



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102675432 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201210103123. 9

(22) 申请日 2006. 02. 17

(30) 优先权数据

60/654, 632 2005. 02. 18 US

(62) 分案原申请数据

200680009326. 4 2006. 02. 17

(71) 申请人 诺华疫苗和诊断公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·皮萨 L·塞里诺

F·博兰达斯科萨

D·戈麦斯·莫里尔 M·R·丰塔纳

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C07K 14/245 (2006. 01)

A61K 39/108 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 69 页 附图 1 页

(54) 发明名称

来自尿路病原性大肠杆菌的免疫原

(57) 摘要

本文公开了可包含在对病原性大肠杆菌 (E. Coli) 菌株特异性的免疫原性组合物中的各种基因。所述基因来自尿路病原性菌株,但不存在于非病原性菌株中,并且其编码蛋白的细胞定位使它们可受免疫系统的影响。

1. 一种多肽,其含有氨基酸序列 SEQ ID NO 577,该多肽用于在患者中产生免疫应答的药物的制备。
2. 如权利要求 1 所述的多肽,其特征在于,所述多肽含有 SEQ ID NO 557 和选自有助于克隆的短肽序列、聚甘氨酸接头、和组氨酸标签的序列。
3. 如权利要求 1 所述的多肽,其特征在于,所述多肽如 SEQ ID NO 577 所示。
4. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求 1-3 中任一项所述的多肽与药学上可接受的载体的混合物。
5. 一种药物组合物,所述药物组合物包含两种或多种如权利要求 1-3 中任一项所述的多肽与药学上可接受的载体的混合物。
6. 如权利要求 4 或 5 所述的组合物,还包含免疫佐剂。
7. 如权利要求 1-3 中任一项所述的多肽或者如权利要求 4 或 5 所述的药物组合物在制备用于在患者中产生免疫应答的药物中的应用。
8. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于,所述免疫应答保护个体免受 ExPEC 感染。

来自尿路病原性大肠杆菌的免疫原

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为 PCT/US2006/005912, 国际申请日为 2006 年 2 月 17 日, 进入中国国家阶段的申请号为 200680009326.4, 名称为“来自尿路病原性大肠杆菌的免疫原”的发明专利申请的分案申请

[0002] 本文引用的所有文献均以其全文纳入本文中作为参考。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求于 2005 年 2 月 18 日提交的美国临时申请号 60/654,632 的优先权, 以其全文纳入本文中作为参考。

技术领域

[0005] 本发明属于大肠杆菌 (*E. coli*) 生物学领域, 具体涉及能引起对肠外病原性大肠杆菌 (ExPEC) 菌株的免疫的免疫原。

背景技术

[0006] 很少有微生物具有如大肠杆菌般的多用途。同时作为哺乳动物正常肠道微生物区系的重要成员, 其已被广泛用作重组 DNA 技术的宿主。然而, 大肠杆菌也可能成为致命病原体。

[0007] 大肠杆菌菌株通常被分为共生性或病原性, 病原性菌株再分成肠内或肠外菌株。更新的分类技术如多基因座酶电泳法 (MLEE) 将大肠杆菌分为 5 类系统发生组 (A、B1、B2、D 和 E), 这些分组与传统的分类不匹配。例如 MLEE B1 组包括共生性和病原性菌株, D 组包括肠内和肠外菌株。

[0008] 大肠杆菌的肠外病原性菌株 (或 'ExPEC' 菌株 [1]) 落入 MLEE B2 组和 D 组中, 包括尿路病原性 (UPEC) 菌株和脑膜炎 / 脓毒症相关性 (MNEC) 菌株。UPEC 菌株引起尿路感染 (UTI), 为膀胱炎的最普遍形式。它们还引起肾盂肾炎 (及其并发症如脓毒症) 和尿道管相关感染。MNEC 菌株引起病例致死率范围在 25% -40% 的新生儿脑膜炎 (每 1000 个活新生儿中出现 0.1 例), 还引起大约 1/6 的脓毒症病例。

[0009] 最早的 ExPEC 疫苗基于细胞裂解物或细胞结构。SOLCOUROVAC™ 包括 10 种不同的热杀细菌, 包括 6 种 ExPEC 菌株, 参考文献 2 中报道了成功的 II 期临床实验。URO-VAXOM™ 是一种含有 18 种选择的大肠杆菌菌株的冻干细菌裂解物的口服片剂疫苗 [3]。Baxter Vaccines 研制出一种基于 6-10 种不同菌株来源的菌毛的 UTI 疫苗, 但该产品已被放弃。MedImmune 研制出一种基于 FimH 粘附素复合物的名为 MEDI516 的产品 [4], 但是 II 期临床实验显示效力不够。而且, 这种疫苗存在影响正常肠道菌丛中的非病原性 FimH⁺ 菌株的风险, 同时, 由于其膀胱特异性粘附机制, 预计这种疫苗仅对 UPEC 菌株有效, 而其它 ExPEC 菌株不受它的控制。

[0010] 因此, 需要一种改良的 ExPEC 疫苗, 还需要从天然细胞裂解物转移到更明确的分子, 还需要鉴定适于包含入疫苗的其它抗原, 尤其是那些在临床 ExPEC 菌株中很普遍、而在共生性菌株中不存在的抗原。

[0011] 参考文献 5 报道了满足上述需要的一种方法,其发明人寻找在 MLEE B2 类型和 D 类型的基因组中存在但在 MLEE A 类型和 B1 类型中不存在的基因。基于扣除杂交的其它比较方法参见参考文献 6 和 7。参考文献 8 中也鉴定了 ExPEC 菌株的毒力基因。参考文献 9 分析了 UPEC 大肠杆菌菌株 536 中的四种致病性岛 (island)。

[0012] 参考文献 10 采用 UPEC(O6:K2:H1) 菌株 CFT073 的基因组序列 [11,12] 来鉴定在非病原性大肠杆菌菌株中不存在的序列。参考文献 13 比较了大肠杆菌人肾盂肾炎分离物 536(O6:K15:H31) (一种 UPEC) 的基因组序列与菌株 CFT073(UPEC)、EDL933(肠出血性)和 MG1655(非病原性实验菌株)的序列数据。病原性菌株的基因组序列获自数据库中的登录号 AE005174、BA000007 和 NC-004431。非病原性菌株的序列获自登录号 U00096。

[0013] 本发明的目的是提供用于引起对病原性大肠杆菌菌株、具体是 ExPEC 菌株、更具体是 UPEC 菌株的免疫的其它抗原。

发明内容

[0014] 发明人确定了能包含入对病原性大肠杆菌菌株有特异性的免疫原性组合物中的各种基因。所述基因来自尿路病原性菌株 (UPEC),然而在非病原性菌株中不存在,并且其编码蛋白的细胞定位使它们可受免疫系统的影响。

[0015] 一方面,本发明涉及一种多肽,其包含:(a)选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO22、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、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、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、

446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598 和 599 ; (b) 与氨基酸序列 (a) 的序列相同性至少为 80% 的氨基酸序列 ; (c) 作为氨基酸序列 (a) 中至少 10 个连续氨基酸的片段的氨基酸序列 ; 或 (d) 与氨基酸序列 (a) 的序列相同性至少为 80% 并包含氨基酸序列 (a) 中至少 10 个连续氨基酸的片段的氨基酸序列。在一个具体实施方式中, 本发明这方面的多肽包含一种片段, 其包含至少一个 (a) 的 B 细胞表位。

[0016] 另一方面, 本发明涉及一种多肽, 其包含 : (a) 选自下组的氨基酸序列 : SEQ IDNO 22、120、219、221、305、371、400、489、555、565、597、598 和 599 ; (b) 与氨基酸序列 (a) 的序列相同性至少为 80% 的氨基酸序列 ; (c) 作为氨基酸序列 (a) 中至少 10 个连续氨基酸的片段的氨基酸序列 ; 或 (d) 与氨基酸序列 (a) 的序列相同性至少为 80% 并包含氨基酸序列 (a) 中至少 10 个连续氨基酸的片段的氨基酸序列。在一个具体实施方式中, 本发明这方面的多肽包含一种片段, 其包含至少一个 (a) 的 B 细胞表位。

[0017] 本发明的多肽可用于在患者中产生免疫应答的药物及药物的制备。

[0018] 本发明还涉及一种药物组合物, 其包含与药学上可接受载体混合的本发明多肽。本发明还涉及一种药物组合物, 其包含两种或多种与药学上可接受载体混合的本发明多肽。在一个具体实施方式中, 本发明药物组合物还包含疫苗佐剂。

[0019] 本发明还涉及免疫原性组合物, 其包含表达或过表达包含如下氨基酸序列的一种或多种多肽的一种或多种外膜泡 (OMV) : (a) 选自下组的氨基酸序列 : SEQ IDNO 22、120、219、221、305、371、400、489、555、565、597、598 和 599 ; (b) 与氨基酸序列 (a) 的序列相同性至少为 80% 的氨基酸序列 ; (c) 作为氨基酸序列 (a) 中至少 10 个连续氨基酸的片段的氨基酸序列 ; 或 (d) 与氨基酸序列 (a) 的序列相同性至少为 80% 并包含氨基酸序列 (a) 中至少 10 个连续氨基酸的片段的氨基酸序列。在一个具体实施方式中, 本发明这方面的免疫原性组合物包含一种或多种多肽, 所述多肽含有包含至少一个 (a) 的 B 细胞表位的片段。

[0020] 本发明还涉及一种在患者中产生免疫应答的方法, 所述方法包括给予所述患者本发明的药物组合物或免疫原性组合物的步骤。在一个具体实施方式中, 所述免疫应答能保护对象不受 ExPEC 感染。

[0021] 本发明的其它方面描述如下。

附图说明

[0022] 图 1 显示用热灭活 CFT073 进行免疫后, 用 CFT073 刺激后小鼠的存活率。

具体实施方式

[0023] 本发明人鉴定了可包含在对病原性大肠杆菌菌株特异性的免疫原性组合物中的各种基因。所述基因来自 UPEC 菌株,然而在非病原性菌株中不存在,并且其编码蛋白的细胞定位使它们可受免疫系统的影响。

[0024] 多肽

[0025] 本发明提供多肽,其包含实施例中公开的氨基酸序列。序列表中的 SEQ ID NO 1-596 和 SEQ ID NO 597-599 给出了这些氨基酸序列。SEQ ID NO 1-596 中的优选序列在表 2、表 3 和表 5 中给出。

[0026] 本发明还提供包含与实施例中公开的氨基酸序列具有序列相同性的氨基酸序列的多肽。针对特定序列,序列相同性程度优选大于 50% (如 60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高)。这些多肽包括同源物、直向同源物、等位基因变体和突变体。一般地,两种多肽序列之间相同性为 50% 或更高被认为是功能等效的标志。优选用 MPSRCH 程序 (Oxford Molecular) 中运行的 Smith-Waterman 同源性检索算法来确定多肽间的相同性,其采用带有参数缺口开放罚分 = 12 和缺口延伸罚分 = 1 的仿射缺口检索来进行。

[0027] 与实施例的序列相比,这些多肽可包含一个或多个 (如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等) 保守的氨基酸取代,即用具有相关侧链的另一种氨基酸取代原有氨基酸。遗传编码氨基酸通常分成 4 种家族: (1) 酸性,即天冬氨酸、谷氨酸; (2) 碱性,即赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3) 非极性,即丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸; 和 (4) 不带电荷的极性氨基酸,即甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。有时将苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸一起称为芳族氨基酸。通常,这些家族中的单个氨基酸的替换不会对生物活性产生重要影响。相对于参比序列,所述多肽可以有一个或多个 (如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等) 单个氨基酸的缺失。相对于参比序列,所述多肽还可包含一个或多个 (如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等) 插入 (如 1、2、3、4 或 5 个氨基酸)。

[0028] 优选的多肽包含那些脂质化的、位于外膜中的、位于内膜中的、或位于周质中的多肽。尤其优选的多肽是同时属于这些范畴中 1 种以上的多肽,如位于外膜中的脂质化多肽。翻译后加工信号肽后脂蛋白的 N 端半胱氨酸共价连接于脂质。

[0029] 可以进行脂质化的多肽包括: SEQ ID NO: 1、2、7、12、13、14、15、16、17、18、22、26、28、29、33、34、38、40、45、50、51、59、67、68、69、71、77、80、82、83、84、92、98、103、104、105、120、121、124、125、126、127、130、131、133、134、138、142、147、159、160、176、184、185、186、187、192、206、210、215、222、223、225、226、228、233、234、246、251、252、268、272、273、275、284、287、293、295、297、298、299、300、302、303、304、305、310、311、312、314、315、320、326、327、330、331、336、340、359、360、364、366、367、369、370、371、374、378、379、386、387、388、389、390、395、400、401、407、408、418、419、422、423、425、429、431、433、434、435、436、438、441、442、444、447、453、464、465、472、478、492、500、506、509、517、518、519、523、526、531、536、540、543、544、546、548、551、557、559、560、562、563、564、565、566、568、569、574、577、583、584、585、586、593 和 594。

[0030] 优选多肽为表 2、表 3 和表 5 列出的多肽,尤其是表 3 列出的多肽。

[0031] 本发明还提供包含实施例中公开的氨基酸序列的片段的多肽。所述片段包含该序列中至少 n 个连续氨基酸,针对特定序列, n 为 7 或更大 (如 8、10、12、14、16、18、20、22、

24、26、28、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100 或更大)。所述片段可包含该序列的至少一个 T 细胞表位,或优选地, B 细胞表位。T 细胞表位和 B 细胞表位可凭经验鉴定(如采用 PEPSCAN[14、15] 或类似方法)或预测(如采用 Jameson-Wolf 抗原性指数[16]、矩阵基方法[17]、TEPITOPE[18]、神经网络[19]、OptiMer & EpiMer[20、21]、ADEPT[22]、Tsites[23]、亲水性[24]、抗原性指数[25] 或参考文献 26 公开的方法等)。其它优选片段为(a) 本发明多肽的 N 端信号肽、(b) 不具有 N 端信号肽的本发明多肽、(c) 不具有其 N 端氨基酸残基的本发明多肽。

[0032] 其它优选的片段为以可能的起始密码子(ATG、GTG、TTG) 编码的氨基酸开始的那些片段。从所示起始密码子下游的起始密码子编码的甲硫氨酸处开始的片段为本发明多肽。

[0033] 其它优选的片段为那些与本发明多肽以及与由参考文献 5、6、8、10 和 11 中的任一篇鉴定的多肽相同的片段。

[0034] 本发明多肽可以许多方式制备,如化学合成(全部或部分)、用蛋白酶消化较长多肽、对 RNA 进行翻译、从细胞培养物(如重组表达的细胞培养物)或生物体本身(如经过细菌培养或直接来自患者的生物体)进行纯化等。制备长度 < 40 个氨基酸的多肽的优选方法包括体外化学合成[27、28]。尤其优选固相的肽合成,如基于 tBoc 或 Fmoc[29] 化学的方法。也可部分或全部采用酶合成[30]。作为对化学合成的替代方法,还可采用生物合成,例如可以通过翻译来制备多肽。这可在体外或体内进行。生物学方法通常限于制备 L 氨基酸多肽,然而操控翻译机器(如氨酰基 tRNA 分子)可用于引入 D 氨基酸(或其它非天然氨基酸,如碘化酪氨酸或甲基苯丙氨酸、叠氮高丙氨酸等)[31]。然而,含有 D 氨基酸时,优选采用化学合成方法。可在 C 末端和 / 或 N 末端对本发明多肽进行共价修饰。

[0035] 本发明多肽可采取各种形式(如天然、融合、糖基化、非糖基化、脂质化、非脂质化、磷酸化、非磷酸化、十四烷基化、非十四烷基化、单体、多聚体、颗粒、变性等)。

[0036] 优选提供纯化或基本纯化形式,即基本上不含其它多肽(如不含天然产生的多肽),尤其是不含其它 ExPEC 或宿主细胞多肽的本发明多肽,通常至少约 50% 纯(重量),通常至少约 90% 纯,即其它表达多肽占该组合物的约 50% 以下,更优选约 10% 以下(如 5% 或更少)。本发明的多肽优选为 ExPEC 多肽。

[0037] 本发明多肽可连接于固相载体。本发明多肽可包含检测标记(如放射性或荧光标记或生物素标记)。

[0038] 术语“多肽”指任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可以是直链或支链,它可包含修饰氨基酸,并且可被非氨基酸所中断。所述术语还涵盖经天然修饰或介入(intervention) 修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其它操控或修饰,如与标记组分偶联。该定义还包括(例如)含有一个或多个氨基酸类似物(包括(如)非天然氨基酸等)以及其它本领域公知修饰的多肽。多肽可以单链或结合链的形式存在。本发明多肽可以是天然或人工糖基化的多肽(即所述多肽的糖基化模式与在相应的天然产生多肽中发现的糖基化模式不同)。

[0039] 本发明多肽的长度可以是至少 40 个氨基酸(如至少 40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、350、400、450、500 或更多)。本发明多肽可短于 500 个氨基酸(如不超过 40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、

260、280、300、350、400 或 450 个氨基酸)。

[0040] 本发明提供的多肽包含序列 $-X-Y-$ 或 $-Y-X-$ ，其中 $-X-$ 为上述定义的氨基酸序列， $-Y-$ 并非上述定义的序列，即本发明提供融合蛋白。当多肽编码序列的 N 末端密码子并非 ATG 时，所述密码子将会按照该密码子的标准氨基酸进行翻译而不是翻译成 Met，这种情况发生在该密码子翻译成起始密码子时。

[0041] 本发明提供一种制备本发明多肽的方法，包括在诱导多肽表达的条件下培养本发明的宿主细胞的步骤。

[0042] 本发明提供一种制备本发明多肽的方法，其中所述多肽部分或完全用化学方法合成。

[0043] 本发明提供一种含有两种或多种本发明多肽的组合物。

[0044] 本发明还提供一种以通式 $NH_2-A-[-X-L-]_n-B-COOH$ 表示的杂交多肽，其中 X 为上述定义的本发明多肽，L 为任选的接头氨基酸序列，A 为任选的 N 末端氨基酸序列，B 为任选的 C 末端氨基酸序列，n 为大于 1 的整数。n 值在 2 和 x 之间，x 值一般为 3、4、5、6、7、8、9 或 10。优选地，n 为 2、3 或 4；更优选地为 2 或 3；最优选地，n = 2。在每种 n 的例子中， $-X-$ 可以相同或不同。在 $[-X-L-]$ 的每种 n 的例子中，接头氨基酸序列 $-L-$ 可有或无。例如，当 n = 2 时，该杂交体可以是 $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$ 、 $NH_2-X_1-X_2-COOH$ 、 $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$ 、 $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$ 等。接头氨基酸序列 $-L-$ 一般为短序列（如 20 个或更少氨基酸，即 19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）。例子包括有助于克隆的短肽序列、聚甘氨酸接头（即 Gly_n ，其中 n = 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更大）、和组氨酸标签（即 His_n ，其中 n = 3、4、5、6、7、8、9、10 或更大）。其它合适的接头氨基酸序列对本领域技术人员而言是显而易见的。 $-A-$ 和 $-B-$ 为任选序列，一般为短序列（如 40 个或更少氨基酸，即 39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）。例子包括指导多肽运输的前导序列，或有助于克隆或纯化的短肽序列（如组氨酸标签，即 His_n ，其中 n = 3、4、5、6、7、8、9、10 或更大）。其它合适的 N 末端和 C 末端氨基酸序列对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0045] 可采用各种试验来评估本发明多肽的体内免疫原性。例如，多肽可重组表达并通过免疫印迹法用来筛选患者血清。多肽和患者血清之间发生阳性反应说明患者以前对所研究蛋白产生了免疫应答，即该蛋白为免疫原。这种方法还可用来鉴定优势免疫蛋白。

[0046] 抗体

[0047] 本发明提供与本发明多肽结合的抗体。它们可以是多克隆或单克隆抗体，并可由任何合适方法制备（如通过重组表达）。为了增加其与人免疫系统的相容性，所述抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体 [如，参考文献 32 和 33]，或可采用完全人抗。所述抗体可以包含检测标记（如用于诊断试验）。本发明抗体可以连接于固相载体。本发明抗体优选为中和抗体。

[0048] 单克隆抗体对鉴定和纯化与之结合的单多肽尤其有用。本发明的单克隆抗体也可以用作免疫测定、放射性免疫试验 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等的试剂。在这些应用中，可用分析检测试剂如放射性同位素、荧光分子或酶标记抗体。以上述方法制备的单克隆抗体还可用于本发明多肽的分子鉴定或表征（表位作图）。

[0049] 本发明抗体优选对大肠杆菌的 ExPEC 菌株具有特异性，即，相对于其它细菌（如，

相对于非 ExPEC 大肠杆菌和相对于非大肠杆菌细菌), 它们优选地与 ExPEC 大肠杆菌结合。更优选地, 所述抗体对 UPEC 菌株具有特异性, 即, 相对于其它细菌, 包括其它 ExPEC 大肠杆菌, 它们优选地与 UPEC 细菌结合。

[0050] 本发明抗体优选地以纯化或基本纯化形式提供。一般地, 抗体存在于基本上不含其它多肽的组合物中, 如组合物中其它多肽少于 90% (重量), 通常少于 60%, 更通常少于 50%。

[0051] 本发明抗体可以是任何同种型 (如 IgA、IgG、IgM, 即 α 、 γ 或 μ 重链), 然而通常为 IgG。在 IgG 同种型中, 抗体可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 亚类。本发明抗体可具有 κ 或 λ 轻链。

[0052] 本发明抗体可具有各种形式, 包括完整抗体, 抗体片段如 $F(ab')_2$ 和 $F(ab)$ 片段、Fv 片段 (非共价异二聚体)、单链抗体 (如单链 Fv 分子 (scFv))、小抗体、寡抗体 (oligobody) 等。术语“抗体”不暗指任何特定来源, 并包括由非常规方法 (如噬菌体呈现) 所获得的抗体。

[0053] 本发明提供一种检测本发明多肽的方法, 包括如下步骤: (a) 在适于形成抗体-抗原复合物的条件下将生物样品与本发明抗体接触; 和 (b) 检测所述复合物。

[0054] 本发明提供一种检测本发明抗体的方法, 包括如下步骤: (a) 在适于形成抗体-抗原复合物的条件下将生物样品 (如血液或血清样品) 与本发明多肽接触; 和 (b) 检测所述复合物。

[0055] 优选抗体与本发明多肽结合的亲和力明显大于本领域公知抗体。优选地, 该亲和力至少比本领域公知抗体强 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍等。

[0056] 核酸

[0057] 本发明还提供包含编码本发明多肽的核苷酸序列的核酸。本发明还提供包含与所述核苷酸序列有序列相同性的核苷酸序列的核酸。序列之间的相同性优选上述 Smith-Waterman 同源检索算法确定。

[0058] 本发明还提供可与这些核酸杂交的核酸。杂交反应可以在不同“严格”条件下进行。本领域众所周知并公开了提高杂交严格性的条件 [如参考文献 34 第 7.52 页]。相关条件的例子包括 (以严格性递增的顺序): 培育温度: 25°C 、 37°C 、 50°C 、 55°C 和 68°C ; 缓冲液浓度: $10\times\text{SSC}$ 、 $6\times\text{SSC}$ 、 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\times\text{SSC}$ (其中 SSC 为 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸盐的缓冲液) 及采用其它缓冲体系的等效物; 甲酰胺浓度: 0%、25%、50% 和 75%; 培育时间从 5 分钟到 24 小时; 1 次、2 次或更多次洗涤步骤; 1 分钟、2 分钟或 15 分钟的洗涤培育时间; 洗涤溶液: $6\times\text{SSC}$ 、 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\times\text{SSC}$ 或去离子水。杂交技术及其优化为本领域公知 [如见参考文献 34-37 等]。

[0059] 一些实施方式中, 本发明核酸在低严格条件下与靶点杂交; 在其它实施方式中它在中等严格条件下杂交; 优选实施方式中, 它在高度严格条件下杂交。低严格杂交条件的示例性参数组为 50°C 和 $10\times\text{SSC}$ 。中等严格杂交条件的示例性参数组为 55°C 和 $1\times\text{SSC}$ 。高度严格杂交条件的示例性参数组为 68°C 和 $0.1\times\text{SSC}$ 。

[0060] 还提供了包含这些序列片段的核酸。它们应该包含序列中的至少 n 个连续核苷酸, 根据特定序列, n 为 10 或更多 (如 12、14、15、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200 或更多)。优选的片段为与本发明核酸序列和参考文献 5、6、8、10 和 11 中任

一篇所鉴定的核苷酸序列相同的那些片段。

[0061] 本发明提供通式 5' -X-Y-Z-3' 的核酸,其中:-X- 为由 x 个核苷酸组成的核苷酸序列;-Z- 为 z 个核苷酸组成的核苷酸序列;-Y- 为由以下片段组成的核苷酸序列:(a) 编码 SEQ ID NO:1-596 之一的核酸序列的片段;或(b) 编码 SEQ ID NO:597-599 之一的核苷酸序列的片段;或(c) (a) 或(b) 的互补物;所述核酸 5' -X-Y-Z-3' 不是(i) 编码 SEQ ID NO:1-596 之一或编码 SEQ ID NO:597-599 之一的核酸序列的片段,也不是(ii) (i) 的互补物。-X- 和 / 或 -Z- 部可包含启动子序列(或其互补序列)。

[0062] 本发明包括包含与这些序列互补的序列的核酸(如作为反义链或探针,或用作引物)。

[0063] 本发明核酸可用于杂交反应(如 Northern 杂交或 Southern 印迹、或用于核酸微阵列或‘基因芯片’)、扩增反应(如 PCR、SDA、SSSR、LCR、TMA、NASBA 等)和其它核苷酸技术。

[0064] 本发明核酸可具有各种形式(如单链、双链、载体、引物、探针、标记等)。本发明核酸可以是环状或支链,然而通常为直链。除非另有限定或要求,采用核酸的本发明任何实施方式均可采用双链形式和组成该双链形式的两条互补的单链形式。引物和探针通常为单链,反义核苷酸通常也是单链。

[0065] 优选以纯化或基本纯化的形式,即基本上不含其它核酸(如不含天然产生的核酸)、尤其不含其它 ExPEC 或宿主细胞核酸的形式提供本发明核酸,通常为至少约 50% 纯(重量),通常至少约 90% 纯。本发明核酸优选地为 ExPEC 核酸。

[0066] 本发明核酸可以多种方式制备,如完全或部分采用化学合成(如 DNA 的亚磷酸胺合成),用核酸酶消化较长核酸(如限制性酶),连接基因组或 cDNA 文库中的较短核酸或核苷酸(如采用连接酶或聚合酶)等。

[0067] 本发明核酸可以连接于固相载体(如珠子、平板、滤纸、膜、玻片、微阵列载体、树脂等)。可用(如)放射性标记或荧光标记、或生物素标记标记本发明核酸。当该核酸用于检测技术,如该核酸是引物或探针时,标记特别有用。

[0068] 术语“核酸”通常包括任何长度的核苷酸的聚合形式,其包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和 / 或其类似物。它包括 DNA、RNA、DNA/RNA 杂交体。它还包括 DNA 或 RNA 类似物,如含有修饰主链(如肽核酸(PNA)或硫代磷酸酯)或修饰碱基的类似物。因此本发明包括 mRNA、tRNA、rRNA、核酶、DNA、cDNA、重组核酸、支链核酸、质粒、载体、探针、引物等。当本发明的核酸采用 RNA 形式时,它可能或可能不带有 5' 帽。

[0069] 本发明核酸包含序列,然而它们还可以包含非 ExPEC 序列(如上述通式 5' -X-Y-Z-3' 的核酸)。这对探针而言尤其适用,从而可使探针包含与靶核酸互补的第一序列和与靶核酸互补的第二序列。引物中的任何此类非互补序列优选位于互补序列的 5'。典型的非互补序列包含限制性位点或启动子序列。

[0070] 本发明的核酸可用许多方法制备,如化学合成(至少一部分),用核酸酶(如限制性酶)消化较长核酸,连接基因组或 cDNA 文库中的较短核酸(如采用连接酶或聚合酶)等。

[0071] 本发明核酸可以是载体的一部分,即设计用于转导 / 转染一种或多种细胞类型的核酸构建物的一部分。载体可以是,例如,设计用来分离、增殖和复制插入核苷酸的“克隆载体”,设计用来在宿主细胞中表达核苷酸序列的“表达载体”,设计用来生产重组病毒或病毒

样颗粒的“病毒载体”，或包括超过一种类型的载体的属性的“穿梭载体”。优选的载体为质粒。“宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物，其可以作为或已经作为外源核酸的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代，并且由于天然、偶然或有意的突变和 / 或改变，所述后代不一定与原始亲代细胞完全相同（形态方面或总 DNA 互补物 (complement) 方面）。宿主细胞包括用本发明核酸在体内或体外转染或感染的细胞。

[0072] 当核酸为 DNA 时，应理解，RNA 序列中的“U”会被 DNA 中的“T”取代。相似地，当核酸为 RNA 时，应理解，DNA 序列中的“T”会被 RNA 中的“U”取代。

[0073] 当术语“互补物”或“互补”用于核酸时，指 Watson-Crick 碱基配对。因此 C 的互补物为 G，G 的互补物为 C，A 的互补物为 T（或 U），T（或 U）的互补物为 A。还可能使用如 I（嘌呤肌苷）这样的碱基，与嘧啶（C 或 T）互补。所述术语还暗示了方向，即 5' -ACAGT-3' 的互补物为 5' -ACTGT-3' 而不是 5' -TGTC A-3'。

[0074] 本发明核酸可用于，如：制备多肽；作为在生物样品中检测核酸的杂交探针；产生核酸的额外拷贝；产生核酶或反义寡核苷酸；作为单链 DNA 引物或探针；或作为三链形式寡核苷酸。

[0075] 本发明提供一种制备本发明核酸的方法，其中所述核酸为部分或全部采用化学方法合成的。

[0076] 本发明提供包含本发明核苷酸序列的载体（如，克隆或表达载体）和转染有所述载体的宿主细胞。

[0077] 本发明还提供包含用于扩增 ExPEC 核酸序列内所含模板序列的引物（如 PCR 引物）的试剂盒，所述试剂盒包括第一引物和第二引物，其中所述第一引物与所述模板序列基本互补，所述第二引物与所述模板序列的互补物基本互补，其中基本互补的所述引物部分确定了待扩增模板序列的末端。所述第一引物和 / 或第二引物可包括可检测标记（如荧光标记）。

[0078] 本发明还提供一种试剂盒，其包括第一和第二单链寡核苷酸，其可以扩增单链或双链核酸（或其混合物）内所含的 ExPEC 模板核酸序列，其中：(a) 所述第一寡核苷酸包含与所述模板核酸序列基本互补的引物序列；(b) 所述第二寡核苷酸包含与所述模板核酸序列的互补物基本互补的引物序列；(c) 所述第一寡核苷酸和 / 或所述第二寡核苷酸包含不与所述模板核酸互补的序列；和 (d) 所述引物序列确定了待扩增模板序列的末端。所述特征 (c) 的非互补序列优选位于所述引物序列的上游（即其 5' 方向）。(c) 序列中一种或两种可包含限制性位点 [如参考文献 38] 或启动子序列 [如 39]。第一寡核苷酸和 / 或第二寡核苷酸可包括可检测标记（如荧光标记）。

[0079] 本发明提供检测本发明核酸的方法，包括如下步骤：(a) 在杂交条件下将生物样品与本发明核酸探针接触以形成双链体；和 (b) 检测所述双链体。

[0080] 本发明提供检测生物样品（如血液）的方法，包括如下步骤：在杂交条件下将生物样品与本发明核酸接触。所述方法可以包括核酸扩增（如，PCR、SDA、SSSR、LCR、TMA、NASBA 等）或杂交（如微阵列、印迹、在溶液中与探针杂交等）。已经报道过用 PCR 检测临床样品中的 ExPEC [如，见参考文献 40]。在参考文献 41 中总体描述了基于核酸的临床试验。

[0081] 本发明提供一种制备靶序列片段的方法，其中通过延伸核酸引物制备所述片段。所述靶序列和 / 或引物为本发明的核酸。所述引物延伸反应可包括核酸扩增（如，PCR、SDA、

SSSR、LCR、TMA、NASBA 等)。

[0082] 本发明的核酸扩增可以是定量和 / 或实时扩增。

[0083] 就本发明的某些实施方式而言,核酸长度优选为至少 7 个核苷酸(如 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300 个核苷酸或更长)。

[0084] 就本发明的某些实施方式而言,核酸长度优选为至多 500 个核苷酸(如 450、400、350、300、250、200、150、140、130、120、110、100、90、80、75、70、65、60、55、50、45、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15 个核苷酸或更短)。

[0085] 本发明的引物和探针,以及其它用于杂交的核酸的长度优选为 10-30 个核苷酸(如 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸)。

[0086] 小泡

[0087] 参考文献 42 描述了通过敲除 mltA(胞壁质溶解性糖基转移酶)或大肠杆菌 Tol-Pal 复合物的一种或多种组分(如 tolA、tolQ、tolB、pal 和 / 或 tolR)从尿路病原性(UPEC)菌株中制备小泡的方法。可以对细菌染色体进行一个或多个遗传改变或插入附加型元件(如表达载体)来增加小泡表面保护性抗原的量和 / 或免疫可及性,从而改进小泡。

[0088] 获得此类改进的一种方法是上调本发明多肽的表达。本领域熟知增加靶蛋白表达的多种不同遗传方案,它们可能分成两大类:一类依赖对染色体的修饰(如用较强的启动子替换野生型启动子、使天然抑制基因失活等)以增加内源性基因的表达,另一类则基于附加型元件(如高拷贝数质粒、携带工程改造的靶基因的载体等)或染色体中整合外源性基因进行的重组表达。这些方法的实施例可以在参考文献 44-50 中找到。

[0089] 提高小泡免疫原性和选择性的另一种方法是下调免疫优势非保护性抗原的表达或下调与共生菌株中找到的蛋白同源的蛋白。可以通过对 LPS 的脂质 A 部分进行脱毒而获得进一步改进。先前描述了相似的改变,以从其它革兰阴性病原体中产生改进小泡(参见参考文献 51 和 52)。

[0090] 所有上述方案均可单独使用或联用以获得用于免疫原性组合物的改进小泡。本发明提供一种敲除了 mltA 和 / 或其 Tol-Pal 复合物的组分和下组中一种或多种的病原性大肠杆菌(尤其是 UPEC):(i) 在一种与编码本发明多肽的基因天然相连的启动子相比使本发明多肽表达水平升高的启动子的控制下编码本发明多肽的染色体基因;(ii) 编码本发明多肽的自主复制的染色体外元件;和 / 或 (iii) 相对于野生型 LPS 减弱大肠杆菌 LPS 的脂质 A 部分毒性的遗传修饰。

[0091] 本发明还提供可通过培育此类细菌获得的小泡,例如在细菌培养时,释放入培养基中的小泡。

[0092] 药物组合物

[0093] 本发明提供的组合物含有:(a) 本发明的多肽、抗体、小泡和 / 或核酸;和 (b) 药学上可接受的载体。这些组合物可能适合用作免疫原性组合物,例如,或者用作诊断试剂,或者用作疫苗。本发明的疫苗可以是预防性疫苗或治疗性疫苗,但一般是预防性疫苗。

[0094] 在一个具体方面,本发明提供包含表达或过表达一种或多种本发明多肽的一种或多种外膜泡(OMV)的免疫原性组合物。在一个具体实施方式中,本发明提供包含表达或过表达一种或多种多肽的一种或多种OMV的免疫原性组合物,所述多肽包含:(a)选自SEQ ID NO:22、120、219、221、305、371、400、489、555、565、597、598或599的氨基酸序列;(b)与氨基酸序列(a)的序列相同性至少为80%的氨基酸序列;(c)作为来自氨基酸序列(a)的至少10个连续氨基酸的片段的氨基酸序列;或(d)与氨基酸序列(a)的序列相同性至少为80%并包含氨基酸序列(a)中至少10个连续氨基酸的片段的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述免疫原性组合物包含含有片段的多肽,所述片段含有选自下组的氨基酸序列的至少一个B细胞表位:SEQ ID NO 22、120、219、221、305、371、400、489、555、565、597、598和599。

[0095] ‘药学上可接受的载体’包括自身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体一般为大的、代谢缓慢的大分子如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖、海藻糖、乳糖和脂质聚集体(如油滴或脂质体)。此类载体对本领域技术人员为公知技术。所述疫苗还可包含稀释剂,如水、盐水、甘油等。此外,可存在助剂,如湿润剂或乳化剂、pH缓冲物质等。无菌无热原的磷酸盐缓冲生理盐水是典型的载体。对药学上可接受赋形剂的详细讨论参见参考文献296。

[0096] 本发明的组合物可包含抗微生物剂、尤其是以多剂量形式包装时。

[0097] 本发明的组合物可包含去污剂,如吐温(聚山梨醇酯),例如吐温80。去污剂的含量通常很低,如<0.01%。

[0098] 本发明的组合物可包含钠盐(如氯化钠)以提供涨度(tonicity)。NaCl浓度一般为 $10\pm 2\text{mg/ml}$ 。

[0099] 本发明的组合物通常包含缓冲液。一般为磷酸盐缓冲液。

[0100] 本发明的组合物,尤其是当其将被冻干或当它们包含由冻干材料重建获得的物质时,可包含(如)约15–50mg/ml(如25mg/ml)的糖醇(如甘露醇)或二糖(如蔗糖或海藻糖)。在冻干前可将用于冻干的组合物的pH调整为约6.1。

[0101] 本发明的多肽可与其它免疫调节剂一起给药。具体说,组合物通常包含疫苗佐剂。所述佐剂可选自TH1佐剂和TH2佐剂中的一种或多种,下面进行进一步论述。可用于本发明组合物的佐剂包括,但不限于:

[0102] A. 含矿物质的组合物

[0103] 适合用作本发明佐剂的含矿物质的组合物包括无机盐、如铝盐和钙盐。本发明包括无机盐,如氢氧化物(例如羟基氧化物)、磷酸盐(例如羟基磷酸盐、正磷酸盐)、硫酸盐等[例如参见参考文献53的第8和9章]或不同无机化合物的混合物(如磷酸盐和氢氧化物佐剂的混合物,任选地磷酸盐过量),该化合物采用任何合适的形式(例如凝胶、晶体、无定形等),优选吸附于盐。含矿物质的组合物制成金属盐颗粒[54]。

[0104] 典型的磷酸铝佐剂为无定形羟基磷酸铝,其 PO_4/Al 摩尔比为0.84–0.92,包括约 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。可以采用低剂量磷酸铝进行吸附,如每剂量每个偶联物采用50–100 $\mu\text{g Al}^{3+}$ 。当采用磷酸铝并且不希望使抗原吸附于佐剂时,宜在溶液中包含游离磷酸根离子(如通过采用磷酸盐缓冲液)。

[0105] 磷酸铝的零电荷点(PZC)与磷酸基团取代羟基的程度负相关,所述取代程度可能

取决于用于以沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也可通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度（更多磷酸离子=更偏酸性的 PZC）或通过添加缓冲液如组氨酸缓冲液（使得 PZC 更偏碱性）来改变 PZC。本发明采用的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0-7.0, 更优选 5.0-6.5, 如约 5.7。

[0106] 用于制备本发明组合物的铝盐悬液可以包含缓冲液（如磷酸盐缓冲液或组氨酸缓冲液或 Tris 缓冲液），但并非必须包含。所述悬液优选为无菌且无热原的。悬液可以含有游离水相磷酸根离子如其浓度是 1.0-20mM, 优选 5-15mM, 更优选约 10mM 的磷酸根离子。所述悬液还可包含氯化钠。

[0107] 本发明可采用氢氧化铝和磷酸铝的混合物。此时磷酸铝比氢氧化铝多，如重量比为至少 2 : 1, 如 $\geq 5 : 1$ 、 $\geq 6 : 1$ 、 $\geq 7 : 1$ 、 $\geq 8 : 1$ 、 $\geq 9 : 1$ 等。

[0108] 本发明疫苗中可含有铝盐，使 Al^{3+} 的剂量为每剂量 0.2-1.0mg。

[0109] B. 油乳剂

[0110] 适合用作本发明佐剂的油乳剂组合物包括鲨烯-水乳剂，如 MF59（采用微流化机将 5% 鲨烯、0.5% 吐温 80 和 0.5% Span 85 制成亚微米颗粒）[参考文献 53 的第 10 章；还参见参考文献 55-57, 参考文献 58 的第 12 章]。MF59 用作 FLUAD™ 流感病毒三价亚基疫苗的佐剂。所述乳剂宜包含柠檬酸根离子，如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0111] 用于该组合物中的尤其优选佐剂为亚微米水包油乳剂。本发明采用的优选的亚微米水包油乳剂为鲨烯/水乳剂，任选地包含不同量的 MTP-PE，如含有 4-5%（重量/体积）鲨烯、0.25-1.0%（重量/体积）吐温 80（聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯）、和/或 0.25-1.0% 的 Span85（山梨聚糖三油酸酯）以及任选的 N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (MTP-PE) 的亚微米水包油乳剂。参考文献 55 和 59-60 中详细描述了用于组合物的亚微米水包油乳剂、其制备方法和免疫刺激剂如胞壁酰肽。

[0112] 可以采用鲨烯、生育酚和吐温 80 的乳剂。所述乳剂可包含磷酸盐缓冲盐水。还可包含 Span85（如 1%）和/或卵磷脂。这些乳剂可含有 2-10% 的鲨烯、2-10% 的生育酚和 0.3-3% 的吐温 80，并且鲨烯：生育酚的重量比优选 ≤ 1 ，以提供更稳定的乳剂。此类乳剂中的一种可以通过以下方法制备：将吐温 80 溶于 PBS 以获得 2% 溶液，然后将 90ml 所述溶液与 5g DL- α -生育酚和 5ml 鲨烯的混合物混合，然后微流化所述混合物。得到的乳剂可含有（如）平均直径为 100-250nm, 优选约 180nm 的亚微米油滴。

[0113] 可以采用鲨烯、生育酚和 Triton 去污剂（如 Triton X-100）的乳剂。

[0114] 可以采用鲨烯、聚山梨醇 80 和泊洛沙姆 401（“Pluronic™ L121”）的乳剂。可用磷酸盐缓冲盐水，pH7.4 配制所述乳剂。所述乳剂可用作胞壁酰二肽的递送载体，并与苏氨酸-MDP 一起用于“SAF-1”佐剂 [61]（0.05-1% Thr-MDP、5% 鲨烯、2.5% 普朗尼克 (Pluronic) L121 和 0.2% 聚山梨醇 80）。它还可以在没有苏氨酸-MDP 的情况下用作“AF”佐剂 [62]（5% 鲨烯、1.25% 普朗尼克 (Pluronic) L121 和 0.2% 聚山梨醇 80）。优选进行微流化。

[0115] 还可将完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA) 用作本发明佐剂。

[0116] C. 皂苷制剂 [参考文献 53 第 22 章]

[0117] 皂苷制剂也可用作本发明的佐剂。皂苷为甾醇糖苷和三萜糖苷的异种组，其发现

于广泛的植物种类的树皮、叶、茎、根甚至花中。分离自皂树 (*Quillaia Saponaria*, Molina) 树皮的皂苷作为佐剂已广泛研究。在商业上,皂苷还可获自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜)、满天星 (*Gypsophilla paniculata*) (婚纱花) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) (皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21 和脂质制剂如 ISCOM。

[0118] 皂苷组合物采用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化。已鉴定出采用这些技术特别纯化的部分,包括:QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。优选地,皂苷为 QS21。制备 QS21 的一种方法示于参考文献 63。皂苷制剂还可包含甾醇,如胆固醇 [64]。

[0119] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒 [参考文献 53 第 23 章]。ISCOM 通常也包含磷脂,如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知皂苷均可用于 ISCOM。优选地,ISCOM 包含一种或多种 Quila、QHA 和 QHC。ISCOM 在参考文献 64-66 中进一步描述。任选地,ISCOM 不含另外的去污剂 [67]。

[0120] 有关皂苷基佐剂的进展的综述可见参考文献 68 和 69。

[0121] D. 病毒体或病毒样颗粒

[0122] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 也可用作本发明的佐剂。这些结构通常包含一种或多种来自病毒的蛋白,所述病毒任选结合磷脂或用磷脂配制。它们通常为不致病、不复制且通常不含有任何天然病毒基因组。所述病毒蛋白可由重组方法制备或从完整病毒中分离。这些适用于病毒体或 VLP 的病毒蛋白包括由如下病毒衍生的蛋白:流感病毒 (如 HA 或 NA)、乙肝病毒 (如核心蛋白或衣壳蛋白)、戊肝病毒、麻疹病毒、辛德比斯病毒 (Sindbis)、轮状病毒、口蹄疫病毒、反转录病毒、诺沃克病毒 (Norwalk)、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA 噬菌体、Q β 噬菌体 (如外被蛋白)、GA 噬菌体、fr 噬菌体、AP205 噬菌体、和 Ty (如反转录转座子 Ty 蛋白 p1)。VLP 在参考文献 70-75 中进一步讨论。病毒体在参考文献 76 中进一步讨论。

[0123] E. 细菌或微生物衍生物

[0124] 适用于本发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物,如肠细菌脂多糖 (LPS) 的非毒性衍生物、脂质 A 衍生物、免疫刺激性寡核苷酸和 ADP 核糖基化毒素及其脱毒衍生物。

[0125] LPS 的非毒性衍生物包括单磷酸脂质 A (MPL) 和 3-O-脱酰化 MPL (3dMPL)。3dMPL 为带有 4、5 或 6 条酰化链的 3 脱 -O-酰化单磷酸脂质 A 的混合物。优选的“小颗粒”形式的 3 脱 -O-酰化单磷酸脂质 A 在参考文献 77 中公开。此类 3dMPL “小颗粒”足够小,能通过 0.22 μ m 膜进行无菌过滤 [77]。其它非毒性 LPS 衍生物包括单磷酸脂质 A 模拟物,如氨基葡萄糖苷磷酸衍生物,如 RC529 [78、79]。

[0126] 脂质 A 衍生物包括大肠杆菌来源的脂质 A 的衍生物,如 OM174。OM174 在参考文献 80 和 81 中进行了描述。

[0127] 适合作为本发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含有 CpG 基序 (含有通过磷酸键与鸟嘌呤连接的未甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列) 的核苷酸序列。含有回文或聚 (dG) 序列的双链 RNA 和寡核苷酸也显现出免疫刺激性。

[0128] CpG 可包括核苷酸修饰 / 类似物,如硫代磷酸修饰并可为双链或单链。参考文献 82、83 和 84 公开了可能的类似物取代,如用 2' -脱氧 -7-脱氮鸟苷代替鸟苷。CpG 寡核苷酸的佐剂效果在参考文献 85-90 中进一步讨论。

[0129] CpG 序列可指向 TLR9,如基序 GTCGTT 或 TTCGTT [91]。CpG 序列可特异性诱导 Th1 免疫应答,如 CpG-A ODN,或可更特异性地诱导 B 细胞应答,如 CpG-BODN。CpG-A 和 CpG-B

ODN 在参考文献 92-94 中讨论。优选的 CpG 为 CpG-A ODN。

[0130] 优选地,构建 CpG 寡核苷酸使 5' 端能进行受体识别。可选地,两种 CpG 寡核苷酸以其 3' 端相连以形成“免疫聚体 (immunomers)”。参见例如,参考文献 91 和 95-97。

[0131] 其它免疫刺激性寡核苷酸包括双链 RNA、或含有回文序列的寡核苷酸、或含有聚 (dG) 序列的寡核苷酸。

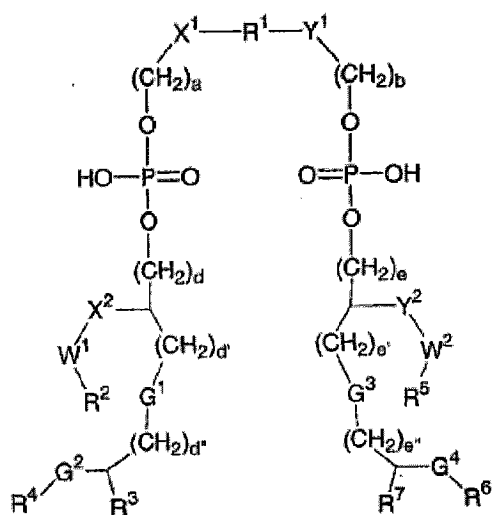
[0132] 细菌 ADP- 核糖基化毒素及其脱毒衍生物可用作本发明的佐剂。优选地,蛋白获自大肠杆菌 (大肠杆菌热不稳定肠毒素“LT”)、霍乱 (“CT”) 或百日咳 (“PT”)。采用脱毒 ADP- 核糖基化毒素作为粘膜佐剂在参考文献 98 中描述,作为肠道外佐剂在参考文献 99 中描述。毒素或类毒素优选为包含 A 和 B 亚基的全毒素形式。优选地, A 亚基包含脱毒突变 ;B 亚基优选不突变。优选地,佐剂为脱毒 LT 突变体,如 LT-K63、LT-R72 和 LT-G192。采用 ADP- 核糖基化毒素及其脱毒衍生物,尤其是 LT-K63 和 LT-R72 作为佐剂可参见参考文献 100-107。氨基酸取代的参比数字优选根据参考文献 108 中所列的 ADP- 核糖基化毒素的 A 和 B 亚基的比对得到。

[0133] 式 I、II 或 III 化合物或其盐也可以用作佐剂 :

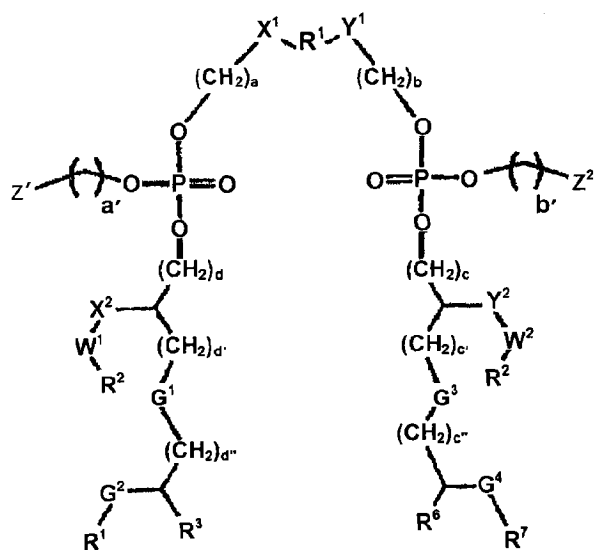
[0134]

I

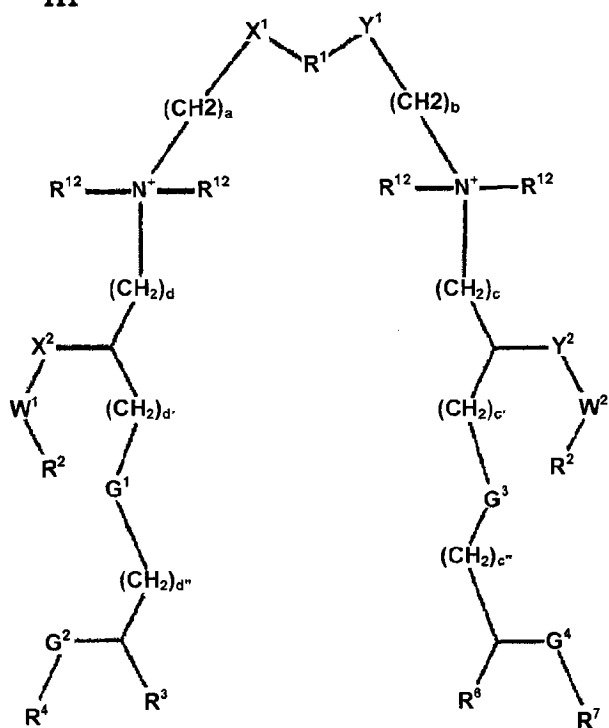
[0135]



II

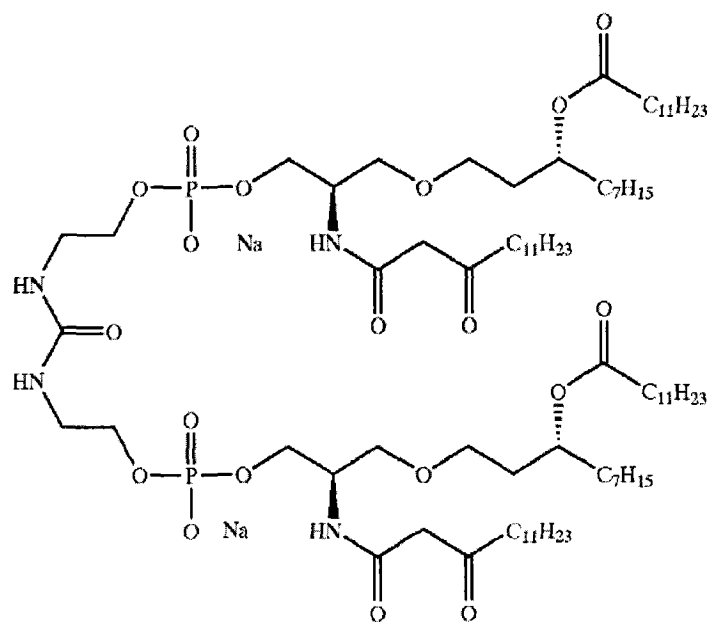


III

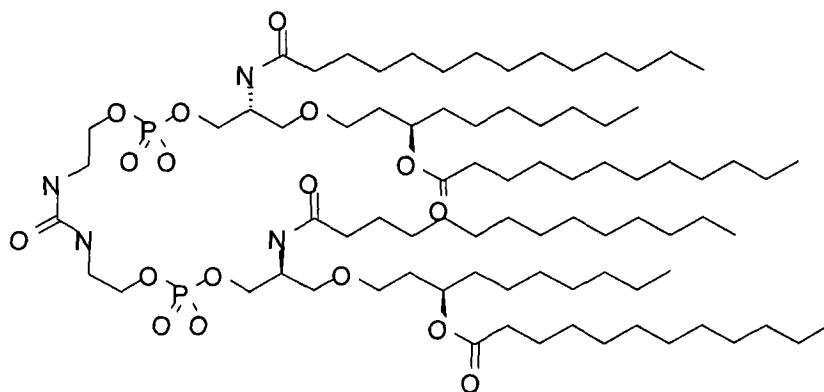


[0136] 如参考文献 109 所述, 如 ‘ER803058’、‘ER803732’、‘ER804053’、‘ER804058’、‘ER804059’、‘ER804442’、‘ER804680’、‘ER804764’、‘ER803022’ 或 ‘ER804057’ 例如:

[0137]



ER804057



ER-803022:

[0138] F. 人免疫调制剂

[0139] 适合用作本发明佐剂的人免疫调制剂包括细胞因子如白介素（如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 [110] 等）[111]、干扰素（如干扰素 γ ）、巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子和巨噬细胞炎性蛋白 -1α (MIP-1 α) 和 MIP-1 β [112]。

[0140] G. 生物粘合剂和粘膜粘合剂

[0141] 生物粘合剂和粘膜粘合剂也可用作本发明的佐剂。合适的生物粘合剂包括酯化透明质酸微球体 [113] 或粘膜粘合剂如聚（丙烯酸）、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。壳聚糖及其衍生物也可用作本发明的佐剂 [114]。

[0142] H. 微粒

[0143] 微粒也可用作本发明的佐剂。优选为可生物降解及无毒性物质（如聚（ α 羟酸）、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己酸内酯等）材料形成的颗粒（即直径在 $\sim 100\text{nm}$ - $\sim 150\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒，更优选直径在 $\sim 200\text{nm}$ - $\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ ，最优选直径在 $\sim 500\text{nm}$ - $\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ ），优选具有丙交酯乙交酯共聚物，任选处理以具有带负电表面（如用 SDS 处理）或带正电表面（例如用阳离子去污剂如 CTAB 处理）。

[0144] I. 脂质体（参考文献 53 第 13 和 14 章）

[0145] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子如参考文献 115-117 中所述。

[0146] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0147] 适用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯 [118]。此类制剂进一步包括结合有辛苯昔醇的聚氧乙烯山梨聚糖酯表面活性剂 [119] 和结合有至少一种其它非离子表面活性剂如辛苯昔醇的聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂 [120]。优选的聚氧乙烯醚选自：聚氧乙烯-9-月桂基醚 (laureth 9)、聚氧乙烯-9-硬脂醚、聚氧乙烯-8-硬脂醚、聚氧乙烯-4-月桂基醚、聚氧乙烯-35-月桂基醚和聚氧乙烯-23-月桂基醚。

[0148] K. 磷腈如 PCPP

[0149] 磷腈佐剂包括参考文献 121 和 122 中所述的聚[二(羧基苯氧基)磷腈] (poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene], “PCPP”)。

[0150] L. 胞壁酰肽

[0151] 适合用作本发明佐剂的胞壁酰肽的例子包括 N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酸酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺 (去甲 MDP) 和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺 (MTP-PE)。

[0152] M. 咪唑并喹啉 (imidazoquinolone) 化合物

[0153] 咪唑并喹啉佐剂包括咪唑莫特 (“R-837”) [123、124]、雷西莫特 (“R-848”) [125] 及其类似物；和它们的盐 (如盐酸盐)。关于免疫刺激性咪唑并喹啉的进一步细节可以在参考文献 126-130 中找到。

[0154] N. 硫代缩氨基脲化合物

[0155] 硫代缩氨基脲化合物的例子以及适合用作本发明佐剂的化合物的配制方法、制备方法和筛选方法包括如参考文献 131 所述的内容。所述硫代缩氨基脲对刺激人外周血单核细胞产生细胞因子 (如 TNF- α) 特别有效。

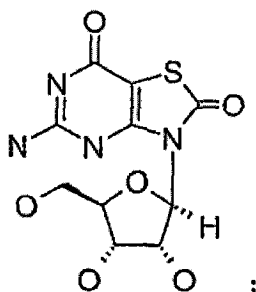
[0156] O. 色胺酮化合物

[0157] 色胺酮化合物的例子以及适合用作本发明佐剂的化合物的配制方法、制备方法和筛选方法包括如参考文献 132 所述的内容。所述色胺酮化合物对刺激人外周血单核细胞产生细胞因子 (如 TNF- α) 特别有效。

[0158] P. 核苷类似物

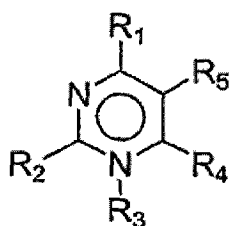
[0159] 各种核苷类似物可用作佐剂, 如 (a) Isatorabine (ANA-245 ; 7-硫杂-8-氧代鸟苷) 及其前药:

[0160]



[0161] (b) ANA975 ; (c) ANA-025-1 ; (d) ANA380 ; (e) 如参考文献 133-135 公开的化合物 ; (f) 具有下式的化合物 :

[0162]



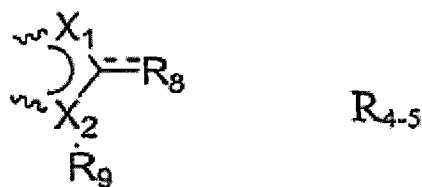
[0163] 式中：

[0164] R₁ 和 R₂ 各自独立地是 H、卤素、-NR_aR_b、-OH、C₁₋₆ 烷氧基、取代 C₁₋₆ 烷氧基、杂环基、取代杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、取代 C₆₋₁₀ 芳基、C₁₋₆ 烷基或取代 C₁₋₆ 烷基；

[0165] R₃ 不存在，或者是 H、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、C₆₋₁₀ 芳基、取代 C₆₋₁₀ 芳基、杂环基或取代杂环基；

[0166] R₄ 和 R₅ 各自独立地是 H、卤素、杂环基、取代杂环基、-C(O)-R_d、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、或结合在一起形成如 R₄₋₅ 所示的 5 元环：

[0167]



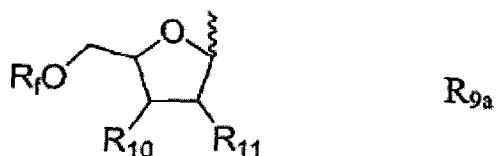
[0168] 在 ~~~~ 表示的化学键处实现结合

[0169] X₁ 和 X₂ 各自独立地是 N、C、O 或 S；

[0170] R₈ 为 H、卤素、-OH、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、-OH、-NR_aR_b、-(CH₂)_n-O-R_c、-O-(C₁₋₆ 烷基)、-S(O)_pR_e 或 -C(O)-R_d；

[0171] R₉ 为 H、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、杂环基、取代杂环基或 R_{9a}，其中 R_{9a} 为：

[0172]



[0173] 在 ~~~~ 表示的化学键处实现结合

[0174] R₁₀ 和 R₁₁ 各自独立地是 H、卤素、C₁₋₆ 烷氧基、取代 C₁₋₆ 烷氧基、-NR_aR_b 或 -OH；

[0175] R_a 和 R_b 各自独立地是 H、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、-C(O)R_d、C₆₋₁₀ 芳基；

[0176] R_c 各自独立地是 H、磷酸、二磷酸、三磷酸、C₁₋₆ 烷基或取代 C₁₋₆ 烷基；

[0177] R_d 各自独立地是 H、卤素、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、取代 C₁₋₆ 烷氧基、-NH₂、-NH(C₁₋₆ 烷基)、-NH(取代 C₁₋₆ 烷基)、-N(C₁₋₆ 烷基)₂、-N(取代 C₁₋₆ 烷基)₂、C₆₋₁₀ 芳基或杂环基；

[0178] R_e 各自独立地是 H、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、C₆₋₁₀ 芳基、取代 C₆₋₁₀ 芳基、杂环基或取代杂环基；

[0179] R_f 各自独立地是 H、C₁₋₆ 烷基、取代 C₁₋₆ 烷基、-C(O)R_d、磷酸、二磷酸或三磷酸；

[0180] n 各自独立地是 0、1、2 或 3；

[0181] p 各自独立地是 0、1 或 2；或

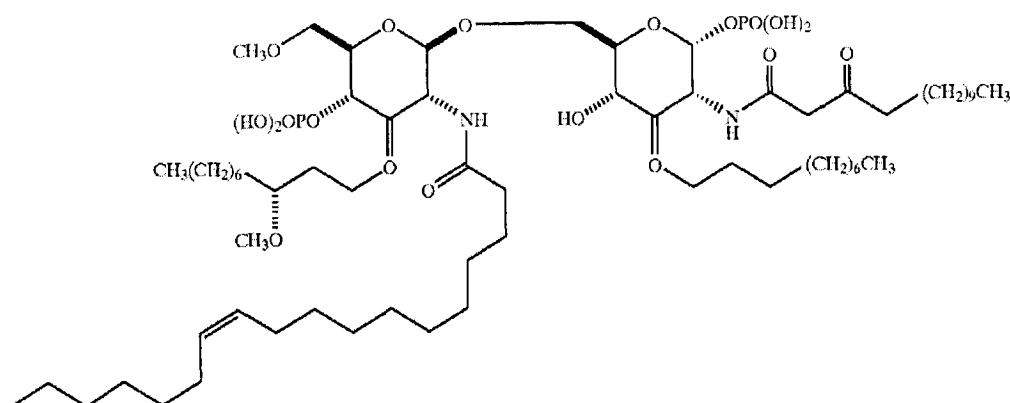
[0182] 或 (g) (a)-(f) 中任一项的药学上可接受的盐、(a)-(b) 中任一项的互变异构体、

或所述互变异构体的药学上可接受的盐。

[0183] Q. 连到含磷酸无环主链上的脂质

[0184] 包含连接于含磷酸无环主链的脂质的佐剂包括 TLR4 拮抗剂 E5564[136、137]：

[0185]



[0186] R. 小分子免疫增强剂 (SMIP)

[0187] SMIP 包括：

[0188] • N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0189] • N2, N2- 二甲基 -1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0190] • N2- 乙基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0191] • N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0192] • 1-(2- 甲基丙基) -N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0193] • N2- 丁基 -1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0194] • N2- 丁基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0195] • N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -N2- 戊基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0196] • N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -N2- 丙 -2- 烯基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0197] • 1-(2- 甲基丙基) -2-[(苯基甲基) 硫] -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺；

[0198] • 1-(2- 甲基丙基) -2-(丙硫基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺；

[0199] • 2-[[4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基) 1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2 基] (甲基) 氨基] 乙醇；

[0200] • 乙酸 2-[[4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基) 1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2 基] (甲基) 氨基] 乙酯；

[0201] • 4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基) -1,3- 二氢 -2H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2- 酮；

[0202] • N2- 丁基 -1-(2- 甲基丙基) -N4, N4- 双 (苯基甲基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0203] • N2- 丁基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -N4, N4- 双 (苯基甲基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0204] • N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基) -N4, N4- 双 (苯基甲基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0205] • N2, N2- 二甲基 -1-(2- 甲基丙基) -N4, N4- 双 (苯基甲基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0206] • 1-{4-氨基-2-[甲基(丙基)氨基]-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1基}-2-甲基丙-2醇;

[0207] • 1-[4-氨基-2-(丙基氨基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1基]-2-甲基丙-2醇;

[0208] • N4,N4-二苄基-1-(2-甲氧基-2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺。

[0209] S. 蛋白体

[0210] 一种佐剂为由第一革兰阴性菌制备的外膜蛋白蛋白体制备物和由第二革兰阴性菌制备的脂糖类(liposaccharide)制备物的组合,其中所述外膜蛋白蛋白体和脂糖类制备物形成稳定的非共价佐剂复合物。此类复合物包括“IVX-908”,它是由脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)外膜和脂多糖组成的复合物。它们已被用作流感疫苗的佐剂[138]。

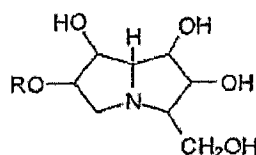
[0211] T. 其它佐剂

[0212] 作为免疫刺激剂的其它物质公开于参考文献 53 和 58。有用的佐剂物质还包括:

[0213] • 甲基肌苷 5' 单磷酸 (“MIMP”)[139]。

[0214] • 一种多羟基化的吡咯烷士定化合物 [140], 如下式化合物:

[0215]



[0216] 式中 R 选自:氢,直链或支链的、未取代或取代的、饱和或不饱和的酰基、烷基(如环烷基)、烯基、炔基或芳基、或者其药学上可接受的盐或衍生物。例子包括,但不限于:木麻黄素(casuarine)、木麻黄素-6- α -D-吡喃葡萄糖、3-表-木麻黄素、7-表-木麻黄素、3,7-二表-木麻黄素等。

[0217] • γ 菊糖 [141] 或其衍生物,如 algammulin。

[0218] • 参考文献 142 中公开的化合物。

[0219] • 参考文献 143 中公开的化合物,包括:酰基哌嗪化合物、吡啶二酮化合物、四氢异喹啉(tetrahydroisoquinoline, THIQ) 化合物、苯并环二酮化合物、氨基氮杂乙烯基化合物、氨基苯并咪唑喹啉酮(ABIQ) 化合物 [144、145]、氢化邻苯二甲酰胺(hydraphtalamide) 化合物、二苯甲酮化合物、异噁唑化合物、甾醇化合物、喹啉酮化合物、吡咯化合物 [146]、蒽醌化合物、喹噁啉化合物、三嗪化合物、吡唑并嘧啶(Pyrazalopyrimidine) 化合物和吡啶化合物 [147]。

[0220] • 罗唑利宾(7-烯丙基-8-氧代鸟苷)[148]。

[0221] • 阳离子脂类和(通常为中性的)共脂如氨基丙基-二甲基-肉豆蔻酰氧基-溴化丙铵-二植烷酰基磷脂酰基-乙醇胺 (“VaxfectinTM”) 或氨基丙基-二甲基-双-十二烷氧基-溴化丙铵-二油酰基磷脂酰基-乙醇胺 (“GAP-DLRIE:DOPE”) 的制剂。优选含有(±)-N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(顺式-9-四癸烯氧基)-1-丙铵盐的制剂。

[0222] 本发明还包含上述一种或多种佐剂的组合。例如,以下组合物可用作本发明佐剂组合物:(1) 皂苷和水包油乳剂 [150];(2) 皂苷(如 QS21)+ 非毒性 LPS 衍生物(如 3dMPL) [151];(3) 皂苷(如 QS21)+ 无毒性 LPS 衍生物(如 3dMPL)+ 胆固醇;(4) 皂苷

(如 QS21)+3dMPL+IL-12(可选地+甾醇)[152];(5)3dMPL 与 QS21 和/或水包油乳剂的组合[153];(6)SAF,含有 10%角鲨烷、0.4%吐温 80TM、5%普朗尼克嵌段聚合物 L121 和 thr-MDP,经微流化形成亚微米乳剂或经涡旋形成较大粒度的乳剂。(7)RibiTM佐剂体系(RAS)(Ribi 免疫化学),其含有 2%角鲨烯、0.2%吐温 80TM和选自下组的一种或多种细菌细胞壁组分:单磷酸基脂质 A(MPL)、二霉菌酸海藻糖酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS),优选为 MPL+CWS(DetoxTM);(8)一种或多种无机盐(如铝盐)+无毒性 LPS 衍生物(如 3dMPL);和(9)一种或多种无机盐(如铝盐)+免疫刺激性寡核苷酸(如包含 CpG 基序的核苷酸序列)。

[0223] 本发明的组合物优选地引起细胞介导免疫应答和体液免疫应答以有效地应对尿路病原性感染。所述免疫应答优选地诱导出长效(如中和)抗体和细胞介导的免疫力从而在遇到 UPEC- 相关抗原时能够快速应答。

[0224] 通常认为两类 T 细胞 CD4 和 CD8 细胞是启动和/或增强细胞介导免疫和体液免疫必需的。CD8T 细胞能够表达 CD8 共受体,通常被称为细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)。CD8 细胞能够识别 MHC I 类分子呈现的抗原或与之相互作用。CD4 T 细胞可表达 CD4 共受体,通常被称为 T 辅助细胞,CD4 细胞能够识别与 MHC II 类分子结合的抗原性肽。通过与 MHC II 类分子相互作用,CD4 细胞可分泌诸如细胞因子这样的因子。这些分泌的细胞因子可激活 B 细胞、细胞毒性 T 细胞、巨噬细胞和参与免疫应答的其它细胞。辅助 T 细胞或 CD4⁺ 细胞可进一步分成两种功能不同的亚组:TH1 表型和 TH2 表型,其不同之处在于细胞因子和效应器功能。

[0225] 活化的 TH1 细胞增强细胞免疫(包括增加抗原特异性 CTL 的产量)并因此对细胞内感染的应答具有特殊价值。活化的 TH1 细胞可以分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- β 中的一种或多种。TH1 免疫应答可通过激活巨噬细胞、NK(自然杀伤)细胞和 CD8 细胞毒性 T 细胞(CTL)而导致局部炎性反应。TH1 免疫应答还可通过以 IL-12 来刺激 B 细胞和 T 细胞的生长,从而扩展免疫应答。经 TH1 刺激的 B 细胞可分泌 IgG2a。

[0226] 活化的 TH2 细胞增加抗体产生并因此对细胞外感染的应答具有特殊价值。活化的 TH2 细胞可分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 中的一种或多种。TH2 免疫应答会导致产生 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞,用于将来的防卫。

[0227] 增强的免疫应答可包括增强的 TH1 免疫应答和 TH2 免疫应答中的一种或多种。增强的 TH1 免疫应答可包括 CTL 增加,一种或多种 TH1 免疫应答相关性细胞因子(如 IL-2、IFN- γ 和 TNF- β)的增加、活化巨噬细胞的增加、NK 活性的增加或 IgG2a 产量的增加中的一种或多种反应。优选地,增强的 TH1 免疫应答包括 IgG2a 产量的增加。增强的 TH2 免疫应答可包括一种或多种 TH2 免疫应答相关性细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)的增加、或 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞的产量的增加中的一种或多种反应。优选地,增强的 TH2 免疫应答包括 IgG1 产量的增加。

[0228] 采用 TH1 佐剂会引起 TH1 免疫应答。TH1 佐剂通常引起 IgG2a 产量相对于无佐剂抗原免疫增加。适用于本发明的 TH1 佐剂可包括例如皂苷制剂、病毒体和病毒样颗粒、肠杆菌脂多糖(LPS)的无毒衍生物、免疫刺激性寡核苷酸。免疫刺激性寡核苷酸,如含有 CpG 基序的寡核苷酸,为优选的用于本发明的 TH1 佐剂。

[0229] 采用 TH2 佐剂会引起 TH2 免疫应答。TH2 佐剂通常引起 IgG1 产量相对于无佐剂抗原免疫增加。适用于本发明的 TH2 佐剂包括例如含矿物质的组合物、油乳剂和 ADP 核糖基

化毒素及其脱毒衍生物。含矿物质的组合物,如铝盐为优选的适用于本发明的 TH2 佐剂。

[0230] 优选地,本发明包括含有 TH1 佐剂和 TH2 佐剂的组合的组合物。优选地,此类组合物引起增强的 TH1 和增强的 TH2 应答,即相对于无佐剂免疫, IgG1 和 IgG2a 的产量均有增加。更优选地,包含 TH1 和 TH2 的组合的所述组合物相对于单佐剂免疫(即相对于单以 TH1 佐剂或单以 TH2 佐剂进行免疫)引起增强的 TH1 和 / 或增强的 TH2 免疫应答。

[0231] 所述免疫应答可以是 TH1 免疫应答和 TH2 免疫应答中的一种或两种。优选地,免疫应答为增强的 TH1 应答和增强的 TH2 应答中的一种或两种。

[0232] 所述增强的免疫应答可以是全身性和粘膜性免疫应答中的一种或两种。优选地,所述免疫应答为增强的全身性和增强的粘膜性免疫应答中的一种或两种。优选地,粘膜性免疫应答为 TH2 免疫应答。优选地,粘膜性免疫应答包括 IgA 产量的增加。

[0233] 尤其优选采用氢氧化铝或磷酸铝佐剂,抗原通常吸附于此类盐。磷酸钙为另一种优选佐剂。

[0234] 本发明的组合物的 pH 优选在 6-8 之间,优选地为大约 7。采用缓冲液维持 pH 的稳定。当组合物包含氢氧化铝盐时,优选采用组氨酸缓冲液 [154]。组合物可以是无菌和 / 或无热原的。本发明的组合物可与人体等渗。

[0235] 所述组合物可装在小瓶中,或者它们可装在预填充的注射器中。所述注射器可以带有或不带有针头。注射器包括单剂量的组合物,而小瓶可包括单剂量或多剂量。可注射组合物通常为液体溶液或悬液。或者,其可以固态形态存在(如冻干),在注射前用液态载体溶解或悬浮。

[0236] 本发明的组合物可以单位剂量形式或以多剂量形式包装。就多剂量形式而言,小瓶优于预填充注射器。可以常规方法得到有效剂量体积,但注射用组合物的人体剂量一般为 0.5ml。

[0237] 当本发明的组合物需要在临用前临时制备(如一组分以冻干形式存放)并以药盒形式存放时,所述药盒可包括两个小瓶,或者可包括一个预填充的注射器 and 一个小瓶,注射之前用注射器中的内容物将小瓶中的内容物再激活。

[0238] 因此本发明提供一种试剂盒,包括第一组分和第二组分,其中:所述第一组分包含一种或多种本发明的多肽、抗体、小泡和 / 或核酸;所述第二组分包含下组中的一种或多种:将组合物给予患者的说明书、注射器或其它递送装置、佐剂和 / 或药学上可接受的配制溶液。

[0239] 本发明还提供一种预填充有本发明的免疫原性组合物的递送装置(如注射器)。

[0240] 用作疫苗的免疫原性组合物包括免疫学有效量的抗原、和其它任何所需组分。‘免疫学有效量’指将所述量(以单剂量给药或作为连续剂量的一部分给药)给予个体能有效治疗或预防。所述量取决于待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗个体的分类组(如非人灵长类、灵长类等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需保护程度、疫苗的剂型、治疗医生对医学状况的评估和其它相关因素。预计所述量将落入可通过常规试验确定的相对宽的范围内,每个剂量中每种脑膜炎球菌糖抗原的含量一般为每抗原 1 μ g-10mg。

[0241] 药物应用

[0242] 本发明还提供一种治疗患者的方法,包括给予患者治疗有效量的本发明组合物。患者可能自身处于患该病的风险中或可能为孕妇(‘母体免疫’[155])。

[0243] 本发明提供用作药剂（如作为免疫原性组合物或作为疫苗）或用作诊断试剂的本发明的核酸、多肽、小泡或抗体。它还提供使用本发明的核酸、多肽、小泡或抗体来制造：(i) 治疗或预防由 ExPEC 细菌引起的疾病和 / 或感染的药剂；(ii) 检测针对 ExPEC 细菌的抗体是否存在的诊断试剂；和 / 或 (iii) 能产生针对 ExPEC 细菌的抗体的试剂。所述 ExPEC 细菌可以是任何血清型或菌株。优选地，所述 ExPEC 细菌为 UPEC 菌株。

[0244] 本发明可用于预防和 / 或治疗疾病如菌血症、脑膜炎、尿路感染、肾盂肾炎和 / 或膀胱炎等。本发明尤其适用于治疗尿路感染。

[0245] 所述患者优选为人。所述人优选为成人（年龄在 20-55 之间）。打算施用于儿童或青少年的疫苗也可给予成人，（例如）以评估其安全性、剂量、免疫原性等。优选女性患者，尤其优选年龄在 20-55 岁有性生活的女性。另一组患者为年龄在 12-20 岁之间的女性，具体用于预防。

[0246] 其它可能的动物患者包括犬，其可能为 ExPEC 携带者 [156、157]。

[0247] 一种检验治疗性治疗效果的方法包括在给予本发明组合物之后监控感染情况。一种检验预防治疗效果的方法包括在给药后监控针对给予的多肽的免疫应答情况。本发明的组合物的免疫原性可通过如下方法确定：将它们给予测试对象（如 12-16 个月大的儿童、或动物模型如小鼠模型），然后确定包括 ELISA 效价 (GMT) 在内的 IgG 的标准参数。通常在给予该组合物大约 4 周后测定这些免疫应答情况，并与给予组合物之前测定的值进行比较。当给予一个以上剂量的组合物时，可进行一次以上的给药后测定。可获得各种 UTI 小鼠模型 [如，参考文献 158 和 159-160]。

[0248] 给予多肽抗原为一种优选的诱导免疫的治疗方式。

[0249] 给予本发明的抗体为另一种优选的治疗方式。这种被动免疫方式尤其适用于新生儿或怀孕妇女。这一方法一般采用单克隆抗体，如人源化抗体或完整的人抗体。

[0250] 本发明的组合物通常直接给予患者。直接递送可通过如下方式实现：胃肠道外注射（如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或组织间隙）、直肠施用、口服（如片剂、喷雾剂）、阴道施用、局部施用、经皮施用、经皮肤施用、鼻内施用、舌下施用、眼部施用、耳部施用、肺部施用或其它粘膜施用。优选肌肉内施用到大腿或上臂。注射可通过针头（如皮下注射针头）实现，然而还可使用无针注射。典型的肌肉内剂量为 0.5ml。

[0251] 本发明可用于引起全身性和 / 或粘膜性免疫。优选地，所述全身性和 / 或粘膜性免疫表现为增强的 TH1 和 / 或 TH2 免疫应答。优选地，增强的免疫应答包括 IgG1 和 / 或 IgG2a 和 / 或 IgA 的产量增加。

[0252] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。多剂量可用于初次免疫方案和 / 或用于加强免疫方案。加强剂量方案可接在初次剂量方案之后。在多剂量方案中，可采用同样或不同的途径，如胃肠道外初次免疫和粘膜加强免疫、粘膜初次免疫和胃肠道外加强免疫等给予各种剂量。初次剂量之间的合适间隔（如 4-16 周）、以及初次和加强免疫之间的合适间隔可用常规方法确定。例如，疫苗接种的初次疗程包括 1-10 个单独剂量，之后以维持和 / 或加强免疫应答所必需的时间间隔给予其它剂量，例如，第二剂在 1-4 个月时给予，当需要时，几个月后给予后续剂量。

[0253] 细菌感染影响身体的各个部分，因此组合物可以制备成各种形式。例如，组合物可以制备为液体溶液或悬液形式的注射剂。还可制备适于在注射前溶解或悬浮于液体载体中

的固体形式（如冻干或喷雾冷冻干燥的组合物）。该组合物可制备成局部给药剂型，如软膏剂、乳膏剂或粉末剂。该组合物可制备成口服给药剂型，如片剂或胶囊、喷雾剂或糖浆（任选地进行调味）。所述组合物可制备成肺部给药剂型，如使用细粉或喷雾的吸入器。所述组合物可制备成栓剂或阴道栓剂。所述组合物可制备成鼻、耳或眼给药剂型，如喷雾剂、滴剂、凝胶或粉末 [如参考文献 161 和 162]。所述组合物可以为药盒形式，设计成临近给予患者前重建成混合的组合物。此类药盒可包括一种或多种液体形式的抗原和一种或多种冻干抗原。

[0254] 本发明的组合物可以在与其它疫苗基本上相同的时间（如在相同的医疗咨询或问诊期间）给予患者，如基本上与下述疫苗相同的时间：麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、风疹疫苗、MMR 疫苗、水痘疫苗、MMRV 疫苗、白喉疫苗、破伤风疫苗、百日咳疫苗、DTP 疫苗、偶联的 b 型流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*) 疫苗、人乳头瘤病毒疫苗、灭活脊髓灰质炎病毒疫苗、乙肝病毒疫苗、肺炎球菌偶联疫苗、脑膜炎球菌偶联疫苗等。类似地，它们可在与抗生素，尤其是对 UPEC 有活性的抗生素化合物基本上相同的时间（如在相同的医疗咨询或问诊期间）给予患者。

[0255] 本发明组合物的其它抗原组分

[0256] 本发明还提供一种包含本发明多肽和一种或多种下述其它抗原的组合物：

[0257] - 脑膜炎奈瑟球菌 (*N. meningitidis*) 血清组 A、C、W135 和 / 或 Y (优选所有四种) 的糖抗原，如在参考文献 163 中公开的血清组 C 的寡糖 [还参见参考文献 164] 或参考文献 165 中的寡糖。

[0258] - 脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的抗原，如参考文献 166-174 等公开的抗原。

[0259] - 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的糖抗原 [如 175、176、177]。

[0260] - 甲肝病毒抗原，如灭活病毒 [如 178、179]。

[0261] - 乙肝病毒抗原，如表面抗原和 / 或核心抗原 [如 179、180]。

[0262] - 丙肝病毒的抗原 [如 181]。

[0263] - HIV 抗原 [182]。

[0264] - 白喉抗原，如白喉类毒素 [如参考文献 183 第 3 章] 如 CRM₁₉₇ 突变体。

[0265] - 破伤风抗原，如破伤风类毒素 [如参考文献 183 第 4 章]。

[0266] - 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*) 的抗原，如百日咳博德特菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA)，任选地还与百日咳杆菌黏附素 (pertactin) 和 / 或凝集原 2 和 3 混合 [如参考文献 185 和 186]。

[0267] - 流感嗜血杆菌 B (*Haemophilus influenzae* B) 的糖抗原 [如 164]。

[0268] - 骨髓灰质炎抗原 [如 187、188] 如 IPV。

[0269] - 麻疹、腮腺炎和 / 或风疹抗原 [如参考文献 183 第 9、10 和 11 章]。

[0270] - 水痘抗原。

[0271] - 流感抗原 [如参考文献 183 第 19 章]，如血凝素和 / 或神经氨酸酶表面蛋白。流感抗原可衍生自大规模流行性（每年）流感毒株。流感抗原可衍生自有可能引起大规模爆发的毒株（即与目前循环毒株的血凝素相比具有新的血凝素的流感毒株，或者对家禽具有病原性并且有可能横向传播给人群的流感毒株，或对人具有病原性的流感毒株）。流感抗原可衍生自在鸡蛋或细胞培养物中生长出来的病毒。

- [0272] - 卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 的抗原 [如 189]。
- [0273] - 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 型链球菌) 的糖抗原。
- [0274] - 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 型链球菌) 的蛋白抗原 [如 190-195]。
- [0275] - 淋病奈瑟球菌 (*N. gonorrhoeae*) 的抗原 [如 196-199]。
- [0276] - 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 的抗原 [如参考文献 200-206] 或来自肺炎衣原体的抗原的组合 [如 207]。
- [0277] - 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 的抗原, 或来自沙眼衣原体的抗原的组合 [如 208]。
- [0278] - 牙龈炎卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的抗原 [如 209]。
- [0279] - 狂犬病抗原 [如 210], 如冻干的灭活病毒 [如 211, RabAvert™]。
- [0280] - 副粘病毒如呼吸道合胞病毒 (RSV[212、213]) 和 / 或副流感病毒 (PIV3[214]) 的抗原。
- [0281] - 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 抗原 [如 215、216、217]。
- [0282] - 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 型链球菌) 的抗原 [如 191、218、219]。
- [0283] - 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的抗原 [如 220]。
- [0284] - 黄病毒属病毒的抗原, 如黄热病病毒、日本脑炎病毒、登格热病毒的四种血清型、蜱传播性脑炎病毒、西尼罗河病毒的抗原。
- [0285] - 痘病毒抗原, 如经典猪热病病毒、牛病毒性腹泻病毒和 / 或边界病病毒的抗原。
- [0286] - 细小病毒, 如细小病毒 B19 的抗原。
- [0287] - 人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原 [221]。
- [0288] 本组合物可包含一种或多种这些其它抗原。
- [0289] 在另一个实施方式中, 将本发明抗原与适用于经设计能保护女性不得泌尿系统和 / 或性传播疾病的疫苗中的一种或多种其它非大肠杆菌抗原混合。例如, 所述抗原可与衍生自下组的抗原混合: 无乳链球菌、沙眼衣原体、淋病奈瑟球菌、乳头瘤病毒和单纯疱疹病毒。使用人乳头状瘤病毒抗原时, 它们可能来自 HPV16、HPV18、HPV6 和 / 或 HPV11 中的一种或多种。
- [0290] 优选的淋球菌抗原包括 ngs13 (OmpA)、OmpH、ngs576 (肽基脯氨酰顺 / 反异构酶 (PPI 酶) 蛋白)、ngs41 和 ngs117 中的一种或多种。
- [0291] 优选的 HPV 抗原包括 HPV16、HPV18、HPV6 和 HPV11 中的一种或多种。
- [0292] 优选的沙眼衣原体抗原包括下组的一种或多种: CT045、CT089、CT242、CT316、CT381、CT396、CT398、CT444、CT467、CT547、CT587、CT823、CT761 和这些抗原的特定组合, 其公开于 W005/002619。
- [0293] 优选的肺炎衣原体抗原包括下组的一种或多种: CPn0324、CPn0301、CPn0482、CPn0503、CPn0525、CPn0558、CPn0584、CPn0800、CPn0979、CPn0498、CPn0300、CPn0042、CPn0013、CPn0450、CPn0661、CPn0557、CPn0904、CPn0795、CPn0186 和 CPn0604 以及这些抗原的特定组合, 其公开于 W005/084306。
- [0294] 优选的 GBS 抗原包括 GBS80、GBS104、GBS59、GBS67、GBS322 和 GBS276 中的一种或

多种。

[0295] 在另一个实施方式中,本发明的抗原组合与适用于经设计能保护老年人或免疫削弱个体的疫苗中的一种或多种其它非大肠杆菌抗原混合。例如,所述抗原组合可与衍生自下组的抗原混合:粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、流感病毒和副流感病毒 (‘PIV’)。

[0296] 在需要时可对毒性蛋白抗原进行脱毒(如通过化学和/或遗传方法对百日咳毒素进行脱毒 [186])。

[0297] 该组合物中含有白喉抗原时,优选还包含破伤风抗原和百日咳抗原。类似地,在包含破伤风抗原的情况下,优选还包含白喉抗原和百日咳抗原。类似地,在包含百日咳抗原的情况下,优选还包含白喉抗原和破伤风抗原。因此优选 DTP 组合物。

[0298] 糖抗原优选为偶联物形式。偶联物的载体蛋白包括细菌毒素(例如白喉类毒素或破伤风类毒素)、脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [222]、合成肽 [223、224]、热激蛋白 [225、226]、百日咳蛋白 [227、228]、来自流感嗜血杆菌的蛋白 D [229、230]、细胞因子 [231]、淋巴因子 [231]、流感嗜血杆菌蛋白、激素 [231]、生长因子 [231]、来自艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或毒素 B [232]、摄铁蛋白 [233]、含有各种病原体衍生抗原的多个人 CD4+T 细胞表位的人工蛋白 [234] 例如 N19 蛋白 [235]、肺炎球菌表面蛋白 PspA [236]、肺炎球菌溶血素 [237] 等。优选的载体蛋白为 CRM197 蛋白 [238]。

[0299] 该组合物中各抗原的浓度一般为至少 1 μ g/ml。总体而言,任何给定抗原的浓度都足以引起针对该抗原的免疫应答。

[0300] 优选地,抗原吸附于铝盐。

[0301] 核酸免疫

[0302] 上述免疫原性组合物包括来自 UPEC 的多肽抗原。作为将蛋白抗原用于本发明免疫原性组合物的替代方法,可以采用编码该抗原的核酸(优选为 DNA,如质粒形式),以提供基于核酸免疫的组合物、方法和用途。目前核酸免疫已经是一个成熟的领域(如,参考文献 239-246 等),已应用于许多疫苗。

[0303] 编码免疫原的核酸在被递送到患者体内后进行体内表达,表达的免疫原进而刺激免疫系统。活性成分通常采用包含以下组件的核酸载体形式:(i) 启动子;(ii) 编码免疫原的序列,其操作性连接于所述启动子;和任选的 (iii) 选择性标记。优选的载体还可包含 (iv) 复制起点;和 (v) 位于 (ii) 下游并与之操作性连接的转录终止子。通常,(i) 和 (v) 为真核来源,而 (iii) 和 (iv) 为原核来源。

[0304] 优选的启动子为病毒启动子,如巨细胞病毒 (CMV) 的启动子。除了启动子外,该载体还可包括转录调控序列(如增强子),其在功能上与启动子相互作用。优选的载体包括立即早期 CMV 增强子/启动子,更优选的载体还包括 CMV 内含子 A。启动子操作性连接于编码免疫原的下游序列,从而对免疫原编码序列的表达进行控制。

[0305] 使用标记时,其优选在微生物宿主中(如在原核生物中、在细菌中、在酵母中)起作用。所述标记优选为原核选择性标记(如在原核启动子的控制下转录)。方便起见,标记

一般为抗生素抗性基因。

[0306] 本发明的载体优选为自主复制附加型载体或自主复制染色体外载体,如质粒。

[0307] 本发明的载体优选包含复制起点。优选地,所述复制起点在原核生物中有活性而在真核生物中无活性。

[0308] 因此,优选的载体包括用于选择该载体的原核标记、原核性复制起点,还包括用于驱动免疫原编码序列转录的真核启动子。因此所述载体 (a) 在原核宿主中扩增并选择而不表达多肽,但 (b) 在真核宿主中表达而不扩增。这种安排对核酸免疫载体很理想。

[0309] 本发明的载体可包含位于编码序列下游的真核转录终止子序列。这将提高转录水平。当编码序列自身不具有聚腺苷酸化序列时,本发明的载体优选具有该序列。优选的聚腺苷酸化序列来自牛生长激素。

[0310] 本发明的载体可包含多克隆位点。

[0311] 除了编码免疫原和标记的序列外,该载体可包含第二真核编码序列。所述载体在所述第二序列的上游还可包含 IRES,以便从与免疫原相同的转录物翻译出第二真核多肽。或者,所述免疫原编码序列可以在 IRES 下游。

[0312] 本发明的载体可包含未甲基化 CpG 基序,如未甲基化 DNA 序列,它们的共同之处在于胞嘧啶后接鸟苷、侧接两个 5' 嘌呤和两个 3' 嘧啶。这些 DNA 基序的非甲基化形式被证明为几种类型的免疫细胞的有效刺激物。

[0313] 可以靶向方式递送载体。受体介导的 DNA 治疗技术描述于(如)参考文献 247-252 中。在基因治疗方法中,以约 100ng-200mg 的 DNA 量给予含有核酸的治疗组合物,以进行局部给药。在基因治疗方法中, DNA 浓度范围还可以是约 500ng-50mg、约 1 μ g-2mg、约 5 μ g-500 μ g 和约 20 μ g-100 μ g。各种因素如作用方式(如提高或抑制编码基因产物的水平)以及转化和表达效力均被认为会影响达到最终效力所需的剂量。当需要在较大组织面积上表达得更多时,为了达到阳性治疗结果,可能需要施用更大量的载体、或通过连续给药方式再次施用同样量载体、或多次施用于邻近或附近组织部位。所有这些情况中,临床试验中的常规试验可以确定达到最优疗效所需的特定范围。

[0314] 可通过基因递送载体进行递送载体。所述基因递送载体可以是病毒或非病毒来源(大致参见参考文献 253-256)。

[0315] 用于递送所需核酸并在所需细胞中的表达的病毒载体为本领域公知。示例性病毒载体包括但不限于:重组逆转录病毒(如参考文献 257-267)、 α 病毒载体(如辛德比斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67;ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(ATCC VR-373;ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923;ATCCVR-1250;ATCC VR-1249;ATCC VR-532);还可采用这些病毒的杂交体或嵌合体)、痘病毒载体(如牛痘病毒、禽痘病毒、金丝雀痘病毒、修饰的安卡拉牛痘病毒等)、腺病毒载体、和腺伴随病毒(AAV)载体(如见参考文献 268-273)。还可采用与杀死的腺病毒相连的 DNA 进行给药[267]。

[0316] 还可采用非病毒递送载体和方法,包括但不限于,单独与杀死的腺病毒连接或不连接的聚阳离子凝聚 DNA[如 274]、配体连接的 DNA[275]、真核细胞递送载体细胞[如,参考文献 276-280]和核电荷(nucleic charge)中和或与细胞膜发生融合。还可使用裸露 DNA。示例性裸露 DNA 引入方式描述于参考文献 281 和 282 中。可作为基因递送载体的脂质体(如免疫脂质体)描述于参考文献 283-287 中。其它方式描述于参考文献 288 和 289

中。

[0317] 适用于本发明的其它非病毒递送包括机械递送系统,如描述于参考文献 289 中的方式。而且,所述编码序列及其表达产物可通过光聚合水凝胶物质的沉积或采用电离辐射进行递送[如参考文献 290 和 291]。可用于递送编码序列的其它基因递送常规方法包括,例如,采用手持式基因转移颗粒枪[292]或采用电离辐射以激活转移基因[290 和 293]。

[0318] 采用 PLG(丙交酯-乙交酯共聚物)微粒递送 DNA 为尤其优选的方法,如,通过将 DNA 吸附到经任选处理以具有负电荷表面(如用 SDS 处理)或正电荷表面(如用阳离子去污剂如 CATB)的微粒上。

[0319] 概述

[0320] 所述术语“包含”涵盖“包括”及“由...组成”,如“包含”X 的组合物可仅由 X 组成或可包括其它附加物,如 X+Y。

[0321] 涉及数值 x 的术语“约”指(例如) $x \pm 10\%$ 。

[0322] 所述术语“基本上”并不排除“完全地”,如“基本上不含”Y 的组合物可以是完全不含 Y。在需要时,术语“基本上”可从本发明的定义中省略。

[0323] 序列列表中的氨基酸序列的 N 端残基为由对应核苷酸序列的第一个密码子编码的氨基酸。当第一密码子不是 ATG 时,应该理解为当密码子为起始密码子时应该翻译成甲硫氨酸,而当该序列位于融合伙伴的 C 端时应该翻译为所示的非甲硫氨酸氨基酸。本发明特别公开并涵盖序列列表中每一种以 N 端甲硫氨酸残基(如甲酰-甲硫氨酸残基)代替任何所示非甲硫氨酸残基的氨基酸序列。它还特别公开并涵盖序列列表中每一种从序列内部的任何甲硫氨酸残基开始的氨基酸序列。

[0324] 如上所述,本发明的核酸和多肽可包括如下序列:

[0325] (a) 与序列列表中公开的序列相同(即 100%相同)的序列;

[0326] (b) 与序列列表中公开的序列有序列相同性的序列;

[0327] (c) 与序列(a)或(b)相比,具有分离或连续的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个核苷酸或氨基酸改变(缺失、插入、取代)的序列;和

[0328] (d) 当采用逐对比对算法与序列列表的特定序列进行比对时,x 个单体(氨基酸或核苷酸)的移动窗口从起点(N 端或 5')移到终点(3' C 端),从而对延长至 p 个单体($p > x$)的比对而言,有 $p-x+1$ 个此类窗口,每个窗口有至少 x. y 个相同的比对单体,其中:x 选自 20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、200;y 选自 0.50、0.60、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99;并且当 x. y 不是整数时四舍五入为整数。优选的逐对比对算法为 Needleman-Wunsch 全局比对算法[294],采用默认参数(如开口开放罚分 = 10.0,开口延伸罚分 = 0.5,采用 EBLOSUM62 评分矩阵)的。用 EMBOSS 软件包中的 Needle 工具很方便地实施该算法[295]。

[0329] 本发明的核酸和多肽还可能在序列(a)-(d)的 N 端/5' 和 / 或 C 端/3' 处连有其它序列。

[0330] 除非另有说明,本发明的实施将采用本领域技术人员能够实施的常规的化学方法、生物化学方法、分子生物学方法、免疫学方法和药理学方法。此类技术已在参考文献中得到充分阐述。见,如,参考文献 296-303 等。

[0331] 实验

[0332] 下面是实施本发明的具体实施方式的例子。所述例子仅为说明性使用,而不以任何方式限制本发明的范围。

[0333] 我们努力保证所用数值(如量、温度等)的精确性,然而还是应该允许一些实验性误差和偏差。

[0334] 实施本发明的方式

[0335] 采用基于计算机的比较和预测工具鉴定 596 种多肽,其为 (a) 在至少两种 UPEC 菌株中常见但在非病原性菌株中未找到的多肽,和 (b) 表面相关或膜相关性多肽。所述 596 种多肽列于表 1,其氨基酸序列是序列表中的 SEQ ID NO:1-596。表 1 给出所述 596 种序列的 'gi' (基因信息标示符) 登录号 [11],该信息可用来检索如下信息:(a) 多肽的全序列数据库记录和 (b) 大肠杆菌基因组中对应的编码序列。例如,能够以 '26111674' 在 NCBI entrez 系统 [304] 中进行查询,得到一条记录 [305],可点击该记录中的 'CDS' 链接,以获得相应的编码序列 [306]。

[0336] 由于本发明的多肽序列已经能够从公共数据库中获得,也可获得其标注的功能。在当前注释中,所述 596 种多肽中有些还没有公认的功能(如在数据库中它们被标注为 '模拟蛋白')。尽管本发明人并未阐明这些多肽的基本生物学功能,但现在本发明确实为这些多肽提供了可靠的应用,即提供了本文所述的免疫原性组合物。

[0337] 表 4 报道了 SEQ ID NO:1-596 与菌株 MG 1655 [307]、W3110 和 DH10B 的非病原性 K12 序列的最接近匹配。

[0338] 表 5 显示在两种不同的 UPEC 基因组间具有最强匹配的 414 种多肽(总共 596 种),其中带有下划线的 SEQ ID NO 为 100% 保守序列。剩下的 182 种多肽为在 UPEC 菌株之间保守性较低的多肽,因此,优选表 5 中的多肽(尤其优选带有下划线的多肽)。

[0339] 这 596 种序列中,优选 156 种(表 2)。表 6 显示这 156 种序列的各种信息。

[0340] 由于其在非病原性菌株中不存在、表面相关、在至少两种 UPEC 菌株中存在、以及从未被鉴定为抗原,选出了 66 种更优选的抗原(表 3)。选择其中的 19 种进行初步试验(表 3 中以 '+' 标记)。

[0341] 克隆、表达并纯化所述多肽。所述纯化抗原用于免疫小鼠,通过 Western 印迹、ELISA 和 FACS 分析其血清,并用体外和体内试验进行进一步检测。合适的体外试验包括检测抗体诱导补体介导的细菌杀伤的能力和 / 或调理吞噬作用的活性、阻断 ExPEC 菌株(或纯化抗原)与人上皮细胞(如膀胱细胞)或其它细胞系结合的能力、和 / 或抑制大肠杆菌(如 K1 菌株)粘附 / 侵入脑微血管内皮细胞(BMEC)的能力。合适的体内试验包括在 UTI 小鼠模型(成年小鼠)中进行主动和 / 或被动的全身性免疫和刺激、用大肠杆菌 K1 菌株刺激的 5 日龄大鼠中通过主动或被动免疫保护其不患菌血症和脑膜炎、和用 ExPEC 菌株免疫和腹膜内感染成年小鼠。

[0342] 所述蛋白对细菌生活周期的重要性通过建立等基因敲除突变体来进行检验。所述突变体还可用于确保抗原产生的血清对该抗原的特异性。采用微阵列研究表达模式。通过对来自多种不同 ExPEC 菌株的序列进行测序来评估保守和变异。

[0343] 进行试验以选出预测的表面暴露蛋白,其对 UPEC 菌株具有特异性并在非病原性菌株(共生菌株和试验菌株)中不存在。一旦选中,即表达并纯化这些蛋白,并用于免疫小鼠。

[0344] 从参考文献 43 中可知,大肠杆菌任一 *tol-pa1* 基因的突变都会导致含有天然外膜蛋白的小泡的形成。通过比较 UPEC 菌株和非病原性菌株的小泡中存在的蛋白,可能选出一小组可用作潜在抗原的蛋白。

[0345] 共生和病原性大肠杆菌中的 λ 红介导的基因操作

[0346] 本方法为基于 PCR 的快速方法,用于使野生型大肠杆菌菌株中的 *tolR* 基因失活 [308]。简单地说,步骤 1 由独立扩增靶基因 (*tolR*) 的上游和下游区域以及抗性标记盒组成。将步骤 1 得到的两种 PCR 产物与等摩尔浓度的 AB 盒的扩增机器混合并进行第二轮 PCR(三元 PCR),以产生其上游和下游侧接的 500bp(或更长)部分与靶基因同源的抗性标记盒。在步骤 3 中,将大量 (1 μ g) 所需直链 DNA 电穿孔到 λ 红感受态细胞中。

[0347] 小泡制备

[0348] 1. 通过 TCA 沉淀制备小泡

[0349] 用平板上培养的细菌接种 LB 培养基,在轻柔振摇下 37℃ 过夜培养。用该培养物接种 200ml LB 使 OD600 = 0.1。细菌生长到 OD6000.4(或按规定)。培养物以 4000×g 离心 10 分钟,上清液通过 0.22mm 滤纸过滤以除去残留细菌。

[0350] 在限铁条件下往 LB 培养基中添加二吡啶基 (Dipyridyl) (0.25mM) 以进行同样的实验。

[0351] 通过往培养物上清液中添加终浓度为 10% 的 100% (重量/体积) TCA、0.4% (重量/体积) 脱氧胆酸盐来进行沉淀。所述沉淀过程在 4℃ 下进行 30 分钟。通过在 4℃ 以 20000×g 离心 10 分钟回收沉淀。该沉淀以 10% TCA (重量/体积) 洗涤一次并用纯乙醇洗涤两次。所述沉淀用 SpeedVac 干燥并保存于 -20℃。

[0352] 对野生型和突变型菌株进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,从中可以观察到突变型菌株上清液中产生的条带远远多于野生型菌株。随机选择的条带证实上清液中的所有蛋白均为膜蛋白。

[0353] 2. 通过超速离心以制备小泡

[0354] 培养物的上清液在 4℃ 以 200000×g 超速离心 2 小时。沉淀以 PBS 洗涤,重悬于 PBS 并保存于 -20℃。

[0355] 3 小泡的胍变性

[0356] 在进行胍变性前,小泡用乙醇沉淀。通过加入冷的纯乙醇到终浓度为 90% 沉淀 PBS 溶液中的 10 μ g OMV。沉淀过程在 -20℃ 下进行 20 分钟。通过 13000×g 离心 10 分钟回收沉淀。将该沉淀重悬于 50ml 6M 胍、15mM DTT、200mM Tris-HCl, pH8.0。变性过程在 60℃ 下进行 60 分钟。消化之前,溶液用 1.5M Tris pH8.0 溶液 1/8 稀释并往所述稀释溶液中添加 5mg 胰蛋白酶。消化过程在 37℃ 过夜。通过添加终浓度为 0.1% 的甲酸终止反应。所述肽用 Oasis 抽提试剂盒 (cartridge) 进行抽提。通过 LC 耦连 MS-MS 分析肽。

[0357] 4. 表面消化

[0358] 将 5mg 胰蛋白酶加入 10mg 小泡的 PBS 溶液中,并在 37℃ 孵育 3 小时。添加 0.1% 终浓度的甲酸终止反应。通过 30Kda 截断滤器过滤回收肽,用 Oasis 抽提试剂盒进行抽提。通过 LC 耦连 MSMS 分析肽。

[0359] 小泡分析

[0360] 蛋白定量

[0361] 用 Bradford 法、以 BSA 作为标准品进行蛋白定量。

[0362] SDS-PAGE

[0363] 采用十二烷基硫酸钠 (SDS) 4-12% 聚丙烯酰胺凝胶和 Mini-protean II 电泳装置分析样品。将样品悬浮于 SDS 样品缓冲液中 (0.06M Tris-HCl pH6.8、10% (体积 / 体积) 甘油、2% (重量 / 体积) SDS、5% (体积 / 体积) 2-巯基乙醇、10mg/ml 溴酚蓝) 并加热到 100℃ 5 分钟, 然后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后, 凝胶用考马斯蓝染色。

[0364] MALDI-TOF 质谱测定

[0365] 从凝胶中将蛋白条带和蛋白点切下, 用 50mM 碳酸氢铵 / 乙腈 (50/50, 体积 / 体积) 洗涤, 并用 SpeedVac 离心 (Savant) 干燥。加入 7-10ml 含有 5mM 碳酸氢铵、0.012mg 测序级胰蛋白酶的溶液于 37℃ 消化干燥的蛋白点 2 小时。消化后, 吸取 0.6ml 加到预点阵列靶 (matrix pre-spotted target) 上并空气干燥。蛋白点用 0.6ml 含有 70% 乙醇、0.1% 三氟醋酸的溶液洗涤。从超挠性 (ultraflex) MALDI-TOF 质谱仪上获得质谱信息。色谱信息采用靶上预点的标准品组合进行外部校准。采用 Mascot 程序对质量范围在 700-3,000Da 内的试验生成的肽的同位素单峰与计算机生成的指纹进行自动或手工比较以鉴定蛋白。

[0366] 二维电泳

[0367] 将 200mg 小泡重悬于 Immobiline 再溶胀溶液 (7M 尿素、2M 硫脲、2% (重量 / 体积) CHAPS、(2% 重量 / 体积) ASB14、2% (体积 / 体积) IPG 缓冲液 pH 3-10NL、2mMTBP、65mM DTT), 并过夜吸附于 7cm Immobiline DryStrip (pH3-10NL)。然后经 2 维电泳分离蛋白。第一维电泳的进行采用 IPGphor 等电位聚焦单位, 连续施加 150 伏电压 35 分钟、500 伏 35 分钟、1,000 伏 30 分钟、2,600 伏 10 分钟、3,500 伏 15 分钟、4,200 伏 15 分钟, 最后施加 5,000 伏至 10kVh。对于第二维电泳, 条带在 4M 尿素、2M 硫脲、30% 甘油、2% SDS、5mM TBP、50mM Tris HCl pH8.8、2.5% 丙烯酰胺、0.2% 溴酚蓝中孵育 2 次 10 分钟以平衡。然后, 在线性 4-12% 预制聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白。

[0368] 凝胶用胶质考马斯蓝染色, 并用个人光密度计 SI 扫描。图像用 Image Master 2DElite 软件进行分析。

[0369] 纳米 -LC/MS/MS

[0370] 肽由连接于装有纳米喷射源的 Q-ToF Micro ESI 质谱仪的 CapLC HPLC 系统上的纳米 LC 进行分离。通过一个 C18 收集柱 (300 μ m i.d. $\times$ 5mm) 将样品装入 AtlantisC18 NanoEase 柱 (100 μ m i.d. $\times$ 100mm)。50 分钟内用梯度从 2% -60% 的 95% ACN 的 0.1% 甲酸溶液进行洗脱, 流速 400nl/ 分钟。经洗提的肽采用 MassLynx 软件 (4.0 版) 进行自动的数据依赖型采集程序, 其中用 MS 测量扫描在 400-2,000 的 m/z 范围内自动选择多电荷肽以进行进一步的 MS/MS 片段化。最多有 3 种不同组分同时进行 MS/MS 片段化。采集到数据之后, 用 MassLynx 对单个 MS/MS 色谱数据进行组合、校平和确定中心。通过 MASCOT 的授权版本的批量模式对肽进行检索和鉴定。所述 MASCOT 检索参数为: (1) 种: ExPEC (2) 允许的切割失败数目 (仅针对胰蛋白酶水解): 6; (3) 可变的翻译后修饰: 甲硫氨酸氧化; (4) 肽容限: $\pm$ 500ppm; (5) MS/MS 容限: $\pm$ 0.3Da 和 (6): 肽电荷: 从 +1 到 +4。就前述平台而言, 仅考虑由 MASCOT 概率分析确定的显著命中。接受至少一种肽的蛋白测定结果的分值阈值由 MASCOT 设定, 胰蛋白酶消化的阈值为 18, 蛋白酶 K 消化的阈值为 36。

[0371] 结果

[0372] 上述分析的结果为,从 CFT073 菌株中鉴定了 13 种优选抗原。即:

[0373] gi-26110866(SEQ ID No 489), gi-26109898(SEQ ID No 597), gi-26107513(SEQ ID No 120), gi-26108604(SEQ ID No 598), gi-26109137(SEQ ID No 305), gi-26106493(SEQ ID No 22), gi-26108194(SEQ ID No 221), gi-26108192(SEQ ID No 219), gi-26109931(SEQ ID No 400), gi-26111428(SEQ ID No 565), gi-26109835(SEQ ID No 371), gi-26109866(SEQ ID No 599) 和 gi-26111414(SEQ ID No 555)

[0374] 见表 7。

[0375] 抗原分析

[0376] 全身感染的小鼠模型

[0377] 为了筛选由对病原性和非病原性大肠杆菌菌株进行的比较基因组分析所选出来的大量抗原,建立了基于经典毒力试验的保护模型。也可采用的其它试验模型包括在参考文献 158、159 和 160 中描述的那些模型。

[0378] 实验模型(免疫和感染)采用 5 周龄的 CD1 远交小鼠,采用腹膜内接种有毒力的 CFT073 大肠杆菌菌株进行刺激。刺激剂量通过试验确定为能够在 72 小时内杀死 80% 成年小鼠的细菌量,对 CFT073 菌株而言,该剂量对应为 7×10^7 cfu/ 只小鼠。

[0379] 免疫方法

[0380] 通过皮下注射 150 μ l 使用弗氏佐剂的蛋白溶液免疫小鼠 3 次,如下表所示:

	对照小鼠	免疫小鼠
[0381]	第 0 天	75 μ l 盐水溶液 75 μ l 完全弗氏佐剂
	第 21 天	75 μ l 盐水溶液 75 μ l 不完全弗氏佐剂
	第 35 天	75 μ l 盐水溶液 75 μ l 不完全弗氏佐剂

[0382] 在第一次免疫前一天(免疫前血清)、第 34 天和第 48 天(刺激前一天)收集血样,用 western 印迹和 ELISA 试验检测免疫小鼠的血清以测定抗体效价。

[0383] 刺激

[0384] 在第 48 天,用大肠杆菌 CFT073 的冻存液在 LB 琼脂平板上划线,在培养箱中于 37℃ 培养过夜(ON)。在第 49 天用所述 ON 平板-培养物接种 50ml LB 培养基,直到 $O.D._{600} = 0.1$,并在 37℃ 振荡培养 1.5 小时,直到细菌培养物达到 $O.D._{600} = 0.6$,其对应为 7×10^8 cfu/ml 的 CFT073 菌株。培养物离心,将沉淀重悬于等体积的生理溶液中用作攻击原液。用标准平板计数法将培养物铺板,以核实接种物。用 1ml 注射器将含有 7×10^7 CFT073 细菌的 100 μ l 细胞悬液注射到对照和免疫小鼠的腹膜内。记录下感染 24、48 和 72 小时后每组动物的死亡数。

[0385] 通过比较刺激 72 小时后小鼠疫苗接种组中的存活率和对照组中的存活率,来评估由于接种疫苗所获得的保护。由下式计算相对于对照的存活率百分比:

[0386] 疫苗组的存活率 - 对照组的存活率

[0387] 对照组的存活率

[0388] 结果

[0389] 用热灭活的 CFT073 进行免疫。如图 1 所示,用热灭活的 CFT073 免疫后,用 CFT073 刺激后小鼠的存活%有所增加。

[0390] 免疫研究

[0391] 选择抗原组合得到本发明组合物。BALB/c 小鼠被分成 9 组并按照如下方式进行免疫:

[0392]

组	免疫组合物	给药途径
1	抗原混合物(各 10-20 μ g 蛋白)+CFA(完全弗氏佐剂)	腹膜内或鼻内或皮下
2	抗原混合物(各 5 μ g 蛋白)+氢氧化铝(200 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下
3	抗原混合物(各 10-20 μ g 蛋白)+CpG(10 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下
4	抗原混合物(各 10-20 μ g 蛋白)+ 氢氧化铝(200 μ g)+CpG(10 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下
5	CFA	腹膜内或鼻内或皮下
6	抗原混合物(各 10-20 μ g 蛋白)+LTK63(5 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下
7	氢氧化铝(200 μ g)+CpG(10 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下
8	CpG(10 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下
9	LTK63(5 μ g)	腹膜内或鼻内或皮下

[0393] 以 2 周间隔免疫小鼠。最后一次免疫后 2-3 周,用合适的 UPEC 菌株刺激所有小鼠。当采用粘膜免疫(如鼻内)时,也以粘膜方式刺激动物模型以测试粘膜免疫原的保护效果。临近刺激前,对小鼠采血以检测针对所给予抗原的抗体的效价。

[0394] 就小鼠刺激而言,有毒力的细菌要在合适的培养基中生长。通过离心收获细菌,重悬,连续稀释成刺激接种物。对 BALB/c 小鼠进行刺激并在接触后 30 天内每天观察。

[0395] 可以采用完整细菌和纯化重组蛋白的 ELISA 试验来测定不同免疫方案产生的小鼠血清中的总 IgG 和 IgG1/IgG2A 亚型。而且,可通过多参数 FACS 分析评价分离自免疫接种小鼠的脾细胞和/或 PBMC 中的抗原特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺Th 细胞,以评估抗原特异性 T 细胞的细胞因子表达情况。具体地,IFN- γ 和 IL-5 的产量可在用纯化抗原体外刺激 T 细胞之后进行测量。此外,用各抗原/疫苗制剂免疫的小鼠的脾细胞和/或 PBMC 可以在最后一次免疫剂量后 10-12 天收集,并用 UPEC 细菌来刺激。经过 4 小时的刺激之后,往后的 12 个小时内往细胞中加入布雷菲德菌素 A 以阻断细胞因子分泌。然后,固定细胞并用抗体染色,以检测表达 IFN- γ 和 IL-5 的 UPEC 特异性 T 细胞。

[0396] 可以通过本领域技术人员了解的各种方法从外周血淋巴细胞(PBL)中分离 T 细胞。例如,可以通过去除辅助细胞和 B 细胞从 PBL 群中“富集”T 细胞群。具体地,可使用抗 MHC II 类单克隆抗体清除非 T 细胞来富集 T 细胞。类似地,其它抗体可用于消耗特定的非 T 细胞群。例如,抗 Ig 抗体分子可用于消耗 B 细胞,抗 MacI 抗体分子可用于消耗巨噬细胞。

[0397] 还可用本领域技术人员已知技术将 T 细胞分成许多不同的亚群。两类主要的亚群可以基于其细胞表面标记 CD4 和 CD8 的表达差异进行分离。例如,在上述 T 细胞富集之后,可采用对 CD4 特异性的抗体富集 CD4⁺ 细胞。所述抗体可以偶联于固体支持物如磁珠上。相反地,CD8⁺ 细胞可使用对 CD4 特异性的抗体进行富集(去除 CD4⁺ 细胞),或可使用偶联于固体支持物的 CD8 抗体进行分离。在转导之前或之后,可以离体扩增感染 UPEC 的患者的 CD4 淋巴细胞。

[0398] T 细胞纯化之后,纯化的 T 细胞用各种细胞因子(包括但不限于 rIL-2、IL-10、IL-12 和 IL-15) 进行预刺激,以促进淋巴细胞的生长和活化。

[0399] 可以用上述免疫原性多肽进行活化 UPEC 特异性 T 细胞。UPEC 特异性 T 细胞可以是 CD8+ 或 CD4+。UPEC 特异性 CD8+T 细胞可以是细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL),其能杀死呈现与 MHC I 类分子复合的任何上述多肽或其片段的 UPEC 感染细胞。衣原体特异性 CD8+T 细胞可以通过如 ^{51}Cr 释放试验进行检测。 ^{51}Cr 释放试验检测 UPEC 特异性 CD8+T 细胞裂解呈现一种或多种这些表位的靶细胞的能力。本发明还考虑了表达抗病毒物质如 IFN γ 的 UPEC 特异性 CD8+T 细胞,它们也可通过免疫学方法进行检测,优选用一种或多种上述 UPEC 多肽进行体外刺激后对 IFN γ 或类似细胞因子进行细胞内染色来检测。UPEC 特异性 CD4+T 细胞可以通过淋巴增殖试验进行检测。淋巴增殖试验检测 UPEC 特异性 CD4+T 细胞响应于一种或多种上述多肽而增殖的能力。

[0400] 应该理解,本发明仅通过实施例的方式进行描述,可以在本发明的范围和精神内进行改变。

[0401] 表 1--599 种病原性大肠杆菌序列

[0402]

gi-26106321 (SEQ ID NO: 1)	gi-26106323 (SEQ ID NO: 2)	gi-26106335 (SEQ ID NO: 3)
gi-26106336 (SEQ ID NO: 4)	gi-26106340 (SEQ ID NO: 5)	gi-26106348 (SEQ ID NO: 6)
gi-26106390 (SEQ ID NO: 7)	gi-26106403 (SEQ ID NO: 8)	gi-26106445 (SEQ ID NO: 9)
gi-26106446 (SEQ ID NO: 10)	gi-26106449 (SEQ ID NO: 11)	gi-26106454 (SEQ ID NO: 12)
gi-26106474 (SEQ ID NO: 13)	gi-26106475 (SEQ ID NO: 14)	gi-26106476 (SEQ ID NO: 15)
gi-26106477 (SEQ ID NO: 16)	gi-26106478 (SEQ ID NO: 17)	gi-26106479 (SEQ ID NO: 18)
gi-26106480 (SEQ ID NO: 19)	gi-26106483 (SEQ ID NO: 20)	gi-26106492 (SEQ ID NO: 21)
gi-26106493 (SEQ ID NO: 22)	gi-26106557 (SEQ ID NO: 23)	gi-26106569 (SEQ ID NO: 24)
gi-26106579 (SEQ ID NO: 25)	gi-26106582 (SEQ ID NO: 26)	gi-26106583 (SEQ ID NO: 27)
gi-26106584 (SEQ ID NO: 28)	gi-26106585 (SEQ ID NO: 29)	gi-26106592 (SEQ ID NO: 30)
gi-26106594 (SEQ ID NO: 31)	gi-26106595 (SEQ ID NO: 32)	gi-26106596 (SEQ ID NO: 33)
gi-26106597 (SEQ ID NO: 34)	gi-26106598 (SEQ ID NO: 35)	gi-26106601 (SEQ ID NO: 36)
gi-26106624 (SEQ ID NO: 37)	gi-26106625 (SEQ ID NO: 38)	gi-26106626 (SEQ ID NO: 39)
gi-26106627 (SEQ ID NO: 40)	gi-26106628 (SEQ ID NO: 41)	gi-26106629 (SEQ ID NO: 42)
gi-26106630 (SEQ ID NO: 43)	gi-26106633 (SEQ ID NO: 44)	gi-26106635 (SEQ ID NO: 45)
gi-26106637 (SEQ ID NO: 46)	gi-26106645 (SEQ ID NO: 47)	gi-26106648 (SEQ ID NO: 48)
gi-26106649 (SEQ ID NO: 49)	gi-26106652 (SEQ ID NO: 50)	gi-26106656 (SEQ ID NO: 51)
gi-26106657 (SEQ ID NO: 52)	gi-26106658 (SEQ ID NO: 53)	gi-26106659 (SEQ ID NO: 54)
gi-26106662 (SEQ ID NO: 55)	gi-26106663 (SEQ ID NO: 56)	gi-26106664 (SEQ ID NO: 57)
gi-26106689 (SEQ ID NO: 58)	gi-26106690 (SEQ ID NO: 59)	gi-26106694 (SEQ ID NO: 60)
gi-26106705 (SEQ ID NO: 61)	gi-26106706 (SEQ ID NO: 62)	gi-26106710 (SEQ ID NO: 63)
gi-26106722 (SEQ ID NO: 64)	gi-26106723 (SEQ ID NO: 65)	gi-26106740 (SEQ ID NO: 66)
gi-26106931 (SEQ ID NO: 67)	gi-26107030 (SEQ ID NO: 68)	gi-26107046 (SEQ ID NO: 69)
gi-26107049 (SEQ ID NO: 70)	gi-26107050 (SEQ ID NO: 71)	gi-26107051 (SEQ ID NO: 72)
gi-26107053 (SEQ ID NO: 73)	gi-26107067 (SEQ ID NO: 74)	gi-26107097 (SEQ ID NO: 75)
gi-26107223 (SEQ ID NO: 76)	gi-26107228 (SEQ ID NO: 77)	gi-26107235 (SEQ ID NO: 78)
gi-26107239 (SEQ ID NO: 79)	gi-26107241 (SEQ ID NO: 80)	gi-26107246 (SEQ ID NO: 81)
gi-26107247 (SEQ ID NO: 82)	gi-26107248 (SEQ ID NO: 83)	gi-26107249 (SEQ ID NO: 84)
gi-26107251 (SEQ ID NO: 85)	gi-26107258 (SEQ ID NO: 86)	gi-26107260 (SEQ ID NO: 87)
gi-26107263 (SEQ ID NO: 88)	gi-26107265 (SEQ ID NO: 89)	gi-26107266 (SEQ ID NO: 90)
gi-26107267 (SEQ ID NO: 91)	gi-26107269 (SEQ ID NO: 92)	gi-26107309 (SEQ ID NO: 93)
gi-26107393 (SEQ ID NO: 94)	gi-26107451 (SEQ ID NO: 95)	gi-26107452 (SEQ ID NO: 96)
gi-26107455 (SEQ ID NO: 97)	gi-26107459 (SEQ ID NO: 98)	gi-26107461 (SEQ ID NO: 99)
gi-26107465 (SEQ ID NO: 100)	gi-26107468 (SEQ ID NO: 101)	gi-26107469 (SEQ ID NO: 102)
gi-26107470 (SEQ ID NO: 103)	gi-26107471 (SEQ ID NO: 104)	gi-26107473 (SEQ ID NO: 105)
gi-26107476 (SEQ ID NO: 106)	gi-26107477 (SEQ ID NO: 107)	gi-26107480 (SEQ ID NO: 108)
gi-26107483 (SEQ ID NO: 109)	gi-26107484 (SEQ ID NO: 110)	gi-26107486 (SEQ ID NO: 111)
gi-26107498 (SEQ ID NO: 112)	gi-26107499 (SEQ ID NO: 113)	gi-26107502 (SEQ ID NO: 114)
gi-26107505 (SEQ ID NO: 115)	gi-26107506 (SEQ ID NO: 116)	gi-26107507 (SEQ ID NO: 117)
gi-26107508 (SEQ ID NO: 118)	gi-26107509 (SEQ ID NO: 119)	gi-26107513 (SEQ ID NO: 120)
gi-26107514 (SEQ ID NO: 121)	gi-26107515 (SEQ ID NO: 122)	gi-26107516 (SEQ ID NO: 123)
gi-26107517 (SEQ ID NO: 124)	gi-26107518 (SEQ ID NO: 125)	gi-26107524 (SEQ ID NO: 126)
gi-26107525 (SEQ ID NO: 127)	gi-26107528 (SEQ ID NO: 128)	gi-26107529 (SEQ ID NO: 129)
gi-26107530 (SEQ ID NO: 130)	gi-26107534 (SEQ ID NO: 131)	gi-26107537 (SEQ ID NO: 132)
gi-26107540 (SEQ ID NO: 133)	gi-26107541 (SEQ ID NO: 134)	gi-26107542 (SEQ ID NO: 135)
gi-26107544 (SEQ ID NO: 136)	gi-26107548 (SEQ ID NO: 137)	gi-26107550 (SEQ ID NO: 138)
gi-26107554 (SEQ ID NO: 139)	gi-26107578 (SEQ ID NO: 140)	gi-26107639 (SEQ ID NO: 141)
gi-26107666 (SEQ ID NO: 142)	gi-26107673 (SEQ ID NO: 143)	gi-26107682 (SEQ ID NO: 144)
gi-26107688 (SEQ ID NO: 145)	gi-26107690 (SEQ ID NO: 146)	gi-26107692 (SEQ ID NO: 147)
gi-26107693 (SEQ ID NO: 148)	gi-26107698 (SEQ ID NO: 149)	gi-26107699 (SEQ ID NO: 150)

[0403]

gi-26107703 (SEQ ID NO: 151)	gi-26107707 (SEQ ID NO: 152)	gi-26107708 (SEQ ID NO: 153)
gi-26107714 (SEQ ID NO: 154)	gi-26107719 (SEQ ID NO: 155)	gi-26107725 (SEQ ID NO: 156)
gi-26107730 (SEQ ID NO: 157)	gi-26107735 (SEQ ID NO: 158)	gi-26107739 (SEQ ID NO: 159)
gi-26107741 (SEQ ID NO: 160)	gi-26107751 (SEQ ID NO: 161)	gi-26107753 (SEQ ID NO: 162)
gi-26107755 (SEQ ID NO: 163)	gi-26107757 (SEQ ID NO: 164)	gi-26107759 (SEQ ID NO: 165)
gi-26107765 (SEQ ID NO: 166)	gi-26107774 (SEQ ID NO: 167)	gi-26107788 (SEQ ID NO: 168)
gi-26107791 (SEQ ID NO: 169)	gi-26107794 (SEQ ID NO: 170)	gi-26107808 (SEQ ID NO: 171)
gi-26107811 (SEQ ID NO: 172)	gi-26107813 (SEQ ID NO: 173)	gi-26107817 (SEQ ID NO: 174)
gi-26107823 (SEQ ID NO: 175)	gi-26107835 (SEQ ID NO: 176)	gi-26107839 (SEQ ID NO: 177)
gi-26107843 (SEQ ID NO: 178)	gi-26107851 (SEQ ID NO: 179)	gi-26107854 (SEQ ID NO: 180)
gi-26107855 (SEQ ID NO: 181)	gi-26107858 (SEQ ID NO: 182)	gi-26107861 (SEQ ID NO: 183)
gi-26107864 (SEQ ID NO: 184)	gi-26107866 (SEQ ID NO: 185)	gi-26107867 (SEQ ID NO: 186)
gi-26107869 (SEQ ID NO: 187)	gi-26107890 (SEQ ID NO: 188)	gi-26107912 (SEQ ID NO: 189)
gi-26107916 (SEQ ID NO: 190)	gi-26107917 (SEQ ID NO: 191)	gi-26107918 (SEQ ID NO: 192)
gi-26107919 (SEQ ID NO: 193)	gi-26107926 (SEQ ID NO: 194)	gi-26107942 (SEQ ID NO: 195)
gi-26107956 (SEQ ID NO: 196)	gi-26107959 (SEQ ID NO: 197)	gi-26107960 (SEQ ID NO: 198)
gi-26107961 (SEQ ID NO: 199)	gi-26107962 (SEQ ID NO: 200)	gi-26108027 (SEQ ID NO: 201)
gi-26108028 (SEQ ID NO: 202)	gi-26108030 (SEQ ID NO: 203)	gi-26108031 (SEQ ID NO: 204)
gi-26108032 (SEQ ID NO: 205)	gi-26108047 (SEQ ID NO: 206)	gi-26108073 (SEQ ID NO: 207)
gi-26108075 (SEQ ID NO: 208)	gi-26108076 (SEQ ID NO: 209)	gi-26108084 (SEQ ID NO: 210)
gi-26108096 (SEQ ID NO: 211)	gi-26108136 (SEQ ID NO: 212)	gi-26108146 (SEQ ID NO: 213)
gi-26108147 (SEQ ID NO: 214)	gi-26108151 (SEQ ID NO: 215)	gi-26108157 (SEQ ID NO: 216)
gi-26108164 (SEQ ID NO: 217)	gi-26108174 (SEQ ID NO: 218)	gi-26108192 (SEQ ID NO: 219)
gi-26108193 (SEQ ID NO: 220)	gi-26108194 (SEQ ID NO: 221)	gi-26108196 (SEQ ID NO: 222)
gi-26108213 (SEQ ID NO: 223)	gi-26108215 (SEQ ID NO: 224)	gi-26108216 (SEQ ID NO: 225)
gi-26108299 (SEQ ID NO: 226)	gi-26108374 (SEQ ID NO: 227)	gi-26108422 (SEQ ID NO: 228)
gi-26108563 (SEQ ID NO: 229)	gi-26108639 (SEQ ID NO: 230)	gi-26108640 (SEQ ID NO: 231)
gi-26108650 (SEQ ID NO: 232)	gi-26108651 (SEQ ID NO: 233)	gi-26108654 (SEQ ID NO: 234)
gi-26108656 (SEQ ID NO: 235)	gi-26108657 (SEQ ID NO: 236)	gi-26108659 (SEQ ID NO: 237)
gi-26108660 (SEQ ID NO: 238)	gi-26108662 (SEQ ID NO: 239)	gi-26108663 (SEQ ID NO: 240)
gi-26108668 (SEQ ID NO: 241)	gi-26108676 (SEQ ID NO: 242)	gi-26108677 (SEQ ID NO: 243)
gi-26108678 (SEQ ID NO: 244)	gi-26108680 (SEQ ID NO: 245)	gi-26108682 (SEQ ID NO: 246)
gi-26108683 (SEQ ID NO: 247)	gi-26108684 (SEQ ID NO: 248)	gi-26108686 (SEQ ID NO: 249)
gi-26108689 (SEQ ID NO: 250)	gi-26108692 (SEQ ID NO: 251)	gi-26108708 (SEQ ID NO: 252)
gi-26108711 (SEQ ID NO: 253)	gi-26108712 (SEQ ID NO: 254)	gi-26108714 (SEQ ID NO: 255)
gi-26108715 (SEQ ID NO: 256)	gi-26108716 (SEQ ID NO: 257)	gi-26108717 (SEQ ID NO: 258)
gi-26108720 (SEQ ID NO: 259)	gi-26108721 (SEQ ID NO: 260)	gi-26108722 (SEQ ID NO: 261)
gi-26108723 (SEQ ID NO: 262)	gi-26108724 (SEQ ID NO: 263)	gi-26108725 (SEQ ID NO: 264)
gi-26108726 (SEQ ID NO: 265)	gi-26108728 (SEQ ID NO: 266)	gi-26108739 (SEQ ID NO: 267)
gi-26108747 (SEQ ID NO: 268)	gi-26108756 (SEQ ID NO: 269)	gi-26108765 (SEQ ID NO: 270)
gi-26108768 (SEQ ID NO: 271)	gi-26108769 (SEQ ID NO: 272)	gi-26108770 (SEQ ID NO: 273)
gi-26108775 (SEQ ID NO: 274)	gi-26108776 (SEQ ID NO: 275)	gi-26108778 (SEQ ID NO: 276)
gi-26108779 (SEQ ID NO: 277)	gi-26108810 (SEQ ID NO: 278)	gi-26108811 (SEQ ID NO: 279)
gi-26108813 (SEQ ID NO: 280)	gi-26108816 (SEQ ID NO: 281)	gi-26108817 (SEQ ID NO: 282)
gi-26108818 (SEQ ID NO: 283)	gi-26108826 (SEQ ID NO: 284)	gi-26108860 (SEQ ID NO: 285)
gi-26108862 (SEQ ID NO: 286)	gi-26108877 (SEQ ID NO: 287)	gi-26108896 (SEQ ID NO: 288)
gi-26108898 (SEQ ID NO: 289)	gi-26108915 (SEQ ID NO: 290)	gi-26108952 (SEQ ID NO: 291)
gi-26109000 (SEQ ID NO: 292)	gi-26109006 (SEQ ID NO: 293)	gi-26109008 (SEQ ID NO: 294)
gi-26109026 (SEQ ID NO: 295)	gi-26109062 (SEQ ID NO: 296)	gi-26109065 (SEQ ID NO: 297)
gi-26109126 (SEQ ID NO: 298)	gi-26109127 (SEQ ID NO: 299)	gi-26109128 (SEQ ID NO: 300)
gi-26109129 (SEQ ID NO: 301)	gi-26109130 (SEQ ID NO: 302)	gi-26109131 (SEQ ID NO: 303)

[0404]

gi-26109132 (SEQ ID NO: 304)	gi-26109137 (SEQ ID NO: 305)	gi-26109141 (SEQ ID NO: 306)
gi-26109143 (SEQ ID NO: 307)	gi-26109160 (SEQ ID NO: 308)	gi-26109178 (SEQ ID NO: 309)
gi-26109277 (SEQ ID NO: 310)	gi-26109278 (SEQ ID NO: 311)	gi-26109279 (SEQ ID NO: 312)
gi-26109311 (SEQ ID NO: 313)	gi-26109396 (SEQ ID NO: 314)	gi-26109400 (SEQ ID NO: 315)
gi-26109404 (SEQ ID NO: 316)	gi-26109406 (SEQ ID NO: 317)	gi-26109409 (SEQ ID NO: 318)
gi-26109428 (SEQ ID NO: 319)	gi-26109447 (SEQ ID NO: 320)	gi-26109452 (SEQ ID NO: 321)
gi-26109490 (SEQ ID NO: 322)	gi-26109512 (SEQ ID NO: 323)	gi-26109518 (SEQ ID NO: 324)
gi-26109519 (SEQ ID NO: 325)	gi-26109522 (SEQ ID NO: 326)	gi-26109548 (SEQ ID NO: 327)
gi-26109581 (SEQ ID NO: 328)	gi-26109582 (SEQ ID NO: 329)	gi-26109583 (SEQ ID NO: 330)
gi-26109585 (SEQ ID NO: 331)	gi-26109587 (SEQ ID NO: 332)	gi-26109613 (SEQ ID NO: 333)
gi-26109629 (SEQ ID NO: 334)	gi-26109630 (SEQ ID NO: 335)	gi-26109631 (SEQ ID NO: 336)
gi-26109636 (SEQ ID NO: 337)	gi-26109637 (SEQ ID NO: 338)	gi-26109639 (SEQ ID NO: 339)
gi-26109640 (SEQ ID NO: 340)	gi-26109641 (SEQ ID NO: 341)	gi-26109642 (SEQ ID NO: 342)
gi-26109643 (SEQ ID NO: 343)	gi-26109645 (SEQ ID NO: 344)	gi-26109647 (SEQ ID NO: 345)
gi-26109648 (SEQ ID NO: 346)	gi-26109650 (SEQ ID NO: 347)	gi-26109730 (SEQ ID NO: 348)
gi-26109741 (SEQ ID NO: 349)	gi-26109750 (SEQ ID NO: 350)	gi-26109751 (SEQ ID NO: 351)
gi-26109753 (SEQ ID NO: 352)	gi-26109760 (SEQ ID NO: 353)	gi-26109761 (SEQ ID NO: 354)
gi-26109766 (SEQ ID NO: 355)	gi-26109801 (SEQ ID NO: 356)	gi-26109807 (SEQ ID NO: 357)
gi-26109809 (SEQ ID NO: 358)	gi-26109811 (SEQ ID NO: 359)	gi-26109812 (SEQ ID NO: 360)
gi-26109813 (SEQ ID NO: 361)	gi-26109816 (SEQ ID NO: 362)	gi-26109817 (SEQ ID NO: 363)
gi-26109826 (SEQ ID NO: 364)	gi-26109827 (SEQ ID NO: 365)	gi-26109828 (SEQ ID NO: 366)
gi-26109829 (SEQ ID NO: 367)	gi-26109831 (SEQ ID NO: 368)	gi-26109833 (SEQ ID NO: 369)
gi-26109834 (SEQ ID NO: 370)	gi-26109835 (SEQ ID NO: 371)	gi-26109837 (SEQ ID NO: 372)
gi-26109841 (SEQ ID NO: 373)	gi-26109842 (SEQ ID NO: 374)	gi-26109844 (SEQ ID NO: 375)
gi-26109845 (SEQ ID NO: 376)	gi-26109849 (SEQ ID NO: 377)	gi-26109852 (SEQ ID NO: 378)
gi-26109853 (SEQ ID NO: 379)	gi-26109855 (SEQ ID NO: 380)	gi-26109861 (SEQ ID NO: 381)
gi-26109862 (SEQ ID NO: 382)	gi-26109864 (SEQ ID NO: 383)	gi-26109867 (SEQ ID NO: 384)
gi-26109868 (SEQ ID NO: 385)	gi-26109870 (SEQ ID NO: 386)	gi-26109871 (SEQ ID NO: 387)
gi-26109873 (SEQ ID NO: 388)	gi-26109877 (SEQ ID NO: 389)	gi-26109878 (SEQ ID NO: 390)
gi-26109879 (SEQ ID NO: 391)	gi-26109880 (SEQ ID NO: 392)	gi-26109881 (SEQ ID NO: 393)
gi-26109895 (SEQ ID NO: 394)	gi-26109908 (SEQ ID NO: 395)	gi-26109915 (SEQ ID NO: 396)
gi-26109927 (SEQ ID NO: 397)	gi-26109928 (SEQ ID NO: 398)	gi-26109930 (SEQ ID NO: 399)
gi-26109931 (SEQ ID NO: 400)	gi-26109935 (SEQ ID NO: 401)	gi-26109936 (SEQ ID NO: 402)
gi-26109938 (SEQ ID NO: 403)	gi-26109941 (SEQ ID NO: 404)	gi-26109951 (SEQ ID NO: 405)
gi-26109955 (SEQ ID NO: 406)	gi-26109956 (SEQ ID NO: 407)	gi-26109957 (SEQ ID NO: 408)
gi-26109990 (SEQ ID NO: 409)	gi-26109991 (SEQ ID NO: 410)	gi-26109993 (SEQ ID NO: 411)
gi-26109994 (SEQ ID NO: 412)	gi-26109995 (SEQ ID NO: 413)	gi-26110009 (SEQ ID NO: 414)
gi-26110010 (SEQ ID NO: 415)	gi-26110011 (SEQ ID NO: 416)	gi-26110012 (SEQ ID NO: 417)
gi-26110024 (SEQ ID NO: 418)	gi-26110025 (SEQ ID NO: 419)	gi-26110026 (SEQ ID NO: 420)
gi-26110029 (SEQ ID NO: 421)	gi-26110030 (SEQ ID NO: 422)	gi-26110031 (SEQ ID NO: 423)
gi-26110032 (SEQ ID NO: 424)	gi-26110033 (SEQ ID NO: 425)	gi-26110145 (SEQ ID NO: 426)
gi-26110198 (SEQ ID NO: 427)	gi-26110269 (SEQ ID NO: 428)	gi-26110271 (SEQ ID NO: 429)
gi-26110273 (SEQ ID NO: 430)	gi-26110457 (SEQ ID NO: 431)	gi-26110458 (SEQ ID NO: 432)
gi-26110460 (SEQ ID NO: 433)	gi-26110461 (SEQ ID NO: 434)	gi-26110462 (SEQ ID NO: 435)
gi-26110465 (SEQ ID NO: 436)	gi-26110466 (SEQ ID NO: 437)	gi-26110467 (SEQ ID NO: 438)
gi-26110529 (SEQ ID NO: 439)	gi-26110530 (SEQ ID NO: 440)	gi-26110532 (SEQ ID NO: 441)
gi-26110559 (SEQ ID NO: 442)	gi-26110564 (SEQ ID NO: 443)	gi-26110568 (SEQ ID NO: 444)
gi-26110614 (SEQ ID NO: 445)	gi-26110650 (SEQ ID NO: 446)	gi-26110651 (SEQ ID NO: 447)
gi-26110658 (SEQ ID NO: 448)	gi-26110671 (SEQ ID NO: 449)	gi-26110674 (SEQ ID NO: 450)
gi-26110675 (SEQ ID NO: 451)	gi-26110685 (SEQ ID NO: 452)	gi-26110699 (SEQ ID NO: 453)
gi-26110700 (SEQ ID NO: 454)	gi-26110708 (SEQ ID NO: 455)	gi-26110734 (SEQ ID NO: 456)

[0405]

gi-26110736 (SEQ ID NO: 457)
gi-26110745 (SEQ ID NO: 460)
gi-26110749 (SEQ ID NO: 463)
gi-26110762 (SEQ ID NO: 466)
gi-26110768 (SEQ ID NO: 469)
gi-26110780 (SEQ ID NO: 472)
gi-26110785 (SEQ ID NO: 475)
gi-26110789 (SEQ ID NO: 478)
gi-26110801 (SEQ ID NO: 481)
gi-26110816 (SEQ ID NO: 484)
gi-26110844 (SEQ ID NO: 487)
gi-26110976 (SEQ ID NO: 490)
gi-26110987 (SEQ ID NO: 493)
gi-26111007 (SEQ ID NO: 496)
gi-26111010 (SEQ ID NO: 499)
gi-26111014 (SEQ ID NO: 502)
gi-26111025 (SEQ ID NO: 505)
gi-26111070 (SEQ ID NO: 508)
gi-26111073 (SEQ ID NO: 511)
gi-26111076 (SEQ ID NO: 514)
gi-26111140 (SEQ ID NO: 517)
gi-26111166 (SEQ ID NO: 520)
gi-26111221 (SEQ ID NO: 523)
gi-26111229 (SEQ ID NO: 526)
gi-26111266 (SEQ ID NO: 529)
gi-26111278 (SEQ ID NO: 532)
gi-26111281 (SEQ ID NO: 535)
gi-26111294 (SEQ ID NO: 538)
gi-26111303 (SEQ ID NO: 541)
gi-26111323 (SEQ ID NO: 544)
gi-26111394 (SEQ ID NO: 547)
gi-26111404 (SEQ ID NO: 550)
gi-26111409 (SEQ ID NO: 553)
gi-26111418 (SEQ ID NO: 556)
gi-26111421 (SEQ ID NO: 559)
gi-26111425 (SEQ ID NO: 562)
gi-26111428 (SEQ ID NO: 565)
gi-26111442 (SEQ ID NO: 568)
gi-26111453 (SEQ ID NO: 571)
gi-26111536 (SEQ ID NO: 574)
gi-26111560 (SEQ ID NO: 577)
gi-26111589 (SEQ ID NO: 580)
gi-26111597 (SEQ ID NO: 583)
gi-26111620 (SEQ ID NO: 586)
gi-26111638 (SEQ ID NO: 589)
gi-26111660 (SEQ ID NO: 592)
gi-26111673 (SEQ ID NO: 595)
gi-26108604 (SEQ ID NO: 598)

gi-26110737 (SEQ ID NO: 458)
gi-26110746 (SEQ ID NO: 461)
gi-26110752 (SEQ ID NO: 464)
gi-26110764 (SEQ ID NO: 467)
gi-26110769 (SEQ ID NO: 470)
gi-26110782 (SEQ ID NO: 473)
gi-26110786 (SEQ ID NO: 476)
gi-26110794 (SEQ ID NO: 479)
gi-26110805 (SEQ ID NO: 482)
gi-26110818 (SEQ ID NO: 485)
gi-26110856 (SEQ ID NO: 488)
gi-26110977 (SEQ ID NO: 491)
gi-26111004 (SEQ ID NO: 494)
gi-26111008 (SEQ ID NO: 497)
gi-26111011 (SEQ ID NO: 500)
gi-26111016 (SEQ ID NO: 503)
gi-26111026 (SEQ ID NO: 506)
gi-26111071 (SEQ ID NO: 509)
gi-26111074 (SEQ ID NO: 512)
gi-26111094 (SEQ ID NO: 515)
gi-26111141 (SEQ ID NO: 518)
gi-26111169 (SEQ ID NO: 521)
gi-26111225 (SEQ ID NO: 524)
gi-26111264 (SEQ ID NO: 527)
gi-26111270 (SEQ ID NO: 530)
gi-26111279 (SEQ ID NO: 533)
gi-26111284 (SEQ ID NO: 536)
gi-26111301 (SEQ ID NO: 539)
gi-26111304 (SEQ ID NO: 542)
gi-26111324 (SEQ ID NO: 545)
gi-26111395 (SEQ ID NO: 548)
gi-26111405 (SEQ ID NO: 551)
gi-26111411 (SEQ ID NO: 554)
gi-26111419 (SEQ ID NO: 557)
gi-26111422 (SEQ ID NO: 560)
gi-26111426 (SEQ ID NO: 563)
gi-26111431 (SEQ ID NO: 566)
gi-26111443 (SEQ ID NO: 569)
gi-26111510 (SEQ ID NO: 572)
gi-26111537 (SEQ ID NO: 575)
gi-26111573 (SEQ ID NO: 578)
gi-26111591 (SEQ ID NO: 581)
gi-26111612 (SEQ ID NO: 584)
gi-26111626 (SEQ ID NO: 587)
gi-26111652 (SEQ ID NO: 590)
gi-26111670 (SEQ ID NO: 593)
gi-26111674 (SEQ ID NO: 596)
gi-26109866 (SEQ ID NO: 599)

gi-26110738 (SEQ ID NO: 459)
gi-26110747 (SEQ ID NO: 462)
gi-26110754 (SEQ ID NO: 465)
gi-26110766 (SEQ ID NO: 468)
gi-26110776 (SEQ ID NO: 471)
gi-26110783 (SEQ ID NO: 474)
gi-26110788 (SEQ ID NO: 477)
gi-26110797 (SEQ ID NO: 480)
gi-26110811 (SEQ ID NO: 483)
gi-26110835 (SEQ ID NO: 486)
gi-26110866 (SEQ ID NO: 489)
gi-26110984 (SEQ ID NO: 492)
gi-26111005 (SEQ ID NO: 495)
gi-26111009 (SEQ ID NO: 498)
gi-26111013 (SEQ ID NO: 501)
gi-26111024 (SEQ ID NO: 504)
gi-26111027 (SEQ ID NO: 507)
gi-26111072 (SEQ ID NO: 510)
gi-26111075 (SEQ ID NO: 513)
gi-26111139 (SEQ ID NO: 516)
gi-26111143 (SEQ ID NO: 519)
gi-26111170 (SEQ ID NO: 522)
gi-26111226 (SEQ ID NO: 525)
gi-26111265 (SEQ ID NO: 528)
gi-26111272 (SEQ ID NO: 531)
gi-26111280 (SEQ ID NO: 534)
gi-26111287 (SEQ ID NO: 537)
gi-26111302 (SEQ ID NO: 540)
gi-26111322 (SEQ ID NO: 543)
gi-26111325 (SEQ ID NO: 546)
gi-26111398 (SEQ ID NO: 549)
gi-26111407 (SEQ ID NO: 552)
gi-26111414 (SEQ ID NO: 555)
gi-26111420 (SEQ ID NO: 558)
gi-26111424 (SEQ ID NO: 561)
gi-26111427 (SEQ ID NO: 564)
gi-26111441 (SEQ ID NO: 567)
gi-26111450 (SEQ ID NO: 570)
gi-26111525 (SEQ ID NO: 573)
gi-26111542 (SEQ ID NO: 576)
gi-26111587 (SEQ ID NO: 579)
gi-26111596 (SEQ ID NO: 582)
gi-26111614 (SEQ ID NO: 585)
gi-26111630 (SEQ ID NO: 588)
gi-26111659 (SEQ ID NO: 591)
gi-26111671 (SEQ ID NO: 594)
gi-26109898 (SEQ ID NO: 597)

[0406] 表 2—156 种优选抗原

[0407]

gi-26106323 (SEQ ID NO: 2)	gi-26106348 (SEQ ID NO: 6)	gi-26106390 (SEQ ID NO: 7)
gi-26106557 (SEQ ID NO: 23)	gi-26106579 (SEQ ID NO: 25)	gi-26106582 (SEQ ID NO: 26)
gi-26106584 (SEQ ID NO: 28)	gi-26106585 (SEQ ID NO: 29)	gi-26106592 (SEQ ID NO: 30)
gi-26106594 (SEQ ID NO: 31)	gi-26106595 (SEQ ID NO: 32)	gi-26106601 (SEQ ID NO: 36)
gi-26106649 (SEQ ID NO: 49)	gi-26106664 (SEQ ID NO: 57)	gi-26106690 (SEQ ID NO: 59)
gi-26106931 (SEQ ID NO: 67)	gi-26107030 (SEQ ID NO: 68)	gi-26107223 (SEQ ID NO: 76)
gi-26107228 (SEQ ID NO: 77)	gi-26107241 (SEQ ID NO: 80)	gi-26107246 (SEQ ID NO: 81)
gi-26107247 (SEQ ID NO: 82)	gi-26107248 (SEQ ID NO: 83)	gi-26107249 (SEQ ID NO: 84)
gi-26107251 (SEQ ID NO: 85)	gi-26107260 (SEQ ID NO: 87)	gi-26107263 (SEQ ID NO: 88)
gi-26107265 (SEQ ID NO: 89)	gi-26107309 (SEQ ID NO: 93)	gi-26107393 (SEQ ID NO: 94)
gi-26107452 (SEQ ID NO: 96)	gi-26107498 (SEQ ID NO: 112)	gi-26107502 (SEQ ID NO: 114)
gi-26107517 (SEQ ID NO: 124)	gi-26107518 (SEQ ID NO: 125)	gi-26107550 (SEQ ID NO: 138)
gi-26107554 (SEQ ID NO: 139)	gi-26107666 (SEQ ID NO: 142)	gi-26107673 (SEQ ID NO: 143)
gi-26107688 (SEQ ID NO: 145)	gi-26107692 (SEQ ID NO: 147)	gi-26107698 (SEQ ID NO: 149)
gi-26107699 (SEQ ID NO: 150)	gi-26107708 (SEQ ID NO: 153)	gi-26107719 (SEQ ID NO: 155)
gi-26107739 (SEQ ID NO: 159)	gi-26107741 (SEQ ID NO: 160)	gi-26107751 (SEQ ID NO: 161)
gi-26107759 (SEQ ID NO: 165)	gi-26107774 (SEQ ID NO: 167)	gi-26107794 (SEQ ID NO: 170)
gi-26107808 (SEQ ID NO: 171)	gi-26107835 (SEQ ID NO: 176)	gi-26107843 (SEQ ID NO: 178)
gi-26107851 (SEQ ID NO: 179)	gi-26107855 (SEQ ID NO: 181)	gi-26107861 (SEQ ID NO: 183)
gi-26107864 (SEQ ID NO: 184)	gi-26107890 (SEQ ID NO: 188)	gi-26107926 (SEQ ID NO: 194)
gi-26107942 (SEQ ID NO: 195)	gi-26107959 (SEQ ID NO: 197)	gi-26107960 (SEQ ID NO: 198)
gi-26107961 (SEQ ID NO: 199)	gi-26107962 (SEQ ID NO: 200)	gi-26108028 (SEQ ID NO: 202)
gi-26108073 (SEQ ID NO: 207)	gi-26108075 (SEQ ID NO: 208)	gi-26108076 (SEQ ID NO: 209)
gi-26108084 (SEQ ID NO: 210)	gi-26108096 (SEQ ID NO: 211)	gi-26108136 (SEQ ID NO: 212)
gi-26108216 (SEQ ID NO: 225)	gi-26108422 (SEQ ID NO: 228)	gi-26108650 (SEQ ID NO: 232)
gi-26108651 (SEQ ID NO: 233)	gi-26108656 (SEQ ID NO: 235)	gi-26108657 (SEQ ID NO: 236)
gi-26108659 (SEQ ID NO: 237)	gi-26108660 (SEQ ID NO: 238)	gi-26108663 (SEQ ID NO: 240)
gi-26108668 (SEQ ID NO: 241)	gi-26108779 (SEQ ID NO: 277)	gi-26108811 (SEQ ID NO: 279)
gi-26108813 (SEQ ID NO: 280)	gi-26108816 (SEQ ID NO: 281)	gi-26108818 (SEQ ID NO: 283)
gi-26108826 (SEQ ID NO: 284)	gi-26108898 (SEQ ID NO: 289)	gi-26108915 (SEQ ID NO: 290)
gi-26109141 (SEQ ID NO: 306)	gi-26109160 (SEQ ID NO: 308)	gi-26109178 (SEQ ID NO: 309)
gi-26109396 (SEQ ID NO: 314)	gi-26109400 (SEQ ID NO: 315)	gi-26109406 (SEQ ID NO: 317)
gi-26109490 (SEQ ID NO: 322)	gi-26109512 (SEQ ID NO: 323)	gi-26109519 (SEQ ID NO: 325)
gi-26109522 (SEQ ID NO: 326)	gi-26109548 (SEQ ID NO: 327)	gi-26109730 (SEQ ID NO: 348)
gi-26109753 (SEQ ID NO: 352)	gi-26109761 (SEQ ID NO: 354)	gi-26109807 (SEQ ID NO: 357)
gi-26109809 (SEQ ID NO: 358)	gi-26109811 (SEQ ID NO: 359)	gi-26109831 (SEQ ID NO: 368)
gi-26109842 (SEQ ID NO: 374)	gi-26109844 (SEQ ID NO: 375)	gi-26109849 (SEQ ID NO: 377)
gi-26109861 (SEQ ID NO: 381)	gi-26109871 (SEQ ID NO: 387)	gi-26109877 (SEQ ID NO: 389)
gi-26109878 (SEQ ID NO: 390)	gi-26109879 (SEQ ID NO: 391)	gi-26109908 (SEQ ID NO: 395)
gi-26109915 (SEQ ID NO: 396)	gi-26109927 (SEQ ID NO: 397)	gi-26109935 (SEQ ID NO: 401)
gi-26109936 (SEQ ID NO: 402)	gi-26109938 (SEQ ID NO: 403)	gi-26109941 (SEQ ID NO: 404)
gi-26109956 (SEQ ID NO: 407)	gi-26109994 (SEQ ID NO: 412)	gi-26110029 (SEQ ID NO: 421)
gi-26110198 (SEQ ID NO: 427)	gi-26110532 (SEQ ID NO: 441)	gi-26110614 (SEQ ID NO: 445)
gi-26110650 (SEQ ID NO: 446)	gi-26110671 (SEQ ID NO: 449)	gi-26110746 (SEQ ID NO: 461)
gi-26110762 (SEQ ID NO: 466)	gi-26110764 (SEQ ID NO: 467)	gi-26110766 (SEQ ID NO: 468)
gi-26110782 (SEQ ID NO: 473)	gi-26110785 (SEQ ID NO: 475)	gi-26110794 (SEQ ID NO: 479)
gi-26110844 (SEQ ID NO: 487)	gi-26110856 (SEQ ID NO: 488)	gi-26110976 (SEQ ID NO: 490)
gi-26110977 (SEQ ID NO: 491)	gi-26110987 (SEQ ID NO: 493)	gi-26111303 (SEQ ID NO: 541)
gi-26111394 (SEQ ID NO: 547)	gi-26111411 (SEQ ID NO: 554)	gi-26111424 (SEQ ID NO: 561)
gi-26111431 (SEQ ID NO: 566)	gi-26111525 (SEQ ID NO: 573)	gi-26111536 (SEQ ID NO: 574)
gi-26111542 (SEQ ID NO: 576)	gi-26111573 (SEQ ID NO: 578)	gi-26111614 (SEQ ID NO: 585)
gi-26111620 (SEQ ID NO: 586)	gi-26111630 (SEQ ID NO: 588)	gi-26111673 (SEQ ID NO: 595)

[0408] 表 3-66 种优选抗原

[0409]

1	gi-26106348	(SEQ ID NO: 6)	
2	gi-26106390	(SEQ ID NO: 7)	+
3	gi-26106664	(SEQ ID NO: 57)	
4	gi-26106931	(SEQ ID NO: 67)	+
5	gi-26107030	(SEQ ID NO: 68)	
6	gi-26107260	(SEQ ID NO: 87)	
7	gi-26107452	(SEQ ID NO: 96)	
8	gi-26107502	(SEQ ID NO: 114)	
9	gi-26107517	(SEQ ID NO: 124)	+
10	gi-26107518	(SEQ ID NO: 125)	+
11	gi-26107666	(SEQ ID NO: 142)	
12	gi-26107741	(SEQ ID NO: 160)	
13	gi-26107835	(SEQ ID NO: 176)	+
14	gi-26107864	(SEQ ID NO: 184)	
15	gi-26107890	(SEQ ID NO: 188)	
16	gi-26108075	(SEQ ID NO: 208)	+
17	gi-26108076	(SEQ ID NO: 209)	
18	gi-26108084	(SEQ ID NO: 210)	
19	gi-26108096	(SEQ ID NO: 211)	
20	gi-26108136	(SEQ ID NO: 212)	
21	gi-26108216	(SEQ ID NO: 225)	+
22	gi-26108650	(SEQ ID NO: 232)	+
23	gi-26108651	(SEQ ID NO: 233)	+
24	gi-26108656	(SEQ ID NO: 235)	
25	gi-26108657	(SEQ ID NO: 236)	+
26	gi-26108659	(SEQ ID NO: 237)	+
27	gi-26108660	(SEQ ID NO: 238)	
28	gi-26108668	(SEQ ID NO: 241)	
29	gi-26108811	(SEQ ID NO: 279)	+
30	gi-26108813	(SEQ ID NO: 280)	+
31	gi-26108816	(SEQ ID NO: 281)	
32	gi-26108818	(SEQ ID NO: 283)	
33	gi-26109160	(SEQ ID NO: 308)	
34	gi-26109396	(SEQ ID NO: 314)	
35	gi-26109519	(SEQ ID NO: 325)	

[0410]

36	gi-26109522	(SEQ ID NO: 326)	+
37	gi-26109548	(SEQ ID NO: 327)	+
38	gi-26109753	(SEQ ID NO: 352)	
39	gi-26109761	(SEQ ID NO: 354)	
40	gi-26109807	(SEQ ID NO: 357)	
41	gi-26109809	(SEQ ID NO: 358)	
42	gi-26109831	(SEQ ID NO: 368)	+
43	gi-26109842	(SEQ ID NO: 374)	
44	gi-26109844	(SEQ ID NO: 375)	
45	gi-26109871	(SEQ ID NO: 387)	
46	gi-26109877	(SEQ ID NO: 389)	+
47	gi-26109878	(SEQ ID NO: 390)	+
48	gi-26109941	(SEQ ID NO: 404)	
49	gi-26109956	(SEQ ID NO: 407)	
50	gi-26109994	(SEQ ID NO: 412)	
51	gi-26110029	(SEQ ID NO: 421)	
52	gi-26110614	(SEQ ID NO: 445)	
53	gi-26110650	(SEQ ID NO: 446)	
54	gi-26110746	(SEQ ID NO: 461)	
55	gi-26110766	(SEQ ID NO: 468)	
56	gi-26110782	(SEQ ID NO: 473)	
57	gi-26110844	(SEQ ID NO: 487)	
58	gi-26110976	(SEQ ID NO: 490)	
59	gi-26110977	(SEQ ID NO: 491)	
60	gi-26110987	(SEQ ID NO: 493)	
61	gi-26111303	(SEQ ID NO: 541)	
62	gi-26111424	(SEQ ID NO: 561)	
63	gi-26111536	(SEQ ID NO: 574)	+
64	gi-26111542	(SEQ ID NO: 576)	
65	gi-26111630	(SEQ ID NO: 588)	
66	gi-26111673	(SEQ ID NO: 595)	

[0411] 表 4-K12 命中

SEQ ID	K12			JW3110			DH10B		
	e 值	重叠	%id	e 值	重叠	%id	e 值	重叠	%i d
1	1.E-50	87/100	87	4.E-50	86/100	86	7.E-50	86/100	86
2			10			10	1.E-17	42/63	66
3	2.E-29	81/263	30	2.E-29	81/263	30	7.E-26	45/123	36
4	1.E-32	135/531	25	1.E-32	135/531	25	2.E-32	135/531	25
5			10			10			10
6	5.E-07	30/112	26	5.E-07	30/112	26	8.E-07	30/112	26
7			10			10			10
8			10			10			10
9			10			10			10
10			10			10			10
11	1.E-31	86/286	30	3.E-31	85/284	29	8.E-24	60/184	32
12	0.E+00	540/625	86	0.E+00	540/625	86	0.E+00	526/628	83
13	e-147	259/422	61	e-147	259/422	61	e-144	224/385	58
14	7.E-86	152/198	76	7.E-86	152/198	76	1.E-85	152/198	76
15	2.E-75	142/202	70	2.E-75	142/202	70	3.E-75	142/202	70
16	1.E-79	144/189	76	1.E-79	144/189	76	2.E-79	144/189	76
17	0.E+00	750/859	87	0.E+00	750/859	87	0.E+00	750/859	87
18	e-124	210/246	85	e-124	210/246	85	e-123	210/246	85
19	2.E-93	169/196	86	2.E-93	169/196	86	9.E-71	140/209	66
20	1.E-80	143/159	89	1.E-80	143/159	89	2.E-80	143/159	89
21			10			10	3.E-14	33/51	64
22	0.E+00	672/753	89	0.E+00	672/753	89	0.E+00	418/495	84
23			10			10			10
24			10			10			10
25			10			10	4.E-52	104/247	42
26			10			10			10
27			10			10			10
28			10			10			10
29	6.E-22	51/146	34	6.E-22	51/146	34	2.E-20	53/148	35
30			10			10			10
31			10			10			10
32			10			10			10
33	6.E-32	167/753	22	6.E-32	167/753	22	5.E-14	91/420	21
34	2.E-05	42/170	24	2.E-05	42/170	24			10
35	1.E-39	108/328	32	1.E-39	108/328	32	6.E-40	109/330	33
36			10			10			10
37	2.E-15	95/465	20	2.E-15	95/465	20	4.E-15	95/465	20
38			10			10			10
39			10			10			10
40			10			10			10
41			10			10			10
42			10			10			10
43			10			10			10
44	2.E-43	96/253	37	2.E-43	96/253	37	3.E-43	96/254	37
45	4.E-72	148/422	35	4.E-72	148/422	35	5.E-67	141/388	36
46	2.E-52	122/398	30	2.E-52	122/398	30	6.E-48	93/318	29
47	2.E-18	260/1249	20	2.E-18	260/1249	20	7.E-12	147/708	20

[0412]

[0413]

48	1.E-18	133/596	22	1.E-18	133/596	22	2.E-24	146/605	24
49			10			10			10
50			10			10			10
51	7.E-06	59/250	23	7.E-06	59/250	23			10
52	2.E-38	137/455	30	2.E-38	137/455	30	1.E-36	131/573	22
53	1.E-06	58/216	26	1.E-06	58/216	26	4.E-06	73/329	22
54	2.E-20	306/1435	21	2.E-20	306/1435	21	3.E-19	334/1518	22
55			10			10			10
56			10			10			10
57			10			10			10
58	2.E-24	220/1026	21	2.E-24	220/1026	21	2.E-20	165/740	22
59			10			10			10
60			10			10			10
61	5.E-23	82/266	30	5.E-23	82/266	30	8.E-23	82/266	30
62	1.E-59	123/298	41	2.E-59	123/298	41	2.E-59	123/298	41
63	4.E-49	97/223	43	3.E-36	87/254	34	4.E-54	110/258	42
64	5.E-49	124/431	28	5.E-49	124/431	28	6.E-45	98/295	33
65			10			10			10
66			10			10			10
67			10			10			10
68	5.E-06	46/189	24	5.E-06	46/189	24	2.E-05	37/149	24
69	2.E-12	43/149	28	4.E-12	42/146	28	7.E-12	42/146	28
70	2.E-79	148/237	62	2.E-79	148/237	62	3.E-79	148/237	62
71	3.E-30	74/227	32	3.E-30	74/227	32	2.E-27	84/260	32
72	4.E-38	110/379	29	4.E-38	110/379	29	6.E-38	110/379	29
73	2.E-50	119/324	36	1.E-50	119/324	36	3.E-50	119/324	36
74			10			10	1.E-09	26/34	76
75			10			10			10
76			10			10			10
77			10			10			10
78			10			10			10
79			10			10			10
80			10			10			10
81			10			10			10
82	3.E-16	57/172	33	3.E-16	57/172	33	5.E-16	57/172	33
83			10			10	0.002	24/102	23
84			10			10			10
85			10			10			10
86			10			10			10
87	6.E-10	84/348	24	6.E-10	84/348	24	7.E-09	44/140	31
88			10			10			10
89			10			10			10
90	7.E-05	48/208	23	7.E-05	48/208	23	5.E-05	52/185	28
91			10			10			10
92	1.E-18	37/67	55	1.E-18	37/67	55	2.E-18	37/67	55
93			10			10	1.E-23	55/79	69
94			10			10	9.E-47	85/96	88
95			10			10			10
96	2.E-05	17/43	39	2.E-05	17/43	39			10
97	e-101	191/462	41	e-101	191/462	41	e-100	191/462	41
98			10			10			10

[0414]

99	8.E-51	92/114	80	8.E-51	92/114	80	1.E-50	92/114	80
100	7.E-67	160/414	38	7.E-67	160/414	38	1.E-66	160/414	38
101	2.E-35	102/322	31	2.E-35	102/322	31	4.E-35	102/322	31
102			10			10			10
103			10			10			10
104			10			10			10
105			10			10	0.001	27/84	32
106			10			10	0.005	22/63	34
107			10			10			10
108			10			10			10
109			10			10			10
110			10			10	3.E-04	76/334	22
111			10			10			10
112			10			10			10
113			10			10			10
114			10			10			10
115			10			10			10
116	8.E-50	130/503	25	8.E-50	130/503	25	1.E-49	130/503	25
117			10			10			10
118			10			10			10
119			10			10			10
120	4.E-58	117/182	64	4.E-58	117/182	64	2.E-36	87/183	47
121	8.E-51	95/171	55	8.E-51	95/171	55	7.E-17	50/149	33
122	6.E-82	144/223	64	6.E-82	144/223	64	8.E-48	94/224	41
123	0.E+00	546/853	64	0.E+00	546/853	64	0.E+00	384/839	45
124	8.E-30	69/171	40	8.E-30	69/171	40	4.E-18	52/154	33
125	6.E-27	68/151	45	6.E-27	68/151	45	5.E-23	70/169	41
126	0.E+00	387/755	51	0.E+00	387/755	51	0.E+00	156/246	63
127			10			10			10
128	4.E-65	157/564	27	4.E-65	157/564	27	8.E-65	157/564	27
129			10			10			10
130			10			10			10
131			10			10			10
132	1.E-31	86/286	30	3.E-31	85/284	29	8.E-24	60/184	32
133	4.E-17	132/556	23	4.E-17	132/556	23	7.E-17	132/556	23
134			10			10			10
135	1.E-07	36/134	26	1.E-07	36/134	26	2.E-07	36/134	26
136	5.E-53	118/315	37	5.E-53	118/315	37	9.E-53	118/315	37
137	0.E+00	917/1091	84	0.E+00	897/1039	86	0.E+00	257/288	89
138			10			10			10
139			10			10	1.E-55	113/264	42
140			10			10	2.E-16	38/43	88
141			10			10	1.E-15	33/43	76
142	e-133	232/262	88	e-133	232/262	88	e-133	232/262	88
143			10			10	1.E-93	162/181	89
144			10			10	0.009	14/20	70
145			10			10			10
146			10			10	6.E-04	14/23	60
147			10			10	3.E-14	33/57	57
148	e-179	296/348	85	e-179	296/348	85	e-156	146/167	87
149			10			10			10

[0415]

150	6.E-40	66/107	61	6.E-40	66/107	61	1.E-39	66/107	61
151	8.E-30	57/71	80	8.E-30	57/71	80	1.E-29	57/71	80
152	3.E-44	96/154	62	1.E-44	97/155	62	2.E-44	97/154	62
153			10			10			10
154	2.E-19	48/118	40	2.E-19	48/118	40	1.E-18	51/121	42
155			10			10			10
156			10			10			10
157	1.E-06	23/42	54	1.E-06	23/42	54	2.E-06	23/42	54
158			10			10			10
159			10			10	0.008	25/56	44
160			10			10			10
161			10			10			10
162	8.E-09	69/284	24	1.E-05	45/175	25	1.E-08	69/284	24
163			10			10			10
164			10			10			10
165			10			10			10
166			10			10			10
167			10			10			10
168			10			10			10
169	1.E-31	86/286	30	3.E-31	85/284	29	8.E-24	60/184	32
170			10			10			10
171			10			10			10
172			10			10			10
173			10			10			10
174			10			10			10
175	1.E-31	86/286	30	3.E-31	85/284	29	8.E-24	60/184	32
176	5.E-13	33/81	40	5.E-13	33/81	40	8.E-13	33/81	40
177	8.E-31	65/118	55	8.E-31	65/118	55	1.E-30	65/118	55
178			10			10			10
179			10			10			10
180	1.E-07	24/42	57	1.E-07	24/42	57	2.E-07	24/42	57
181			10			10			10
182			10			10	0.005	18/32	56
183			10			10	1.E-05	33/81	40
184			10			10			10
185	2.E-19	64/250	25	2.E-19	64/250	25	3.E-19	64/250	25
186	2.E-23	63/235	26	2.E-23	63/235	26	4.E-23	63/235	26
187	5.E-13	59/274	21	5.E-13	59/274	21	8.E-13	59/274	21
188			10			10	0.002	19/31	61
189	1.E-11	78/262	29	1.E-11	78/262	29	6.E-14	143/685	20
190	4.E-32	74/238	31	4.E-32	74/238	31	7.E-32	74/238	31
191	3.E-46	116/278	41	3.E-46	116/278	41	6.E-46	116/278	41
192	7.E-06	54/229	23	7.E-06	54/229	23	1.E-05	54/229	23
193			10			10			10
194			10			10			10
195			10	1.E-23	51/92	55	2.E-23	51/92	55
196	2.E-26	85/314	27	2.E-26	85/314	27	3.E-26	85/314	27
197			10			10			10
198	9.E-07	46/194	23	1.E-06	38/158	24	2.E-06	38/158	24

[0416]

199			10			10			10
200			10			10			10
201	3.E-95	186/362	51	3.E-95	186/362	51	4.E-95	191/383	49
202			10			10			10
203	0.E+00	569/1007	56	0.E+00	569/1007	56	0.E+00	546/1003	54
204	4.E-74	166/456	36	4.E-74	166/456	36	3.E-71	90/190	47
205	9.E-50	115/382	30	6.E-47	108/367	29	1.E-33	67/184	36
206			10			10	2.E-27	52/65	80
207	6.E-17	41/54	75	6.E-17	41/54	75	1.E-16	41/54	75
208	2.E-12	32/86	37	2.E-12	32/86	37	3.E-12	32/86	37
209	6.E-09	33/124	26	6.E-09	33/124	26	5.E-08	22/56	39
210			10			10			10
211			10			10	0.002	13/15	86
212	2.E-21	50/56	89	2.E-21	50/56	89	4.E-21	50/56	89
213			10			10			10
214			10			10			10
215			10			10			10
216	e-119	199/226	88	e-119	199/226	88	e-119	199/226	88
217			10			10	e-121	232/327	70
218			10			10	1.E-13	35/45	77
219	0.E+00	497/862	57	0.E+00	497/862	57	0.E+00	231/536	43
220	1.E-75	133/208	63	1.E-75	133/208	63	1.E-52	100/217	46
221	4.E-62	121/187	64	4.E-62	121/187	64	6.E-37	84/171	49
222	2.E-54	97/194	50	2.E-54	97/194	50	3.E-49	77/156	49
223	e-167	285/541	52	e-167	285/541	52	e-166	285/541	52
224	1.E-72	163/443	36	1.E-72	163/443	36	2.E-72	163/443	36
225	2.E-13	42/102	41	2.E-13	42/102	41	3.E-13	42/102	41
226			10			10	3.E-13	34/40	85
227	9.E-40	76/86	88			10	2.E-39	76/86	88
228			10			10			10
229			10			10	9.E-15	35/42	83
230	e-108	205/382	53	e-108	205/382	53	e-114	149/247	60
231			10			10			10
232	9.E-05	86/394	21	9.E-05	86/394	21			10
233			10			10			10
234			10			10			10
235			10			10			10
236			10			10			10
237			10			10			10
238			10			10			10
239			10			10			10
240			10			10			10
241			10			10			10
242	1.E-20	99/376	26	1.E-20	99/376	26	3.E-20	99/376	26
243	3.E-60	172/595	28	3.E-60	172/595	28	6.E-60	172/595	28
244	2.E-60	169/578	29	2.E-60	169/578	29	3.E-60	169/578	29
245	1.E-57	238/911	26	1.E-57	238/911	26	2.E-21	47/142	33
246			10			10			10
247	7.E-26	83/277	29	7.E-26	83/277	29	1.E-25	83/277	29
248			10			10	0.002	32/127	25
249			10			10			10

[0417]

250	4.E-80	169/408	41	4.E-80	169/408	41	7.E-76	112/232	48
251	2.E-15	87/336	25	2.E-15	87/336	25	3.E-15	87/336	25
252	2.E-22	95/372	25	2.E-22	95/372	25	3.E-18	84/322	26
253	1.E-63	269/1057	25	1.E-63	269/1057	25	6.E-28	64/193	33
254	6.E-17	88/436	20	6.E-17	88/436	20	0.007	45/208	21
255	3.E-63	258/939	27	3.E-63	258/939	27	6.E-36	62/192	32
256	8.E-86	298/1062	28	8.E-86	298/1062	28	6.E-47	70/191	36
257	4.E-27	110/434	25	4.E-27	110/434	25	7.E-27	110/434	25
258	e-102	312/1088	28	e-102	312/1088	28	1.E-25	80/229	34
259	5.E-23	84/328	25	5.E-23	84/328	25	9.E-23	84/328	25
260			10			10			10
261			10			10			10
262	9.E-41	97/285	34	9.E-41	97/285	34	2.E-40	97/285	34
263	4.E-24	109/441	24	1.E-23	108/436	24	6.E-24	109/448	24
264	7.E-22	67/215	31	7.E-22	67/215	31	1.E-21	67/215	31
265	6.E-64	249/954	26	6.E-64	249/954	26	2.E-50	64/189	33
266			10			10			10
267			10			10			10
268			10			10			10
269			10			10			10
270			10			10			10
271	1.E-39	108/328	32	1.E-39	108/328	32	6.E-40	109/330	33
272	2.E-05	42/170	24	2.E-05	42/170	24			10
273	6.E-32	167/753	22	6.E-32	167/753	22	5.E-14	91/420	21
274			10			10			10
275			10			10			10
276	3.E-60	102/153	66	3.E-60	102/153	66	5.E-60	102/153	66
277			10			10	6.E-38	80/175	45
278	0.E+00	338/471	71	0.E+00	338/471	71	0.E+00	198/290	68
279			10			10			10
280			10			10			10
281			10			10			10
282			10			10			10
283	7.E-25	98/406	24	7.E-25	98/406	24	7.E-23	82/315	26
284			10			10	4.E-09	24/33	72
285			10			10			10
286			10			10			10
287			10			10			10
288	0.E+00	520/641	81	0.E+00	408/526	77	0.E+00	776/924	83
289			10			10	4.E-26	60/83	72
290			10			10	6.E-19	43/49	87
291	e-164	277/313	88	e-164	277/313	88	e-172	295/352	83
292			10			10	8.E-16	36/42	85
293			10			10	3.E-30	60/72	83
294			10			10	e-155	177/224	79
295	0.E+00	1036/1252	82	0.E+00	1036/125 2	82	0.E+00	521/682	76
296	2.E-78	133/153	86	2.E-78	133/153	86	3.E-78	133/153	86
297			10			10	5.E-14	30/37	81
298	6.E-75	151/295	51	4.E-73	148/290	51	2.E-74	150/295	50
299	2.E-67	123/152	80	2.E-67	123/152	80	4.E-67	123/152	80

[0418]

300	1.E-51	98/162	60	1.E-51	98/162	60	2.E-51	98/162	60
301	2.E-57	106/167	63	2.E-57	106/167	63	3.E-57	106/167	63
302	e-107	186/250	74	e-107	186/250	74	e-107	186/250	74
303	0.E+00	444/578	76	0.E+00	444/578	76	0.E+00	681/883	77
304	4.E-72	137/189	72	4.E-72	137/189	72	7.E-67	91/124	73
305	0.E+00	351/456	76	0.E+00	351/456	76	0.E+00	351/456	76
306			10			10			10
307	e-103	390/1363	28	e-103	390/1363	28	e-131	290/918	31
308	3.E-43	81/91	89	3.E-43	81/91	89	5.E-43	81/91	89
309	7.E-51	98/114	85			10	4.E-53	102/119	85
310	5.E-05	104/439	23	5.E-05	104/439	23	5.E-06	207/951	21
311			10			10			10
312	7.E-71	159/458	34	9.E-71	159/458	34	5.E-67	139/378	36
313			10			10	2.E-06	22/37	59
314			10			10			10
315			10			10	9.E-09	61/152	40
316			10			10	0.005	18/32	56
317			10			10			10
318	1.E-07	24/42	57	1.E-07	24/42	57	2.E-07	24/42	57
319	1.E-79	148/165	89	3.E-79	147/165	89	5.E-79	147/165	89
320			10			10			10
321			10			10			10
322			10			10			10
323			10			10	e-133	258/343	75
324			10			10			10
325	5.E-31	62/134	46	5.E-31	62/134	46	8.E-31	62/134	46
326			10			10			10
327			10			10	0.004	25/90	27
328			10			10	7.E-07	23/36	63
329			10			10			10
330	2.E-49	115/308	37	2.E-49	115/308	37	2.E-41	100/273	36
331	1.E-16	46/153	30	1.E-16	46/153	30	7.E-13	36/118	30
332	e-131	224/291	76	e-131	224/291	76	e-122	209/255	81
333			10			10	2.E-17	40/45	88
334			10			10			10
335			10			10			10
336	4.E-14	40/104	38	4.E-14	40/104	38	4.E-08	45/127	35
337			10			10			10
338			10			10			10
339			10			10			10
340			10			10			10
341			10			10			10
342			10			10			10
343			10			10	0.006	24/88	27
344			10			10			10
345	6.E-30	77/250	30	6.E-30	77/250	30	1.E-29	77/250	30
346	4.E-44	97/184	52	4.E-44	97/184	52	1.E-36	76/148	51
347	e-115	218/523	41	e-115	218/523	41	e-115	218/523	41
348			10			10	2.E-15	36/49	73
349	e-165	298/343	86	e-165	298/343	86	e-145	271/343	79
350			10			10			10

[0419]

351			10			10			10
352	2.E-23	66/215	30	2.E-23	66/215	30	3.E-23	68/209	32
353	2.E-11	46/158	29	2.E-11	46/158	29	4.E-11	46/158	29
354			10	7.E-10	31/46	67	2.E-15	49/101	48
355			10			10			10
356			10			10			10
357	2.E-23	74/229	32	2.E-23	74/229	32	4.E-23	74/229	32
358			10			10			10
359			10			10			10
360			10			10			10
361			10			10	0.003	32/100	32
362	2.E-73	179/543	32	2.E-73	179/543	32	3.E-73	179/543	32
363			10			10			10
364			10			10			10
365	4.E-05	32/119	26	4.E-05	32/119	26	3.E-04	32/137	23
366	2.E-05	46/185	24	2.E-05	46/185	24			10
367	3.E-09	58/177	32	3.E-09	58/177	32	4.E-08	52/157	33
368			10			10			10
369	e-162	316/830	38	e-146	306/844	36	0.E+00	359/827	43
370	3.E-08	42/160	26	3.E-08	42/160	26	6.E-05	38/139	27
371	2.E-16	63/183	34	2.E-16	63/183	34	2.E-11	38/130	29
372	3.E-22	55/159	34	3.E-22	55/159	34	6.E-22	55/159	34
373			10			10			10
374	6.E-06	25/83	30	6.E-06	25/83	30	1.E-05	25/83	30
375	2.E-07	45/177	25	2.E-07	45/177	25	3.E-07	45/177	25
376			10			10			10
377			10			10			10
378			10			10			10
379	7.E-81	214/679	31	7.E-81	214/679	31	1.E-80	214/679	31
380	5.E-54	108/122	88	2.E-53	107/122	87			10
381			10			10			10
382	7.E-21	212/963	22	7.E-21	212/963	22	8.E-18	179/807	22
383			10			10			10
384			10			10			10
385			10			10			10
386			10			10			10
387	3.E-09	86/354	24	3.E-09	86/354	24	7.E-08	96/395	24
388	e-108	176/316	55	e-108	176/316	55	e-107	176/316	55
389	6.E-99	159/348	45	6.E-99	159/348	45	1.E-98	159/348	45
390	2.E-87	144/235	61	2.E-87	144/235	61	4.E-87	144/235	61
391			10			10			10
392	0.E+00	316/472	66	0.E+00	316/472	66	e-170	273/410	66
393	4.E-79	152/284	53	4.E-79	152/284	53	7.E-79	152/284	53
394	e-138	241/456	52	e-138	241/456	52	e-138	241/456	52
395			10			10			10
396			10			10	4.E-51	94/107	87
397			10			10			10
398			10			10			10
399			10			10	0.004	43/246	17
400	2.E-08	54/204	26	2.E-08	54/204	26			10
401			10			10			10

402			10			10			10
403			10			10			10
404	5.E-06	34/156	21	5.E-06	34/156	21			10
405	2.E-26	137/573	23	2.E-26	137/573	23	2.E-21	91/374	24
406	2.E-39	100/356	28	2.E-39	100/356	28	2.E-39	104/376	27
407	3.E-25	97/340	28	3.E-25	97/340	28	6.E-25	97/340	28
408	8.E-55	100/184	54	8.E-55	100/184	54	1.E-54	100/184	54
409	e-122	232/464	50	e-122	232/464	50	e-121	232/475	48
410	e-108	189/338	55	e-108	189/338	55	1.E-44	108/341	31
411	5.E-33	89/327	27	5.E-33	89/327	27	9.E-33	89/327	27
412	1.E-06	32/154	20	1.E-06	32/154	20			10
413	4.E-77	151/414	36	4.E-77	151/414	36	3.E-79	154/423	36
414	2.E-10	51/206	24	2.E-10	51/206	24	4.E-10	51/206	24
415	3.E-08	60/221	27	3.E-08	60/221	27	6.E-05	46/162	28
416	2.E-42	102/313	32	2.E-42	102/313	32	3.E-42	102/313	32
417	4.E-53	127/321	39	4.E-53	127/321	39	4.E-53	128/324	39
418			10			10			10
419	7.E-14	64/227	28	7.E-14	64/227	28	3.E-13	62/221	28
420	2.E-09	40/126	31	2.E-09	40/126	31	3.E-09	40/126	31
421			10			10	2.E-18	40/59	67
422	1.E-54	110/185	59	1.E-54	110/185	59	3.E-50	103/172	59
423	0.E+00	451/803	56	0.E+00	348/818	42	0.E+00	453/803	56
424	2.E-68	117/227	51	2.E-68	117/227	51	1.E-63	99/196	50
425	1.E-59	134/357	37	1.E-59	134/357	37	7.E-55	119/313	38
426	2.E-58	113/257	43	2.E-58	113/257	43	3.E-58	113/258	43
427			10			10	1.E-36	75/107	70
428	3.E-63	133/312	42	3.E-63	133/312	42	6.E-63	133/312	42
429	9.E-36	95/292	32	9.E-36	95/292	32	2.E-35	95/292	32
430			10			10			10
431			10			10			10
432			10			10			10
433	1.E-14	45/163	27	1.E-14	45/163	27	1.E-12	57/223	25
434	2.E-37	84/227	37	2.E-37	84/227	37	4.E-37	84/227	37
435	2.E-17	59/183	32	2.E-17	59/183	32	4.E-17	59/183	32
436	0.E+00	404/834	48	0.E+00	404/834	48	0.E+00	256/536	47
437	2.E-53	102/224	45	2.E-53	102/224	45	4.E-43	88/218	40
438	6.E-11	53/180	29	6.E-11	53/180	29	1.E-10	53/180	29
439	9.E-13	33/93	35	9.E-13	33/93	35	1.E-12	33/93	35
440	e-100	178/437	40	e-100	178/437	40	2.E-99	178/437	40
441			10			10			10
442	1.E-29	172/695	24	1.E-29	172/695	24	2.E-29	172/695	24
443	2.E-22	67/220	30	2.E-22	67/220	30	4.E-22	67/220	30
444	2.E-55	126/321	39	2.E-55	126/321	39	4.E-54	117/284	41
445			10			10	3.E-43	83/100	83
446	5.E-61	112/149	75	5.E-61	112/149	75	2.E-56	63/74	85
447	0.E+00	339/390	86	0.E+00	339/390	86	0.E+00	361/425	84
448			10			10	e-107	182/230	79
449			10			10	3.E-64	113/136	83
450			10			10			10
451	3.E-17	244/1144	21	3.E-17	244/1144	21	1.E-13	157/679	23
452			10			10	8.E-35	67/87	77

[0420]

[0421]

453	1.E-44	115/390	29	1.E-44	115/390	29	2.E-44	117/394	29
454	3.E-18	46/139	33	3.E-18	46/139	33	4.E-14	24/72	33
455	e-143	243/332	73	e-143	243/332	73	e-148	251/344	72
456	9.E-69	126/305	41	3.E-68	123/296	41	2.E-68	126/305	41
457	2.E-36	96/280	34	2.E-36	96/280	34	7.E-36	87/232	37
458	2.E-75	142/328	43	2.E-75	142/328	43	3.E-75	142/328	43
459	2.E-23	51/99	51	2.E-23	51/99	51	4.E-23	51/99	51
460			10			10			10
461	2.E-22	91/347	26	2.E-22	91/347	26	7.E-18	86/330	26
462	e-103	177/416	42	e-103	177/416	42	e-103	177/416	42
463	2.E-31	103/382	26	2.E-31	103/382	26	3.E-31	103/382	26
464	6.E-95	184/480	38	6.E-95	184/480	38	1.E-94	184/480	38
465	3.E-89	169/470	35	3.E-89	169/470	35	6.E-89	169/470	35
466			10			10			10
467			10			10			10
468			10			10			10
469			10			10			10
470			10			10			10
471	2.E-43	98/237	41	2.E-43	98/237	41	4.E-43	98/237	41
472	e-115	203/392	51	e-115	203/392	51	e-112	185/345	53
473	3.E-13	32/47	68	3.E-13	32/47	68	5.E-13	32/47	68
474	1.E-07	52/206	25	1.E-07	52/206	25	2.E-07	52/206	25
475			10			10			10
476	3.E-15	56/188	29	3.E-15	56/188	29	5.E-15	56/188	29
477	2.E-54	110/268	41	2.E-54	110/268	41	3.E-54	110/268	41
478			10			10			10
479			10			10			10
480	e-143	243/382	63	e-143	243/382	63	e-142	243/382	63
481	e-128	215/344	62	e-128	215/344	62	e-128	215/344	62
482			10			10			10
483			10			10			10
484	3.E-40	97/226	42	3.E-40	97/226	42	2.E-20	49/89	55
485			10			10			10
486			10	5.E-46	87/97	89	4.E-56	105/120	87
487			10			10			10
488			10			10	3.E-18	41/52	78
489	1.E-38	73/118	61	1.E-38	73/118	61	9.E-49	92/143	64
490			10			10	5.E-07	27/36	75
491			10			10	1.E-15	34/47	72
492			10			10			10
493			10			10			10
494	2.E-27	55/82	67	2.E-27	55/82	67	4.E-27	55/82	67
495			10			10			10
496	e-105	213/487	43	e-105	213/487	43	e-105	213/487	43
497	0.E+00	452/658	68	0.E+00	452/659	68	0.E+00	434/663	65
498	3.E-17	64/268	23	3.E-17	64/268	23	5.E-15	62/273	22
499	4.E-49	101/294	34	4.E-49	101/294	34	5.E-46	97/282	34
500	3.E-31	106/400	26	3.E-31	106/400	26			10
501	2.E-75	155/319	48	2.E-75	155/319	48	8.E-69	123/232	53
502	e-119	216/466	46	e-119	216/466	46	e-115	214/461	46
503	e-100	214/511	41	e-100	214/511	41	2.E-94	134/277	48

[0422]

504			10			10			10
505			10			10			10
506			10			10			10
507	5.E-31	83/202	41	5.E-31	83/202	41	3.E-44	91/195	46
508	e-103	186/260	71	e-103	186/260	71	e-103	186/260	71
509	e-112	199/297	67	e-112	199/297	67	e-107	106/154	68
510	e-118	211/292	72	e-118	211/292	72	e-118	130/181	71
511	e-108	194/288	67	e-108	194/288	67	e-102	171/258	66
512	2.E-34	99/316	31	2.E-34	99/316	31	3.E-34	99/316	31
513	9.E-28	112/428	26	9.E-26	112/428	26	6.E-22	91/377	24
514	9.E-97	175/424	41	9.E-97	175/424	41	2.E-96	175/424	41
515			10			10			10
516	e-106	169/262	64	e-106	169/262	64	e-106	169/262	64
517	2.E-19	140/630	22	2.E-19	140/630	22	3.E-19	140/630	22
518	9.E-30	132/525	25	9.E-30	132/525	25	2.E-18	120/566	21
519	8.E-25	121/497	24	8.E-25	121/497	24	5.E-21	119/542	21
520	e-137	239/427	55	e-137	239/427	55	7.E-58	74/198	37
521	1.E-34	121/426	28	1.E-34	121/426	28	3.E-34	121/426	28
522	1.E-56	138/416	33	1.E-56	138/416	33	9.E-52	128/428	29
523			10			10			10
524	1.E-96	170/272	62	1.E-96	170/272	62	5.E-91	137/205	66
525	6.E-92	160/252	63	6.E-92	160/252	63	5.E-78	115/172	66
526	3.E-30	90/271	33	3.E-30	90/271	33	3.E-29	88/271	32
527	2.E-07	107/560	19	2.E-07	107/560	19			10
528	1.E-79	156/420	37	1.E-79	156/420	37	7.E-64	144/420	34
529	2.E-35	88/254	34	2.E-35	88/254	34	4.E-35	88/254	34
530			10			10			10
531	2.E-15	47/204	23	2.E-15	47/204	23	3.E-15	47/204	23
532	1.E-77	176/458	38	1.E-77	176/458	38	1.E-61	112/289	38
533	e-115	216/386	55	e-115	216/386	55	e-114	216/386	55
534	e-116	196/290	67	e-116	196/290	67	e-116	196/290	67
535	2.E-39	134/486	27	2.E-39	134/486	27	1.E-38	126/430	29
536	1.E-20	62/231	26	1.E-20	62/231	26	4.E-13	97/410	23
537			10			10	6.E-08	23/35	65
538			10			10	9.E-18	37/44	84
539	5.E-27	79/275	28	5.E-27	79/275	28	5.E-26	73/241	30
540			10			10			10
541	2.E-12	36/109	33	2.E-12	36/109	33	3.E-12	36/109	33
542	7.E-33	77/224	34	7.E-33	77/224	34	1.E-32	77/224	34
543	2.E-47	109/277	39	2.E-47	109/277	39	3.E-46	110/263	41
544	4.E-66	121/266	45	3.E-66	121/266	45	6.E-66	121/266	45
545	5.E-71	145/332	43	5.E-71	145/332	43	1.E-70	145/332	43
546	2.E-42	146/504	28	2.E-42	146/504	28	3.E-41	144/502	28
547			10			10	1.E-31	63/129	48
548	2.E-59	100/137	72	2.E-59	100/137	72	3.E-59	100/137	72
549			10			10			10
550			10			10			10
551			10			10			10
552	7.E-22	67/217	30	2.E-21	66/215	30	1.E-17	42/118	35
553			10			10			10
554			10			10	0.006	15/43	34

[0423]

555	e-103	254/698	36	e-103	254/698	36	e-103	254/698	36
556	5.E-31	84/286	29	2.E-30	83/284	29	8.E-24	60/184	32
557			10			10			10
558	4.E-05	32/119	26	4.E-05	32/119	26	3.E-04	32/137	23
559	2.E-05	46/185	24	2.E-05	46/185	24			10
560	3.E-09	58/177	32	3.E-09	58/177	32	4.E-08	52/157	33
561			10			10			10
562	3.E-51	99/243	40	3.E-51	99/243	40	5.E-51	99/243	40
563	e-162	316/830	38	e-146	306/844	36	0.E+00	359/827	43
564	3.E-08	42/160	26	3.E-08	42/160	26	6.E-05	38/139	27
565	9.E-15	60/182	32	9.E-15	60/182	32	7.E-12	50/184	27
566			10			10			10
567	3.E-85	169/437	38	3.E-85	169/437	38	5.E-85	169/437	38
568			10			10			10
569	2.E-18	58/215	26	2.E-18	58/215	26	2.E-13	50/195	25
570			10			10			10
571	7.E-31	85/286	29	2.E-30	84/284	29	6.E-24	65/202	32
572			10			10	3.E-22	43/49	87
573			10			10	e-114	196/221	88
574			10			10			10
575	e-122	200/424	47	e-122	200/424	47	e-122	200/424	47
576	7.E-24	75/255	29	7.E-24	75/255	29	1.E-23	75/255	29
577	3.E-47	107/304	35	3.E-47	107/304	35	5.E-47	107/304	35
578			10			10	9.E-40	91/126	72
579	3.E-63	145/495	29	3.E-63	145/495	29	7.E-35	86/326	26
580	1.E-84	164/298	55	1.E-84	164/298	55	1.E-82	161/295	54
581			10			10			10
582	2.E-35	71/132	53	2.E-35	71/132	53	3.E-34	70/131	53
583	9.E-43	85/227	37	9.E-43	85/227	37	2.E-42	85/227	37
584			10			10			10
585			10			10			10
586			10			10	0.006	17/50	34
587			10			10			10
588			10			10	1.E-48	103/138	74
589			10			10	7.E-04	22/42	52
590			10			10			10
591	e-105	185/294	62	e-105	185/294	62	e-105	185/294	62
592			10			10			10
593	2.E-66	130/414	31	2.E-66	130/414	31	1.E-67	136/419	32
594	5.E-08	27/95	28	5.E-08	27/95	28	5.E-06	22/74	29
595			10			10			10
596	e-179	321/549	58	e-179	321/549	58	2.E-96	181/334	54
597	0	927/1041	89	0	891/1040	89	0	267/288	92
598	1.E-175	295/329	89	1.00e0175	295/329	89	1.E-174	395/329	89
599	3.00E-12	146/711	20	3.00e-12	146/711	20	5.00E-12	146/711	20

[0424] 空白格代表此菌株中没有高于 10% 相同性的命中

[0425] 表 5- 具有最强 UPEC 间命中的 SEQ ID NO

[0426]

<u>1</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>	<u>22</u>
<u>24</u>	<u>33</u>	<u>34</u>	<u>35</u>	<u>37</u>	<u>41</u>	<u>42</u>	<u>44</u>	<u>45</u>	<u>46</u>	<u>47</u>	<u>48</u>	<u>50</u>	<u>51</u>	<u>52</u>	<u>53</u>
<u>54</u>	<u>55</u>	<u>56</u>	<u>57</u>	<u>58</u>	<u>60</u>	<u>61</u>	<u>62</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>67</u>	<u>68</u>	<u>69</u>	<u>70</u>	<u>71</u>
<u>72</u>	<u>73</u>	<u>75</u>	<u>82</u>	<u>87</u>	<u>96</u>	<u>97</u>	<u>99</u>	<u>100</u>	<u>101</u>	<u>106</u>	<u>110</u>	<u>111</u>	<u>114</u>	<u>115</u>	<u>116</u>
<u>117</u>	<u>118</u>	<u>119</u>	<u>120</u>	<u>121</u>	<u>122</u>	<u>123</u>	<u>124</u>	<u>125</u>	<u>126</u>	<u>127</u>	<u>128</u>	<u>129</u>	<u>130</u>	<u>131</u>	<u>132</u>
<u>133</u>	<u>134</u>	<u>135</u>	<u>136</u>	<u>137</u>	<u>140</u>	<u>142</u>	<u>151</u>	<u>152</u>	<u>154</u>	<u>156</u>	<u>157</u>	<u>158</u>	<u>160</u>	<u>162</u>	<u>169</u>
<u>175</u>	<u>176</u>	<u>177</u>	<u>180</u>	<u>182</u>	<u>184</u>	<u>185</u>	<u>186</u>	<u>187</u>	<u>188</u>	<u>189</u>	<u>190</u>	<u>191</u>	<u>192</u>	<u>194</u>	<u>195</u>
<u>196</u>	<u>201</u>	<u>203</u>	<u>204</u>	<u>205</u>	<u>208</u>	<u>209</u>	<u>210</u>	<u>211</u>	<u>212</u>	<u>214</u>	<u>215</u>	<u>216</u>	<u>219</u>	<u>220</u>	<u>221</u>
<u>222</u>	<u>223</u>	<u>224</u>	<u>225</u>	<u>227</u>	<u>230</u>	<u>232</u>	<u>233</u>	<u>234</u>	<u>235</u>	<u>236</u>	<u>237</u>	<u>238</u>	<u>239</u>	<u>241</u>	<u>242</u>
<u>243</u>	<u>244</u>	<u>245</u>	<u>246</u>	<u>247</u>	<u>248</u>	<u>249</u>	<u>250</u>	<u>251</u>	<u>252</u>	<u>253</u>	<u>254</u>	<u>255</u>	<u>256</u>	<u>257</u>	<u>258</u>
<u>259</u>	<u>261</u>	<u>262</u>	<u>263</u>	<u>264</u>	<u>265</u>	<u>266</u>	<u>268</u>	<u>269</u>	<u>270</u>	<u>271</u>	<u>272</u>	<u>273</u>	<u>274</u>	<u>275</u>	<u>276</u>
<u>278</u>	<u>279</u>	<u>280</u>	<u>281</u>	<u>283</u>	<u>285</u>	<u>286</u>	<u>288</u>	<u>291</u>	<u>295</u>	<u>296</u>	<u>298</u>	<u>299</u>	<u>300</u>	<u>301</u>	<u>302</u>
<u>303</u>	<u>304</u>	<u>305</u>	<u>307</u>	<u>308</u>	<u>310</u>	<u>311</u>	<u>312</u>	<u>314</u>	<u>316</u>	<u>318</u>	<u>325</u>	<u>326</u>	<u>327</u>	<u>329</u>	<u>330</u>
<u>331</u>	<u>332</u>	<u>334</u>	<u>335</u>	<u>336</u>	<u>340</u>	<u>341</u>	<u>342</u>	<u>343</u>	<u>344</u>	<u>345</u>	<u>346</u>	<u>347</u>	<u>349</u>	<u>350</u>	<u>351</u>
<u>352</u>	<u>353</u>	<u>354</u>	<u>355</u>	<u>357</u>	<u>358</u>	<u>360</u>	<u>361</u>	<u>362</u>	<u>363</u>	<u>364</u>	<u>365</u>	<u>366</u>	<u>367</u>	<u>368</u>	<u>369</u>
<u>370</u>	<u>371</u>	<u>372</u>	<u>374</u>	<u>375</u>	<u>379</u>	<u>380</u>	<u>382</u>	<u>387</u>	<u>388</u>	<u>389</u>	<u>390</u>	<u>392</u>	<u>393</u>	<u>394</u>	<u>399</u>
<u>400</u>	<u>404</u>	<u>405</u>	<u>406</u>	<u>407</u>	<u>408</u>	<u>409</u>	<u>410</u>	<u>411</u>	<u>412</u>	<u>413</u>	<u>414</u>	<u>415</u>	<u>416</u>	<u>417</u>	<u>418</u>
<u>419</u>	<u>420</u>	<u>421</u>	<u>422</u>	<u>423</u>	<u>424</u>	<u>425</u>	<u>426</u>	<u>428</u>	<u>429</u>	<u>431</u>	<u>432</u>	<u>433</u>	<u>434</u>	<u>435</u>	<u>436</u>
<u>437</u>	<u>438</u>	<u>439</u>	<u>440</u>	<u>442</u>	<u>443</u>	<u>444</u>	<u>445</u>	<u>446</u>	<u>447</u>	<u>450</u>	<u>451</u>	<u>453</u>	<u>454</u>	<u>455</u>	<u>456</u>
<u>457</u>	<u>458</u>	<u>459</u>	<u>461</u>	<u>462</u>	<u>463</u>	<u>464</u>	<u>465</u>	<u>468</u>	<u>471</u>	<u>472</u>	<u>473</u>	<u>474</u>	<u>476</u>	<u>477</u>	<u>480</u>
<u>481</u>	<u>482</u>	<u>484</u>	<u>485</u>	<u>486</u>	<u>487</u>	<u>489</u>	<u>490</u>	<u>491</u>	<u>492</u>	<u>493</u>	<u>494</u>	<u>496</u>	<u>497</u>	<u>498</u>	<u>499</u>
<u>500</u>	<u>501</u>	<u>502</u>	<u>503</u>	<u>504</u>	<u>505</u>	<u>506</u>	<u>507</u>	<u>508</u>	<u>509</u>	<u>510</u>	<u>511</u>	<u>512</u>	<u>513</u>	<u>514</u>	<u>515</u>
<u>516</u>	<u>517</u>	<u>518</u>	<u>519</u>	<u>520</u>	<u>521</u>	<u>522</u>	<u>523</u>	<u>524</u>	<u>525</u>	<u>526</u>	<u>527</u>	<u>528</u>	<u>529</u>	<u>530</u>	<u>531</u>
<u>532</u>	<u>533</u>	<u>534</u>	<u>535</u>	<u>536</u>	<u>539</u>	<u>541</u>	<u>542</u>	<u>543</u>	<u>544</u>	<u>545</u>	<u>546</u>	<u>548</u>	<u>549</u>	<u>552</u>	<u>553</u>
<u>555</u>	<u>556</u>	<u>557</u>	<u>558</u>	<u>559</u>	<u>560</u>	<u>561</u>	<u>562</u>	<u>563</u>	<u>564</u>	<u>565</u>	<u>567</u>	<u>568</u>	<u>569</u>	<u>571</u>	<u>574</u>
<u>575</u>	<u>576</u>	<u>577</u>	<u>579</u>	<u>580</u>	<u>582</u>	<u>583</u>	<u>588</u>	<u>591</u>	<u>592</u>	<u>593</u>	<u>594</u>	<u>595</u>	<u>596</u>		

[0427] 表 6

[0428]

SEQ ID	PSORT	LP	TMD	最佳命中	HitLen	e	相同性	查询%	靶%
2	I	*	1	痤疮丙酸杆菌(propionibacterium acnes)转运蛋白相关多肽 WO03/33515	221	3e-01	21/69	24	9
6	I		3	痤疮丙酸杆菌免疫原性多肽 WO03/33515	318	2e-10	49/171	27	15
7	O	*	0	AmEPV 晚期转录因子 2(AMV047) WO200212526	259	0.011	33/114	23	12
23	I		1	肠出血性大肠杆菌(E. coli)0157:H7-特异性蛋白 SEQ ID NO:1295 JP2002355074	470	0.059	16/57	14	3
25	I		1	人 XB51 JP2003164298	273	3e-01	14/28	4	5
26	I	*	1	原核必需基因编码的蛋白 WO200277183	324	9e-02	15/38	9	4
28	P	*	0	蛋白序列 SEQ ID 2281 EP1258494	503	2e-02	21/81	9	4
29	O	*	0	新人诊断蛋白 WO200175067	1395	6e-17	42/120	25	3
30	I		1	利什曼虫延伸抗原 LmgSP10 US2002169285	320	1e-02	36/157	9	11
31	I		1	原核必需基因编码的蛋白 WO200277183	249	6e-02	27/95	11	10
32	I		1	鲍氏不动杆菌(Acinetobacter baumannii)蛋白 US6562958	284	1e-06	53/215	19	18
36	I		2	谷氨酸棒杆菌(C. glutamicum)内稳态及适应蛋白 SEQ ID 32 WO03/40290	513	4e-02	15/33	10	2
49	I		1	前列腺癌标记蛋白 WO03/09814	338	4e-01	16/52	30	4
57	I		1	发光杆菌(Photobacterium luminescens)蛋白序列 WO200294867	149	4e-02	15/41	36	10
59	O	*	0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	512	4e-02	13/40	20	2
67	I	*	1	结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)营养素饥饿诱导蛋白 WO03/04520	429	4e-02	17/43	15	3
68	I	*	5	鲍氏不动杆菌蛋白 US6562958	273	6e-23	68/204	10	24
76	I		2	恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)染色体 2 相关蛋白 SEQ ID NO:152 WO200025728	980	2e-05	42/172	13	4
77	P	*	0	生殖器支原体(Mycoplasma genitalium)外壳蛋白 US2003039963	1139	9e-02	13/37	19	1
80	O	*	0	新人诊断蛋白 WO200175067	812	2e-01	33/111	7	4
81	I		2	睡眠嗜组织菌(Histophilus somni)holi 片段 WO03/59392	74	3e-02	15/52	21	20
82	P	*	0	来自质粒 pRAP501 的 ORF5 的 Heamin 结合蛋白 WO9321323	178	2e-20	61/163	35	34
83	I	*	3	肝炎 GB 病毒蛋白序列 SEQ ID NO:53 US6051374	177	0.033	23/75	16	12
84	P	*	0	新人分泌和跨膜蛋白 WO03/72035	591	0.004	26/80	18	4
85	I		1	分枝杆菌种的蛋白序列 46C WO9909186	119	5e-02	28/84	15	23
87	I		8	与多糖外生物合成有关的酶 EPS11 WO9962316	504	3e-23	86/320	25	17
88	I		1	有除草活性的多肽 SEQ ID NO 2856 WO200210210	638	3e-01	35/139	18	5
89	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	734	8e-02	12/24	7	1
93	I		1	人 GPCR 蛋白 SEQ ID NO:1506 EP1270724	156	1e-01	20/66	15	12

[0429]

94	I		0	恶性疟原虫染色体 2 相关蛋白 SEQ ID NO:152 WO200025728	471	3e-02	16/74	16	3
96	I		0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	87	6e-09	28/47	51	32
112	I		0	金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 蛋白 WO200294868	190	1e-01	12/36	15	6
114	I		1	新人分泌和跨膜蛋白 WO03/72035	1894	2e-04	23/61	23	1
124	O	*	0	大肠杆菌增殖相关蛋白 SEQ ID 365 WO20044906	176	6e-28	69/171	39	39
125	O	*	0	大肠杆菌增殖相关蛋白 SEQ ID 366 WO20044906	167	4e-25	68/151	40	40
138	O	*	0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	312	4e-02	26/101	17	8
139	I		1	人甲状旁腺细胞钙受体 5.2(HuPCaR5.2) US5688938	1088	7e-02	32/118	10	2
142	I	*	2	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	285	2e-02	32/158	12	11
143	I		2	人唐氏综合症细胞粘附分子 DS-CAM2 WO9817795	1571	3e-01	27/104	11	1
145	I		2	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	679	3e-01	17/55	23	2
147	P	*	0	人 NS 蛋白序列 SEQ ID NO:159 WO200206315	354	1e-01	14/41	23	3
149	I		1	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异性蛋白 JP2002355074	55	0.003	18/29	41	32
150	I		0	人 p53 修饰蛋白, SEQ ID 214 WO200299122	409	4e-02	13/42	11	3
153	I		1	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异性蛋白:949 JP2002355074	50	1e-19	46/50	92	92
155	I		0	恶性疟原虫染色体 2 相关蛋白 WO200025728	1700	5e-02	14/34	11	0
159	P	*	0	新人诊断蛋白 WO200175067	260	4e-02	25/56	46	9
160	I	*	1	小鼠 PG1 蛋白序列 WO9932644	354	4e-02	14/37	14	3
161	I		2	耳炎差异球菌 (Alloiococcus otitis) 抗原蛋白 SEQ ID NO:1640 WO03/48304	225	9e-02	16/46	15	7
165	I		0	黑曲霉 (A. niger) 金属蛋白酶多肽 WO200268823	791	3e-01	29/110	24	3
167	I		0	辐射松 (Pinus radiata) 细胞信号转导相关蛋白 SEQ ID:128 WO200042171	120	2e-01	19/54	35	15
170	I		1	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异性蛋白:881 JP2002355074	53	2e-13	38/42	15	71
171	I		0	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异性蛋白:615 JP2002355074	50	1e-21	48/50	96	96
176	P	*	0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	239	3e-11	33/81	26	13
178	I		0	人结肠癌抗原蛋白 SEQ ID NO:7716 WO200122920	134	4e-02	11/20	8	8
179	I		3	人 GPCR 蛋白 SEQ ID NO:1506 EP1270724	523	0.014	23/115	16	4
181	I		0	牛痘疹病毒 1US3 蛋白序列 SEQ ID NO:9 WO03/12049	468	2e-02	17/56	7	3
183	I		1	新人诊断蛋白 WO200175067	260	0.007	32/75	38	12
184	I	*	1	淋病奈瑟球菌氨基酸序列 SEQ ID 7826 WO200279243	508	4e-02	28/90	28	5
188	I		1	乳酸乳球菌 (Lactococcus lactis) 蛋白 ycdH FR2807446	486	3e-01	18/61	24	3

[0430]

194	I		1	MeCP2-Tat dMT 融合蛋白 WO200285948	561	0.029	11/22	15	2
195	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	80	1e-17	44/80	47	55
197	I		1	肉桂地链霉菌(<i>S. cinnamonensis</i>)CapK 同源物 WO200168867	427	3e-18	91/350	21	21
198	I		4	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	219	4e-11	49/178	24	22
199	I		8	药代酶蛋白-2804794CD1 WO200266654	445	2e-28	78/231	20	17
200	I		4	集胞藻(<i>Synechocystis</i>) δ -6-解饱和酶多肽 US2002108147	359	2e-19	84/347	23	23
202	I		0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	615	4e-01	14/41	29	2
207	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	230	1e-14	41/54	65	17
208	I		1	鲍氏不动杆菌蛋白 US6562958	358	2e-11	29/86	28	8
209	I		1	鲍氏不动杆菌蛋白 US6562958	515	1e-06	29/124	21	5
210	I	*	2	细菌多肽 US6605709	320	3e-27	55/105	45	17
211	I		1	酿酒酵母(<i>S. cerevisiae</i>)凋亡相关蛋白 YOR010C WO200102550	730	8e-02	15/53	20	2
212	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	240	4e-19	50/56	64	20
225	P	*	0	单核细胞增生利斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)蛋白 WO200177335	100	2e-26	57/97	55	56
228	P	*	0	黑腹果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)多肽 SEQ ID NO 19890 WO200171042	460	5e-02	37/129	13	8
232	I		1	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	393	5e-13	93/377	19	23
233	O	*	0	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	205	2e-11	50/183	27	24
235	I		2	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	513	9e-02	22/58	7	4
236	O	*	0	耳炎差异球菌抗原蛋白 SEQ ID NO:1640 WO03/48304	309	1e-02	15/30	7	4
237	I		1	38kd 退化相关抗原 US5242823	403	6e-02	33/129	20	8
238	I		1	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异性蛋白:1084 JP2002355074	131	1e-08	26/45	37	19
240	I		0	人多肽 SEQ ID NO 21835 WO200164835	81	2e-01	11/40	24	14
241	I		1	烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)必需基因蛋白 WO200286090	367	0.005	32/116	25	8
277	I		1	细菌多肽 US6605709	338	3e-01	20/64	11	5
279	I		0	大肠杆菌多肽 SEQ ID NO 1320 WO200166572	367	0.017	45/217	12	12
280	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	266	2e-02	28/105	7	10
281	I		9	肺炎链球菌(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)多肽 SEQ ID NO 329 WO200283855	477	7e-07	34/118	7	7
283	I		11	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	431	6e-25	105/421	25	24
284	P	*	0	新人诊断蛋白 WO200175067	285	7e-05	23/29	44	8
289	I		1	幽门螺杆菌(<i>H. pylori</i>)选择的作用域(SID)蛋白 WO200266501	268	2e-01	17/65	20	6
290	I		0	新人诊断蛋白 WO200175067	750	2e-01	16/23	32	2
306	I		1	肺炎链球菌抗原蛋白 SP092 US6573082	641	0.020	40/139	22	6
308	O	*	0	单核细胞增生利斯特菌蛋白 WO200177335	439	9e-02	16/53	17	3
309	I		3	新人诊断蛋白 WO200175067	285	0.001	17/23	14	5
314	I	*	1	淋病奈瑟球菌氨基酸序列 SEQ ID 7826 WO200279243	508	8e-02	28/90	28	5
315	I	*	3	新人诊断蛋白 WO200175067	261	2e-04	35/100	23	13
317	I		0	牛疱疹病毒 1US3 蛋白序列 SEQ ID NO:9	468	5e-02	18/56	6	3

[0431]

				WO03/12049					
322	I		1	截形苜蓿 (M.truncatula) 鲨烯环氧酶 WO03/93425	526	1e-01	15/48	11	2
323	I		2	人 PECAM-1 蛋白 SEQ ID NO:73 WO200078808	738	4e-02	18/55	5	2
325	I		1	大肠杆菌增殖相关蛋白序列:300 WO200044906	138	2e-29	62/134	44	44
326	P	*	0	黄瓜棉子糖合酶 JP1123080	784	1e-01	21/68	8	2
327	P	*	0	预测的 CXC-AMN20 克隆的部分序列 WO9634112	262	1e-05	70/286	20	26
348	I		2	人多肽 SEQ ID NO21123 WO200164835	73	5e-02	15/47	30	20
352	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	279	4e-29	72/225	30	25
354	I		0	新人酶多肽 WO200155301	190	3e-13	40/61	26	21
357	I		0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	898	7e-26	82/252	16	9
358	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	206	5e-28	57/124	43	27
359	P	*	0	黑腹果蝇多肽 SEQ ID NO 19890 WO200171042	1176	3e-01	19/75	23	1
368	I		1	肺炎链球菌转运蛋白 WO9826072	293	4e-02	23/82	11	7
374	P	*	0	新人诊断蛋白 WO200175067	701	0.012	24/82	27	3
375	I		4	细菌多肽 US6605709	184	0.001	36/168	23	19
377	I		0	大鼠蛋白 P26039,SEQ ID NO 11184 WO03/16475	2541	4e-02	22/67	20	0
381	I		1	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	323	2e-01	30/88	12	9
387	I	*	9	谷氨酸棒杆菌蛋白片段 SEQ ID NO:4758 EP1108790	405	5e-08	79/354	19	19
389	P	*	0	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异性蛋白:949 JP2002355074	108	3e-20	42/80	11	38
390	O	*	0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	230	6e-15	58/207	23	25
391	I		1	头孢菌素 C 乙酰酯酶 JP04144688	231	2e-18	67/218	24	29
395	O	*	0	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	312	4e-02	26/101	17	8
396	I		1	谷氨酸棒杆菌蛋白片段 SEQ ID NO:4758 EP1108790	261	8e-02	15/30	6	5
397	I		0	不动杆菌重组酶 US2003087446	324	9e-03	20/50	39	6
401	O	*	0	表兄链球菌(Streptococcus sobrinus)葡糖基转移酶-U WO03/75845	1554	9e-02	30/139	9	1
402	I		1	乳酸乳球菌蛋白 yjeD FR2807446	543	3e-15	77/331	22	14
403	I		1	Fukuyama 型先天性肌肉萎缩症-引发蛋白 JP11313682	461	9e-06	42/167	10	9
404	I		6	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	264	1e-16	60/237	23	22
407	I	*	5	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	367	2e-23	86/345	24	23
412	I		4	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	139	3e-24	50/121	31	35
421	I		1	乳酸乳球菌蛋白 ypbF FR2807446	320	0.093	27/78	22	8
427	I		1	链球菌多肽 SEQ ID NO 21123 WO200234771	139	2e-02	30/110	12	21
441	O	*	0	人 ORFX 蛋白序列 SEQ ID NO:18748 WO200192523	130	8e-02	14/42	10	10
445	I		1	新人诊断蛋白 WO200175067	717	3e-04	24/33	14	3
446	I		4	流感嗜血杆菌必需基因 WO200218601	165	7e-11	31/126	20	18
449	I		1	人多肽 SEQ ID NO21123 WO200164835	73	6e-01	21/65	15	28
461	I		1	细菌多肽 US6605709	376	1e-20	87/358	23	23

[0432]

466	I		3	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)蛋白片段 SEQ ID NO:49986 EP1033405	382	2e-02	18/54	9	4
467	I		1	单核细胞增生利斯特菌蛋白 WO200177335	400	6e-19	90/309	20	22
468	I		1	流感嗜血杆菌 Orf25 多肽 SEQ ID NO:49 WO03/55905	664	2e-08	62/287	10	9
473	I		1	单核细胞增生利斯特菌蛋白 WO200177335	95	4e-17	44/48	53	46
475	I		1	人蛋白 P57723,SEQ ID NO 11321 WO03/16475	403	9e-02	18/36	18	4
479	I		1	新人分泌/跨膜蛋白 PRO1110 US2003215911	322	3e-01	13/42	20	4
487	I		2	人多肽 SEQ ID NO 16040 WO200164835	94	2e-02	21/89	7	22
488	I		0	人多肽 SEQ ID NO 18650 WO200164835	115	4e-01	15/32	26	13
490	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	277	9e-02	20/78	4	7
491	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	622	3e-01	14/39	2	2
493	I		1	细菌多肽 US6605709	168	3e-06	36/118	21	21
541	I		4	鲍氏不动杆菌蛋白 US6562958	146	2e-14	43/130	32	29
547	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	1765	8e-02	22/64	14	1
554	I		1	人 GPCR 蛋白 SEQ ID NO:1506 EP1270724	294	0.058	30/72	34	10
561	I		1	肺炎链球菌运输蛋白 WO9826072	293	4e-02	23/82	11	7
566	O	*	0	肠出血性大肠杆菌 0157:H7-特异蛋白:202 JP2002355074	48	4e-18	39/48	26	81
573	I		1	痤疮丙酸杆菌预测 ORF-编码多肽 WO03/33515	215	4e-10	52/191	23	24
574	O	*	0	发光杆菌蛋白序列 WO200294867	157	2e-10	46/134	22	29
576	I		0	耳炎差异球菌抗原蛋白 SEQ ID NO:5934 WO03/48304	262	9e-26	90/273	34	34
578	I		1	肺炎链球菌多肽 SEQ ID NO 382 WO200283855	456	3e-02	17/35	12	3
585	O	*	0	长双歧杆菌(<i>Bifidobacterium longum</i>)NCC2705 ORF 氨基酸序列 SEQ ID NO:298 EP1227152	180	2e-01	14/42	12	7
586	O	*	0	人分泌多肽 US2003100051	266	1e-01	11/33	11	4
588	I		1	新人诊断蛋白 WO200175067	1387	1e-01	22/83	16	1
595	I		1	原核必需基因编码蛋白 WO200277183	345	3e-01	15/32	27	4

[0433] 栏:

[0434] • PSORT :由 PSORT 算法得到的预测位点 ;I = 内膜 ;O = 外膜 ;P = 周质

[0435] • LP :星号代表脂蛋白

[0436] • TMD :跨膜结构域的个数

[0437] • 最佳命中 :专利数据库中的最接近匹配

[0438] • HitLen :最接近匹配的长度

[0439] • e :BLAST 分析中的 ‘预计’ 值

[0440] • 相同性 :比对长度上的相同残基数和比对长度

[0441] • 查询% / 靶% :通过观察 ExPEC 或数据库序列得到的序列相同性%

[0442] 表 7

[0443]

蛋白质	gi#	SEQ ID	备注	Psort	TMD
upec-4519	26110866	489	推定保守蛋白	I	1

upec-3573	26109898	597	抗原 43 前体	I	1
upec-1196	26107513	120	F1C 主要菌毛亚基	0	0
upec-2283	26108604	598	外膜通道蛋白 p	C	0
upec-2814	26109137	305	长链脂肪酸	0	0
upec-0179	26106493	22	铁色素 - 铁受体前体	0	0
upec-1875	26108194	221	1 类菌毛蛋白	I	1
upec-1873	26108192	219	外膜引导子 (usher)	I	1
upec-3606	26109931	400	KpsD 蛋白	P	0
upec-5079	26111428	565	PapA 蛋白	0	0
upec-3510	26109835	371	PapA 蛋白	0	0
upec-3541	26109866	599	IutA 蛋白	C	0
upec-5065	26111414	555	推定铁调蛋白	I	1

[0444] 栏：

[0445] • PSORT :由 PSORT 算法得到的预测位点 ;I = 内膜 ;0 = 外膜 ;P = 周质 ;C = 胞质

[0446] • TMD :跨膜结构域的个数

[0447] • % ID :比对长度上相同残基的百分比

[0448] 参考文献 (其全文结合到本文中作为参考)

[0449] [1]Russo 和 Johnson(2000)J Infect Dis 181:1753-1754。

[0450] [2]Uehling 等 (1997)J Urol 157:2049-2052。

[0451] [3]Tammen(1990)Br J Urol 65:6-9。

[0452] [4]Langermann 等 (1997)Science 276:607-611。

[0453] [5]W003/074553。

[0454] [6]W001/66572。

[0455] [7]Janke 等 (2001)FEMS Microbiol Lett 199:61-66。

[0456] [8]W02004/005535。

[0457] [9]Dobrindt 等 (2002)Infect Immun 70:6365-6372。

[0458] [10]US2003/0165870。

[0459] [II]Welch 编 (2002)Proc Natl Acad Sci USA 99:17020-17024。

[0460] [12] 美国典型培养物保藏中心 :ATCC 700928。

[0461] [13]European Journal of Biochemistry 2003 ;增刊 1,7 月 1 日 :摘要 P1. 3-11。

[0462] [14]Geysen 等 (1984)PNAS USA 81:3998-4002。

- [0463] [15]Carter(1994)Methods Mol Biol 36 :207-223.
- [0464] [16]Jameson, BA 等 1988, G45/OS4(1) :181-186。
- [0465] [17]Raddrizzani 和 Hammer(2000)Brief Bioinform 1(2) :179-189。
- [0466] [18]De Lalla 等 (1999)J. Immunol. 163 :1725-1729。
- [0467] [19]Brusic 等 (1998)Bioinformatics 14(2) :121-130
- [0468] [20]Meister 等 (1995)Vaccine 13(6) :581-591。
- [0469] [21]Roberts 等 (1996)AIDS Res Hum Retroviruses 12(7) :593-610。
- [0470] [22]Maksyutov 和 Zagrebelnaya(1993)Comput Appl Biosci 9(3) :291-297。
- [0471] [23]Feller 和 de la Cruz(1991)Nature 349(6311) :720-721。
- [0472] [24]Hopp(1993)Peptide Research 6 :183-190。
- [0473] [25]Welling 等 (1985)FEBS Lett. 188 :215-218。
- [0474] [26]Davenport 等 (1995)Immunogenetics 42 :392-397。
- [0475] [27]Bodanszky(1993)《肽合成原理》(Principles of Peptide Synthesis) (ISBN : 0387564314)。
- [0476] [28]Fields 等 (1997) 《酶学方法 289 : 固相肽合成》(Meth Enzymol 289 : Solid-Phase Peptide Synthesis). ISBN:0121821900。
- [0477] [29]Chan 和 White(2000) 《Fmoc 固相肽合成》(Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis). ISBN :0199637245。
- [0478] [30]Kullmann(1987) 《酶学肽合成》(Enzymatic Peptide Synthesis). ISBN : 0849368413。
- [0479] [31]Ibba(1996)Biotechnol Genet Eng Rev 13 :197-216。
- [0480] [32]Breedveld(2000)Lancet 355(9205) :735-740。
- [0481] [33]Gorman 和 Clark(1990)Semin. Immunol. 2 :457-466。
- [0482] [34]Sambrook 等 (2001) 《分子克隆 : 实验室手册》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual), 第 3 版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)。
- [0483] [35]Ausubel 等 (编) (2002) 《分子生物学中的小方案》(Short protocols in molecular biology), 第 5 版 (Current Protocols)。
- [0484] [36] 美国专利 5, 707, 829
- [0485] [37] 《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology) (F. M. Ausubel 等编, 1987) 增刊 30。
- [0486] [38]EP-B-0509612。
- [0487] [39]EP-B-0505012。
- [0488] [40]Johnson 和 Stell(2001)J Clin Microbiol 39 :3712-3717。
- [0489] [41]Tang 等 (1997)Clin. Chem. 43 :2021-2038。
- [0490] [42]PCT/IB2005/003494。
- [0491] [43]Bernadac 等 (1998)J Bacteriol 180(18) :4872-4878。
- [0492] [44]EP-1441036。
- [0493] [45]Sorensen 和 Mortensen(2005)Journal of Biotechnology 115 :113-128。
- [0494] [46]Meynial-Salles 等 (2005)Applied and Environmental Microbiology71 :

2140-2144。

- [0495] [47]US2004/0209370。
- [0496] [48]W000/68253。
- [0497] [49]W097/04110。
- [0498] [50]Alper 等 (2005)Proc. Natl Acad. Sci. USA 102 :12678-12683。
- [0499] [51]WO 01/09350。
- [0500] [52] 欧洲专利 0624376。
- [0501] [53]《疫苗设计》(Vaccine Design...) (1995)Powell 和 Newman 编。ISBN : 030644867X. Plenum。
- [0502] [55]W090/14837。
- [0503] [56]Podda (2001)Vaccine 19 :2673-2680。
- [0504] [57]Frey 等 (2003)Vaccine 21 :4234-4237。
- [0505] [58]“疫苗佐剂:制备方法和研究方案”(Vaccine Adjuvants :Preparation Methods and Research Protocols) (分子药物方法系列 (Methods in Molecular Medicine series) 第 42 卷)。ISBN :1-59259-083-7. 0' Hagan 编。
- [0506] [59] 美国专利 6, 299, 884。
- [0507] [60] 美国专利 6, 451, 325。
- [0508] [61]Allison 和 Byars (1992)Res Immunol 143 :519-525。
- [0509] [62]Hariharan 等 (1995)Cancer Res 55 :3486-3489。
- [0510] [63] 美国专利 5, 057, 540。
- [0511] [64]W096/33739。
- [0512] [65]EP-A-0109942。
- [0513] [66]W096/11711。
- [0514] [67]W000/07621。
- [0515] [68]Barr 等 (1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32 :247-271。
- [0516] [69]Sjolanderet 等 (1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32 :321-338。
- [0517] [70]Niilcura 等 (2002)Virology 293 :273-280。
- [0518] [71]Lenz 等 (2001)J Immunol 166 :5346-5355。
- [0519] [72]Pinto 等 (2003)J Infect Dis 188 :327-338。
- [0520] [73]Gerber 等 (2001)Virol 75 :4752-4760。
- [0521] [74]W003/024480
- [0522] [75]W003/024481
- [0523] [76]Gluck 等 (2002)Vaccine 20 :B10-B16。
- [0524] [77]EP-A-0689454。
- [0525] [78]Johnson 等 (1999)Bioorg Med Chem Lett 9 :2273-2278。
- [0526] [79]Evans 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2 :219-229。
- [0527] [80]Meraldi 等 (2003)Vaccine 21 :2485-2491。
- [0528] [81]Pajak 等 (2003)Vaccine 21 :836-842。
- [0529] [82]Kandimalla 等 (2003)Nucleic Acids Research 31 :2393-2400。

- [0530] [83]W002/26757。
- [0531] [84]W099/62923。
- [0532] [85]Krieg(2003)Nature Medicine 9 :831-835。
- [0533] [86]McCluskie 等 (2002)FEMS Immunology and Medical Microbiology32 : 179-185。
- [0534] [87]W098/40100。
- [0535] [88] 美国专利 6, 207, 646。
- [0536] [89] 美国专利 6, 239, 116。
- [0537] [90] 美国专利 6, 429, 199。
- [0538] [91]Kandimalla 等 (2003)Biochemical Society Transactions 31(part 3) : 654-658。
- [0539] [92]Blackwell 等 (2003)J Immunol 170 :4061-4068。
- [0540] [93]Krieg(2002)Trends Immunol 23 :64-65。
- [0541] [94]W001/95935。
- [0542] [95]Kandimalla 等 (2003)BBRC 306 :948-953。
- [0543] [96]Bhagat 等 (2003)BBRC 300 :853-861。
- [0544] [97]W003/035836。
- [0545] [98]W095/17211。
- [0546] [99]W098/42375。
- [0547] [100]Beignon 等 (2002)Infect Immun 70 :3012-3019。
- [0548] [101]Pizza 等 (2001)Vaccine 19 :2534-2541。
- [0549] [102]Pizza 等 (2000)Int J Med Microbiol 290 :455-461。
- [0550] [103]Scharton-Kersten 等 (2000)Infect Immun 68 :5306-5313。
- [0551] [104]Ryan 等 (1999)Infect Immun 67 :6270-6280。
- [0552] [105]Partidos 等 (1999)Immunol Lett 67 :209-216。
- [0553] [106]Peppoloni 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2 :285-293。
- [0554] [107]Pine 等 (2002)J Control Release 85 :263-270。
- [0555] [108]Domenighini 等 (1995)MoI Microbiol 15 :1165-1167。
- [0556] [109]W003/011223。
- [0557] [110]W099/40936。
- [0558] [111]W099/44636。
- [0559] [112]Lillard JW 等 (2003)Blood 101(3) :807-814. Epub 2002 年 9 月 12 日。
- [0560] [113]Singh 等 (2001)J Cont Release 70 :267-276。
- [0561] [114]W099/27960。
- [0562] [115] 美国专利 6, 090, 406
- [0563] [116] 美国专利 5, 916, 588
- [0564] [117]EP-A-0626169。
- [0565] [118]W099/52549。
- [0566] [119]W001/21207。

- [0567] [120]W001/21152。
- [0568] [121]Andrianov 等 (1998)Biomaterials 19 :109-115。
- [0569] [122]Payne 等 (1998)Adv Drug Delivery Review 31 :185-196。
- [0570] [123]US 4,680,338。
- [0571] [124]US 4,988,815。
- [0572] [125]W092/15582。
- [0573] [126]Stanley(2002)Clin Exp Dermatol 27 :571-577。
- [0574] [127]Wu 等 (2004)Antiviral Res. 64(2) :79-83。
- [0575] [128]Vasilakos 等 (2000)Cell Immunol. 204(1) :64-74。
- [0576] [129] 美 国 专 利 4689338、4929624、5238944、5266575、5268376、5346905、5352784、5389640、5395937、5482936、5494916、5525612、6083505、6440992、6627640、6656938、6660735、6660747、6664260、6664264、6664265、6667312、6670372、6677347、6677348、6677349、6683088、6703402、6743920、6800624、6809203、6888000 和 6924293。
- [0577] [130]Jones(2003)Curr Opin Investig Drugs 4 :214-218。
- [0578] [131]W004/60308
- [0579] [132]W004/64759。
- [0580] [133]US 6,924,271。
- [0581] L134]US 2005/0070556。
- [0582] [135]US 5,658,731。
- [0583] [136]Wong 等 (2003)J Clin Pharmacol 43(7) :735-42。
- [0584] [137]US2005/0215517。
- [0585] [138]W002/072012。
- [0586] [139]Signorelli 和 Hadden(2003)Int Immunopharmacol 3(8) :1177-1186。
- [0587] [140]W02004/064715。
- [0588] [141]Cooper(1995)Pharm Biotechnol 6 :559-580。
- [0589] [142]PCT/US2005/022769。
- [0590] [143]W02004/87153。
- [0591] [144]US 6,605,617。
- [0592] [145]W002/18383。
- [0593] [146]W02004/018455。
- [0594] [147]W003/082272。
- [0595] [148] 美国专利 5,011,828。
- [0596] [149]US-6586409。
- [0597] [150]W099/11241。
- [0598] [151]W094/00153。
- [0599] [152]W098/57659。
- [0600] [153] 欧洲专利申请 0835318、0735898 和 0761231。
- [0601] [154]W003/009869。
- [0602] [155]Glezen 和 Alpers(1999)Clin. Infect. Dis. 28 :219-224。

- [0603] [156] Johnson 等 (2001) *Infect Immun* 69 :1306-1314。
- [0604] [157] Johnson 等 (2001) *J Infect Dis* 183 :897-906 (也参见 183 :1546)。
- [0605] [158] Johnson, Hopkins (1998) *Infection and Immunity* 66 :6063-6064。
- [0606] [159] Bahrani-Mougeot 等 ; *Molecular Microbiology* (2002) 45 (4), 1079-1093
- [0607] [160] Johnson 等, *Infection and Immunity*, (1998) 3059-3065
- [0608] [161] Almeida 和 Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3 :455-467。
- [0609] [162] Agarwal 和 Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37 :6-16。
- [0610] [163] Costantino 等 (1992) *Vaccine* 10 :691-698。
- [0611] [164] Costantino 等 (1999) *Vaccine* 17 :1251-1263。
- [0612] [165] 国际专利申请 W003/007985。
- [0613] [166] W0 99/24578。
- [0614] [168] W0 99/57280。
- [0615] [169] W0 00/66791。
- [0616] [170] W0 01/64922。
- [0617] [171] W0 01/64920。
- [0618] [172] W0 03/020756。
- [0619] [173] W0 2004/032958。
- [0620] [174] W0 2004/048404。
- [0621] [175] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19 :331-332。
- [0622] [176] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47 :269-285。
- [0623] [177] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65 :187-207。
- [0624] [178] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19 :1187-1188。
- [0625] [179] Iwarson (1995) *APMIS* 103 :321-326。
- [0626] [180] Gerlich 等 (1990) *Vaccine* 8 增刊 :S63-68 和 79-80。
- [0627] [181] Hsu 等 (1999) *Clin Liver Dis* 3 :901-915。
- [0628] [182] Stratov 等 (2004) *Curr Drug Tgts* 5 (1) :71-88。
- [0629] [183] Plotkin 等 (编) (2003) *Vaccines*, 第 4 版 (W. B. Saunders Company)
- [0630] [184] Del Giudice 等 (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19 :1-70。
- [0631] [185] Gustafsson 等 (1996) *N Engl. J. Med.* 334 :349-355。
- [0632] [186] Rappuoli et al (1991) *TIBTECH* 9 :232-238。
- [0633] [187] Sutter 等 (2000) *Pediatr Clin North Am* 47 :287-308。
- [0634] [188] Zimmerman 和 Spann (1999) *Am Fam Physician* 59 :113-118, 125-126。
- [0635] [189] McMichael (2000) *Vaccine* 19 增刊 1 :S101-S107。
- [0636] [190] Schuchat (1999) *Lancet* 353 (9146) :51-56。
- [0637] [191] W002/34771。
- [0638] [192] W0 99/54457。
- [0639] [193] W0 04/01846。
- [0640] [194] W0 04/041157。
- [0641] [195] W0 05/028618。

- [0642] [196]WO 99/24578。
[0643] [197]WO 99/36544。
[0644] [198]WO 99/57280。
[0645] [199]WO 02/079243。
[0646] [200]WO 02/02606。
[0647] [201]Kalman 等 (1999)Nature Genetics 21 :385-389。
[0648] [202]Read 等 (2000)Nucleic Acids Res 28 :1397-1406。
[0649] [203]Shirai 等 (2000)J. Infect. Dis. 181(增刊 3) :S524-S527。
[0650] [204]WO 99/27105。
[0651] [205]WO 00/27994。
[0652] [207]WO2005/084306。
[0653] [208]WO2005/002619。
[0654] [209]Ross 等 (2001)Vaccine 19 :4135-4142。
[0655] [210]Dreesen(1997)Vaccine 15 增刊 :S2-S6。
[0656] [211]MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998Jan 16 ;47(1) :12,19。
[0657] [212]Anderson(2000)Vaccine 19 增刊 1 :S59-S65。
[0658] [213]Kahn(2000)Curr Opin Pediatr 12 :257-262。
[0659] [214]Crowe(1995)Vaccine 13 :415-421。
[0660] [215]Modlin 等 (2001)J Toxicol Clin Toxicol 39 :85-100。
[0661] [216]Demicheli 等 (1998)Vaccine 16 :880-884。
[0662] [217]Stepanov 等 (1996)J Biotechnol 44 :155-160。
[0663] [218]Dale(1999)Infect Dis Clin North Am 13 :227-43, viii。
[0664] [219]Ferretti 等 (2001)PNAS USA 98 :4658-4663。
[0665] [220]Kuroda 等 (2001)Lancet 357(9264) :1225-1240 ;也参见 1218-1219。
[0666] [221]WO 00/09699。
[0667] [222]EP-A-0372501
[0668] [223]EP-A-0378881
[0669] [224]EP-A-0427347
[0670] [225]W093/17712
[0671] [226]W094/03208
[0672] [227]W098/58668
[0673] [228]EP-A-0471177
[0674] [229]EP-A-0594610。
[0675] [230]W000/56360
[0676] [231]W091/01146
[0677] [232]W000/61761
[0678] [233]W001/72337
[0679] [234]Falugi 等 (2001)Eur J Immunol 31 :3816-3824。
[0680] [235]Baraldo et al, (2004)Infect Immun. 72 :4884-4887

- [0681] [236]W002/091998。
- [0682] [237]Kuo 等 (1995) Infect Immun 63 :2706-2713。
- [0683] [238]Research Disclosure,453077(2002 年 1 月)
- [0684] [239]Donnelly 等 (1997)Annu Rev Immunol 15 :617-648。
- [0685] [240]Strugnell 等 (1997)Immunol Cell Biol 75(4) :364-369。
- [0686] [241]Cui(2005)Adv Genet 54 :257-89。
- [0687] [242]Robinson 和 Torres(1997)Seminars in Immunol 9 :271-283。
- [0688] [243]Brunham 等 (2000)J Infect Dis 181 增刊 3 :S538-S543。
- [0689] [244]Svanholm 等 (2000)Scand J Immunol 51(4) :345-353。
- [0690] [245]《DNA 疫苗 - 基因疫苗》(DNA Vaccination-Genetic Vaccination)(1998)Koprowski 等编 (ISBN 3540633928)。
- [0691] [246]《基因疫苗 : 理论和实践》(Gene Vaccination :Theory and Practice)(1998)Raz 编 (ISBN 3540644288)。
- [0692] [247]Findeis 等, Trends Biotechnol. (1993)11 :202。
- [0693] [248]Chiou 等 (1994)《基因治疗 : 直接基因转移的方法和应用》(Gene Therapeutics :Methods And Applications Of Direct Gene Transfer).Wolff 编。
- [0694] [249]Wu 等, J. Biol. Chem. (1988)263 :621。
- [0695] [250]Wu 等, J. Biol. Chem. (1994)269 :542。
- [0696] [251]Zenke 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990)57 :3655。
- [0697] [252]Wu 等, J. Biol. Chem. (1991)266 :338。
- [0698] [253]Jolly, Cancer Gene Therapy(1994)7 :51。
- [0699] [254]Kimura, Human Gene Therapy(1994)5 :845。
- [0700] [255]Connelly, Human Gene Therapy(1995)7 :185。
- [0701] [256]Kaplitt, Nature Genetics(1994)6 :148。
- [0702] [257]W0 90/07936。
- [0703] [258]W0 94/03622。
- [0704] [259]W0 93/25698。
- [0705] [260]W0 93/25234。
- [0706] [261]US 5, 219, 740。
- [0707] [262]W0 93/11230。
- [0708] [263]W0 93/10218。
- [0709] [264]US 4, 777, 127。
- [0710] [265]GB 2, 200, 651。
- [0711] [266]EP-A-0 345 242。
- [0712] [267]W0 91/02805。
- [0713] [268]W0 94/12649。
- [0714] [269]W0 93/03769。
- [0715] [270]W0 93/19191。
- [0716] [271]W0 94/28938。

- [0717] [272]WO 95/11984。
- [0718] [273]WO 95/00655。
- [0719] [274]Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3 :147。
- [0720] [275]Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264 :16985。
- [0721] [276]US 5, 814, 482。
- [0722] [277]WO 95/07994。
- [0723] [278]WO 96/17072。
- [0724] [279]WO 95/30763。
- [0725] [280]WO 97/42338。
- [0726] [281]WO 90/11092。
- [0727] [282]US 5, 580, 859。
- [0728] [283]US 5, 422, 120。
- [0729] [284]WO 95/13796。
- [0730] [285]WO 94/23697。
- [0731] [286]WO 91/14445。
- [0732] [287]EP 0524968。
- [0733] [288]Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14 :2411。
- [0734] [289]Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91 :11581。
- [0735] [290]US 5, 206, 152。
- [0736] [291]WO 92/11033。
- [0737] [292]US 5, 149, 655。
- [0738] [293]WO 92/11033。
- [0739] [294]Needleman 和 Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453。
- [0740] [295]Rice 等 (2000) Trends Genet 16 :276-277。
- [0741] [296]Gennaro (2000) 《雷明顿:药物科学和实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy). 第 20 版, ISBN :0683306472。
- [0742] [297]《酶学方法》(Methods In Enzymology) (S. Colowick 和 N. Kaplan 编, Academic Press, Inc.)
- [0743] [298]《实验免疫学手册》(Handbook of Experimental Immunology), 第 I-IV 卷 (D. M. Weir 和 CC. Blackwell 编, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [0744] [299]Sambrook 等 (2001) 《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual), 第 3 版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)。
- [0745] [300]《表面和胶体化学手册》(Handbook of Surface and Colloidal Chemistry) (Birdi, K. S. 编, CRC Press, 1997)
- [0746] [301]Ausubel 等 (编) (2002) 《分子生物学中的小方案》(Short protocols in molecular biology), 第 5 版 (Current Protocols)。
- [0747] [302]《分子生物学技术:短期实验教程》(Molecular Biology Techniques :An Intensive Laboratory Course), (Ream 等编, 1998, Academic Press)
- [0748] [303]PCR (生物技术介绍系列丛书 (Introduction to Biotechniques Series)),

第 2 版. (Newton 和 Graham 编, 1997, Springer Verlag)

[0749] [304]<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=PubMed>

[0750] [305]<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=26111674>

[0751] [306]<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=26111641&itemID=33&view=gbwithparts>

[0752] [307]Blattner 等 (1997) *Science* 277 :1453-1474。

[0753] [308]Murphy (1998) *J. Bacteriol* 180 :2063-2071。

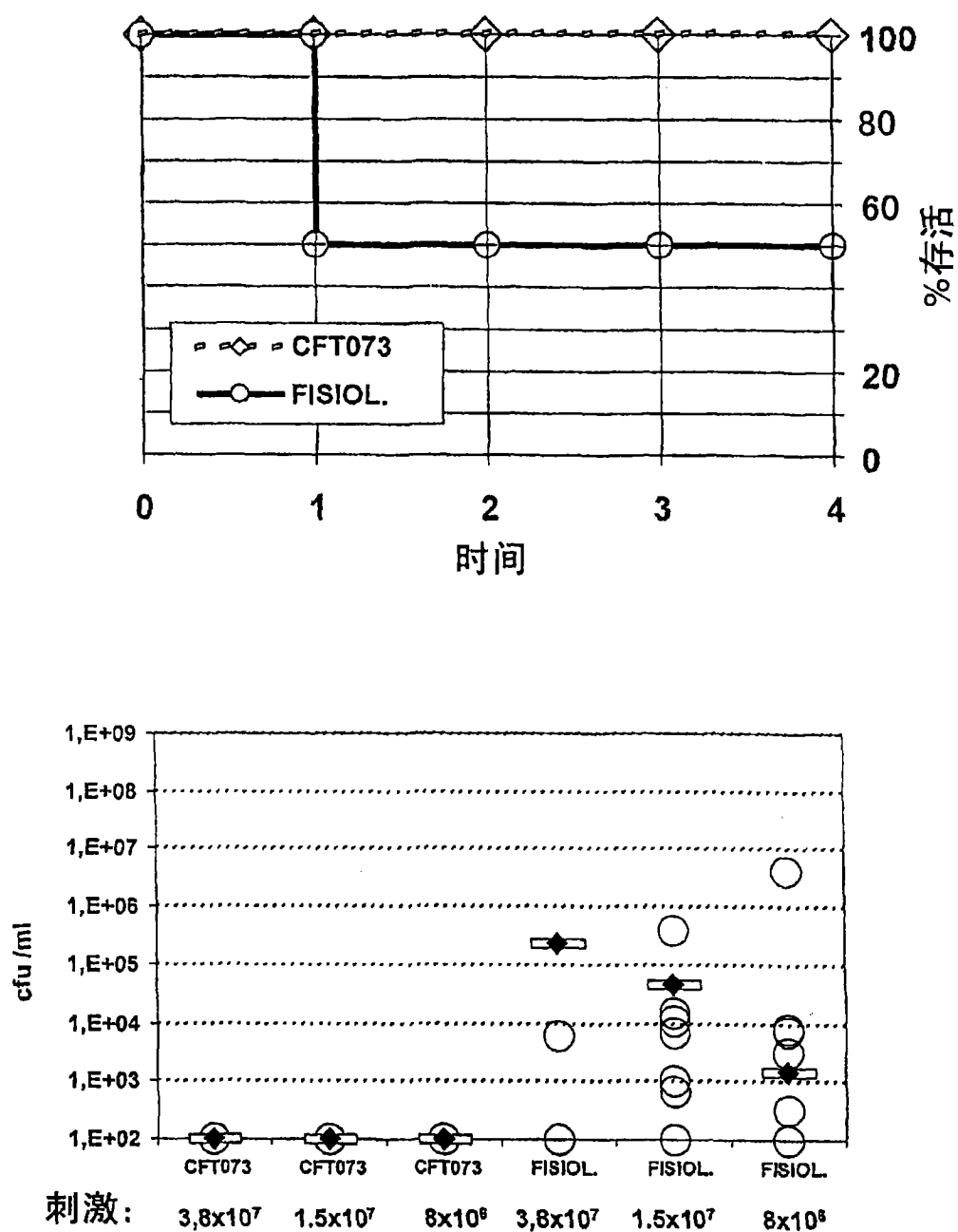


图 1