



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103068837 B

(45) 授权公告日 2015.06.24

(21) 申请号 201180025824.9

(22) 申请日 2011.05.27

(30) 优先权数据

1050535-2 2010.05.28 SE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.11.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/058755 2011.05.27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2011/147975 EN 2011.12.01

(73) 专利权人 斯匹遐生物技术公司

地址 瑞典厄勒布鲁

(72) 发明人 S·安德森 A·斯特里德

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 王维琦

(51) Int. Cl.

C07K 14/295(2006.01)

A61K 39/118(2006.01)

(56) 对比文件

US 2005/232941 A1, 2005.10.20, 全文.

MURDIN A D ET AL. Poliovirus Hybrids

Expressing Neutralization Epitopes from

Variable Domains I and IV of the Major Outer Membrane Protein of Chlamydia trachomatis Elicit Broadly Cross-Reactive C. trachomatis-Neutralizing Antibodies. 《INFECTION AND IMMUNITY》. 1995, 第63卷(第3期), 1116-1121.

ORTIZ L ET AL. T-cell epitopes in variable segments of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein elicit serovar-specific immune responses in infected humans. 《INFECTION AND IMMUNITY》. 2000, 第68卷(第3期), 1719-1723.

KLEIN M ET AL. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 2003, 第41卷(第5期), 1957-1962.

审查员 刘俊

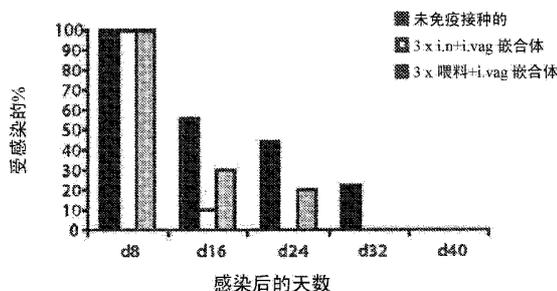
权利要求书1页 说明书13页
序列表7页 附图11页

(54) 发明名称

嵌合 MOMP 抗原、方法和使用

(57) 摘要

本发明涉及能够诱导抗沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)的保护性免疫应答的多肽。所述多肽包括具有与根据 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列至少 90% 同源性的第一氨基酸序列和具有与根据 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列至少 90% 同源性的第二氨基酸序列。此外,还提供了产生这些多肽以及包含它们的药用组合物。



CN 103068837 B

1. 一种多肽,所述多肽包括根据 SEQ ID NO:1 的第一氨基酸序列和根据 SEQ ID NO:2 的第二氨基酸序列,其中所述第一和第二氨基酸序列被少于 30 个氨基酸残基分开。
2. 根据权利要求 1 所述的多肽,其长度在 107 和 132 个氨基酸之间。
3. 根据权利要求 1 所述的多肽,其中所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列被根据 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:26 的接头分开。
4. 根据权利要求 1 所述的多肽,包括根据 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一权利要求所述的多肽,被融合到一氨基酸序列,所述氨基酸序列包括根据 SEQ ID NO:5 的 His 标签或根据 SEQ ID NO:4 的 V5 标签。
6. 根据权利要求 5 所述的多肽,具有根据 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列。
7. 一种核酸,所述核酸编码如权利要求 1-6 中任一权利要求所述的多肽。
8. 根据权利要求 7 所述的核酸,所述核酸具有根据 SEQ ID NO:7 的第一核酸序列和根据 SEQ ID NO:8 的第二核酸序列,其中所述第一和第二核酸序列被少于 90 个核酸残基分开。
9. 根据权利要求 8 所述的核酸,包括根据 SEQ ID NO:9 的核酸序列。
10. 一种质粒,所述质粒包括根据权利要求 7-9 中任一权利要求所述的核酸。
11. 根据权利要求 10 所述的质粒,用作表达载体。
12. 一种通过根据权利要求 11 所述的表达载体转化的细胞。
13. 根据权利要求 12 所述的细胞,所述细胞选自由下述构成的组:植物细胞、细菌、酵母细胞、真菌细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。
14. 一种用于产生根据权利要求 1-6 中任一权利要求所述的多肽的方法,所述方法包括培养根据权利要求 12-13 中任一权利要求所述的细胞并且恢复所述多肽。
15. 一种组合物,所述组合物包括根据权利要求 1-6 中任一权利要求所述的多肽,连同药学上可接受的赋形剂。
16. 根据权利要求 15 所述的组合物,还包括佐剂。
17. 根据权利要求 1-6 中任一权利要求所述的多肽或根据权利要求 15-16 中任一权利要求所述的组合物在制备用作抗沙眼衣原体的疫苗的药物的应用。
18. 根据权利要求 1-6 中任一权利要求所述的多肽或根据权利要求 15-16 中任一权利要求所述的组合物在制备用于防止由于沙眼衣原体感染而引起的不孕的药物中的应用。
19. 根据权利要求 17 或 18 所述的应用,其中所述药物被配制用于通过口服、肠道外、通过吸入喷雾、局部外敷、经直肠、经鼻、经口腔、舌下或经阴道进行给药。
20. 根据权利要求 19 所述的应用,其中所述给药是经鼻给药。
21. 根据权利要求 20 所述的应用,其中所述给药是通过鼻喷雾剂或滴鼻剂。

嵌合 MOMP 抗原、方法和使用

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及能够诱导抗沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)的保护性免疫应答(反应)的多肽类的领域。更具体地说,本发明涉及这些多肽类的生产并涉及包括它们的药用组合物。

背景技术

[0002] 已知形成沙眼衣原体的外膜复合物的蛋白质之一的主要外膜蛋白(MOMP)能够诱导两种 T- 细胞应答并且中和哺乳动物(如人类)的抗衣原体感染的抗体。MOMP 蛋白质的示意性概观在图 1 中示出,改编自 Findlay HE, McClafferty H&Ashley RH(2005),重组沙眼衣原体主要外膜蛋白的表面表达、单通道分析和膜拓扑学(Surface expression, single-channel analysis and membranetopology of recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein)。BMCMicrobiology 5, 5 是一篇阐明 MOMP 蛋白质的拓扑学的论文。在图 1 中, A 表示细胞膜而 B 表示细胞膜的外表面。

[0003] 将总 MOMP 蛋白质用作抗沙眼衣原体的疫苗已在 WO 2008/040757A1 中披露。

[0004] 不过,动物实验已表明抗 - 衣原体的 MOMP 亚单位疫苗的成功非常有限。此外,整体 MOMP 蛋白质的生产是繁琐的和昂贵的,更不用说还受限于某些特定的生产方法。

[0005] 为了克服上述的缺陷,已有人提出使用合成肽类,所述合成肽类结合了来自沙眼衣原体的特异性表位,这些表位触发免疫应答。

[0006] 不过,所述分离的表位在合成的背景下可能不具备功能性,并因而不能提供希望的效果。

[0007] 因此,用于产生抗沙眼衣原体的保护性免疫应答的改进的多肽会是有优势的,并且尤其是允许有增大的灵活性、成本效率、简化的生产和纯化同时具有保留或改进的免疫效应的多肽会是有优势的。

发明内容

[0008] 因此,本发明优选寻求减轻、缓和或消除本领域的一个或多个上述缺陷以及单独或以任何组合形式的缺点的解决方案并且通过提供根据所附权利要求所述的多肽解决至少上面提到的问题。

[0009] 本发明的一般解决方案是提供一种多肽,所述多肽易于生产和纯化,但具有保留的用于产生抗沙眼衣原体的免疫应答的能力。

[0010] 因此,根据第一方面,提供了一种多肽。所述多肽包括第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列具有与根据 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列至少 90% (如至少 95%) 的同源性(%一致性),如用标准设置通过 BLAST 算法进行测量;和第二氨基酸序列,所述第二氨基酸序列具有与根据 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列至少 90% (如至少 95%) 的同源性,如用标准设置通过 BLAST 算法进行测量;其中所述第一和第二氨基酸序列被少于 30 个氨基酸残基分开。所述第一和第二氨基酸序列分别包括用于产生抗沙眼衣原体的保护性的抗原 - 特异性免疫

应答的表位,以及沙眼衣原体的主要外膜蛋白(MOMP)的跨膜部分的一部分。所述第一和第二氨基酸序列合起来包括大约 25 个表位,这些表位可能刺激 T 细胞应答(CD4+ 和 CD8+)以及 B 细胞应答。这样的优点是与整个(完整的)MOMP 蛋白质相比,该多肽易于以纯化的形式生产,同时仍诱导可接受的免疫应答。多肽(每个包括 MOMP 的跨膜部分的一部分)的优点是表位的三维结构被保存(是保守的),因为两个跨膜部分可能互相作用以形成疏水结构,如图 14 中所示。包括 MOMP 的跨膜部分的一部分的多肽的另一个优点是在生产过程中,表位被保留在构造中。这样的另一个优点是嵌合体的两个部分之间的疏水相互作用提供了可能,继而提供可模拟整个 MOMP 蛋白质的抗原特征的三维域。因此,通过去除根据第一方面的多肽中的大部分的 MOMP 蛋白质的膜部分,获得了比野生型 MOMP 更易于处理的多肽;并且通过同时保留特别选定的、在序列端部的膜螺旋(体)的最小部分,获得了与较短的人工序列相比更稳定并且可能更有效的多肽。

[0011] 一并考虑,所述多肽提供了基于 MOMP 蛋白质的替代的合成肽,所述合成肽是抗原性的并且适用作疫苗。

[0012] 具体地说,与只有两个链接(结合)表位的人工的较短的序列相比,所述多肽能够实现保留或改进的抗原性,同时与野生型 MOMP 相比易于生产和纯化。

[0013] 在一个实施例中,所述多肽的长度在 107 和 132 个氨基酸之间,如在 107 和 112 个氨基酸之间的长度。这样的优点是所述多肽更易于表达。

[0014] 在一个实施例中,所述第一氨基酸序列和第二氨基酸序列被根据 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:26 的接头分开。

[0015] 这是有优势的,因为根据 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:26 的接头是挠性的,这意味着它为嵌合体的两个部分之间随机的相互作用提供了可能,增大了三维结构形成的机率,所述三维结构在不将蛋白质锁定在不利构象的前提下会被免疫系统认可。

[0016] 挠性的接头的另一个优点是它为多肽的两个部分同时与免疫系统的不同部分发生相互作用提供了机会,因为它们可以彼此相对运动(移动),如图 15 所示。

[0017] 在一个实施例中,用于产生抗沙眼衣原体的保护性的抗原特异性免疫应答的表位在若干沙眼衣原体的血清(变)型中被保存。

[0018] 这是有优势的,因为它能够使(对)抗一种以上的沙眼衣原体的血清(变)型的保护性应答成为可能。

[0019] 在一个实施例中,所述第一和第二氨基酸序列分别是根据 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的序列(沙眼衣原体, E 血清型)。在另一个实施例中,所述第一和第二氨基酸序列分别是根据 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24 的序列(沙眼衣原体, D 血清型)。所述第一和第二氨基酸序列还可以由不同的血清型进行组合。

[0020] 这是有优势的,因为它能够使抗一种以上沙眼衣原体的血清型的保护性应答成为可能。

[0021] 在一个实施例中,如用标准设置通过 BLAST 算法所测量的,多肽具有与根据 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列至少 90% (如至少 95%) 的同源性。在一个实施例中,多肽包括根据 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列并且在另一个实施例中,多肽具有根据 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。

[0022] 在一个实施例中,多肽被融合到一氨基酸序列,所述氨基酸序列包括根据 SEQ ID NO:5 的 His- 标签(多聚组氨酸标签)和/或根据 SEQ ID NO:4 的 V5 标签。

- [0023] 这样的优点是所述多肽更易于纯化。
- [0024] 在一个实施例中,所述多肽具有根据 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列,即由根据 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列构成。
- [0025] 根据第二方面,提供了包括根据第一方面的氨基酸序列的化合物。
- [0026] 根据第三方面,提供了一种核酸,所述核酸编码根据第一方面的多肽。
- [0027] 在一个实施例中,核酸具有第一核酸序列,如用标准设置通过 BLAST 算法所测量的,所述第一核酸序列具有与根据 SEQ ID NO :7 的核酸序列至少 60% 或至少 70%,如至少 80%,或优选至少 90% 的同源性;以及第二核酸序列,如用标准设置通过 BLAST 算法所测量的,所述第二核酸序列具有与根据 SEQ ID NO :8 的核酸序列至少 60% 或至少 70%,如至少 80%,或优选至少 90% 的同源性,其中所述第一和第二核酸序列被少于 90 个核酸残基分开。
- [0028] 在一个实施例中,所述核酸包括根据 SEQ ID NO :9 的核酸序列。
- [0029] 根据第四方面,提供了一种质粒,所述质粒包括根据第三方面的核酸。
- [0030] 在一个实施例中,所述质粒被用作表达载体。
- [0031] 根据第五方面,提供了一种通过根据第四方面的表达载体转化的细胞。
- [0032] 在一个实施例中,所述细胞选自由下述各项构成的组:植物细胞、细菌、酵母细胞、真菌细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。
- [0033] 根据第六方面,提供了一种用于产生根据第一方面的多肽的方法,所述方法包括培养根据第五方面的细胞并且恢复(回收)所述多肽。
- [0034] 根据第七方面,提供了一种组合物,所述组合物包括根据第一方面的多肽连同药学上可接受的赋形剂。
- [0035] 在一个实施例中,所述组合物还包括佐剂,如霍乱毒素(CT)佐剂。
- [0036] 根据第八方面,提供了用作药剂的根据第一方面的多肽、根据第二方面的化合物、或根据第七方面的组合物。
- [0037] 根据第九方面,提供了用作抗沙眼衣原体的疫苗的根据第一方面的多肽、根据第二方面的化合物、或根据第七方面的组合物。
- [0038] 根据第十方面,提供了用于防止由于沙眼衣原体感染引起的不孕的根据第一方面的多肽、根据第二方面的化合物、或根据第七方面的组合物。
- [0039] 根据第十一方面,提供了使用,其中根据第一方面的所述多肽、根据第二方面的所述化合物、或根据第七方面的所述组合物通过口服、肠道外给药、通过吸入喷雾给药、局部外敷、直肠给药、鼻给药、口腔(向颊)给药、舌下给药或阴道给药。
- [0040] 在一个实施例中,所述给药是(经)鼻给药。(经)鼻给药可以通过鼻喷雾剂或滴鼻剂实现。
- [0041] 与现有技术相比,本发明具有的优点是它更易于生产,具有保持的或改进的免疫效应,这继而允许更灵活的给药途径。
- [0042] 本发明还具有的优点是它更易于以可溶的形式纯化并且在溶液中具有增大的稳定性。

附图说明

- [0043] 由本发明下文的实施例的描述显而易见并可阐明本发明所能够实现的这些和其

它方面、特征和优点,参见附图,其中

- [0044] 图 1 是 WT MOMP 蛋白质的示意性图解;
- [0045] 图 2 是根据一个实施例的基因构造的 PCR 分析结果的图像;
- [0046] 图 3 是根据一个实施例的多肽的蛋白质印迹分析 (Western blot analysis) 结果的图像;
- [0047] 图 4 是根据一个实施例的纯化的 MOMP 蛋白质的考马斯蓝染色 (Coomassie blue staining) 的图像;
- [0048] 图 5 是根据另一实施例的多肽的蛋白质印迹分析结果的图像;
- [0049] 图 6 是根据一个实施例的转化的基因组 DNA 的 Southern 印迹分析结果的图像;
- [0050] 图 7 是根据另一个实施例的多肽的半定量结果的图像;
- [0051] 图 8 和 9 是示出根据某些实施例的免疫接种实验结果的图解;
- [0052] 图 10 是示出根据一个实施例的在小鼠上免疫接种的保护效应的图表;
- [0053] 图 11 是示出根据一个实施例的免疫接种实验结果的图解;
- [0054] 图 12 是示出根据一个实施例的在小鼠上免疫接种的保护效应的图表;
- [0055] 图 13 是示出根据一个实施例的在小鼠上免疫接种的禁止效应的图表;
- [0056] 图 14 是根据一个实施例的跨膜部分相互作用以形成疏水结构的示意性概观;和
- [0057] 图 15 是根据一个实施例的多肽的两个部分的示意性概观,它们彼此相对移动(运动)。

具体实施方式

[0058] 为了本领域的普通技术人员能够实施本发明,将在下文结合附图更详细地描述本发明的几个实施例。不过,本发明可能以许多不同的形式来体现并且不应当被解释为受限于在此所列举的实施例。相反,这些实施例提供的目的是为了本文公开内容能详尽和完整,并且将本发明的范围完全地传达给本领域的普通技术人员。实施例不是对本发明的限制,而是本发明仅限于所附的权利要求书。此外,在附图中示出的具体实施例的详细说明所用的术语不旨在对本发明进行限制。

[0059] 下文的说明书着重于本发明的一个实施例,所述实施例可应用于一种用于产生抗沙眼衣原体的保护性的免疫应答的多肽,并且特别地可适用于一种嵌合多肽,所述嵌合多肽基于沙眼衣原体 E 血清型多肽 MOMP,用于产生抗沙眼衣原体的保护性的免疫应答。不过,应当理解的是本发明并不局限于本申请的公开内容,而是可被应用到许多其他的血清型,包括例如血清型 A-K、Ba、Da、Ia、Ja、L1-L3、和 L2a。

[0060] 本发明的发明人业已发现一种嵌合多肽,所述嵌合多肽基于 MOMP 蛋白质,起到抗沙眼衣原体的免疫的抗原的作用,并且还易于纯化,这是由于与 WTMOMP 蛋白质相比它的尺寸相对小并且疏水性降低。

[0061] 如将在下文中更详细示出的,多肽可能在多种宿主中表达,如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和胡萝卜 (*Daucus carota*)。不过,任何一种宿主(如细菌酵母、真菌、植物、昆虫或哺乳动物细胞)都可用于表达。包括两个 WT MOMP 蛋白质环的多肽或 MOMP 嵌合体比 WT 蛋白质更溶于水并且在抗原性方面是优化的,因为它包括 T 和 B 淋巴细胞 - 刺激表位,这对于免疫效应是重要的。此外,它更易于纯化并更

稳定。

[0062] 多肽可通过对于本领域技术人员来说已知的任何方式给药给受用对象。例如, 给药给人或动物可以是局部的或全身的并且通过口服、肠道外给药、通过吸入喷雾、局部外敷、直肠给药、经鼻给药、口腔(向颊)给药、舌下给药、阴道给药或经植入式储药器实现。术语“肠道外(给药)”用在本文中包括皮下、静脉注射、动脉内、肌肉、皮肤内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内、颅内和骨内的注射和输注技术。

[0063] 在一个实施例中, 还提供了药用组合物, 所述组合物包括有效量的根据某些实施例的至少一种多肽和药学上可接受的载体。组合物可被配制成固态、液态、凝胶或悬浮液形式, 用于: 口服给药, 例如, 片剂(例如, 针对口腔、舌下或全身的吸收)、大丸剂、粉剂、颗粒剂、施用于舌的糊剂或凝胶剂、硬胶囊剂、软胶囊、口腔喷剂、乳剂和微乳剂; 通过皮下、肌肉、静脉或硬膜外注射的肠道外给药, 例如, 无菌溶液或悬浮液; 局部外敷给药, 例如, 施加于皮肤的乳霜、药膏、贴剂或喷剂; 阴道内或直肠内给药, 例如, 阴道栓、霜或泡沫剂; 舌下给药; 眼部给药; 经皮肤给药; 或经鼻给药, 如鼻喷雾剂或滴鼻剂。

[0064] 在一个实施例中, 多肽可以口服地给药给受用对象, 如小鼠或人。在另一个实施例中, 多肽可以经鼻给药给受用对象, 如小鼠或人。经鼻给药可以通过喷雾剂或通过滴剂进行。在另一个实施例中, 多肽可以肠道外给药给受用对象, 如小鼠或人。

[0065] 本发明的发明人发现具有根据一个实施例的表位的构造, 对于 CD4⁺T 淋巴细胞、细胞毒 T 淋巴细胞(CTL) 以及中和抗体是重要的, 它们对于形成抗沙眼衣原体的保护性免疫应答是必要的。这种新的蛋白质在小鼠上诱导免疫原性应答以及保护性效应。

[0066] 分开表位(如分开 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2)的氨基酸残基的类型和数量可以选择, 如本领域所知的, 以使多肽易于被纯化, 相应的核酸序列以希望的细胞类型方便表达和/或多肽可以按希望的剂型给药。优选的, 进行这种选择使得多肽的产生抗沙眼衣原体的免疫应答的能力保持在高位, 或至少在可接受的水平。

[0067] 所设计的构造被成功地转到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 基因组中, 并且超过至少六代证实了转基因的稳定整合, 这通过免疫印迹分析得到证明。这是有优势的, 因为后代中转基因的稳定性的对于未来扩大转基因植物生产的可能性是重要的。由于拟南芥(*A. thaliana*) 被小鼠生吃, 在临床前试验中, 它可用作模型系统。

[0068] 将可食用转基因植物用作接种疫苗的其它优点包括运输简单、成本效率和用于当地生产的可能性。此外, 通过这种方式生产的疫苗是安全的和非传染性的并且为高频率的增殖提供了可能性。在口服(接种)疫苗期间给药方案的改进和佐剂的使用可增大可食用疫苗的功效。

[0069] 基于植物的可食用疫苗对于所述免疫接种是良好的候选者。它们安全、便宜并且可以在当地种植。此外, 通过杂交植物产生不同的产物, 转基因植物能够产生若干种不同的抗原。已知的是, 转基因植物可以刺激全身和粘膜的双向免疫应答。

[0070] 此外, 所设计的构造被成功地转到大肠杆菌(*Escherichia coli*) 中。这是有优势的, 因为大肠杆菌(*E. coli*) 对于蛋白质生产是公知的和常用的宿主。

[0071] 在一个实施例中, 多肽被链接至表达标签, 如 V5 和/或 His(多聚组氨酸) 标签。这是有优势的, 因为它简化了多肽的生产和纯化。

[0072] 实施例的详细说明

[0073] 以下是实施例的详细说明。提供的实施例仅用于示例目的,以便本领域的普通技术人员能够实施和使用本发明。不过,实施例不应被理解为以任何方式对本发明加以限制。

[0074] 嵌合 MOMP 构造

[0075] 根据制造商的方案,使用 QIAamp® DNA Mini Kit (迷你试剂盒)(Qiagen, Hilden, Germany), 从源自被沙眼衣原体 E 血清型感染的病人的细菌悬浮液(Orebro University Hospital, Sweden)中分离出总基因组 DNA。利用根据 SEQ ID NOs :10 至 13 的引物(分别是 VS2 正向 1、VS2 反向 1、VS4 正向 1 和 VS4 反向 1), 从制备好的基因组 DNA 起, 对包含多个选定的 B 和 T 细胞表位的沙眼衣原体 MOMP 的两个 DNA 片段(如图 1 中的相似部分 VS2 和 VS4 所示)进行初始扩增。PCR 反应利用了 Ex Taq DNA 聚合酶(Takara Bio Inc, Shiga, Japan) 并且由 98° C (10 秒)、55° C (30 秒)和 72° C (1 分钟)35 个循环组成, 随后在 72° C 下延伸 (15 分钟)。PCR 产物通过 QIAquick PCR Purification Kit (纯化试剂盒)(Qiagen, Hilden, Germany)进行纯化, 并且在与第一次 PCR 相同的条件下通过用于 VS2 延伸的片段的根据 SEQ ID NOs :14 至 15 的引物(分别是 VS2 正向 2&3 和 VS2 反向 2)以及用于 VS4 延伸的片段的根据 SEQ ID NOs :16 至 17 的引物(分别是 VS4 正向 2 和 VS4 反向 2&3) 进行第二次 PCR。用于扩增 VS2 和 VS4 片段的 PCR 引物外加接头序列 [(Gly₄Ser)₃] (根据 SEQ ID NO : 20)或接头序列 [(Gly₄Ser)₂Gly₄] (根据 SEQ ID NO :26)是基于接头和选定的 MOMP 片段的核苷酸序列设计的。纯化的片段被提供为 SEQ ID NOs :1 和 2, 并且与根据图 1 的 VS2 和 VS4 片段相似。纯化的片段通过对于本领域技术人员已知的重叠延伸利用下述条件进行拼接: 95° C (1 分钟)、55° C (1 分钟)、72° C (2 分钟) 循环 10 次, 接着在 72° C 下延伸 15 分钟。拼接的产物被用于第三次 PCR, 其中使用 Pfx Taq- 聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 94° C (15 秒)、55° C (30 秒)、72° C (2 分钟) 循环 25 次, 接着是在 72° C 下单个延伸步骤(30 分钟)。扩增通过引物 SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :17 进行。如上文所述对所获得的根据 SEQ ID NO :9 的 PCR 产物进行纯化。

[0076] 纯化的片段 SEQ ID NOs :1 和 2 包括用于产生抗沙眼衣原体的保护性的抗原特异性免疫应答的表位, 以及沙眼衣原体的主要外膜蛋白(MOMP)的跨膜部分的部分。SEQ ID NO :1 的跨膜部分由氨基酸编号 22 至 27 来表示, 并且 SEQ ID NO :2 的跨膜部分分别由氨基酸编号 3 至 9 和 17 至 23 来表示。只使用 MOMP 的片段的一个优点是与整个 MOMP 蛋白质相比, 多肽更易于以纯化的形式生产。多肽包括 MOMP 的跨膜部分的一个优点是表位的三维结构被保存(是保守的)。多肽包括 MOMP 的跨膜部分的部分的另一个优点是在生产过程中表位被保留在构造中。这种结构的另一个优点是它为嵌合体的两个部分之间的疏水性相互作用提供了可能, 继而提供可以模拟整个 MOMP 蛋白质的抗原特征的三维域。

[0077] 相信跨膜部分是螺旋构象。

[0078] 在一个实施例中, 每个片段, 如 SEQ ID NOs :1 和 2, 包括两个螺旋。

[0079] 这是有利的, 因为它进一步增强了上述优点。

[0080] 一并考虑, 多肽使保留或改进的抗原性成为可能, 同时易于生产和纯化。

[0081] 在一个实施例中, 用于产生抗沙眼衣原体的保护性的抗原特异性免疫应答的表位在若干沙眼衣原体的血清型中被保存(是保守的)。

[0082] 这是有利的, 因为它使抗一种以上的沙眼衣原体的血清型的保护性应答成为可能。

[0083] 大肠杆菌 (E. coli) 中 MOMP 嵌合体的克隆和表达

[0084] 根据制造商的方案,利用 Champion pET Directional **TOPO**[®] ExpressionKit(表达试剂盒)(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)将纯化的 MOMP 嵌合体克隆到 pET 101/D- **TOPO**[®]载体。通过测序(ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA)确认我们的构造与 C-端 V5 和 6xHis 融合标签在框架中。嵌合蛋白质在 BL21 StarTM(DE3) 大肠杆菌 (E. coli) 菌株中表达。用 10ml 的源自大肠杆菌单菌落的新鲜的过夜培养物接种体积为 1000ml 的包含 50 μ g/ml 羧苄西林和 2.5mM 甜菜碱的 LB 培养基 (Sigma, Steinheim, Germany) 并且在 600nm 下 0.72 的光密度 (OD) 在 37 $^{\circ}$ C 下生长。加入异丙基 β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG, Invitrogen, Groningen, The Netherlands) 到最终浓度为 0.15mM, 并且将培养物再孵育 4 小时。细菌通过离心作用 (5000 x g, 15 分钟) 被收集并且根据针对它们的 Ni-NTA 树脂的 Sigma-Aldrich 的方案进行蛋白质纯化。

[0085] MOMP 嵌合体的纯化

[0086] 将细菌沉淀物 (粒料) 重悬在裂解液中 (50mM 磷酸钾, pH 7.8, 400mM NaCl, 100mM KCl, 10% 甘油, 0.5% Triton X-100, 10mM L- 组胺酸, 1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF)), 在液氮中冷冻并随后在 42 $^{\circ}$ C 下解冻。重复冷冻和解冻三次, 接着在冰上超声处理 (35W, 6 x 30 秒) 以便裂解。超速离心后 (45000 x g, 45 分钟) 获得两个部分 - 可溶部分和不可溶部分。根据制造商的方案, 在天然条件下利用 HIS-Select 镍亲和凝胶 (HIS-Select Nickel Affinity Gel) (Sigma, Saint Louis, Missouri) 纯化可溶部分。沉淀物 (粒料) 被重悬在 0.1M 磷酸钠 (pH 为 8.0), 8M 尿素中并且经声波处理, 如上文所述。通过超速离心 (50000 x g, 60 分钟) 除去不可溶物质。根据制造商的建议, 通过固定化的金属 - 离子亲和层析在变性条件下对上层清液进行纯化。将洗脱的蛋白质的已收集的部分汇集起来 (分别对于天然蛋白质和对于变性蛋白质) 并且通过截留分子量为 10KDa 的 Amicon Ultra 离心过滤器装置 (Millipore, Billerica, MA) 进行浓缩。

[0087] 对于植物转化的 DNA 构建

[0088] 利用引物 SEQ ID NO:14 和 18 (STOP 密码子被引入根据 SEQ ID NO:18 的引物) 以及 Pfx Taq- 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 由先前获得的构造再扩增嵌合 MOMP, 以便产生钝端 PCR 产物。利用以下条件进行 PCR: 94 $^{\circ}$ C 下 15 秒、55 $^{\circ}$ C 下 30 秒、72 $^{\circ}$ C 下 2 秒循环 35 次, 接着 72 $^{\circ}$ C 下单个延伸步骤达 30 分钟。PCR 产物如前所述被纯化并用于亚克隆到植物表达载体。

[0089] 作为植物表达载体, 我们使用了 pGreen0229 (www.pgreen.ac.uk), 由 Dr. P. Mullineaux 和 Dr. R. Hellens, John Innes Centre 和 Biotechnology and Biological Sciences Research Council (Norwich Research Park, UK) 惠赠。表达盒包含了 CaMV35S 启动子和 CaMV 聚腺苷酸终止 (子) 序列, 由多克隆位点分开。载体由 SmaI 酶在多克隆位点线性化并且用于克隆嵌合 MOMP 构造。通过测序核实所得到的质粒以确定插入物的正确定向 (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA)。

[0090] 拟南芥中的植物转化

[0091] 通过电穿孔, 利用 pGreen0229/ 嵌合 MOMP 来转化根癌土壤杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) (EHA105), 由 E. E. Hood (Department of Biology, Utah State University)

惠赠。

[0092] 在添加有卡那霉素 (50 $\mu\text{g/ml}$) 和四环素 (5 $\mu\text{g/ml}$) 的 LB 培养基上选择阳性克隆 (系)。

[0093] 拟南芥生态型 Columbia-0 (Col-0) (The European Arabidopsis Stock Centre, Loughborough, UK) 被用作植物转化的背景。在施肥的土壤:珍珠岩:蛭石混合物 (1:1:1) 上播种后,种子在 4° C 下(黑暗)保持 5 天,然后转移到生长室(22° C, 16 小时光照, 8 小时黑暗, 70% 湿度)。白光的荧光率是 100 μmol 光子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (PAR)。转基因植物通过本领域已知的四周龄拟南芥属植物的简化的花序浸渍 (floral dip) 法产生并且通过在包含草铵膦 (glufosinate-ammonium) (BASTA) (10 $\mu\text{g/ml}$) (Riedel-de Haen, Seelze, Germany) 和 sephatoxime (400 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma, Steinheim, Germany) 的 Murashige and Skog (MS) 培养基上发芽进行选择。抗性植物被转移到盆栽混合土 (potting mix), 以便分析、自体受粉和种子生产。由产生 100%BASTA- 抗性后代的各植物所获得的种子被用于进一步的实验。

[0094] 胡萝卜中的植物转化

[0095] 在一个替代性实施例中,通过电穿孔,利用 pGreen0229/ 嵌合 MOMP 来转化根癌土壤杆菌 (EHA105), 该菌株由 E. E. Hood (Department of Biology, Utah State University) 惠赠。

[0096] 在添加有卡那霉素 (50 $\mu\text{g/ml}$) 和四环素 (5 $\mu\text{g/ml}$) 的 LB 培养基上选择阳性克隆 (系)。

[0097] 胡萝卜 (*Daucus carota* (carrot) (L.) ssp. sativus cv Napoli Fl) (Weibullstradgard AB, Hammenhog, Sweden) 的种子在 25% [v/v] 氯中消毒 45 分钟又在 2.5% [v/v] 氯中消毒 2 小时, 70% 乙醇中 1 分钟, 并最终在 1 小时内在水中洗三次。无菌的胡萝卜 (*D. carota*) 种子在没有生长调节剂的 MS 培养基上发芽并且通过用 2, 4- 二氯苯氧乙酸 (1mg/l) 在 MS 培养基上培养由切断的下胚轴开始生长愈伤组织细胞。将愈伤组织细胞悬浮在相同类型的液态培养基中并且在 25° C 下在黑暗中的摇床 (90rpm) 上生长。为了产生体细胞胚, 细胞被转移到无生长调节剂的 MS 培养基。为了转化, 在添加了新鲜的生长培养基后的 10-14 天取胡萝卜细胞。通过离心作用 (在 100g 达 1 分钟) 将胡萝卜细胞进行浓集, 4-5ml 浓集的细胞在可达到 20ml 的液态 MS 培养基中被稀释并且添加 600 μl 的 LB 培养基 (在 600nm 下 1.5 的光密度) 中携带载体的根癌土壤杆菌 (*A. tumefaciens*)。利用摇床 (90rpm) 在 25° C 下在黑暗中将细胞和细菌共培养 3 天。为了选择转基因胡萝卜细胞, 它们通过离心作用在液态 MS 培养基中被重复洗三次以便除去细菌, 并且随后在 25° C 下在弱光 (1 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$) 中在添加有 BASTA (0、1、5、或 10 $\mu\text{g/ml}$) 以及头孢噻肟 (cephotaxime) (500 $\mu\text{g/ml}$) 的无生长调节剂的培养基中埋入并进一步培养。胡萝卜细胞的密度为 0.1-0.9ml 浓集细胞 / 10ml 的培养基。生长聚集物以及某些情况下植物被转移到没有 BASTA 的无生长调节剂的 MS 培养基。体外植物在薄雾 - 房子 (mist-house) 中在 11 (个) 塑料罐 (Phyto Technology Laboratories, Terrace Lenexa, KS, USA) 中被培养并适应环境大致 2 周, 在弱光下给予 18h/6h 光 / 黑暗, 并随后利用相等的光周期但用 50 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 的光强在盆中培养。

[0098] 免疫印迹

[0099] 为了制备蛋白质样本, 通过研钵和研杵在包含 50mM Tris、8M 尿素、1% Triton X-100

和 1mM DTT (pH 7.5) 的提取缓冲液中研磨拟南芥属组织。蛋白质提取物通过 SDS-PAGE 被分离并且被印迹到硝化纤维素膜 Hybond-C 上 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)。所述膜在 TBS (0.02M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.4) 中的 3% BSA (Sigma, Steinheim, Germany) 中封闭 1 小时并且用稀释了 1:2500 倍的小鼠抗沙眼衣原体 MOMP 的单克隆抗体 (Acris Antibodies GmbH, Germany) 探测 1 小时。用结合了碱性磷酸酶 (AP) 的抗-鼠抗体 (Promega, Madison, WI) 检测嵌合 MOMP 并且用 NBT 和 BCIP (Promega, Madison, WI) 进行可视化。

[0100] 基因组 DNA 提取和 Southern 印迹分析

[0101] 利用 JETFLEX 基因组 DNA 纯化试剂盒 (JETFLEX Genomic DNA Purification Kit) (GENOMED GmbH, Lohne, Germany) 隔离植物基因组 DNA, 并通过 DraI, NdeI 或 NotI (Sigma) 裂解 15 μ g DNA。这些酶不裂解嵌合 MOMP 序列。裂解的 DNA 通过在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离被分离并被转移到 Hybond-N 膜 (GE Healthcare)。膜通过利用随机引物 DNA 标记系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 标记有 32 P-dCTP 的嵌合 MOMP DNA 进行探测。在 X-射线胶片上观察到的带的数量与植物基因组中 T-DNA 插入物的数量相对应。

[0102] 构建的免疫基因的验证

[0103] 进行了中间试验。用鼻内给药通过重组 MOMP 嵌合体使五只小鼠 (C57/b16) 得到免疫, 每次免疫启动之间有 10 天间隔。给药剂量是 10 μ g 的纯化的重组 MOMP 嵌合体。小鼠在免疫接种开始前和每次免疫启动后被采集血液, 并且通过 ELISA 分析血清抗-MOMP 嵌合体 IgG。ELISA 板 (Nunc Maxisorp, Odense, Denmark) 覆有重组 MOMP 嵌合蛋白质 (2 μ g/ml)。血清在 PBS 中被稀释。抗嵌合体抗体 (Abs) 之后是 HRP-标记的兔抗鼠 Ig Abs 并利用柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中的邻苯二胺底物 / 0.04% H_2O_2 进行可视化。在 450nm 下通过分光光度法读取 (这些) 反应。抗-MOMP 嵌合体血清效价 \log_{10} 滴度, 表明了有希望的结果 (数据未示出)。

[0104] 嵌合 MOMP 构造及其在大肠杆菌中的过表达

[0105] 用于 PCR 以便扩增用于组装嵌合体的 MOMP 的 VS2 和 VS4 可变区的反向和正向引物是从核苷酸序列数据设计的。根据 SEQ ID NO:19、编码根据 SEQ ID NO:20 的共同挠性接头 $(Gly_4Ser_3)_3$ 的序列被分别引入根据 SEQ ID NOs:14 和 15 的引物的 5'-端。在一个实施例中, 根据 SEQ ID NO:25、编码根据 SEQ ID NO:26 的另一共同挠性接头 $(Gly_4Ser)_2Gly_4$ 的序列被分别引入根据 SEQ ID NOs:14 和 15 的引物的 5'-端。随后沿以下方向组装扩增的 VS2- 和 VS4- 类片段 (分别是 SEQ ID NOs:1 和 2); 5'-SEQ ID NOs:1: 接头: SEQ ID NOs:2-3'。所产生的嵌合体显示 351bp 的预期尺寸, 如图 2 中 L 道中的强带所示出。图 2 示出了组装的基因构造的 PCR 分析的结果。N 表示 PCR-反应的阴性对照, L 表示 DNA 尺寸标记物。产物通过测序进行验证并且克隆到 pET101 载体。过表达的蛋白质通过抗-His Abs (数据未示出) 和抗-MOMP Abs (Acris Antibodies GmbH, Germany) 进行检测, 如图 3 中所见, 图 3 示出了在大肠杆菌中表达的并利用 Ni-NTA 技术纯化的重组嵌合 MOMP 蛋白质的蛋白质印迹分析 (Western blot analysis) 的结果。通过对沙眼衣原体 MOMP 的小鼠单克隆抗体 (Acris Antibodies GmbH, Germany) 检测预期尺寸 (17kD) 的带。L 表示蛋白质尺寸标记物。我们将 MOMP 嵌合体的表达扩大到 2000ml 细菌培养物, 以便利用 Ni-NTA 亲和技术进行纯化。用考马斯蓝 (Coomassie Blue) 染色的纯化的嵌合体蛋白质在图 4 中示出。在天然

条件下纯化的蛋白质被用在以后的免疫接种实验中,用于验证所设计的构造的免疫原性特征和用于产生抗-MOMP 嵌合体多克隆抗血清。在变性条件下纯化的蛋白质被用于覆盖(包被)ELISA 板,(所述 ELISA 板)用于检测小鼠血清中的特异性 Abs。

[0106] 植物中转基因插入物和嵌合体产生的分析

[0107] 所设计的 MOMP 嵌合体被连接到 pGreen 载体的 SacI 克隆位点,并且克隆片段的序列被验证。重组表达载体被用于转化 Co1-0 生态型的拟南芥植物。在用双丙氨磷进行初始幼苗筛选后选定四十株转基因植物。三个选定的转基因系编号 9、15 和 25 被用于进一步的分析,并且已经证实可达到第六代的转基因的稳定整合,如图 4 中所见。

[0108] 未分级(段)的叶提取物中的组成性表达的嵌合 MOMP 蛋白质的蛋白质印迹检测在图 5 中示出:三个转基因系(一式二份“a”和“b”)与未转化的植物(WT,作为阴性对照)的比较揭示了适当尺寸的特异性带,所述尺寸完全符合嵌合体和大肠杆菌表达的重组蛋白质的计算尺寸。

[0109] 将选定的转基因植物进行 Southern 印迹分析以便估算转基因的数量。限制性酶 Dra I、Nde I 和 Mlu I 被用于植物基因组 DNA 的裂解。用 Dra I 和 Nde I 所获得的结果在图 6 中示出。不同数量的转基因插入物出现在不同的系中:系 9 包含一个插入物,系 12- 三个,系 15- 两个,而系 25- 四个插入物。尽管在不同的系中存在不同数量的转基因,但这并没有在视觉上影响植物的显型(表现型)。与拟南芥野生型(WT)植物相比,所述转化株具有相同的形态学的外观。

[0110] 通过用研钵和研棒在液氮中研磨大约 200mg 胡萝卜(根)来分析使用胡萝卜的替代性实施例的结果。冷冻的粉末在冰上被解冻并用 200 μ l 的 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)进行涡流,并随后如上所述进行分析。图 7 示出了根据上文所述利用胡萝卜产生的 MOMP 嵌合体的量的半定量分析的结果,用栽培种 Karotan(系 +;图 7 中表示为 Kar)和栽培种 Napoli(系 313/3;图 7 中表示为 313/3),并与我们的 MOMP 嵌合蛋白质的标准量(180、300、600、和 1200ng)进行比较。系 Kar+ 每 40 μ g 总可溶蛋白质(TSP)产生 450ng MOMP,这对应于 1%。系 Napoli313/1 每 20 μ g TSP 产生 600ng MOMP,这对应于 3%。

[0111] 通过具有 His/V 5 标签的重组嵌合 MOMP 蛋白质在小鼠诱导的免疫应答

[0112] 四组 10 只小鼠被给予根据 SEQ ID NO:6 的构建的 MOMP 嵌合体。根据下述进行给药:

[0113] 给予第一组 10 μ g 纯化的 MOMP 嵌合体和 1 μ g 霍乱毒素(CT)佐剂的混合物,鼻内给药(i. n.)20 μ l 三次,有 10 天间隔。在 MOMP 嵌合体+CT 佐剂的末次给药十天后,给小鼠皮下(s. c)注射 Depo-Provera (Pfizer)。在 Depo-Provera 注射后七天,经阴道(i. vag)给药 40 μ l 的 10 μ g MOMP 嵌合体+1 μ g CT 佐剂的混合物的后续给药(加强)。

[0114] 给予第二组根据上文所述转化的转基因拟南芥,口服三次,有十天的间隔。每次,除常规饲料(喂料)之外,给予小鼠过量的新鲜的转基因拟南芥。在转基因拟南芥的末次给药后十天,给小鼠皮下(s. c)注射 Depo-Provera (Pfizer)。在 Depo-Provera (Pfizer)注射后七天,经阴道(i. vag)给予 40 μ l 的 10 μ g MOMP 嵌合体+1 μ g CT 佐剂的混合物的后续给药(加强)。

[0115] 给予第三组根据上文所述转化的转基因拟南芥,口服三次,有十天的间隔。每次,除常规饲料(喂料)之外,给予小鼠过量的新鲜的转基因拟南芥。在转基因拟南芥的末次

给药后十天,给小鼠皮下(s. c.)注射 Depo-Provera (Pfizer)。在 Depo-Provera (Pfizer) 注射后七天,经阴道(i. vag)给予 40 μ l 的 PBS 缓冲剂的后续给药(加强)。

[0116] 第四组被用作阴性对照,即,没有任何给药。

[0117] 通过 ELISA 针对抗原特异性抗体(IgG 和 IgA)分析小鼠的免疫应答。然后,通过用沙眼衣原体入侵(挑战)小鼠来测试免疫应答的强度,以查看是否获得了保护性免疫或保护性免疫应答。末次处理后十天,采集血液和阴道样本。在七天过程中再次用 Depo-Provera (Pfizer) 处理小鼠,然后受(沙眼衣原体的)入侵。血液和阴道液体的样本被采集并通过 ELISA 进行分析,如上文“构建的免疫基因的验证”中所描述。当分析血清和阴道分泌物中的免疫应答时,第一组小鼠的免疫应答最强。第二和第三组显示较低一些的应答(某些小鼠是阴性的)。在阴道分泌物中可检测到低水平的抗体,主要是来自第一组中的小鼠。

[0118] 结果总结在图 8 和图 9 中。图 8 是示出分别在上述组一(•)、组二(□)和组三(▲)的小鼠的免疫应答(IgG 的 \log_{10} 滴度)的图表。结果被分段以显示(从左到右)1 次给药后、2 次给药后、3 次给药后、3 次给药加上加强后、由独立的抗原破伤风类毒素刺激(以确保小鼠不是反应过度的)以及只由 V5 表位刺激的免疫应答。上述的组四(对照)不显示任何应答(数据未示出)。

[0119] 图 9A 和 9B 是示出分别在上述的组一(•)、组二(□)和组三(▲)中的小鼠的免疫应答(A-IgG 的 \log_{10} 滴度 ;B-IgA 的 \log_{10} 滴度)的图表。结果被分段以显示(从左到右)3 次给药加上加强后的免疫应答,如用 ELISA 分别靶向 MOMP 嵌合体 and V5 表位所测量的。此外,研究了被沙眼衣原体血清型 D 感染的小鼠中用所构建的 MOMP 嵌合体进行免疫接种引起的保护效应。在图 10 中示出的结果根据标准的方法进行测量,即,分别在感染后携带细菌 8(d8)、16(d16)、32(d32) 和 40(d40) 天的小鼠的数量。黑条表示没有被免疫接种的小鼠(第四组),白条表示用根据上文所述的大肠杆菌产生的 MOMP 嵌合体处理的小鼠(鼻内给药和阴道内加强)(第一组),而灰条表示用根据上文所述的拟南芥产生的 MOMP 嵌合体处理的小鼠(口服给药和阴道内加强)(第二组)。

[0120] 可以看到,免疫接种明显地提供了保护效应。第一组的小鼠部分得到了保护,比对照组更快的恢复。

[0121] 通过没有 His/V 5 标签的重组嵌合 MOMP 蛋白质在小鼠中诱导的免疫应答

[0122] 给予三组 10 龄对照小鼠根据 SEQ ID NO :3 的所构建的 MOMP 嵌合体,即,没有 His/V5 标签。根据下述进行给药:

[0123] 给予第一组 10 μ g 纯化的 MOMP 嵌合体 +1 μ g CT 佐剂的混合物,鼻内(i. n.)给药 20 μ l 三次,有 10 天时间间隔。MOMP 嵌合体 +CT 佐剂的末次给药后的十天,给小鼠皮下(s. c.)注射 Depo-Provera(Pfizer)。在 Depo-Provera(Pfizer) 注射后七天,经阴道(i. vag)给予 40 μ l 的 10 μ g MOMP 嵌合体 +1 μ g CT 佐剂的混合物的后续给药(加强)。

[0124] 经鼻内给予第二组 20 μ l PBS 缓冲液三次,有十天的时间间隔。在 PBS 缓冲液末次给药后十天,给小鼠皮下(s. c.)注射 Depo-Provera (Pfizer)。在 Depo-Provera (Pfizer) 注射后七天,经阴道(i. vag)给予 40 μ l 的 10 μ g MOMP 嵌合体 +1 μ g CT 佐剂的混合物的后续给药(加强)。

[0125] 第三组被用作阴性对照,即,没有任何给药。

[0126] 通过使小鼠受沙眼衣原体的入侵来测量小鼠的免疫应答。末次处理后十天,采集

血液和阴道样本。在七天过程中再次用 Depo-Provera (Pfizer) 处理小鼠,并随后受(沙眼衣原体的)入侵。取血液和阴道液体的样本并用如上文“所构建的免疫基因的验证”所述的 ELISA 分析。图 11 示出每次给药后第一组小鼠(黑点)的血清中逐渐增加的免疫应答。第三组的小鼠(对照组)显示为白色方块。

[0127] 研究了被沙眼衣原体血清型 D 感染的小鼠中用所构建的 MOMP 嵌合体免疫接种引起的保护效应。在图 12 中示出的结果根据标准化的方法进行测量,即,分别在感染后携带细菌 7 或 14 天的小鼠的数量。白条表示没有被免疫接种的小鼠(第三组),灰条表示用根据上文所述的大肠杆菌中产生的 MOMP 嵌合体处理的小鼠(鼻内给药和阴道内加强)(第一组),而黑条表示用根据上文所述的大肠杆菌中产生的 MOMP 嵌合体处理的小鼠(只有阴道内加强)(第二组)。

[0128] 可以看到,免疫接种明显地提供了保护效应。

[0129] 用没有 His/V5 标签的重组嵌合 MOMP 蛋白质诱导的小鼠的生育力研究

[0130] 与上文所讨论的免疫接种研究同时,进行了生育力研究。进一步研究了四组 10 只小鼠中,预先用根据 SEQ ID NO :3 (即没有 His/V5 标签)的重组嵌合 MOMP 蛋白质进行免疫接种的雌性小鼠,其中每组如下:

[0131] 第一组是没有被免疫接种并且健康的小鼠。

[0132] 第二组是被免疫接种的小鼠,但感染了沙眼衣原体血清型 D。

[0133] 第三组的小鼠经鼻给予 20 μ l 的 10 μ g 纯化的 MOMP 嵌合体 +1 μ g CT 佐剂的混合物三次,有十天时间间隔。MOMP 嵌合体 +CT 佐剂的末次给药后的十天,给小鼠皮下(s. c.)注射 Depo-Provera (Pfizer)。在 Depo-Provera (Pfizer)注射后七天,经阴道(i. vag)给予 40 μ l 的 10 μ g MOMP 嵌合体 +1 μ g CT 佐剂的混合物的后续给药(加强)。然后使小鼠受沙眼衣原体的入侵。

[0134] 给第四组的小鼠皮下(s. c.)注射 Depo-Provera (Pfizer)。在 Depo-Provera (Pfizer)注射后七天,经阴道(i. vag)给予 40 μ l 的 10 μ g MOMP 嵌合体 +1 μ g CT 佐剂的混合物的后续给药(加强)。然后使小鼠受沙眼衣原体的入侵。

[0135] 所有小鼠进行交配,然后称重以确定是否怀孕。将怀孕的小鼠处死并且计算胚胎的数量。

[0136] 研究的目的是调查所构建的 MOMP 抗原对小鼠生育力的影响。将受沙眼衣原体入侵的被免疫接种和未被免疫接种的小鼠的胚胎的数量进行比较。

[0137] 结果表现为受沙眼衣原体血清型 D 感染并且感染后交配产生后代的小鼠的数量。如在图 13 中可见,所有的未受感染和接种过疫苗的小鼠怀孕了,而 40% 的受感染的雌性小鼠是不孕的。

[0138] 因此,该研究表明沙眼衣原体导致 40% 的受感染的雌性小鼠不孕,而未受感染的小鼠和受感染的小鼠在给药根据 SEQ ID NO :3 的所构建的 MOMP 嵌合体后是 100% 有能生育的。在一个实施例中,提供了一种用于在哺乳动物中诱导抗沙眼衣原体的保护性免疫应答的方法,所述方法包括给药给所述哺乳动物根据第一方面的治疗有效量的多肽或根据第二方面的化合物或根据第七方面的组合物。

[0139] 在一个实施例中,所述哺乳动物是人。

[0140] 尽管本发明已在上文结合具体实施例进行了描述,但它不旨在受限于本文所述的

特定形式。相反,本发明仅受限于所附的权利要求书,并且以上特定的实施例以外的其它实施例在这些所附权利要求的范围内是等同可能的。

[0141] 在权利要求中,术语“包括 (comprises)/ 包括 (comprising)”不排除其它元件或步骤的存在。此外,尽管单独列出,但多个装置、元件或方法步骤可以通过例如单个单元来实现。另外,尽管各个特征可以包括在不同的权利要求中,但这些特征可能可进行有利的组合,并且纳入在不同的权利要求中并不意味着特征的组合是不可行的和/或不利的。此外,单数引用不排除多个。术语“一个 (a)”、“一个 (an)”、“第一”、“第二”等等不排除多个。权利要求中的附图标记仅用作阐明示例,而不应被解释为以任何方式限制权利要求的范围。

[0142] 序列表自由文本

[0143] 在序列表中,以下人工序列具有自由文本信息:

[0144]	SEQ ID NO :4	V5 标签
[0145]	SEQ ID NO :5	His 标签
[0146]	SEQ ID NO :10	VS2 引物,正向 1
[0147]	SEQ ID NO :11	VS2 引物,反向 1
[0148]	SEQ ID NO :12	VS4 引物,正向 1
[0149]	SEQ ID NO :13	VS4 引物,反向 1
[0150]	SEQ ID NO :14	VS2 引物,正向 2&3
[0151]	SEQ ID NO :15	VS2 引物,反向 2
[0152]	SEQ ID NO :16	VS4 引物,正向 2
[0153]	SEQ ID NO :17	VS4 引物,反向 2&3
[0154]	SEQ ID NO :18	VS4 引物,反向, STOP(终止)
[0155]	SEQ ID NO :19	接头序列
[0156]	SEQ ID NO :20	接头序列
[0157]	SEQ ID NO :25	接头序列
[0158]	SEQ ID NO :26	接头序列

[0001]

W102660001_sekvenslista_PCT.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Spixia Biotechnology AB
 <120> Chimeric MOMP Antigen, Method and Use
 <130> W102660001
 <150> SE1050535-2
 <151> 2010-05-28
 <160> 26
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <400> 1
 Met Gly Asp Asn Glu Asn Gln Ser Thr Val Lys Thr Asn Ser Val Pro
 1 5 10 15
 Asn Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val Glu Leu
 20 25
 <210> 2
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <400> 2
 Trp Gln Ala Ser Leu Ala Leu Ser Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro
 1 5 10 15
 Tyr Ile Gly Val Lys Trp Ser Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile
 20 25 30
 Arg Ile Ala Gln Pro Lys Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr
 35 40 45
 Leu Asn Pro Thr Ile Ala Gly Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu
 50 55 60
 Gly Gln Leu Gly Asp Thr Met Gln Ile Val Ser
 65 70 75
 <210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <400> 3
 Met Gly Asp Asn Glu Asn Gln Ser Thr Val Lys Thr Asn Ser Val Pro
 1 5 10 15
 Asn Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val Glu Leu Gly Gly Gly Ser

[0002]

W102660001_sekvenslista_PCT.ST25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Trp Gln Ala Ser Leu Ala Leu
 35 40 45

Ser Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile Gly Val Lys Trp Ser
 50 55 60

Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile Ala Gln Pro Lys Ser
 65 70 75 80

Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn Pro Thr Ile Ala Gly
 85 90 95

Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu Gly Gln Leu Gly Asp Thr Met
 100 105 110

Gln Ile Val Ser Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro
 115 120 125

Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His
 130 135 140

His His His His
 145

<210> 7
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 7
 atgggagata atgaaaatca aagcacggtc aaaacgaatt ctgtaccaa tatgagctta 60
 gatcaatctg ttgttgaact t 81

<210> 8
 <211> 225
 <212> DNA
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 8
 tggcaagcaa gtttagctct ctctacaga ttgaatatgt tcactcccta cattggagtt 60
 aaatggtctc gagcaagttt tgatccgat acgattcgta tagcccagcc aaaatcagct 120
 acagctatct ttgatactac cacgcttaac ccaactattg ctggagctgg cgatgtgaaa 180
 gctagcgcag agggtcagct cggagatacc atgcaaatcg tctcc 225

<210> 9
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 9
 atgggagata atgaaaatca aagcacggtc aaaacgaatt ctgtaccaa tatgagctta 60
 gatcaatctg ttgttgaact tgggtggaggc ggttcaggcg gaggtggatc cggcgggtggc 120

[0004]

w102660001_sekvenslista_PCT.ST25

ggatggcaag caagtttagc tctctcttac agattgaata tgttcactcc ctacattgga 180
gttaaattggt ctcgagcaag ttttgatgcc gatacgattc gtatagccca gccaaaatca 240
gctacagcta tctttgatac taccacgctt aaccctaacta ttgctggagc tggcgatgtg 300
aaagctagcg cagagggtca gctcggagat accatgcaaa tcgtctcc 348

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> vs2 primer, forward 1

<400> 10
tatttgggat cgctttgatg tat 23

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> vs2 primer, back 1

<400> 11
tattggaaag aagcccctaa agt 23

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> vs4 primer, forward 1

<400> 12
ctcttgact catagcagga act 23

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> vs4 primer, back 1

<400> 13
tgtaactgcg tatttgtctg cat 23

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> vs2 primer, forward 2&3

<400> 14
caccatggga gataatgaaa a 21

[0005]

w102660001_sekvenslista_PCT.ST25

<210> 15
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> vs2 primer, back 2

 <400> 15
 ccgccggatc cacctccgcc tgaaccgct ccaccaagt caacaacaga ttgatct 57

 <210> 16
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> vs4 primer, forward 2

 <400> 16
 caggcggagg tggatccggc ggtggcggat ggcaagcaag tttagctctc tct 53

 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> vs4 primer, back 2&3

 <400> 17
 ggagacgatt tgcattggtat 20

 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> vs4 primer back, STOP

 <400> 18
 attgagctcg cctcaggaga c 21

 <210> 19
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Linker sequence

 <400> 19
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggatcc ggcggtggcg gatgg 45

 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Linker sequence

 <400> 20

[0006]

W102660001_sekvenslista_PCT.ST25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 21

Gly Asp Asn Glu Asn Gln Ser Thr Val Lys Thr Asn Ser Val Pro Asn
 1 5 10 15

Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val Glu Leu
 20 25

<210> 22
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 22

Ala Ser Leu Ala Leu Ala Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile
 1 5 10 15

Gly Val Lys Trp Ser Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile
 20 25 30

Ala Gln Pro Lys Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn
 35 40 45

Pro Thr Ile Ala Gly Ala Gly Asp Val Lys Ala Ser Ala Glu Gly Gln
 50 55 60

Leu Gly Asp Thr Met Gln Ile Val Ser
 65 70

<210> 23
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 23

Gly Asp Asn Glu Asn Gln Lys Thr Val Lys Ala Glu Ser Val Pro Asn
 1 5 10 15

Met ser Phe Asp Gln ser Val Val Glu Leu
 20 25

<210> 24
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<400> 24

[0007]

w102660001_sekvenslista_PCT.ST25
 Ala Ser Leu Ala Leu Ala Tyr Arg Leu Asn Met Phe Thr Pro Tyr Ile
 1 5 10 15

Gly Val Lys Trp Ser Arg Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Arg Ile
 20 25 30

Ala Gln Pro Lys Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn
 35 40 45

Pro Thr Ile Ala Gly Ala Gly Asp Val Lys Thr Gly Ala Glu Gly Gln
 50 55 60

Leu Gly Asp Thr Met Gln Ile Val Ser
 65 70

<210> 25
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Linker sequence

<400> 25
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggatcc ggcggtggcg ga

42

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Linker sequence

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10

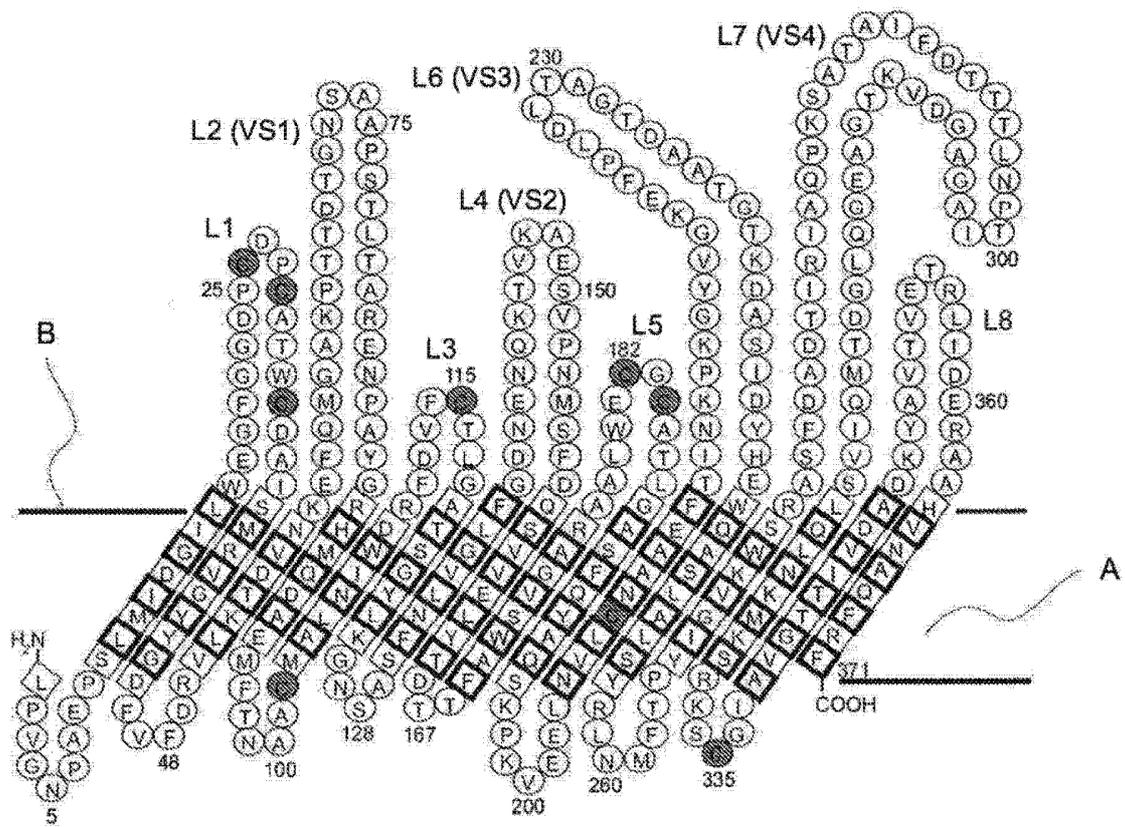


图 1

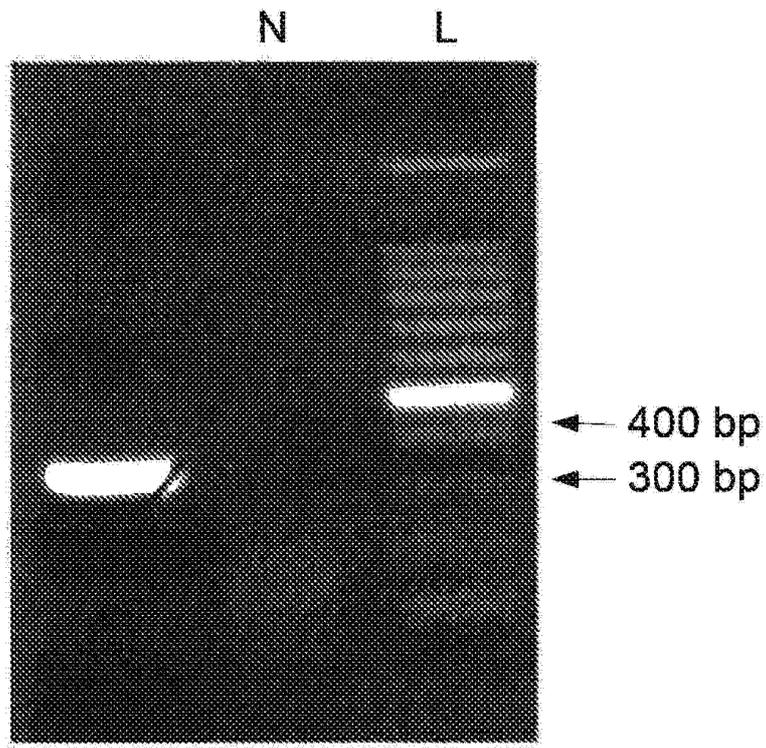


图 2

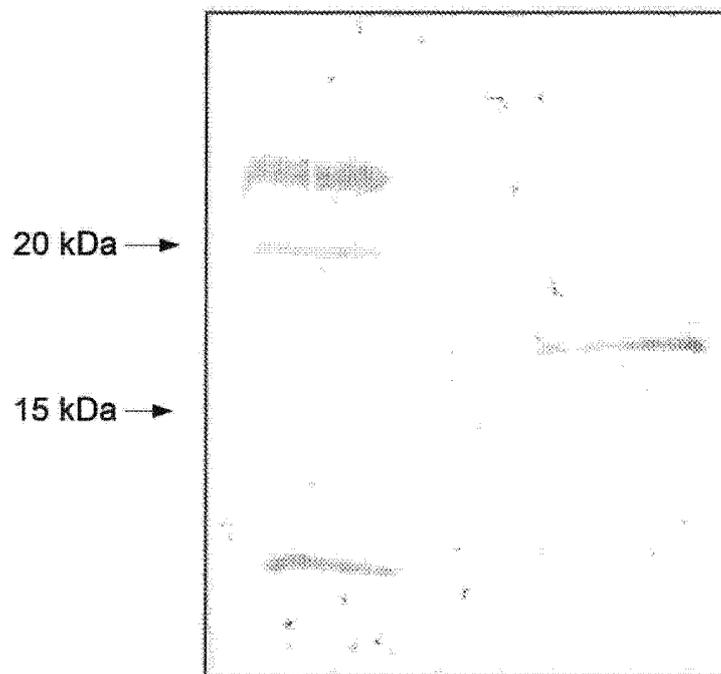


图 3

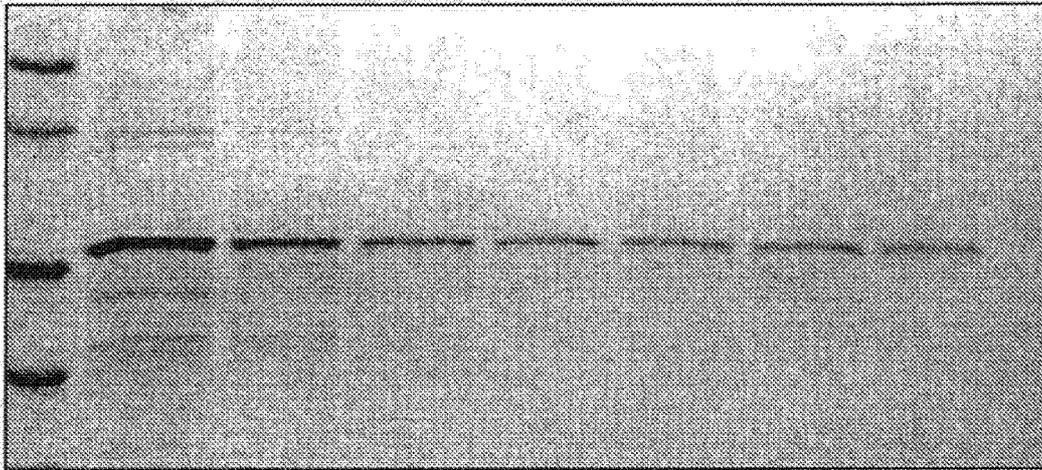


图 4

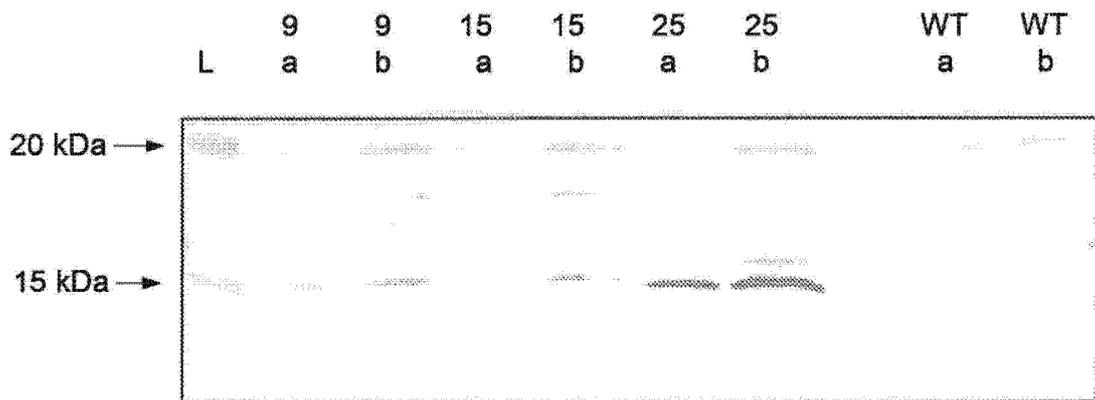


图 5

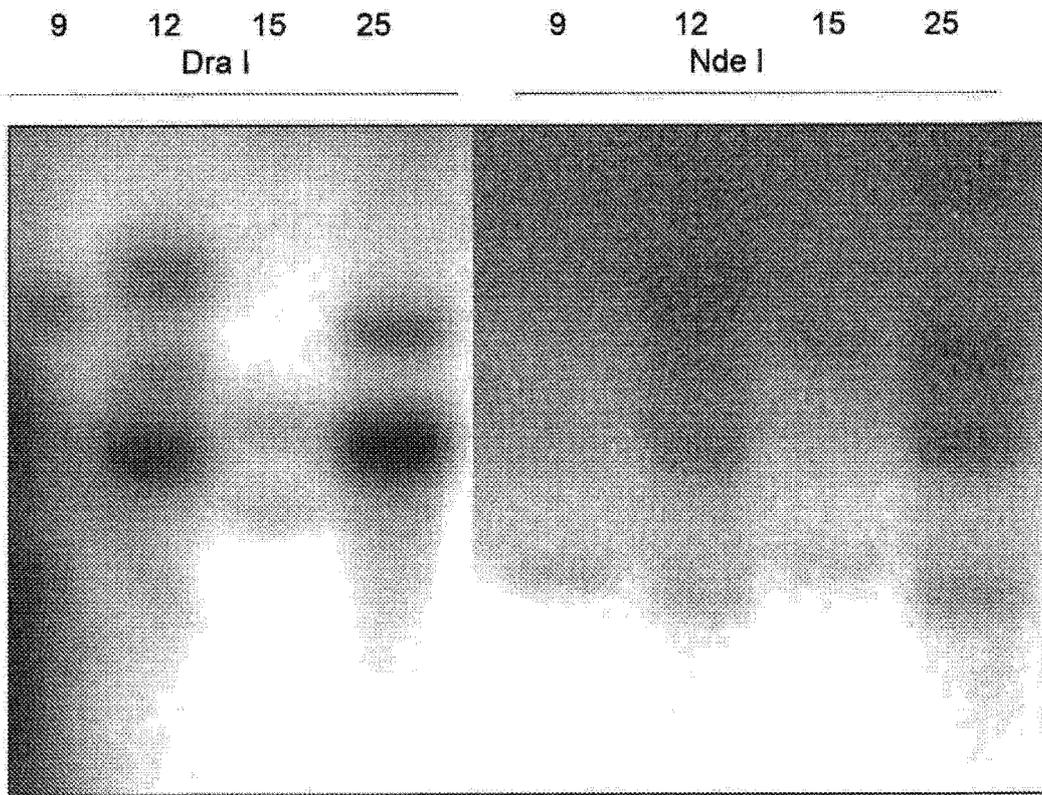


图 6

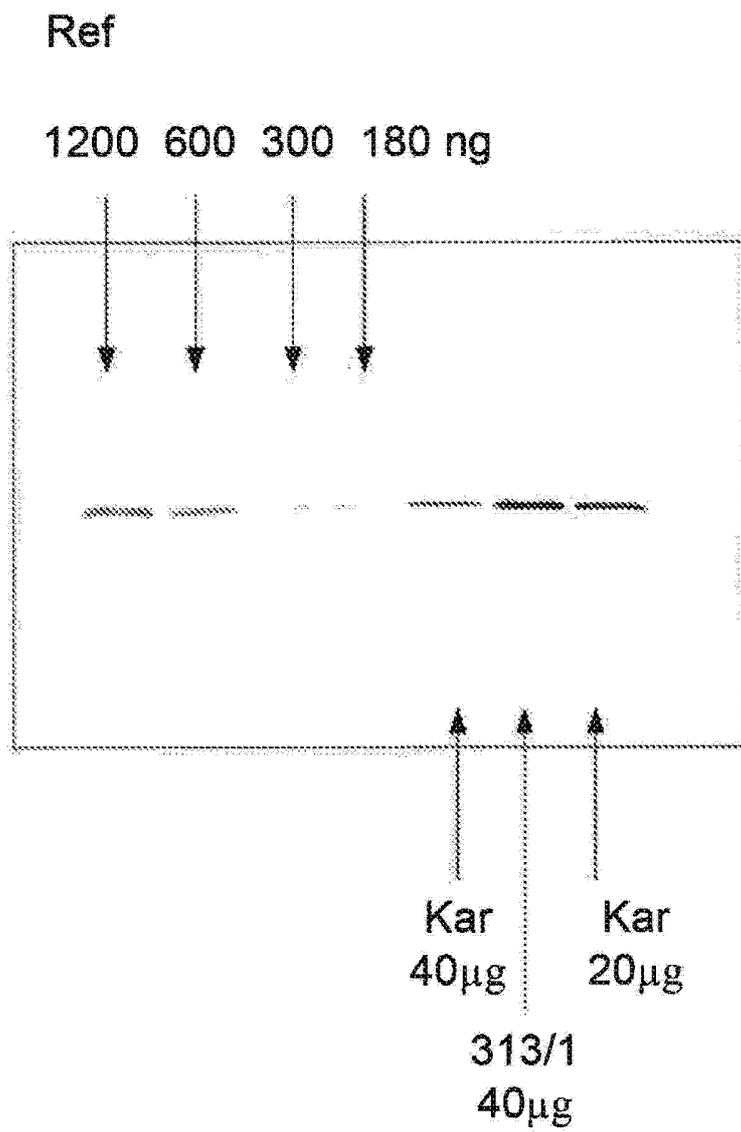


图 7

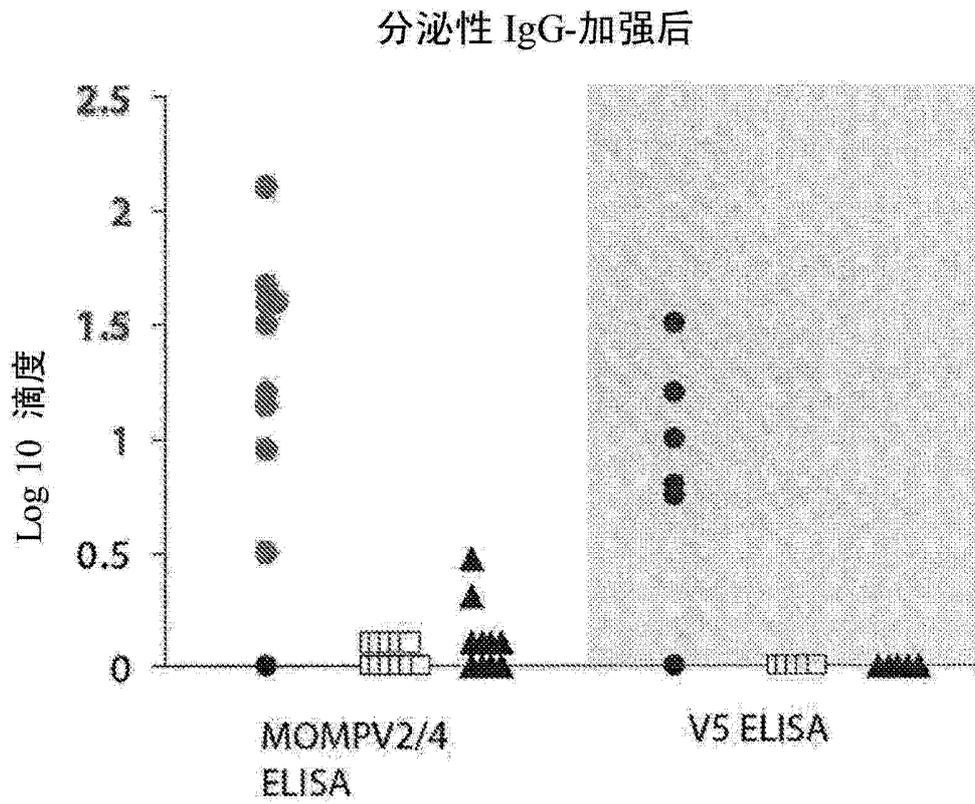


图 9A

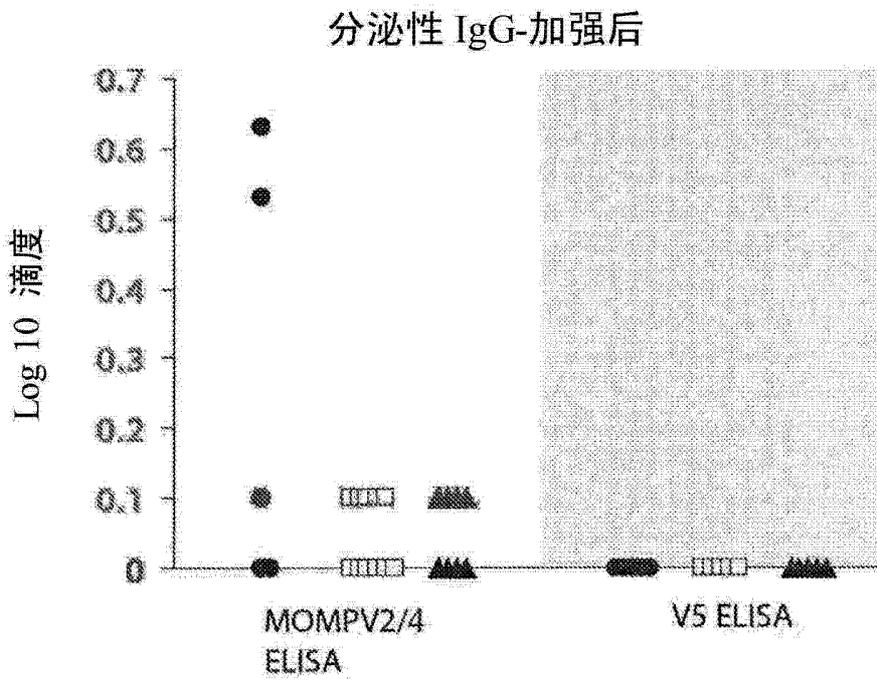


图 9B

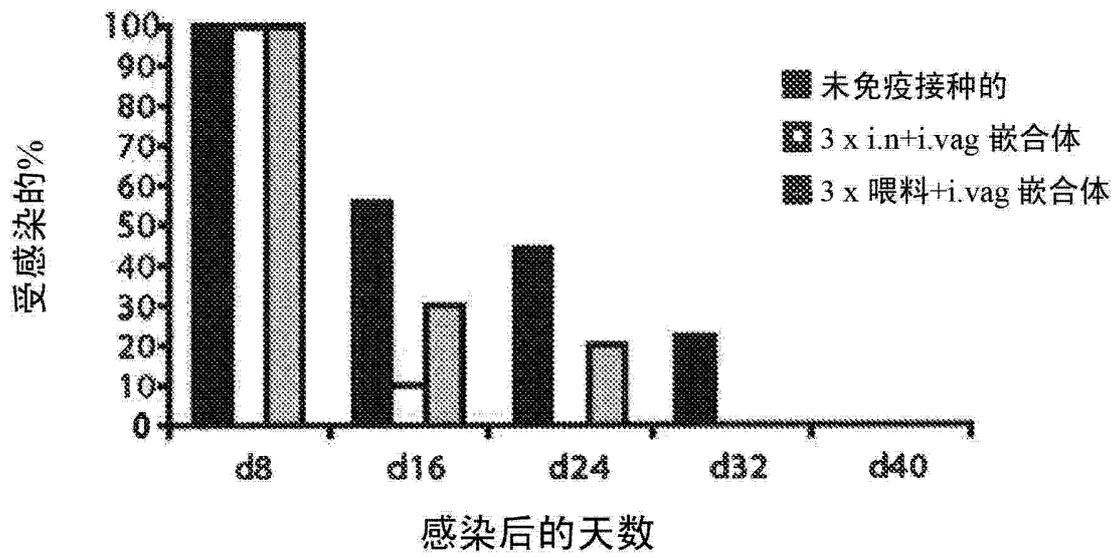


图 10

血清 IgG

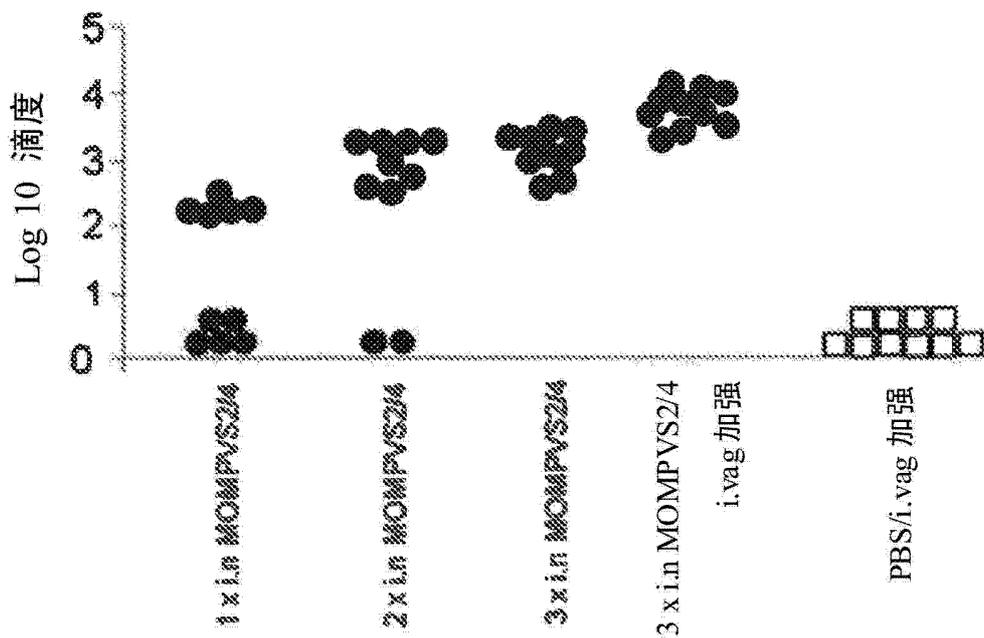


图 11

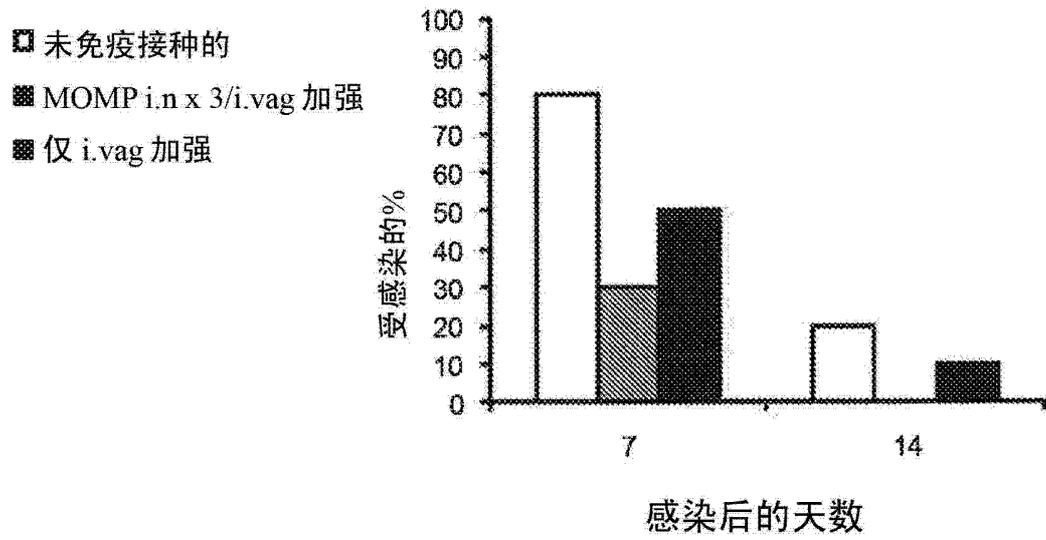


图 12

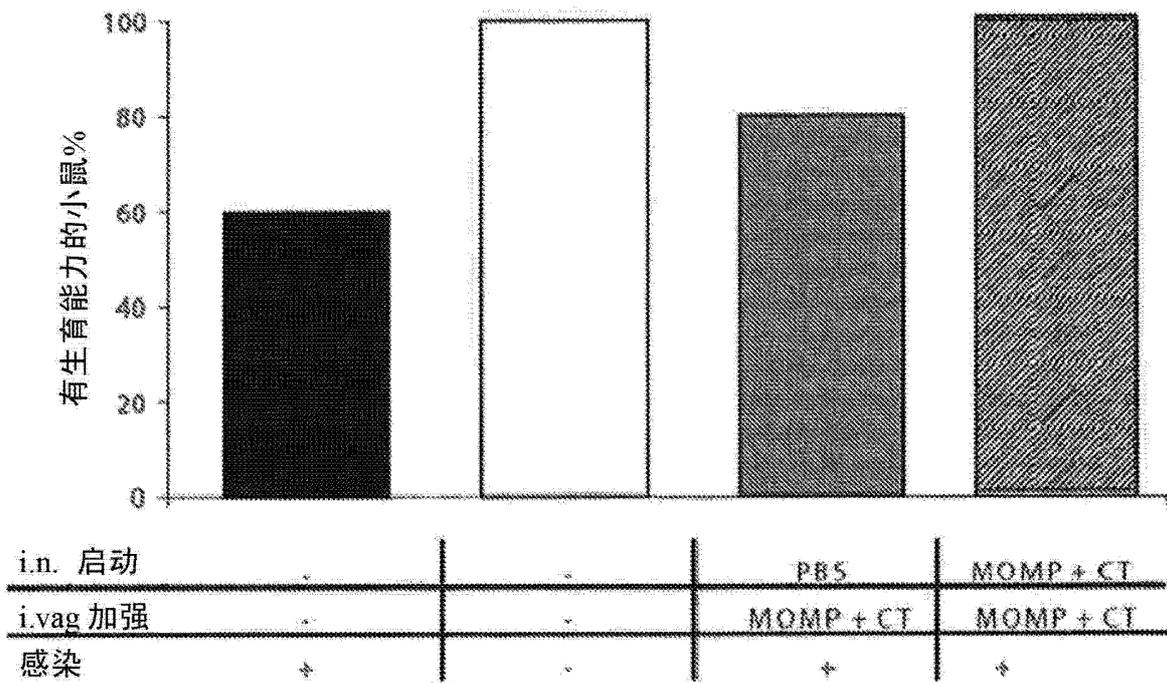


图 13

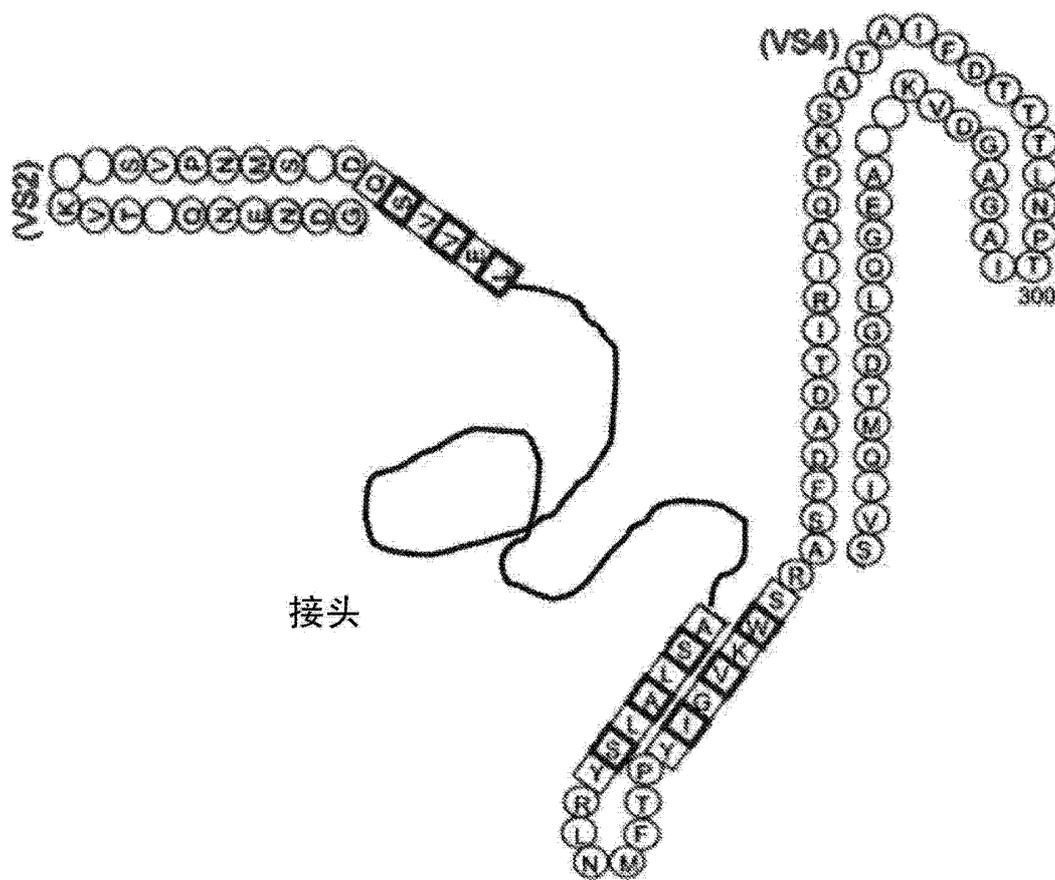


图 15