

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99807792.5

A61K 39/02

A61K 39/00

A61K 39/102

A61K 38/00

C07H 21/04

C07H 21/02

C07K 16/00

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1201818C

[22] 申请日 1999.5.28 [21] 申请号 99807792.5

[30] 优先权

[32] 1998.6.11 [33] GB [31] 9812613.9

[86] 国际申请 PCT/US1999/011980 1999.5.28

[87] 国际公布 WO1999/064067 英 1999.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2000.12.25

[71] 专利权人 史密斯克莱·比奇曼生物公司

地址 比利时里克森萨特

共同专利权人 俄亥俄州大学研究基金会

[72] 发明人 劳伦·O·巴卡利茨 约瑟夫·科恩

盖伊·德奎斯尼 伊维斯·洛贝特

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

C12P 21/06

C12P 21/04

C12N 1/20

G01N 33/53

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 16 页

[54] 发明名称 疫苗

[57] 摘要

本发明提供不可分型流感嗜血杆菌 (ntHi) 各种菌株之 P5 样菌毛蛋白上 LB1 (f) 肽的肽序列的抗原性基团。本发明还提供携带这些肽并在动物体内诱导针对 ntHi 的免疫应答的嵌合多肽, 以及编码这类肽和多肽的多核苷酸。本发明还涉及分离这些肽或嵌合多肽的方法, 检测生物样品中这些肽的存在的方法, 以及用于治疗流感嗜血杆菌感染的疫苗组合物。

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

1. 一种肽，其包含一或多个选自下组的氨基酸序列：

SEQ ID NO. 1，

SEQ ID NO. 2，

SEQ ID NO. 3，和

SEQ ID NO. 4

或上述序列的任何抗原相关变体，其同源性至少为 75%并能在免疫学上模拟不可分型流感嗜血杆菌 P5 样菌毛蛋白的相关抗原决定位点，条件是抗原相关变体不包括 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所提供的多肽。

2. 权利要求 1 的肽，其包括 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。

3. 权利要求 1 的肽，其包括 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列。

4. 权利要求 1 的肽，其包括 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列。

5. 权利要求 1 的肽，其包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列。

6. 一种嵌合多肽，其包含一个或多个权利要求 1-5 任一项的肽，该肽共价连接于含至少一个 T 细胞表位的载体多肽。

7. 权利要求 6 的嵌合多肽，其还含有一个作为纯化标签的肽序列。

8. 权利要求 7 的嵌合多肽，其中该纯化标签肽序列是组氨酸标签序列。

9. 权利要求 6 的嵌合多肽，其中该载体多肽是脂蛋白 D。

10. 权利要求 6 的嵌合多肽，其中所用肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 1, 2 和 3。

11. 一种嵌合多肽，其包含三个 LB1(f)亚单位和脂蛋白 D，其中所用 LB1(f)亚单位的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2, 3 和 5 所示。

12. 权利要求 11 的嵌合多肽，其还包含一个组氨酸纯化标签序列。

13. 权利要求 11 的嵌合多肽，其中肽组分的顺序自多肽 N-末端开始依次为：脂蛋白 D，如 SEQ ID NO: 2 所示的 LB1(f)亚单位，如 SEQ ID NO: 5 所示的 LB1(f)亚单位，和如 SEQ ID NO: 3 所示的 LB1(f)亚单位。

14. 权利要求 13 的嵌合多肽，其中该多肽的氨基酸序列如图 5 所示。

15. 一种疫苗组合物，其在可药用赋形剂中包含致免疫有效量的至少一种权利要求 1-14 任一项的肽或多肽，以及一种可选择的佐剂。

种权利要求 1-14 任一项的肽或多肽，以及一种可选择的佐剂。

16. 至少一种权利要求 1-14 任一项的肽或多肽，在制备预防或治疗流感嗜血杆菌病的药物中的应用。

17. 权利要求 16 的应用，其中该流感嗜血杆菌病为中耳炎，鼻窦炎，结膜炎，或下呼吸道感染。

18. 权利要求 15 的疫苗组合物在制备对流感嗜血杆菌感染敏感的哺乳动物体内诱导免疫应答的药物中的应用。

19. 权利要求 15 的疫苗组合物在制备预防流感嗜血杆菌感染的药物中的应用。

20. 一种 DNA 或 RNA 分子，其编码权利要求 1-14 任一项的一种 LB1(f) 肽或多肽。

21. 权利要求 20 的 DNA 或 RNA 分子，其中该 LB1(f) 多肽的 DNA 序列如图 5 所示。

22. 包含权利要求 20 或 21 的 DNA 或 RNA 分子的表达载体，其中该表达载体在适宜宿主细胞内能产生上述 LB1(f) 肽或多肽。

23. 一种宿主细胞，其包含权利要求 22 的表达载体。

24. 一种产生 LB1(f) 肽或多肽的方法，其包括在适于产生所述多肽的条件下培养权利要求 23 的宿主细胞，并回收该 LB1(f) 肽或多肽。

25. 权利要求 24 的产生 LB1(f) 肽或多肽的方法，其包括裂解该宿主细胞，并经固相化镍柱，阳离子交换柱，以及分子排阻层析柱纯化可溶性提取物。

26. 一种产生能生成 LB1(f) 肽或多肽的宿主细胞的方法，其包括用权利要求 22 的表达载体转化或转染宿主细胞，以使该宿主细胞在适当培养条件下表达 LB1(f) 肽或多肽。

27. 一种纯化的抗体，其对权利要求 1-5 任一项的一种肽具有免疫特异性。

28. 一种纯化的抗体，其对权利要求 6-14 任一项的一种嵌合多肽具有免疫特异性。

29. 一种检测样品中流感嗜血杆菌的存在的方法，其通过在一种指示剂存在时，使该样品与权利要求 27 的抗体接触。

30. 一种检测样品中流感嗜血杆菌的存在的方法，其使该样品与一种

DNA 探针或引物接触，该 DNA 探针或引物为针对编码流感嗜血杆菌 P5 样菌毛蛋白之 LB1(f)肽的野生型核酸序列而构建，其特征在于该探针选自表 6-8 中所示基因序列。

31. 一种诊断哺乳动物体内流感嗜血杆菌感染的试剂盒，其包含 DNA 探针，该探针为针对编码流感嗜血杆菌 P5 样菌毛蛋白之 LB1(f)肽的野生型核酸序列而构建的，其特征在于选自表 6-8 所示的基因序列。

32. 一种诊断哺乳动物体内流感嗜血杆菌感染的试剂盒，其包含权利要求 1-5 任一项的 LB1(f)肽。

33. 一种诊断哺乳动物体内流感嗜血杆菌感染的试剂盒，其包含权利要求 27 的抗体。

疫苗

5 发明领域:

本发明涉及新鉴定的肽和编码这些肽的多核苷酸以及携带这些肽的嵌合蛋白。本发明还涉及一种用于分离这些肽或嵌合蛋白的方法和用于治疗流感嗜血杆菌感染的疫苗组合物。

10 发明背景

流感嗜血杆菌(Hi)是一种革兰氏阴性球杆菌和严格的人类共生体。流感嗜血杆菌菌株(Hi)或是包裹在多糖内荚膜或是没有荚膜,因而也就相应地分为可分型的(有荚膜)和不可分型的(没有荚膜)菌株。

15 带有荚膜的致病原流感嗜血杆菌(Hi)主要,但并非唯一地导致六岁以下儿童的侵袭性疾病。例如,流感嗜血杆菌b型(Hib)是在儿童中引发脑(脊)膜炎和其它侵袭性疾病的一个主要原因。抗Hib感染已经有了有效的疫苗,它以产生多糖荚膜的抗体为基础,并因而对不可分型的流感嗜血杆菌(ntHi)引发的感染无效。

20 不可分型的流感嗜血杆菌(ntHi)是主要定居菌株而且,尽管鲜有侵袭性,但是它仍是绝大多数粘膜疾病,包括中耳炎、鼻窦炎、慢性结膜炎和慢性下呼吸道感染或其恶化的原因。目前,大约30%,最多62%的ntHi具有青霉素抗性。带菌状态在儿童中估计占44%,在成年人中约占5%,并能持续数月。但是由ntHi引发的中耳炎无论致病机理,还是宿主免疫反应,现在均没有完全弄清楚。

25 中耳炎是两岁以下儿童中的较常见疾病。患者在中耳处有流体的出现并伴随有急性的局部或全身性疾病的征兆。急性的征兆包括耳痛、耳干、听力丧失而全身性症状有发热、无力、兴奋、厌食、呕吐或腹泻。肺炎链球菌和不可分型的流感嗜血杆菌(ntHi)是导致该症状的最主要细菌,大约分别占所培养细菌的25-50%和15-30%。另外,ntHi引起53%的复发性中耳炎。1岁和
30 3岁的儿童分别有大约60%和80%有该病的至少一种症状(峰值约为10个月)。

已有证据表明，对 ntHi 存在保护性免疫。然而，表位的抗原漂移(外膜蛋白 P2，P4，P6)在 ntHi 逃避宿主免疫防御的能力上扮演着重要的角色。

因此，需要另外一种有效的抗流感嗜血杆菌的疫苗，尤其抗无荚膜流感嗜血杆菌的疫苗，其不受当前应用的 Hi 多糖疫苗的影响。

- 5 菌毛是发现于 ntHi 表面的附属物，在慢性中耳炎儿童的中耳和鼻咽处收获的细菌中 100%有菌毛。包含菌毛蛋白(一种衍生自 ntHi 的菌毛的丝状蛋白)的疫苗已有报道(WO 94/26304)。菌毛蛋白和 ntHi 外膜蛋白 P5 同源，此 P5 蛋白已经成为另一项专利申请的主题(EP680765)。P5 样蛋白这种菌毛蛋白能诱导产生和细菌表面发生相互作用的抗体并为杀菌性蛋白(WO
- 10 94/26304)。该蛋白已经纯化并显示出能够诱导针对各种不同的 ntHi 的免疫反应。

从细菌外膜分离菌毛蛋白的现有方法既烦琐又耗时。一种在其它种细菌中使用的策略是生产天然蛋白的相对较短的线性肽。然而这种方法使用价值有限，因为这类改变的免疫原的抗体常常不能识别天然病原体。

- 15 LB1(f)是一个有 19 个氨基酸的肽(SEQ ID NO:5)，它衍生自菌株 ntHi1128 上 P5 样菌毛蛋白的序列(占据 117 位精氨酸到 135 位甘氨酸之间的区段)。该肽最初通过分析 P5 样菌毛蛋白的一级序列而鉴定为潜在的 B 细胞表面表位。用包括 LB1(f)肽、连接肽和 T 细胞表面表位的菌毛蛋白嵌合肽(称为 LB1 肽)免疫动物，可诱导针对 P5 样菌毛蛋白的免疫应答和减少动物接触
- 20 ntHi 后 ntHi 的体内定居(见 US 5,843,464)，LB1 肽在体内具有免疫原性，其抗血清可与变性的或天然的菌毛蛋白发生免疫应答。因此该肽可作为有效的免疫原，因为它能产生识别并结合其天然结构上的表位的抗体。这部分是由于合成的 LB1(f)肽可以模拟菌毛蛋白中肽的卷曲螺旋型二级结构。

- 在疫苗中仅使用一种流感嗜血杆菌的蛋白质抗原的问题是，保护作用可能很大程度上被限制在同源菌株的攻击上[Bakaletz 等(1997)疫苗 15:955-961；Haase 等(1991)感染与免疫.59:1278-1284;Sirakova 等(1994)感染与免疫.62:2002-2020]。ntHi 外膜蛋白的抗原多样性意味着，开发针对 ntHi 异源性微生物的广谱有效疫苗需要新的策略。

- 如下，本发明涉及 LB1(f)肽作为疫苗的更有效应用，该疫苗是针对广泛
- 30 的能表达 P5 样菌毛蛋白(或该蛋白的天然变体)的流感嗜血杆菌异源株。

发明概述

本发明的目的是提供各种 ntHi 菌株之 P5 样菌毛蛋白的新鉴定的抗原性亚单位肽(LB1(f)肽)。另一目的是提供携带这些肽并在动物体内诱导对 ntHi 的免疫应答的嵌合多肽、和编码这些肽或多肽的多核苷酸。本发明还涉及分

5 离这些肽或嵌合多肽的方法、在生物样品中检测这些肽存在的方法,以及在流感嗜血杆菌感染的治疗中应用的疫苗组合物。

LB1(f)肽包含长约 13 到约 22 个氨基酸的多肽。这些肽可分为三组(其中一组包含 2 个亚组)。嵌合多肽包含共价结合至载体蛋白(其另可作为一种 T 细胞表位)的一或多个 LB1(f)肽单位。该载体蛋白优选来自流感嗜血杆菌,使

10 它也能诱导动物体内针对流感嗜血杆菌(包括不可分型的流感嗜血杆菌)的免疫原性应答。

参考以下附图和详述可以更全面理解本发明。

附图简述:

15 图 1: 质粒 pMGMC5。给出了多克隆位点的 DNA 序列。

图 2: 质粒 pRIT 14588。

图 3: 质粒 LPD-LB1-A。

图 4: 质粒 LPD-LB1-II。LB1(f)肽的 1 组(LB1-GR1)、2 组(LB1-GR2)的 DNA 和氨基酸序列用箭头表示。这些箭头将 LB1(f)肽包括在 P5 样菌毛蛋白中其天然的前后序列中。

20

图 5: 质粒 LPD-LB1-III。LB1(f)肽的 1 组(LB1-GR1)、2 组(LB1-GR2)和 3 组(LB1-GR3)的 DNA 和氨基酸序列用箭头表示。这些箭头将 LB1(f)肽包括在 P5 样菌毛蛋白中其天然的前后序列中。LB1(f)多肽(称为 LPD-LB1(f)_{2,1,3})从第一位的甲硫氨酸延伸到终止密码子前的 C-末端组氨酸残基。

25 图 6: 丙烯酰胺凝胶,经考马斯亮兰染色显示以下质粒的表达产物。

泳道: 1. 分子量标准 2. pMGMC5 3. pRIT 14588

4. LPD-LB1-A 5. LPD-LB1-II 6. LPD-LB1-III

7. LPD-LB1-III(纯化的 LPD-LB1(f)_{2,1,3})

8. 分子量标准

30 图 7: 丙烯酰胺凝胶的 Western Blot(使用兔抗-LB1 抗血清)显示以下质粒的表达产物:

泳道：1.分子量标准 2. pMGMCS3. pRIT 14588
4. LPD-LB1-A5. LPD-LB1-II6. LPD-LB1-III
7. LPD-LB1-III(纯化的 LPD-LB1(f)2,1,3)
8.分子量标准

5 图 8：丙烯酰胺凝胶的 Western Blot(使用单克隆抗-LPD 抗体)显示以下质粒的表达产物：

泳道：1.分子量标准 2. pMGMCS3. pRIT 14588
4. LPD-LB1-A5. LPD-LB1-II6. LPD-LB1-III
7. LPD-LB1-III(纯化的 LPD-LB1(f)2,1,3)
8.分子量标准

10

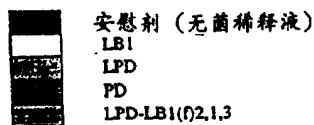
图 9：丙烯酰胺凝胶的 Western Blot(使用含 6 个组氨酸的纯化标签的抗体)显示以下质粒的表达产物：

泳道：1.分子量标准 2. pMGMCS 3. pRIT 14588
4. LPD-LB1-A5. LPD-LB1-II6. LPD-LB1-III
7. LPD-LB1-III(纯化的 LPD-LB1(f)2,1,3)
8.分子量标准

15

图 10：被动转移/攻击实验。通过对五个同龄组的被动免疫毛丝鼠进行超过 35 天的观察得出的平均鼓膜炎症指数。平均鼓膜炎症值 1.5 处的间断水平线表示仅由腺病毒引起的炎症。超过该水平线的值表示由 ntHi 引起的炎症。
20 症。▼-安慰剂组；○-LB1；■-LPD；◇-PD；△-LPD-LB1(f)_{2,1,3}。

图 11：条形图显示 5 只对腺病毒无免疫力的毛丝鼠，在实验全程中，根据耳镜检查 and 鼓室压测量发现或怀疑有渗出的中耳总数的百分率。时间值从 ntHi 鼻内攻击的当天(第 0 天)开始计算。每只动物在接受 ntHi #86-028NP 鼻内攻击前通过被动转移接受 1:5 稀释的特异性抗血清。各年龄组接受针对
25 下述的抗血清：



30

图 12：用于被动转移的血清的 Western blot。Blot A 为抗 LB1 血清集合。Blot B 为抗-LPD-LB1(f)_{2,1,3} 血清集合。泳道包括：(1)分子量标准；

(2)LPD ; (3)LPD-(f)_{2,1,3} ; (4)LB1 ; (5)NTHi 86-028NP 全外膜蛋白(OMP)制剂 ; (6)NTHi 1885MEE 全 OMP ; (7)NTHi 1728MEE 全 OMP 。

图 13 : 研究 A : 被动转移/攻击实验。对 5 只被动免疫的毛丝鼠进行超过 35 天的观察得出平均鼓膜炎症的指数。攻击用 ntHi 的 86-028NP 菌株或 5 1885MEE 菌株进行。

图 14 : 研究 B : 被动转移/攻击实验。对 5 只被动免疫的毛丝鼠进行超过 35 天的观察得出平均鼓膜炎症的指数。攻击用 ntHi 的 86-028NP 菌株或 1728MEE 菌株进行。

图 15 : 研究 A : 表中显示 6 只对腺病毒无免疫力的毛丝鼠, 在实验全
10 程中, 根据耳镜检查 and 鼓室压测量发现或怀疑有渗出的中耳总数的百分率。时间值从 ntHi 鼻内攻击的当天(第 0 天)开始计算。每只动物在接受 ntHi #86-028NP 或 1885MEE 鼻内感染前通过被动转移接受 1:5 稀释的特异性抗血清。

图 16 : 研究 B : 图中显示 6 只对腺病毒无免疫力的毛丝鼠, 在实验全
15 程中, 根据耳镜检查 and 鼓室压测量发现或怀疑有渗出的中耳总数的百分率。时间值从 ntHi 鼻内攻击的当天(第 0 天)开始计算。每只动物在接受 ntHi #86-028NP 或 1728MEE 鼻内感染前通过被动转移接受 1:5 稀释的特异性抗血清。

20 优选实施方案详述

本发明的肽

本发明的肽涉及从欧洲和美国的各种 ntHi 菌株的 P5 样菌毛蛋白新鉴定的 LB1(f)肽。

25 已查明 83 株 ntHi 的 P5 样菌毛蛋白的 DNA 序列, LB1(f)肽的肽序列也已指明。本发明的肽是几乎出现在每种蛋白质的相同区(以及相同环境中)的 B 细胞表位 - 在该蛋白质的氨基酸序列中几乎涵盖 110 到 140 位的区中。例如, 在菌株 ntHi-10567RM 中, 该肽就存在于 117 位的精氨酸到 135 位的甘氨酸之间。(SEQ ID NO:1)。

30 经对比排列, 来自欧洲和美国的 ntHi 菌株肽序列可归为相同的三组, 其中有一些变化。第 1 组肽[或 LB1(f)₁]占这些肽的 71%, 包含约 19 个氨基酸, 且与 SEQ IN NO:1 所示肽的同源性不低于 75%。第 2 组肽[或 LB1(f)₂]占这些

肽的 19%，包含 19-22 个氨基酸，且与 SEQ ID NO:2 所示肽的同源性不低于 75%。该组可再分为 2 个亚组，第 2a 组[或 LB1(f)_{2a}]实例如 SEQ ID NO:2；第 2b 组[或 LB1(f)_{2b}]实例如 SEQ ID NO:4。第 3 组肽[或 LB1(f)₃]占这些肽的 10%，包含 13 个氨基酸(如 SEQ ID NO:3 所示)。

- 5 肽(以及多肽和多核苷酸)的序列同一性可利用如 UWGCG 软件包计算，它提供 BESTFIT 程序用于计算同源性(一致性)，优选它的默认设置。[Deveraux 等,核酸研究.12:387-395(1984)]。

所分析的 83 株 ntHi 中，来自所有 62 个美国菌株和所有 21 个欧洲菌株的 LB1(f)肽归至第 1-3 组。表 1 显示分析的所有的 ntHi 菌株，它们各自的 LB1(f)肽所归属的组别。表 2，3 和 4 分别列出了第 1，2 和 3 组的各种 LB1(f)肽。表 5 列出了第 1，2a，2b 和 3 组 LB1(f)肽的代表性实例。

10 先前已知的 LB1(f)肽的序列(SEQ ID NO:5)属于第 1 组。尽管已知这种肽是有效免疫原，并可提供对 ntHi 所致中耳炎的保护作用，但直到现在才清楚该有效肽存在三种不同的抗原形式，它们有可能通过组合提供针对所有表达 P5 样菌毛蛋白的流感嗜血杆菌的保护性免疫原。

本发明的肽涉及第 1，2a，2b 和 3 组的代表肽(分别为 SEQ ID NO: 1，2，4 和 3)以及这些肽的抗原性相关变体。“抗原性相关变体”可以是天然变体(如表 2，3 和 4 中所列出的肽)或与 P5 样菌毛蛋白上 LB1(f)之抗原决定位点免疫学相似的人工修饰变体。这类人工修饰变体可通过本领域熟知的化学合成或重组 DNA 诱变技术制备(参见如 Sambrook 等“分子克隆实验室手册”(1989)第 15 章冷泉港实验室出版社)。所述肽的抗原性相关变体应与 SEQ ID NO: 1-4 之一的氨基酸序列有至少 75%的同一性(更优选至少 85%，最优选至少 95%的同一性)，而且仍与不可分型的流感嗜血杆菌上 P5 样菌毛蛋白的相应抗原决定位点免疫学相似。本发明中“与 ntHi 上 P5 样菌毛蛋白的相应抗原决定位点免疫学相似”指能诱导特异性识别全 P5 样菌毛蛋白中野生型 LB1(f)序列(表 2、3 和 4 所列)之一的抗体的肽(变体)，和/或指能被具有上述抗体(特异性识别全 P5 样菌毛蛋白中野生型 LB1(f)序列(表 2、3 和 4 所列)之一的抗体)相同免疫特异性的抗体识别的肽(变体)。在第一个定义中，所述肽变体能独自或与载体分子一起诱导所述抗体。第二个定义中，所述肽变体应能依靠其自身或与载体分子一起被识别。所述抗原性相关肽变体并不包括 SEQ ID NO:5 所示的肽(此前确定的 ntHi-1128 株上 P5 样菌毛蛋白

的 LB1(f)肽)和 SEQ ID NO:6 所示的肽(此前确定的 ntHi 上 P5 样菌毛蛋白的 LB1(f)样肽)。

抗原性相关变体可能有氨基酸的增加、插入、替换或删除。优选的变体是与所述相比有保守性(优选单个)氨基酸替换的那些。

- 5 本发明的肽涉及共价连接(可任选其间包含间隔臂氨基酸)以形成单肽的上述 LB1(f)肽的组合。进行这类组合时可使用 SEQ ID NO:5 和 6。化学合成或重组表达这些肽的方法为领域内技术人员熟知[参见如 Sambrook 等(1989)]。所述任选间隔臂氨基酸应优选在所述肽的每一侧不超过 18 个氨基酸, 并应优选由 P5 样菌毛蛋白之 LB1(f)肽的天然相邻序列中的氨基酸组成
- 10 (例如, 如果两个 LB1(f)肽相连, 第一个 LB1(f)肽或 N-末端 LB1(f)肽可在其天然 C-末端相邻序列中有 9 个氨基酸连接至第二个 LB1(f)肽或是 C-末端 LB1(f)肽的天然 N-末端相邻序列中 9 个氨基酸)。一或多个 LB1(f)肽可以以这种方式相连。优选 1-10 个 LB1(f)肽相连, 更优选 1-5 个相连, 再更优选 1-3 个相连。更优选来自每一 LB1(f)组的至少一种 LB1(f)肽以此方式相连。
- 15 还要优选相连的 LB1(f)肽是 SEQ ID NO:2, 3 和 5 所示的肽。一旦这三种抗原性不同的肽发生组合, 就能形成一种具有更广泛保护性的免疫原。

本发明的多肽

- 本发明的多肽涉及上述肽, 其共价连接至载体多肽以形成 LB1(f) 嵌合多肽, 所述载体多肽至少含有一种 T-细胞表位(例如: 破伤风毒素、白喉毒素、CRM197、布氏疏螺旋体 sensu lato 的 OspA、匙孔血蓝蛋白, 流感嗜血杆菌 P6 蛋白、流感嗜血杆菌 P5 样菌毛蛋白、流感嗜血杆菌 OMP26、流感嗜血杆菌蛋白 D、或流感嗜血杆菌脂蛋白 D)。这种嵌合多肽包含至少一种本发明的 LB1(f)肽。优选所述嵌合多肽包含 1-10 种 LB1(f)肽, 更优选 1-5 种, 再更优选 1-3 种。这些肽可与载体多肽发生 N-末端或 C-末端连接, 或
- 25 N-末端和 C-末端均连接。优选该载体多肽来自流感嗜血杆菌, 使其成为良好的免疫原性载体, 并同时具有针对其自身的保护效应和/或同时提供流感嗜血杆菌衍生的 T-细胞表位来源。所述嵌合肽还可任选地包含一个作为纯化标签的肽序列(如组氨酸标签或谷胱甘肽-S-转移酶标签)以有助于随后的多肽纯化。任选的短肽间隔臂序列可引入所述嵌合多肽的元件之间(如以上本发明的
- 30 肽中所指定)。

所述载体多肽优选使用流感嗜血杆菌的 OMP26 (WO 97/ 01638)、或流

感嗜血杆菌的 P6 蛋白 (Nelson, M. B. 等, (1998) 感染与免疫 56, 128-134)。

最优选所述载体多肽使用不可分型的流感嗜血杆菌的 D 蛋白(PD)或脂蛋白 D(LPD - D 蛋白的脂化形式)。PD 是 42 kDa 的人 IgD 结合性外膜蛋白, 该蛋白目前所知的所有流感嗜血杆菌菌株中高度保守(WO 91/18926)。

5 PD 和 LPD 均已能在大肠杆菌中表达。

LPD 是流感嗜血杆菌的致病因子, 它能激发大鼠抗血清中针对 ntHi 的杀菌活性。流感嗜血杆菌的 LPD 和重组表达的 LPD 等价体因此能作为良好的免疫原性载体, 并具有针对其自身的保护效应。所述非脂化形式(PD)因便于加工而更便于使用, 而且也是本发明的潜在载体多肽。LPD 因其固有的佐剂特性(即, 其诱导巨噬细胞产生白血病介素的能力以及其刺激 B 细胞增殖的能力)而具有较强免疫原性(WO 96/32963)。PD 不具有固有的佐剂特性, 因此优选将它们偶联至具有佐剂特性的物质如(但不限于)氢氧化铝或是磷酸铝。针对 LPD 应答的抗体可能对可分型或不可分型的 Hi 菌株都有保护作用。它因此代表了一种附载其它 Hi 抗原(如 LB1(f)肽)以获得针对该生物体的更有效疫苗的重要载体分子。LPD 除了能增强对 LB1(f)肽抗原的免疫应答外, 还可作为同时针对不可分型和可分型的 Hi 的保护性抗原。

优选将三种 LB1(f)肽连接到该载体多肽上: 每组 LB1(f)一种。优选所用 LB1(f)肽为 SEQ ID NO:2, 3, 和 5 所示的肽, 并优选将它们通过 C-末端连接至所述载体多肽, 连接顺序为: SEQ ID NO:2(第 2 组肽)、SEQ ID NO:5(第 1 组肽)、SEQ ID NO:3(第 3 组肽)。这类连接至 LPD 的多肽中已知的有 LPD1-LB1(f)_{2,1,3}。这三种抗原性不同的肽一旦组合, 就会形成具有更广泛保护性的免疫原。

尽管所述嵌合多肽并不必需纯化标签, 但必要时优选组氨酸标签序列, 并优选其位于该多肽的 C-末端。

25 一种优选的 LPD1-LB1(f)_{2,1,3} 嵌合多肽的序列示于图 5。残基 1-19 为蛋白 D 的信号序列。可将该信号序列除去以制备所述嵌合多肽中的 PD。

本发明的多肽能以任何适当的方式制备。这类多肽包括重组产生的多肽、化学合成的多肽、或通过这些方法的联合运用产生的多肽。制备这类多肽的方式为本领域所熟知, 方法的实例示于实施例部分。

30 本发明的多核苷酸

本发明的多核苷酸涉及表 6-8 所示 LB1(f)肽的野生型多核苷酸序列。它

他们也涉及本发明多肽的野生型 DNA 序列 - 即构建嵌合多肽的基因, 其中使用载体多肽的野生型基因序列和 LB1(f)肽的野生型多核苷酸序列。这类多核苷酸示于表 5。所述可任选的间隔臂氨基酸的 DNA 序列并非本发明必需, 但如果该间隔臂氨基酸来自 LB1(f)肽的天然相邻区, 则优选(但非必需)使用这些间隔臂的天然 DNA 序列。

本发明的多核苷酸还涉及可衍生自本发明肽的氨基酸序列和可通过简并密码子的假想使用衍生自本发明多核苷酸的 DNA 序列。这一点为本领域所熟知, 在不同表达宿主中密码子使用的知识也是本领域熟知, 其有助于使本发明的肽和多核苷酸的重组表达最优化。

10 本发明还提供互补于所有上述多核苷酸的多核苷酸。

当用本发明的多核苷酸重组制备本发明的多肽时, 该多核苷酸可能本身包括成熟多肽的编码序列; 或在阅读框架中包括成熟多肽的编码序列和其它编码序列, 如编码前导或分泌肽的序列, 前-或原-或前原蛋白序列、或其它融合肽组分的编码序列(如在图 5 中的氨基酸残基 1-19, LPD 的天然信号序列)。例如, 可编码有助于融合多肽纯化的标记序列。在本发明这方面的特定优选实施方案中, 标记序列是有 6 个组氨酸的肽(如 pQE 载体(Qiagen.Inc)中所含以及 Gentz 等, 美国国家科学院学报(1989)86:821-824 所述)或一个 HA 标签, 或谷胱苷肽-S-转移酶。还优选与其天然信号序列融合的 LPD(图 5 中氨基酸残基 1-19)。多核苷酸还可包含非编码的 5' 和 3' 序列, 比如转录的、非翻译序列, 剪接和多聚腺苷化信号, 核糖体结合位点和稳定 mRNA 的序列。

载体, 宿主细胞, 表达

本发明还涉及包含一种多核苷酸或本发明的多核苷酸的载体, 用本发明的载体进行遗传工程改造的宿主细胞, 以及本发明的肽或多肽的重组制备。还可使用无细胞翻译系统从本发明之 DNA 构建体衍生的 RNA 制备这类蛋白质。

重组制备中, 宿主细胞可经遗传改造引入针对本发明多核苷酸的表达系统或其部分。可用多种常规实验室手册(如 Davis 等, “分子生物学的基本方法”(1986), Sambrook 等, “分子克隆: 实验室手册”, 第二版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约)中所述的方法将多核苷酸引入宿主细胞, 如磷酸钙转染, DEAE-葡聚糖介导的转染, 转染(transvection), 显微注射, 阳离子

脂质介导的转染,电穿孔,转导,刮取装载(scrape loading),冲击导入(ballistic introduction)或感染。

适当宿主的代表性实例包括细菌细胞,如脑膜炎球菌,链球菌,葡萄球菌,大肠杆菌,链霉菌和枯草芽孢杆菌的细胞;真菌细胞,如酵母细胞和曲霉细胞;昆虫细胞如果蝇 S2 细胞和球粘虫 SF9 细胞;动物细胞,如 CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 和 Bowes 黑素瘤细胞;植物细胞。

可应用各种表达系统。这类系统包括染色体系统、附加体系统、和病毒衍生的系统,如来源于细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件的载体,来源于病毒如杆状病毒、SV40 等乳多空病毒、痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒、猪 α 疱疹病毒 I 型以及逆转录病毒的载体,以及来源于以上之组合的载体,如来源于质粒和粘粒、噬菌粒等噬菌体基因元件的载体。这些表达系统可能含有调节并引起表达的控制区。一般可利用适于在宿主中维持、繁殖或表达多核苷酸以产生多肽的任何系统或载体。适当的核苷酸序列可用众多已知和常规的技术中的任何一种插入表达系统中,所述技术如 Sambrook 等,分子克隆,实验室手册(同上)所示。

所翻译的蛋白质分泌到内质网腔、胞质周围间隙、或胞外环境中,可将适当信号掺入目的多肽中。这些信号对所述多肽而言可能是内源性的(图 5 中氨基酸残基 1-19)或它们可能是异源信号。

20 重组表达的肽/多肽的纯化

本发明的肽或多肽可自重组细胞培养经已知方法回收并纯化,所述方法有硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。最优选利用高效液相层析进行纯化。当所述多肽在分离或纯化期间变性后,可利用蛋白质折叠的已知技术再生其活性构象。

25 尽管载体上 LB1(f) 嵌合多肽的基因序列可以用组氨酸标签序列进行标记,以便于该多肽的纯化,但是它并非本发明的必需元件,因为没有组氨酸标签的多肽仍可以用上述技术之一纯化。

30 实施例 3 描述了 LPD-LB1(f)(第 2 组/第 1 组/第 3 组)(或 LPD-LB1(f)2,1,3) 嵌合多肽的纯化方法。LPD-LB1(f)嵌合多肽在 C-末端含有 3 个或多个 LB1(f) 肽时比只含一个 LB1(f)肽更易纯化。这是因为在 C-末端只含有一个 LB1(f)

肽的多肽可测得有部分的降解，而在 C-末端含有 3 个 LB1(f)肽的多肽则没有发生降解。当发生部分降解后，可通过在纯化过程中加一步精细阴离子交换步骤而使全长多肽与已降解多肽分离开来。

抗体

- 5 本发明的肽和多肽，或表达它们的细胞均可作为免疫原用以产生对野生型 LB1(f)肽具有免疫特异性的抗体，术语“免疫特异性的”指所述抗体对本发明的肽或多肽的亲和力远大于对现有领域中其它相关多肽的亲和力。

可应用常规以抗原免疫动物的方法将所述肽或多肽投予动物，优选非人类的体内，收集血液，分离血清并利用与该肽发生反应的抗体而获得针对所述肽或多肽的抗体。含此抗体的血清或 IgG 可在分析这种蛋白时使用。制备单克隆抗体时，可使用经传代细胞系培养而产生抗体的任何技术。实例包括杂交瘤技术(kohler,G和 Milstein,C.,自然(1975) 256:495-497)， trioma 技术，人 B-细胞杂交瘤技术(Kozbor 等,今日免疫学(Immunology Today) (1983) 4:72) 和 EBV-杂交瘤技术(Cole 等, 单克隆抗体和癌症治疗, 77-96 页, Alan R. Liss, Inc., 1985)。

15 用于生产单链抗体的技术(美国专利号: 4,946,778)也适用于产生针对本发明肽或多肽的单链抗体。转基因鼠, 或其它生物体包括其它哺乳动物可以用来表达人源化的抗体。

上述抗体可用于分离或鉴定表达此肽的克隆, 或通过亲和层析纯化本发明的肽或多肽。

20 本发明的肽或多肽还可用于产生对流感嗜血杆菌的感染进行被动免疫治疗的多克隆抗体。优选人的免疫球蛋白, 因为异源化的免疫球蛋白可能会诱导对其外源免疫原性组分的良好免疫应答。多克隆抗血清可从所述肽或多肽用上述任一种方式所免疫的个体中获得。然后富集免疫球蛋白组分。例如, 特异于所述蛋白质之表位的免疫球蛋白可通过免疫亲和层析技术用本发

25 明的肽或多肽富集。抗体自抗血清特异地吸附至含有所述肽的表位的免疫吸附剂上, 然后作为富集的免疫球蛋白级分从该免疫吸附剂上洗脱。

疫苗

30 对 ntHi-1128 菌株的 LB1(f)肽的此前研究表明, 这种肽可作为免疫原用于开发抗流感嗜血杆菌疾病的亚单位疫苗, 特别是能够防止或减少对急性中耳炎和由不可分型的流感嗜血杆菌株所致疾病的易感。本发明因发现了

LB1(f)肽的三个主要组而扩大了此项工作的范围。这三组的不同之处在于不同组的菌株之间不太可能获得有效的交叉保护。因此本发明通过对各组之实例的应用来提供针对可表达P5样菌毛蛋白之流感嗜血杆菌(优选ntHi)的更有效且全面的疫苗。

- 5 相应地,本发明另一方面是包含免疫有效量的至少一种本发明肽或多肽的疫苗组合物。优选该组合物还应包含一种可药用的赋形剂。疫苗的制备概述于疫苗设计(“亚单位和佐剂方法”(Powell M.F. & Newman M.J. 编)(1995)Plenum Press New York)。

10 另外,本发明的肽和多肽优选在本发明的疫苗制剂中有佐剂辅助。合适的佐剂包括铝盐,例如氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝,但也可钙,铁或锌,或酰化的酪氨酸或酰化的糖的不溶性悬浮液,多糖的阳离子或阴离子衍生物,或多聚磷腈。其它已知的佐剂包括含有CpG的寡核苷酸。这类寡核苷酸的特征是CpG二核苷酸未甲基化。这类寡核苷酸已是众所周知并述于如WO 96/02555。

- 15 其它优选佐剂是那些能优先诱导TH1型免疫应答的佐剂。高水平的TH1型细胞因子更易诱导对所选抗原的细胞免疫应答,而高水平的TH2型细胞因子更易诱导对所选抗原的体液免疫应答。合适的佐剂系统包括,例如单磷酸脂质A,优选3-脱-O-酰化单磷酸脂质A(3D-MPL),或(3D-MPL)与铝盐的组合。CpG寡核苷酸也优先诱导TH1应答。一种强化系统包含单磷酸脂质A和皂苷衍生物的组合,特别是QS21和3D-MPL的组合(如WO 94/00153所公开),或一种弱反应组合物,其中Q21用胆固醇猝灭(如WO 96/33739所公开)。一种包含QS21 3D-MPL和维生素E之水包油乳剂的特有效佐剂制剂在WO 95/17210中有述,而且也是一种优选的制剂。

25 本发明的另一方面涉及在哺乳动物中诱导免疫应答的方法,其包括用本发明中肽或多肽以有效量接种该哺乳动物,所述有效量足以产生针对流感嗜血杆菌疾病的抗体和/或T-细胞免疫应答,从而保护在群体中保护该动物。本发明另一方面涉及在哺乳动物体内诱导免疫应答的方法,其中包括通过载体指导本发明多核苷酸的体内表达,从而运送本发明的肽或多肽,以诱导免疫应答,产生抗体保护该动物远离疾病。

- 30 本发明另一方面涉及一种免疫/疫苗制剂(组合物),当将这种制剂投予哺乳动物宿主后,在该宿主体内诱导对于LB1(f)肽或多肽的免疫应答,其中该

组分包括 LB1(f)肽或多肽的基因，或 LB1(f)肽或多肽本身。疫苗的制剂还可包含一种合适的载体。LB1(f)疫苗组合物优先经口、鼻内或非胃肠道(包括皮下，肌肉，静脉，皮内，穿皮注射)给药。适于非胃肠道给药的制剂包括可能含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使该制剂与受者血液等渗的溶剂的水相和非水相无菌注射液；可能含悬浮剂或增稠剂的水相和非水相无菌悬浮液。制剂应存于单元剂或多剂容器，如密封的安瓿瓶和管形瓶中，并可能冻干贮存，只需新鲜加入无菌液体赋形剂就可以使用。所述疫苗制剂也可包括上述佐剂。用量取决于疫苗的特异性活性并可通过常规实验轻易测定。

5 本发明另一方面涉及包含本发明多核苷酸的免疫/疫苗制剂。这类技术为领域内已知，如参见 Wolff 等，科学(1990) 247：1465-8。

本发明的肽或多肽可与流感嗜血杆菌的其它蛋白质抗原一起作为多价亚单位疫苗给药，以获得更高的抗菌活性。它们也可与多糖抗原如流感嗜血杆菌 b 的 PRP 荚膜多糖(优选偶联至一种蛋白质)。与其它蛋白质的表位组合给药时，LB1(f)肽或多肽可以作为混合物单独给药，或作为偶联物或遗传融合的多肽给药。偶联物可通过偶联蛋白质物质的常规技术获得。本发明的肽或多肽可以与其它生物体的抗原(如有荚膜或无荚膜的细菌、病毒、真菌、和寄生虫)联合使用。例如，本发明的肽或多肽与中耳炎或其它疾病所涉及的其它微生物抗原联合使用很有效。这些微生物包括肺炎链球菌，A 族酿脓链球菌，金黄色葡萄球菌，呼吸道合胞病毒和粘膜炎布兰汉氏球菌。

15 由于本发明的多肽本身包含 P5 样菌毛蛋白，本发明的另一优先方面为在疫苗制剂中包含来自不同的 LB1(f)组的两种或更多种 P5 样菌毛蛋白。

由俄亥俄州立大学 Dr. L. Bakaletz 在毛丝鼠动物模型中对本发明的肽或多肽作为抗 ntHi 所致中耳炎的潜在疫苗进行了评价。该模型模拟儿童中耳炎的发展，是建立在每隔一周的连续鼻内给予腺病毒和 ntHi 的基础上。在这些条件中，细菌在鼻咽处定居后，可通过咽鼓管侵入到中耳。一旦如此，ntHi 将增殖并诱导类似于儿童体内的炎症过程。

25 疫苗评价中，毛丝鼠主动免疫后，经鼻内途径接种 ntHi；甚至已有腺病毒的预感染时，它们因太老而几乎无一发生了中耳炎。另一种可替换的攻击途径是直接细菌穿过颅骨接种至中耳(大泡)。也可使用被动转移/攻击方法以避免穿大泡的攻击。

30 对于所有这些攻击，可以通过(穿过外耳的)耳镜检查或耳室压的测定分

别评估中耳的炎症程度或中耳压力的变化及中耳内流体的出现，从而给疾病的严重性打分。疫苗的效率通过严重性和/或炎症时间的减少以及耳部和鼻咽部定居量的减少而评价。

5 在早先的实验中, ntHi-1128 株的 LB1 以及 LPD 的保护效率在主动免疫及大泡内的攻击后可以评估。重复地, 用 LB1 免疫可保护毛丝鼠免患中耳炎, 其指征是耳炎时间的缩短, 严重性的减小, 和耳部和鼻咽部定居的减少。单独用 LPD 免疫可保护毛丝鼠抵抗中耳炎, 但单独用 LB1 免疫不可, 且没有重复性。

10 本发明的疫苗可以进一步通过检验本发明的肽或多肽是否能够抑制 ntHi 粘附毛丝鼠的喉上皮细胞, 和它们是否能抑制 ntHi 体内定居于鼻咽部。ntHi-1128 的 LB1 肽在抑制 ntHi 粘附毛丝鼠喉上皮细胞时有剂量依赖效应(可能因为它是 ntHi 结合的直接立体抑制物), 并减少鼻咽灌洗液中的 ntHi。鼻咽部的定居是发生中耳炎必需的起始步骤, 因此这种对定居的抑制还将有助于抑制中耳炎的发展。

15 诊断试验/试剂盒

本发明也涉及将本发明的肽或多肽, 和抗这些肽或多肽的抗体作为诊断试剂的应用。LB1(f)肽的检测将提供一种在许多疾病中辅助诊断或确诊流感嗜血杆菌性疾病的诊断工具。

20 用于诊断的生物样品可以来自受试者的细胞, 如血清、血液、尿液、唾液、组织活检标本、痰、灌洗液。

与表 6-8 中的核苷酸序列之一相同或完全相同的本发明多核苷酸可以作为 cDNA 和基因组 DNA 杂交的探针或作为核酸扩增反应(PCR)的引物, 以分离编码 P5 样菌毛蛋白的全长 cDNA 和基因组克隆。这类杂交技术为领域内技术人员熟知。这些核苷酸序列通常与参照序列有 80%相同, 优选 90%相同, 25 更优选 95%相同。探针通常包含至少 15 个核苷酸。优选这类探针有至少 30 个核苷酸, 甚至可能有至少 50 个核苷酸。特别优选的探针为 30-50 个核苷酸。采用此方法, 可在生物样品中检测流感嗜血杆菌, 而在特别严谨的杂交条件下, 出现在样品中的一或多株特定流感嗜血杆菌株可用表 6-8 中的野生型多核苷酸序列确定。

30 因此本发明另一方面涉及疾病诊断试剂盒, 特别是诊断流感嗜血杆菌性疾病的诊断试剂盒, 其包括:

- (a)本发明的多核苷酸，优选表 6-8 中的核苷酸序列；
 (b)互补于(a)的序列的核苷酸序列；
 (c)本发明的 LB1(f)肽，优选 SEQ ID NO:1-4 的肽；或
 (d)抗本发明的 LB1(f)肽，优选 SEQ ID NO:1-4 的肽的抗体。
- 5 优选在任何这类试剂盒中，(a)，(b)，(c)或(d)可能包含一种基本组分。
 所举例的文献已引入本文作参考。
 本发明将通过以下实施例进一步举例说明。

实施例：

- 10 以下实施例除非另有详述，均用众所周知的且是本领域常规的标准技术实施。

实施例均为举例说明，并非限制本发明。

实施例 1：测定各种 ntHi 菌株中 LB1(f)肽的氨基酸序列的变异性

1a) ntHi 分离物的培养 - 为 PCR 分析准备样品

- 15 53 个 ntHi 分离物得自俄亥俄州立大学 Dr. L. Bakaletz；30 个 ntHi 分离物得自 Dr. A. Forsgren of Malmo, 瑞典。

- 将每一 ntHi 分离物的 0.1 ml 培养液涂布于 Gelose 巧克力琼脂(GCA)上。样品的纯度可通过固相化的培养基来控制(Petri 平板中的 TSA-胰蛋白胨琼脂)。此培养皿于 35 °C 温育 24 小时。平板上的菌落用 5ml 已过滤过的 TSB
 20 (胰蛋白胨肉汤+3µg/µl NAD；+3µg/µl Hemine +1%马血清)重新悬浮。50ml TSB 液体培养基与 2.5ml 培养基一起接种，并于 35 °C 温育。当培养液浓度达 10⁸ 细胞/ml 时，取 10ml 培养液于 4 °C 以 10,000 rpm 离心 10 分钟。去除上清液，细胞用生理缓冲液洗涤，再于 4 °C 以 10,000 rpm 离心 15 分钟。重新悬浮的细胞终浓度为 10⁹ 细胞/ml。该细胞在 95-100 °C 煮沸 10-15 分钟，然后
 25 直接放置在冰上。样品于 -70 °C 冻存，以备经 PCR 扩增 DNA。

1b) PCR 扩增 P5 样菌毛蛋白基因的 DNA 片段

- 菌毛蛋白基因片段的扩增在实施例 1a) 的 ntHi 制品上实施。取 200µl ntHi 制品于室温以 14,200 rpm 离心 3 分钟。去掉全部上清。将细胞重悬于 25µl ADI 中，95 °C 煮沸 10 分钟，以 14,200 rpm 离心 3 分钟。取 5µl 上清用于 PCR
 30 反应。

DNA 扩增用特异性引物进行：

NTHi-01: 5'-ACT-GCA-ATC-GCA-TTA-GTA-GTT-GC-3'

NTHi-02: 5'-CCA-AAT-GCG-AAA-GTT-ACA-TCA-G-3'

PCR 反应混合物包括: 细胞抽提液上清, 5.0 μ l; 引物 NTHi-01 (1/10), 1.0 μ l; 引物 NTHi-02(1/10), 1.0 μ l; DMSO, 2.0 μ l; dNTP 混合物, 4.0 μ l; 10X 缓冲液, 5.0 μ l; ADI, 31.5 μ l; Taq 聚合酶, 0.5 μ l。

PCR 循环条件如下: (94 $^{\circ}$ C 1 分钟; 50 $^{\circ}$ C 1 分钟; 72 $^{\circ}$ C 3 分钟)共 25 个循环,最后以 72 $^{\circ}$ C 10 分钟终止。此反应可通过 3%琼脂糖凝胶在 TBE 缓冲液中的电泳监控。

用于鉴别特定 ntHi 的 P5 样菌毛蛋白 LB1(f)肽属于哪组的引物如下(它们用于与上述条件相似的反应中)。

第 1 组:

NTHi-01 : 5'-ACT-GCA-ATC-GCA-TTA-GTA-GTT-GC-3'

NTHi-GR1: 5'-GTG-GTC-ACG-AGT-ACC-G-3'

第 2 组:

15 NTHi-01: 5'-ACT-GCA-ATC-GCA-TTA-GTA-GTT-GC-3'

NTHi-GR2bis: 5'-TCT-GTG-ATG-TTC-GCC-TAG-3'

第 3 组:

NTHi-01: 5'-ACT-GCA-ATC-GCA-TTA-GTA-GTT-GC-3'

NTHi-GR3: 5'-CTA-TCG-ATG-CGT-TTA-TTA-TC-3'

20 1c) DNA 纯化

PCR 反应中的 DNA 片段用 PCR Clean Up 试剂盒(Boehringer Mannheim) 纯化。在该方案的最后, 用 25 μ l 重蒸水经两次洗脱将纯化的 PCR 产物从硅胶树脂上洗脱下来。

25 纯化产物经 3%琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色分析。该 DNA 随后可用于测序。

1d) DNA 测序

用 ABI 自动测序仪、ABI-PRISM - DNA 测序试剂盒(采用 Terminator PCR 循环测序), 和 Amplitaq DNA 聚合酶 FS(来自 Perkin Elmer)进行。

所用 PCR 反应混合物如下:

30 混合物(来自试剂盒), 8.0 μ l; DNA(大约 1 μ g), 3.0 μ l; 引物(如下): 1/5 或 1/10, 1.0 μ l; ADI, 8.0 μ l。

所用测序引物如下：

NTHi-03:5'-AGG-TTA-CGA-CGA-TTT-CGG-3' 或

NTHi-04:5'-CGC-GAG-TTA-GCC-ATT-GG-3' 或

NTHi-05:5'-AAA-GCA-GGT-GCT-TTA-G-3' 或

5 NTHi-06:5'-TAC-TGC-GTA-TTC-TGC-ACC-3'

或

NTHi-03:5'-AGG-TTA-CGA-CGA-TTT-CGG-3'

NTHi-04:5'-CGC-GAG-TTA-GCC-ATT-GG-3'

NTHi-05:5'-AAA-GCA-GGT-GTT-GCT-TTA-G-3'

10 NTHi-06:5'-TAC-TGC-GTA-TTC-TTA-TGC-ACC-3'

NTHi-14:5'-GGT-GTA-TTT-GGT-GGT-TAC-C-3'

NTHi-15:5'-GTT-ACG-ACG-ATT-ACG-GTC-G-3'

PCR 循环测序条件如下：(96 °C 30 秒； 50 °C 15 秒； 60 °C 4 分钟)共 25 个循环，最后以 72 °C 10 分钟结束。

15 制备 PCR 产物并通过以下进行分析：在 PCR 测序反应中加 80µl ADI 至反应物终体积为 100µl；在该 DNA 溶液中加入等体积的酚/氯仿。样品在 4 °C 以 14,500rpm 离心 3 分钟，然后去掉顶层的水相。酚/氯仿步骤和离心步骤再重复一次。然后加入 10µl 3M NaAc (pH4.8)和 220µl 100%乙醇(在室温的条件下)，并混匀。样品于-20 °C放置 5 分钟，然后在 4 °C 以 14,000 rpm 离心 20 分钟。去掉乙醇上清液，沉淀用 70%乙醇 1ml 悬浮(在室温下)。在 4 °C 以 14,000rpm 离心 10 分钟，如上述去掉上清液。沉淀在空气中干燥，冷冻过夜。用以下溶液溶解沉淀：甲酰胺 100%去离子水，5 倍体积；0.5M EDTA, pH8.00，1 倍体积；搅拌几秒钟后上样至测序胶。

1e)汇总的结果和结论

25 对各种 ntHi 分离物中 P5 样菌毛蛋白的 LB1(f)肽的序列分析示于表 1。通过使 LB1(f)肽对应于 SEQ ID NO：5，2 或 3(分别为第 1，2，或 3 组 LB1(f)肽的代表)进行对齐排列而确定分组。所测的 LB1(f)肽必需与某一组的代表肽具有至少 75%的相同性才能被归类于这一组。表 2，3 和 4 分别显示第 1，2 和 3 组 LB1(f)肽序列的对齐排列序列。表 5 显示第 1、2a、2b 和 30 3 组的代表性 LB1(f)肽相互之间的对齐排列。

表 6-9 分别显示表 2-5 中 LB1(f)肽的 DNA 序列。

表 1

	血清型	n°order	菌株	组别
1	NTHi	1848L	流感嗜血杆菌	1
2	NTHi	1848NP	流感嗜血杆菌	1
3	NTHi	1885R	流感嗜血杆菌	1
4	NTHi	1886MEE	流感嗜血杆菌	2
5	NTHi	10547RMEE	流感嗜血杆菌	3
6	NTHi	10548LMEE	流感嗜血杆菌	3
7	NTHi	10567RMEE	流感嗜血杆菌	1
8	NTHi	10568LMEE	流感嗜血杆菌	1
9	NTHi	10567&8NP	流感嗜血杆菌	3
10	NTHi	1371MEE	流感嗜血杆菌	1
11	NTHi	214NP	流感嗜血杆菌	1
12	NTHi	1370MEE	流感嗜血杆菌	1
13	NTHi	1380MEE	流感嗜血杆菌	1
14	NTHi	217NP	流感嗜血杆菌	1
15	NTHi	266NP	流感嗜血杆菌	2
16	NTHi	167NP	流感嗜血杆菌	1
17	NTHi	1657MEE	流感嗜血杆菌	1
18	NTHi	284NP	流感嗜血杆菌	1
19	NTHi	1666MEE	流感嗜血杆菌	1
20	NTHi	287NP	流感嗜血杆菌	1
21	NTHi	1236MEE	流感嗜血杆菌	2
22	NTHi	183NP	流感嗜血杆菌	2
23	NTHi	165NP	流感嗜血杆菌	2
24	NTHi	1182MEE	流感嗜血杆菌	1
25	NTHi	166NP	流感嗜血杆菌	1
26	NTHi	1199MEE	流感嗜血杆菌	1
27	NTHi	172NP	流感嗜血杆菌	1
28	NTHi	1230MEE	流感嗜血杆菌	1
29	NTHi	180NP	流感嗜血杆菌	1
30	NTHi	1234MEE	流感嗜血杆菌	1
31	NTHi	182NP	流感嗜血杆菌	1
32	NTHi	152NP	流感嗜血杆菌	1
33	NTHi	226NP	流感嗜血杆菌	1
34	NTHi	1714MEE	流感嗜血杆菌	2
35	NTHi	297NP	流感嗜血杆菌	2
36	NTHi	1715MEE	流感嗜血杆菌	2
37	NTHi	1729MEE	流感嗜血杆菌	3
38	NTHi	1728MEE	流感嗜血杆菌	3

39	NTHi	250NP	流感嗜血杆菌	1	
40	NTHi	1563MEE	流感嗜血杆菌	1	
41	NTHi	1562MEE	流感嗜血杆菌	1	
42	NTHi	10559RMEE	流感嗜血杆菌	1	
43	NTHi	1712MEE	流感嗜血杆菌	1	
44	NTHi	1621	流感嗜血杆菌	1	
45	NTHi	1060RMEE	流感嗜血杆菌	1	
46	NTHi	86-027MEE	流感嗜血杆菌		2
47	NTHi	86-027NP	流感嗜血杆菌	1	
48	NTHi	86-028NP	流感嗜血杆菌	1	
49	NTHi	86-028LMEE	流感嗜血杆菌	1	
50	NTHi	90-100	流感嗜血杆菌	1	
51	NTHi	90-121RMEE	流感嗜血杆菌	1	
52	NTHi	1128	流感嗜血杆菌	1	
53	NTHi	90-100RMEE	流感嗜血杆菌	1	
54	NTHi*	476	流感嗜血杆菌	1	
55	NTHi*	480	流感嗜血杆菌	1	
56	NTHi*	481	流感嗜血杆菌	1	
57	NTHi*	482	流感嗜血杆菌	1	
58	NTHi*	484	流感嗜血杆菌	1	
59	NTHi*	486	流感嗜血杆菌	1	
60	NTHi*	490	流感嗜血杆菌	1	
61	NTHi*	492	流感嗜血杆菌		2
62	NTHi*	494	流感嗜血杆菌	1	
63	NTHi*	495	流感嗜血杆菌		2
64	NTHi*	498	流感嗜血杆菌	1	
65	NTHi*	499	流感嗜血杆菌	1	
66	NTHi*	500	流感嗜血杆菌		2
67	NTHi*	501	流感嗜血杆菌	1	
68	NTHi*	502	流感嗜血杆菌		2
69	NTHi*	503	流感嗜血杆菌	1	
70	NTHi*	504	流感嗜血杆菌		3
71	NTHi*	506	流感嗜血杆菌		2
72	NTHi*	507	流感嗜血杆菌	1	
73	NTHi*	546	流感嗜血杆菌		2
74	NTHi*	567	流感嗜血杆菌	1	
75	NTHi	544	流感嗜血杆菌		3
76	NTHi	565	流感嗜血杆菌	1	
77	NTHi	600	流感嗜血杆菌		3
78	NTHi	601	流感嗜血杆菌	1	
79	NTHi	603	流感嗜血杆菌	1	

80	NTHi	604	流感嗜血杆菌		2
81	NTHi	605	流感嗜血杆菌	1	
82	NTHi	606	流感嗜血杆菌	1	
83	NTHi	608	流感嗜血杆菌	1	

- 5 所调查的 ntHi 菌株的总列表以及它们各自的 P5 样菌毛蛋白 LB1(f) 肽序列的归类(菌株 1-53 来自 L. Bakaletz ; 菌株 54-83 来自 A. Forsgren)。*指明一 ntHi 欧洲株, 所有其它菌株均分离自美国。菌株 1885 和 1128 可从美国典型培养物保藏中心获得(编号分别为 ATCC#55431 和 55430)。

表 2: 第1组的各种肽序列

N1128	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N1380MEE	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N1885R	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N1562MEE	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N1563MEE	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N180NP	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N217NP	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N284NP	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N1666MEE	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N1230MEE	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
NTHI-501	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
NTHI-507	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
NTHI-565	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
NTHI-603	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
NTHI-608	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N287NP	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N86028LM	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N86028NP	RSDYKFYEDANGTRDHKKG
N152NP	RSDYKFYEDADGTRDHKKG
N1234MEE	RSDYKFYDDANGTRDHKKG
N182NP	RSDYKFYDDANGTRDHKKG
N90100RM	RSDYKFYEDENGTRDHKKG
N90100	RSDYKFYEDENGTRDHKKG
N10567RM	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
N1060MEE	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
N172NP	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
N1199MEE	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
N10568LM	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
N90121RM	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
N86027NP	RSDYKFYEVANGTRDHKKG
NTHI-486	RSDYKFYEVANGTRDHKKG
N1712MEE	RSDYKFYEVANGTRDHKKG
NTHI-503	RSDYKFYEAANGTRDHKKG
NTHI-476	RSDYKFYEEANGTRDHKKG
N166NP	RSDYKFYNDANGTRDHKKS
N1182MEE	RSDYKFYNDANGTRDHKKS
N1848NP	RSDYKFYEVANGTRDHKKS
N1371MEE	RSDYKFYEVANGTRDHKKS
NTHI-498	RSDYKFYEVANGTRDHKKS
NTHI-606	RSDYKFYEVANGTRDHKKS
N1848L	RSDYKFYEVANGTRDHKKS
NTHI-567	RSDYKFYEDANGTRDRKTG
NTHI-484	RSDYKFYEDANGTRKHKEG
N10559RM	RSDYKLYEVANGTRDHKKS
NTHI-601	RSDYKFYEVANGTRDHKQS
NTHI-481	RSDYKFYEVANGTRDHKQS
NTHI-482	RSDYKFYEVANGTRDHKQS
N1370MEE	RSDYKFYEVANGTRDHKQS
N226NP	RSDYKFYEEANGTRDHKRS
NTHI-480	RSDYKFYEDANGTRERKRG
N1657MEE	RSDYKFYEVANGTRERKKG
N267NP	RSDYKFYEVANGTRERKKG
NTHI-490	RSDYKFYEVANGTRERKKG
NTHI-494	RSDYKFYEVANGTRERKKG
N214NP	RSDYKFYEPNGTRDHKQS
N250NP	RSDYKRYEEANGTRNHDKG
N1521	RSDYKRYEEANGTRNHDKG

NTHI-605	RSDYKRYEEANGTRNHDKG
NTHI-499	RSDYEFYEAPNSTRDHKKG

表 3： 第2组的各种肽序列

N1715MEE	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
N1714MEE	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
N86027RM	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
N297NP	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
N266NP	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
N1885MEE	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
NTHI-546	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
NTHI-604	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
NTHI-492	RSDYKLYNKNSS-NSTLKNLGE
NTHI-502	RSDYKLYDNSSSN-TLKKLGE
NTHI-506	RSDYKLYNKNSS-NSTLKNLGE
N1236MEE	RSDYKLYNKNSS---TLKDLGE
NTHI-500	RSDYKLYNKNSS---TLKDLGE
NTHI-183	RSDYKLYNKNSS---TLKDLGE
N165NP	RSDYKLYNKNSSN-TLKDLGE
NTHI-495	RSDYKLYNKNSSD-ALKLGE

表 4： 第3组的各种肽序列

N1729MEE	RSDYKFYDNKRID
NTHI-504	RSDYKFYDNKRID
NTHI-544	RSDYKFYDNKRID
NTHI-600	RSDYKFYDNKRID
N1728MEE	RSDYKFYDNKRID
N10548LM	RSDYKFYDNKRID
N10547RM	RSDYKFYDNKRID
N105678R	RSDYKFYDNKRID

表 5： 第1、2a、2b和3组的各种肽序列

N1128	RSDYKFYEDANGTRDHKKG---
N1715MEE	RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE
NTHI-183	RSDYKLYNKNSS---TLKDLGE
N1729MEE	RSDYKFYDN-----KRID---

表 6： 第1组的各种基因序列

N1128	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1380MEE	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1885R	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1562MEE	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1563MEE	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N180NP	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N217NP	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N284NP	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1666MEE	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1230MEE	CGTTCTGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT

NTHI-501 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-507 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-565 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-603 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-608 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N287NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N86028LM CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N86028NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N152NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1234MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGATGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
182NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGATGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N90100RM CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N90100 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N10567RM CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1060MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N172NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1199MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N10568LM CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N90121RM CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N86027NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-486 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1712MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-503 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGCTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-476 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGAAGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N166NP CGTTCGATTATAAAATTTTATAATGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1182MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATAATGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1848NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1371MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-498 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-606 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
N1848L CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-567 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-484 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTAAAGCAAGGAAGGT
N10559RM CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
NTHI-601 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGCAAAAGT
NTHI-481 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGCAAAAGT
NTHI-482 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGCAAAAGT
N1370MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGCAAAAGT
N226NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGAAGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGAGAAAGT
NTHI-480 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGATGCAAAACGGTACTCGTGAGCGCAAGAGAGGT
N1657MEE CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGAGCGCAAGAAAGGT
N267NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGAGCGCAAGAAAGGT
NTHI-490 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGAGCGCAAGAAAGGT
NTHI-494 CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGAGCGCAAGAAAGGT
N214NP CGTTCGATTATAAAATTTTATGAAGTTGCAAAACGGTACTCGTGACCACAAGCAAAAGT
N250NP CGTTCGATTATAAACGTTATGAAGAAGCAAAACGGTACTCGTAACCACGACAAAGGT
N1521 CGTTCGATTATAAACGTTATGAAGAAGCAAAACGGTACTCGTAACCACGACAAAGGT
NTHI-605 CGTTCGATTATAAACGTTATGAAGAAGCAAAACGGTACTCGTAACCACGACAAAGGT
NTHI-499 CGTTCGATTATGAATTTTATGAAGCTCCAACAGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT

表 7: 第2组的各种基因序列

N1715MEE CGTTCGACTATAAAATGTACAATAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
N1714MEE CGTTCGACTATAAAATGTACAATAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
N86027RM CGTTCGACTATAAAATGTACAATAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
N297NP CGTTCGACTATAAAATGTACAATAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
N266NP CGTTCGACTATAAAATGTACAATAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
N1885MEE CGTTCGACTATAAAATGTACAATAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA

5
 NTHI-546 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
 NTHI-604 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
 NTHI-492 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGT---AATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
 NTHI-502 CGTTCTGACTATAAAATTGTACGATAAAAAATAGTAGTAGTAAT---ACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
 NTHI-506 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGT---AATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
 N1236MEE CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGT-----ACTCTTAAAGACCTAGGCGAA
 NTHI-500 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGT-----ACTCTTAAAGACCTAGGCGAA
 NTHI-183 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGT-----ACTCTTAAAGACCTAGGCGAA
 N165NF CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGTAAT-----ACTCTTAAAGACCTAGGCGAA
 NTHI-495 CGTTCTGACTATAAAATTACAATAAAAAATAGTAGTGAT-----GCTCTTAAAAACCTAGGCGAA

表 8： 第3组的各种基因序列

10
 N1729MEE CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 NTHI-504 CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 NTHI-544 CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 NTHI-600 CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 N1728MEE CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 N10548LM CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 N10547RM CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT
 N105678R CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAATAAACGCATCGAT

表 9： 第1、2a、2b和3组的各种基因序列

15
 N1128 CGTTCTGATTATAAAATTTATGAAGATGCAACGGTACTCGTGACCACAAGAAAGGT
 N1715MEE CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGTAGTAATAGTACTCTTAAAAACCTAGGCGAA
 NTHI-183 CGTTCTGACTATAAAATTGTACAATAAAAAATAGTAGT-----ACTCTTAAAGACCTAGGCGAA
 N1729MEE CGTTCTGACTATAAAATCTACGATAAT-----AAACGCATCGAT

该研究表明：所测 83 株 ntHi 分离物上 P5 样菌毛蛋白的 LB1(f)肽可分为三组，且 ntHi 的美国和欧洲分离株均包括在这种分类中。

实施例 2：在大肠杆菌中表达 LPD-LB1(f)肽融合多肽

材料资源：

20 1)表达载体 pMG1

表达载体 pMG1 是 pBR322 的衍生物，其中导入了 λ 噬菌体中用于转录和翻译外源插入基因的控制元件 (Young 等,(1983)美国国家科学院院报 80,6105-6109)。另外，氨苄青霉素抗性基因换成卡那霉素抗性基因。

25 该载体包含 λ 启动子 P_L、操纵子 O_L 和两个用于减弱转录的极性效应的位点(Nut_L 和 Nut_R)。将含有 P_L 启动子的载体导入溶原性大肠杆菌以稳定该质粒 DNA。溶原性菌株的基因组中整合了有复制缺陷的 λ 噬菌体 DNA。作为染色体的 λ 噬菌体 DNA 指导 cI 抑制蛋白的合成，该蛋白可以结合载体的 O_L 抑制子，阻止 RNA 聚合酶结合 PL 启动子和因此所致的插入基因的转录。
 30 AR58 表达菌株的 cI 基因包含一个温度敏感性突变，使 P_L 指导的转录可通过温度变化来调节，即升高培养温度使抑制物失活，则外源蛋白质的合成得以启动。该表达系统使得对外源蛋白质特别是那些可能对细胞有毒害的蛋白质

的合成可以进行控制。

2)表达载体 pMGMCS

pMG1 中 BamHI 和 XbaI 限制性酶切位点之间的核苷酸序列被一多克隆位点 DNA 片段(MCS)所替代, 产生 pMGMCS 表达载体(图 1)。

- 5 在 MCS 序列的 3'末端加一个多组氨酸序列, 以使融合至一个 6 组氨酸尾的蛋白质产物表达。

编码 NS1 的最开始三个氨基酸(Met-Asp-Pro)的序列也出现在该载体上, 位于 BamHI 限制性酶切位点之前。

3)载体 pRIT 14588 的构建

- 10 从 pMGMCS 载体产生 pRIT 14588 表达载体的克隆策略概述于图 2。用分别在 5'和 3'端包含 BamHI 和 NcoI 限制性位点的引物经 PCR 从 pHIC348 载体扩增脂蛋白 D 的基因(Janson 等, (1991)感染与免疫 59, 119-125)。然后将 BamHI/NcoI 片段插入 pMGMCS 的 BamHI 和 NcoI 位点之间。

- 15 脂蛋白 D 基因的产物含有其天然信号序列, 但最开始的三个氨基酸已被 NS1 的 Met-Asp-Pro 取代。

用 pRIT 14588 将 LB1(f)肽导入脂蛋白基因的 3'末端。所用 LB1(f)肽如下: 第 1 组, ntHi-1128 (SEQ ID NO:5); 第 2 组, ntHi-1715MEE (SEQ ID NO:2); 第 3 组, ntHi-1729 MEE (SEQ ID NO:3)。

4)大肠杆菌菌株 AR58

- 20 用来生产蛋白 D 载运蛋白的 AR58 溶原性大肠杆菌菌株是标准的 NIH 大肠杆菌 K12 菌株 N99(F⁻su⁻galK2, lacZ⁻thr⁻)的衍生物。它包含一个缺陷的溶原性 λ 噬菌体(galE::TN10, λ KiL⁻ci857 DH1)。KiL⁻表型阻止宿主大分子合成的关闭。ci857 突变为 ci 抑制子提供一种温度敏感性损伤。DH1 缺失除去了 λ 噬菌体的右侧操纵子和宿主的 bio, uvr3 以及 chlA 位点。通过
25 用预先生长在 SA500 衍生物 (galE::TN10, λ KiL⁻ci857 DH1)上的 P1 噬菌体原种转导 N99 就可产生 AR58 菌株(Mott 等(1985), 美国国家科学院院报, 82,88-92),用四环素来筛选导入了缺陷的溶原性噬菌体的 N99 菌株(编码四环素抗性的 TN10 转座子出现在 galE 基因的邻区)。

实施例 2a)脂蛋白 D-第 1 组 LB1(f)之融合体的产生

- 30 该构建的目的是将 LB1(f)肽的 19 个残基从 3'方向克隆至 pRIT 14588 的多克隆位点上 NcoI 位点处。在紧邻 NcoI 位点 3'处, 导入两个甘氨酸残基,

使 LB1(f)肽的基因和 LPD 基因在同一框架内。在这两个甘氨酸残基后面导入编码 LB1(f)肽 N 末端 8 个天然残基(来自 P5 样菌毛蛋白)的 DNA 序列,其后为 LB1(f)DNA 序列,再往后是编码 LB1(f)肽 C 末端 5 个天然残基的 DNA 序列。该质粒(称为 LPD-LB1-A)示于表 3,其制备如下:

- 5 用 NcoI 和 SpeI 酶切 pRIT 14588,并将该线性大片段去磷酸化。LB1(f)基因用以下引物从 ntHi-1128 P5 样菌毛蛋白基因扩增:

引物 LB-Baka-01(5'-含有一个 NcoI 位点)

5'-CTA-GCC-ATG-GAT-GGT-GGC-AAA-GCA-GGT-G-3'

引物 LB-Baka-05(3'-含有一个 SpeI 位点)

- 10 5'-CAC-TAG-TAC-GTG-CGT-TGT-GAC-GAC-3'

PCR 扩增的产物用 NcoI 和 SpeI 酶切。将 LB1(f) DNA 片段纯化,再连接至酶切的 pRIT 14588 上的 NcoI 和 SpeI 位点。将连接混合物转化至大肠杆菌 AR58 中,并将转化产物涂布于固体培养基(BP)LBT + 卡那霉素(50 μ g/ml)。平板于 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。转化子经 PCR 检测,将阳性转化子在液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 培养。为了启动 LPD-LB1(f)嵌合多肽的表达,将培养温度在 4 小时内从 30 $^{\circ}$ C 换成 39 $^{\circ}$ C。表达在 12.5%的丙烯酰胺凝胶上监控(用考马斯亮兰染色和/或 Western Blot 观察)。该嵌合多肽的分子量约为 44kDa。

实施例 2b) 第 2 组 LPD-LB1(f)+第 1 组 LB1(f)之融合体的产生

质粒(称为 LPD-LB1-II)示于表 4,其制备如下:

- 20 用 NcoI 酶切质粒 LPD-LB1-A,并使该线性 DNA 去磷酸化。第 2 组 LB1(f)肽的基因用如下引物从 ntHi-1715MEE 的 P5 样菌毛蛋白基因扩增:

引物 NT1715-11NCO(5'含有一个 NcoI 位点)

5'-CAT-GCC-ATG-GAT-GGC-GGT-AAA-GCA-GGT-GGT-GCT-3'

引物 NT1715-12NCO(3'含有一个 NcoI 位点)

- 25 5'-CAT-GCC-ATG-GCA-CGT-GCT-CTG-TGA-TG-3'

PCR 扩增的产物用 NcoI 酶切。将 LB1(f) DNA 片段纯化,再连接至酶切的 LPD-LB1-A 质粒之开放性 NcoI 位点上(5'于第 1 组 LB1(f)肽的基因)。将连接混合物转化至大肠杆菌 AR58 中,并将转化产物涂布于固体培养基(BP)LBT+卡那霉素(50 μ g/ml)上。平板于 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。转化子经 PCR 检测,将阳性转化子在液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 培养。为了启动 LPD-LB1(f)_{2,1}嵌合多肽的表达,将培养温度在 4 小时内从 30 $^{\circ}$ C 换成 39 $^{\circ}$ C。表达在 12.5%的丙烯酰胺

胺凝胶上监控(用考马斯亮兰染色和/或 Western Blot 观察)。该嵌合多肽的分子量约为 50kDa。

实施例 2C) 脂蛋白 D-第 2 组 LB1(f) + 第 1 组 LB1(f) + 第 3 组 LB1(f) 的融合体的产生

5 质粒(称为 LPD-LB1-III)示于表 5, 其制备如下:

质粒 LPD-LB1-II 用 SpeI 酶切, 使该线性 DNA 去磷酸化。ntHi-1929MEE 的第 3 组 LB1(f) 肽的基因通过与以下引物杂交而制备:

引物 NT1729-18 SPE(在 5' 端含有一个 SpeI 位点)

5'-CTA-GTC-GTT-CTG-ACT-ATA-AAT-TCT-ACG-ATA-ATA-AAC-
10 GCA-TCG-ATA-GTA-3'

引物 NT1729-19 SPE(在 3' 端含有一个 SpeI 位点)

5'-CTA-GTA-CTA-TCG-ATG-CGT-TTA-TCG-TAG-AAT-TTA-TAG-
GCA-GAA-CGA 3'

15 杂交的 DNA 包含第 3 组 LB1(f) 肽的基因并在其两端各有一个 SpeI 位点。将 LB1(f) DNA 片段连接至酶切的 LPD-LB1-II 质粒之开放性 SpeI 位点上(3' 于第 1 组 LB1(f) 肽的基因)。将连接混合物转化至大肠杆菌 AR58 中, 并将转化产物涂布于固体培养基(BP)LBT+卡那霉素(50 μ g/ml)上。平板于 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。转化子经 PCR 检测, 将阳性转化子在液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 培养。为了启动 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 嵌合多肽的表达, 将培养温度在 4 小时内从 30 $^{\circ}$ C 换
20 成 39 $^{\circ}$ C。表达在 12.5% 的丙烯酰胺凝胶上监控(用考马斯亮兰染色和/或 Western Blot 观察)。该嵌合多肽的分子量约为 53kDa。

实施例 2d) 对嵌合多肽表达的定性

以上嵌合多肽的表达可以在 12.5% 的丙烯酰胺凝胶上监控, 其用以下任一方法观察:

25 a) 考马斯亮兰染色的凝胶(图 6)

b) WESTERN BLOT

1) 使用兔抗 LB1 抗体(图 7)

2) 使用单克隆抗-LPD 抗体(图 8)

3) 使用抗 6-组氨酸纯化标签的抗体(图 9)

30 如上所示, 每一嵌合多肽均可在大肠杆菌中有效表达。

实施例 3: 嵌合多肽的纯化

纯化 LPD-LB1(f)_{2,1,3}(用图 5 所示的构建体表达)可通过以下方法实现:

大肠杆菌在磷酸盐缓冲液(50mM, pH7.0)中洗涤并重悬。在 3% Empigen 存在的条件下,通过 4 °C 轻微涡旋过夜使细胞裂解。溶液在 Beckman JA10 转头上以 8,000 rpm 离心 30 分钟。上清液在 50mM 磷酸盐缓冲液, 500mM NaCl, pH7.0 中稀释 4 倍。第一步纯化可在 Qiagen NTA Ni⁺⁺柱上完成, 因为该多肽的 C-末端有 6 组氨酸标签。柱子用 10mM 磷酸钠缓冲液, 500mM NaCl, 0.5% Empigen, pH7.5 平衡, 然后用在 20mM 的磷酸钠缓冲液, 0.5% Empigen, pH7.0 中的咪唑梯度(0 - 100mM)从柱中洗脱该多肽。随后对各洗脱级分进行 SDS-PAGE 电泳。

- 10 下一步纯化在 Bio-Rad Macro-Prep 50S 柱上完成。在用 20 mM 磷酸盐缓冲液, 0.5% Empoigen, pH7.0 平衡的柱上所结合的多肽用同一缓冲液中的 0 - 500mM NaCl 梯度洗脱。然后对洗脱的级分进行 SDS-PAGE 电泳。

最后一步(精加工步骤)用 Sephacryl S200 HR 分子排阻层析柱完成。首先将前一步骤的多肽溶液用 Filtron Omega 10kDa 浓缩仪浓缩。将所得溶液上样于已用含 0.5% Empigen 的 PBS 缓冲液平衡的层析柱并洗脱。多肽的洗脱完成后对洗脱级进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

收集的级分经 0.22 μ m 滤膜过滤。所得蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳并考马斯亮兰染色后为一条纯的带, 用抗 LB1 抗体进行的 Western Blot 结果相同。检测证实该蛋白质在 37 °C 7 天后仍保持完整。

- 20 通过该方法可从每升细胞培养液中纯化得到大约 200mg 多肽。

实施例 4: 所述嵌合多肽的疫苗效率的前临床实验

实施例 4a) 抗血清的产生

针对四型抗原产生抗血清: LPD; PD; LPD-LB1(f)_{2,1,3}(用质粒 LPD-LB1-III 重组制得); LB1(融合至麻症病毒的 T-细胞随机表位的第 1 组 LB1(f) 肽融合蛋白, 此肽的序列为:

- 25 RSDYKIFYEDANGTRDHKKGPSLKLLSLIKGVIVHRLEGVE

四个各含 5 只毛丝鼠的同龄组接受免疫, 每一同龄组分别用以上鉴定的免疫原之一免疫。前三种抗原的剂量是 10 μ g 抗原/200 μ l AlPO₄/20 μ g MPL (3-O-脱酰基的单磷酸脂质 A), LB1 的剂量为在完全或不完全弗氏佐剂中的 10 μ g 抗原。

- 30 每隔一个月注射三针。最后一次免疫的 15 天后, 所有动物经心脏穿刺

和胸廓造口术(thorectomy)放血以收集血清。血清按同龄组收集并贮存于-70℃。

抗PD-血清的效价为10-50K,抗LPD的为50K,抗LB1的为50-100K,抗-LPD-LB1(f)_{2,1,3}的为50-100K。除了LB1肽,抗-LB1在Western Blot上也识别LPD-LB1(f)_{2,1,3}。抗-LPD和抗-PD也识别LPD-LB1(f)_{2,1,3}。免疫金标记实验(用金偶联的蛋白A)显示,抗LB1和抗-LPD-LB1(f)_{2,1,3}多克隆抗血清均识别ntHi 86-028NP细胞的表面可接近表位,这些表位类似于由针对P5样菌毛蛋白的单克隆抗体所识别的表位。

另外,图12显示了一项Western Blot,其表明抗LPD-LB1(f)_{2,1,3}血清识别来自三个ntHi菌株、代表三个LB1(f)大组的P5样菌毛蛋白。抗LPD-LB1(f)_{2,1,3}对这些菌株的识别远强于抗LB1的识别。

实施例4b) 被动转移和攻击

该研究目的在于通过对被动免疫的毛丝鼠实施体内攻击,以确定4种免疫原(或安慰剂)制剂促进ntHi从鼻咽部清除的相对效力。

五个同龄组各含11只毛丝鼠,每只(毛丝鼠(chinchilla lanigera))均无中耳疾病,在第-7天鼻内接种 6×10^6 TCID₅₀的腺病毒1型。在第-1天,每一同龄组的毛丝鼠经心脏穿刺被动免疫1:5稀释的以上实施例4a所述的四种血清样品之一。第五个同龄组(安慰剂组)经心脏穿刺接受不含致热原的无菌生理盐水。注射剂量是大约5mL血清/kg动物。

在第0天,各同龄组经鼻内接受ntHi的攻击:每只动物约 10^8 cfu ntHi #86-028NP(第1组)。在公开(de-blinding)这一被动转移研究之前对该研究进行统计学评估。

用两种病原体进行的这种连续接种较近似地模仿了这些因子的天然获得途径以及它们在人体内的协同相互作用。

该疾病的严重性可通过耳镜观察打分。分0-4个等级。可观察鼓膜(TM)炎症的症状以获得指数:渗出物的出现、小血管的扩张、气液界面、不透明性等。

利用对变化的重复测量分析来比较超时(天数)应答模式以及这五个组(同龄组)的(左或右)耳。因对每个动物进行了大量的重复观察,而将此分析分为如下5部分:1-7天,8-14天,19-21天,22-28天,和29-33天。在第-7天到第0天,第34天和第35天应答几乎无变化,因而未对这些时间进行

所述分析。只要有可能(即平均应答中有非零变化时),就会进行检测以比较各组在这些时间点的平均应答。用 Tukey's HSD 检验进行所有 post-hoc multiple 比较。显著性用 0.05 的 α 评估。

5 结果显示于表 10。在 1-7 天期间,所有组的炎症反应均显著增加。在 29-33 天期间,所有组的炎症反应均显著减少。如该数据所示,含有抗重组 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 抗体的血清在整个实验期间有助于减少 TM 炎症。一种有效的疫苗原应能使 TM 炎症在整个研究期间维持在或低于 1.5。LPD-LB1(f)_{2,1,3} 抗血清仅有 2 天使平均炎症指数超过 1.5,随后则导致持续下降。

10 除了耳镜检查,还可利用鼓室压测量(EarScan, South Daytona, FL, USA),其测量中耳压的变化。这两种检测方法可联合使用以明示中耳内是否有渗出。鼓室压测量结果如果是得到 B 型鼓室压图,或中耳压低于 -100daPa,说明耳的异常。表 11 显示此分析的结果。很明显,如果考虑到对 TM 炎症以及渗出发生的预防作用的测量结果,重组 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 在该研究里效果很好。LPD-LB1(f)_{2,1,3} 的总体水平仅次于作为阳性对照的 LB1 肽。但 LB1 肽有 15 CFA(一种非常强的佐剂)辅助,故不能直接与 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 的结果比较。

对表 11 中数据的统计评估示于图 10 中。此评估比较了每一接受免疫之同龄组比接受安慰剂免疫之动物在疾病最严重时[共有 4 天,接种安慰剂的耳至少有 50%有渗出(患中耳炎)]渗出百分率的减少。

20 4 天内(第 11-14 天)阳性对照(抗-LB1/CFA)的显著性为 $P < 0.001$ 。抗 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 在第 11, 12, 13 和 14 天时也抑制中耳炎的发展, P 值小于或等于 0.001。抗 PD 仅在第 13 和 14 天时有显著性,而抗 LPD 仅在第 14 天时相对于安慰剂组动物能阻止中耳炎的发展(P 值接近 0.02)。

因此重组 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 多肽能显著抑制毛丝鼠体内经该血库被动转移的中耳炎的发展。

天数	组	渗出率(%)	P 值
11(安慰剂组=70%)	LB1	0	<0.0001
	PD	45	0.1010
	LPD-LB1(f) _{2,1,3}	17	0.0010
	LPD	68	0.8886
12(安慰剂组=80%)	LB1	0	<0.0001
	PD	55	0.0854
	LPD-LB1(f) _{2,1,3}	22	0.0004
	LPD	68	0.3788
13(安慰剂组=65%)	LB1	15	0.0012
	PD	18	0.0020
	LPD-LB1(f) _{2,1,3}	17	0.0002
	LPD	41	0.1188
14(安慰剂组=60%)	LB1	0	<0.0001
	PD	5	0.0002
	LPD-LB1(f) _{2,1,3}	0	<0.0001
	LPD	23	0.0146

表 10：比较第 11-14 天期间，LB1，PD，LPD-LB1(f)₂₁₃ 和 LPD 组与安慰剂组中有渗出的耳的百分率。

实施例 4c) 粘附抑制数据

- 5 用人口咽细胞进行常规的单细胞粘附实验。由免疫毛丝鼠血清对 ntHi 菌株粘附这些细胞的平均抑制百分率产生于实施例 4a。利用抗 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 和 LPD 抗血清的结果见表 11。抗 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 的抗血清能有效抑制第 1 组和第 2 组 ntHi 菌株的粘附。它也比抗-LPD 抗血清对所有菌株的抑制更有效。

同龄组名	ntHi 株 (组)	n	所收集的血清的稀释					
			1:251:501:1001:2001:4001:800					
LPD/ AIPO ₄ / MPL	86-028L (第 1 组)	3	29 ± 3	31 ± 4	13 ± 7	19 ± 8	12 ± 5	16 ± 7
	1128MEE (第 1 组)	2	0 ± 0	12 ± 12	8 ± 5	12 ± 1	8 ± 8	16 ± 1
	266NP (第 2a 组)	3	46 ± 9	38 ± 7	24 ± 13	24 ± 21	30 ± 16	28 ± 19
LPD- LB1(f)2,1,3/ AIPO ₄ / MPL	86-028L (第 1 组)	3	32 ± 2	36 ± 1	38 ± 2	27 ± 3	3 ± 2	19 ± 3
	1128MEE (第 1 组)	2	24 ± 14	23 ± 4	30 ± 7	13 ± 13	11 ± 11	12 ± 6
	266NP (第 2a 组)	3	52 ± 10	43 ± 3	36 ± 7	13 ± 10	6 ± 9	14 ± 19

表 11 :免疫毛丝鼠血清对 ntHi 菌株粘附人口咽细胞的平均抑制百分率。

实施例 4d) 用异源 ntHi 菌株进行的被动转移和攻击

进行类似于以上实施例 4b)所述的实验，用分属不同 LB1(f)组的 ntHi 菌株攻击毛丝鼠的腺病毒共感染模型。

共 132 只幼龄(约 300 克)毛丝鼠(*Chinchilla lanigera*)经耳镜检查或鼓室压测量证实无任何中耳感染迹象。将它们用于抗 LB1 和抗-LPD-LB1(f)_{2,1,3} 抗血清的 2 个攻击实验。2 个攻击实验在下文中详述，其中所用毛丝鼠的平均体重分别为 296 ± 38g 或 298 ± 42g。使动物休养 10 天，之后经心脏穿刺略放血以收集免疫前的血清，将其贮于 -70 °C 备用。动物在收集了免疫前的血清后至少休息 7 天，再接受腺病毒攻击。

这些研究中所用的 ntHi 菌株是有限传代的临床分离物[86-028NP(第 1 组), 1885MEE(第 2 组)和 1728MEE(第 3 组)]，来自哥伦比亚儿童医院中因患慢性中耳炎并伴有渗出而接受鼓膜压测试和插管的患儿。将所有分离物冻存于加了 20%甘油(v/v)的脱脂奶中，直到在巧克力琼脂上划线分离并在含有 5% CO₂ 的潮湿空气下，于 37 °C 培养 18 小时。腺病毒 1 血清型也来自哥伦比亚儿童医院的患儿。

为了进行两组被动转移研究，将 66 只幼龄毛丝鼠分成 6 个同龄组，每组 11 只。收集这些毛丝鼠的天然状态血清，用 Western blot 逐一检查开始研究前是否已有任何显著的抗体滴度。实验如实施例 4b) 一样进行。两个同龄组接受 LB1 抗血清，两个同龄组接受 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 抗血清，还有两个同龄组接受不含致热原的无菌生理盐水。观察者既不知道接受了何种血清，也不知道哪些动物组成一个同龄组。

毛丝鼠接受鼻内攻击，方式为每只鼠被动吸入约 10^8 CFU 的：ntHi 86-028NP，或 1885MEE(研究 A)；或，ntHi 86-028NP，或 1728 MEE (研究 B)。选择这三个菌株分别代表 LB1(f)肽的不同序列的异源 ntHi 组：第 1 组 ntHi 菌株 86-028NP；第 2 组 ntHi 菌株 1885MEE；第 3 组 ntHi 菌株 1728MEE。

在实施例 4b) 中，从接种腺病毒到 ntHi 攻击后 35 天，每天，或每 2 天通过耳镜检查 and 鼓室压测量而盲目地评估动物。将鼓膜炎症的症状依次分为 0 - 4+级，并用鼓室压测量图谱监控中耳压、鼓室宽度和鼓膜顺应性。当鼓室压检测得到 B 型鼓室图；顺应性 $< 0.5\text{ml}$ 或 $\geq 1.2\text{ml}$ ；中耳压低于 -100 dapa；或鼓室宽度超过 150dapa，表示有耳异常。

用 Tukey's HSD 检验比较：接受相同 NTHi 菌株攻击的各同龄组之间，自细菌攻击后的 1-35 天内的日平均鼓膜炎症指数。每一免疫动物同龄组，与用相同 NTHi 至少攻击了 7 天(最多 22 天)的安慰剂同龄组相比，平均耳镜检查指数显著偏低($p < 0.05$)。耳镜检查定级结果示于图 13(研究 A)和图 14(研究 B)。LPD-LB1(f)_{2,1,3} 平均耳镜指数显著低于安慰剂组的天数有：第 13-35 天(研究 A，86-028 NP)；第 1-8 天，第 12-21 天(研究 A，1885 MEE)；第 8-14 天，第 23 天(研究 B，86-028 NP)；第 8-14 天(研究 B，1728 MEE)。

对研究 A 和 B 中正常耳的百分比分析分别示于图 15 和图 16。

特异性抗血清经被动转移而抵抗中耳炎的发生的能力可以通过 Z 检验来评估。在两个研究中，接受抗 LB1 血清的动物在用 NTHi 86-028NP 攻击后，未显示任何产生中耳炎并伴有渗出的症状。与安慰剂组动物相比，抗 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 的转移显著阻止中耳炎发展的天数有(在安慰剂组动物超过 50%有渗出的日子里测量)：第 13-21 天(研究 A，86-028NP)；第 13-18 天(研究 A，1885 MEE)；第 13-14 天(研究 B 86-028NP)；第 9-12 天(研究 B，1728MEE)。

总之，用这三株 ntHi 分离物中的任何一株所进行的毛丝鼠攻击导致在鼻

咽部开始定居。通过耳镜检查 and 鼓室压测量所得的评估数据说明，接受抗 LPD-LB1(f)_{2,1,3} 抗血清的同龄组相比于用相同 nH_i 攻击的安慰剂组，在多日的观察中，平均耳镜指数显著降低且中耳炎的发生率显著减少。

因此，LPD-LB1(f)_{2,1,3} 可提供保护作用以抵抗因腺病毒感染而抵抗力下降的毛丝鼠由异源 NTH_i 引起的中耳炎发展。此外，LB1 也能提供保护，但这可能部分归因于强效佐剂(CFA)与其的联合使用。

虽已显示和描述了本发明的特定实施方案，但在不背离本发明所附权利要求所述的范围的前提下，还可进行各种改变和修饰。例如，具有如本文所述之基本相同氨基酸序列的肽或多肽也在本发明的范围之内。

SEQ ID NO: 1

RSDYKFYEANGTRDHKKG

[来自菌株 ntHi-10567RM(第 1 组)]

5

SEQ ID NO: 2

RSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGE

[来自菌株 ntHi-1715MEE(第 2a 组)]

SEQ ID NO: 3

10

RSDYKFYDNKRID

[来自菌株 ntHi-1729MEE(第 3 组)]

SEQ ID NO: 4

RSDYKLYNKNSSSTLKDGE

15

来自菌株 ntHi-183NP(第 2b 组)]

SEQ ID NO: 5

RSDYKFYEDANGTRDHKKG

[来自菌株 ntHi-1128(第 1 组)]

20

SEQ ID NO: 6

RSDYKFYEAPNSTRDXKKG

[来自 ntHi 的 P5 蛋白的残基 119-137(第 1 组)]

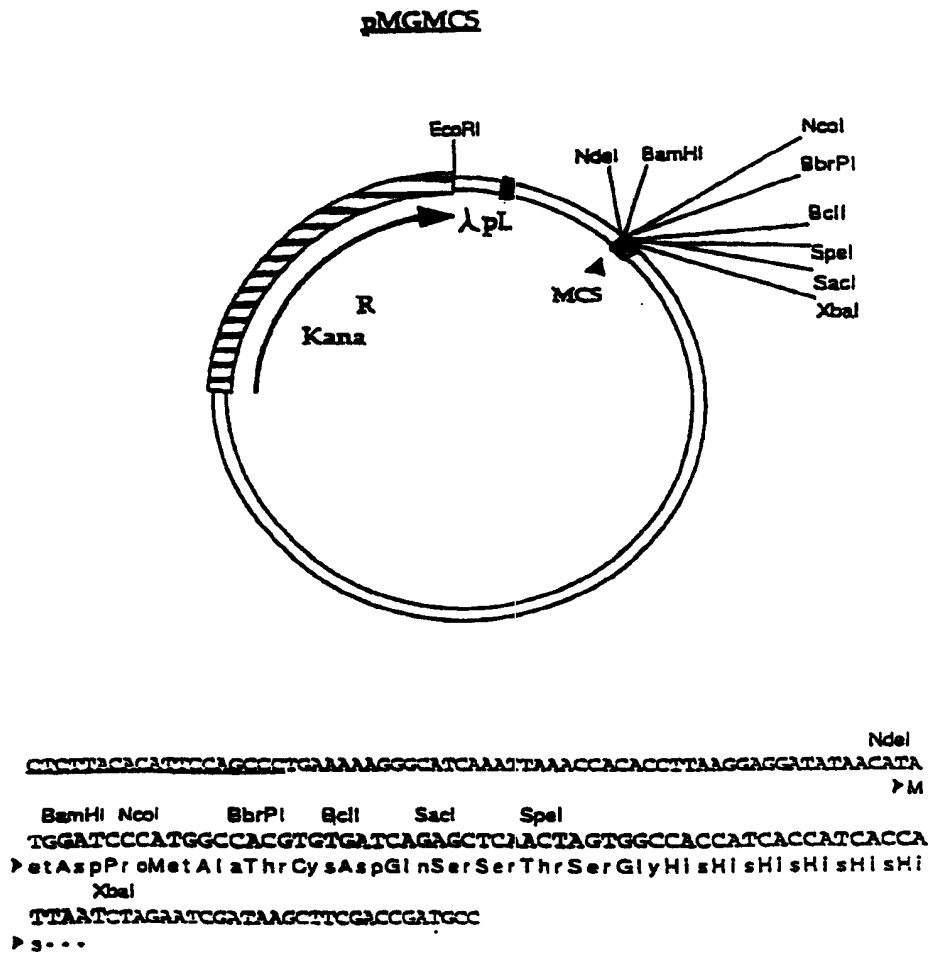
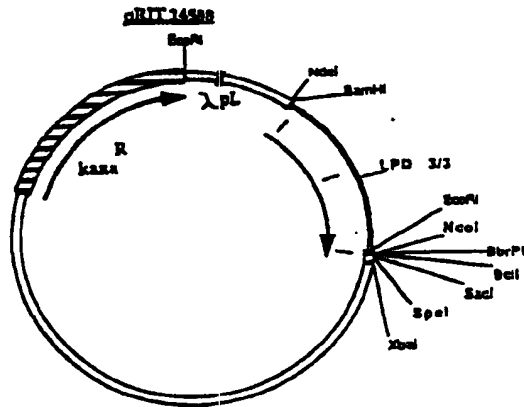


图 1



NcoI BamHI

CCCTCACATCCGACCGCCGAAAGGCGCCGAACTGAAACCCACCTGACCGGCGGACGACGCGCGG

▶ Met Asp

CCAAAGCTTGGCCCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu Ala Met Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met

CCAAAGCTTGGCCCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Ala Asn Thr Gln Met Lys Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Gln His

ACGTTGACCTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Thr Leu Gln Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp Tyr Leu Gln Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys

GATGTCCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Asp Gly Arg Leu Val Val Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro His

CCTCAGCTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr Leu Lys Gln Ile Gln Ser Leu Gln Met Thr

CAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Gln Asn Phe Gln Thr Lys Asp Gly Lys Gln Ala Gln Val Tyr Pro Asn Arg Phe Pro Leu Trp Lys Ser His

TTTCAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Phe Arg Ile His Thr Phe Gln Asp Gln Ile Gln Phe Ile Gln Gln Lys Gln Lys Ser Thr Gln Lys Lys Val

CGGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Gln Ile Tyr Pro Gln Ile Lys Ala Pro Trp Phe His Gln Gln Asn Gln Lys Asp Ile Ala Ala Gln Thr Leu

AAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

LPD 3/3

▶ Lys Val Leu Lys Lys Tyr Gln Tyr Asp Lys Lys Thr Asp Met Val Tyr Leu Gln Thr Phe Asp Phe Asn Gln

TTTCAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Leu Lys Arg Ile Lys Thr Gln Val Leu Leu Pro Gln Met Gln Met Asp Leu Lys Leu Val Gln Leu Ile Ala Tyr

ACGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Thr Asp Trp Lys Gln Thr Gln Gln Lys Asp Pro Lys Gln Tyr Trp Val Asn Tyr Asn Tyr Asp Trp Met Phe

AAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Lys Pro Gln Val Met Ala Gln Val Val Lys Tyr Ala Asp Gln Val Gln Tyr Pro Gln Tyr Trp Met Leu Val Asn

AAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Lys Gln Gln Ser Lys Pro Asp Asn Ile Val Tyr Thr Pro Leu Val Lys Gln Leu Ala Gln Tyr Asn Val Gln

GTCCAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Val His Pro Tyr Thr Val Arg Lys Asp Ala Leu Pro Gln Phe Thr Asp Val Ala Asn Gln Met Tyr Asp Ala

EcoRI

TTTCAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Leu Leu Asn Lys Ser Gln Val Thr Gln Val Phe Thr Asp Phe Pro Asp Thr Gln Val Gln Phe Leu Lys Gln

NcoI BstPI BclI SmaI SpeI

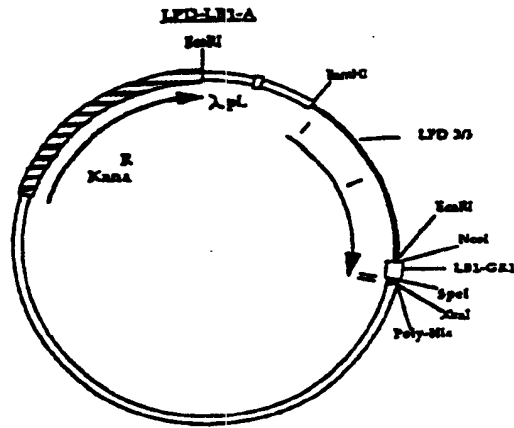
ATAAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

▶ Ile Lys Ser Met Ala Thr Cys Asp Gln Ser Ser Thr Ser Gly His His His His His His His ...

XbaI

TTTCAAGCTTCCAAAGCTTCTTCTACTGACCGCTGCTACTGACGGTTCGACCGCTTCCGAAAGCTC

图 2



```

                                     BamHI
CTCTCCACATTCGCGGCTGAAAGCCGATGAAACCAAGCTTAAAGCGGATTAACATATGATCCAA
                                     P Met Asp P re Ly
AAGTTTAGCCCTTCTCTGAGGACGCTGCGGCGACGACAGCTTGCACGCGCTCATCAATATGCGGAAAGCC
> Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn His Ala Asn Thr G
AAGTCAATCGACAAATCGCTGATGCGACCGCTGCGCAGCGGATGATGACCGAGCATAGCTGCAATCGAA
> i n e t Lys Ser Asp Lys I l e I l e Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Gly u His Thr Leu Gly u Ser Lys
CGCTTCCGCTTCCGACAGCGCGCTGCTGAGCGCAAAATTTAGCGAAGTACAGGACAAAGGATGCTGCTTAGTGGTAC
> Ala Leu Ala Phe Ala Gly Gly Ala Asp Tyr Leu Gly u His Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val I l
TCAGATCAGCTTTTAGAGCGCTGACGCGGCTGCGAAAGAACTCCCAAGCTTCATCGTAAAGATGCGCGTACT
> e His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr T
ATGTCAGCTGCTTACCTTAAAGAAATTCAGAACTTGGCAATGCGCAAAAGCTTCAGAAAGGATGCGCAACA
> y r Val I l e Asp Phe Thr Leu Lys Gly u l e Gly n Ser Leu Gly u Met Thr Gly uasn Phe Gly u Thr Lys Asp Gly Lys Gly n
GCGCAATGATGCGCAAGGATGCGTTCGCTTTCGAAAGCTTTCGAACTTCATCGCTTGAAGATGAAATGAAAT
> Ala Gly n Val Tyr Pro Asn Arg Phe Pro Leu Trp Lys Ser His Phe Arg I l e His Thr Phe Gly u Asp Gly u l e Gly n
TGTCAGAGCTTACAAAGAAATGCACTGCAAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> e l l e Gly n Gly Leu Gly u Lys Ser Thr Gly Lys Lys Val Gly l e Tyr Pro Gly u l e Lys Ala P re Trp Phe His e His G
AAAGCGGAAAGGATGCTGCTGCAAGCTGCAAGGCTTAAAGAAATGCGCTTACGACAGAAAGCGGATGCTG
                                     L P B 3 7 3
> i n e n Gly Lys Asp I l e Ala Ala Gly u Thr Leu Lys Val Leu Lys Lys Tyr Gly y Tyr Asp Lys Lys Thr Asp Met Val
TACATCAAGCTTACAGCTTAAAGAAATGCACTGCAAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> Tyr Leu Gly n Thr Phe Asp Phe Asn Gly u Leu Lys Arg I l e Lys Thr Gly u Leu Leu Pro Gly n Met Gly y Met Asp Leu Lys
ATGTCAGCTGCTTACCTTAAAGAAATGCACTGCAAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> Leu Val Gly n Leu I l e Ala Tyr Thr Asp Trp Lys Gly u Thr Gly n Gly Lys Asp Pro Lys Gly y Tyr Trp Val Asn Tyr A
ATGTCAGCTGCTTACCTTAAAGAAATGCACTGCAAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> n Tyr Asp Trp Met Phe Lys Pro Gly y Ala Met Ala Gly u Val Val Lys Tyr Ala Asp Gly Val Gly y Pro Gly y Trp Tyr
AAGCTGATGATGAAAGAAAGCAAGCAAGCTTAAAGAAATGCGCTTACGACCGCTTCTGAAAGAACTTGCAGATATA
> Met Leu Val Asn Lys Gly u Gly u Ser Lys Pro Asp Asn I l e Val Tyr Thr Pro Leu Val Lys Gly u Leu Ala Gly n Tyr As
TGTGAGCTGATCCTTACCGCTGCTGAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> n Val Gly u Val His Pro Tyr Thr Val Arg Lys Asp Ala Leu Pro Gly u Phe Phe Thr Asp Val Asn Gly n Met Tyr Asp A
CGCTGATGATGAAAGAAAGCAAGCAAGCTTAAAGAAATGCGCTTACGACCGCTTCTGAAAGAACTTGCAGATATA
> i Leu Leu Asn Lys Ser Gly y Ala Thr Gly y Val Phe Thr Asp Phe Pro Asp Thr Gly y Val Gly u Phe Leu Lys Gly l l e
AAATCGAAAGCTTAAAGAAATGCACTGCAAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> Lys Ser Met Asp Gly y Gly Lys Ala Gly y Val Ala Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Gly u Asp Ala As
CGCGCTGCTGACCAAGAAAGCTGCTGACCAAGCTTACCTACTGCGCCACCATCACCATCACCATC
> n Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Ala Arg Thr Ser Gly His His His His His His
AAATCGAAAGCTTAAAGAAATGCACTGCAAAAGCGGATTTAGCGCAAGAAAGCAAGCAAGCTTTCGCAATC
> ...

```

图 3

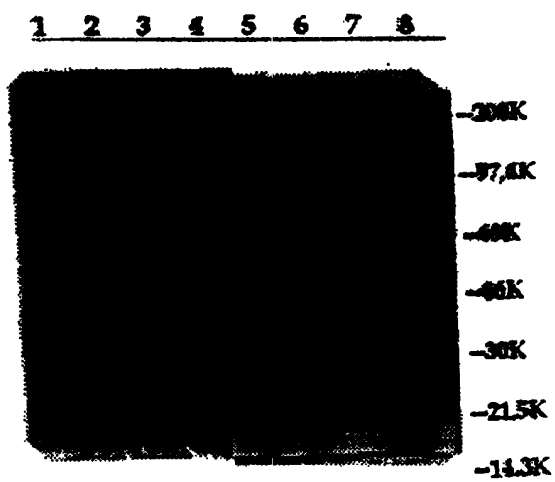


图 6

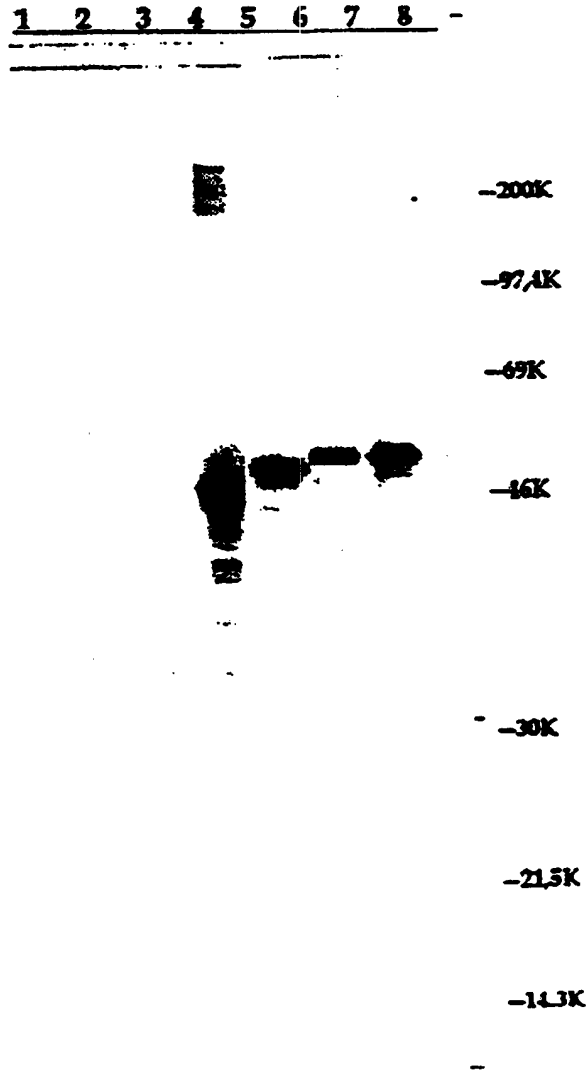


图 7

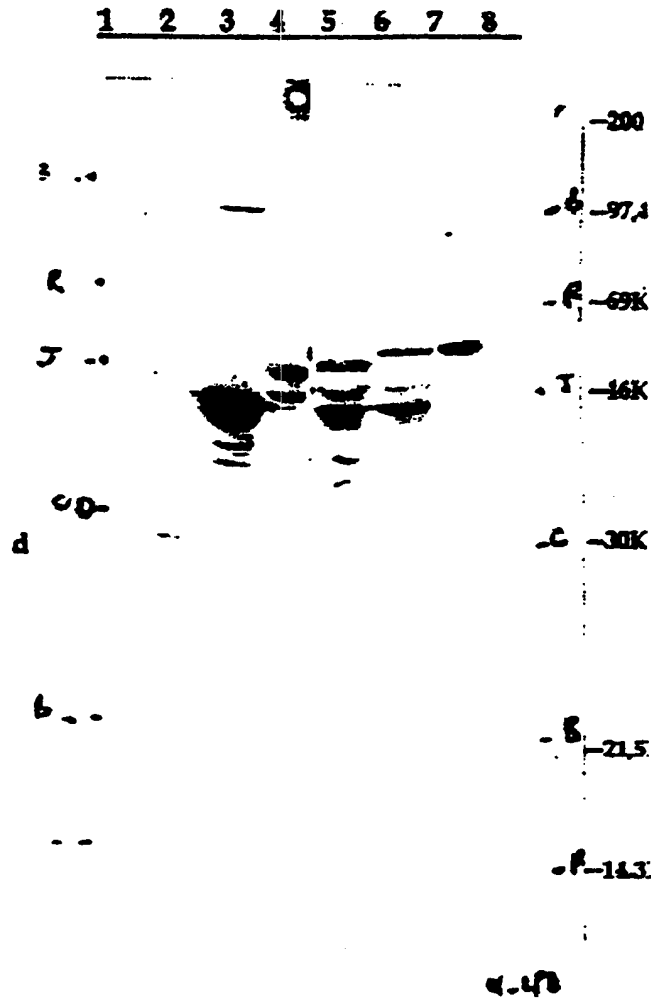


图 8

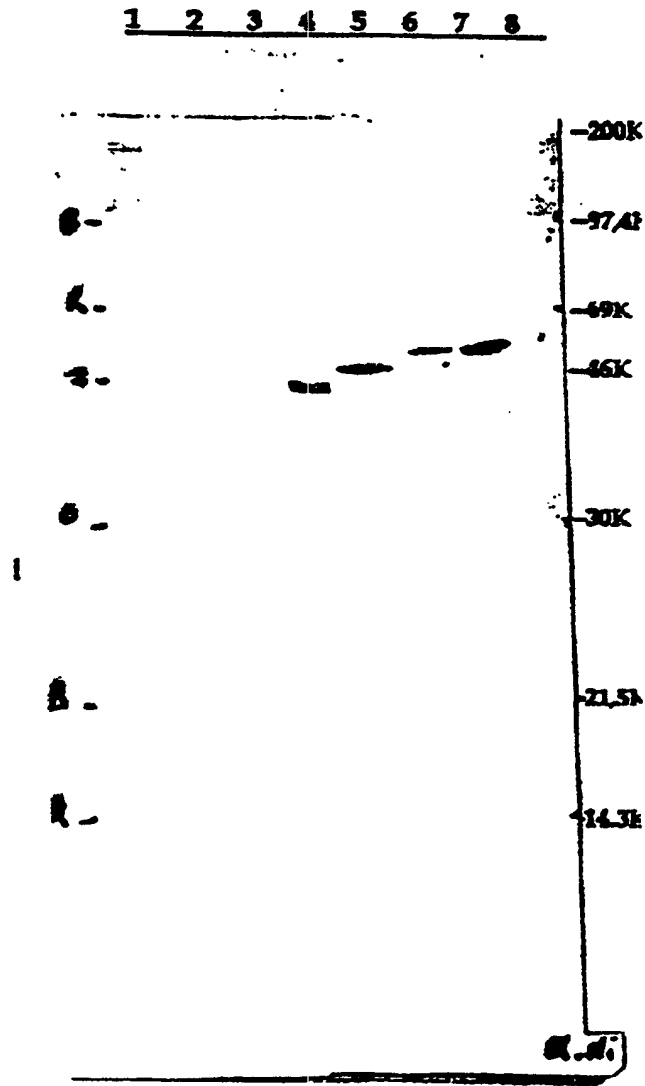


图 9

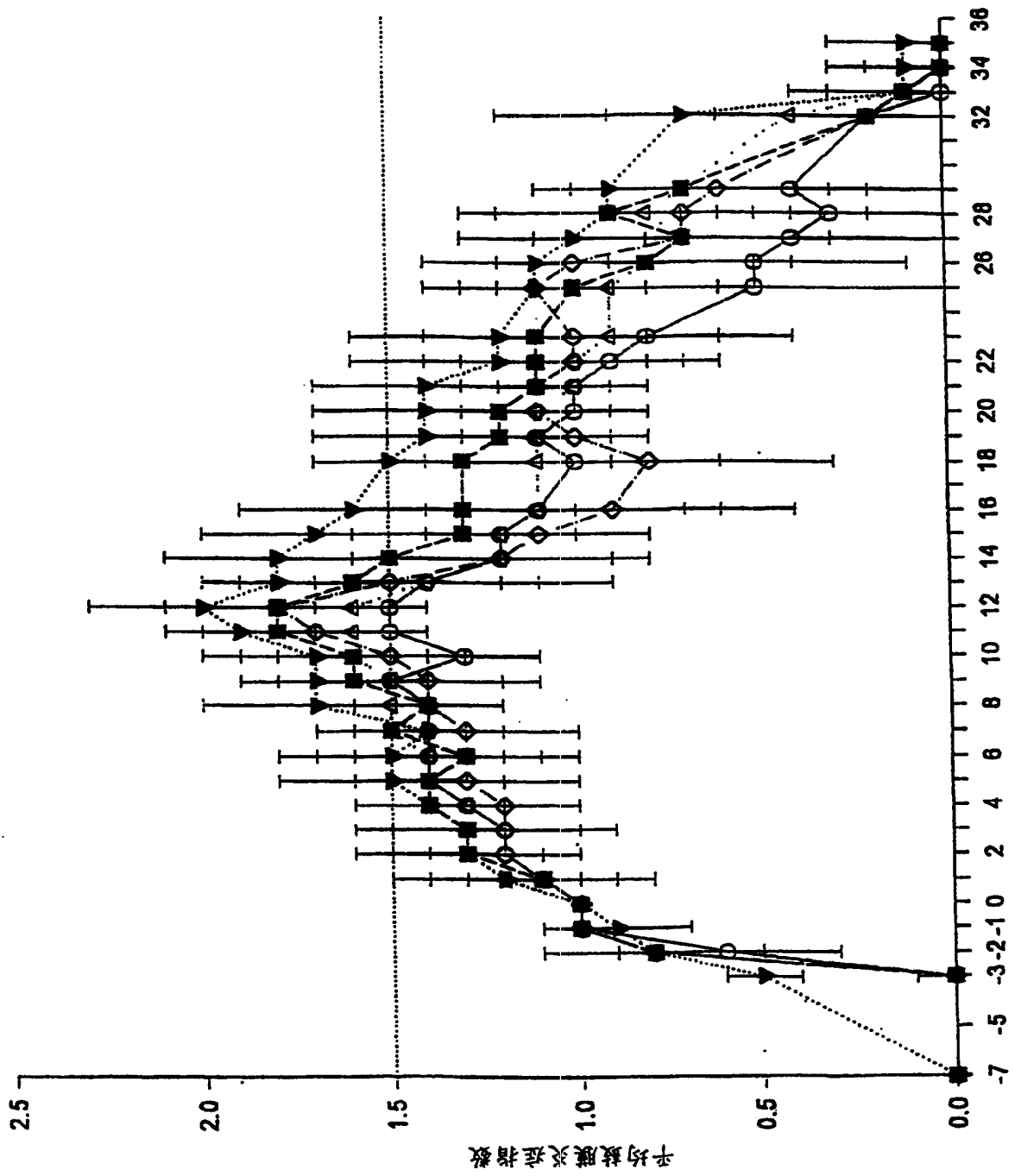


图 10

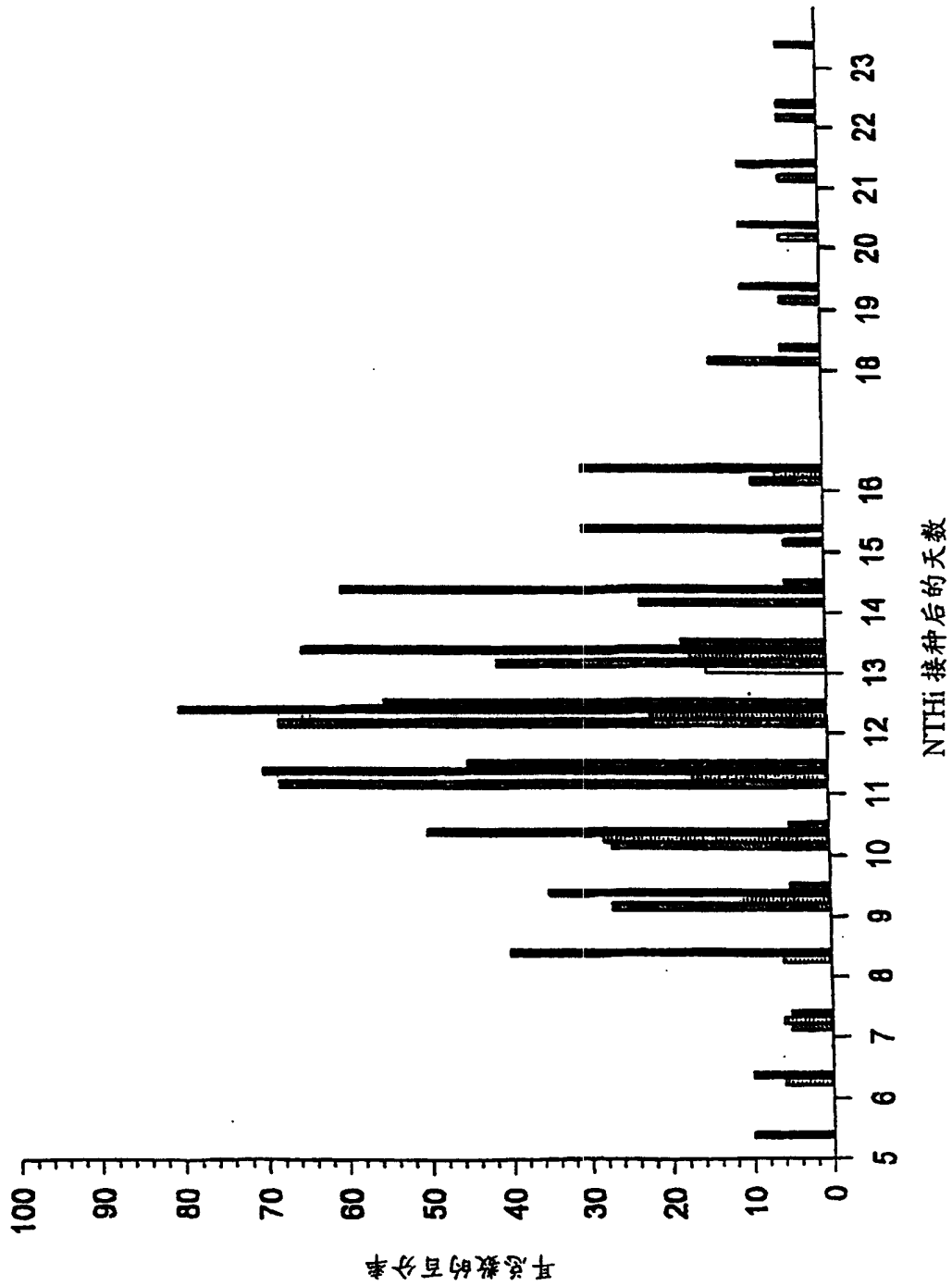


图 11

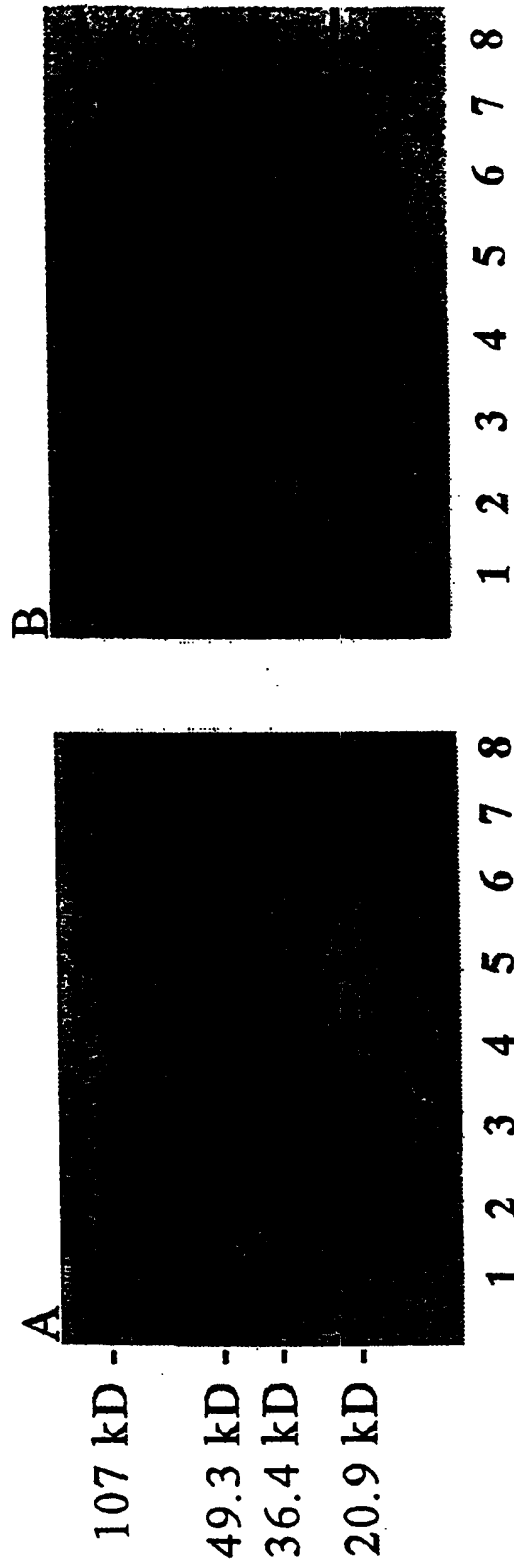
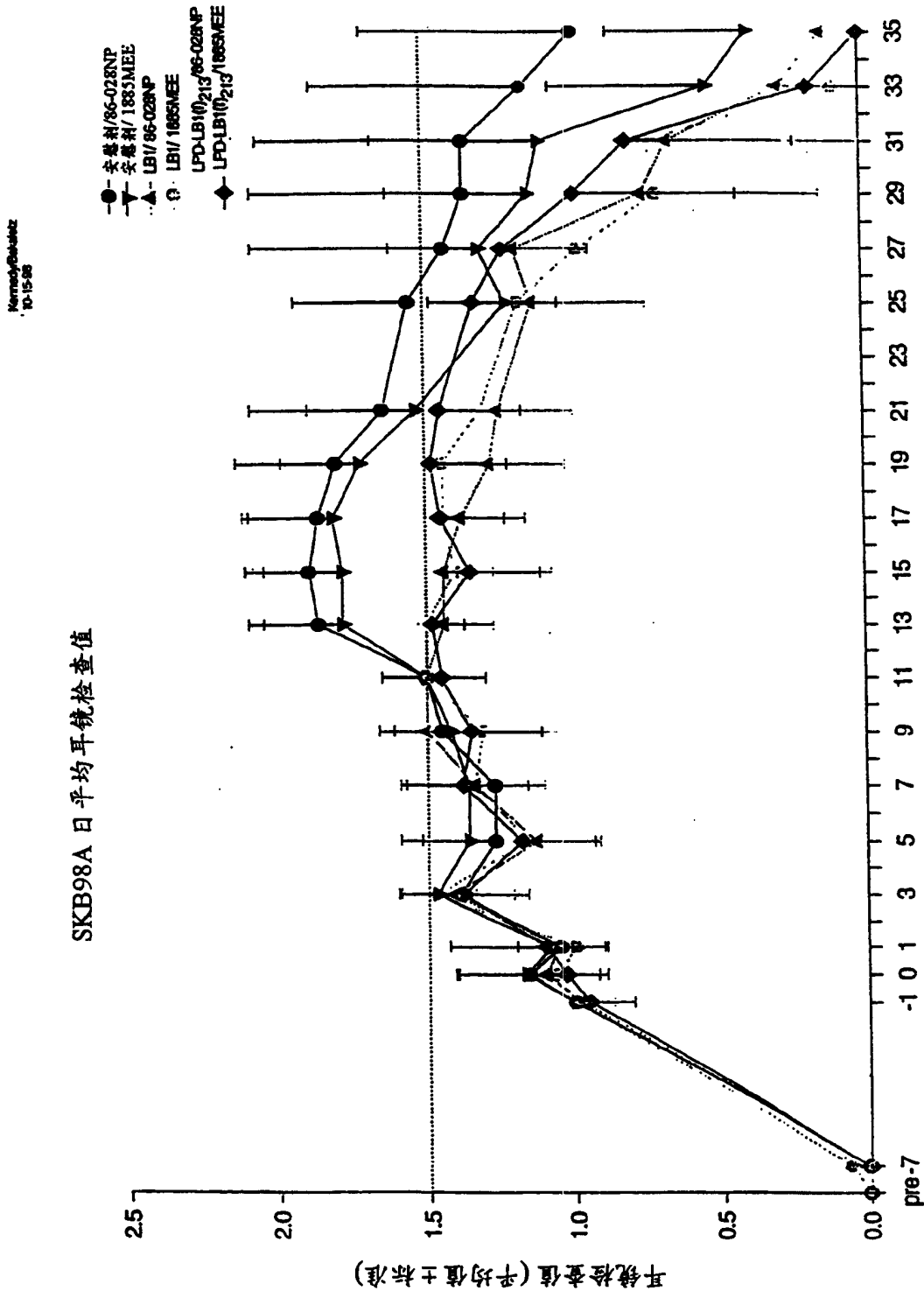


图 12



攻击后的天数

图 13

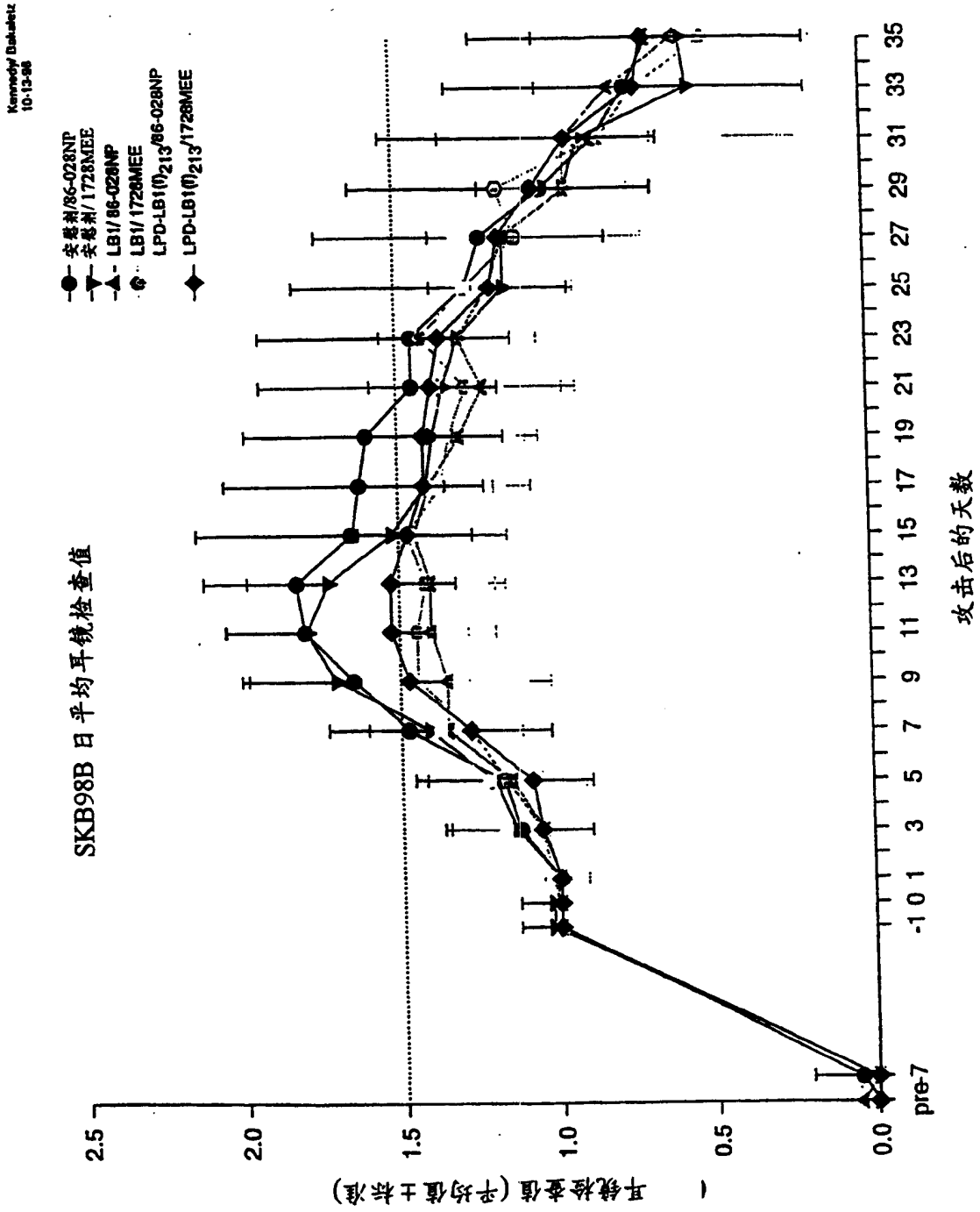


图 14

day	LPD-LB1(1)21	LB1/ 86-028	LB1/ 1885MEE	LPD-LB1(1)21 Sham	86-028 Sham	1885MEE
1	86	75	100	100	100	100
4	56	50	100	100	78	100
7	29	50	80	63	44	71
10	11	17	38	56	44	50
14	11	0	38	44	40	43
18	0	0	13	30	20	25
21	0	0	13	20	11	13
28	0	0	13	20	20	13
35	0	0	13	10	10	13

数据由 BJK 于1949年5月5日更新

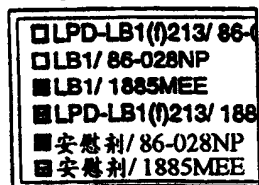
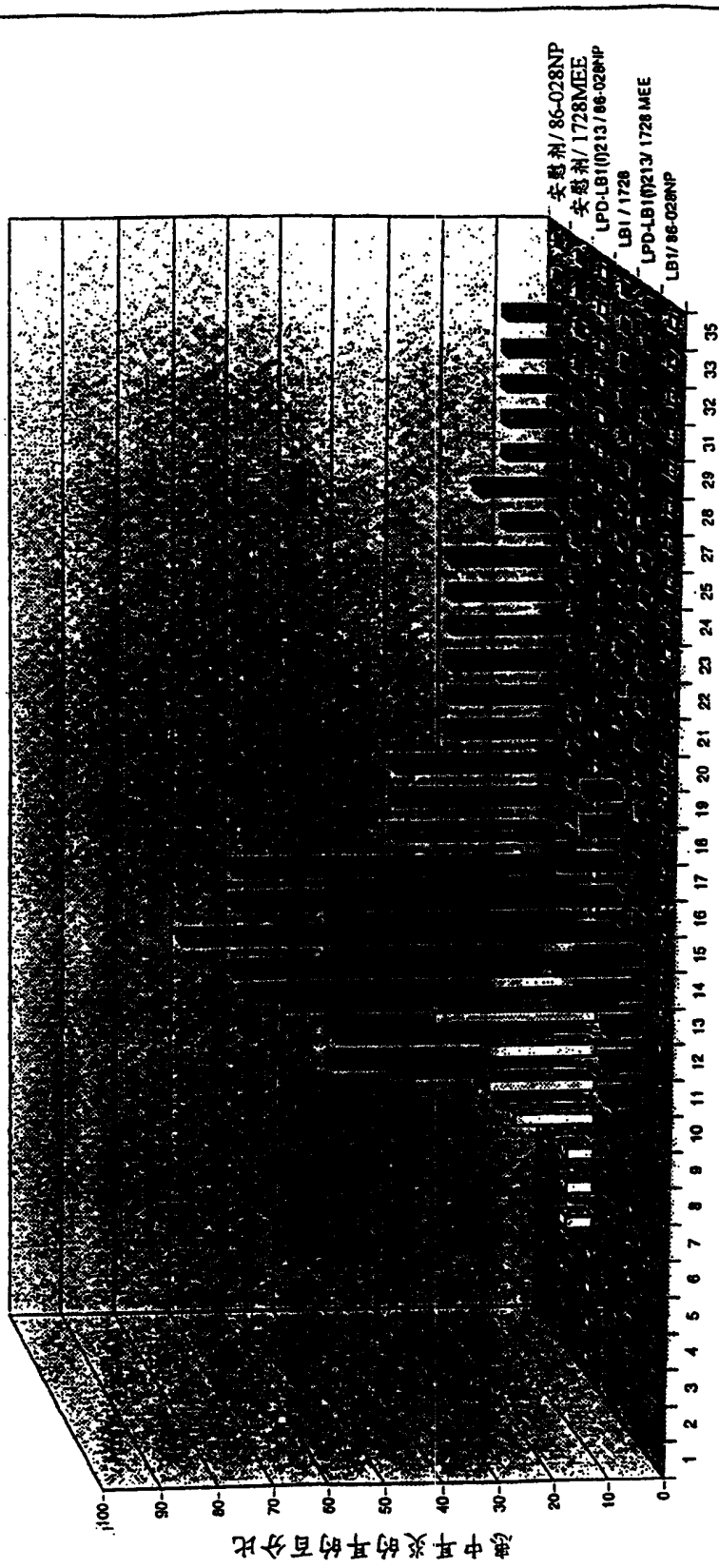


图 15

B组：各同龄组之间患中耳炎的百分率的比较



攻击后的天数

图 16