

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/11  
C12N 15/31 A61K 39/04

[21] 申请号 95197250.2

[43]公开日 1998年1月28日

[11] 公开号 CN 1171814A

[22]申请日 95.11.13

[30]优先权

[32]94.11.14[33]US[31]08 / 338,992

[86]国际申请 PCT / US95 / 14899 95.11.13

[87]国际公布 WO96 / 15241 英 96.5.23

[85]进入国家阶段日期 97.7.4

[71]申请人 麦克公司

地址 美国新泽西州

共同申请人 英诺吉尼蒂克斯有限公司

[72]发明人 M·A·刘 D·蒙特戈马利

J·厄尔默 J·康坦特 K·休根

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 温宏艳

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 多核苷酸结核病疫苗

[57]摘要

编码结核分支杆菌(M.tb 蛋白)的基因被克隆进真核表面载体中,以使其在哺乳肌肉细胞体内表达所编码的蛋白。动物免疫是通过注射这些称为多核苷酸疫苗或PNV的这些DNA构建体到动物的肌肉中而进行的。产生抗M.tb抗原的免疫抗血清。在接种小鼠的脾细胞中检测到特异的T-细胞应答,抗原应答中细胞因子分泌的类型提示有T<sub>H</sub>1型辅助T-细胞应答的出现(即高IL-2和IFN- $\gamma$ )。M.tbDNA疫苗的保护效用在牛分支杆菌BCG攻击后的小鼠中得到证明,如测定M.tbDNA接种鼠的脾和肺中分支杆菌相对于对照DNA接种小鼠或天然小鼠中的初次感染增殖的降低。

## 权 利 要 求 书

1. 一种在导入脊椎动物组织中诱导一种或多种抗分支杆菌免疫应答的多核苷酸，其免疫应答选自抗体、CTL、辅助T淋巴细胞应答和保护性免疫应答，其中所述的多核苷酸包括编码一种或多种分支杆菌蛋白或其功能性等价体的一个或多个基因，所述的基因可操作地连在转录启动子上。  
5
2. 权利要求1的多核苷酸，其中所述的基因编码一种结核分支杆菌蛋白和其功能性等价体。
3. 权利要求2的多核苷酸，其中所述的基因编码一种选自抗原  
10 85A、B、和/或C的和其功能性等价体的蛋白。
4. 一种在脊椎动物中诱导抗分支杆菌表位的免疫应答的方法，包括将根据权利要求1的1ng~5mg多核苷酸导入到脊椎动物组织中。
5. 权利要求4的方法，其中所述的基因编码一种结核分支杆菌蛋白和其功能性等价体。
- 15 6. 权利要求5的方法，其中所述的基因编码一种选自抗原85A、B和C和其功能性等价体的蛋白。
7. 一种诱导抗分支杆菌抗原免疫应答的疫苗，包括权利要求1的多核苷酸和一种药学可接受的载体。
8. 权利要求7的疫苗，其中所述的抗原是一种结核分支杆菌抗原和其功能性等价体。  
20
9. 权利要求8的疫苗，其中所述的抗原是一种选自抗原85A、B和C以及其功能性等价体的蛋白。
10. 一种诱导抗分支杆菌抗原的免疫应答的方法，包括将一或多种分离和纯化的分支杆菌基因导入到脊椎动物的组织中，引起预防分支杆菌感染和/或减轻分支杆菌疾病的免疫应答。  
25
11. 权利要求10的方法，其中所述的基因编码一种结核分支杆菌蛋白和其功能性等价体。
12. 权利要求11的方法，其中所述的基因编码一种选自抗原85A、B、和C及其功能性等价体的蛋白。
- 30 13. 一种多核苷酸，其包括：
  - a) 一种真核转录启动子；
  - b) 一种操作性地与所述启动子连接的编码一或多种分杆菌表

位的开放阅读框, 和一种翻译终止信号; 以及

c) 选择性地含有一种或多种操作性连接的 IRES, 一种或多种编码一种或多种附加基因的开放阅读框, 和一种或多种转录终止信号。

14. 权利要求 13 的多核苷酸, 其中所述 c) 的附加基因是选自 GM-CSF、IL-12、干扰素、和 T - 细胞共刺激蛋白 B7 家族的一个成员的免疫调节或免疫刺激基因。

15. 权利要求 13 的多核苷酸, 其中所述的 a) 的分支杆菌基因编码一种结核分支杆菌蛋白和其功能性等价体。

16. 权利要求 15 的多核苷酸, 其中所述 a) 的分支杆菌基因编码一种选自抗原 85A、B 和 C 的和其功能性等价体的结核分支杆菌蛋白。

17. 权利要求 13 的多核苷酸, 其中所述 c) 的附加基因是选自抗原 85A、B 和 C 和其功能性等价体的结核分支杆菌基因。

18. 一种在需要治疗时用一种多核苷酸治疗病人的方法, 该多核苷酸在导入脊椎动物组织中后诱导一或多种选自抗体、CTL、辅助 T 淋巴细胞应答和保护性免疫应答的抗分支杆菌免疫应答, 其中所述的多核苷酸包括编码一种或多种分支杆菌蛋白或其功能性等价体的基因, 所述的基因可操作性地连接在一转录启动子上。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述的基因编码一种结核分支杆菌蛋白和其功能性等价体。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述的基因编码一种或多种选自抗原 85A、B 和 C 及其功能性等价体的蛋白。

21. 权利要求 10 的方法, 其中所述的患者是家养动物或家畜。

22. 一种在家养或农业动物中诱导抗分支杆菌感染的免疫应答的方法, 包括权利要求 1 的多核苷酸和一种药学上可接受的载体。

# 说明书

## 多核苷酸结核病疫苗

### 发明背景

- 5 抗病毒和细菌疫苗开发的主要障碍是不同分离体和株中外部蛋白的多样性，尤其抗多种血清型或高突变率的种类，需要诱发中和作用抗体和/或保护性细胞介导的免疫反应。由于小鼠和人细胞毒性 T - 淋巴细胞 ( CTLs )，能识别来自内部保守的病毒蛋白的表位 [ J. W. Yewdell 等，美国国家科学院院报 82, 1785 (1985); A. R. M. Townsend 等，细胞 44, 959
- 10 (1986); A. J. McMichael 等， J. Gen. Virol. 67, 719 (1986); J. Bastin 等，实验医学杂志 165, 1508 (1987); A. R. M. Townsend 和 H. Bodmer，免疫学年评 7, 601 (1989)]，被认为在抗病毒的免疫应答中是重要的[Y.-L. Lin 和 B. A. Askonas，实验医学杂志 154, 225 (1981); I. Gardner 等，欧洲免疫学杂志 4, 68 (1974); K.L. Yap 和 G. L. Ada，自然 273, 238 (1978); A. J.
- 15 McMichael 等，新英格兰医学杂志 309, 13 (1983); P. M. Taylor 和 B. A. Askonas，免疫学 58, 417(1986)]，许多努力方向是能提供抗不同病毒株的异源性保护的 CTL 疫苗的开发。

众所周知，当 T 细胞受体识别和 MHC I 类和/或 II 类分子相连的外来肽时， CTLs 杀死病毒或细菌感染的细胞。这些肽可能衍生自内源合成的

20 外来蛋白，而不论蛋白在病原体中的定位和功能。通过识别保守性蛋白的表位， CTLs 可能提供异源性保护。在细胞内细菌存在的情况下，从细菌分泌或释放的蛋白被 MHC I 类和 II 类分子加工和呈递，因而产生了在降低或消除感染中起作用的 T 细胞应答。

大多数产生 CTL 应答的努力在于使用复制载体，以在细胞中产生蛋

25 白抗原 [ J. R. Bennink 等，同上， 311, 578 (1984); J. R. Bennink 和 J. W. Yewdell，当今微生物免疫学论题 163, 153(1990); C. K. Stover 等，自然 351, 456 (1991); A. Aldovini 和 R. A. Young，自然 351, 479 (1991); R. Schafer 等， J. Immunol. 149, 53(1992); C. S. Hahn 等美国国家科学院院报 89, 2679 (1992)]，或者它们集中于把肽导入细胞溶质中 [ F. R. Carbone 和

30 M. J. Bevan，实验医学杂志 169, 603 (1989); K. Deres 等 自然 342, 561 (1989); H. Takahashi 等，同上 344, 873 (1990); D. S. Collins 等，免疫学杂志 148, 3336 (1992); M. J. Newman 等，同上 148, 2357 (1992)]。这二种

途径的局限性可能降低了它们作为疫苗的可应用性。反转录病毒在维持重组病毒复制能力的情况下对作为融合蛋白表达的多肽的大小和结构具有限制 [A. D. Miller, 当今微生物免疫学论题 158, 1 (1992)], 载体如牛痘作下一步的免疫作用的有效性能被抗牛痘的免疫应答所缓和 [E. L. Cooney 等, 柳叶刀 337, 567 (1991)]. 另外, 病毒载体和修饰的病原体有内在的风险, 能妨碍其在人类中应用 [R. R. Redfield 等, 新英格兰医学杂志 316, 673 (1987); L. Mascola 等, Arch Intern. Med. 149, 1569 (1989)]. 因此, 被呈递的肽段表位的选择依赖于个体 MHC 抗原的结构, 所以肽疫苗由于远亲群体中 MHC 单倍型的多样性具有有限的效用性。

- 10 Benvenisty, N. 和 Reshef, L [美国国家科学院院报 83, 9551-9555, (1986)] 表明腹膜内 (i.p.), 静脉内 (i.v.) 或肌肉内 (i.m.) 导入小鼠的氯化钙沉淀的 DNA 能表达。DNA 表达载体在鼠中肌肉内 (i.m.) 注射的结果说明 DNA 被肌肉细胞吸收, 表达由 DNA 编码的蛋白 [J. A. Wolff 等, 科学, 247, 1465 (1990); G. Ascadi 等, 自然 352, 815 (1991)].
- 15 表明质粒以附加体的方式被维持, 没有复制。后来在大鼠、鱼和灵长目骨骼肌和大鼠心肌的 i.m. 注射后观察到持续的表达 [H. Lin 等; 循环 82, 2217(1990); R. N. Kitsis 等, 美国国家科学院院报 88, 4138 (1991); E. Hansen 等, FEBS Lett. 290, 73 (1991); S. Jiao 等, 人类基因治疗 3, 21 (1992)]; J. A. Wolff 等, 人类分子遗传 1, 363 (1992)]. 用核苷酸作治疗
- 20 剂的技术在 WO 90/11092 (1990 年 10 月 4 日) 报道, 其中用裸多核苷酸接种脊椎动物。

最近, 在活化 CTLs 消除肿瘤中抗原呈递细胞表面表位的 B7 和主要组织相容性复合物 (MHC) 呈递的协同作用做了综述 [Edgington 生物技术 11, 1117-1119, 1993]。一旦抗原呈递细胞 (APC) 表面的 MHC 分子呈递表位给 T 细胞受体 (TCR), 在相同 APC 表面表达的 B7 起第二

25 信号的作用与 CTLA-4 或 CD28 结合。其结果是 CD4<sup>+</sup> 辅助细胞的快速分裂, 其传递信号给 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 使其增殖和杀死 APC。

对方法的成功来说, 肌肉内免疫并非必要。因此, Tang 等 [自然, 356, 152-154 (1992)] 发现包被编码牛生长激素 (BGH) 的 DNA 的金微粒

30 导入小鼠皮肤, 结果小鼠产生了抗 BGH 的抗体。弗斯等 [分析生物化学, 205, 365-368, (1992)] 表明喷射 (jet) 注射器可用于转染活动物的皮肤、肌肉、脂肪和乳腺组织。最近综述了导入核苷酸的不同方法

[Friedman, T. 科学 244, 1275-1281 (1989)]. 也可见 Robinson 等 [提交到关于新疫苗现代方法, 包括 AIDS 预防的 1992 会议的论文摘要, 冷泉港, p92; 疫苗 11, 957 (1993)], 其中主张鸟类流感 DNA im, ip 和 iv 对鸡给药, 以提供保护抗致死攻击。小鼠中 DNA: 阳离子脂质体复合物的静脉注射由 Zhu 等证明 [科学 261, 209-211 (1993 年 7 月 9 日)]; 亦见于 WO93/24640, 1993 年 12 月 9 日], 结果是克隆的转基因系统地表达。最近, Ulmer 等 [科学 259, 1745-1749, (1993)] 报道注射编码流感病毒蛋白的 DNA 可异源地保护抗流感病毒感染。

Wang 报道 [美国国家科学院院报 90, 4156-4160 (5 月, 1993)] 用克隆的基因组 (未剪切) 的 HIV 基因肌肉内接种, 能诱发小鼠抗 HIV 的免疫应答。不过, 所获的免疫应答水平非常低, 该系统使用小鼠乳腺癌病毒 (MMTV) 长末端重复 (LTR) 启动子部分和猴病毒 40 (SV40) 启动子和终止子部分。已知 SV40 能转化细胞, 可通过整合进宿主细胞 DNA 而起作用。因而, Wang 等所描述的系统, 施用于人是完全不合适的, 这是本发明的目的之一。

WO93/17706 描述了一种接种动物抗病毒的方法, 其中载体颗粒用基因构建体包被, 包被的颗粒加速进入动物细胞。

由 Wolff 等 (同上) 的研究最先证明编码报告基因的质粒 DNA 肌肉注射, 结果是在注射位点和其附近的肌细胞内该基因的表达。最近报道表明编码流感 A 血凝素 (Montgomery D. L 等, 1993, 细胞生物学, 12, pp777-783), 或核蛋白 (Montgomery D. L 等, 同上; Ulmer, J. B. 等, 1993, 科学, 259, pp. 1745-1749) 的质粒注射, 成功地免疫小鼠抗流感。对疱疹病毒 DNA 免疫作用的首次应用已有报道 (Cox 等, 1993, 病毒学杂志, 67, pp. 5664-5667)。编码牛疱疹病毒 (BHV-1) 糖蛋白 g IV 的质粒注射在小鼠和小牛中产生了抗 g IV 的抗体。用 BHV-1 鼻内攻击表明免疫小牛减轻症状, 排出基本上比对照少的病毒。

结核病 (TB) 是由病原体结核分支杆菌引起的肺慢性感染病。TB 是世界范围临床上最显著的感染病之一, 伴随而来的是每年 300 万人死亡和 1 千万新病例。估计多达世界人口的三分之一会被感染, 在发展中国家, 已报道 5 千 5 百万发病的 TB 病例。直到本世纪初, TB 是美国主要死因。可是, 随着卫生条件的改善和抗微生物药物的出现, 死亡率稳定下降至预计到 2000 年该病将被根除的程度。不过, 在大多数发达国家,

自 1980 年代中期以来发病的 TB 病例数每年上升。该复发部分归因于迁移和免疫后损害的, HIV 感染个体数目增加。假如趋势没有减弱, 预计 TB 将在下一个十年要了三千万以上人的性命。象这些数学显得使人惊恐一样, 甚至更为关注的是结核分支杆菌的多药抗性 (MDR) 株的出现。5 这些 MDR 株不被传统药物疗法所驯服, 特别在城市中心引起最近几次 TB 的爆发。所以, 长期 TB 控制的关键组分之一将是有效的疫苗 [综述见 Bloom 和 Murray, 1993, 科学 257, 1055]。

结核分支杆菌是感染巨噬细胞的细胞内病原菌, 能在该类型细胞吞噬溶酶体的恶劣环境中存活。大多数吸入的杆菌被活化的小泡巨噬细胞破坏。可是, 存活的杆菌能在巨噬细胞中增殖, 靠细胞死亡而释放, 发出了淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞向该点浸润的信号。负载有杆菌的巨噬细胞的裂解由迟发型超敏反应所介导, 导致环绕感染细胞区域的紧密干酪样结核结节的出现。继续的 DTH 引起结节液化, 因而释放所捕获的杆菌。大剂量的胞外杆菌进一步激发 DTH, 引起对支气管的损害和由淋巴的、血原性的以及支气管通路散播, 最终使感染性的杆菌由呼吸扩散。15

对 TB 的免疫性涉及效应细胞的几种类型。由细胞因子比如  $\gamma$  - 干扰素对巨噬细胞的活化是把细胞内分支杆菌增殖降到最低的一种有效方法。不过, 靠这种方法常未取得完全根除分支杆菌。抗 TB 的保护的获得需要 T 淋巴细胞。在这些之中,  $CD8^+$  和  $CD4^+$  T 细胞似乎是重要的 [Orme 等, 1993, 传染病杂志, 167, 1481]。这些细胞类型在对分支杆菌应答中分泌  $\gamma$  - 干扰素, 显示有  $T_H1$  免疫应答, 和具有对分支杆菌脉冲的靶细胞的细胞毒活性。最近用  $\beta$ -2 微球蛋白和 CD8 缺陷的小鼠研究中, 表明 CTL 应答在提供抗结核分支杆菌的保护中是关键性的 [Flynn 等, 1992, 美国国家科学院院报 89, 12013; Flynn 等, 1993, 实验医学杂志 178, 2249; Cooper 等, 1993, 实验医学杂志 178, 2243]。相反, B 淋巴细胞似乎没有涉及, 抗分支杆菌的抗体的被动输入不提供保护。所以, 抗 TB 的有效疫苗必须产生细胞介导的免疫应答。20

T 细胞抗原刺激需要 MHC 分子的呈递作用。为了使分支杆菌抗原可进入抗原呈递通路, 它们必须从细菌中释放。在感染的巨噬细胞中, 这可能与分泌或细菌裂解完成。分支杆菌具有许多潜在的 T 细胞抗原, 有几种现已确认 [Andersen 1994, Dan Med. Bull 41, 205]。这些抗原的一些25

由细菌分泌。一般认为抗 TB 的免疫性由直接针对这些所分泌抗原的 CD8<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup> T 细胞所介导。在 TB 的小鼠和豚鼠模型中，由降低体重减轻所测定的对细菌攻击的保护作用，已应用分泌的分支杆菌抗原的混合物获得。 [Pal 和 Horowitz, 1992, 感染免疫 60, 4781; Andersen 1994, 感染免疫 62, 2536; Collins, 1994, Veterin. 微生物学 40, 95]。

几种潜在的保护性 T 细胞抗原已在结核分支杆菌中确认，一些作疫苗的靶物正在研究。最近工作显示主要的 T 细胞抗原是它们停留在巨噬细胞中的过程中，由分支杆菌分泌的那些蛋白，例如： i) 蛋白抗原 85 复合体 ( 85A, 85B, 85C ) [wiker 和 Harboe, 1992, 微生物学综述, 58, 648], ii) 一种称作 ESAT-6 的 6 kDa 蛋白 [Ardersen 1994, 感染免疫 62, 2536], iii) 一种与 Phos 有同源性的 38 kDa 脂蛋白 [Young 和 Garbe, 1991 微生物学研究, 142, 55; Ardersen 1992, 感染病杂志 166, 874], iv) 65 kDa 的 GroEl 热休克蛋白 [Siva 和 Lowrie, 1994, 免疫学 82, 244], v) 一种富含脯氨酸和苏氨酸的 55 kDa 蛋白 [Romain 等, 1993, 美国国家科学院院报 90, 5322]; 和 vi) 一种 19 kDa 脂蛋白 [Faith 等, 1991, 免疫学 74, 1]。

三种抗原 85 蛋白 ( A、B 和 C ) 的每一种的基因已被克隆和测序 [Borremans 等, 1989 感染免疫 57, 3123; Content 等, 感染免疫 59, 3205; DeWit 等 1994, DNA 序列 4, 267]。此外，这些结构相关蛋白是感染和接种后强烈的 T 细胞应答的目标 [Huygen 等, Scand. J. Immunol. 27, 187; Launois 等 1991, 临床实验免疫学 86, 286; Huygen 等, 1992, 感染免疫 60, 2880; Munk 等, 1994, 感染免疫 62, 726; Launois 等 1994, 感染免疫 62, 3679]。因此，抗原 85 蛋白被认为是良好的疫苗靶物。

### 发明概述

为检验 DNA 免疫在预防 M.tb 疾病中的有效性，将编码 M.tb 蛋白的 DNA 序列克隆进真核表达载体中。这些 DNA 构建体当注射到动物中时，激发了免疫应答。免疫的动物用分支杆菌感染，以评价是否用基因 ( 或其他 M.tb 基因 ) 的直接 DNA 免疫能保护它们免除疾病。因而公开的是包括 DNA 构建体和 RNA 转录体的核苷酸，通过注射或其他途径直接导入动物组织，能诱导 M.tb 蛋白的体内表达。这些核苷酸注射能激发免疫应答，应答导致对 M.tb 抗原特异的细胞毒性 T 淋巴细胞 ( CTLs ) 的产生和对后续的攻击有保护作用的特异于 M.tb 的辅助 T 淋巴细胞应答的产



生。将这些核苷酸用作诱导对 M.tb 免疫性的疫苗是有用的，它能预防感染和/或改善 M.tb 相关的疾病。

### 附图简述

- Fig1. 显示克隆 M.tb 基因进入表达载体的一般原理。
- 5 Fig2. 显示 V1Jns.tPA85A.C1 的载体图谱。
- Fig3. 显示 V1Jns.85A.C2 的载体图谱。
- Fig4. 显示 V1Jns.85A.C3 的载体图谱。
- Fig5. 显示 V1Jns.tPA85B.C1 的载体图谱。
- Fig6. 显示 V1Jns.tPA85C.C1 的载体图谱
- 10 Fig7. 显示构建体 N 末端序列的核实。
- Fig8. 显示在组织培养中 M.tb 蛋白的表达。
- Fig9. 显示在接种 DNA 的小鼠中对抗原 85A 特异的抗体的产生。
- Fig10. 显示在 BALB/c 小鼠中由 Tb DNA 疫苗而产生 IL-2。
- Fig11. 显示在 C57BL/6 小鼠中由 Tb DNA 疫苗而产生 IL-2。
- 15 Fig12. 显示在 BALB/c 小鼠中由 Tb DNA 疫苗而产生 IFN- $\gamma$ 。
- Fig13. 显示在 C57BL/6 小鼠中由 Tb DNA 疫苗而产生 IFN- $\gamma$ 。
- Fig14. 显示在 BALB/c 小鼠中，Tb DNA 疫苗不产生 IL-4。
- Fig15. 显示在小鼠中，Tb DNA 疫苗不产生 IL-6。
- Fig16. 显示在小鼠中，Tb DNA 疫苗不产生 IL-10。
- 20 Fig17. 显示用 Tb DNA 疫苗接种的 C57BL/6 小鼠的肺中 BCG 的增殖降低。
- Fig18. 显示用 Tb DNA 疫苗接种的 BALB/c 小鼠的肺中 BCG 的增殖降低。
- Fig19. 显示用 Tb DNA 疫苗接种的 BALB/c 小鼠的脾中 BCG 的增殖
- 25 降低。
- Fig20. 显示用 Tb DNA 疫苗接种的 C57BL/6 小鼠的脾中 BCG 的增殖降低。

### 发明详述

本发明提供的多核苷酸，当直接导入包括诸如人类的哺乳动物的脊椎动物体内时，诱导编码蛋白在动物中表达。在此所用的多核苷酸是一种核酸，它含有依赖其导入活脊椎动物细胞中的基本调控元件，和能指导细胞机构产生包含多核苷酸基因编码的翻译产物。在本发明的一个实

30

实施方案中，多核苷酸是一种多脱氧核糖核酸，其包括有操纵性地连结于转录启动子的结核分支杆菌（*M. tb*）基因。在本发明的另一实施方案中，多核苷酸疫苗包括编码服从于由真核细胞机构（核糖体、tRNAs、和其他翻译因子）翻译的 *M. tb* 基因的多核糖核酸。那里由多核苷酸编码的蛋白是除在病理条件下在动物中不正常产生的一种，（即一种异源性蛋白）如与 *M. tb* 有关的蛋白，动物的免疫系统被活化发动保护性免疫应答。因为这些外源蛋白由动物自身组织产生，表达的蛋白由主要组织相容性系统（MHC）以类似于当真正的 *M. tb* 感染发生时的方式所处理。如在本公开内容所示的结果是诱导抗 *M. tb* 的免疫应答。为对一种编码蛋白产生免疫应答的目的的多核苷酸在此称作多核苷酸疫苗或 PNV。

本发明有许多实施方案使本领域的技术人员能从特例中正确评价。这样，可成功地使用不同的转录启动子、终止子、穿梭载体（carrier vector）或特异的基因序列。

本发明提供一种应用多核苷酸的方法，导入哺乳动物组织中时，多核苷酸诱导因而产生编码蛋白的体内多核苷酸表达。对本领域技术人员极明显的是能产生编码蛋白的核苷序列的变异或衍生序列，而改变编码蛋白的氨基酸序列。改变的表达蛋白可能具有改变的氨基酸序列，而仍能引起和分支杆菌蛋白起反应的免疫应答，改变的表达蛋白被认为是功能性等价体。另外，编码全长蛋白部分的全长基因的片段也可构建。这些片段能编码一种蛋白或肽，其可诱导出和分支杆菌蛋白起反应的抗体，这些片段被认为是功能性等价体。

在本发明的一个实施方案中，编码 *M. tb* 基因产物的一个基因被掺入到表达载体中。载体含由真核 RNA 聚合酶识别的转录启动子和在 *M. tb* 基因编码序列末端的转录终止子。在优选的实施方案中，启动子是具有内含子 A 序列的巨细胞病毒启动子（CMV-intA），尽管本领域的技术人员会认为可用许多其他的已知启动子如强免疫球蛋白或其他真核基因启动子的任一个。优选的转录终止子是牛生长激素终止子。CMVintA-BGH 终止子的结合是优选的。此外，为有助于在原核细胞中多核苷酸的制备，抗生素抗性标志也选择性地包括在合适的原核启动子的转录控制下的表达载体中。可用氨苄青霉素抗性基因，新霉素抗性基因或任何其他合适的抗生素抗性标志。在本发明的优选实施方案中，抗生素抗性基因编码对新霉素/卡那霉素抗性的基因产物。更进一步，为助于生长在原

核生物中多核苷酸的高水平产生，载体含原核的复制起点和具有高拷贝数是有利的。许多商品化的原核克隆载体的任一个均能提供这些元件。在本发明优选的实施方案中，这些功能体由商品化称为 pUC 系列的载体提供。不过移去非必需 DNA 序列可能是需要的。这样，可移去 pUC 的 lacZ 和 lacI 编码序列。也需要载体不能在真核细胞中复制。这使多核苷酸疫苗序列整合到接受体基因组的风险降低到最低限度。

在另一实施方案中，使用表达载体 pnRSV，其中劳斯肉瘤病毒（RSV）的长末端重复序列（LTR）被用作启动子。仍在另一实施方案中，应用 V1，一种克隆有 CMV 启动子和 BGH 转录终止子的突变 pBR322 载体。在本发明优选的实施方案中，结合 V1 和 pUC19 元件而产生的表达载体称作 V1J。

克隆进 V1J，V1JtPA 或另一需要的表达载体中的是 M.tb 基因，例如抗原 85 复合体基因之一，或任何其他能诱导抗 M.tb 免疫应答（CTLs，辅助 T 淋巴细胞和抗体）的 M.tb 基因。在另一实施方案中，氨基霉素抗性基因从 V1J 中移去，代之以新霉素抗性基因以产生 V1J-neo，按照本发明，使用时可把许多不同的 M.tb 基因克隆到 V1J-neo 中。仍在另一实施方案中，载体是 V1Jns，这是与 V1J-neo 相同，除了在 V1J-neo 的 2114 位点，唯一的 SfiI 限制性位点构建到单独的 KpnI 位点上。在人基因组 DNA 中 SfiI 位点的出现率非常低（大约每 100,000 碱基 1 个位点）。这样，简单地把提取的基因组 DNA 的 SfiI 消化，该载体允许对表达载体整合到宿主 DNA 中作仔细监测。在一进一步的实施方案中，载体是 V1R。在这载体中，尽可能地“剪去”非必需 DNA 以产生高度紧密的载体。该载体允许用作较大的插入片段，当编码特异的病毒基因构建体被导入周围组织时，较少涉及非必需的序列被编码和细胞吸收的优化。根据本领域人员熟知的方法，可完成用于产生前面的载体修饰和发展步骤的方法。

根据本工作，本领域的技术人员会认为本发明的应用之一是提供体内和体外的检测和分析系统，结果能找出和 CTL 和 T - 细胞增殖应答以及其他参数的 M.tb 序列多样性的相关性。这些不同的基因的分离和克隆可按本领域技术人员熟知的方法完成。本发明进一步提供一种方法对疫苗产生的 M.tb 株和序列作系统鉴别。来自 M.tb 株的初级分离体基因的结合提供一种免疫原，它能诱导抗临床的微生物分离体的免疫应答，因而

满足迄今为止该领域未遇的需求。因而，假如毒性分离体变化，免疫原可修改以反映必需的新序列。

5 在本发明的一个实施方案中，编码 M.tb 蛋白的基因直接与转录启动子相连。组织特异的启动子或增强子例如肌肉肌酸激酶（MCK）增强子元件的应用可望限制多核苷酸在一特定的组织类型中表达。例如，肌细胞是最终分化时不再分裂的细胞。外源 DNA 整合进染合体似乎需要细胞分裂和蛋白合成。因此，对非分裂细胞如肌细胞限制性的蛋白表达是优选的。不过，CMV 启动子的应用对获得 PNV 导入许多组织中表达是合适的。

10 M.tb 和其他基因优先地连接到特异地优化作多核苷酸接种的表达载体中，在此描述的元件包括转录启动子、免疫原性表位、编码免疫增强或免疫调节基因的附加顺反子和它们自身的启动子，转录终止子、细菌复制起点和抗生素抗性基因。选择性地，载体可含有多顺反子 mRNA 表达的  
15 DNA 对等物编码的体外转录产生多顺反子 mRNA 的 RNA 在本发明范围之内。为该目的，必须用如强 RNA 聚合酶启动子作 T7 或 SP6 启动子为转录启动子，用线性化的 DNA 模板进行体外连续转录。这些方法在本领域中已众所周知。

20 抗后续攻击的多核苷酸 M.tb 免疫原的保护效用通过本发明的 DNA 免疫作用得到阐明。由于不涉及感染原，不需要细菌的组装和复制和允许决定簇选择，这是有利的。因此，因为分支杆菌基因产物的序列在 M.tb 的不同株中可能保守，能获得由 M.tb 另一菌株引起的抗后续攻击的保护作用。

25 编码抗原 85A，B 或 C 的 DNA 表达载体的注射可导致抗后续攻击的显著的保护免疫性的形成。尤其是会产生特异的 CTLs 和辅助 T 淋巴细胞应答。

因为 M.tb 的每一个基因产物在不同的 M.tb 株中高度保守和因为免疫应答能在细胞内表达和 MHC 处理的反应中产生，预计许多不同的 M.tb PNV 构建体会产生交叉反应的免疫应答。

30 本发明提供一种方法不需要自身复制因素或佐剂诱导异源性保护免疫。病毒蛋白和人生长激素 DNA 注射后[Tang 等，自然 356, 152, 1992]抗表达蛋白的高效价抗体的产生显示，这是一种制取基于抗体的疫苗的

方便和高效的方法，该疫苗靶向于保守抗原分别或和细胞毒性 T 淋巴细胞和辅助 T 细胞结合。

产生和纯化 DNA 构建体的容易性和传统的蛋白纯化相比是有利的，便于结合疫苗的产生。因而可制备例如编码抗原 85 复合体基因和任何其他  
5 其他的 M.tb 基因，也包括非 M.tb 基因的多种构建体，混合和共施用。另外，以下的 DNA 注射维持了蛋白表达 [H. Lin 等，循环 82, 2217 (1990); R. N. Kitsis 等，美国国家科学院院报 88, 4138(1991); Hansen 等，FEBS Lett, 290, 73 (1991); S. Jiao 等，人类基因治疗 3, 21 (1992); J.A.Wolff 等，人类分子遗传学 1, 363 (1992)], B-和 T-细胞记忆的持久性被增强 [D. Gray 和 P.  
10 Mat Zinger, 实验医学杂志, 174, 969 (1991); S. Oehen 等，同上 176, 1273 (1992)], 因而产生长期存活的体液和细胞介导的免疫性。

导入到疫苗受体的能表达的 DNA 或转录的 RNA 数量具有非常宽的剂量范围，依赖于所用的转录和翻译的启动子的强度。此外，免疫应答的强度可能依赖于蛋白表达的水平 and 表达的基因产物的免疫原性。一般  
15 来说，大约 1ng ~ 5mg, 100ng ~ 2.5mg, 1 $\mu$ g ~ 750 $\mu$ g 为有效剂量范围，优选直接用于肌肉组织的 DNA 约为 10 $\mu$ g ~ 300 $\mu$ g。皮下注射、真皮导入、透皮印模 (impression) 和其它给药方式如腹膜内、静脉内或吸入输送也是合适的。也可考虑提供加强接种。在用 M.tb 多核苷酸免疫原接种后，也可考虑用 M.tb 蛋白免疫原比如抗原 85 复合体基因产物予以加强。肠道  
20 外施用如白介素 - 12 蛋白 (或其他细胞因子，例如 GM-CSF) 静脉内、肌肉内、皮下或其他方式的给药，同时或接着本发明的 PNV 的肠道外导入是有利的。

多核苷酸可以是裸露的，那就是说，与影响受体免疫系统的任何蛋白、佐剂或其他因素无关。在这种情况下，多核苷酸必须在生理学可接受  
25 的溶液中，例如但不局限于无菌的盐水或无菌的缓冲盐水中。替代方法是 DNA 可和脂质体作相连，如本领域熟知的卵磷脂脂质体或其他脂质体 DNA - 脂质体混合物，或者 DNA 可和本领域熟知的佐剂相连，如蛋白或其他载体以促进免疫应答。也可用帮助 DNA 细胞吸收的试剂，例如但并不局限于钙离子。这些试剂在此一般称作转染促进试剂和药学上可  
30 接受的载体。包被多核苷酸微粒的包被技术在本领域中已经熟知，和本发明相衔接也是有用的。对计划用于人的 DNA，最终的 DNA 产物在药学可接受的载体或缓冲溶液中可能是有用的。药学可接受的载体或缓冲

溶液在本领域中众所周知，包括各种手册如雷明顿氏药学科学所描述的那些种类。

5 在另一实施方案中，本发明是一种多核苷酸，它包含能表达的连续核苷酸序列，在所述的多核苷酸体内导入真核组织时产生基因产物。编码的基因产物优选地起免疫刺激物或抗原的作用，能引起免疫应答。因此，在本实施方案中核苷酸序列编码一种 M.tb 免疫原的表位和选择性地编码一种细胞因子或一种 T - 细胞共刺激元件如 B7 蛋白家族的一个成员。

10 用基因而不是其基因产物的免疫有几个优点。首先是相对的简单性，通过它天然的或接近天然的抗原呈递给免疫系统。哺乳动物蛋白在细菌、酵母或甚至哺乳动物细胞中重组表达常需要广泛的处理，以保证合适的抗原性。DNA 免疫的第二个优点是有可能免疫原进入 MHC I 类通路而引起细胞毒性 T 细胞应答。用编码流感 A 核蛋白 ( NP ) 的 DNA 免疫小鼠产生 CD8<sup>+</sup> 对 NP 的应答，保护小鼠对抗异源性流感株的攻击  
15 ( Montgomery D. L. 等，同前； Ulmer. J. 等，同前)。

有充足的证据表明细胞介导的免疫在控制 M.tb 感染中是重要的 [ Orme 等，1993，传染病杂志 167，1481；Cooper 等 1993，实验医学杂志 178，2243；Flynn 等，1993，实验医学杂志 178，2249；Orme 等，1993，免疫学杂志 151，518 ]。由于 DNA 免疫能引起体液和细胞介导的免疫应答，  
20 其最大的优点是提供一种相对简单的方法，为潜在的疫苗检查大量的 M.tb 基因。

正如以上讨论，DNA 注射免疫亦允许多组分亚单位疫苗的快速组合。和多种流感基因同时免疫已于最近报道 ( Donnelly J. 等，1994，疫苗，pp55-59 )。包含其产物活化免疫系统不同武器的基因的一个 M.tb  
25 疫苗也可提供对后续攻击的完全保护。

本发明的疫苗对人类及家养或农业动物给药用是有用的。本发明的疫苗可用于预防和/或对抗任何农业动物的感染，包括但不限于奶牛，奶牛对分支杆菌感染敏感。给动物和人服用这些疫苗的技术分别对于兽医和人类健康领域的技术人员众所周知。

30 提供如下的实施例说明本发明，但不限于在此相同的例子。

### 实施例 1

#### 生产疫苗的载体

### A) V1 表达载体

表达载体 V1 构建自 pCMVIE - AKI - DHFR [Y. Whang 等, 病毒学杂志 61, 1796 (1987)]. 用 EcoRI 切割载体和自连接移去 AKI 和 DHFR 基因。该载体在 CMV 启动子中不含内含子 A, 所以加一段缺乏内部 SacI 5 位点的 PCR 片段[在 B. S. Chapman 等, 核苷酸研究 19, 3979 (1991)定位在 1855]。用于 PCR 反应的模板是 pCMVintA-Lux, 来自 pCMV6a120 [见 B. S. Chapman 等, 同上, ]包括 hCMV-IE1 增强子/启动子和内含子 A 的 Hind III 和 Nhe I 片段连接到 pBL3 的 Hind III 和 Xba I 位点中产生 pCMVIntBL 制成。来自 RSV-Lux [ J. R. de Wet 等, 分子细胞生物学, 7, 725, 1987] 10 的 1881 碱基对的虫荧光素酶基因片段 ( Hind III-Sma I Klenow 补平) 克隆到 pCMVIntBL 的 Sal I 位点, 它是 Klenow 补平和磷酸酶处理过的。

跨越内含子 A 的引物是:

5'引物, SEQ. ID: 1:

5'-CTATATAAGCAGAG CTCGTTTAG -3'; 3'引物, SEQ. ID: 2:

15 5'-GTAGCAAAGATCTAAGGACGGTGA CTGCAG-3'

用于移去 SacI 位点的引物是:

有义引物, SEQ. ID: 3:

5'-GTATGTGTCTGAAAATGAGCGIGGAGATTGGGCTCGCAC-3'

和反义引物, SEQ. ID: 4:

20 5'-GTGCGAGCCCAATCTCCACGCTCATTTCAGACACA TAC-3'

用 SacI 和 BglIII 切下 PCR 片段, 插入到用相同的酶切过的载体中。

### B) V1J 表达载体

创制 V1J 的目的是从载体 V1 移去启动子和转录终止元件以便在更精确的前后关系中确定它们, 创造一种更紧密的载体和改善质粒纯化产 25 率。

V1J 衍生自 V1 和商业化的质粒 pUC18。V1 用 Ssp I 和 EcoRI 限制酶消化产生二个 DNA 片段。这些片段的较小一个, 含能控制异源基因表达的 CMVintA 启动子和牛生长激素 ( BGH ) 转录终止元件, 从琼脂糖电泳凝胶纯化。然后该 DNA 片段的末端用 T4 DNA 聚合酶“钝化”, 以 30 便于另一个“钝端” DNA 片段的连接。

被选的 pUC18 提供表达载体的“骨架”。众所周知它能产生高的质粒产率, 序列和功能被特征描述以及体积小。用 Hae II 限制酶部分消化

从该载体中移去整个 lac 操纵子。质粒的剩余部分从琼脂糖电泳凝胶纯化，钝端处理用 T4 DNA 聚合酶和小中肠碱性磷酸酶，连接到上述的 CMVintA/BGH 元件上。获得的质粒显示在 pUC 骨架中二个可能的启动子元件方向的一种。这些质粒的一个在大肠杆菌中产生更高产量的 DNA，命名为 V1J。载体的结构通过连接区的序列分析证实，与 V1 比较，进一步表明产生相仿的或更高的异源基因表达。

### C) V1Jneo 表达载体

必须移去锚定在 V1J 上用于细菌抗生素筛选的 amp<sup>r</sup> 基因，因为氨苄霉素在大规模发酵中是不需要的。V1J 的 pUC 骨架上的 amp<sup>r</sup> 基因用 SspI 和 Eam1105 I 限制酶消化移去。质粒的其余部分用琼脂糖凝胶电泳纯化，用 T4 DNA 聚合酶纯化，然后用小牛肠碱性磷酸酶处理。商品化的 Kan<sup>r</sup> 基因，衍生自转座子 903，含在 pUC4K 质粒中，用 Pst I 限制酶切下，琼脂糖凝胶电泳纯化、用 T4 DNA 聚合酶使末端钝化。该片段和 V1J 骨架连接，产生的两个方向具有 Kan<sup>r</sup> 基因的质粒，命名为 V1Jneo # 's 1 和 3。这些质粒的每一个用限制酶消化分析，连接区域的 DNA 序列测定证实，表明产生与 V1J 相似的质粒数量。对这些 V1Jneo 载体异源基因产物的表达也与 V1J 相当。选出的 V1Jneo #3，自此后称为 V1Jneo，含作为表达构建体与 V1J 中的 amp<sup>r</sup> 基因相同方向的 Kan<sup>r</sup> 基因。

### D) V1Jns 表达载体

一个 Sfi 位点加到 V1Jneo 上以便于整合研究。商业来源的 13 个碱基对 Sfi 接头（新英格兰生物实验室）加到载体的 BGH 序列中的 KpnI 位点上。V1Jneo 用 KpnI 线性化，凝胶纯化，T4 DNA 聚合酶钝化，连接到钝化的 SfiI 接头上。通过限制性作图挑选克隆分离体，通过接头的序列分析证实。新载体命名为 V1Jns。在 V1Jns（有 SfiI）中异源基因的表达相当于在 V1Jneo（有 KpnI）中相同基因的表达。

### E) V1Jns-tPA

为提供异源的前导肽序列分泌和/或膜蛋白，修饰 V1Jns 以包含人组织特异的纤维蛋白酶原活化子（tPA）前导肽。二个合成的互补寡聚体退火，然后连接进已被 Bgl II 消化的 V1Jn 中。有义和反义寡聚体是：5'-GATC ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GA-3' SEQ ID: 5; 和 5'-GAT CTC GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC ACA



CAG CAG CAG CAC ACA GCA GAG CCC TCT CTT CAT TGC ATC CAT  
GGT-3' SEQ. ID: 6。Ko zak 序列在有义寡聚体划有下划线。这些寡聚体有  
突出的碱基，与 BglII 酶切序列连接时兼容。连接后上游 BglII 位点被毁  
而下游 BglII 被保持作下一步的连接。二个连接位点及整个 tPA 前导序列  
5 通过 DNA 序列测定证实。另外，为了和统一优化的载体 V1Jns( = V1Jneo  
和 SfiI 位点)一致，用 T4 DNA 聚合酶钝化 KpnI 位点接着和 SfiI 连接器  
连结(目录号 1138，新英格兰生物实验室)，SfiI 限制点代替了 V1Jn-tPA  
的 BGH 终止子区中的 KpnI 位点。该修饰通过限制性消化和琼脂糖凝胶  
电泳证实。

10 F) pGEM-3-X-IRES-B7

(其中 X = 任何抗原基因) 作为提供编码免疫原基因和编码免疫刺  
激蛋白基因协调表达的双顺反子疫苗构建体的一个实例，鼠 B7 基因 PCR  
扩增自 B 淋巴瘤细胞系 CH1 (从 ATCC 获得)。B7 是提供在主要组织  
相容性复合物 I 和 II 的前后关系中的抗原必需的共激活 T 细胞的蛋白  
15 家属的一个成员。CH1 细胞是提供 B7 mRNA 良好来源，因为它们有组  
成性活化的表型，B7 主要由活化的抗原呈递细胞如 B 细胞和巨噬细胞表  
达。这些细胞进一步在体外用 cAMP 或 IL-4 刺激，制备 mRNA 用标准的  
硫氰酸胍操作。cDNA 合成的操作用该 mRNA 和 GeneAmp RNA PCR 试  
剂盒 (Perkin-Elmer Cetus) 及特异地针对 B7 定位在 B7 翻译开放阅读框  
20 的下游的引物寡聚体 (5'-GTA CCT CAT GAG CCA CAT AAT ACC ATG  
-3', SEQ. ID: 7)。B7 被 PCR 扩增，分别用下列有义和反义 PCR 寡聚体：  
5'-GGT ACA AGA TCT ACC ATG GCT TGC AAT TGT CAG TTG ATG C-  
3' SEQ. ID: 8; 和 5'-CCA CAT AGA TCT CCA TGG GAA CTA AAG GAA  
GAC GGT CTG TTC-3', SEQ. ID: 9。这些寡聚体供有在插入片段末端的  
25 BglII 限制酶位点，和含一个 NcoI 限制位点及紧密地位于 3'端 BglII 位点  
前的一个额外 NcoI 位点的 Ko zak 翻译起始序列。NcoI 消化产生的片段  
适于克隆进已用 NcoI 消化的 pGEM-3-IRES 中。得到的载体，pGEM-3-  
IRES-B7，含一个易于转移给 V1Jns-X 的 IRES-B7 盒，其中 X 代表一个  
编码抗原的基因。

30 G) pGEM-3-X-IRES-GM-CSF

(其中 X = 任何抗原基因) 该载体含的盒与上述 C 项载体的相似，  
除了用免疫刺激细胞因子 GM-CSF 基因而不是 B7 之外。GM-CSF 是巨噬

细胞分化和刺激的细胞因子，已表明它在体内引起强烈的抗肿瘤 T 细胞活性 [G. Dranoff 等，美国国家科学院院报，90, 3539 (1993)。

#### H) pGEM-3-X-IRES-IL-12

(其中 X = 任何抗原基因) 该载体含的盒与上述 C 项的载体相似，除了用免疫刺激细胞因子 IL-12 基因，而不是 B7 之外。已阐明 IL-12 在使免疫应答移向与体液应答相对的细胞的，T 细胞主导的通路中有影响性作用 [L. Alfonso 等，科学，263, 235, 1994]。

### 实施例 2

#### 载体 VIR 的制备

10 通过努力继续优化基本的接种载体，制备了 V1Jns 的衍生体，称作 VIR。构建该载体的目的是获得没有非必需 DNA 序列的最小体积的疫苗载体，它仍保留整个优化的异源基因表达特性和 V1J 及 V1Jns 赋予的高的质粒产率。据文献和实验确定：(1) 包括大肠杆菌复制起点的 pUC 骨架之中的区域能被移去，而不影响细菌的质粒产率；(2) 接着卡那霉素开放阅读框的 kan<sup>r</sup> 基因的 3' 区能移去，假如细菌的终止子插入其位的话；和 (3) 自 BGH 终止子的 3' 一半的 ~300bp 能移去而不影响其调节功能 (在 BGH 元件中接着的是原来的 Kpn I 限制酶位点)。

20 构建 VIR 用 PCR 从 V1Jns 分成三个 DNA 片段，分别代表 CMVintA 启动子/BGH 终止子，复制起点和卡那霉素抗性元件。对每一片段唯一的限制酶 (位点) 用 PCR 寡聚体加到每一片段末端：CMVintA/BGH 加入 SspI 和 XhoI；Kan<sup>r</sup> 基因加入 EcoRV 和 BamHI；及 ori<sup>r</sup> 加入 BclI 和 Sall。选择这些酶位点是因为用每一位点的后来丢失，它们使来自 PCR 的 DNA 片段的每一个直接连接：EcoRV 和 SspI 留下连接相容的钝端 DNAs，而 BamHI 和 BclI 留下互补突出端与 Sall 和 XhoI 一样。通过 PCR 获得这些  
25 片段后，每一片段用如上所示的合适的限制酶消化，然后在含全部三种 DNA 片段的单一反应混合液中连接在一起。设计 ori<sup>r</sup> 的 5' 端包括在该区通常所见的 T2rho 独立终止子序列，以能提供给卡那霉素抗性基因的终止信息。连接产物用限制酶消化 (> 8 个酶) 和连接接口的 DNA 序列测定证实。在 VIR 中 DNA 质粒产量和用病毒基因的异源性表达似乎与 V1Jns  
30 相似。所得的载体大小的净减小数为 1346 bp (V1Jns = 4.86kb; VIR = 3.52 kb)。

用于合成 VIR 的 PCR 寡聚物序列 (限制酶位点已划下线，在下列序

列的括号中识别)：

(1) 5'-GGT ACA AAT ATT GG CTA TTG GCC ATT GCA TAC G-3'  
[SspI], SEQ.ID:10;

(2) 5'-CCA CAT CTC GAG GAA CCG GGT CAA TTC TTC AGC  
5 ACC-3' [XhoI], SEQ.ID:11:

(为 CMVintA/BGH 片段)

(3) 5'-GGT ACA GAT ATC GGA AAG CCA CGT TGT GTC TCA AAA  
TC-3' [EcoRV], SEQ. ID:12:

10 (4) 5'-CCA CAT GGA TCC G TAA TGC TCT GCC AGT GTT ACA  
ACC-3' [BamHI], SEQ.ID:13:

(为卡那霉素抗性基因片段)

(5) 5'-GGT ACA TGA TCA CGT AGA AAA GAT CAA AGG ATC TTC  
15 TTG-3' [BclI], SEQ. ID:14;

(6) 5'-CCA CAT GTC GAC CC GTA AAA AGG CCG CGT TGC TGG-  
3' [SalI], SEQ.ID:15:

(为大肠杆菌复制起点)

20

### 实施例 3

#### 细胞培养和转染

为制备稳定表达 M.tb 抗原的转染细胞系，RD 细胞（人横纹肌肉瘤 ATCC CCL136）生长在 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 下，添加有 10% 热失活的胎牛血清，20mM HEPES，4mM L-谷氨酰胺，和青霉素及链霉素每一种为  
25 100µg/mL 的 Dulbecco's 修饰的 Eagle's 培养基（DMEM）中。细胞以 1.5 × 10<sup>6</sup> 细胞/100mm<sup>2</sup> 板接种，培养 18 小时。用 CellPfect 试剂盒（Pharmacia），细胞用每板 TB 构建体 10µg 和共转染的 Ca<sup>+</sup> 构建体 10µg 转染，DNA 加入细胞后甘油休克 5 小时（15 % 甘油在 PBS 中，pH7.2 2.5 分）。转染后 72 小时，用 2x-10mL 冷 PBS，pH7.2，加 5mL 冷 TEN  
30 缓冲液（40mM TRIS-Cl, pH7.5, 1mM EDTA，150mM NaCl）洗板，刮下，收获培养物。作蛋白表达分析，细胞沉淀在 50µL 的单一去垢剂裂解缓冲液（50mM Tris-Cl，pH8.0, 150mM NaCl, 0.029。NaN<sub>3</sub>, 1% Nonidet

P-40, 100mM PMSF, 2 $\mu$ g/ml 抑蛋白酶肽, 2 $\mu$ g/mL 亮抑蛋白酶肽和 1 $\mu$ g/mL Pepstatin A) 中裂解, 在冰上超声 (破裂 2~15 秒)。裂解物在 13,000  $\times$  g, 4  $^{\circ}$ C 下离心 10 分钟。蛋白浓度用布莱德福德 Bradford 法测定, 每道 20 $\mu$ g 细胞提取蛋白上样到 10 % TRIS-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶 (Novex) 上, 然后转移到 Immobilon P (Millipore) 膜上。免疫印迹用 1:20 稀释的小鼠单克隆抗体 TD 17-4 [Huygen 等, 1994, 感染免疫 62, 363] 反应过夜, 接着和 1:1000 稀释的羊抗小鼠 IgG Fc 过氧化酶 (Jackson) 反应 1.5 小时。印迹用 ECL 试剂盒 (Amersham) 显色。

#### 实施例 4

#### 10 克隆和 DNA 制备

1. V1Jns-tPA-85A (含成熟的 Ag85A 具 tPA 信号序列) 的构建用下列引物进行:

有义 85A.C1 引物 [SEQ. ID.NO: 16]

GG AAG ATC TTT TCC CGG CCG GGC TTG CCG

15 BglII

反义 85A 引物 [SEQ. ID.NO: 17]

GGAAGATCTTGCTCTGTTCGGAGCTAGGC

20 结核分支杆菌 Ag85A 扩增自质粒 p85A.tub, 它是一 800bp HindIII 片段与来自 Borremans 等, 1989 [感染免疫 57, 3123], 图 2 的 1600 bp Hind III-SphI 片段连接而制备的。得到的 2400 bp 插入片段亚克隆在 BlueScribe M13<sup>+</sup> 的 HindIII 和 SphI 位点中。在 BlueScribe M13<sup>+</sup> (VCS/Stratagene) 中的整个编码序列和侧翼区, 在下列条件下用所示的引物进行 PCR 扩增。每 100 $\mu$ l 反应液含 2.5 单位克隆的 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene), 200mM dNTP, 每一引物 0.5 $\mu$ g 和在补充有酶 (Stratagene) 的反应缓冲液中的 250ng 模板 DNA。Hybaid 热反应器按下列编程: 94  $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 接着 25 个循环 (94  $^{\circ}$ C 1 分钟, 55  $^{\circ}$ C 2 分钟和 72  $^{\circ}$ C 3 分钟), 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟结束。

30 扩增的 DNA 用 50 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K (Boehringer Mannheim) 37  $^{\circ}$ C 消化 30 分钟, 95  $^{\circ}$ C 加热 10 分钟接着苯酚 (氯仿-异戊醇) 抽提二次, 一倍体积的异丙醇沉淀, 70 % 乙醇洗二次, 干燥并溶解在 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O 中。3 $\mu$ g 扩增的 DNA 用 40 单位的 Bgl II (Boehringer Mannheim) 消化, 907 bp 的片段 (在 85A-C1 的情况下) 在 1 % 琼脂糖凝胶上分离, 按厂家的指

导书在“Prep a Gene” (BioRad) 上提取。

该片段 50ng 与 20ng Bgl II 消化和脱磷酸化的 V1Jns.tPA 载体，在含位于连接缓冲液中的 2.5 单位 T4 DNA 连接酶 (Amersham) 的 10 $\mu$ l 反应液中，14  $^{\circ}$ C 连接 16 小时，转化到感受态 DH5 大肠杆菌 (BRL) 中，在含卡那霉素 (50 $\mu$ g/ml) 的 LB 琼脂培养基上铺板。挑取转化体，其质粒 DNA 用 Bgl II (证实插入片段的的存在) 限制性酶切和 Pvu II 确定其方向。

2. V1Jns-85A [C2] (含成熟 Ag85A，不具信号序列) 的构建用下列引物进行:

有义 85AC2 [SEQ. ID.NO.: 18]

10 GGA AGA TCT ACC ATG GGC TTT TCC CGG CCG GGC TTG C

反义 85A [SEQ. ID.NO.: 17]

GGA AGA TCT TGC TGT TCG GAG CTA GGC.

除克隆是在 V1Jns 上之外，接着进行与上面 1 中相同的操作。

3. V1Jns-85A [C3] (含 Ag85A 具其自身的信号序列) 的构建用引物进行:

有义 85A C3 [SEQ. ID.NO.: 19]

GGA AGA TCT ACC ATG GCA CAG CTT GTT GAC AGG GTT

反义 85A [SEQ. ID.NO.: 17]

GGA AGA TCT TGC TGT TCG GAG CTA GGC.

20 除克隆是在 V1Jns 上之外，接着进行与上面 1 中相同的操作。

4. V1Jns-tPA-85B [C1] (含 Ag85B，具 tPA 信号序列) 的构建用下列引物进行:

有义 85B[C1] [SEQ. ID.NO.: 20]

GG AAG ATC TCC TTC TCC CGG CCG GGG CTG CCG GTC GAG

25 反义 85B [SEQ. ID.NO.: 21]

GGA AGA TCT AAC CTT CGG TTG ATC CCG TCA GCC.

除 PCR 的模板是 p85B.tub 外，接着进行与上面 1 中相同的操作。

5. V1Jns-tPA-85C [C1] (含 Ag85C，具 tPA 信号序列) 的构建用下列引物进行:

30 有义 85C[C1] [SEQ. ID.NO.: 22]

GG AAG ATC TCC TTC TCT AGG CCC GGT CTT CCA

反义 85C [SEQ. ID.NO.: 23]

GGA AGA TCT TGC CGA TGC TGG CTT GCT GGC TCA GGC.

除 PCR 的模板是 p85C.tub 外, 接着进行与上面 1 中相同的操作。

6. V1Jns-85B [C2] (含 Ag85B, 不具信号序列) 的构建用下列引物进行:

5 有义 85B[C2] [SEQ. ID.NO.: 24]

GGA AGA TCT ACC ATG GGC TTC TCC CGG CCG GGG CTG C

反义 85B [SEQ. ID.NO.: 21]

GGA AGA TCT AAC CTC GGT TGA TCC CGT CAG CC.

10 除 PCR 的模板是 p85B.tub 外, 和克隆是 V1Jns 上之外, 接着与上面 1 中相同的操作。

7. V1Jns-85C [C2] (含 Ag85C, 不含信号序列) 的构建用下列引物进行:

有义 85C [C2] [SEQ. ID.NO.: 25]

GGA AGA TCT ACC ATG GGC TTC TCT AGG CCC GGT CTT C

15 反义 85C [SEQ. ID.NO.: 23]

GGA AGA TCT TGC CGA TGC TGG CTT GCT GGC TCA GGC.

除 PCR 的模板是 p85C.tub 和克隆是在 V1Jns 中外, 接着进行与上面 1 中相同的操作。

20 限制性分析后, 所有构建体的跨载体连接部分做序列分析。大规模 DNA 制备基本按所述的方法 (Montgomery, D. L. 等, 上文)。

质粒构建体的特点通过载体 - 插入连接部分的限制性作图和序列分析得到 (见图 1 - 6)。结果与发表的 M.tb 序列数据一致, 表明对每个构建体来说启动子是完整的 (图 7)。也表明的是与 M.tb Ag85 无关的作为克隆的结果插入不同的附加氨基酸残基。

25 实施例 5

来自 V1Jns. tPA 质粒的 M.tb 蛋白表达

30 在使用前一天, 横纹肌肉瘤细胞 (ATCC CCL 136) 在添加 10% 热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、25mM HEPEs, 50U/ml 青霉素和 50µg/ml 链霉素的高葡萄糖 DMEM 中, 以每 9.5cm<sup>2</sup> 孔 1.2 × 10<sup>6</sup> 细胞的密度种在六孔组织培养板中。(全部来自 BRL-Gibco) 苯酚: 氯仿抽提氯化铯纯化的质粒 DNA, 用 pharmacia Cellphect 试剂用磷酸钙沉淀, 除 RD 细胞每个 9.5cm<sup>2</sup> 孔用 5 - 15µg 之外, 按试剂盒的指示使用。培养

物在加磷酸钙 - DNA 沉淀后甘油休克 6 小时, 重新换液后, 收获前将培养物培养二天。

5 转染培养物的裂解液制备在添加  $1\mu\text{M}$  亮抑蛋白酶肽,  $1\mu\text{M}$  胃蛋白酶抑制剂,  $300\text{nM}$  抑蛋白酶肽和  $10\mu\text{M}$  TLCK 的 1X RIPA (  $0.5\%$  SDS,  $1.0\%$  TRITON X-100,  $1\%$  脱氧胆酸钠,  $1\text{mM}$  EDTA,  $150\text{mM}$  NaCl,  $25\text{mM}$  TRIS-HCl pH7.4 ) 中, 短暂超声以降低粘性。裂解物通过电泳在  $10\%$  Tricine 胶 ( Novex ) 上分离, 然后转移到硝酸纤维素膜上。免疫印迹用 M.tb 单克隆抗体 17/4 和 32/15 处理[Huygen 等, 1994, 感染免疫 62, 363], 用 ECL 检测试剂盒 ( Amersham ) 显色。

10 M.tb 抗原 85 复合体基因的表达通过 RD 细胞的瞬时转染阐明。转染或模拟转染细胞的裂解液 SDS PAGE 分离, 免疫印迹法分析。图 8 显示 V1Jns.tPA-85A(C1)、V1Jns.tPA-85A(C2)、V1Jns.tPA-85A(C3) 和 V1Jns.tPA-85B(C1) 转染细胞表达一种表观分子量约为  $30 - 32\text{kDa}$  的免疫反应蛋白。

15

#### 实施例 6

用 PNV 免疫和抗原 85 蛋白在体内表达

5~6 周龄的雌性 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠腹膜 ( ip ) 内注射在盐水中的  $5\text{mg}$  盐酸氯胺酮 ( Aveco, Fort Dodge, IA ) 和  $0.5\text{mg}$  甲苯噻嗪 ( Mobley Corp., Shawnee, KS. ) 的混合液麻醉。后腿用  $70\%$  乙醇擦洗。  
20 动物用悬浮在盐水中的 DNA (  $2\text{mg/ml}$  )  $100\mu\text{l}$  注射三次; 每腿  $50\mu\text{l}$ 。免疫后 17 - 18 天, 收集血清样品, 作抗 - Ag85 抗体存在分析。图 9 显示来自注射 Ag85 DNA 小鼠 ( C1 ) 的血清有特异的免疫印迹反应, 而来自接受不含有基因插入 ( V1J ) 的对照 DNA 的小鼠没有特异免疫印迹反应。反应性检出是血清至少 1:160 稀释, 抗  $300\text{ng}$  纯化的抗原 85A ( 图  
25 96 )。这说明 Ag85DNA 注射导致体内 Ag85 表达, 这样在二种 BALB/c 和 C57BL/6 ( B6 ) 小鼠中抗体应答的产生是有效的。

#### 实施例 7

抗原 85 特异的 T 细胞应答

30 在对特异抗原重刺激如 Huygen 等, 1992 [感染免疫 60, 2880] 所述的应答中, 对来自接种小鼠的脾细胞作细胞因子分泌分析。脾细胞用来自牛分支杆菌 BCG 纯化抗原 85A 或相当于 C57BL/6 小鼠的一个熟知的 T 细胞表位 ( 氨基酸 241 ~ 260 ) 的  $20 -$  聚肽 ( p25 ) 的培养滤过 ( CF )

蛋白温育。小鼠用 V1Jns.tPA85A(C1) (100 $\mu$ g) 间隔三周免疫三次，最后一次注射 17 天后分析。细胞因子分析 IL-2、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和 IL-6 用生物分析法，IL-4 和 IL-10 用 ELISA 法。基本的 IL-2 和 IFN- $\gamma$  产生在两种用 V1Jns.tPA85A(C1) 接种的 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠中观察到 (图 10 - 13)。此外，C57BL/6 小鼠也与 H-2<sup>b</sup> 限制的 T 细胞表位有反应 (图 13)。在 V1Jns.tPA85A 接种小鼠中，IL-4、IL-6 和 IL-10 没有增加 (图 14 - 16)。这些结果提示辅助 T 细胞应答的 T<sub>h</sub>1 型由 DNA 疫苗产生。

### 实施例 8

#### 对分支杆菌攻击的保护作用

10 为测试 M.tb DNA 疫苗的效用，小鼠用活牛分支杆菌 BCG (0.5mg) 的静脉内注射攻击，在脾和肺中分析 BCG 增殖。作为对照，BCG 增殖在攻击的首次实验小鼠 (第一次感染) 和在 DNA 注射期间用 BCG 接种的攻击小鼠 (第二次感染) 中测定。与第一次感染小鼠或用对照 DNA V1J 接种的小鼠比较，在接种 V1Jns.tPA85A(C1) 小鼠的肺中，克隆形成单位  
15 (CFU) 的数目基本上降低。在 C57BL/6 小鼠中，攻击后第 8 天 CFU 降低了 83% (图 17)，在 BALB/c 小鼠中第 20 天 CFU 降低了 65% (图 18)。在脾中，在 BALB/c 小鼠中攻击后第 20 天 (图 19) 和在 C57BL/6 小鼠中第 8 天 (图 20) CFU 降低了约 40%。因此，M.tb DNA 疫苗注射后观察到的免疫应答在活 M. bovis 攻击模型中提供了保护。

20

25

30



## 序列表

### (1) 一般信息:

(i) 申请人: CONTENT, JEAN

HUYGEN, KRIS

5 LIU, MARGARET A.

MONTGOMERY, DONNA

ULMER, JEFFREY

(ii) 发明题目: 多核苷酸结核病疫苗

(iii) 序列数: 25

10 (iv) 通讯地址:

(A) 收信人: JACK L. TRIBBLE

(B) 街道: 126 E. LINCOLN AVE., P.O.BOX 2000

(C) 城市: RAHWAY

(D) 州: NEW JERSEY

15 (E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 07065 - 0907

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: Floppy disk

(B) 计算机: IBM PC 兼容

20 (C) 操作系统: PC-DOS / MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release # 1.0, Version # 1.25

(vi) 当前申请资料:

(A) 申请号: US 08/338,992

(B) 提交日期: 1994年11月14日

25 (C) 分类:

(viii) 委托人/代理人信息:

(A) 姓名: TRIBBLE JACK L.

(B) 登记号: 32,633

(C) 参考/备审件号: 19342

30 (ix) 电讯信息:

(A) 电话: (908) 594 - 5321

(B) 传真: (908) 594 - 4720

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1 :

CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAG

23

10

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2 :

GTAGCAAAGA TCTAAGGACG GTGACTGCAG

30

20

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3 :

GTATGTGTCT GAAAATGAGC GTGGAGATTG GGCTCGCAC

39

30

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

5 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4:

GTGCGAGCCC AATCTCCACG CTCATTTTCA GACACATAC

39

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

10 (i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

15 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5:

GATCACCATG GATGCAATGA AGAGAGGGCT CTGCTGTGTG CTGCTGCTGT GTGGAGCAGT 60

CTTCGTTTCG CCCAGCGA

78

20 (2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

25 (D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6:

GATCTCGCTG GGCGAAACGA AGACTGCTCC ACACAGCAGC AGCACACAGC AGAGCCCTCT 60

CTTCATTGCA TCCATGGT

78

30

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

5 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:7:

GTACCTCATG AGCCACATAA TACCATG

27

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

10 (i) 序列特征:

(A) 长度: 40 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

15 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:8:

GGTACAAGAT CTACCATGGC TTGCAATTGT CAGTTGATGC

40

(2) SEQ ID NO:9 的信息:

20 (i) 序列特征:

(A) 长度: 42 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

25 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:9:

CCACATAGAT CTCCATGGGA ACTAAAGGAA GACGGTCTGT TC

42

(2) SEQ ID NO:10 的信息:

30 (i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸



(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:10:

5

GGTACAAATA TTGGCTATTG GCCATTGCAT ACG

33

(2) SEQ ID NO:11 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 个碱基对

10

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:11:

15

CCACATCTCG AGGAACCGGG TCAATTCTTC AGCACC

36

(2) SEQ ID NO:12 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 38 个碱基对

20

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:12:

25

GGTACAGATA TCGGAAAGCC ACGTTGTGTC TCAAATC

38

(2) SEQ ID NO:13 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 37 个碱基对

30

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:13:

CCACATGGAT CCGTAATGCT CTGCCAGTGT TACAACC

37

5 (2) SEQ ID NO:14 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

10 (D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:14:

GGTACATGAT CACGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTG

39

15 (2) SEQ ID NO:15 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 34 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

20 (D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:15:

CCACATGTGCG ACCCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGG

35

25 (2) SEQ ID NO:16 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

30 (D) 拓扑学: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:16:

GGAAGATCTT TTCCCGGCCG GGCTTGCCG

29

(2) SEQ ID NO:17 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 28 个碱基对  
(B) 类型: 核酸  
(C) 链型: 单  
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

- 10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:

GGAAGATCTT GTCTGTTCCG AGCTAGGC

28

(2) SEQ ID NO:18 的信息:

(i) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 37 个碱基对  
(B) 类型: 核酸  
(C) 链型: 单  
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

- 20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

GGAAGATCTA CCATGGGCTT TTCCCGGCCG GGCTTGC

37

(2) SEQ ID NO:19 的信息:

(i) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 36 个碱基对  
(B) 类型: 核酸  
(C) 链型: 单  
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

- 30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:19:

GGAAGATCTA CCATGGCACA GCTTGTTGAC AGGGTT

36

(2) SEQ ID NO:20 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 38 个碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:20:

GGAAGATCTC CTTCTCCCGG CCGGGGCTGC CGGTCGAG

38

10

(2) SEQ ID NO:21 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

15 (C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:21:

GGAAGATCTA ACCTTCGGTT GATCCCGTCA GCC

33

20

(2) SEQ ID NO:22 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个碱基对

(B) 类型: 核酸

25 (C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:22:

GGAAGATCTC CTTCTCTAGG CCCGGTCTTC CA

32

30

(2) SEQ ID NO:23 的信息:

(i) 序列特征:



(A) 长度: 36 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

5 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:23:

GGAAGATCTT GCCGATGCTG GCTTGCTGGC TCAGGC

36

(2) SEQ ID NO:24 的信息:

10 (i) 序列特征:

(A) 长度: 37 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

15 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:24:

GGAAGATCTA CCATGGGCTT CTCCCGGCCG GGGCTGC

37

(2) SEQ ID NO:25 的信息:

20 (i) 序列特征:

(A) 长度: 37 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

25 (ii)分子类型: DNA (基因组的)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:25:

GGAAGATCTA CCATGGGCTT CTCTAGGCCC GGTCTTC

37

30

说明书附图

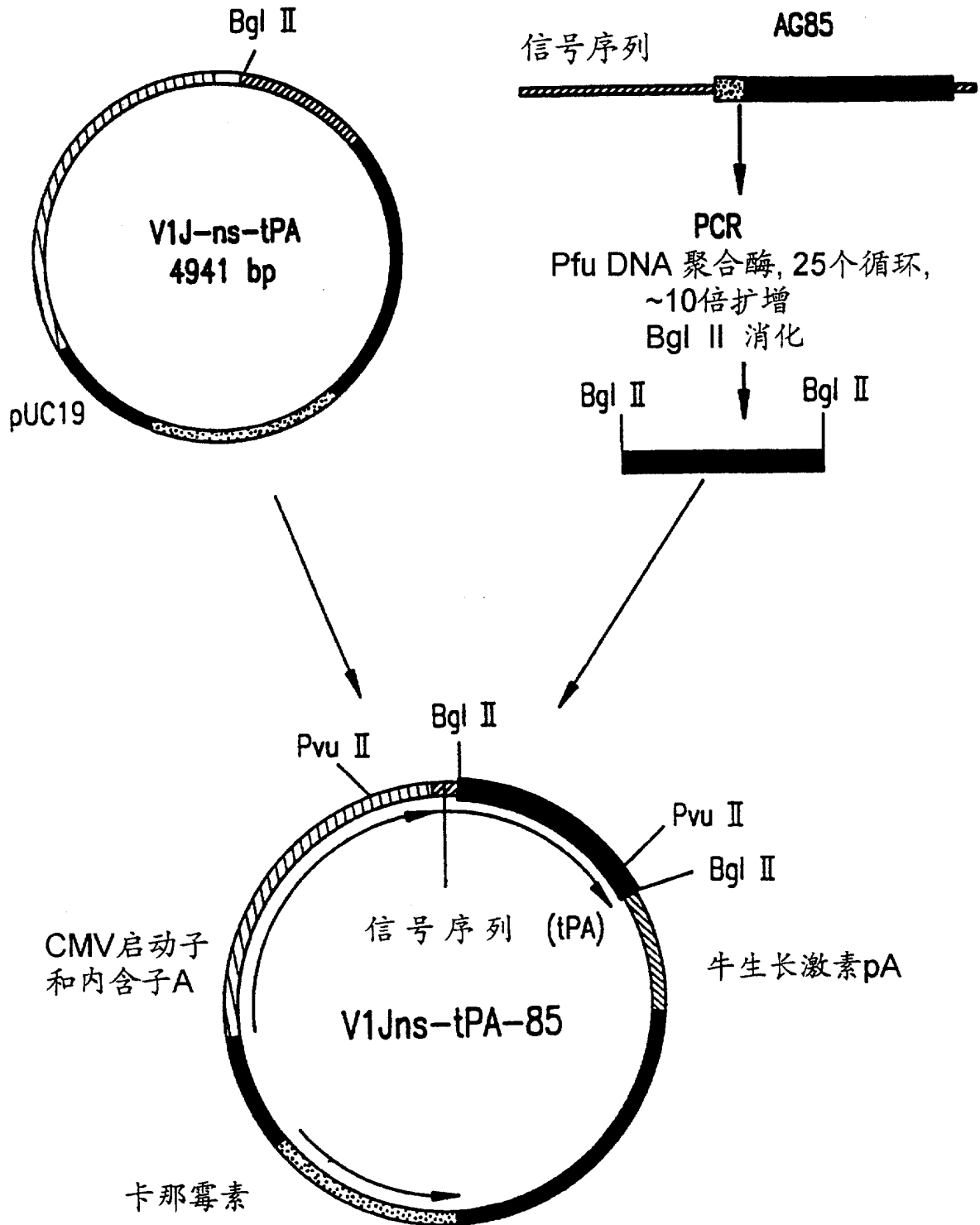


图 1

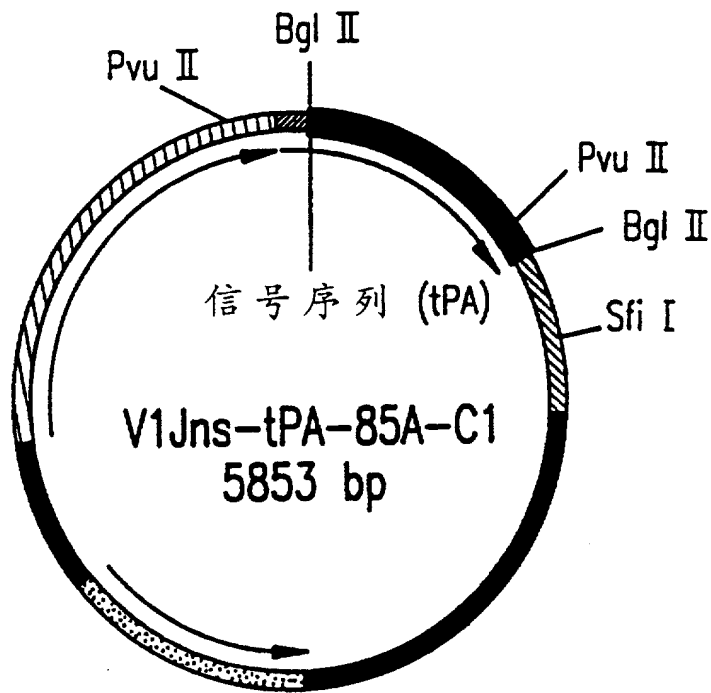


图 2

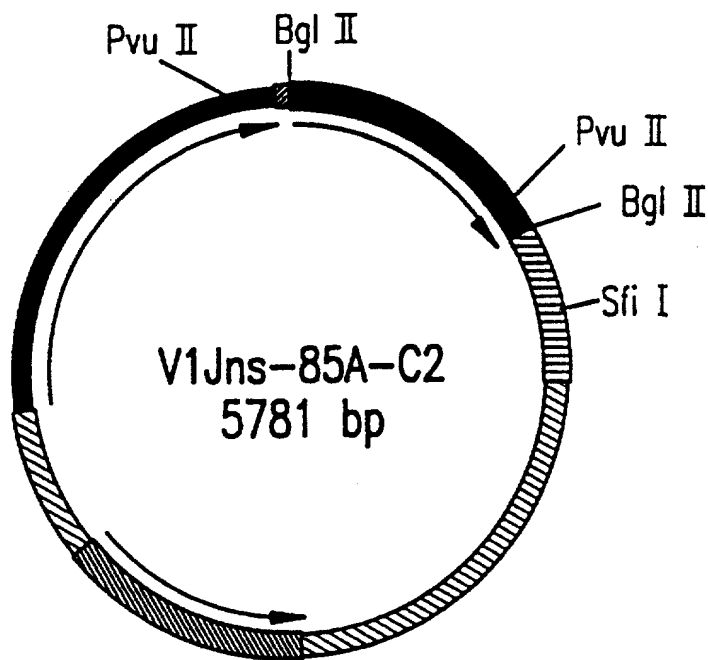


图 3

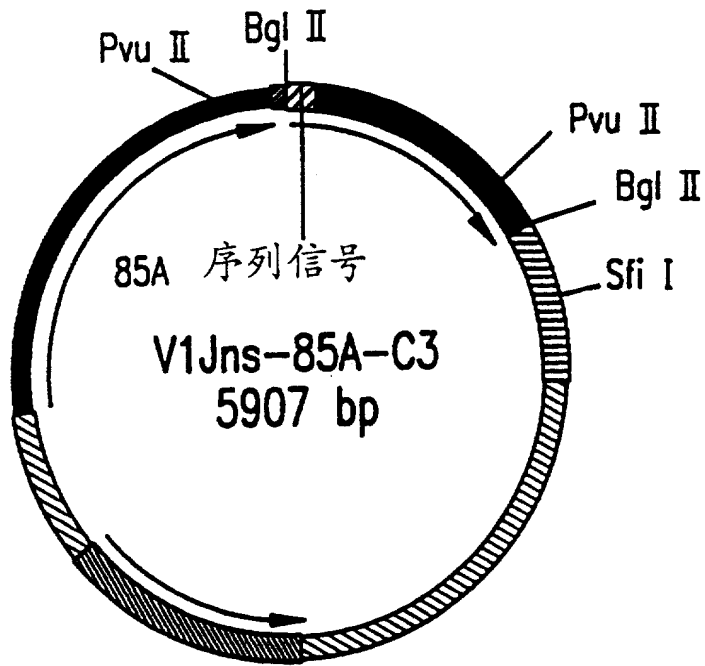


图 4

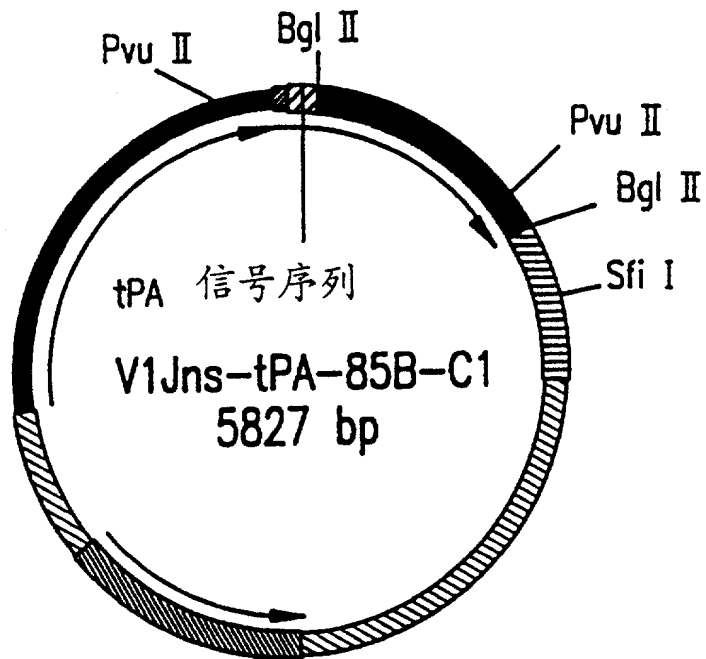


图 5

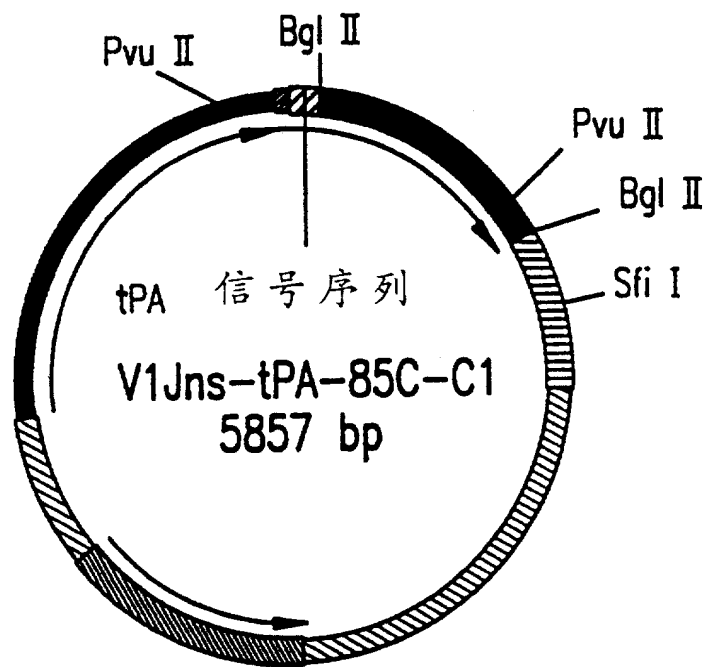


图 6

85A C1

GTCACCGTCCTTGAGATCACCATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG TGT  
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys

GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GAG ATC TTT TCC CGG CCG GGC TTG CCG GTG GAG TAC  
Gly Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Glu Ile Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr

tPA sig.seq. tPA NH2 ter AG 85 mature protein (NH2-ter)

85A C2

GTCACCGTCCTTGAGATCTACC ATG GGC TTT TCC CGG CCG GGC TTG CCG GTG GAG TAC  
Bgl II Met Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr

85A C3

CTGCAGTCACCGTCCTTGAGATCTACATG GCA CAG CTT GTT GAC AGG GTT CGT  
Met Ala Gln Leu Val Asp Arg Val Arg

GGC GCC GTC ACG GGT ATG TCG CGT CGA CTC GTG GTC GGG GCC GTC GGC GCG GCC CTA GTG  
Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val

TCG GGT CTG GTC GGC GGC GTC GGT GGC ACG GCG ACC GCG CCG GCA TTT TCC CGG CCG CGC  
Ser Gly Leu Val Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly

85B C1

CTGCAGTCACCGTCCTTGAGATCACCATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG  
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu

CTG TGT GGA CCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GAG ATC TCC TTC TCC CGG CCG  
Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Glu Ile Ser Phe Ser Arg Pro

85C C1

CTGCAGTCACCGTCCTTGAGATCACCATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG  
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu

CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GAG ATC TCC TTC TCT AGG CCC  
Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Glu Ile Ser Phe Ser Arg Pro

图 7

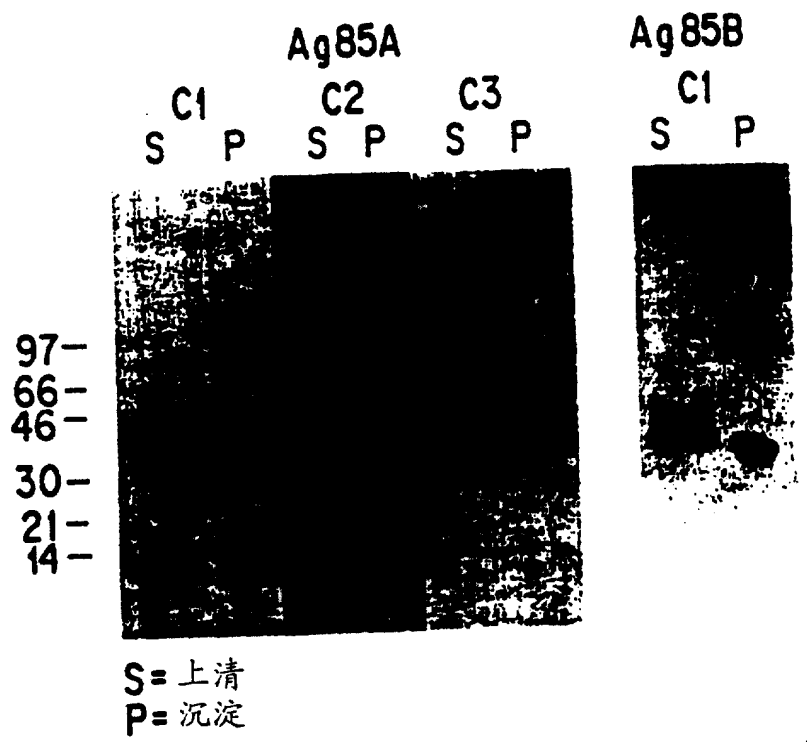


图 8

BALB/C

B6

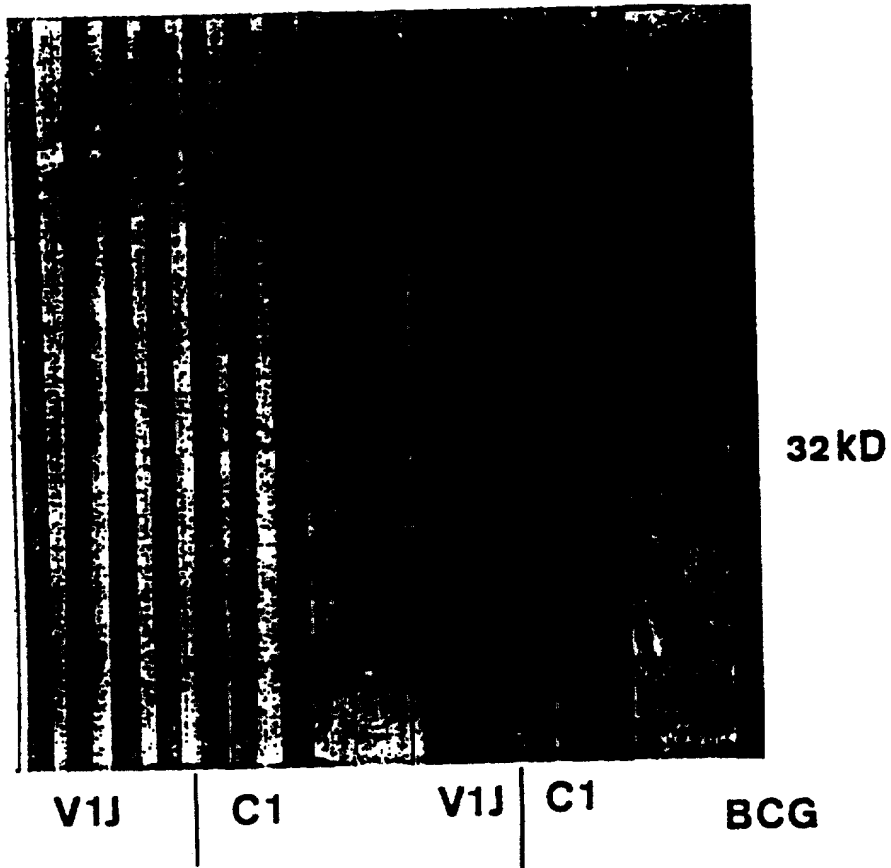
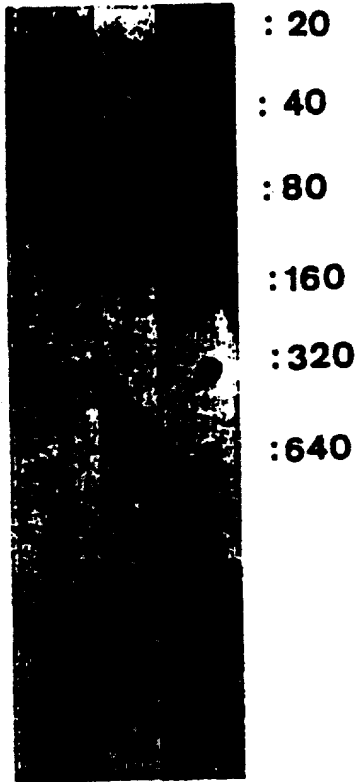


图 9A



V1J

C1



图

9B

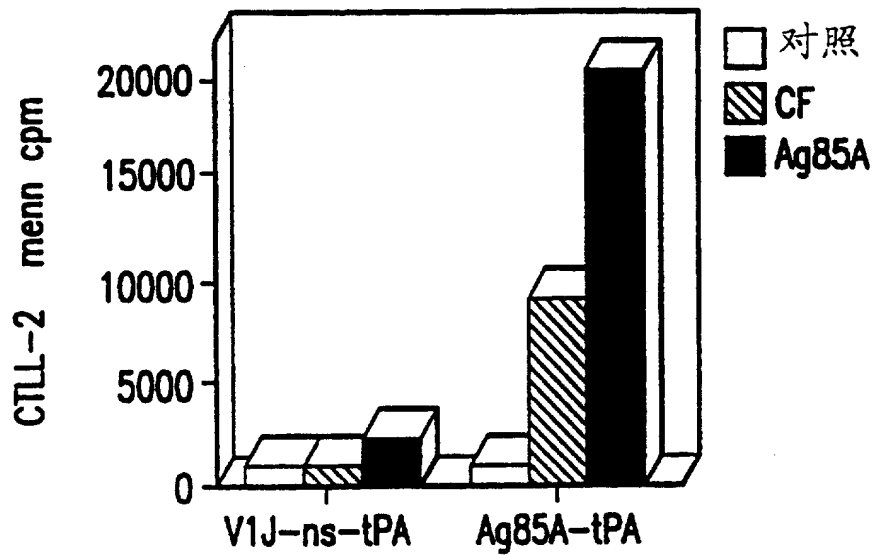


图 10

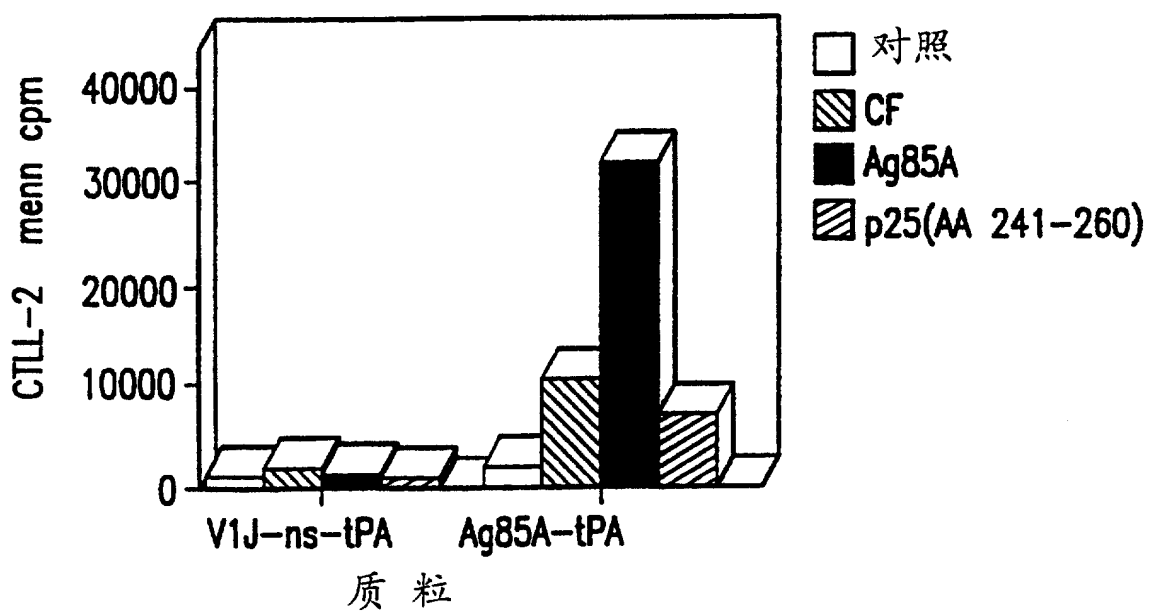


图 11

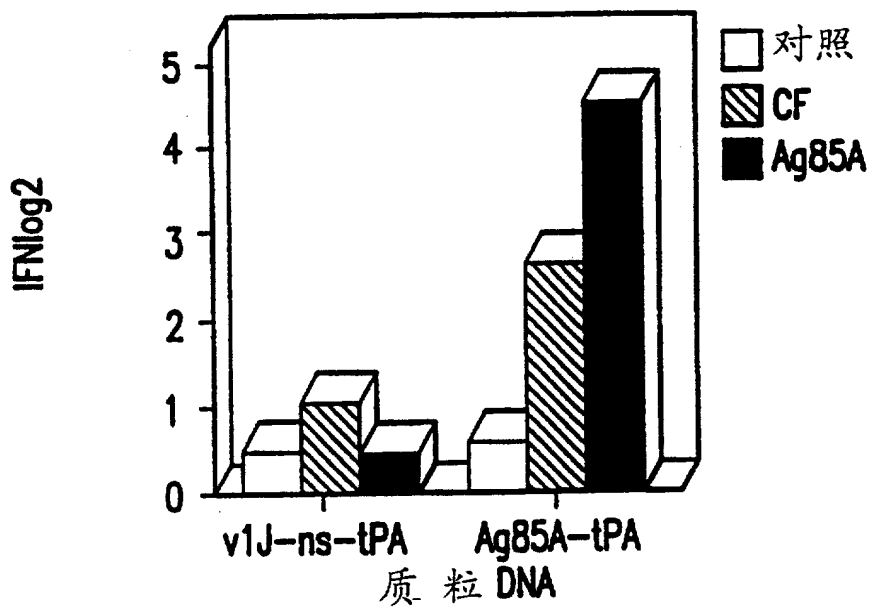


图 12

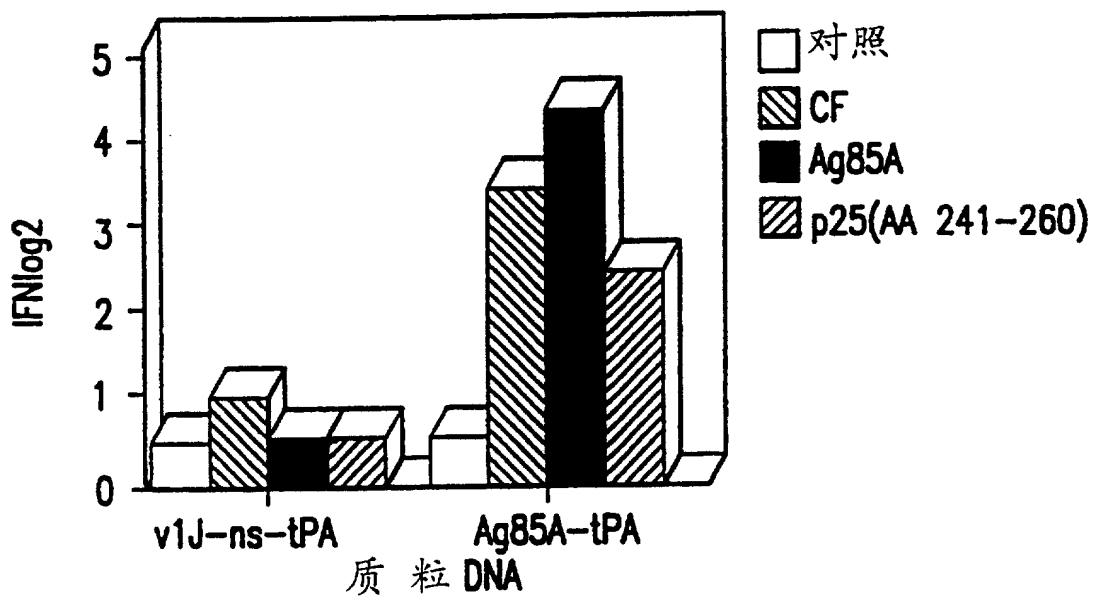


图 13

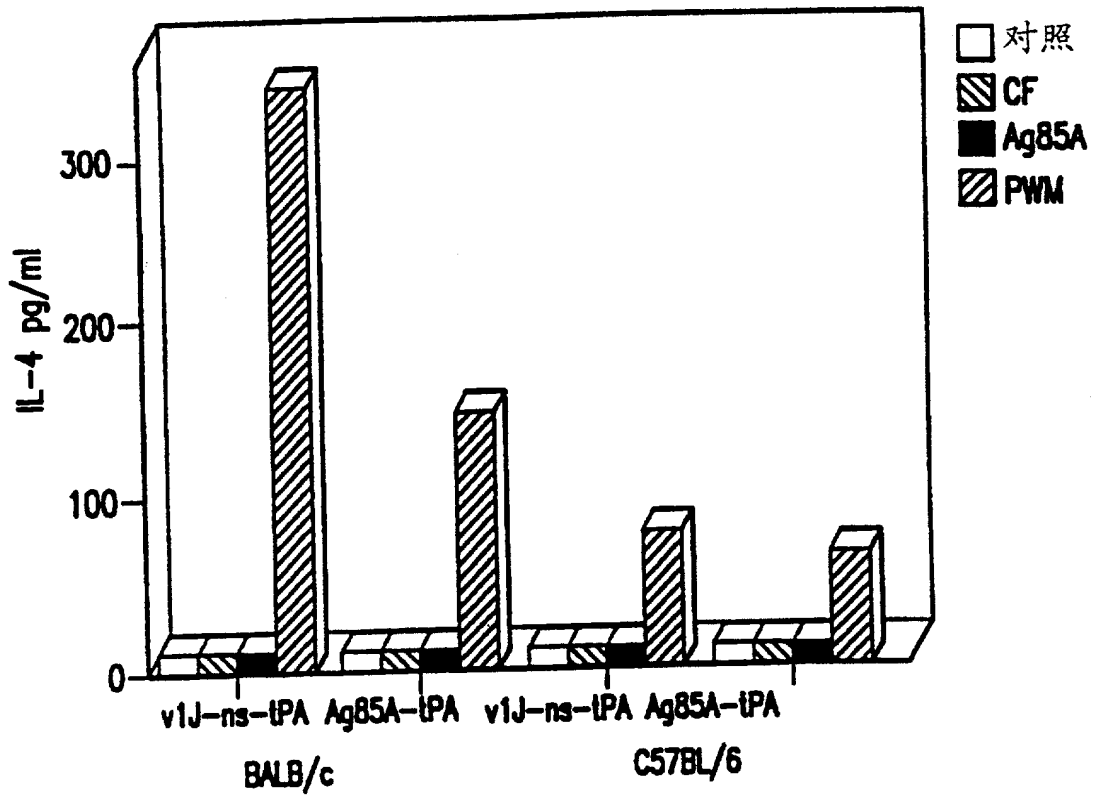


图 14

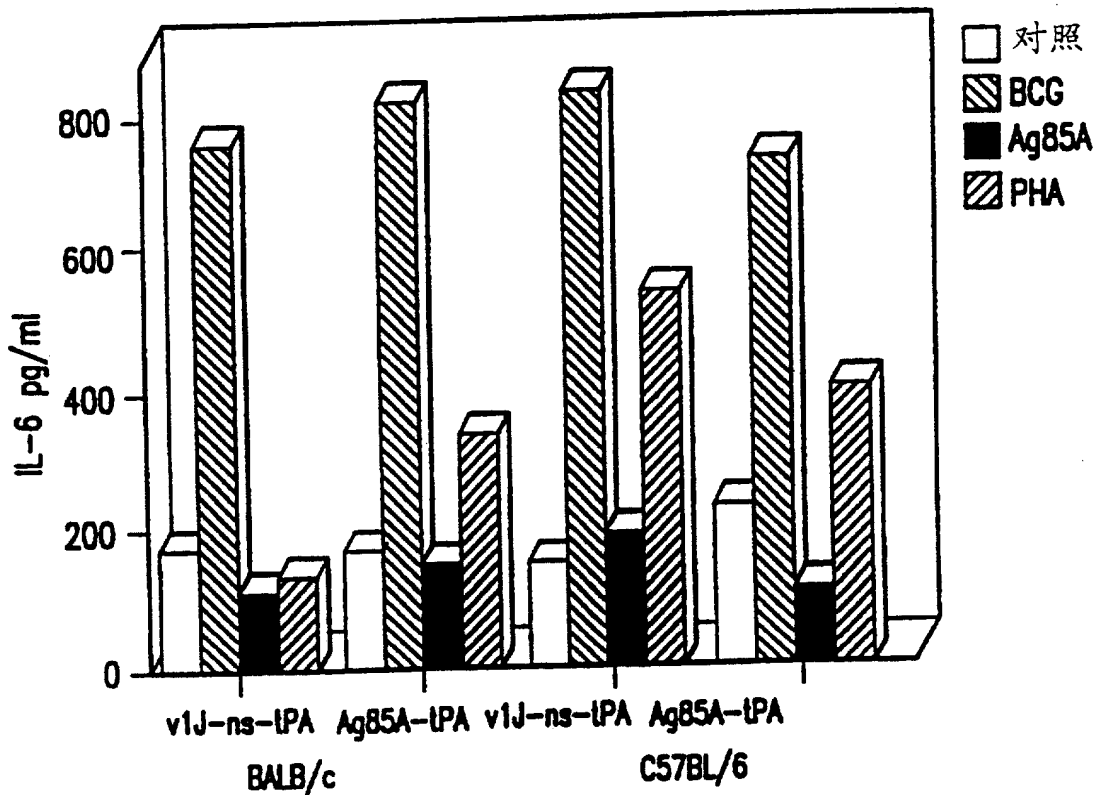


图 15

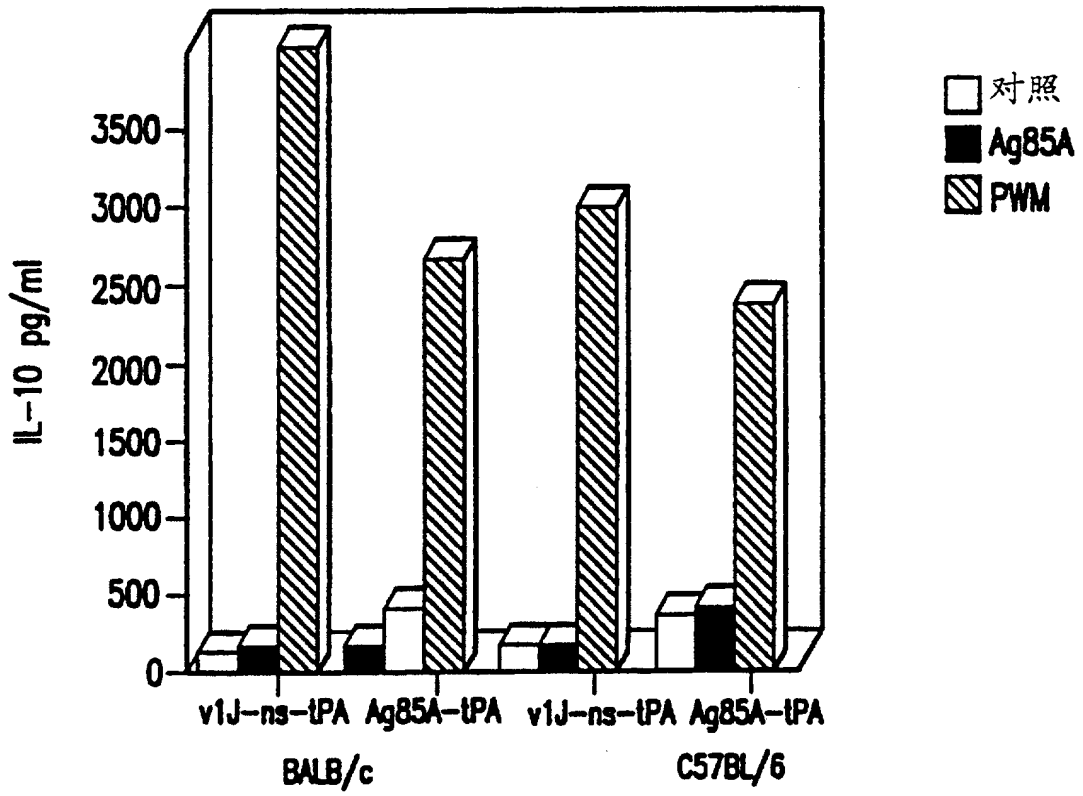


图 16

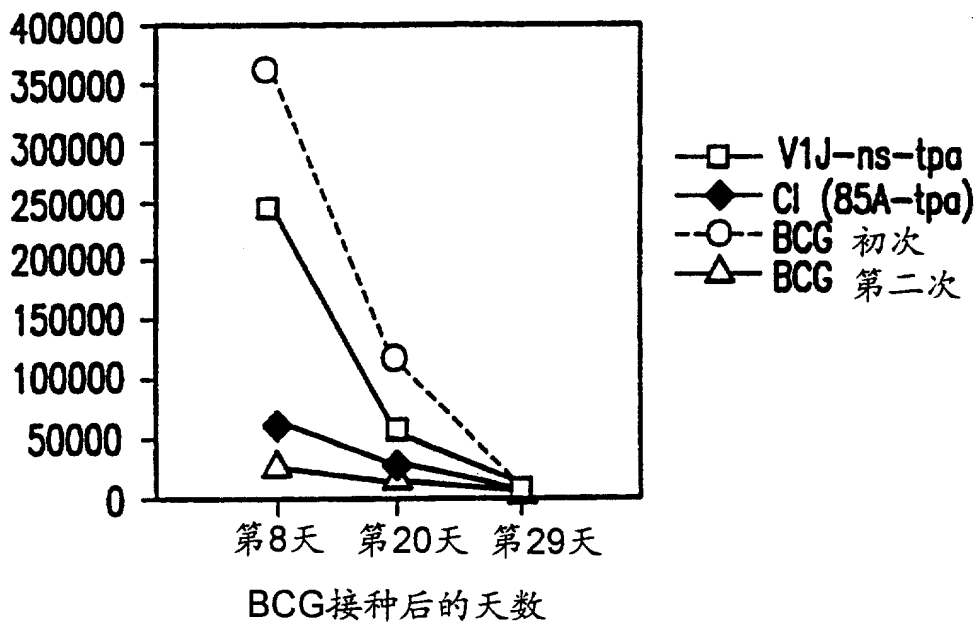


图 17

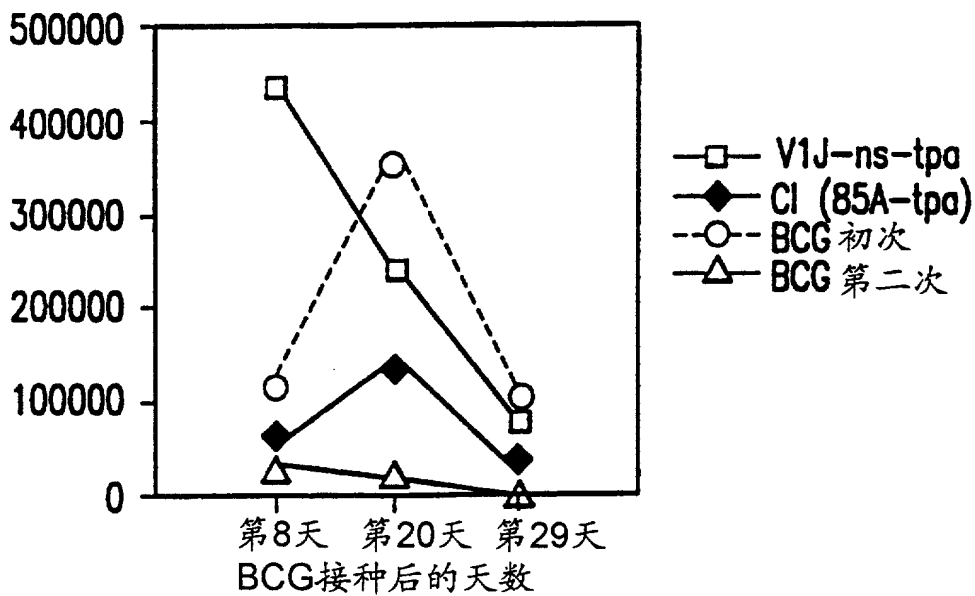


图 18  
13

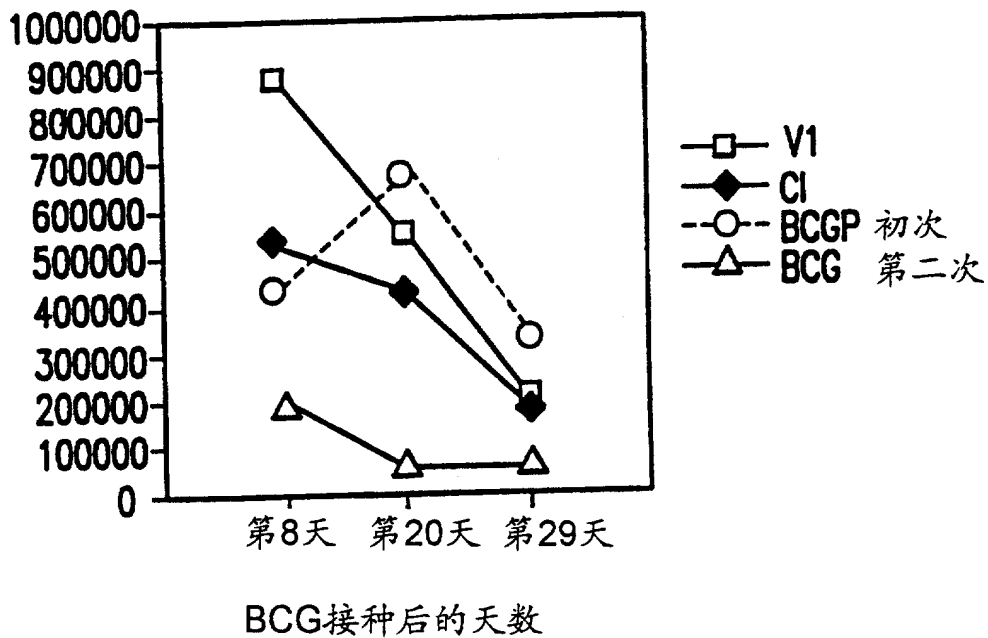


图 19

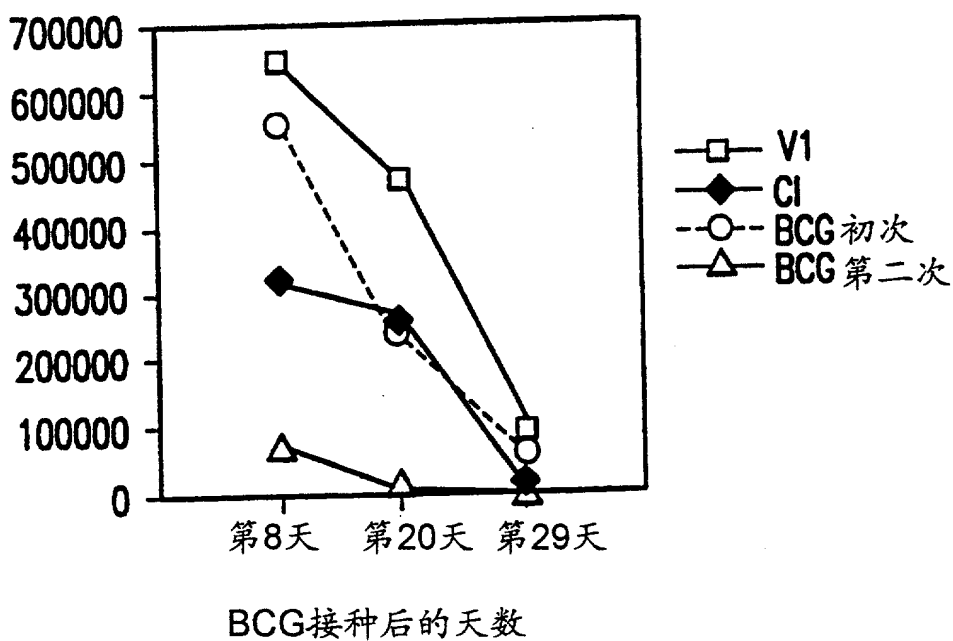


图 20