



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102203252 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 03

(21) 申请号 200980134149. 6

*C07K 14/255*(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 23

*A61K 39/39*(2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 郝佳

08305327. 2 2008. 06. 25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 02. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/057836 2009. 06. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/156405 EN 2009. 12. 30

(73) 专利权人 法国国家健康和医学研究所

地址 法国巴黎

专利权人 里尔巴斯德研究所

(72) 发明人 J-C · 西拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 梁谋 李炳爱

(51) Int. Cl.

*C12N 15/11*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书32页

序列表17页 附图14页

(54) 发明名称

基于鞭毛蛋白的新型免疫佐剂化合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及衍自来源于肠道沙门氏菌(*Salmonelle enterica*)的鞭毛蛋白、显示体内免疫佐剂活性的新型肽化合物。

1. 一种免疫佐剂化合物,其为SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的化合物。
2. 一种免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含权利要求1的免疫佐剂化合物以及一种或多种抗原。
3. 一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包含权利要求1的免疫佐剂化合物以及一种或多种抗原。
4. 权利要求2的免疫原性组合物或者权利要求3的疫苗组合物,其中所述免疫佐剂化合物不与所述一种或多种抗原共价连接。
5. 一种核酸,所述核酸编码权利要求1的免疫佐剂化合物。
6. 一种重组载体,所述载体中包含插入其中的权利要求5的核酸。
7. 一种宿主细胞,所述细胞转染或转化有权利要求5的核酸或者转染或转化有权利要求6的重组载体。

## 基于鞭毛蛋白的新型免疫佐剂化合物及其用途

### 发明领域

[0001] 本发明涉及在个人或动物中诱导和/或刺激免疫应答。

[0002] 具体地讲,本发明涉及可用于免疫原性组合物和疫苗组合物的新型免疫佐剂化合物。

[0003] 发明背景

[0004] 安全且有效的疫苗的开发仍是全球公共卫生的一个主要目标。

[0005] 具体地讲,已出现被称为“粘膜疫苗”的疫苗,作为可注射疫苗的吸引人的潜在替代品。

[0006] 粘膜给药具有许多潜在地合乎需要的特征。开发粘膜疫苗递送技术的最迫切的理由也许是,通过许多侵入性病原体的粘膜进入部位产生局部免疫来形成免疫防御的第一道防线。

[0007] 此外,一些研究者已报道存在着普通粘膜免疫系统,凭借该系统,在一个部位诱导的粘膜免疫能导致在远端粘膜部位的免疫(McGhee, J.R.等人.The mucosal immune system:from fundamental concepts to vaccine development(粘膜免疫系统:从基础概念到疫苗开发).Vaccine1992,10:75-88)。

[0008] 另外,通过粘膜部位递送抗原具有还能产生全身免疫应答的潜力。

[0009] 这表明,通过以非侵入性方式(例如鼻内途径或其他粘膜途径)递送疫苗,以引发针对可能在不同粘膜部位进入的各种各样的病原体的免疫,可获得极大的益处。

[0010] 现今的疫苗(粘膜疫苗或其他疫苗)大部分是由以下两个主要组分组成的:(i)具有治疗意义的靶标抗原和(ii)能刺激和/或诱导针对所述抗原的免疫原性的免疫佐剂化合物。

[0011] 已知的各种免疫佐剂在性质上相差甚大,但具体地讲包含矿物油、细菌提取物、活的和减毒的生物体以及氢氧化铝金属的悬浮液。

[0012] 即使佐剂能提供增强的免疫应答,但它们的使用也会引起不良副作用,这主要取决于它们的给予途径。因此,得到批准且在人类中有效的佐剂的数目仍相对有限。

[0013] 先天性免疫领域的进展已使人们更好地了解支配着宿主免疫应答的调节的细胞机制和分子机制。

[0014] 这一对免疫系统的更好的认识,已让人们能研究和开发新的潜在有用的免疫佐剂。

[0015] 具体地讲,toll样受体(TLR)有助于哺乳动物体内的先天性免疫和适应性免疫的协同诱导。由于TLR是由多种多样的细胞类型表达的,因此它们能够在全身引发免疫。

[0016] 发生病原微生物感染后,TLR可识别被称为微生物相关分子模式(MAMP)的保守模体。TLR的结合可诱导专事于对病原微生物的先天性清除和获得性免疫的基因表达程序。例如,TLR可诱导趋化因子的产生,趋化因子进而特异性吸引直接参与先天性微生物清除的多形核嗜中性粒细胞(PMN)。此外,TLR能促进多效性免疫介质(如TNF $\alpha$ )的分泌和专事于将抗原呈递到淋巴细胞的树突细胞(DC)的功能性成熟。

[0017] 因此,TLR激动剂不仅能刺激“广泛特异性的”促炎免疫应答,而且能增强对限定的抗原的适应性免疫应答,因此被认为是免疫佐剂。

[0018] 尽管这些潜在有利的作用,但由于MAMP有全身毒性,这促使了人们努力开发能使MAMP活性偏向于佐剂作用的衍生物。的确,将分子工程改造成具有独特的性质,这是操纵免疫应答中的一个重大挑战。

[0019] 细菌鞭毛蛋白(许多细菌病原体中的主要鞭毛成分)是用于TLR5活化的特异性、独特激动剂。

[0020] 来自鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, (S.Typhimurium))的FliC鞭毛蛋白是有关鞭毛结构-功能、免疫性和TLR5信号转导的研究的典范。

[0021] 它是具有两个独特结构域的含494个氨基酸的蛋白质。氨基和羧基末端“保守”区域形成对于TLR5活化必不可少的结构域。

[0022] 鞭毛蛋白FliC的中间结构域包含对于TLR5信号转导非必须的氨基酸。它被称为“超可变”区,因为一级序列在组成和大小上随细菌种类的不同而大大不同。与此相对,已知超可变区为鞭毛蛋白抗原性所必需。

[0023] 已证实静脉内(i.v.)注射鞭毛蛋白能促进全身应答,全身应答由促炎介质(如TNF $\alpha$ 或IL-6)的产生和DC活化来表征。

[0024] 此外,鞭毛蛋白还能引发粘膜特异性的先天性和适应性防御机制。例如,上皮细胞系和肺粘膜能上调趋化因子样CXCL8(IL-8)和CCL20的产生,CXCL8(IL-8)和CCL20进而分别募集粘膜PMN和DC。

[0025] 不同的作者还报道了鞭毛蛋白是强效的全身和粘膜免疫佐剂,其能引起(i)血清和/或分泌性抗体应答和(ii)对鞭毛蛋白本身和共给予的抗原的Th1和Th2细胞应答。

[0026] 由于鞭毛蛋白的强效的全身和粘膜免疫佐剂活性,它们对于疫苗尤其是粘膜疫苗类型的开发来说可特别值得关注。

[0027] 但是,大多数的所述鞭毛蛋白型佐剂不完全适合于这种疫苗应用,特别是适合于所述粘膜疫苗策略。

[0028] 的确,已知的鞭毛蛋白佐剂呈现重大的副作用,具体而言是当体内给予时,呈现固有的抗原活性和全身促炎性质。

[0029] 此外,大多数的已知的鞭毛蛋白型免疫佐剂需要与靶标抗原物理连接,以便当体内给予时能引起强效的免疫应答。这个要求迫使需要额外的复杂操作以便获得合适的鞭毛蛋白抗原连接和最终的有用的免疫原性物质。

[0030] 因此,需要这样的新的化合物,它们可用作免疫佐剂,特别是用于诱导和/或增强对抗原的粘膜免疫应答,引人注目的是又不会引起任何重大的全身炎症副作用。

[0031] 有利地,这些新的化合物还应能够简单地与靶标抗原混合就能引发免疫应答。

[0032] 本发明于是提出能满足这个需要且尤其可用于生产免疫原性组合物和疫苗(特别是粘膜型疫苗)的新的免疫佐剂化合物。

[0033] 发明概述

[0034] 根据本发明,已发现了衍自来源于SEQ ID N° 1类型的鼠伤寒沙门氏菌的鞭毛蛋白的新型肽化合物呈现出体内免疫佐剂活性,这在本文的实施例中进行说明。

[0035] 根据本发明,还证实这些新型佐剂化合物尤其呈现出粘膜佐剂性质,而又不会造成显著的全身促炎作用。

[0036] 本发明的所述新的源自鞭毛蛋白的化合物因此尤其可用作免疫佐剂物质,有利地用以诱导和/或增强粘膜免疫应答。

[0037] 本发明因此涉及这样的免疫佐剂化合物,其包含:

[0038] a)与起始于位于SEQ ID N° 1的位置1的氨基酸残基、终止于选自位于SEQ ID N° 1的位置99至173的氨基酸残基中的任何一个的氨基酸残基的氨基酸序列具有至少90%氨基酸同一性的N末端肽;和

[0039] b)与起始于选自位于SEQ ID N° 1的位置401至406的氨基酸残基中的任何一个的氨基酸残基、终止于SEQ ID N° 1的位置494的氨基酸残基的氨基酸序列具有至少90%氨基酸同一性的C末端肽,

[0040] 其中:

[0041] -所述N末端肽和C末端肽直接互相连接,或者

[0042] -所述N末端肽和C末端肽通过间隔链间接互相连接。

[0043] 本发明的免疫佐剂化合物的优选实施方案在下文的描述中进行详细说明。

[0044] 本发明还涉及包含上文中(或者下文的描述中)所定义的免疫佐剂化合物以及一种或多种药物可接受的赋形剂的药物组合物。

[0045] 根据本发明的药物组合物包含上文中所定义的免疫佐剂化合物以及一种或多种抗原。

[0046] 所述药物组合物因此有利地为免疫原性组合物(即旨在引起针对抗原的免疫应答以(例如)产生抗体的组合物)或者疫苗组合物(即旨在受试者或动物中引起免疫应答以治疗或预防疾病的组合物)。

[0047] 根据本发明的一个优选实施方案,所述免疫原性组合物或所述疫苗有利地包含不与所述一种或多种抗原共价连接的本发明所述免疫佐剂化合物。

[0048] 本发明还涉及供用作药物的上文中所定义的免疫佐剂化合物(特别是用以诱导和/或增强粘膜佐剂活性)。

[0049] 本发明还涉及本发明的免疫佐剂化合物用于制造这样的药物组合物的用途,该药物组合物尤其用于引起和/或增强针对鞭毛蛋白之外的一种或多种的抗原的免疫应答(尤其是在通过粘膜途径给予后在粘膜区室中引起和/或增强)。

[0050] 本发明还涉及(i)编码以上所公开的免疫佐剂肽化合物的核酸,(ii)包含插入其中的所述核酸的重组载体,(iii)转染或转化有所述核酸或所述重组载体的宿主细胞。

[0051] 附图简述

[0052] 图1. 缺失超可变区的鞭毛蛋白的特性和交叉反应性。

[0053] (A)重组鞭毛蛋白的示意性三维视图。

[0054] 野生型鞭毛蛋白FliC的结构用Pymol(<http://www.pymol.org>)在左侧小图中示出。在单体中,末端区域(1-170和400-494)紧密折叠成 $\alpha$ -螺旋,形成参与鞭毛功能的结构域。模体89-96(黑色)对于TLR5信号转导是必不可少的。FliC“超可变”结构域主要由 $\beta$ 结构和 $\beta$ 转角组成。

[0055] 使用Swiss模型(<http://www.expasy.org/spdbv/>)预测了FliC $\Delta$ <sub>204-292</sub>和

FliC $\Delta$ 174-400的总体结构,FliC $\Delta$ 204-292和FliC $\Delta$ 174-400分别表示超可变区的部分缺失和完全缺失。

[0056] 对于FliC $\Delta$ 191-352,表示该缺失的氨基酸的位置在左侧小图示出。FliC $\Delta$ 174-400和FliC $\Delta$ 191-352分别在缺失交汇处含有GAAG接头和LELE接头。

[0057] (B,C)FliC特异性血清的交叉反应性。

[0058] 超免疫血清是在皮下给予用CFA配制的鞭毛蛋白进行初次免疫、随后进行IFA加强免疫之后获得的。在ELISA中滴定血清的FliC、FliC $\Delta$ 204-292、FliC $\Delta$ 191-352和FliC $\Delta$ 174-400。结果代表2个实验。(B)抗FliC血清的交叉反应性。(C)抗FliC $\Delta$ 174-400血清的交叉反应性。

[0059] 统计学显著性(Mann-Whitney试验中 $p > 0.05$ )由星号表示。

[0060] 图2. 缺失超可变区的鞭毛蛋白的上皮和粘膜促炎活性。

[0061] (A,B)重组鞭毛蛋白对上皮细胞的活化。

[0062] 人上皮细胞用鞭毛蛋白FliC、FliC $\Delta$ 204-292、FliC $\Delta$ 191-352、FliC $\Delta$ 174-400或FliC $\Delta$ 174-400/89-96\*以指定的浓度进行活化。将含有报道融合体CCL20-luc的Caco-Rumbo细胞活化6小时,并将萤光素酶活性归一化到用饱和FliC水平测量的最大活性(A)。将BEAS-2B支气管上皮细胞刺激16小时,然后测量上清液中的IL-8水平。结果代表2个独立实验中的一个(B)。

[0063] (C-D)缺失的鞭毛蛋白对粘膜先天性应答的刺激。

[0064] 将重组鞭毛蛋白或胰蛋白酶处理的制品(1 $\mu$ g当量)i.n.给予麻醉的小鼠( $n = 3-5$ )。2小时后,用实时qRT-PCR测定全肺中的CCL20特异性mRNA水平(C)。滴注后六小时,对BAL(黑色柱)和肺(空心柱)取样测量CCL20浓度(D)。

[0065] 在Mann-Whitney试验中确定统计学显著性( $p > 0.05$ )。

[0066] 图3. 具有超可变区缺失的鞭毛蛋白的佐剂作用。

[0067] 在第1天和第21天用卵清蛋白(OVA)±鞭毛蛋白或霍乱毒素(CT)i.n.免疫小鼠( $n = 8$ )。

[0068] 在第35天,在血清(A)和BAL(B)中测量OVA特异性IgG滴度。

[0069] 测定BAL中的OVA特异性IgA的浓度(C)。

[0070] 结果代表2个独立实验中的1个。在Mann-Whitney试验中确定统计学显著性( $p > 0.05$ )。

[0071] 图4. 缺乏超可变区的鞭毛蛋白的固有抗原性质。

[0072] 在第1天和第21天用卵清蛋白(OVA)±鞭毛蛋白或霍乱毒素(CT)或LPSi.n.免疫小鼠( $n = 8$ )。

[0073] 在第35天,在血清(A)和BAL(B)中测量FliC特异性IgG滴度。结果代表2个独立实验中的1个。

[0074] 在Mann-Whitney试验中确定统计学显著性( $p > 0.05$ )。

[0075] 图5. 鞭毛蛋白特异性抗体对TLR5信号转导的中和作用。

[0076] 在第1周用1 $\mu$ g鞭毛蛋白FliC和CFA皮下免疫NMRI小鼠,然后在第3、5、7周用FliC和IFA加强免疫。在模拟条件下,类似地用卵清蛋白和佐剂或者单独用佐剂对动物进行处理。实验在第9周进行。

[0077] (A)鞭毛蛋白特异性免疫血清的体外TLR5中和活性。

- [0078] 用与50%v/v FliC超免疫血清(空心圆圈)或模拟血清(黑色圆圈)温育的鞭毛蛋白FliC,将含有报道构建物CCL20-luc的Caco-Rumbo上皮细胞活化6小时。测定萤光素酶活性,并归一化到用100ng/mlFliC获得的活性。结果代表3个独立实验中的1个。
- [0079] (B,C)鞭毛蛋白特异性免疫血清的体内TLR5中和活性。
- [0080] 给经免疫的动物(n=3)静脉内注射PBS(黑色柱)或者0.1 $\mu$ g(灰色柱)或1 $\mu$ g的鞭毛蛋白FliC(空心柱)。2小时后收集血清,通过ELISA测定CCL20(B)和CXCL2(C)的浓度。
- [0081] (D)免疫血清的中和活性。
- [0082] 给动物(每个剂量n=3)静脉内被动转移不同数量的鞭毛蛋白特异性血清或模拟血清,1小时后用所指示的重组鞭毛蛋白静脉内处理。通过ELISA测量攻击后2小时血清中的趋化因子产生量。
- [0083] 用Mann-Whitney 试验确定统计学显著性( $p>0.05$ )。
- [0084] 图6.鞭毛蛋白FliC和FliC $\Delta$ 174-400的鼻内剂量响应活性。
- [0085] 给小鼠(n=3-5)i.n.滴注不同数量的鞭毛蛋白FliC(黑色方框)或FliC $\Delta$ 174-400(空心方框)。6小时后,用ELISA测定BAL中的CCL20(A)和CXCL2(B)的浓度。
- [0086] 在Mann-Whitney U试验中确定统计学显著性( $p>0.05$ )。
- [0087] 图7.缺失超可变区的鞭毛蛋白FliC $\Delta$ 174-400的全身活化能力的改变。
- [0088] 静脉内给予不同数量的鞭毛蛋白FliC(黑色方框)或FliC $\Delta$ 174-400(空心方框)。2小时后,用ELISA测定血清中的CCL20(A)和CXCL2(B)的浓度。
- [0089] 在Mann-Whitney 试验中测定统计学显著性( $p>0.05$ )。
- [0090] 图8.各种重组的缺失超可变区的鞭毛蛋白的SDS PAGE分析。
- [0091] 图8是重组产生的FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405、FliC $\Delta$ 138-405和FliC $\Delta$ 100-405用考马斯蓝染色后的SDS PAGE电泳的照片。
- [0092] 图9.各种重组的缺失超可变区的鞭毛蛋白的免疫印迹分析。
- [0093] 图9是重组产生的FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405、FliC $\Delta$ 138-405和FliC $\Delta$ 100-405在用抗FliC抗体染色后的蛋白质印迹电泳的照片。
- [0094] 图10.各种重组的缺失超可变区的鞭毛蛋白对CCL20趋化因子的生成的诱导。
- [0095] 经缺失的鞭毛蛋白对全身先天性应答的刺激。
- [0096] 将重组鞭毛蛋白或经胰蛋白酶处理的制品(10 $\mu$ g当量)腹膜内给予小鼠(n=2)。注射后两小时,采集血清样本测量CCL20浓度。
- [0097] 图11.各种重组的缺失超可变区的鞭毛蛋白对CXCL2趋化因子的生成的诱导。
- [0098] 经缺失的鞭毛蛋白对全身先天性应答的刺激。
- [0099] 将重组鞭毛蛋白或经胰蛋白酶处理的制品(10 $\mu$ g当量)腹膜内给予小鼠(n=2)。注射后两小时,采集血清样本测量CXCL2浓度。
- [0100] 图12.重组FliC $\Delta$ 174-400对于针对来自HIV病毒的gp140抗原的免疫的佐剂作用。
- [0101] 在第1天和第21天用gp140(5 $\mu$ g) $\pm$ 鞭毛蛋白(1 $\mu$ g)i.n免疫小鼠(n=6)。
- [0102] 在第35天,测量血清(实心符号)和BAL(空心符号)中的gpP140特异性IgG滴度。结果代表2个独立实验中的1个。
- [0103] 图13.FliC在固定化有抗FliC $\Delta$ 174-400小鼠单克隆抗体的免疫亲和基材上的纯化循环的280nm色谱图。

[0104] 图14.在FliC在固定化有抗FliC $\Delta$ 174-400小鼠单克隆抗体的免疫亲和基材上的纯化循环过程中收集的各种色谱流份的电泳分析。

[0105] 图14是收集的流份(如图13中所示)在用考马斯蓝染色后的SDSPAGE电泳的照片。

[0106] 发明详述

[0107] 根据本发明,已证实新型化合物能诱导体内粘膜免疫佐剂活性,使得当将所述新型化合物与靶标抗原一起给予时,可以诱导针对该合适的相应的抗原的免疫应答。

[0108] 引人注目的是,本文已证实本发明的新型佐剂化合物在鼻内给予小鼠后也能发挥其免疫佐剂性质。本发明的所述免疫佐剂化合物因此能够加强全身和粘膜免疫应答。

[0109] 还已证明本发明的所述鞭毛蛋白衍生的免疫佐剂化合物具有TLR5介导的粘膜佐剂性质,其虽有体内粘膜促炎作用,但在全身注射后不显示任何显著的全身促炎副作用。

[0110] 此外,本文实施例中所含的结果显示,所述鞭毛蛋白衍生的免疫佐剂化合物不显示显著的固有抗原作用,即,当通过鼻内途径给予时目的分子能防止或减弱引发鞭毛蛋白特异性抗体显著地进入血清或支气管肺泡灌洗液(BAL)的能力。

[0111] 以上结果表明,本发明的所述鞭毛蛋白衍生的免疫佐剂化合物可用作免疫应答的有效佐剂,尤其是用于诱导粘膜免疫应答。

[0112] 因此,引人注目的是,所述肽化合物当它包含在(i)粘膜疫苗组合物中时可用于通过诱导受试生物体体内的粘膜免疫应答而防止或治疗疾病,或者当它包含在(ii)免疫原性组合物中时可用于增强或引发针对所期望的抗原的免疫应答。

[0113] 具体地讲,如本文的实施例中所示,本发明人已发现出乎意料的是,TLR5信号转导是区室化的,因为新的特别的FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白(即来自鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028鞭毛蛋白FliC的肽序列SEQ ID<sup>o</sup> 1从位置174至位置400发生缺失所得的鞭毛衍生肽)能刺激粘膜中的免疫性,但毫无任何显著的全身促炎作用。

[0114] 本发明人还确定,FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白由于产生中和性flic特异性抗体的能力差,因此具有突出的有利性质。

[0115] 另外,本发明已发现,与野生型鞭毛蛋白相比,FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白的全身信号转导作用被大大削弱,而粘膜活性不受影响。

[0116] 本文还已证实,其他的缺失超可变区的鞭毛蛋白(包括FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405在内)也被赋予免疫佐剂性质。

[0117] 本发明的免疫佐剂肽

[0118] 这些发现使本发明人得以设计出应具有与FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405鞭毛蛋白相同的性质和优点的肽家族。

[0119] 所述肽家族从本文实施例中研究的FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405鞭毛蛋白出发并基于鞭毛蛋白肽序列SEQ ID<sup>o</sup> 1和基于该肽的晶体结构进行定义,以预测可能具有剩余的TLR5刺激活性的截短形式。

[0120] 本发明因此有利地涉及这样的免疫佐剂化合物,其包含:

[0121] a)具有起始于位于SEQ ID<sup>o</sup> 1的位置1的氨基酸残基、终止于选自位于SEQ ID<sup>o</sup> 1的位置99至173的氨基酸残基中的任何一个的氨基酸残基的氨基酸序列的N末端肽;和

[0122] b)具有起始于选自位于SEQ ID<sup>o</sup> 1的位置401至406的氨基酸残基中的任何一个的氨基酸残基、终止于SEQ ID<sup>o</sup> 1的位置494的氨基酸残基的氨基酸序列的C末端肽,



[0123] 其中：

[0124] -所述C末端肽直接连接到N末端肽，或者

[0125] -所述N末端肽和C末端肽通过中间间隔链间接互相连接。

[0126] 词语“包含”及其语法变体当在本说明书中使用时，应理解为指示规定的特征、整数、步骤或组分或者它们的群组的存在，但并不排除一种或多种其他的特征、整数、步骤或组分或者它们的群组的存在或添加。

[0127] 本发明的化合物在本文中可互换地称为“免疫佐剂化合物”或“鞭毛蛋白衍生肽”。

[0128] 所谓“免疫佐剂化合物”是理解为本发明的鞭毛蛋白衍生肽当给予受试者或动物时可诱导和/或增强针对抗原的免疫应答。

[0129] 它还意在表示通常有助于加速、延长或增强对特定抗原的特异性免疫应答的质量的物质。

[0130] 如本文中所述，所述免疫佐剂化合物可与一种或多种抗原和药物可接受的赋形剂一起用于疫苗组合物或免疫原性组合物。

[0131] 上述的SEQ ID N° 1的肽序列来源于鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028鞭毛蛋白FliC(登录号AAL20871)。

[0132] 多肽编号起始于最终N末端甲硫氨酸(SEQ ID N° 1中未显示)之后的第一个氨基酸，该甲硫氨酸通常被细菌宿主细胞中的甲硫氨酸氨基肽酶切除，这在下文中提到。

[0133] 有利地，本发明的鞭毛蛋白衍生肽的N末端肽和C末端肽与SEQ ID N° 1的相应的氨基酸序列部分具有至少90%甚至更高的氨基酸同一性。

[0134] 同一性的描述及如何确定同一性是本领域技术人员公知的。

[0135] 本文意图，给定的目的氨基酸序列当与参考氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、69%、97%、98%、99%或99.5%氨基酸同一性时，则所述目的氨基酸序列与所述参考氨基酸序列具有90%或更高的同一性。

[0136] 为确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数，出于最佳比较的目的将序列进行比对。例如，出于比较目的，可在第一和第二氨基酸序列中的一个序列中或者同时在两个序列中引入空隙以便最佳比对，且可忽视非同源的序列。

[0137] 出于最佳比较的目的，可使用CLUSTAL W(版本1.82)用以下参数获知两个氨基酸序列的同一性百分数：(1)CPU MODE=ClustalWmp；(2)ALIGNMENT=《full》；(3)OUTPUT FORMAT=《aln/numbers》；(4)OUTPUT ORDER=《aligned》；(5)COLORALIGNMENT=《no》；(6)KTUP(word size)=《default》；(7)WINDOW LENGTH=《default》；(8)SCORE TYPE=《percent》；(9)TOPDIAG=《default》；(10)PAIRGAP=《default》；(11)PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE=《none》；(12)MATRIX=《default》；(13)GAP OPEN=《default》；(14)END GAPS=《default》；(15)GAP EXTENSION=《default》；(16)GAPDISTANCES=《default》；(17)TREE TYPE=《cladogram》和(18)TREE GRAP DISTANCES=《hide》。

[0138] 具体地讲，应理解，可在不破坏本发明的鞭毛蛋白衍生肽的优点和活性的情况下，作出微小的修饰。

[0139] 这种修饰包括在本发明的术语“免疫佐剂化合物”或“鞭毛蛋白衍生肽”的含义内，只要特定的免疫活性得到保持，特别是TLR5介导的粘膜佐剂性质，而又没有任何显著的全

身促炎副作用。

[0140] 此外,可将各种分子共价或非共价连接到本发明的鞭毛蛋白衍生肽,包括例如其他的多肽、碳水化合物、核酸或脂质。

[0141] 这些连接的分子最终存在于需求针对其的免疫应答的抗原中。这种修饰包括在本发明的定义内。

[0142] 微小的修饰还可例如涉及天然氨基酸的保守置换,以及掺入非天然氨基酸、氨基酸类似物和功能模拟物的结构变更。例如,赖氨酸残基被认为是精氨酸残基的保守置换。

[0143] 因此本文意图,与参考的第二多肽具有至少90%氨基酸同一性的第一多肽涵盖这样的第一多肽,其与该参考的第二多肽相比包含一个或多个氨基酸差异,且其中所述氨基酸差异选自(i)一个或多个氨基酸置换,(ii)一个或多个氨基酸缺失以及(iii)一个或多个氨基酸添加,或者(i)、(ii)和(iii)的任何组合。

[0144] 一般来讲,本发明因此涵盖这样的变体多肽,其与参考的多肽相比具有一个或多个氨基酸置换、缺失或添加,优选地与参考的多肽相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸置换,和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸缺失和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸添加。

[0145] 本领域技术人员知道或能确定什么结构会构成功能上相当的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。

[0146] 如上所述,本发明鞭毛蛋白衍生肽的C末端肽和N末端肽可直接连接,有利地通过肽键共价连接。

[0147] 在一个另选的实施方案中,本发明鞭毛蛋白衍生肽的所述N末端肽和C末端肽通过间隔链间接地相互连接。

[0148] 应将间隔链选择成不会干扰最终化合物的生物活性,且不会使最终化合物的免疫原性显著增加。

[0149] 间隔链优选地由通过肽键连接在一起的氨基酸构成,且在本发明鞭毛蛋白衍生肽的N末端序列和C末端序列之间共价连接。因此,在优选的实施方案中,间隔链包含1至20个通过肽键连接的氨基酸,其中氨基酸选自20个天然氨基酸。在一个更优选的实施方案中,该1至20个氨基酸选自Gly、Ala、Pro、Asn、Gln、Cys、Lys。甚至更优选地,间隔链由NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH序列构成。

[0150] 也可能是非肽的接头,例如烷基接头。这些烷基接头还可被任何非立体阻碍性基团、低级酰基、卤素、CN、NH<sub>2</sub>、苯基等取代。另一种类型的非肽接头是聚乙二醇基团。

[0151] 本领域技术人员熟知这些间隔链,且可选择合适的间隔链,尤其是根据他要连接在一起的N末端肽和C末端肽来选择。

[0152] 此外,位于SEQ ID N°1的氨基酸位置488的C末端序列的天冬酰胺残基有利地被丝氨酸残基取代。

[0153] 已引入了这个置换来特异性标记本发明的鞭毛蛋白衍生肽。这种置换天然出现于其他细菌种类如嗜肺军团杆菌(*Legionellapneumophila*)的鞭毛蛋白中,而不改变TLR5刺激活性。可在不会改变佐剂TLR5刺激活性的位置中引入其他的置换,以进一步标记本发明的鞭毛蛋白衍生肽。

[0154] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽的优选实施方案

[0155] 根据优选的实施方案,考虑到鞭毛蛋白肽序列SEQ ID N° 1和考虑到晶体结构,本发明的免疫佐剂化合物的N末端肽有利地选自SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-99、1-137、1-160和1-173。

[0156] 具体地讲,鞭毛蛋白FliC的三维结构显示,N末端结构域被编组在3个 $\alpha$ 螺旋中,这些 $\alpha$ 螺旋被 $\beta$ 转角接着是 $\beta$ 片层和 $\beta$ 转角隔开。保持这些二级结构的(一些)部分在N末端处可足以保持TLR5刺激活性(具体而言是粘膜TLR5刺激活性),即SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-99含有前2个 $\alpha$ 螺旋,SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-137含有前3个 $\alpha$ 螺旋,而SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-173含有FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白中存在的N末端结构。

[0157] 在更优选的实施方案中,免疫佐剂化合物的所述C末端肽选自SEQ ID N° 1的氨基酸序列401-494和406-494。

[0158] 具体地讲,鞭毛蛋白FliC的三维结构显示,C末端结构域被编组在2个被 $\beta$ 转角隔开的 $\alpha$ 螺旋中。保持这些二级结构的(一些)部分在N末端处可足以保持TLR5刺激活性(具体而言是粘膜TLR5刺激活性):SEQ ID N° 1的氨基酸序列401-494是FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白中存在的序列,而SEQ ID N° 1的氨基酸序列406-494仅含有两个C末端二级 $\alpha$ 螺旋。

[0159] 在某些优选的实施方案中,本发明免疫佐剂化合物的N末端肽由这样的氨基酸序列组成,该氨基酸序列起始于位于SEQ ID N° 1的位置1的丙氨酸残基,终止于位于SEQ ID N° 1的选自以下的位置的氨基酸残基:位置137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172和173。

[0160] 在某些优选的实施方案中,本发明免疫佐剂化合物的C末端肽由这样的氨基酸序列组成,该氨基酸序列起始于位于SEQ ID N° 1的选自位置401、402、403、404、405和406的位置的氨基酸残基,终止于位于SEQ ID N° 1的位置494的精氨酸残基。

[0161] 在这些优选实施方案的一个具体方面,本发明免疫佐剂化合物的所述N末端肽和所述C末端肽有利地通过上述的NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH间隔链互相连接(即置换缺失的序列174-400);而且位于SEQ ID N° 1的位置488的天冬酰胺残基有利地被丝氨酸残基置换。

[0162] 上述这种免疫佐剂化合物的示例性实施方案涵盖本文实施例中所示且在下文中更详细描述FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405。

[0163] 在又一个实施方案中,目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽分别由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-173和401-494组成。

[0164] 在再一个实施方案中,目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽分别由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-160和406-494组成。

[0165] 在又一个实施方案中,目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽分别由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-137和406-494组成。

[0166] 在一些实施方案中,本发明的免疫佐剂化合物在其N末端包含额外的甲硫氨酸残基,尤其是当这些化合物在细菌细胞中作为重组蛋白产生时。

[0167] 在其中目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-173和401-494组成的实施方案中,本发明的鞭毛蛋白衍生肽由缺失了从氨基酸位置174延伸到氨基酸位置400的那部分氨基酸序列的氨基酸序列SEQ ID N° 1组成。此本发明鞭毛

蛋白肽序列在本说明书中也称为“FliC $\Delta$ 174-400”或“FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白”。

[0168] 根据一个优选的实施方案,本发明免疫佐剂化合物的所述N末端肽和所述C末端肽有利地通过上述的NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH间隔链互相连接(即置换缺失的序列174-400);而且位于SEQ ID N° 1的位置488的天冬酰胺残基有利地被丝氨酸残基置换。

[0169] 这样获得的本发明鞭毛蛋白衍生肽是271个氨基酸的序列,其中该肽序列存在于SEQ ID N° 2。

[0170] 多肽编号起始于最终N末端甲硫氨酸(SEQ ID N° 2中未显示)之后的第一个氨基酸,该甲硫氨酸通常被细菌宿主细胞中的甲硫氨酸氨基肽酶切除,这在下文中提到。

[0171] 在其中目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-160和406-494组成的实施方案中,本发明的鞭毛蛋白衍生肽由缺失了从氨基酸位置161延伸到氨基酸位置405的那部分氨基酸序列的氨基酸序列SEQ ID N° 1组成。此本发明鞭毛蛋白肽序列在本说明书中也称为“FliC $\Delta$ 161-405”或“FliC $\Delta$ 161-405鞭毛蛋白”。

[0172] 根据一个优选的实施方案,本发明免疫佐剂化合物的所述N末端肽和所述C末端肽有利地通过上述的NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH间隔链互相连接(即置换缺失的序列161-405);而且位于SEQ ID N° 1的位置488的天冬酰胺残基有利地被丝氨酸残基置换。

[0173] 这样获得的本发明鞭毛蛋白衍生肽是253个氨基酸的序列,其中该肽序列存在于SEQ ID N° 25。

[0174] 多肽编号起始于最终N末端甲硫氨酸(SEQ ID N° 25中未显示)之后的第一个氨基酸,该甲硫氨酸通常被细菌宿主细胞中的甲硫氨酸氨基肽酶切除,这在下文中提到。

[0175] 在其中目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-137和406-494组成的实施方案中,本发明的鞭毛蛋白衍生肽由缺失了从氨基酸位置138延伸到氨基酸位置405的那部分氨基酸序列的氨基酸序列SEQ ID N° 1组成。此本发明鞭毛蛋白肽序列在本说明书中也称为“FliC $\Delta$ 138-405”或“FliC $\Delta$ 138-405鞭毛蛋白”。

[0176] 根据一个优选的实施方案,本发明免疫佐剂化合物的所述N末端肽和所述C末端肽有利地通过上述的NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH间隔链互相连接(即置换缺失的序列138-405);而且位于SEQ ID N° 1的位置488的天冬酰胺残基有利地被丝氨酸残基置换。

[0177] 这样获得的本发明鞭毛蛋白衍生肽是230个氨基酸的序列,其中该肽序列存在于SEQ ID N° 26。

[0178] 多肽编号起始于最终N末端甲硫氨酸(SEQ ID N° 26中未显示)之后的第一个氨基酸,该甲硫氨酸通常被细菌宿主细胞中的甲硫氨酸氨基肽酶切除,这在下文中提到。

[0179] 在其中目的免疫佐剂化合物的所述N末端肽和C末端肽由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-99和406-494组成的实施方案中,本发明的鞭毛蛋白衍生肽由缺失了从氨基酸位置100延伸到氨基酸位置405的那部分氨基酸序列的氨基酸序列SEQ ID N° 1组成。此本发明鞭毛蛋白肽序列在本说明书中也称为“FliC $\Delta$ 100-405”或“FliC $\Delta$ 100-405鞭毛蛋白”。

[0180] 根据一个优选的实施方案,本发明免疫佐剂化合物的所述N末端肽和所述C末端肽有利地通过上述的NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH间隔链互相连接(即置换缺失的序列100-405);而且位于SEQ ID N° 1的位置488的天冬酰胺残基有利地被丝氨酸残基置换。

[0181] 这样获得的本发明鞭毛蛋白衍生肽是192个氨基酸的序列,其中该肽序列存在于SEQ ID N° 27。

[0182] 多肽编号起始于最终N末端甲硫氨酸(SEQ ID N° 27中未显示)之后的第一个氨基酸,该甲硫氨酸通常被细菌宿主细胞中的甲硫氨酸氨基肽酶切除,这在下文中提到。

[0183] 本发明的免疫佐剂肽的合成

[0184] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽可由通过遗传工程获得的重组细胞合成,或者由本领域技术人员公知的化学或酶促肽合成方法中的任何一种合成。

[0185] 1.通过重组细胞合成

[0186] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽可通过重组法由重组细胞产生,所述重组细胞已转染了编码该肽的氨基酸序列且能让该肽得以在受转染的细胞内有效产生的核酸。

[0187] 编码本发明的鞭毛蛋白衍生肽的核酸序列

[0188] 所述鞭毛蛋白肽序列的修饰可用重组DNA诱变技术来产生。

[0189] 有多种用于构建和修饰DNA序列的方法为本领域技术人员所知,且所述重组方法的选择也将为本领域技术人员所知。

[0190] “重组诱变”技术包括例如定点诱变和PCR诱变(具体参见Current Protocols in Molecular Biology,2007,John Wiley and Sons,Inc.,第8章和第15章)。

[0191] 所述聚合酶链反应(PCR)尤其可用于多种突变程序和应用。PCR诱变程序使得有可能容易地和有效地对任何靶标DNA进行修饰和工程化改造。这包括例如点突变、缺失或插入的引入。

[0192] 这些技术例如在SEQ ID N° 3的野生型fliC基因上进行,该基因分离自编码由SEQ ID N° 1表示的鞭毛蛋白肽的鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028菌株。

[0193] 在一个优选的实施方案中,通过PCR诱变(具体参见Current Protocols in Molecular Biology,2007,John Wiley and Sons,Inc.,第8章和第15章)使上述fliC基因缺失其长度的中间部分,PCR诱变是用根据为本发明的肽搜索的所需N末端序列和C末端序列而选择的合适引物对来进行。

[0194] 例如,基于含有SEQ ID N° 3的所述野生型fliC基因的pBR322衍生质粒,在其自身的启动子的控制下,以下引物对可用于PCR诱变技术:

[0195] -SEQ ID N° 4和SEQ ID N° 5,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-99和401-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0196] -SEQ ID N° 4和SEQ ID N° 6,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-99和406-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0197] -SEQ ID N° 7和SEQ ID N° 5,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-137和401-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0198] -SEQ ID N° 7和SEQ ID N° 6,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-137和406-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0199] -SEQ ID N° 8和SEQ ID N° 5,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-160和401-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0200] -SEQ ID N° 8和SEQ ID N° 6,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-160和406-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0201] -SEQ ID N° 9和SEQ ID N° 5,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-173和401-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0202] -SEQ ID N° 9和SEQ ID N° 6,分别用于由SEQ ID N° 1的氨基酸序列1-173和406-494组成的N末端肽和C末端肽;

[0203] 为将SEQ ID N° 1的位置488的天冬酰胺变成丝氨酸,例如可用以下引物SEQ ID N° 10和SEQ ID N° 11进行定点诱变。

[0204] 为在鞭毛蛋白重组肽的1-99、1-137、1-160或1-173与401-494或406-494的交汇处引入NH<sub>2</sub>-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH接头,可将以下DNA序列GGTGCAGCTGGA添加在引物序列SEQ ID N° 5和SEQ ID N° 6的5'末端,产生出分别称为序列SEQ ID N° 12的“F-接头-401”和序列SEQ ID N° 13的“F-接头-406”的引物。

[0205] 适合于产生本发明鞭毛蛋白衍生肽FliC $\Delta$ 174-400的DNA序列例如为序列SEQ ID 14。

[0206] 适合于产生本发明鞭毛蛋白衍生肽FliC $\Delta$ 161-405的核酸例如为序列SEQ ID 28。

[0207] 适合于产生本发明鞭毛蛋白衍生肽FliC $\Delta$ 138-405的核酸例如为序列SEQ ID 29。

[0208] 适合于产生本发明鞭毛蛋白衍生肽FliC $\Delta$ 100-405的核酸例如为序列SEQ ID 30。

[0209] 可复制载体的选择和使用

[0210] 可将本文公开的编码目的鞭毛蛋白衍生肽的核酸序列插入到可复制载体中以进行克隆(DNA的扩增)或用于表达。

[0211] 各种载体是可公开获得的。载体可例如为质粒、黏粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可通过多种程序将适当的核酸序列插入到载体中。一般地,用本领域知道的技术将DNA插入到适当的限制性内切核酸酶位点中。

[0212] 载体组分通常包括但不限于信号序列(如果所述序列要分泌的话)、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列中的一者或多者。

[0213] 含有这些组分中的一者或多者的合适载体的构建采用到技术人员知道的标准连接技术。

[0214] 目的鞭毛蛋白衍生肽不仅可直接重组产生,而且可作为与异源多肽的融合多肽产生,该异源多肽可为信号肽或其他的在成熟蛋白质或肽的N末端具有特异性切割位点的多肽。一般而言,信号序列可为载体的组分,或者它可为被插入到载体中的、编码目的多肽的DNA的一部分。信号序列可为选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II的前导序列的原核生物信号序列。为了酵母分泌,信号序列可例如是酵母转化酶前导序列(包括酵母菌属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)的 $\alpha$ 因子前导序列,后者在美国专利第5,010,182号中描述),或者酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌(*C.albicans*)葡糖淀粉酶前导序列(EP 362,179,1990年4月4日公布),或者1990年11月15日公布的WO 90/13646中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列可用于指导蛋白质如来自相同或相关的物种的分泌多肽的信号序列以及病毒分泌前导序列的分泌。

[0215] 表达载体和克隆载体都含有使该载体能够在一个或多个选定的宿主细胞中复制的核酸序列。适于多种细菌、酵母和病毒的这类序列是公知的。来自质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2.  $\mu$ . 质粒起点适合于酵母,各种病毒起点(SV40、多瘤、腺病毒、VSV或BPV)可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。

[0216] 表达载体和克隆载体通常会含有选择基因,也称为可选择标记。典型的选择基因编码具有以下功能的蛋白质:(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如氨基青霉素、新霉素、甲氨喋呤或四环素)的抗性,(b)对营养缺陷加以补足,或者(c)供应从复杂培养基不可得到的关

键营养物,例如对于杆菌而言编码D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0217] 对于哺乳动物细胞而言合适的可选择标记的例子,是那些使得能够鉴定有能力吸收编码目的鞭毛蛋白衍生肽的核酸的细胞的可选择标记,如DHFR或胸苷激酶。当采用野生型DHFR时,适当的宿主细胞是缺乏DHFR活性的CHO细胞系,其按照Urlaub等人., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216(1980)所述进行制备和扩增。适用于酵母的选择基因是酵母质粒YRp7中存在的trp 1基因。Stinchcomb等人.,Nature,282:39(1979);Kingsman等人.,Gene,7:141(1979);Tschemper等人.,Gene,10:157(1980)。trp1基因因为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变株(例如ATCC No.44076或PEP4-1)提供选择标记。Jones,Genetics,85:12(1977)。

[0218] 表达载体和克隆载体通常含有可操作地连接到编码鞭毛蛋白衍生肽的核酸序列以指导mRNA合成的启动子。被各种潜在的宿主细胞识别的启动子是公知的。适用于原核生物宿主的启动子包括 $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang等人.,Nature,275:615(1978);Goeddel等人.,Nature,281:544(1979)),碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel,Nucleic Acids Res.,8:4057(1980);EP 36,776),和杂合启动子如tac启动子(deBoer等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:21-25(1983))。用于细菌系统的启动子还会含有可操作地连接到编码目的鞭毛蛋白衍生肽的DNA的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0219] 适用于酵母宿主的启动序列的例子包括用于以下酶的启动子:3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman等人.,J.Biol.Chem.,255:2073(1980))或其他糖酵解酶(Hess等人.,J.Adv.Enzyme Reg.,7:149(1968);Holland,Biochemistry,17:4900(1978)),如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0220] 其他的酵母启动子——它们属于具有转录受生长条件控制的额外优点的可诱导启动子——是用于以下酶的启动子区域:醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶以及负责麦芽糖和半乳糖的利用的酶。适用于酵母表达的载体和启动子在EP 73,657中有进一步描述。

[0221] 目的核酸在哺乳动物宿主细胞中从载体的转录例如受到以下启动子的控制:从病毒如多瘤病毒、鸟痘病毒(UK 2,211,504,1989年7月5日公布)、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒和猿病毒40(SV40)的基因组获得的启动子;异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子;和热激启动子,前提是这种启动子与宿主细胞系统相容。

[0222] 通过将增强子序列插入到载体中,可增加更高等的真核生物对编码目的鞭毛蛋白衍生肽的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常为约10至300bp,其作用于启动子以增加启动子的转录。现已知许多来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 $\alpha$ -胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。但是,通常会使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括在复制起点的后侧(late side)上的SV40增强子(bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点的后侧上的多瘤增强子和腺病毒增强子。增强子可在相对于编码目的多肽的序列的5'或3'位置剪接到载体中,但优选位于相对于启动子的5'位点。

[0223] 用于真核生物宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人类或者来自其他多细胞生物的有核细胞)的表达载体还会含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。这种序列通常

可得自真核生物或者病毒DNA或cDNA的5'非翻译区和偶尔得自3'非翻译区。这些区域含有在编码目的鞭毛蛋白衍生肽的mRNA的非翻译部分中被转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[0224] 另外其他的适合改编用于在重组脊椎动物细胞培养物中合成目的鞭毛蛋白衍生肽的方法、载体和宿主细胞在Gething等人., *Nature*, 293:620-625(1981); Mantei等人., *Nature*, 281:40-46(1979); EP117,060和EP 117,058中有描述。

[0225] 宿主细胞的选择和转化

[0226] 使宿主细胞转染或转化本文对于鞭毛蛋白衍生肽的生成所述的表达载体或克隆载体,并在常规的营养培养基中进行培养,该培养基视所需而定进行修改以便诱导启动子、选择转化子或者扩增编码所需的序列的基因。

[0227] 技术人员无需进行过多的实验就能选择培养条件,如培养基、温度、pH等。一般而言,用于使细胞培养物的生产率最大化的原理、方案和实用技术可在Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler编辑( IRL Press, 1991)中找到。

[0228] 转染方法是普通技术人员知道的,例如CaPO<sub>4</sub>处理和电穿孔。取决于所用的宿主细胞,转化是用适于这种细胞的标准技术来进行。应用氯化钙的钙处理法(如Sambrook等人(出处同上)中所述)或者电穿孔法,通常被用于原核生物细胞或者其他含有很大的细胞壁屏障的细胞。根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染被用于某些植物细胞的转化,如Shaw等人., *Gene* 23:315(1983)和1989年6月29日公布的W0 89/05859中所述。对于没有这种细胞壁的哺乳动物细胞,可采用Graham和van der Eb, *Virology*, 52:456-457(1978)所述的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统的转化的各个一般方面在美国专利No. 4,399,216中已有描述。向酵母中的转化通常是按Van Solingen等人., *J. Bact.*, 130:946(1977)和Hsiao等人., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829(1979)所述的方法进行。但是,也可使用其他的将DNA引入到细胞中的方法,如核微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合或者聚阳离子(例如聚凝胺(polybrene)或聚鸟氨酸)。有关各种用于转化哺乳动物细胞的技术,参见Keown等人., *Methods in Enzymology*, 185:527-537(1990)和Mansour等人., *Nature*, 336:348-352(1988)。

[0229] 适用于克隆或表达本文的载体中的DNA的宿主细胞包括原核生物细胞、酵母细胞或更高等的真核生物细胞。

[0230] 合适的原核生物包括但不限于真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌,例如肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),如大肠杆菌(*E. coli*)。有各种大肠杆菌菌株可公开获得,如大肠杆菌K12 MM294菌株(ATCC31,446);大肠杆菌X1776(ATCC 31,537);大肠杆菌W3110菌株(ATCC27,325);和K5772(ATCC 53,635)。其他合适的原核生物宿主细胞包括肠杆菌科如埃希氏菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属(*Serratia*) (如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))和志贺氏菌属(*Shigella*)以及杆菌如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)如铜绿假单胞杆菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。这些例子是示例性的而非限制性的。



[0231] 鼠伤寒沙门氏菌的SIN41菌株(*fliC fliB*)对于生产鞭毛蛋白衍生肽而言特别值得关注,因为这些原核宿主细胞不分泌任何鞭毛蛋白(*Proc Natl Acad Sci USA*.2001;98:13722-7)。但是,鞭毛蛋白通过专门的分泌系统分泌:所谓的“III型分泌系统”。有趣的是,菌株SIN41能产生为达到鞭毛蛋白最佳分泌所需的III型分泌系统所有组分。置于*fliC*启动子下的编码新的鞭毛蛋白肽的克隆序列使得能够在菌株SIN41中大量分泌目的鞭毛蛋白衍生肽。

[0232] 菌株W3110也是值得关注的,因为它是重组DNA产物发酵的普通宿主菌株。优选地,该宿主细胞分泌的蛋白水解酶数量极少。例如,可对菌株W3110进行修饰以在编码该宿主的内源蛋白质的基因中产生遗传突变,这种宿主的例子包括大肠杆菌W3110菌株1A2,其具有完整基因型*tonA*;大肠杆菌W3110菌株9E4,其具有完整基因型*tonA ptr3*;大肠杆菌W3110菌株27C7(ATCC 55,244),其具有完整基因型*tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kan.sup.r*;大肠杆菌W3110菌株37D6,其具有完整基因型*tona ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r*;大肠杆菌W3110菌株40B4,其为具有非卡那霉素抗性*degP*缺失突变的菌株37D6;和具有突变的周质蛋白酶的大肠杆菌菌株,公开于1990年8月7日公布的美国专利第4,946,783号。大肠杆菌菌株MG1655、MG1655  $\Delta$  *fimA-H*或MKS12、缺失*fliD*和缺失*fimA-H*的MG1655菌株也是将重组鞭毛蛋白作为分泌蛋白生产的值得关注的候选菌株(*Nat Biotechnol*.2005;(4):475-81)。或者,体外克隆方法如PCR或其他核酸聚合酶反应是适合的。

[0233] 除了原核生物之外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是编码鞭毛蛋白衍生肽的载体的合适克隆宿主或表达宿主。

[0234] 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是常用的低等真核宿主微生物。其他包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach和Nurse,*Nature*,290:140[1981];1985年5月2日公布的EP 139,383);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主(美国专利No.4,943,529;Fleer等人.,*Bio/Technology*,9:968-975(1991)),如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)(MW98-8C,CBS683,CBS4574;Lourencourt等人.,*J.Bacteriol.*,737[1983])、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*)(ATCC 16,045)、*K.wickerhamii*(ATCC 24,178)、*K.waltii*(ATCC 56,500)、*K.drosophilum*(ATCC 36,906;Van den Berg等人.,*Bio/Technology*,8:135(1990))、*K.thermotolerans*和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*);亚罗酵母属(*Yarrowia*)(EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070;Sreekrishna等人.,*J.BasicMicrobiol.*,28:265-278[1988]);假丝酵母属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234);粗糙脉胞菌(*Neurospora crassa*)(Case等人.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,76:5259-5263[1979]);许旺酵母属(*Schwanniomyces*)如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)(1990年10月31日公布的EP 394,538);和丝状真菌,如脉胞菌属(*Neurospora*)、青霉菌属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)(1991年1月10日公布的WO 91/00357)和曲霉菌属(*Aspergillus*)宿主如构巢曲霉(*A.nidulans*)(Ballance等人.,*Biochem.Biophys.Res.Comm.*,112:284-289[1983];Tilburn等人.,*Gene*,26:205-221[1983];Yelton等人.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,81:1470-1474[1984])和黑曲霉(*A.niger*)(Kelly和Hynes,*EMBO J.*,4:475-479[1985])。甲基营养型酵母适合于本发明,包

括但不限于以下各属的能够在甲醇上生长的酵母:汉逊酵母属(*Hansenula*)、假丝酵母属(*Candida*)、克勒克酵母属(*Kloeckera*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母菌属(*Saccharomyces*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)和红酵母属(*Rhodotorula*)。这类酵母的示例性的具体种类的列表可在C.Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269(1982)中找到。

[0235] 适用于表达编码目的鞭毛蛋白衍生肽的核酸的宿主细胞源自多细胞生物。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞(如果蝇S2和夜蛾Sf9)以及植物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和COS细胞。更具体的例子包括被SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞系(293细胞或经亚克隆以在悬浮培养中生长的293细胞, Graham等人., *J.Gen.Virol.*, 36:59(1977));中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub和Chasin, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77:4216(1980));小鼠塞托利细胞(TM4, Mather, *Biol.Reprod.*, 23:243-251(1980));人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);和小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)。适当的宿主细胞的选择被认定为在本领域的技能范围内。

[0236] 纯化目的鞭毛蛋白衍生肽的一般方法

[0237] 可从培养基或从宿主细胞裂解物回收各种形式的目的鞭毛蛋白衍生肽。

[0238] 如果它与膜结合,则可用合适的去污剂溶液(例如TRITON--X.TM.100)或者通过酶促切割将它从膜释放下来。

[0239] 应用于表达编码目的鞭毛蛋白衍生肽的核酸的细胞可通过多种物理或化学手段进行破碎,如冷冻-解冻循环、超声处理、机械破碎或细胞裂解剂。

[0240] 可能需要从重组细胞蛋白或多肽纯化目的多肽。以下程序是合适的纯化程序的代表:在离子交换柱上进行分部分离;乙醇沉淀;反相HPLC;在二氧化硅上或阳离子交换树脂(如DEAE)上进行层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如Sephadex G-75进行凝胶过滤;用A蛋白琼脂糖凝胶柱除去污染物(如IgG);和用金属螯合柱结合目的鞭毛蛋白衍生肽的表位标记的形式。

[0241] 可采用各种蛋白质纯化方法,这类方法是本领域公知的,在例如Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182(1990);Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*(Springer-Verlag: New York, 1982)中有描述。所选择的纯化步骤将取决于例如所用的生产方法的性质和具体产生的鞭毛蛋白衍生肽。

[0242] 在一个优选的实施方案中,鞭毛蛋白衍生肽从重组鼠伤寒沙门氏菌SIN41(*fliC fliB*)的上清液纯化,这在实施例中公开。

[0243] 具体地讲,将沙门氏菌在Luria-Bertani(LB)肉汤中37°C搅拌下生长6-18小时。将上清液过滤,并用60%硫酸铵(Sigma Aldrich, 美国)饱和。离心回收沉淀的物质,溶解于20mM Tris/HCl pH7.5,然后透析。通过依次进行羟基磷灰石处理、阴离子交换和尺寸排阻层析(Bio-Rad Laboratories, 美国;GE Healthcare, 瑞典),对蛋白质进行进一步的纯化。最后,用多粘菌素B柱(Pierce, 美国),使蛋白质脱去脂多糖(LPS)。使用鲎测定法(Associates of Cape Cod Inc., 美国),测出残余LPS浓度小于30pg LPS/ $\mu$ g重组鞭毛蛋白。

[0244] 通过免疫亲和层析纯化目的鞭毛蛋白衍生肽

[0245] 在另外的实施方案中,可通过在免疫亲和层析基材上进行分离,来纯化根据本发明的鞭毛蛋白衍生肽。

[0246] 所述免疫亲和层析基材包含已固定化在其上的抗鞭毛蛋白抗体。本文所谓“抗鞭毛蛋白”抗体是指能结合天然鞭毛蛋白或结合缺失超可变区的鞭毛蛋白(包括本发明涵盖的那些缺失超可变区的鞭毛蛋白)的抗体。

[0247] 优选地,抗鞭毛蛋白抗体由单克隆抗体组成,包括小鼠抗鞭毛蛋白抗体在内。

[0248] 根据本发明已证实,通过在本说明书别处公开的、包括用缺失超可变区的鞭毛蛋白FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>免疫小鼠这个步骤的方法来获得的抗鞭毛蛋白抗体,能识别天然鞭毛蛋白和本文公开的任何一种缺失超可变区的鞭毛蛋白。

[0249] 因此,在免疫亲和层析基材的某些优选的实施方案中,所述基材包含抗FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>的小鼠单克隆抗体。

[0250] 所述优选的免疫亲和层析基材可如下制备:

[0251] -在Econo-Pac A蛋白柱(#732-2022 Affi-gel;Bio-Rad)上纯化含有抗FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>单克隆抗体的小鼠腹水。

[0252] -将所得的纯化的抗FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>单克隆抗体(也可称为“B23C5”)通过伯氨基共价偶联到N-羟基琥珀酰亚胺活化的Sepharose™高性能柱(#17-0716-01 Hitrap NHS活化的HP,GEHealthcare),产生鞭毛蛋白特异性亲和柱。偶联收率为98%。

[0253] 如本文实施例中所示,上述鞭毛蛋白特异性亲和柱使得可以高度特异性地将天然鞭毛蛋白与起始样本中所含的其他蛋白质组分或非蛋白质组分分离开来,从而也可以将本文所公开的任何一种缺失超可变区的鞭毛蛋白与起始样本中所含的其他蛋白质组分或非蛋白质组分分离开来。

[0254] 以下描述一种用于纯化鞭毛蛋白或本文所公开的任何一种缺失超可变区的鞭毛蛋白的方法:

[0255] -将得自重组鼠伤寒沙门氏菌SIN41或大肠杆菌的培养物的含鞭毛蛋白的上清液离心,滤过0.22 $\mu$ m膜,用结合缓冲液(75mMTris-HCl pH8)1:1稀释,上样到上述的鞭毛蛋白特异性亲和柱。

[0256] -接着,用15-20 CV(柱体积)的结合缓冲液洗涤该鞭毛蛋白特异性亲和柱。

[0257] -然后,用3CV的洗脱缓冲液(100mM甘氨酸-HCl,0.5M NaCl,pH2.7)洗脱蛋白质,各流份立即用500 $\mu$ L Tris 1.5M pH8.9中和,以避免长时间暴露于酸性pH。

[0258] -然后,用10CV的结合缓冲液将柱再生,并用0.02%叠氮化钠在4°C下保藏。

[0259] 典型的层析图谱在图13中显示,该图示出了(i)在280nm处的吸光度(O.D.)曲线(带实心方框的线条)和(ii)电导率曲线。图13中的箭头数字对应于从柱流出的液体流份已被成功收集的时间,所谓成功收集是根据对各流份的鞭毛蛋白含量的进一步分析(参见图14和以下段落)。数字表示的各个收集的流份分别为:

[0260] -1号-上样前的5 $\mu$ L样本(3 $\mu$ g)=输入总量=900 $\mu$ g

[0261] -2号-柱运行后从上样的样本得到的20 $\mu$ L

[0262] -3号-从柱洗涤得到的20 $\mu$ L

[0263] -4号-从柱洗涤得到的20 $\mu$ L

[0264] -5、6和7号-在洗脱缓冲液后的各个流份得到的20 $\mu$ L:总量 $\approx$ 900 $\mu$ g

[0265] -8号-柱再平衡得到的20 $\mu$ L

[0266] 图14示出了蛋白质印迹的照片,该蛋白质印迹是用图13所示的流份1至8作为分别

的起始材料进行。

[0267] 2. 化学分析

[0268] 在某些实施方案中,本发明的肽可通过化学肽合成的常规技术进行合成。

[0269] 例如,可用固相技术,如Stewart等人.,*Solid-Phase Peptide Synthesis* (W.H.Freeman Co.:San Francisco,Calif.,(1969);Merrifield,J.Am.Chem.Soc.,85:2149-2154(1963);Fields GB,Noble RL;1990;Int.J.Pept.Protein Res.;Vol.35:161-214)所描述的那些固相技术,通过直接肽合成来产生目的鞭毛蛋白衍生肽。

[0270] 可用手工操作或通过自动化来进行体外蛋白质合成。自动合成可例如用Applied Biosystems肽合成仪(Foster City,Calif.)按生产商说明书来完成。

[0271] 目的肽的各个部分可分别进行化学合成,并用化学或酶促方法进行组合以产生全长目的肽。

[0272] 包含本发明鞭毛蛋白衍生肽的组合物

[0273] 本发明的又一个目标是包含本说明书所定义的佐剂化合物以及(特别地)一种或多种药物可接受的赋形剂的组合物,特别是药物组合物。

[0274] 本发明还涉及包含本说明书所定义的免疫佐剂化合物以及一种或多种抗原的免疫原性组合物。

[0275] “免疫原性组合物”一旦给予受试者或动物,将能引起针对其中所包含的所述一种或多种抗原的保护性免疫应答。

[0276] 本发明还涉及包含本说明书所定义的免疫佐剂化合物以及一种或多种抗原的疫苗组合物。

[0277] 本文所用的疫苗组合物一旦给予受试者或动物,将能引起针对例如微生物的保护性免疫应答,或者能有效地保护受试者或动物免受感染。

[0278] 疫苗组合物可用于防止或改善会对免疫应答调节作出有利响应的病理状况。

[0279] 免疫佐剂

[0280] 如上所述,术语“免疫佐剂”当针对免疫原性组合物或疫苗使用时,意在指通常起到加速、延长或增强对抗原的特异性免疫应答的的质量的作用的物质。

[0281] 有利地,免疫佐剂还可减少进行保护性免疫所需的免疫次数或抗原数量。

[0282] 抗原

[0283] 有多种物质可用作免疫原性类型的或疫苗类型的化合物或制剂中的抗原。例如,减毒的和灭活的病毒和细菌病原体、纯化的大分子、多糖、类毒素、重组抗原、含有来自病原体的外来基因的生物体、合成的肽、聚核酸、抗体和肿瘤细胞可用来制备:(i)可用于在个体中引起免疫应答的免疫原性组合物,或(ii)可用于治疗病理状况的疫苗。

[0284] 因此,可将本发明的鞭毛蛋白衍生肽与多种抗原进行组合,以产生可用于在个体中引起免疫应答的免疫原性组合物或疫苗。

[0285] 本领域技术人员会能够选择适宜于治疗具体的病理状况的抗原,且会知道如何确定粗抗原或分离的抗原在具体的疫苗制剂中是否有利。

[0286] 本领域技术人员还会能够确定是否优选将本发明的免疫佐剂共价连接或者不共价连接到所述一种或多种抗原。

[0287] 本发明的体内试验证明,当目的鞭毛蛋白衍生肽和靶标抗原通过粘膜途径特别是

鼻内途径一起给予时,粘膜佐剂活性并不需要目的鞭毛蛋白衍生肽和靶标抗原之间的任何连接。

[0288] 分离的抗原可用本领域公知的多种方法制备。可使用本领域公知的重组方法,例如在细菌、酵母、昆虫、爬行动物或哺乳动物细胞中分离和克隆编码任何免疫原性多肽的基因,所述方法例如描述于Sambrook等人.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold SpringHarbor Laboratory,New York(1992)和Anselmetti等人.,*Current Protocols in Molecular Biology*,John Wiley and Sons,Baltimore,MD(1998)。已成功地克隆、表达了多种编码来自病毒、细菌和原生动物的表面抗原的基因,并用作疫苗开发用的抗原。例如,已在各种公知的载体/宿主系统中表达乙型肝炎病毒的主要表面抗原HbsAg、霍乱毒素的P亚单位、大肠杆菌的肠毒素、疟疾寄生虫的环孢子蛋白和Epstein-Barr病毒的糖蛋白膜抗原以及肿瘤细胞抗原,并加以纯化和用于疫苗。

[0289] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽通过能有益地增强对重组抗原的免疫应答的TLR5介导的粘膜系统引起先天性免疫应答。

[0290] 用于疫苗的病理上异常细胞可获自任何来源,如一个或多个具有病理状况的个体或者获自一个或多个这种个体的离体或体外培养细胞,包括要用所产生的疫苗进行治疗的特定个体。

[0291] 免疫调节分子

[0292] 有多种免疫调节分子也可与本发明的鞭毛蛋白衍生肽组合使用,以改变个体中的免疫应答。所需的改变的类型将决定被选择与本发明的所述鞭毛蛋白衍生肽进行组合的免疫调节分子的类型。

[0293] 例如,为增强先天性免疫应答,可将本发明的鞭毛蛋白衍生肽与另一种能促进先天性免疫应答的免疫调节分子进行组合,所述另一种免疫调节分子例如其他的PAMP或者已知或怀疑能引起先天性免疫应答的保守区域。有多种PAMP已知能刺激受体的toll样家族的不同成员的活性。

[0294] 可将这类PAMP进行组合以对能诱导有益的细胞因子谱的toll样受体的特定组合进行刺激。例如,可将这类PAMP进行组合以刺激能诱导Th1或Th2免疫应答的细胞因子谱。

[0295] 可将其他类型的能促进体液或细胞介导的免疫应答的免疫调节分子与本发明的鞭毛蛋白衍生肽进行组合。例如,可给予细胞因子以改变Th1和Th2免疫应答的平衡。本领域技术人员会知道如何为具体的病理状况确定可用于获得免疫应答的有益改变的适宜细胞因子。

[0296] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽的给予

[0297] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽将以“免疫原性量”与一种或多种分子如抗原或其他免疫调节分子一起给予,所述免疫原性量意在指引发免疫应答所需的量。

[0298] 单独的或与一种或多种分子组合在一起的本发明鞭毛蛋白衍生肽的剂量将取决于例如所要治疗的病理状况、个体的体重和状况以及之前进行的或同时进行治疗。本领域技术人员可确定被认为对于该方法的具体应用而言是免疫原性剂量的适当量。本领域技术人员会理解,在治疗过程中需要对患者的状况进行监测,且可根据患者对治疗的反应调整所给予的组合物的量。

[0299] 作为疫苗免疫佐剂,本发明的鞭毛蛋白衍生肽可通过增强较弱的抗原(如高度纯

化的或重组的抗原)的免疫原性、减少免疫应答所需的抗原的量、减少提供保护性免疫所需的免疫频率来提高疫苗的有效性,可改进疫苗在免疫应答减低或弱化的个体(如新生儿、老年人和免疫受损的个体)中的功效,和可增强在靶标组织中的免疫性(如粘膜免疫性),或者通过引发特定的细胞因子谱来促进细胞介导的免疫或体液免疫。

[0300] 本发明的鞭毛蛋白衍生肽通过活化TLR5系统来引起先天性免疫应答,这里具体而言当通过粘膜途径给予时引起TLR5介导的粘膜应答。

[0301] 具体地讲,体内试验表明,本发明的鞭毛蛋白衍生肽显示出粘膜佐剂活性,这种活性能够加强对靶标抗原的全身应答和粘膜应答。

[0302] 先天性免疫应答通过刺激适应性免疫应答来增加对抗原的免疫应答。因此,本发明鞭毛蛋白衍生肽与一种或多种抗原的组合可提供用于在个体中诱导免疫应答的有效免疫原性组合物或疫苗。

[0303] 抗原和/或免疫调节分子与本发明鞭毛蛋白衍生肽的组合,可在本领域公知的多种临床前毒理学和安全性研究中进行试验。

[0304] 例如,可在这样的动物模型中评价这种组合:该抗原已被发现在该动物模型中具有免疫原性,且该动物模型可通过与提议用于人临床试验的途径相同的途径可再现地进行免疫。

[0305] 抗原和/或免疫调节分子与本发明鞭毛蛋白衍生肽的组合,可例如通过由美国食品与药物管理局生物制品评价与研究中心与美国国家过敏症与传染病研究所(Goldenthal, KL等人. AID Res Hum Retroviruses, 9: S45-9(1993))提出的方案进行试验。

[0306] 本领域技术人员会知道如何为抗原和/或免疫调节分子与本发明鞭毛蛋白衍生肽的具体组合确定适当的抗原负荷、免疫途径、剂量、抗原纯度和可用于在特定动物物种中治疗特定病理状况的接种方案。

[0307] 用于诱导免疫应答的本发明免疫原性组合物或疫苗,可与药物可接受的介质一起作为溶液或悬浮液给予。

[0308] 这种药物可接受的介质可为例如水、磷酸缓冲盐水、生理盐水或其他生理缓冲盐水、或者其他溶剂或介质,如二元醇、甘油和油(如橄榄油)或可注射有机酯。药物可接受的介质还可含有脂质体或胶束,且可含有通过将多肽或肽抗原与去污剂和糖苷(如Quil A)混合在一起制备的免疫刺激复合物。

[0309] 下文将针对能诱导TLR5介导的粘膜应答的化合物,给出更多的用于在药物可接受的介质中制备和给予本发明的鞭毛蛋白衍生肽的方法。

[0310] 本发明的免疫原性组合物或疫苗可通过多种途径给予以刺激免疫应答。例如,这些免疫调节分子可通过皮下、真皮内、淋巴内、肌肉内、肿瘤内、膀胱内、腹膜内和脑内途径递送。

[0311] 本领域技术人员会知道如何选择用于本发明鞭毛蛋白衍生肽的具体制剂的适当递送途径。

[0312] 在本发明的一个优选实施方案中,用于在哺乳动物中治疗或预防感染的接种方法包括使用本发明的疫苗,该疫苗具体而言将通过粘膜(例如眼、鼻内、口腔、胃、肺、肠、直肠、引导或尿道)表面给予。

[0313] 鼻递送途径可用于同时诱导粘膜免疫应答和全身免疫应答。有多种装置可以便利

且有效地递送制剂到鼻腔和肺组织。

[0314] 鼻递送途径在此可特别值得关注,因为本发明的鞭毛蛋白衍生肽在粘膜区室中显示显著的佐剂活性,却没有任何显著的全身促炎副作用。

[0315] 在接种方案中,可有利地通过粘膜途径给予疫苗,疫苗可作为单独剂量给予,或者优选地根据初次免疫/加强免疫模式每周或每月给予数次,例如两次、三次或四次。适当的剂量根据各种参数而定。

[0316] 接种方案可为严格的粘膜方案,或者为混合方案,其中疫苗的初次免疫剂量通过粘膜途径(例如鼻内途径)给予,而加强免疫剂量通过胃肠外途径给予,反之亦可。

[0317] 制剂

[0318] 制备药物制剂或组合物的方法包括使活性成分与载体及任选的一种或多种辅助成分结合在一起的步骤。

[0319] 一般而言如下制备制剂:将活性成分与液体载体或粉碎的固体载体或两者均匀地和紧密的结合在一起,然后有必要的话将产品成形。

[0320] 用于口服给予活性成分的液体剂型包括药物可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了活性成分之外,液体剂型还可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具体而言为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇、脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,以及它们的混合物。

[0321] 除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可包含佐剂如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、香味剂和防腐剂。

[0322] 混悬剂制剂除了含有活性成分之外还可含有悬浮剂,例如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶以及它们的混合物。

[0323] 供直肠或阴道给予的本发明药物组合物的制剂可作为栓剂提供,其可通过将活性成分与一种或多种合适的非刺激性赋形剂或载体(包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂用蜡或水杨酸盐)混合来制备,且在室温下为固体而在体温下为液体,从而在直肠或阴道中会熔化而释放出活性成分。本发明的适合于阴道给予的制剂还包括含有本领域已知适用的载体的阴道栓剂、棉塞、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂。

[0324] 适合于胃肠外给予的本发明药物组合物包含活性成分和与其相组合的一种或多种药物可接受的无菌等渗含水或非水载体,包括溶液剂、分散剂、混悬剂或乳剂或者可在临用前重构成无菌可注射溶液剂或分散剂的无菌散剂,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、使制剂与预定接受者的血液等渗的溶质或者悬浮剂或增稠剂。

[0325] 可应用于本发明药物组合物的合适的含水和非水载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和它们的合适混合物、植物油如橄榄油、以及可注射的有机酯如油酸乙酯。可例如通过使用包衣材料如卵磷脂,通过维持所需的颗粒大小(在分散剂的情况下),和通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。

[0326] 这些组合物还可含有佐剂如湿润剂、乳化剂和分散剂。还可能需要在组合物中包含等渗剂,如糖类、氯化钠等。另外,可通过掺入能延迟吸收的物质如单硬脂酸铝和明胶,实现可注射药物形式的延长吸收。

[0327] 可通过形成活性成分于生物可降解聚合物(如聚丙交酯-聚乙醇酸交酯)中的微囊基质,制备出可注射的长效制剂形式。根据活性成分与聚合物的比例和具体采用的聚合物的性质,可控制活性成分的释放速度。其他生物可降解聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。长效可注射制剂也可通过将活性成分包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳中来制备。可注射材料可例如通过用细菌保留滤器过滤来进行除菌。

[0328] 制剂可以单剂量提供,或者以多剂量密封容器(例如安瓿和小瓶)提供,且可在冻干条件下保存,在临用前仅需要加入无菌液体载体如注射用水。可从上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂即时制备注射溶液和混悬剂。

[0329] 抗原和免疫佐剂化合物在本发明疫苗组合物中的量及所给予的剂量,通过制药领域技术人员公知的技术来确定,其中要考虑到诸如以下的因素:具体的抗原,具体的动物或患者的年龄、性别、体重、物种和状况,以及给予途径。

[0330] 在一个优选的实施方案中,本发明的疫苗组合物还包含一种或多种选自以下的组分:表面活性剂、吸收促进剂、吸水聚合物、抑制酶促降解的物质、醇、有机溶剂、油、pH控制剂、防腐剂、渗透压控制剂、抛射剂、水以及它们的混合物。

[0331] 本发明的疫苗组合物还可包含药物可接受载体。载体的量将取决于其他成分所选定的量、抗原的所需浓度、给予途径的选择(口服还是胃肠外途径)等。载体可在任何方便的时间加到疫苗。在冻干的疫苗的情况中,可例如在临给予前加入载体。或者,最终产品可制造成带有载体。

[0332] 适当的载体的例子包括但不限于无菌水、盐水、缓冲液、磷酸缓冲盐水、缓冲氯化钠、植物油、极限必需培养基(MEM)、带HEPES的MEM,等等。

[0333] 任选地,本发明的疫苗组合物可含有不同数量的常规次要佐剂,数量取决于该佐剂和所需的结果。通常的数量在约0.02%(重量)至约20%(重量)的范围内,取决于其他成分和所需的效果。

[0334] 合适的次要佐剂的例子包括但不限于稳定剂;乳化剂;氢氧化铝;磷酸铝;pH调节剂,如氢氧化钠、盐酸等;表面活性剂,如Tween.RTM.80(聚山梨醇酯80,可从Sigma Chemical Co.(St.Louis,Mo.)市售获得);脂质体;iscom佐剂;合成的糖肽,如胞壁酰二肽;增量剂,如右旋糖苷或者右旋糖苷与例如磷酸铝的组合;聚羧乙烯;细菌细胞壁,如分枝杆菌细胞壁提取物;它们的衍生物,如短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*);痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acne*);牛分支杆菌(*Mycobacterium bovis*),例如卡介苗(*Bovine Calmette Guerin, BCG*);牛痘或动物痘病毒蛋白;亚病毒颗粒佐剂,如环状病毒;霍乱毒素;N,N-双十八烷基-N',N'-双(2-羟乙基)-丙二胺(吡啶);单磷酸脂质A;二甲基双十八烷基溴化铵(DDA,可从Kodak公司(Rochester,N.Y.))市售获得;它们的合成物和混合物。理想地,将氢氧化铝与其他的次要佐剂或免疫佐剂如Quil A混合在一起。

[0335] 合适的稳定剂的例子包括但不限于蔗糖、明胶、蛋白胨、消化的蛋白质提取物如NZ-胺或NZ-胺AS。乳化剂的例子包括但不限于矿物油、植物油、花生油和其他可用于注射剂或鼻内疫苗组合物的标准、可代谢、无毒的油。

[0336] 出于本发明的目的,这些佐剂在本文指称为“次要”仅仅是为了与上述的免疫佐剂化合物形成对比,该免疫佐剂化合物由Rho GTP酶激活剂组成,因为其与抗原物质相组合以显著提高针对该抗原物质的体液免疫应答的作用而作为疫苗组合物中的必要成分。次要佐



剂主要是作为加工助剂包括在疫苗制剂中,尽管某些佐剂的确具有一定程度的免疫增强性质从而具有双重目的。

[0337] 常规的防腐剂可以以约0.0001%(重量)至约0.1%(重量)的有效量加到疫苗组合物。取决于制剂中所采用的防腐剂,这个范围以下或以上的数量也可使用。典型的防腐剂包括例如山梨酸钾、焦亚硫酸钠、苯酚、羟苯甲酯、羟苯丙酯、硫柳汞等。

[0338] 失活的、修饰的或其他类型的疫苗组合物的选择以及本发明的改进的疫苗组合物制剂的制备方法,是本领域普通技术人员知道的或者容易确定的。

[0339] 药理学上有效量的本发明免疫佐剂化合物可例如口服给予、胃肠外给予或以其他方式给予,且优先通过粘膜途径给予,在给予抗原物质的同时给予、相续给予或不久以后给予,以增强、加速或延长抗原的免疫原性。

[0340] 虽然疫苗组合物的剂量显著取决于抗原、已接种的或要接种的宿主的物种等,但药理学上有效量的疫苗组合物的剂量通常将为每剂约0.01 $\mu$ g至约500 $\mu$ g(具体而言50 $\mu$ g至约500 $\mu$ g)的本发明免疫佐剂化合物(主要基于图6所示的结果)。

[0341] 组合中的具体抗原物质的量会影响为改进免疫应答所需的本发明免疫佐剂化合物的量,不过设想到业内人士可容易地通过常规试验调整免疫佐剂化合物的有效剂量以符合具体的情况。

[0342] 一般而言,本发明的疫苗组合物便利地通过口服、胃肠外(皮下、肌肉内、静脉内、真皮内或腹膜内)、口腔内、鼻内或透皮途径给予。本发明所设想的给予途径将取决于抗原物质和辅助剂(co-formulant)。例如,如果疫苗组合物含有皂苷类,虽然它们口服或鼻内给予时是无毒的,但必须小心不要将皂苷元糖苷注射到血流中,因为它们起到强溶血剂的作用。还有,许多抗原如果口服的话将不会有效。优选地,疫苗组合物通过皮下、肌肉内或鼻内途径给予。

[0343] 疫苗组合物的剂量将显著取决于所选择的抗原、给予途径、物种和其他标准因素。设想到,本领域普通技术人员可很容易地滴定出用于针对每种抗原的免疫应答的适当剂量,以获知有效的免疫量和给予方法。

[0344] 本说明书中别处已经指明的是,本发明的又一个目标是供给予粘膜表面的本发明疫苗组合物。

[0345] 这种给予方式具有重大意义。的确,粘膜含有众多树突细胞和朗格汉斯细胞,它们是极好的抗原检测和抗原呈递细胞。粘膜还与被称为粘膜相关淋巴组织的淋巴器官连接,这些器官能够将免疫应答传递到其他粘膜区域。这种上皮的例子是鼻上皮膜,其实际上由单层的上皮细胞组成(假复层上皮),而上呼吸道中的粘膜与两个淋巴组织即淋巴腺和扁桃体连接。鼻粘膜下的一大片毛细血管网络具有高密度的B细胞和T细胞,这些细胞特别适合于提供对抗原的快速识别和提供快速的免疫应答。

[0346] 优选地,粘膜表面选自鼻、肺、口、眼、耳、胃肠道、生殖道、阴道、直肠和皮肤的粘膜表面。

## 实施例

[0347] 实施例1缺失超可变区的鞭毛蛋白的免疫佐剂作用

[0348] 材料和方法

[0349] 重组鞭毛蛋白的产生

[0350] 来源于鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028鞭毛蛋白FliC(登录号AAL20871)的重组鞭毛蛋白。

[0351] 鞭毛蛋白FliC和FliC $\Delta$ <sub>205-293</sub>如之前所描述(Yoshioka等人,1995.Flagellar filament structure and cell motility of Salmonella typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin(缺乏鞭毛蛋白的一部分外结构域的鼠伤寒沙门氏菌的鞭毛丝结构和细胞运动性).J.Bacteriol.177:1090-1093; Didierlaurent等人,2004.Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response(鞭毛蛋白能促进Th2型应答的髓样分化因子88依赖性发展).J.Immunol.172:6922-6930;Sierra等人,2001,Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells(鞭毛蛋白对肠上皮细胞的刺激能引发CCL20介导的树突细胞迁移).Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98:13722-13727)从鼠伤寒沙门氏菌菌株SIN22(f1jB)和SJW46分离得到,或者购自Alexis Biochemicals(瑞士)。

[0352] 编码FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>和FliC $\Delta$ <sub>191-352</sub>的构建物,是在pBR322衍生的具有野生型f1iC基因SEQ ID N° 3的质粒上,在该质粒自身的启动子控制下,使用以下引物对通过PCR产生的:***AGCACC***attcagcgtatccagacc(SEQ ID N° 15)/***GCTGGT***gctacaaccaccgaaaac(SEQ ID N° 16),和***TCGAG***atatacctgtaacagttgcagcc(SEQ ID N° 17)/***ACTCGAG***gacggtacatccaaaactgcac(SEQ ID N° 18)(编码接头的碱基以斜体表示)。

[0353] 还在具有FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>的质粒上进行定点诱变,以使参与TLR5检测的残基89-96(QRVRELAV)被来自非信号转导鞭毛蛋白(DTVKVKAT)的相应序列替代;所得的蛋白质因此为FliC $\Delta$ <sub>174-400/89-96\*</sub>。

[0354] 在FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>、FliC $\Delta$ <sub>191-352</sub>和FliC $\Delta$ <sub>174-400/89-96\*</sub>中,离末端6个残基处的天冬酰胺被换成丝氨酸。

[0355] 如下所述从重组鼠伤寒沙门氏菌SIN41(f1iC f1jB)的上清液纯化截短的鞭毛蛋白。将沙门氏菌在Luria-Bertani(LB)肉汤中37°C搅拌下生长18小时。将上清液过滤,并用60%硫酸铵(Sigma Aldrich,美国)饱和。离心回收沉淀的物质,溶解于20mM Tris/HCl pH7.5,然后透析。通过依次进行羟基磷灰石处理和阴离子交换层析(Bio-Rad Laboratories,美国),对蛋白质进行进一步的纯化。最后,用多粘菌素B柱(Pierce,美国),使蛋白质脱去脂多糖(LPS)。使用鲎测定法(Associates of Cape Cod Inc.,美国),测出残余LPS浓度小于30pgLPS/ $\mu$ g重组鞭毛蛋白。

[0356] 当指明时,将鞭毛蛋白用0.017%胰蛋白酶-EDTA(Invitrogen,美国)在37°C下处理1小时以完全水解蛋白质,然后在70°C下加热1小时以灭活胰蛋白酶。用标准的SDS-PAGE分析蛋白质,并用FliC特异性多克隆抗体进行免疫印迹分析。

[0357] 动物实验

[0358] 雌性NMRI小鼠(6-8周龄)购自Charles River Laboratories实验室(法国),并在经认可的机构(#A59107;法国里尔巴斯德研究所)中维持在特殊的无病原体的设施中。所有实验均符合现行的国家法规和机构法规以及伦理规则。

[0359] 为进行超免疫,在第1天给动物皮下注射在200 $\mu$ l的完全弗氏佐剂(CFA)/PBS中乳化的鞭毛蛋白FliC(1 $\mu$ g每次注射),并在第21、35和49天皮下注射在200 $\mu$ l的不完全弗氏佐剂(IFA)/PBS中乳化的鞭毛蛋白FliC(1 $\mu$ g每次注射)。在第63天,静脉内给予小鼠200 $\mu$ l鞭毛蛋白/PBS,两小时后通过腹膜内注射5mg戊巴比妥钠(CEVA SantéAnimale,法国)将小鼠处死以进行血清和组织采样和分析。

[0360] 为表征粘膜先天性应答和佐剂性质,将20 $\mu$ l的PBS $\pm$ 蛋白质鼻内给予经麻醉的小鼠,麻醉是通过每25g动物经腹膜内给予1.5mg氯胺酮(Merial,法国)和0.3mg赛拉嗪(Bayer,德国)进行。

[0361] 为研究促炎应答,小鼠在2小时进行采样(以进行RNA和基因表达测定)或在6小时进行采样(以测试细胞因子的生成)。

[0362] 为进行免疫测定,在第1天和第21天对小鼠i.n.给予PBS $\pm$ 去除LPS的卵清蛋白(OVA)(20 $\mu$ g, Sigma, VII等级,美国) $\pm$ 鞭毛蛋白(1 $\mu$ g)。在第35天采集支气管肺泡灌洗液(BAL)和血清。

[0363] 为评估中和作用,将免疫血清和模拟血清在56 $^{\circ}$ C下加热30分钟以使补体失活。在用鞭毛蛋白进行全身活化前1小时,通过静脉内途径将系列血清稀释液(于200 $\mu$ l的PBS中)被动转移到动物。在一些实验中,将血清与稀释于PBS中的鞭毛蛋白混合,并i.n.给予以测试粘膜中和作用。

[0364] 在气管内注射1ml含完全蛋白酶抑制剂混合物(cocktail)(Roche,瑞士)的PBS后收集BAL,并离心澄清。

[0365] 收集血液样本,在室温下凝固,然后离心分离血清。

[0366] 通过用2ml补加有蛋白酶抑制剂的T-PER组织蛋白提取试剂(Pierce,美国)均化肺组织,制备肺蛋白提取物。所有样本在分析前保存于-80 $^{\circ}$ C下。

[0367] 抗原特异性抗体应答的分析

[0368] 用ELISA评估血清和BAL样本中的OVA特异性或鞭毛蛋白特异性抗体的含量。

[0369] 简而言之,将OVA(20 $\mu$ g/孔,于磷酸盐缓冲液0.2M pH 6.5中)和鞭毛蛋白FliC(100ng/孔,于PBS中)在MaxiSorp微量培养板(NalgeNunc Int.,美国)上4 $^{\circ}$ C包被过夜。所有的微量培养板均用PBS/Tween20 0.05%洗涤,然后用PBS/乳粉1%在室温下封闭1小时。

[0370] 将样本的系列稀释液在室温下温育1小时,然后显色。生物素酰化的抗小鼠IgG或IgA抗体(Southern Biotechnology Associates,美国)、HRP缀合的链霉亲和素(GE Healthcare,美国)和3,3',5,5'四甲基联苯胺(Becton Dickinson Bioscience,美国)用作显色试剂。通过加入H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,然后于450nm处测定OD。

[0371] IgG滴度的定义,对于OVA,为产生0.15 OD的吸光值的最高样本稀释度的倒数,对于FliC,为产生0.5 OD的吸光值的最高样本稀释度的倒数,并将IgG滴度与参考血清进行系统地比较。滴度以得自各个小鼠的滴度的几何平均值表示。

[0372] 测量BAL中的总IgA水平和OVA特异性IgA水平,并用由市售小鼠IgA(Sigma)得到的校准曲线进行归一化。确定每个小鼠的特异性IgA比例(以OVA特异性IgA的ng数/ $\mu$ g总IgA表示)。

[0373] 细胞因子特异性ELISA和基因表达

[0374] 用市售的ELISA试剂盒(R&D Systems,美国),测量血清、BAL、总肺和/或细胞培养

物上清液中的小鼠CXCL2和CCL20和人IL-8(CXCL8)水平。

[0375] 用Nucleospin RNA II试剂盒(Macherey Nagel,德国)从小鼠肺提取总RNA,并用High-Capacity cDNA Archive试剂盒(Applied Biosystems,美国)进行反转录。所得的cDNA用基于SYBR Green的实时PCR(Applied Biosystems)进行扩增。

[0376] 特异性引物为CGTCATCCATGGCGAACTG(SEQ ID N° 19)/GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT(SEQ ID N° 20)(ACTB,编码β-肌动蛋白)、TTTTGGGATGGAATTGGACAC(SEQ ID N° 21)/TGCAGGTGAAGCCTTCAACC(SEQ ID N° 22)(CCL20)和CCCTCAACGGAAGAACCAAAA(SEQ ID N° 23)/CACATCAGGTACGATCCAGGC(SEQ ID N° 24)(CXCL2)。如之前所描述(Sierro等人,2001,Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells(鞭毛蛋白对肠上皮细胞的刺激能引发CCL20介导的树突细胞迁移).Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98:13722-13727),通过比较(a)目的基因和ACTB的PCR循环阈值(Ct)( $\Delta Ct$ )和(b)处理组和对照组的 $\Delta Ct$ 值( $\Delta \Delta Ct$ ),确定相对mRNA水平( $2^{-\Delta \Delta Ct}$ )。

### [0377] 基于细胞的测定

[0378] 用具有在人CCL20启动子控制下的萤光素酶基因的质粒稳定转染Caco-2人结肠腺癌细胞系(Rumbo等人,2004,Lymphotoxin betareceptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium(淋巴毒素β受体信号转导能诱导肠上皮中的细胞因子CCL20).Gastroenterol.127:213-223),产生Caco-Rumbo细胞系。

[0379] 将这些肠上皮细胞在Dulbecco改进的Eagle培养基中生长,该培养基补加有10%胎牛血清、10mM HEPES、非必需氨基酸1X、青霉素(100U/ml)和链霉素(100U/ml)及(为了转基因选择)0.7mg/mL G418(Invitrogen)。

[0380] 将人支气管上皮细胞系BEAS-2B在Kaigh F12营养培养基中进行培养,该培养基如Caco-Rumbo培养基一样补加,还补加1mM丙酮酸钠和胰岛素-转铁蛋白-硒混合物(Invitrogen)。

[0381] 将细胞用重组鞭毛蛋白刺激6小时以进行萤光素酶测定,或者刺激16小时然后收获上清液进行ELISA。

[0382] 用Bright Glo萤光素酶测定法(Promega,美国)测量细胞提取物中的萤光素酶活性。对于用重组鞭毛蛋白进行的活化试验,相对发光(RLU)归一化为野生型鞭毛蛋白的最大活性的百分数。对于体外中和作用试验,RLU归一化为每种蛋白质的最大活性的百分数: $[(RLU_{处理}/RLU_{未处理})/(RLU_{最大}/RLU_{未处理})] \times 100$ 。

### [0383] 统计学分析

[0384] 用Mann-Whitney试验分析统计学差异,p值<0.05时认为差异显著。结果以算术平均值±标准偏差表示,除非另有指明。

### [0385] 结果

#### [0386] 鞭毛蛋白超可变区的缺失会削弱抗原性,但不会改变TLR5刺激活性

[0387] 通过内部缺失构建了两种新型鞭毛蛋白分子(FliC $\Delta$ 191-352和FliC $\Delta$ 174-400,分别由336个和271个氨基酸组成)(图1A)。

[0388] 作为对照,我们使用了之前表征的变体FliC $\Delta$ 204-292,其在抗原结构域中具有部分缺失(Yoshioka等人,1995,Flagellar filament structure and cell motility of

Salmonella typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin (缺乏鞭毛蛋白的一部分外结构域的鼠伤寒沙门氏菌的鞭毛丝结构和细胞运动性). *J. Bacteriol.* 177:1090-1093 (Fig. 1A)。

[0389] 作为体外和体内实验的阴性对照,将能削弱TLR5信号转导的突变引入到FliC $\Delta$ 174-400中,产生重组蛋白FliC $\Delta$ 174-400/89-96\*。

[0390] 各个鞭毛蛋白的预测结构表明,模体89-96和保守区域的总体结构没有改变(图1A)。

[0391] 除了FliC $\Delta$ 204-292以外,各变体不能够补足鞭毛蛋白缺陷型细菌的运动性,且被分泌到培养上清液中。

[0392] 其次,我们评估了重组鞭毛蛋白的内在抗原性。为此,将饱和浓度的鞭毛蛋白包被到微量培养板上,并用对FliC或FliC $\Delta$ 174-400具有特异性的超免疫血清通过ELISA进行探测。

[0393] 如图1B中所示,我们观察到抗FliC血清对FliC变体滴定与对野生型FliC滴定相比,抗体滴度低3至10倍。

[0394] 相比之下,无论是什么目标鞭毛蛋白,对FliC $\Delta$ 174-400具有特异性的超免疫血清的反应性都相似(图1C)。

[0395] 这些结果提示,中部超可变区是抗鞭毛蛋白抗体的主要靶标。

[0396] 最后,我们试图确定重组分子是否保持任何TLR5刺激活性。

[0397] 用Caco-Rumbo报道细胞和肺上皮细胞系BEAS-2B进行了剂量响应分析。通过测量Caco-Rumbo细胞中的萤光素酶活性和BEAS-2B细胞的IL-8分泌量,评估激活情况(基于细胞因子CCL20(也称“肝脏活化的和调节的细胞因子(或LARC)”和IL-8的表达,人肠上皮细胞系是鞭毛蛋白/TLR5刺激活性的独特报道细胞)。

[0398] 如图2A-B所示,FliC $\Delta$ 204-292、FliC $\Delta$ 191-352和FliC $\Delta$ 174-400都是强效的细胞激活剂。各个鞭毛蛋白各自的EC50值随细胞类型稍有变化,但落入之前描述的ng/mL范围之内(Smith等人,2003,Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin protofilament formation and bacterial motility(Toll样受体5能识别鞭毛蛋白原丝形成和细菌运动性上的保守位点). *Nat. Immunol.* 4:1247-1253)。

[0399] 发现重组鞭毛蛋白的活性完全依赖于TLR5,因为FliC $\Delta$ 174-400/89-96\*不能够激活上皮细胞。

[0400] 用源自TLR5缺陷型小鼠的骨髓巨噬细胞进一步证实了对TLR5信号转导的需求;细胞在用重组鞭毛蛋白刺激时并没有合成任何IL-12p40(数据未显示)。

[0401] 缺失的鞭毛蛋白能刺激TLR5依赖性粘膜先天性应答

[0402] 然后通过粘膜途径体内研究了重组鞭毛蛋白对TLR5的刺激。

[0403] 为此,采用qRT-PCR,对经鞭毛蛋白i.n.处理的小鼠的肺中的CCL20和CXCL2表达进行了定量(图2C)。

[0404] 在2小时内,用野生型鞭毛蛋白或重组鞭毛蛋白处理的动物与模拟处理的动物相比,肺部CCL20 mRNA水平约30倍高。

[0405] 此外,在滴注后6小时,在肺均浆和BAL中都检测到CCL20细胞因子的产生(图2D)。在对照实验中,FliC $\Delta$ 174-400/89-96\*和胰蛋白酶消化的鞭毛蛋白没有诱导这种类型的作用。对于CXCL2也观察到类似的发现(数据未显示)。

[0406] 这些结果证实了体内促炎应答仅由重组鞭毛蛋白所致。

[0407] 总之,在超可变区中具有缺失的鞭毛蛋白显示出与野生型FliC对等物相当的粘膜促炎性质。

[0408] 重组鞭毛蛋白显示出粘膜佐剂活性

[0409] 为了表征我们的重组分子的佐剂性质,在进行i.n.免疫后研究了在血清和分泌物中的抗体应答。

[0410] 卵清蛋白(OVA)用作模型抗原,将其与或不与各种鞭毛蛋白进行配制或者与霍乱毒素(CT)进行配制,作为金标准粘膜佐剂。

[0411] 与单独用OVA免疫的动物相比,FliC与OVA共给予显著提高了OVA特异性IgG响应(在血清和BAL中均如此,分别提高300倍和100倍)(图3A-B)。

[0412] 此外,在BAL中OVA特异性IgA应答得到增强,由此提示FliC能促进粘膜佐剂的原型分泌抗体应答(图3C)。有趣的是,FliC的作用与CT的作用类似。

[0413] 与FliC一样,重组鞭毛蛋白FliC $\Delta$ <sub>204-292</sub>、FliC $\Delta$ <sub>191-352</sub>和FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>也因此能够加强全身应答和粘膜应答。

[0414] 相比之下,FliC $\Delta$ <sub>174-400/89-96\*</sub>和胰蛋白酶处理的鞭毛蛋白缺乏功效(图3和表1)。

[0415] 因此,鞭毛蛋白的超可变区的缺失没有显著影响TLR5介导的粘膜佐剂性质。我们的数据还显示,各个重组分子各自对先天性和适应性免疫的作用是相关连的。

[0416] 超可变区的缺失会削弱引发抗鞭毛蛋白抗体的能力

[0417] 抗原结构域的缺失预期会降低鞭毛蛋白特异性免疫应答,从而降低对TLR5介导的免疫性的任何中和作用,特别是在反复进行给予的情况下。

[0418] 我们因此决定评估i.n.免疫对于FliC特异性抗体的诱导的功效。

[0419] 如所示,FliC在血清和BAL中引发了强烈的IgG应答(表1和图4)。相比之下,FliC $\Delta$ <sub>204-292</sub>在这两种流体中引发的抗体水平比FliC引发的低10倍,在用FliC $\Delta$ <sub>191-352</sub>和FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>免疫后观察到更明显的作用。

[0420] 总之,鞭毛蛋白的抗原结构域和免疫刺激结构域在功能上是分开的。因此,FliC $\Delta$ <sub>191-352</sub>和FliC $\Delta$ <sub>174-400</sub>是用于防止或削弱具有中和活性的鞭毛蛋白特异性抗体的生成的值得关注的分子。

[0421] 鞭毛蛋白特异性抗体能中和TLR5介导的信号转导

[0422] 细菌鞭毛蛋白已知能引发主要针对超可变区的强烈的抗体应答。我们猜测,抗鞭毛蛋白抗体会中和鞭毛蛋白的TLR5刺激活性。

[0423] 因此,用鞭毛蛋白FliC或模拟制品(单独PBS或者在CFA中配制的非相关抗原卵清蛋白(OVA))对小鼠进行皮下免疫,然后用IFA进行加强免疫。ELISA分析揭示,抗FliC血清显示出特异性IgG滴度 $>10^6$ ,而模拟血清滴度低于该测定法的检测阈( $10^2$ )。

[0424] 如上所述,基于细胞因子CCL20(也称“肝脏活化的和调节的细胞因子”,LARC),人肠上皮细胞系是鞭毛蛋白/TLR5刺激活性的独特报道细胞。

[0425] 因此在此使用具有在CCL20启动子控制下的荧光素酶基因的Caco-Rumbo细胞,证明抗FliC血清能够完全中和FliC的TLR5激动活性(图5A)。

[0426] 然后直接在经免疫的动物中评估FliC特异性抗体对TLR5信号转导的中和作用。为此,给小鼠静脉内注射FliC,然后研究小鼠中的全身促炎应答(CCL20和CXCL2细胞因子的生

成)(图5B-C)。

[0427] 在模拟免疫的动物中,相比于PBS攻击,FliC攻击引发了CCL20和CXCL2的血清水平的显著提高。

[0428] 相比之下,在FliC免疫的动物中,任何一种攻击都没有增强细胞因子的生成。在未经免疫的动物中使用被动血清转移,发现了注射的抗体量与全身先天性应答之间的紧密相关性,如图5D所示。

[0429] 总之,预先存在的对鞭毛蛋白的免疫性在体外和体内都能中和后者的TLR5刺激活性。

[0430] 但对于FliC $\Delta$ 174-400并非如此,其促进鞭毛蛋白特异性抗体(包括中和性抗体在内)的生成的能力被大大削弱,如前面根据图4所公开的。

[0431] 确定了通过i.n.途径引发TLR5介导的先天性应答所需的有效剂量。FliC和FliC $\Delta$ 174-400显示出类似的剂量-响应曲线,选择0.1 $\mu$ g剂量用于后续的中和测定(图6)。

[0432] 为此,用FliC对动物进行i.n.超免疫以引发强烈的FliC特异性粘膜IgG应答(平均滴度约45,000),然后用0.1 $\mu$ g FliC或FliC $\Delta$ 174-400鞭毛蛋白进行攻击。监测了BAL中的促炎细胞因子的生成。

[0433] 如在未经免疫的动物中观察到,用FliC或FliC $\Delta$ 174-400攻击导致了CCL20生成(在模拟免疫的小鼠和FliC免疫的小鼠中分别为 $4.28 \pm 1.98$ 对 $1.08 \pm 0.54$ ng/ml和 $2.48 \pm 1.22$ 对 $0.93 \pm 0.48$ ng/ml)。

[0434] 粘膜和全身TLR5依赖性应答在不同程度上取决于鞭毛蛋白超可变区

[0435] 我们还想研究鞭毛蛋白特异性抗体对静脉内注射重组鞭毛蛋白后诱导的TLR5依赖性应答的中和作用。

[0436] 为分析先天性免疫的全身激活,通过ELISA测量了血清中的循环促炎细胞因子CCL20和CXCL2的生成(图7)。

[0437] 我们出乎意料地观察到,与野生型FliC相比,FliC $\Delta$ 174-400引发全身促炎作用的能力被削弱大约100倍。

[0438] 而10 $\mu$ g FliC $\Delta$ 174-400却稍微刺激了细胞因子的生成,在TLR5模体FliC $\Delta$ 174-400/89-96\*中发生突变的变体缺乏活性(对于CCL20而言, $0.85 \pm 0.27$ 对 $0.02 \pm 0.00$ ng/ml)。

[0439] 这与FliC $\Delta$ 204-292和FliC $\Delta$ 191-352形成了对比,后两者如同FliC一样都是强效激活剂。

[0440] 因此,超可变区上的某些分子决定簇(或者取决于超可变区的某些分子决定簇)为全身TLR5刺激所必需,但不是粘膜TLR5刺激所必需。总而言之,我们的结果表明,粘膜区室和全身区室当中的TLR5活化是由不同的机制控制的。

[0441] 实施例2:选自FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405的缺失超可变区的鞭毛蛋白的生物活性

[0442] 重组缺失超可变区的鞭毛蛋白的产生

[0443] 通过进行以上实施例1公开的同一方法,重组产生各种缺失超可变区的鞭毛蛋白,即FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405、FliC $\Delta$ 138-405和FliC $\Delta$ 100-405。

[0444] 图8和9示出了所述重组产生的蛋白质的分析。

[0445] 图8显示了在重组蛋白上进行的SDS PAGE电泳的结果,所述蛋白从得自相应的重组鼠伤寒沙门氏菌SIN41细菌细胞的培养上清液收集,在用TCA进行蛋白质沉淀的步骤后进

行SDS PAGE电泳。

[0446] 图9显示了用抗FliC多克隆抗体在得自相应的重组鼠伤寒沙门氏菌SIN41细菌细胞的培养上清液上进行的蛋白质印迹测定的结果,蛋白质印迹测定是在用TCA进行蛋白质沉淀的步骤后进行。

[0447] 缺失超可变区的鞭毛蛋白FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405的生物活性

[0448] 通过进行实施例1中所述的细胞因子特异性ELISA测定,测试了FliC $\Delta$ 174-400、FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405对CCL20和CXCL2的诱导的作用。

[0449] 简而言之,给C3H/HeJ(TLR4缺陷型)腹膜内注射10 $\mu$ g的缺失了位置174-400、161-405和138-405的不同重组鞭毛蛋白。

[0450] 2小时后,采集血清样本并处理以便进行细胞因子特异性ELISA(CCL20和CXCL2)。

[0451] 鞭毛蛋白制品源自之前用硫酸铵沉淀并进行透析的重组沙门氏菌的上清液(图8和9)。由于这些粗制品可能被内毒素污染,我们使用了TR4信号转导缺陷型小鼠,因为LPS可能是这些粗制品中的主要污染物。另外,我们使用了胰蛋白酶处理来证明生物活性存在于粗制品的蛋白质级份中。

[0452] 结果在图10(CCL20的诱导)和11(CXCL2的诱导)中示出。

[0453] 图10和11的结果提示,如对FliC $\Delta$ 174-400所述,重组鞭毛蛋白FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405有能力进行体内信号转导。

[0454] 这些结果提示,FliC $\Delta$ 161-405和FliC $\Delta$ 138-405是有效的TLR5激动剂,因此可代表有效的佐剂化合物。

[0455] 实施例3:FliC $\Delta$ 174-400对于针对来自HIV1病毒的gp140抗原的免疫应答的佐剂活性

[0456] 免疫方案和抗原特异性抗体应答的分析与实施例1中所述相同,例外之处在于以下说明的具体特征。

[0457] 简而言之,如下分析天然鞭毛蛋白FliC和重组FliC $\Delta$ 174-400对HIV1抗原gp140的佐剂活性:NMRI小鼠(n=8)在第1天和第21天用20 $\mu$ l的含有gp140(5 $\mu$ g/只小鼠)、不含或含有FliC或FliC $\Delta$ 174-400(1 $\mu$ g/只小鼠)的PBS进行鼻内免疫。

[0458] 在第35天采集血清和支气管肺泡灌洗液(BAL)样本,通过gp140特异性ELISA测定抗体滴度。

[0459] 结果在图12中示出,其中每个符号表示小鼠个体,条棒代表几何平均数。

[0460] 各符号表示的进行鼻内给予的小鼠分别如下:(i)圆圈:单独给予HIV1 gp140;(ii)菱形:给予HIV1 gp140+FliC $\Delta$ 174-400;(iii)三角形:给予gp140+FliC。

[0461] 血清样本的抗体滴度在图12左边部分以填充符号(实心符号)表示。支气管肺泡灌洗样本的抗体滴度在图12的右边部分以空心符号表示。

[0462] 结果显示,本说明书中定义的各种缺失超可变区的鞭毛蛋白由有效的免疫佐剂化合物组成。

[0463] 表1:重组鞭毛蛋白诱导的蛋白酶敏感性免疫应答\*

[0464]



	鼻内免疫*		抗 OVA IgG**		抗 FliC IgG**			
	血清		BAL		血清		BAL	
	平均值	标准 偏差	平均值	标准 偏差	平均值	标准 偏差	平均值	标准 偏差
PBS	ND***	0.0	ND	0.0	ND	0.0	ND	0.0
OVA	2.4	0.8	1.1	0.7	ND	0.0	ND	0.0
FliC + OVA	5.7	0.1	3.9	0.5	5.9	0.6	3.0	0.7
FliC <sub>Δ204-292</sub> + OVA	5.5	0.9	3.4	0.8	3.3	0.8	1.0	0.5
FliC <sub>Δ191-352</sub> + OVA	4.5	1.3	2.9	0.9	2.2	0.3	ND	0.0
FliC <sub>Δ174-400</sub> + OVA	4.9	0.9	2.7	0.9	2.0	0.1	0.1	0.2
TRP + OVA	3.4	1.2	1.3	0.8	ND	0.0	ND	0.0
FliC/TRP + OVA	2.8	0.5	1.1	0.6	ND	0.0	0.3	0.3
FliC <sub>D204-292</sub> /TRP + OVA	3.0	1.4	0.8	1.0	ND	0.0	ND	0.0
FliC <sub>D191-352</sub> /TRP + OVA	2.6	0.7	0.8	0.9	ND	0.0	ND	0.0
FliC <sub>D174-400</sub> /TRP + OVA	2.6	0.4	1.1	0.9	ND	0.0	ND	0.0

[0465] \*小鼠(n=8)在第1天和第21天用PBS、卵清蛋白(OVA)、OVA+鞭毛蛋白/鞭毛蛋白衍生肽或OVA+胰蛋白酶处理的鞭毛蛋白(TRP)进行i.n.免疫。在第35天,在血清和BAL中测量OVA特异性和FliC特异性IgG滴度。

[0466] 在Mann-Whitney试验中确定统计学显著性( $p > 0.05$ )。\*\*数值以Log<sub>10</sub>(滴度倒数)±标准偏差(SD)表示。在血清和BAL中,检测极限分别为2和0.3(1/100血清稀释度和1/2BAL稀释度)。

[0467] \*\*\*“ND”代表“未检测”。

[0468] 表2:序列

[0469]

SEQ ID N°	类型	说明
1	肽	鞭毛蛋白(FliC)
2	肽	FliC <sub>Δ174-400</sub>
3	核酸	鞭毛蛋白(FliC)
4	核酸	引物
5	核酸	引物
6	核酸	引物
7	核酸	引物
8	核酸	引物
9	核酸	引物
10	核酸	引物
11	核酸	引物

12	核酸	引物
13	核酸	引物
14	核酸	FliC $\Delta$ 174-400
15	核酸	引物
16	核酸	引物
17	核酸	引物
18	核酸	引物
19	核酸	引物
20	核酸	引物
21	核酸	引物
22	核酸	引物
23	核酸	引物
24	核酸	引物
25	肽	FliC $\Delta$ 161-405
26	肽	FliC $\Delta$ 138-405
27	肽	FliC $\Delta$ 100-405
28	核酸	FliC $\Delta$ 161-405
29	核酸	FliC $\Delta$ 138-405
30	核酸	FliC $\Delta$ 100-405

CPCH1063836P

## 序 列 表

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
(INSERM)

<120> Novel immunoadjuvant compounds and use thereof

<130> V882EU - INSERM

<160> 30

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 494

<212> PRT

<213> 肠炎沙门氏菌 (Salmonella enterica)

<400> 1

[0001] Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn  
1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser  
20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala  
35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser  
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala  
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val  
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln  
100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln  
115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr  
130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys  
145 150 155 160

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln  
165 170 175

Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp  
180 185 190

Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly  
195 200 205

[0002] Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp  
210 215 220

Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly  
225 230 235 240

Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val  
245 250 255

Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro Ala  
260 265 270

Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp Leu  
275 280 285

Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr Ala  
290 295 300

Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile Asp

305	310	315	320	
Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln	325	330	335	
Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp	340	345	350	
Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly	355	360	365	
Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser Lys	370	375	380	
Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala	385	390	395	400
Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala	405	410	415	
[0003]				
Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe	420	425	430	
Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser	435	440	445	
Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn	450	455	460	
Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala	465	470	475	480
Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg	485	490		
<210> 2				
<211> 271				
<212> PRT				

<213> 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)

<400> 2

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn  
1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser  
20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala  
35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser  
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala  
65 70 75 80

[0004] Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val  
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln  
100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln  
115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr  
130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys  
145 150 155 160

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Gly Ala Ala  
165 170 175

Gly Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu  
180 185 190

Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg  
 195 200 205

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr  
 210 215 220

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser  
 225 230 235 240

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu  
 245 250 255

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg  
 260 265 270

- <210> 3
- <211> 1488
- [0005] <212> DNA
- <213> 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)

<400> 3  
 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga ccagaataa cctgaacaaa 60  
 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tataacagc 120  
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcaa catcaaaggt 180  
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240  
 gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct 300  
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgctg 360  
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420  
 gacaacacc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480  
 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacctga atgtgcaaca aaaatataag 540  
 gtcagcgata cggctgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc ttagacaat 600  
 agtactttta aagcctcggc tactggtctt ggtgtactg accagaaaat tgatggcgat 660

	ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgccaaag ttaccgttac ggggggaact	720
	ggtaaagatg gctattatga agtttccggt gataagacga acggtgaggt gactcttgct	780
	ggcggtgcca cttccccgct tacagggtgga ctacctgcca cagcaactga ggatgtgaaa	840
	aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt	900
	gttaccggca cagcatctgt tgtaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt	960
	gatggtggtt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat	1020
	ggttcataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca	1080
	ctaaacaaac tgggtggcgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact	1140
	tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg	1200
	gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac	1260
	acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg	1320
	ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg	1380
[0006]	accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgag attctgcagc aggccggtac ctccgttctg	1440
	gcgcaggcga accagttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa	1488

<210> 4  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 4  
 agcagactga accgccag 18

<210> 5  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 5



	gctacaacca ccgaaaacc	19
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 6	
	aaccgcgtgc agaaaattg	19
	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 7	
[0007]	caggactttc acgccgtt	18
	<210> 8	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 8	
	cttcagatcg atatcgatag tttcac	26
	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 9	
	attcagcgta tccagacc	18

	<210> 10	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 10	
	gttccgcaaa gcgtcctctc ttactg	27
	<210> 11	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 11	
	cagtaaagag aggacgcttt gcggaac	27
[0008]	<210> 12	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 12	
	ggtgcagctg gagctacaac caccgaaaac c	31
	<210> 13	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 13	
	ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt g	31
	<210> 14	

<211>	819	
<212>	DNA	
<213>	肠炎沙门氏菌 ( <i>Salmonella enterica</i> )	
<400>	14	
	atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa	60
	tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc	120
	gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt	180
	ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc	240
	gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcgtt tcagtctgct	300
	aacagcacca actcccagtc tgacctgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg	360
	aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag	420
	gacaacaccc tgaccatcca ggttgggtgc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg	480
	aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatagctga atggtgctgc tgggtctaca	540
	accaccgaaa acccgctgca gaaaattgat gctgctttgg cacaggtga cacgttacgt	600
[0009]	tctgacctgg gtgcggtaca gaaccgttcc aactccgcta ttaccaacct gggcaacacc	660
	gtaaacaacc tgactttctgc ccgtagccgt atcgaagatt ccgactacgc gaccgaagtt	720
	tccaacatgt ctgcgcgca gattctgcag caggccggtg cctccgttct ggcgaggcgc	780
	aaccaggttc cgcaaagcgt cctctcttta ctgcgttaa	819
<210>	15	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	15	
	agcaccattc agcgtatcca gacc	24
<210>	16	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	16	
		gctggtgcta caaccaccga aaac	24
	<210>	17	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	17	
		tcgagatatc ctgtaacagt tgcagcc	27
	<210>	18	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0010]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	18	
		actcgaggac ggtacatcca aaactgcac	29
	<210>	19	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	19	
		cgtcatccat ggcgaactg	19
	<210>	20	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0011]			

<223> 引物	
<400> 20 gcttctttgc agctccttgc t	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 21 ttttgggatg gaattggaca c	21
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 22 tgcagtgaa gccttcaacc	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 23 ccctcaacgg aagaaccaaa	20
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

<400> 24  
cacatcaggt acgatccagg c

21

<210> 25  
<211> 253  
<212> PRT  
<213> 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)

<400> 25  
Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn  
1                   5                   10                   15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser  
                  20                   25                   30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala  
          35                   40                   45

[0012] Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser  
          50                   55                   60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala  
65                   70                   75                   80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val  
                  85                   90                   95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln  
                  100                   105                   110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln  
          115                   120                   125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr  
      130                   135                   140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys  
145                   150                   155                   160

Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln  
 165 170 175

Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn  
 180 185 190

Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala  
 195 200 205

Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met  
 210 215 220

Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln  
 225 230 235 240

Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg  
 245 250

[0013]

<210> 26  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)

<400> 26

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn  
 1 5 10 15

~~Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser~~  
 20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala  
 35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser  
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val  
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln  
100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln  
115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu  
130 135 140

Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp  
145 150 155 160

Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly  
165 170 175

[0014]

Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser  
180 185 190

Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln  
195 200 205

Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser  
210 215 220

Val Leu Ser Leu Leu Arg  
225 230

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 肠炎沙门氏菌 (Salmonella enterica)

&lt;400&gt; 27

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn



1	5	10	15
Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser	20	25	30
Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala	35	40	45
Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser	50	55	60
Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala	65	70	80
Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val	85	90	95
[0015] Gln Ser Ala Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala	100	105	110
Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn	115	120	125
Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu	130	135	140
Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val	145	150	160
Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val	165	170	175
Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg	180	185	190
<210> 28			
<211> 765			
<212> DNA			

<213> 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)

<400> 28

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60  
 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggctctgcg tatcaacagc 120  
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180  
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgvcagac cactgaaggc 240  
 gcgctgaacg aaatcaaaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct 300  
 aacagcacca actcccagtc tgacctgcac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360  
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420  
 gacaacaccc tgaccatcca gtttgggtcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480  
 aagggctcag ctggaaaccc gctgcagaaa attgatgctg ctttggcaca gttgacacg 540  
 ttacgttctg acctgggtgc ggtacagaac cgtttcaact ccgctattac caacctgggc 600  
 aacaccgtaa acaacctgac ttctgcccgt agccgtatcg aagattccga ctacgcgacc 660  
 gaagtttcca acatgtctcg cgcgcagatt ctgcagcagg ccggtacctc cgttctggcg 720  
 caggcgaacc aggttccgca aagcgtcctc tctttactgc gttaa 765

[0016]

<210> 29

<211> 696

<212> DNA

<213> 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)

<400> 29

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60  
 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggctctgcg tatcaacagc 120  
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180  
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgvcagac cactgaaggc 240  
 gcgctgaacg aaatcaaaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct 300  
 aacagcacca actcccagtc tgacctgcac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360  
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctgggtgca 420

	gctggaacc cgctgcagaa aattgatgct gctttggcac aggttgacac gttacgttct	480
	gacctgggtg cggtagacagaa ccgtttcaac tccgctatta ccaacctggg caacaccgta	540
	aacaacctga cttctgccc tagccgtatc gaagattccg actacgcgac cgaagtttcc	600
	aacatgtctc gcgcgcagat tctgcagcag gccggtacct ccgttctggc gcaggcgaac	660
	caggtccgc aaagcgtcct ctctttactg cgtaa	696
	<210> 30	
	<211> 582	
	<212> DNA	
	<213> 肠炎沙门氏菌 ( <i>Salmonella enterica</i> )	
	<400> 30	
[0017]	atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa	60
	tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctcg tatcaacagc	120
	gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gtaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt	180
	ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc	240
	gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggc tcagtctgct	300
	ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt gatgctgctt tggcacaggt tgacacgtta	360
	cgttctgacc tgggtgcggt acagaaccgt ttcaactccg ctattaccaa cctgggcaac	420
	accgtaaaca acctgacttc tgcccgtagc cgtatcgaag attccgacta cgcgaccgaa	480
	gtttccaaca tgtctcgcgc gcagattctg cagcaggccg gtacctccgt tctggcgcag	540
	gcgaaccagg ttccgcaaag cgtcctctct ttactgcgtt aa	582

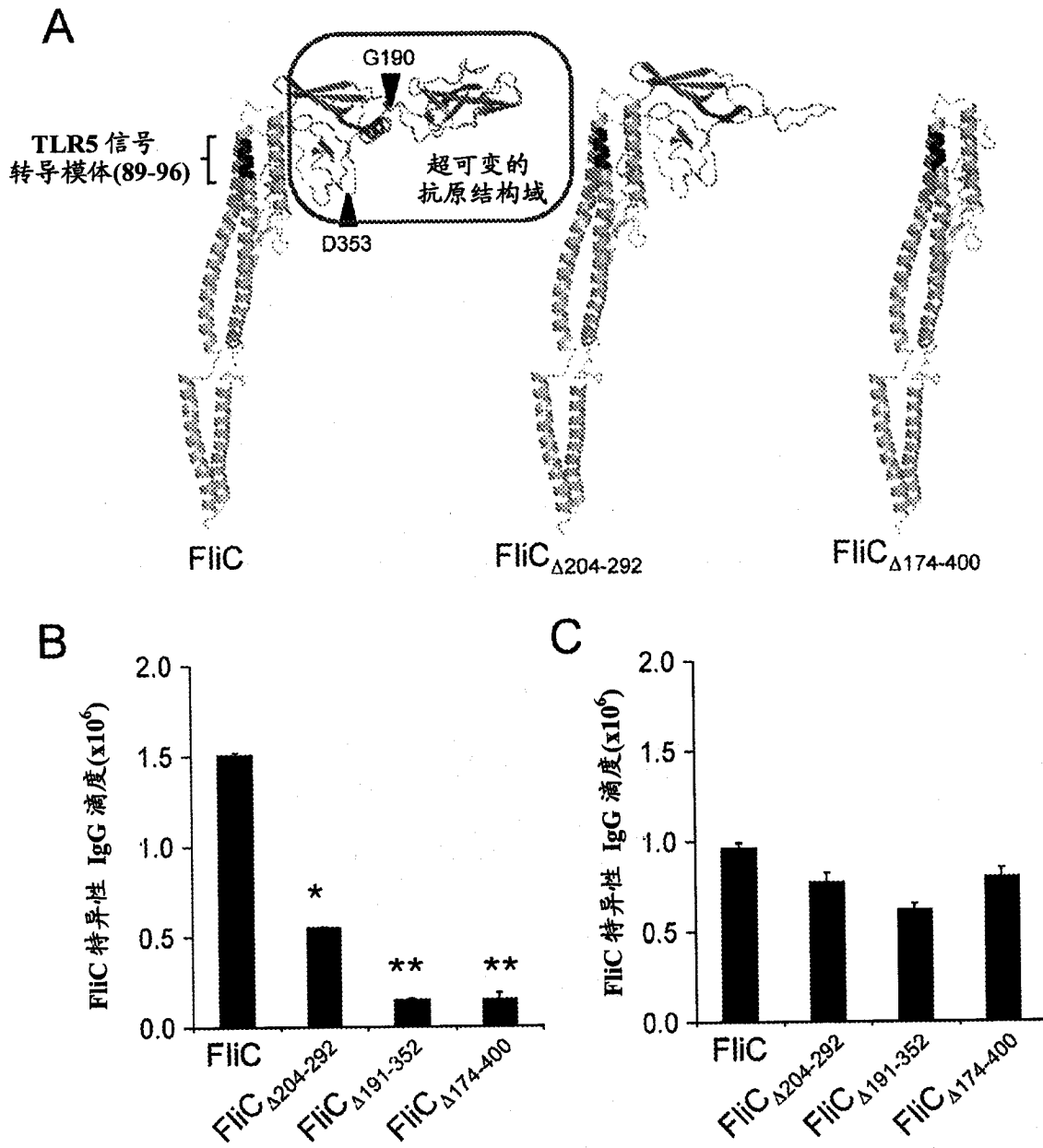


图1

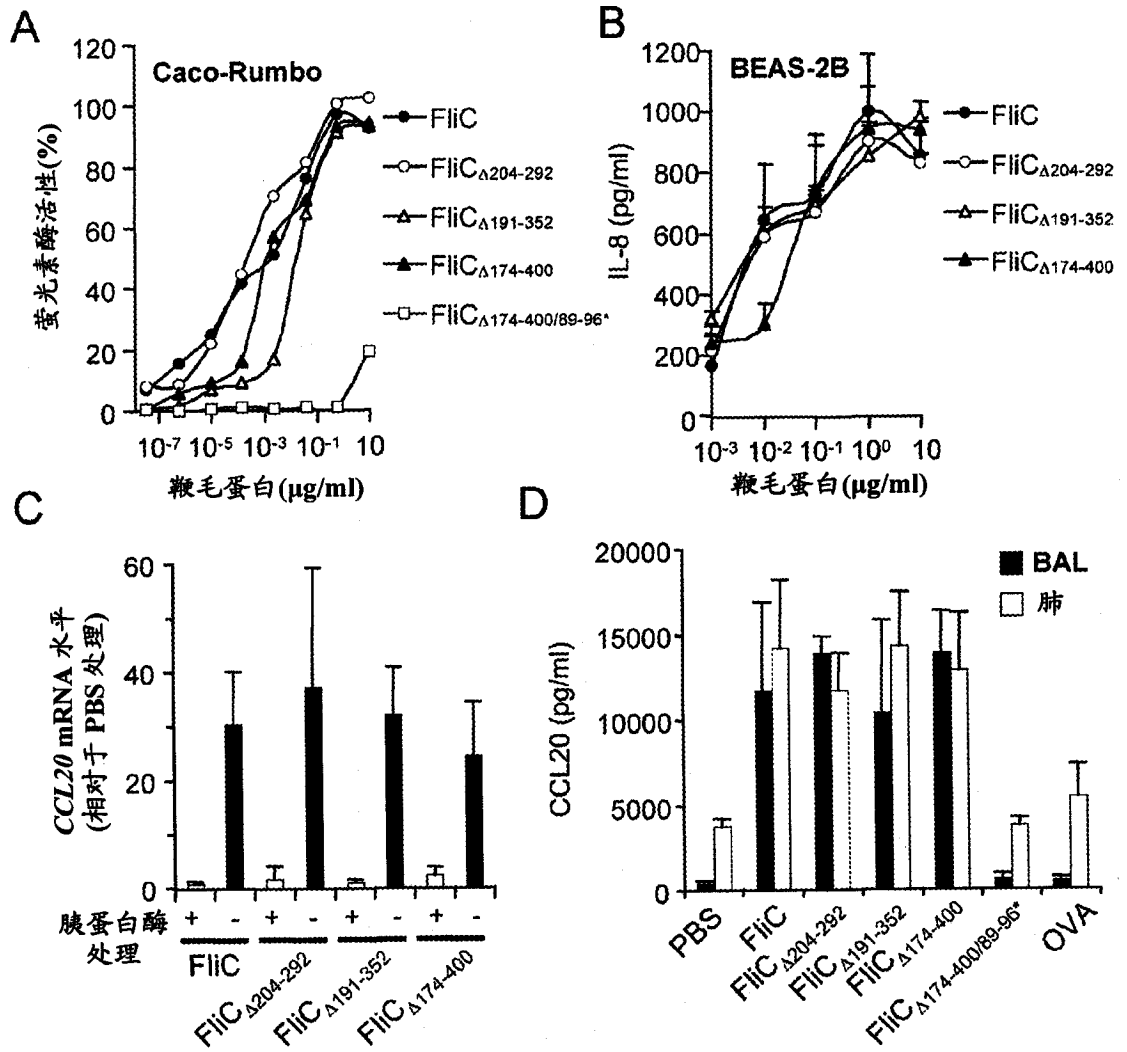


图2

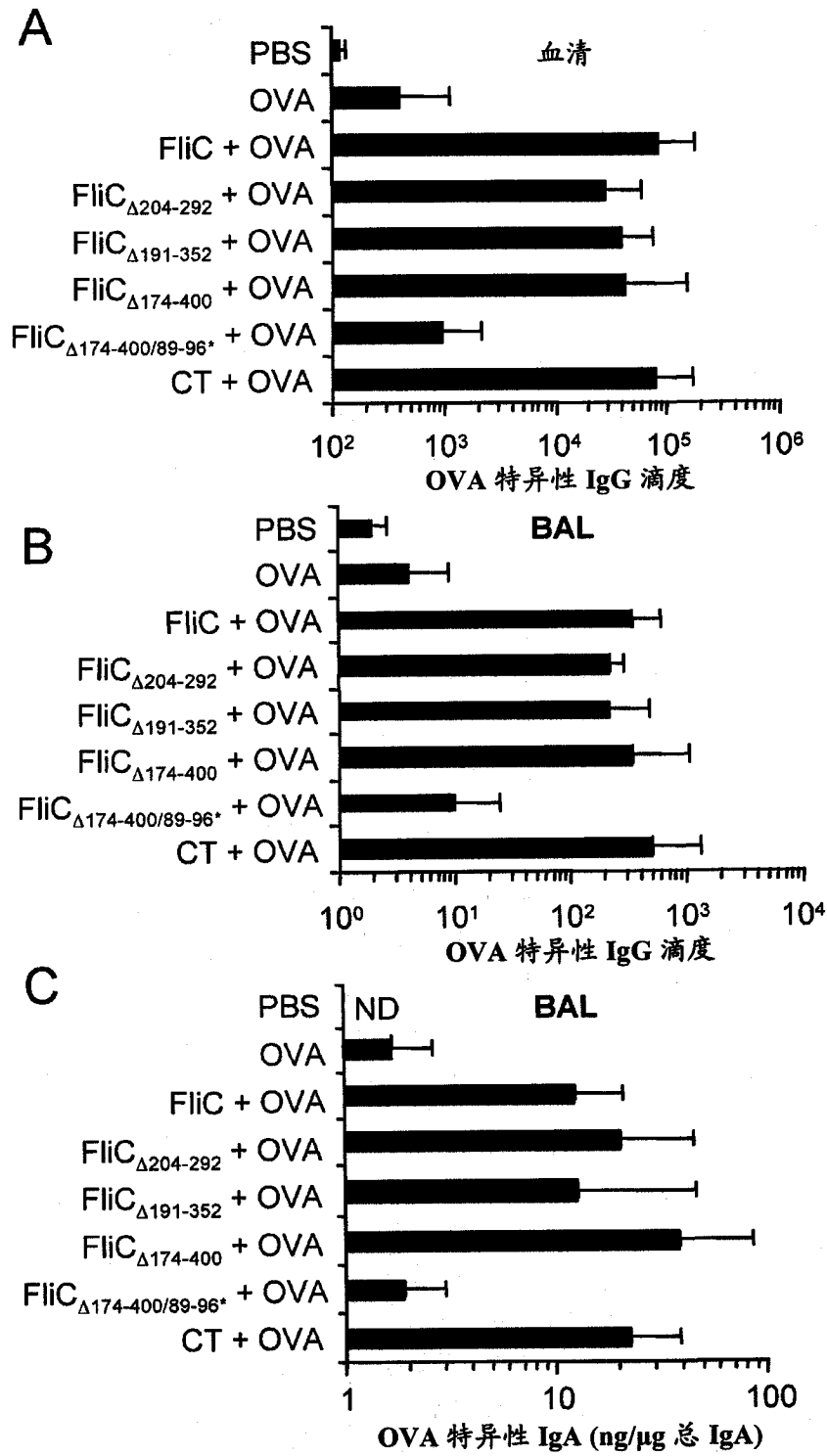


图3

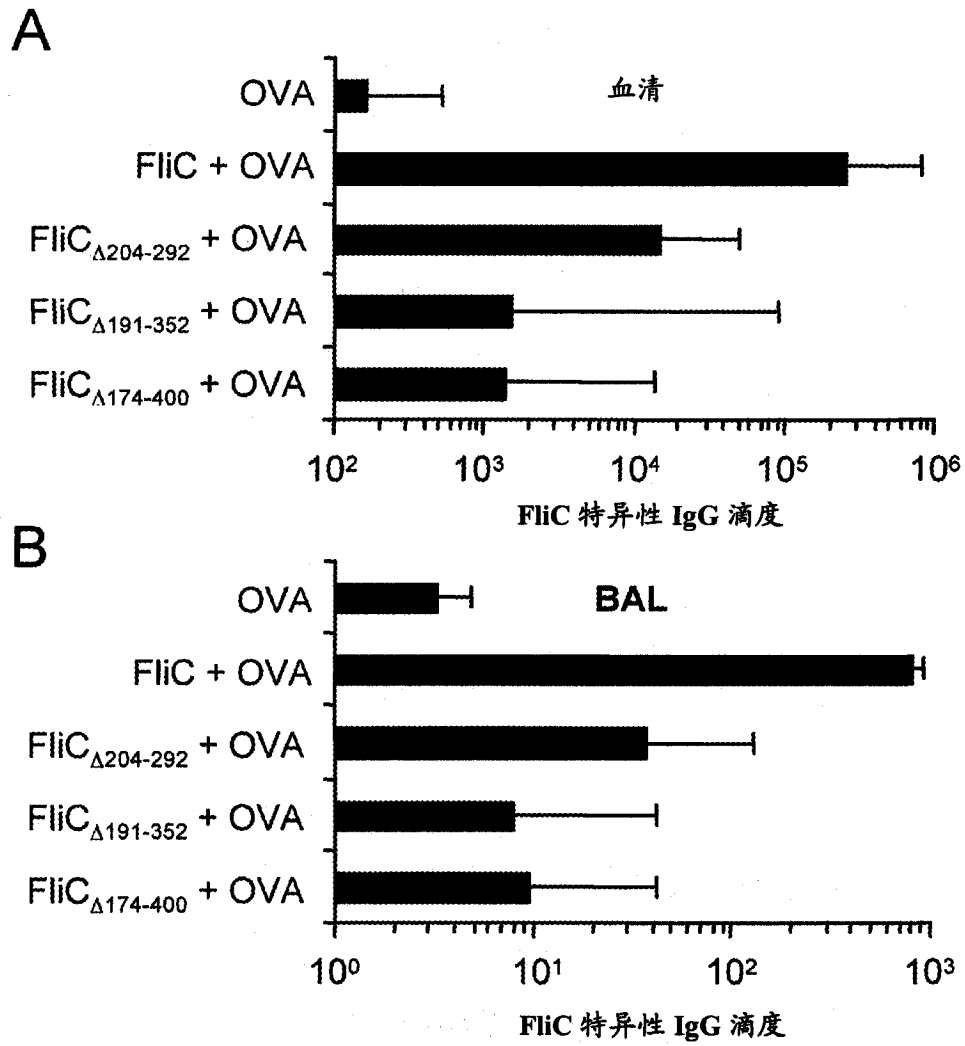


图4

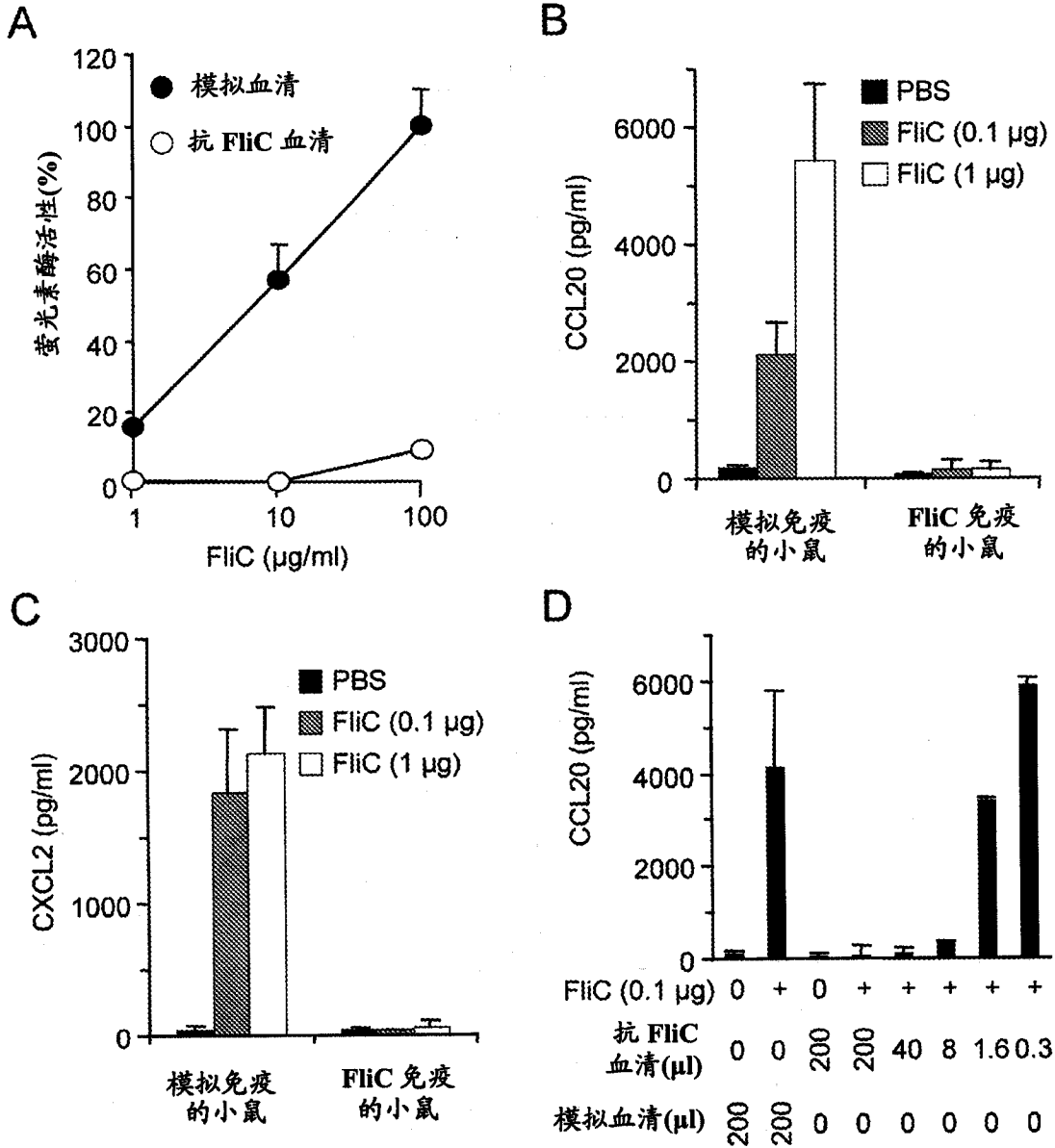


图5



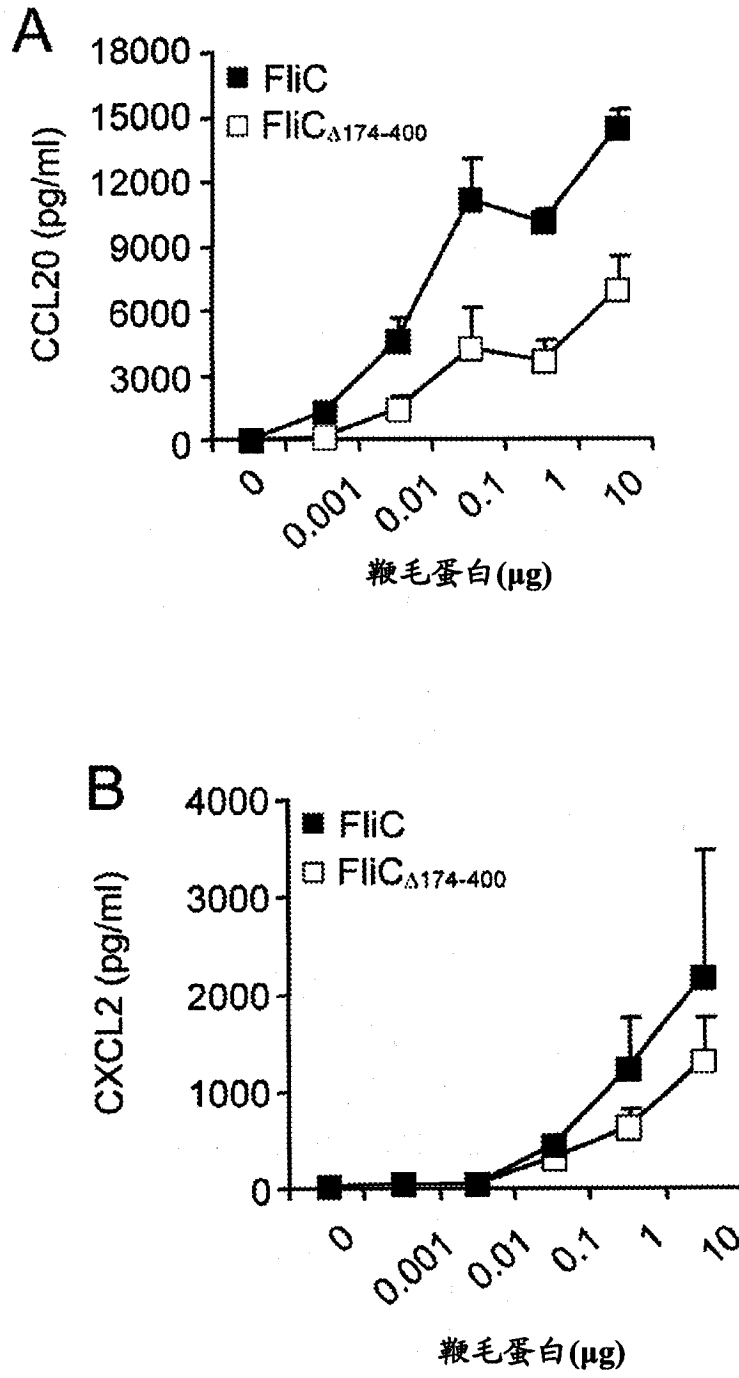


图6

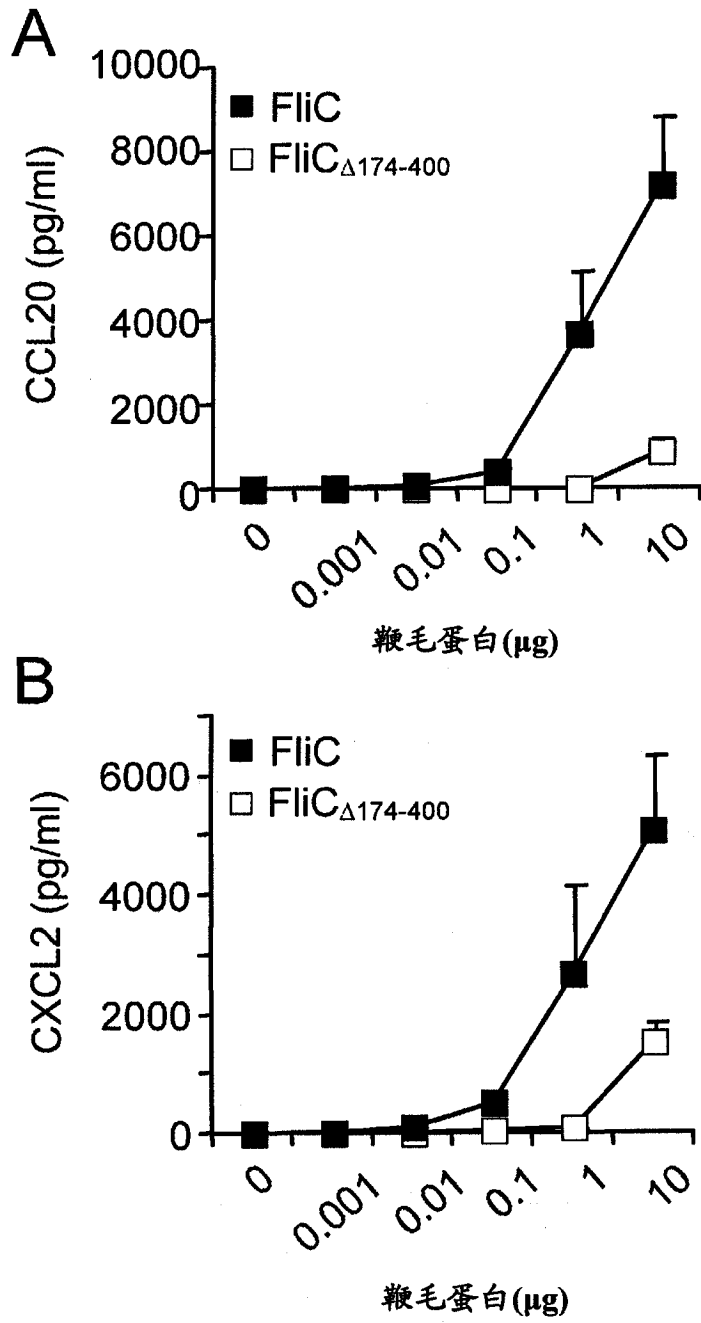


图7

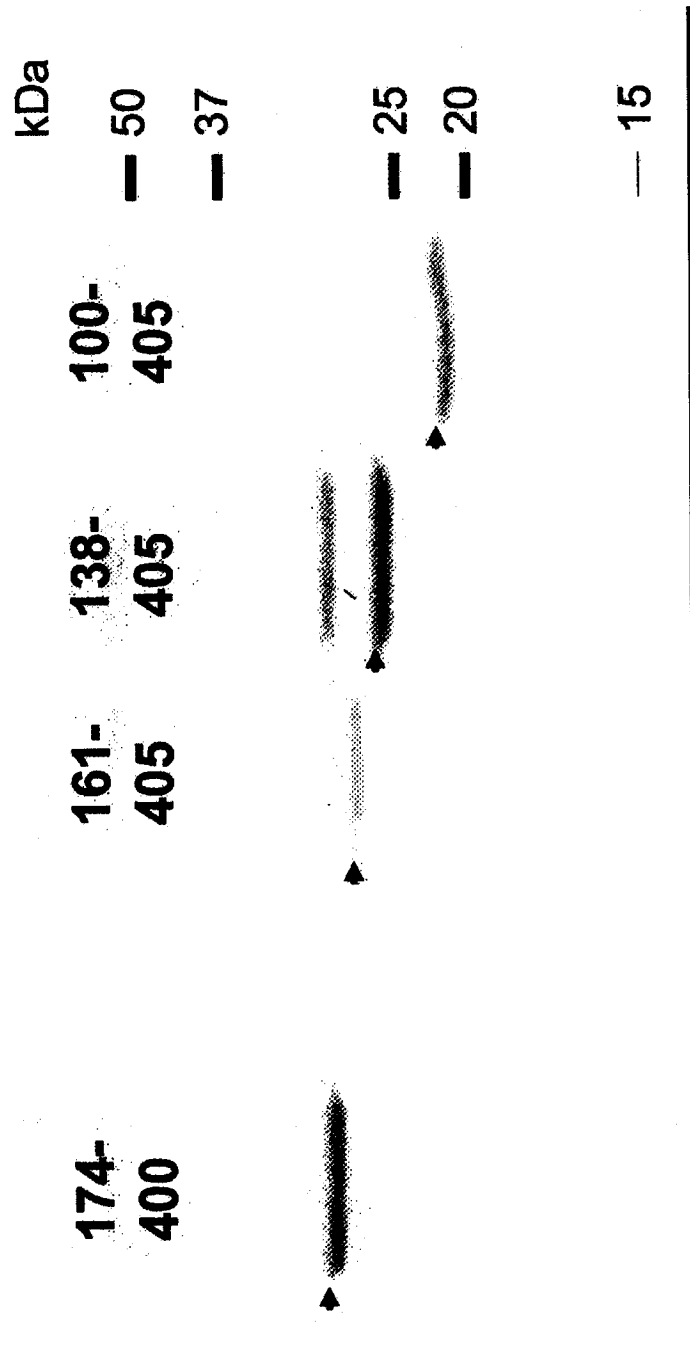


图8

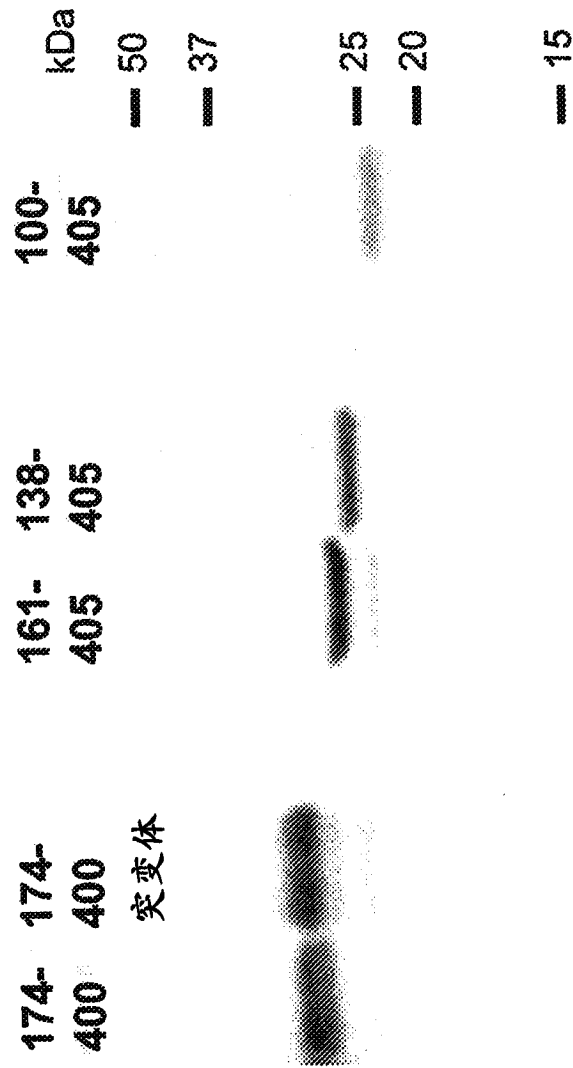


图9

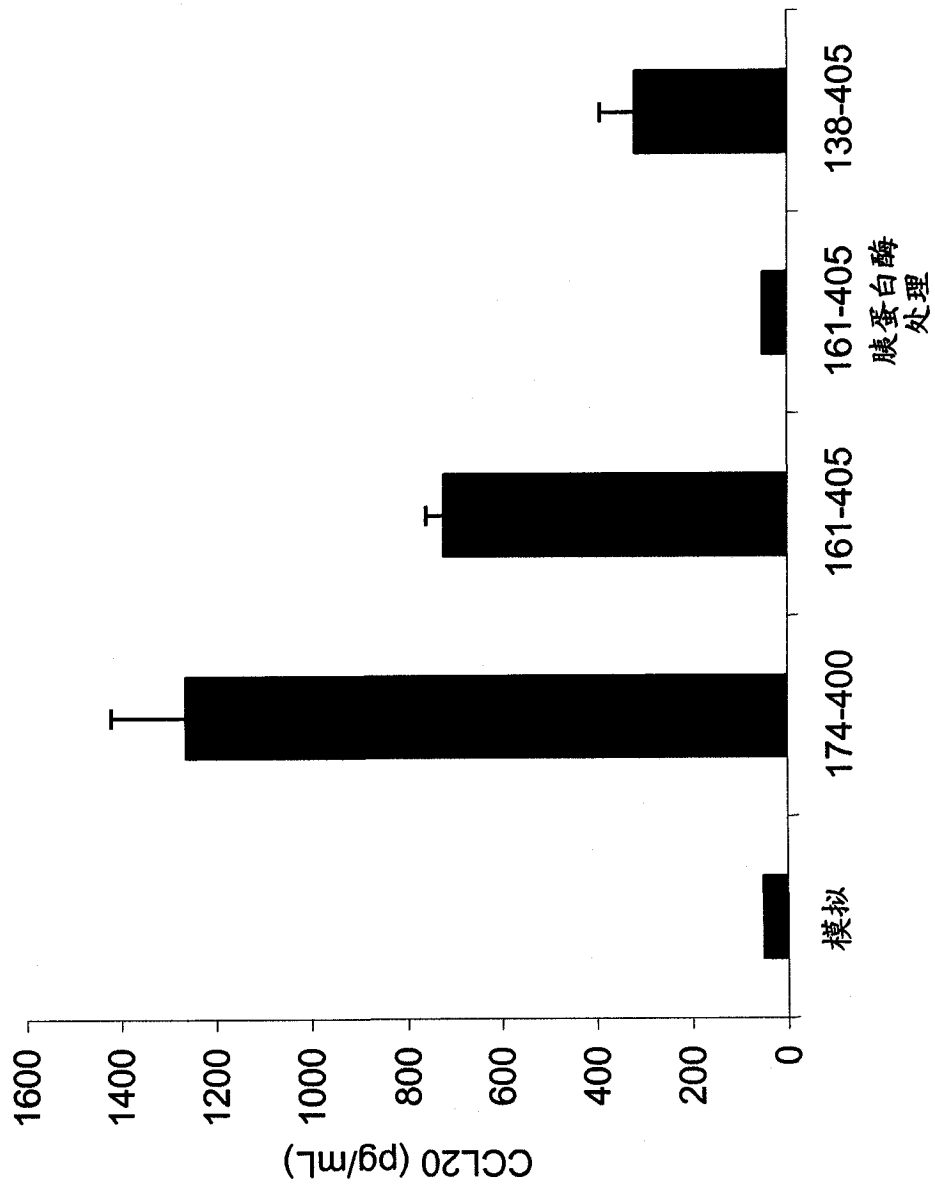


图10

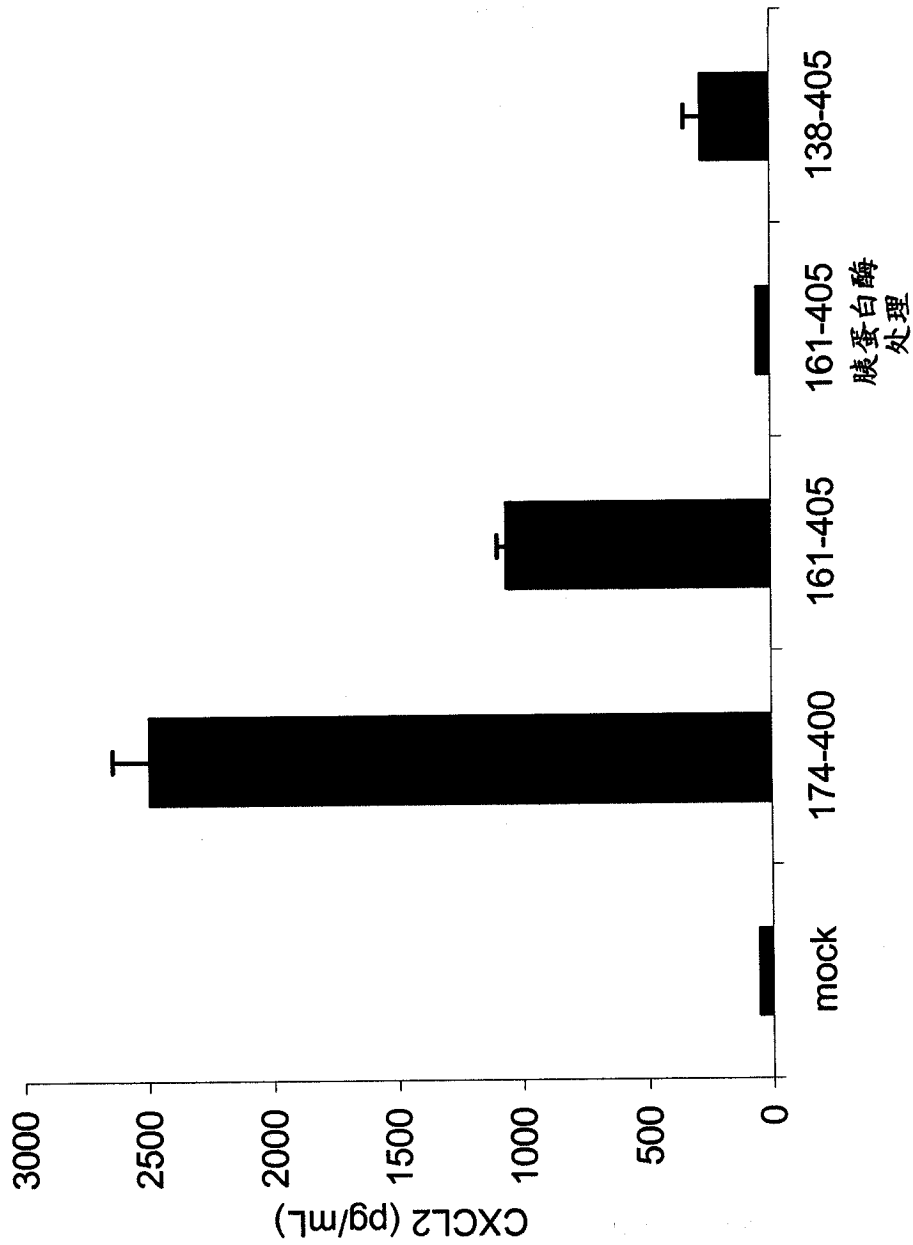
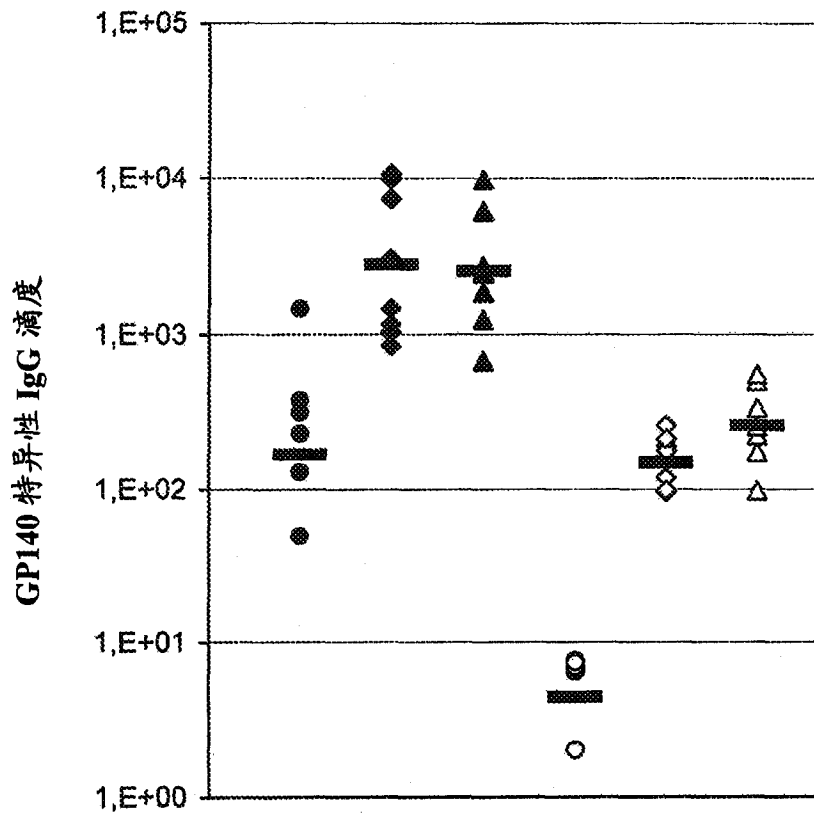


图11



GP140	+	+	+	+	+	+
FliCΔ174-400	-	+	-	-	+	-
FliC	-	-	+	-	-	+

图12

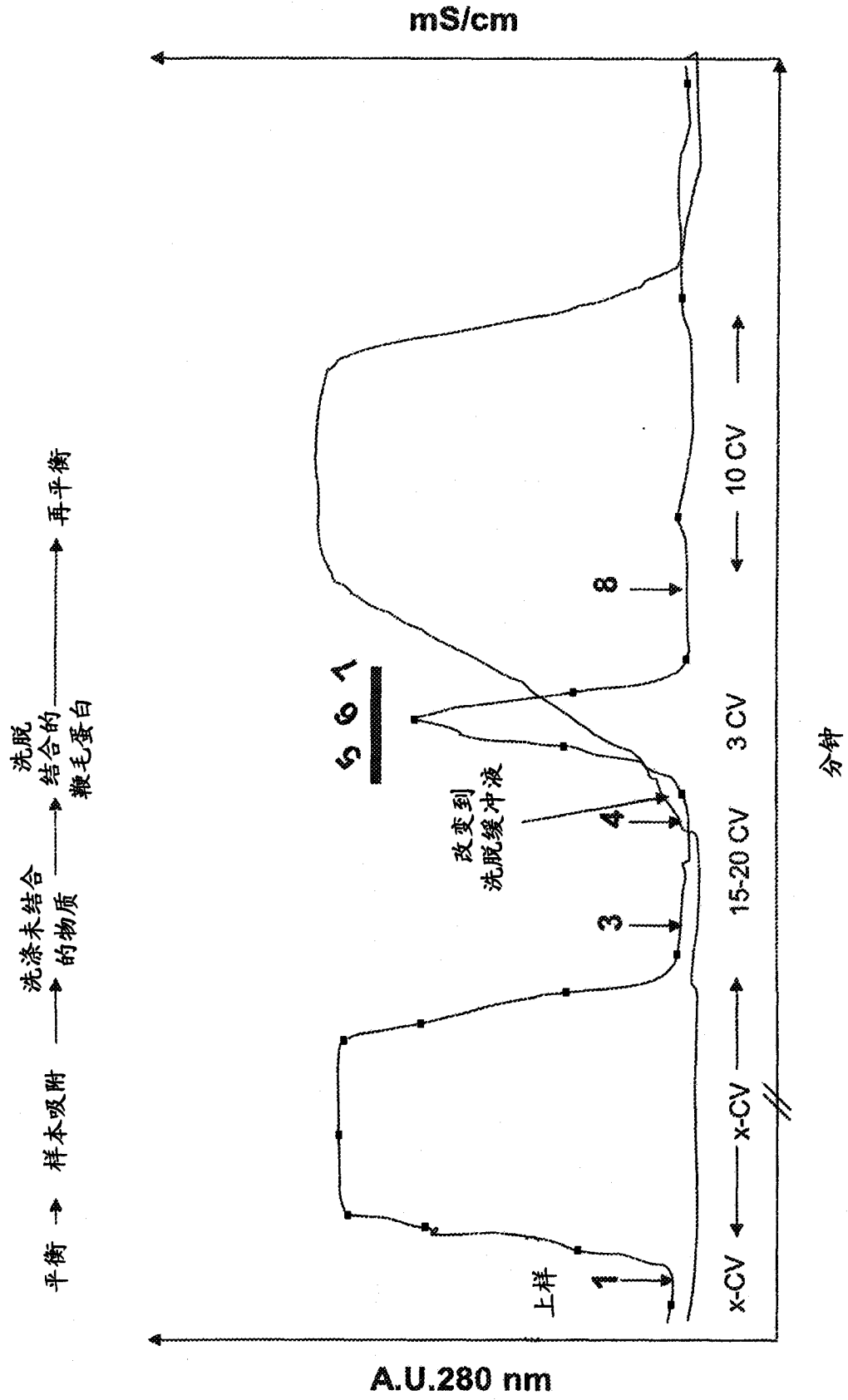


图13



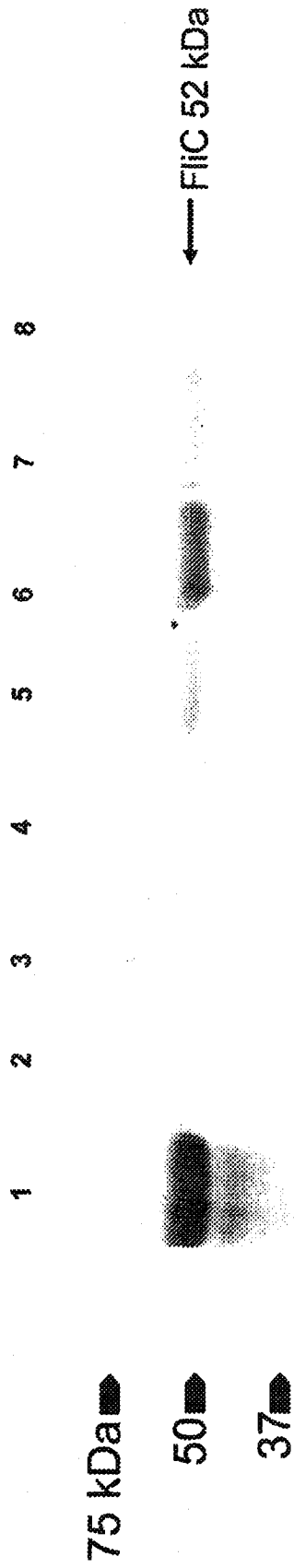


图14