr His Asn Gly Ile Thr Gly Glu Thr Thr Thr  
                   180                  185                  190  
 Thr Glu Tyr Ser Asn Ala Arg Tyr Val Ser Gln Gln Thr Arg Ala Asn  
                   195                  200                  205  
 Pro Asn Pro Tyr Thr Ser Arg Arg Ser Val Ala Ser Ile Val Gly Thr  
                   210                  215                  220  
 Leu Val Arg Met Ala Pro Val Ile Gly Ala Cys Met Ala Arg Gln Ala  
                   225                  230                  235                  240  
 Glu Ser Ser Glu Ala Met Ala Ala Trp Ser Glu Arg Ala Gly Glu Ala  
                   245                  250                  255  
 Met Val Leu Val Tyr Tyr Glu Ser Ile Ala Tyr Ser Phe  
                   260                  265

<210>2

<211>1464

<212>PRT

<213> 包特氏百日咳杆菌 (Bordetella pertussis)

<400>2

Met Asp Lys Asp Glu Ser Ala Leu Arg Gln Leu Val Asp Met Ala Leu  
 1                  5                  10                  15  
 Val Gly Tyr Asp Gly Val Val Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Ser Glu  
                   20                  25                  30  
 Glu Ser Gly Asp Leu Ala Gly Gly Arg Ala Lys Arg Glu Lys Ala Glu  
                   35                  40                  45  
 Phe Ala Leu Phe Ser Glu Ala Pro Asn Gly Asp Glu Pro Ile Gly Gln  
                   50                  55                  60

Asp	Ala	Arg	Thr	Trp	Phe	Tyr	Phe	Pro	Lys	Tyr	Arg	Pro	Val	Ala	Val
65					70					75					80
Ser	Asn	Leu	Lys	Lys	Met	Gln	Val	Ala	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Glu	Pro
			85						90					95	
Glu	Ser	Leu	Ile	Leu	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Leu	Asp	Val	Tyr	Leu	Gly
			100					105					110		
Val	Leu	Ile	Ala	Ala	Leu	Ser	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Val	Phe
			115				120					125			
Glu	Tyr	Val	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Asn	Arg	Val
			130				135					140			
Pro	His	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Pro
145					150					155					160
Val	Asp	Arg	Ser	Gly	Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Phe	Glu	His	Pro	Leu	Trp
				165					170					175	
Phe	Ala	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ala	Gly	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile
			180					185					190		
Tyr	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Arg	Met	Asp	Gly	Glu
			195				200					205			
Pro	Asp	Asp	Gly	Ser	Leu	Asp	Thr	Ala	Glu	His	Asp	Val	Trp	Arg	Leu
			210				215				220				
Cys	Arg	Asp	Gly	Ile	Asn	Arg	Gly	Glu	Gln	Ala	Ile	Phe	Gln	Ala	Ser
225					230					235					240
Gly	Pro	Tyr	Gly	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Gly	Tyr	Met	Arg	Thr	Val	Ala
				245					250					255	
Asp	Leu	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Leu
			260					265					270		
Arg	Ile	Arg	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Asp	Ser	Pro	Gly	Asp	Glu	Met	Pro
			275				280					285			
Arg	Lys	Leu	Asp	Ala	Trp	Glu	Ile	Ala	Lys	Phe	His	Leu	Ala	Ala	Thr
			290				295				300				
Gln	Gln	Ala	Arg	Val	Asp	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Phe	Ala	Leu	Asp	Tyr
305					310					315					320
Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Arg	Asn	Ala	Leu
				325					330				335		
Ala	Leu	Arg	Phe	Ile	Lys	Arg	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Arg
			340					345					350		
Arg	Gly	Asn	Ala	Ser	Thr	Met	Pro	Ala	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Tyr	Asp
			355				360					365			
Glu	Ile	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Asn	Asp	Ala	Ala	Tyr	Val	Ser	Met

370	375	380
Ala Ala Ala Leu Ile Ala Gly Val Leu Cys Asp Leu Glu Ser Ala Gln		
385	390	395
Arg Thr Leu Pro Val Val Leu Ala Arg Phe Arg Pro Leu Gly Val Leu		
	405	410
Ala Arg Phe Arg Arg Leu Glu Gln Glu Thr Ala Gly Met Leu Leu Gly		
	420	425
Asp Gln Glu Pro Glu Pro Arg Gly Phe Ile Ser Phe Thr Asp Phe Arg		
	435	440
Asp Ser Asp Ala Phe Ala Ser Tyr Ala Glu Tyr Ala Ala Gln Phe Asn		
	450	455
Asp Tyr Ile Asp Gln Tyr Ser Ile Leu Glu Ala Gln Arg Leu Ala Arg		
465	470	475
Ile Leu Ala Leu Gly Ser Arg Met Thr Val Asp Gln Trp Cys Leu Pro		
	485	490
Leu Gln Lys Val Arg His Tyr Lys Val Leu Thr Ser Gln Pro Gly Leu		
	500	505
Ile Ala Arg Gly Ile Glu Asn His Asn Arg Gly Ile Glu Tyr Cys Leu		
	515	520
Gly Arg Pro Pro Leu Thr Asp Leu Pro Gly Leu Phe Thr Met Phe Gln		
	530	535
Leu His Asp Ser Ser Trp Leu Leu Val Ser Asn Ile Asn Gly Glu Leu		
545	550	555
Trp Ser Asp Val Leu Ala Asn Ala Glu Val Met Gln Asn Pro Thr Leu		
	565	570
Ala Ala Leu Ala Glu Pro Gln Gly Arg Phe Arg Thr Gly Arg Arg Thr		
	580	585
Gly Gly Trp Phe Leu Gly Gly Pro Ala Thr Glu Gly Pro Ser Leu Arg		
	595	600
Asp Asn Tyr Leu Leu Lys Leu Arg Gln Ser Asn Pro Gly Leu Asp Val		
	610	615
Lys Lys Cys Trp Tyr Phe Gly Tyr Arg Gln Glu Tyr Arg Leu Pro Ala		
625	630	635
Gly Ala Leu Gly Val Pro Leu Phe Ala Val Ser Val Ala Leu Arg His		
	645	650
Ser Leu Asp Asp Leu Ala Ala His Ala Lys Ser Ala Leu Tyr Lys Pro		
	660	665
Ser Glu Trp Gln Lys Phe Ala Phe Trp Ile Val Pro Phe Tyr Arg Glu		
	675	680
		685



Ile Phe Phe Ser Thr Gln Asp Arg Ser Tyr Arg Val Asp Val Gly Ser  
 690 695 700  
 Ile Val Phe Asp Ser Ile Ser Leu Leu Ala Ser Val Phe Ser Ile Gly  
 705 710 715 720  
 Gly Lys Leu Gly Ser Phe Thr Arg Thr Gln Tyr Gly Asn Leu Arg Asn  
 725 730 735  
 Phe Val Val Arg Gln Arg Ile Ala Gly Leu Ser Gly Gln Arg Leu Trp  
 740 745 750  
 Arg Ser Val Leu Lys Glu Leu Pro Ala Leu Ile Gly Ala Ser Gly Leu  
 755 760 765  
 Arg Leu Ser Arg Ser Leu Leu Val Asp Leu Tyr Glu Ile Phe Glu Pro  
 770 775 780  
 Val Pro Ile Arg Arg Leu Val Ala Gly Phe Val Ser Ala Thr Thr Val  
 785 790 795 800  
 Gly Gly Arg Asn Gln Ala Phe Leu Arg Gln Ala Phe Ser Ala Ala Ser  
 805 810 815  
 Ser Ser Ala Gly Arg Thr Gly Gly Gln Leu Ala Ser Glu Trp Arg Met  
 820 825 830  
 Ala Gly Val Asp Ala Thr Gly Leu Val Glu Ser Thr Ser Gly Gly Arg  
 835 840 845  
 Phe Glu Gly Ile Tyr Thr Arg Gly Leu Gly Pro Leu Ser Glu Cys Thr  
 850 855 860  
 Glu His Phe Ile Val Glu Ser Gly Asn Ala Tyr Arg Val Ile Trp Asp  
 865 870 875 880  
 Ala Tyr Thr His Gly Trp Arg Val Val Asn Gly Arg Leu Pro Pro Arg  
 885 890 895  
 Leu Thr Tyr Thr Val Pro Val Arg Leu Asn Gly Gln Gly His Trp Glu  
 900 905 910  
 Thr His Leu Asp Val Pro Gly Arg Gly Gly Ala Pro Glu Ile Phe Gly  
 915 920 925  
 Arg Ile Arg Thr Arg Asn Leu Val Ala Leu Ala Ala Glu Gln Ala Ala  
 930 935 940  
 Pro Met Arg Arg Leu Leu Asn Gln Ala Arg Arg Val Ala Leu Arg His  
 945 950 955 960  
 Ile Asp Thr Cys Arg Ser Arg Leu Ala Leu Pro Arg Ala Glu Ser Asp  
 965 970 975  
 Met Asp Ala Ala Ile Arg Ile Phe Phe Gly Glu Pro Asp Ala Gly Leu  
 980 985 990  
 Arg Gln Arg Ile Gly Arg Arg Leu Gln Glu Val Arg Ala Tyr Ile Gly

995	1000	1005
Asp Leu Ser Pro Val Asn	Asp Val Leu Tyr Arg	Ala Gly Tyr Asp
1010	1015	1020
Leu Asp Asp Val Ala Thr	Leu Phe Asn Ala Val	Asp Arg Asn Thr
1025	1030	1035
Ser Leu Gly Arg Gln Ala	Arg Met Glu Leu Tyr	Leu Asp Ala Ile
1040	1045	1050
Val Asp Leu His Ala Arg	Leu Gly Tyr Glu Asn	Ala Arg Phe Val
1055	1060	1065
Asp Leu Met Ala Phe His	Leu Leu Ser Leu Gly	His Ala Ala Thr
1070	1075	1080
Ala Ser Glu Val Val Glu	Ala Val Ser Pro Arg	Leu Leu Gly Asn
1085	1090	1095
Val Phe Asp Ile Ser Asn	Val Ala Gln Leu Glu	Arg Gly Ile Gly
1100	1105	1110
Asn Pro Ala Ser Thr Gly	Leu Phe Val Met Leu	Gly Ala Tyr Ser
1115	1120	1125
Glu Ser Ser Pro Ala Ile	Phe Gln Ser Phe Val	Asn Asp Ile Phe
1130	1135	1140
Pro Ala Trp Arg Gln Ala	Ser Gly Gly Gly Pro	Leu Val Trp Asn
1145	1150	1155
Phe Gly Pro Ala Ala Ile	Ser Pro Thr Arg Leu	Asp Tyr Ala Asn
1160	1165	1170
Thr Asp Ile Gly Leu Leu	Asn His Gly Asp Ile	Ser Pro Leu Arg
1175	1180	1185
Ala Arg Pro Pro Leu Gly	Gly Arg Arg Asp Ile	Asp Leu Pro Pro
1190	1195	1200
Gly Leu Asp Ile Ser Phe	Val Arg Tyr Asp Arg	Pro Val Arg Met
1205	1210	1215
Ser Ala Pro Arg Ala Leu	Asp Ala Ser Val Phe	Arg Pro Val Asp
1220	1225	1230
Gly Pro Val His Gly Tyr	Ile Gln Ser Trp Thr	Gly Ala Glu Ile
1235	1240	1245
Glu Tyr Ala Tyr Gly Ala	Pro Ala Ala Ala Arg	Glu Val Met Leu
1250	1255	1260
Thr Asp Asn Val Arg Ile	Ile Ser Ile Glu Asn	Gly Asp Glu Gly
1265	1270	1275
Ala Ile Gly Val Arg Val	Arg Leu Asp Thr Val	Pro Val Ala Thr
1280	1285	1290

Pro Leu Ile Leu Thr Gly Gly Ser Leu Ser Gly Cys Thr Thr Met  
 1295 1300 1305  
 Val Gly Val Lys Glu Gly Tyr Leu Ala Phe Tyr His Thr Gly Lys  
 1310 1315 1320  
 Ser Thr Glu Leu Gly Asp Trp Ala Thr Ala Arg Glu Gly Val Gln  
 1325 1330 1335  
 Ala Leu Tyr Gln Ala His Leu Ala Met Gly Tyr Ala Pro Ile Ser  
 1340 1345 1350  
 Ile Pro Ala Pro Met Arg Asn Asp Asp Leu Val Ser Ile Ala Ala  
 1355 1360 1365  
 Thr Tyr Asp Arg Ala Val Ile Ala Tyr Leu Gly Lys Asp Val Pro  
 1370 1375 1380  
 Gly Gly Gly Ser Thr Arg Ile Thr Arg His Asp Glu Gly Ala Gly  
 1385 1390 1395  
 Ser Val Val Ser Phe Asp Tyr Asn Ala Ala Val Gln Ala Ser Ala  
 1400 1405 1410  
 Val Pro Arg Leu Gly Gln Val Tyr Val Leu Ile Ser Asn Asp Gly  
 1415 1420 1425  
 Gln Gly Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala Glu Asp Leu Ala Trp Ala  
 1430 1435 1440  
 Gly Ser Gly Ser Ala Leu Asp Val Leu Asn Glu Arg Leu Val Thr  
 1445 1450 1455  
 Leu Phe Pro Ala Pro Val  
 1460

<210>3

<211>403

<212>PRT

<213> 包特氏百日咳杆菌 (Bordetella pertussis)

<400>3

Met Ala Pro Leu Leu Val Leu Gly Phe Ala Ser Gly Leu Pro Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Gly Thr Leu Gln Ala Trp Ala Thr Val Glu Asn Val Ser  
 20 25 30  
 Leu Gln Ser Ile Gly Phe Leu Thr Leu Ala Gly Thr Ala Tyr Thr Leu  
 35 40 45  
 Lys Phe Leu Trp Ala Pro Leu Ile Asp Arg Tyr Val Pro Pro Phe Leu

50	55	60
Gly Arg Arg Arg Gly Trp Met Leu Leu Thr Gln Val Leu Leu Ala Ala		
65	70	75
Ala Ile Met Val Met Gly Met Leu Ser Pro Gly Ser Ala Leu Leu Pro		
	85	90
Leu Ala Leu Val Ala Val Leu Val Ala Phe Leu Ser Ala Ser Gln Asp		
	100	105
Ile Ala Phe Asp Ala Tyr Ser Thr Asp Val Leu Arg Gln Glu Glu Arg		
	115	120
Gly Ala Gly Ala Ala Met Arg Val Met Gly Tyr Arg Leu Ala Met Ile		
	130	135
Val Ser Gly Gly Leu Ala Leu Ile Val Ala Asp Arg Trp Leu Gly Trp		
145	150	155
Gly Asn Thr Tyr Val Leu Met Gly Gly Leu Met Leu Ala Cys Ala Leu		
	165	170
Gly Thr Leu Trp Ala Pro Glu Pro Glu Arg Pro Ala Asn Pro Pro Arg		
	180	185
Asp Leu Gly Ala Ala Val Val Glu Pro Phe Arg Glu Phe Phe Ser Arg		
	195	200
Arg Gly Ala Ile Asp Met Leu Leu Leu Ile Val Leu Tyr Lys Leu Gly		
	210	215
Asp Ala Phe Ala Gly Ala Leu Ser Thr Thr Phe Leu Leu Arg Gly Ala		
225	230	235
Gly Phe Ser Ala Thr Glu Val Gly Thr Val Asn Lys Val Leu Gly Leu		
	245	250
Ala Ala Thr Ile Val Gly Ala Leu Ala Gly Gly Ser Ile Met Thr Arg		
	260	265
Trp Gly Leu Tyr Arg Ser Leu Met Ala Phe Gly Leu Leu Gln Ala Val		
	275	280
Ser Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Ile Ala Val Ser Pro Lys Asn Leu Tyr		
	290	295
Leu Met Gly Leu Ala Val Gly Val Glu Asn Leu Cys Gly Gly Leu Gly		
305	310	315
Thr Ala Ser Phe Val Ala Leu Leu Met Ala Met Cys Arg Gln Gln Phe		
	325	330
Ser Ala Thr Gln Phe Ala Leu Leu Ser Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg		
	340	345
Thr Tyr Leu Ala Gly Pro Leu Thr Pro Val Leu Val Glu Trp Leu Asp		
	355	360
		365

Trp Pro Gly Phe Phe Ile Val Thr Val Leu Ile Ala Leu Pro Gly Leu  
 370 375 380  
 Trp Leu Leu Arg Leu Arg Arg Asn Val Ile Asp Glu Leu Asp Ala Gln  
 385 390 395 400  
 Thr Ala Arg

<210>4

<211>491

<212>PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>4

Met Ser Ser Gln Tyr Leu Arg Ile Phe Gln Gln Pro Arg Ser Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Ser Gly Leu Pro Leu Ala Leu Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Thr Leu Gln Ala Trp Met Thr Val Glu Asn Ile Asp Leu Lys Thr  
 35 40 45  
 Ile Gly Phe Phe Ser Leu Val Gly Gln Ala Tyr Val Phe Lys Phe Leu  
 50 55 60  
 Trp Ser Pro Leu Met Asp Arg Tyr Thr Pro Pro Phe Phe Gly Arg Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Trp Leu Leu Ala Thr Gln Ile Leu Leu Leu Val Ala Ile Ala  
 85 90 95  
 Ala Met Gly Phe Leu Glu Pro Gly Thr Gln Leu Arg Trp Met Ala Ala  
 100 105 110  
 Leu Ala Val Val Ile Ala Phe Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Val Phe  
 115 120 125  
 Asp Ala Trp Lys Thr Asp Val Leu Pro Ala Glu Glu Arg Gly Ala Gly  
 130 135 140  
 Ala Ala Ile Ser Val Leu Gly Tyr Arg Leu Gly Met Leu Val Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Ala Leu Trp Leu Ala Asp Lys Trp Leu Gly Trp Gln Gly Met  
 165 170 175  
 Tyr Trp Leu Met Ala Ala Leu Leu Ile Pro Cys Ile Ile Ala Thr Leu  
 180 185 190  
 Leu Ala Pro Glu Pro Thr Asp Thr Ile Pro Val Pro Lys Thr Leu Glu  
 195 200 205

Gln Ala Val Val Ala Pro Leu Arg Asp Phe Phe Gly Arg Asn Asn Ala  
 210 215 220  
 Trp Leu Ile Leu Leu Leu Ile Val Leu Tyr Lys Leu Gly Asp Ala Phe  
 225 230 235 240  
 Ala Met Ser Leu Thr Thr Thr Phe Leu Ile Arg Gly Val Gly Phe Asp  
 245 250 255  
 Ala Gly Glu Val Gly Val Val Asn Lys Thr Leu Gly Leu Leu Ala Thr  
 260 265 270  
 Ile Val Gly Ala Leu Tyr Gly Gly Ile Leu Met Gln Arg Leu Ser Leu  
 275 280 285  
 Phe Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gly Ile Leu Gln Gly Ala Ser Asn Ala  
 290 295 300  
 Gly Tyr Trp Leu Leu Ser Ile Thr Asp Lys His Leu Tyr Ser Met Gly  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Val Phe Phe Glu Asn Leu Cys Gly Gly Met Gly Thr Ser Ala  
 325 330 335  
 Phe Val Ala Leu Leu Met Thr Leu Cys Asn Lys Ser Phe Ser Ala Thr  
 340 345 350  
 Gln Phe Ala Leu Leu Ser Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Val Tyr Val  
 355 360 365  
 Gly Pro Val Ala Gly Trp Phe Val Glu Ala His Gly Trp Ser Thr Phe  
 370 375 380  
 Tyr Leu Phe Ser Val Ala Ala Ala Val Pro Gly Leu Ile Leu Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Val Cys Arg Gln Thr Leu Glu Tyr Thr Arg Val Asn Asp Asn Phe Ile  
 405 410 415  
 Ser Arg Thr Glu Tyr Pro Ala Gly Tyr Ala Phe Ala Met Trp Thr Leu  
 420 425 430  
 Ala Ala Gly Ile Ser Leu Leu Ala Val Trp Leu Leu Leu Leu Thr Met  
 435 440 445  
 Asp Ala Leu Asp Leu Thr His Phe Ser Phe Leu Pro Ala Leu Leu Glu  
 450 455 460  
 Val Gly Val Leu Val Ala Leu Ser Gly Val Val Leu Gly Gly Leu Leu  
 465 470 475 480  
 Asp Tyr Leu Ala Leu Arg Lys Thr His Leu Met  
 485 490

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚核苷酸 A

<400>5

tataaatcga tattcctget ggtttcgttc tc

32

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚核苷酸 B

<400>6

tatagctagc aagttgggaa acgacaccac

30

<210>7

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚核苷酸 C

<400>7

taagaagcaa aataagccag gcatt

25

<210>8

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚核苷酸 D

<400>8

---

tataccatgg cgccgctgct ggtgctgggc

30

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡聚核苷酸 E

&lt;400&gt;9

tatatctaga cgctggccgt aaccttagca

30

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡聚核苷酸 F

&lt;400&gt;10

tatagaattc gctcggttcg ctggtcaagg

30

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡聚核苷酸 G

&lt;400&gt;11

tatatctaga gcaatgccga ttcattctta

30

&lt;210&gt;12

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工序列



<220>

<223> 寡聚核苷酸 H

<400>12

tatatctaga geggcttta ttgcttttcc

30

<210>13

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚核苷酸 I

<400>13

tataaagctt ctcatgcacg ccgcttctc

30

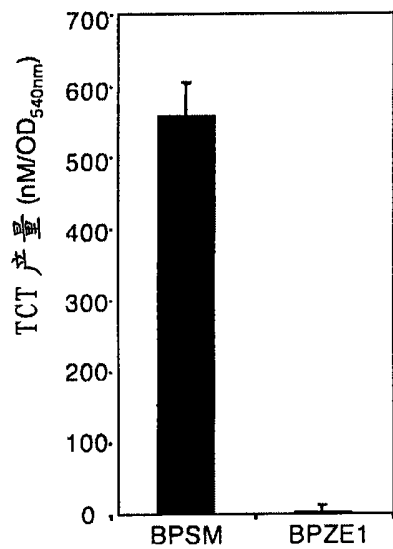


图 1

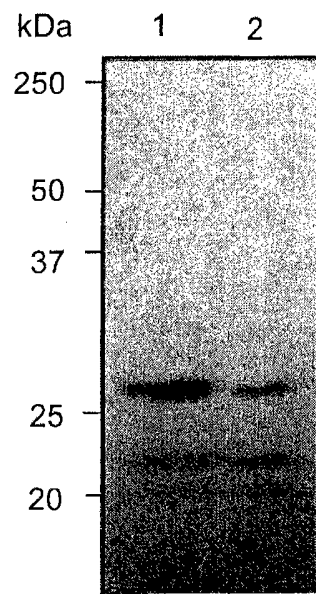


图 2

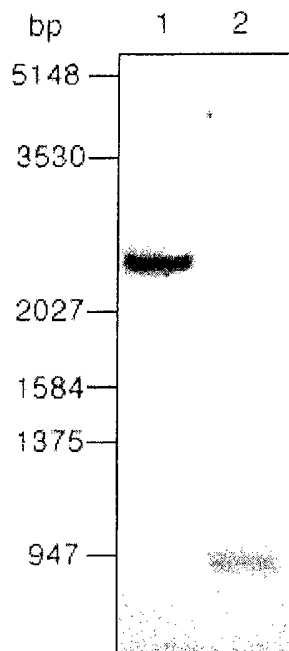


图 3

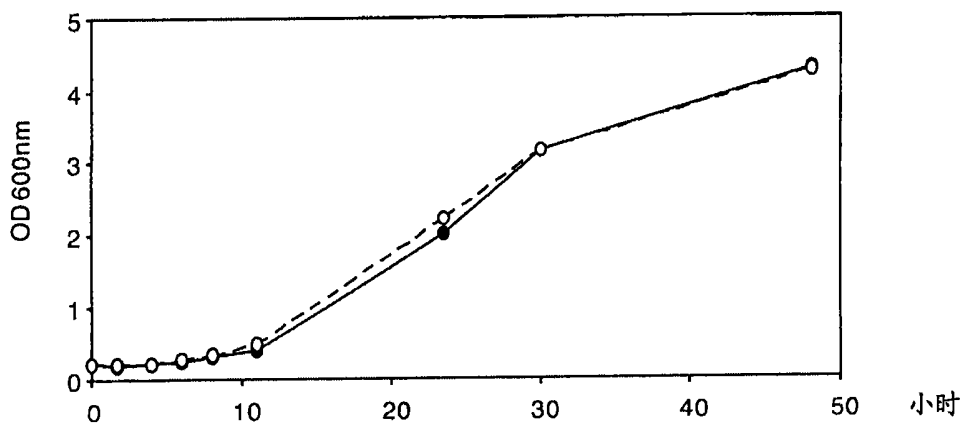


图 4

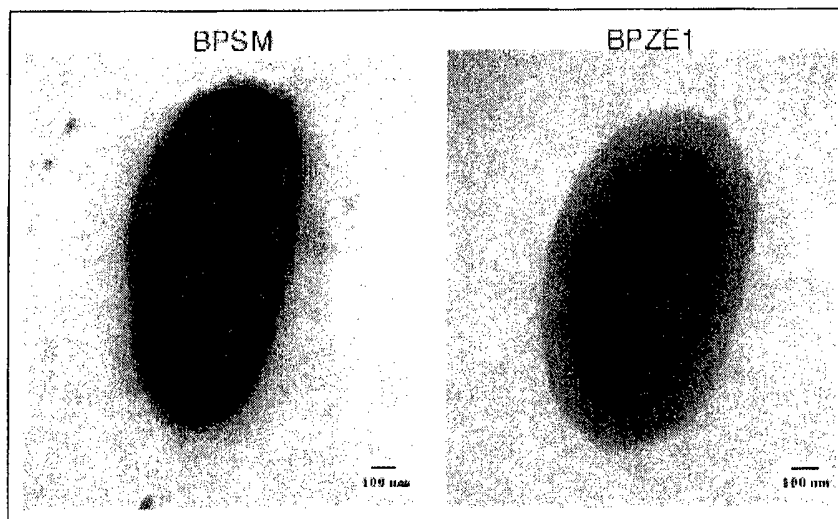


图 5

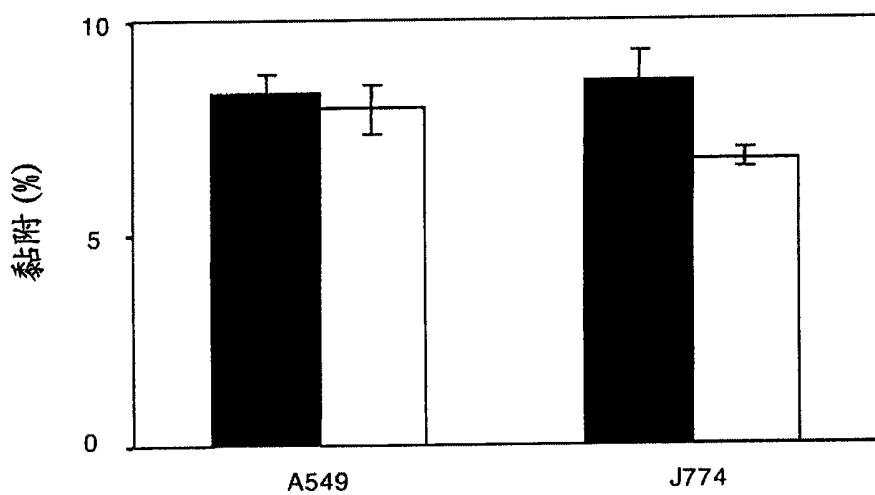


图 6

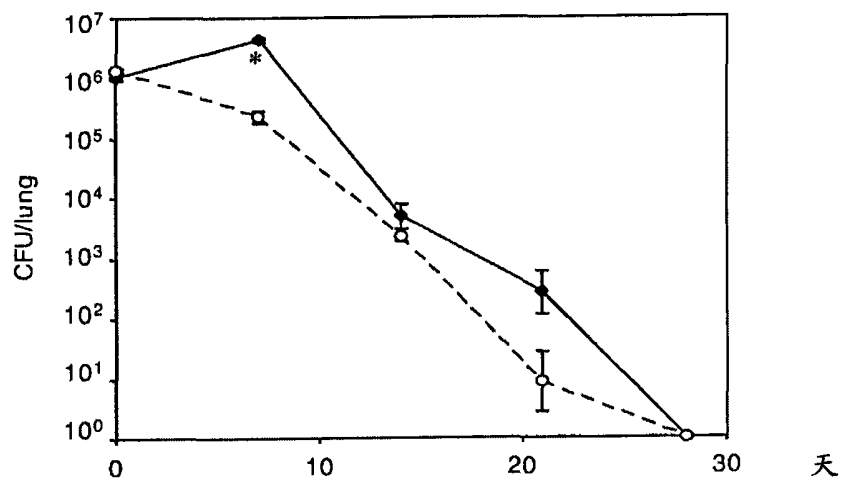


图 7

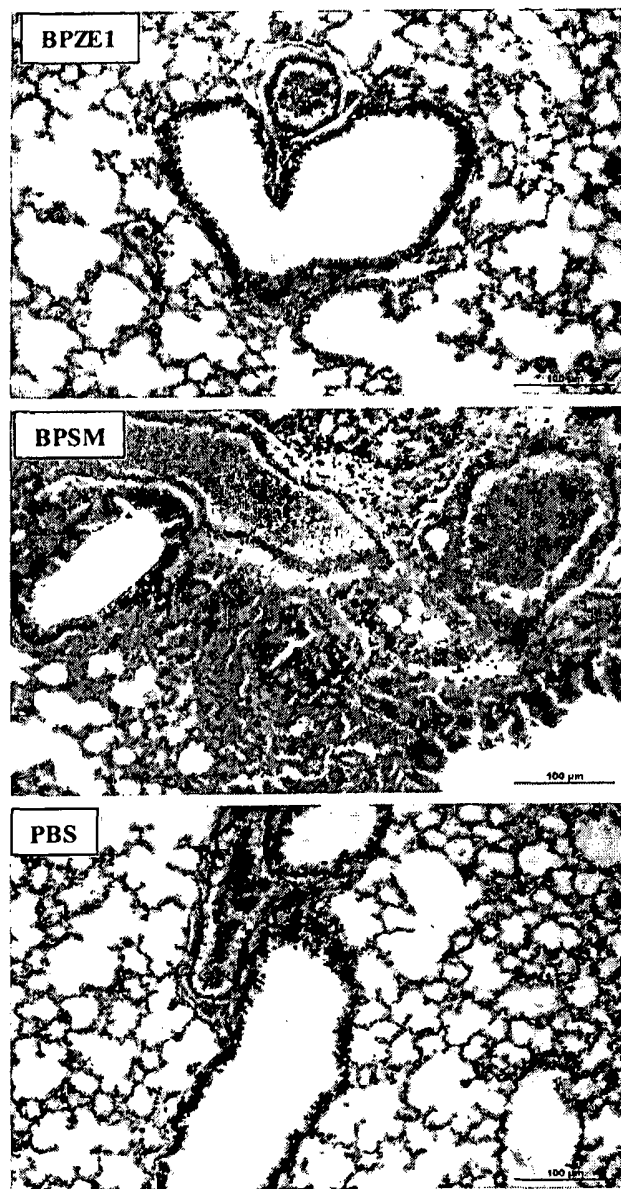


图 8

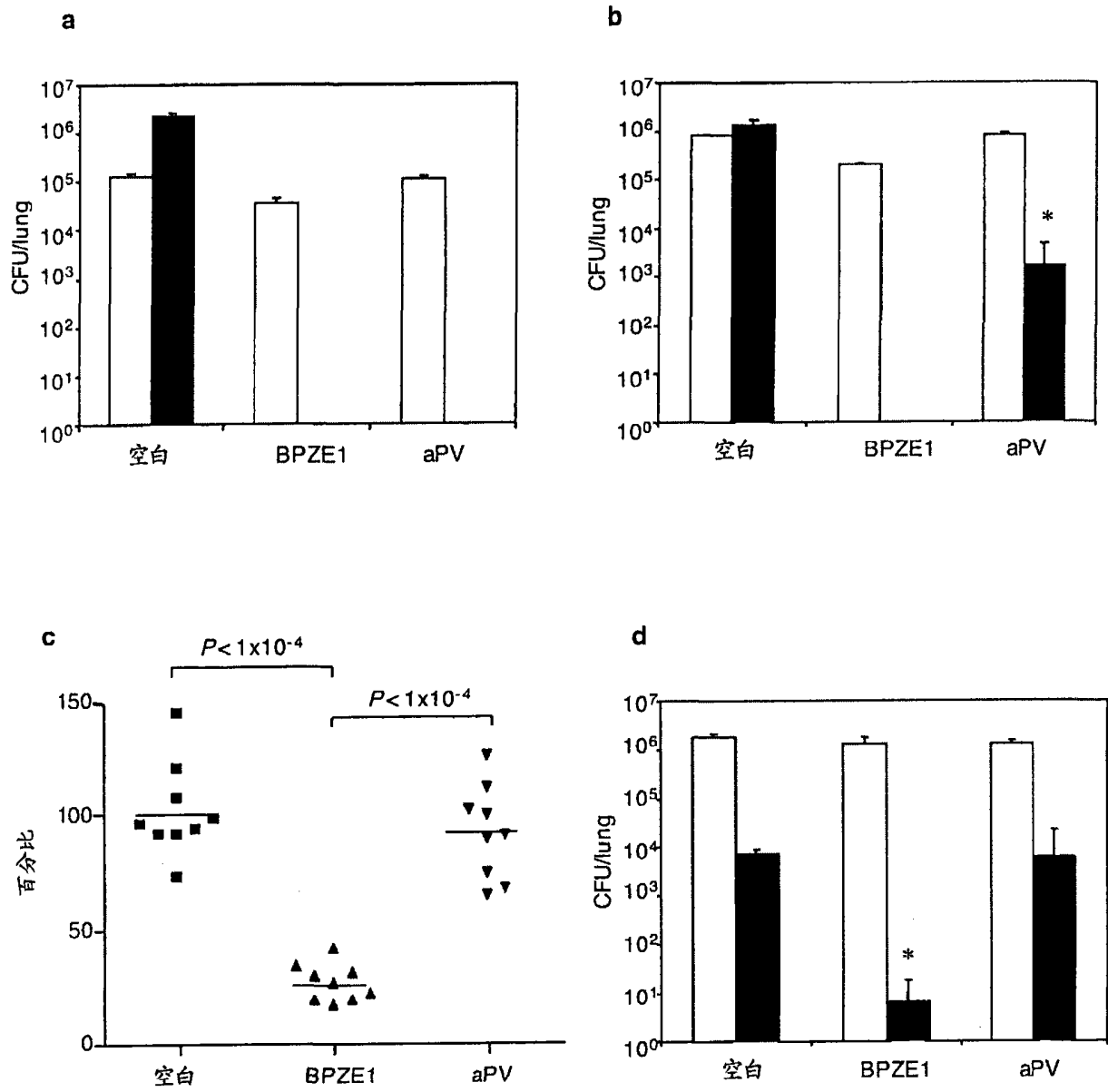


图 9

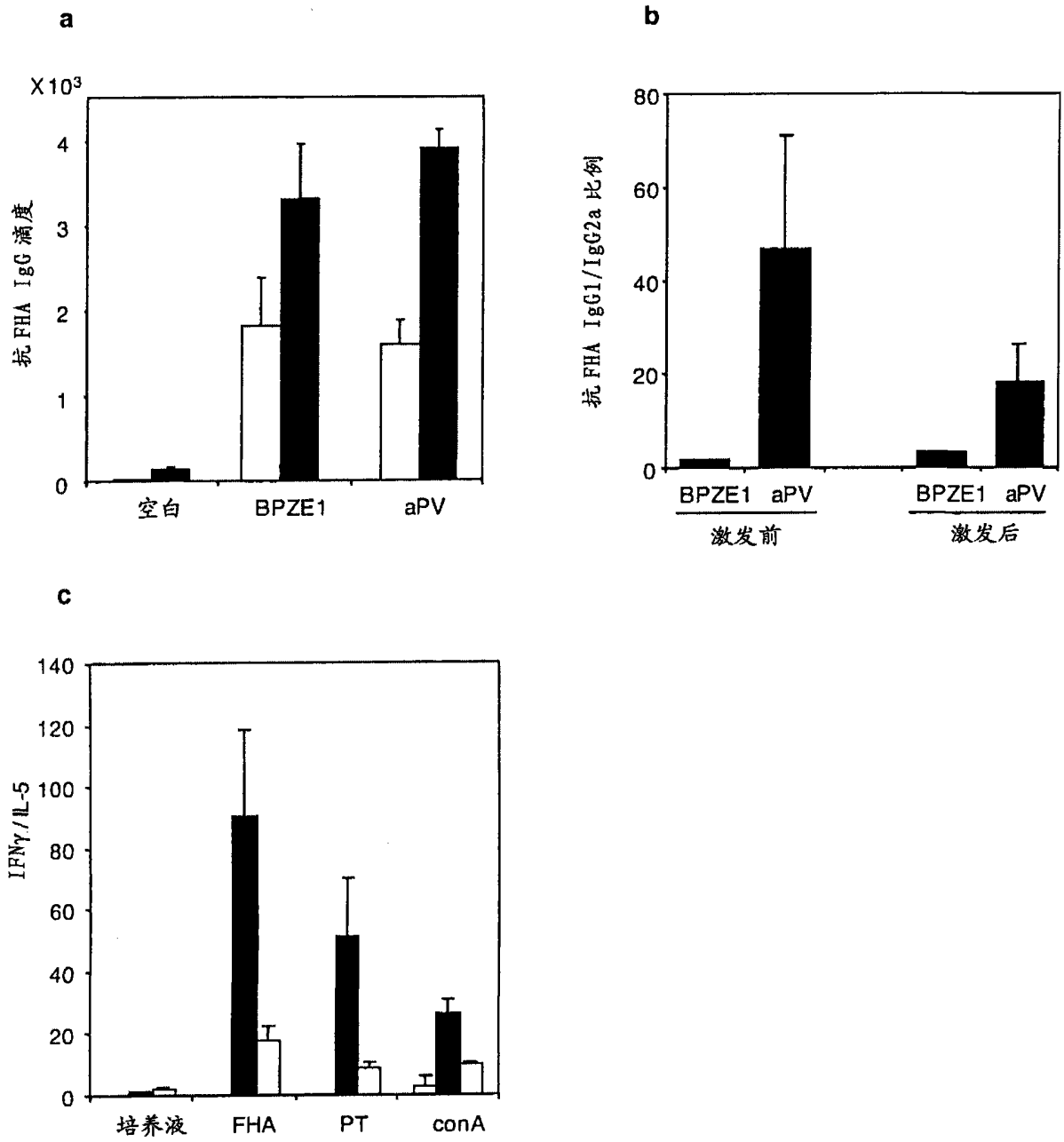


图 10

**胰岛激活蛋白 S1 (NP\_882282)**

MRCTRAIRQTARTGWLTWLAAILAVTAPVTS PAWADDPPATVYRYDSRPPEDVF  
 QNGFTAWGNNDNVLDHLTGRSCQVGSSNSAFVSTSSRRRYTEVYLEHRMQEAV  
 EAERAGRGTHFIGYIYEV RADNNFYGAASSYFEYVD TYGDNAGRILAGALAT  
 YQSEYLAHRRIPPENIRRVTRVYHNGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPY  
 TSSRSVASIVGTLVRMAPVIGACMARQAESSEAMA AW SERAGEAMVLVYYESI  
 AYSF

图 11

**皮肤坏死毒素的氨基酸序列 (NP\_881965)**

MDKDESALRQLVDMALVGYDGVVEELLALPSEESGDLAGGRAKREKAEFALFS  
 EAPNGDEPIGQDARTWFYF PKYRPVAVSNLKKMQVAIRARLEPESLILQWLIA  
 LDVYLGVLIAALSRTVISDLVFEYVKARYEIIYLLNRVPHPLATAYLKRRRQR  
 PVDRSGRLG SVFEHPLWFAYDELAGTVDL DADIYEQALAESIERRMDGEPDDG  
 SLDTAEHDVWRLCRDGINRGEQAI FQASGPYGVVADAGYMRTVADLAYADALA  
 DCLHAQLRIRAQGSVDS PGDEMPRKLDAWEIAKFHLAATQQARVDLLEAAFAL  
 DY AALRDVRVYGDYRNALALRFIKREALRLLGARRGNASTMPAVAAGEYDEIV  
 ASGAANDAAYVSMAAALIAGVLC DLESAQRTL PVVLARFRPLGVLARFRRLEQ  
 ETAGMLLDGQEPEPRGFISFTDFRDS DAFASYAEYAAQFNDYIDQYSILEAQR  
 LARILALGSRMTVDQWCLPLQKVRHYKVLTSQPGLIARGIENHNRGIEYCLGR  
 PPLTDL PGLFTMFQLHDSWLLVSNINGELWSDVLANAEVMQNPTLAALAEPO  
 GRFRTGRRTGGWFLGGPATEG PSLRDNYLLKLRQSNPGLDVKKCWYFGYRQEY  
 RLPAGALGVPLFAVSVALRHSLDDLA AHAKSALYKPSEWQKFAFWIVPFYREI  
 FFSTQDRSYRVDVGSIVFDSISLLASVFSIGGKLSFTRTQYGNLRNFVVRQR  
 IAGLSGQRLWRSVLKELPALIGASGLRLSRSLLDLYEIFEPPVIRRLVAGFV  
 SATTVGGRNQAF LRQAFSAASSSAGRTGGQLASEWRMAGVDATGLVESTSGGR  
 FEGIYTRGLGPLSECTEHFIVESGNAYRVIW DAYTHGWRV VNGRLPPRLTYTV  
 PVRLNGQGHWETHLDVPGRGGAPEIFGRIRTRNLVALAAEQAAPMRLLNQAR  
 RVALRHIDTCRSLALPRAESDM DAAIRIFFGEPDAGLRQRIGRRLQEVRAI  
 GDLSPVNDVLYRAGYDLD DVATLFNAVDRNTSLGRQARMELYLDAIVDLHARL  
 GYENARFVDLMAFHLLSLGHAATASEVVEAVSPRLLGNVFDISNVAQLERGIG  
 NPASTGLFVMLGAYSESSPAIFQS FVNDIFPAWRQASGGGPLVWNFGPAAISP  
 TRLDYANTDIGLLNHGDISPLRARPPLGGRRDIDLPPGLDISFVRYDRPVRMS  
 APRALDASVFRPVDGPVHG YIQSWTGAEIEYAYGAPAAAREVMLTDNVRIISI  
 ENGDEGAIGVRVRLDTPVATPLILTGGSLSGCTTMVGVKEGYLAFYHTGKST  
 ELGDWATAREGVQALYQAHLAMGYAPISIPAPMRNDDLVSIAATYDRAVIAYL  
 GKDVPGGGSTRITRHDEGAGSVVSFDYNAAVQASAVPRLGQVYVLI SNDGQGA  
 RAVLLAEDLAWAGSGSALDVLNERLVTLFPAPV

图 12



**AmpG 蛋白 (NP\_878961.1)**

MAPLLVLGFASGLPLALSSGTLQAWATVENVSLQSIGFLTLAGTAYTLKFLWA  
PLIDRYVPPFLGRRRGWMLLTQVLLAAAIMVMGMLSPGSALLPLALVAVLVAF  
LSASQDIAFDAYSTDVLRQEERGAGAAAMRVMGYRLAMIVSGGLALIVADRWL  
WGNTYVLMGGLMLACALGTLWAPEPERPANPPRDLGAAVVEPFREFFSRRGAI  
DMLLLIVLYKLGDAFAGALSTTFLLRGAGFSATEVGTVNKVLGLAATIVGALA  
GGSIMTRWGLYRSLMAFGLLQAVSNLGYWLIIVSPKNLYLMGLAVGVENLCGG  
LGTASFVALLMAMCRQQFSATQFALLSALAAVGRTYLAGPLTPVLVEWLDWPG  
FFIVTVLIALPGLWLLRLRRNVIDELDAQAR

图 13

**AmpG 蛋白 (NP\_752478.1)**

MSSQYLRIFFQQPRSAILLILGFASGLPLALTSGTLQAWMTVENIDLKTIGFFS  
LVGQAYVFKFLWSPLMDRYTPPPFGRRRGWLLATQILLLVAIAAMGFLEPGTQ  
LRWMAALAVVIAFCSASQDIVFDAWKTDVLPAAEERGAGAAISVLGYRLGMLVS  
GGLALWLADKWLGWQGMWMAALLIPCIATLLAPEPTDTIPVPKTLEQAVV  
APLRDFFGRNNAWLILLLIVLYKLGDAFAMSLTTTFLIRGVGFDAGEVGVNK  
TLGLLATIVGALYGGILMQRLSLFRALLIFGILQGASNAGYWLLSITDKHLYS  
MGAAVFFENLCGGMGTSASFVALLMTLCNKSFSATQFALLSALSAVGRVYVGPV  
AGWFVEAHGWSTFYLFVAAAVPGLILLLVCRQTLEYTRVNDNFISRTEYPAG  
YAFAMWTLAAGISLLAVWLLLLTMDALDLTHFSFLPALLEVGVLVALSQVVLG  
GLLDYLALRKTHLM

图 14