

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 1/21
C12N 15/53 A01N 63/00
A61K 7/16



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96195927.4

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1149280C

[22] 申请日 1996. 6. 7 [21] 申请号 96195927. 4
[30] 优先权
[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/486,037
[86] 国际申请 PCT/US1996/009667 1996. 6. 7
[87] 国际公布 WO96/040865 英 1996. 12. 19
[85] 进入国家阶段日期 1998. 1. 26
[71] 专利权人 佛罗里达大学研究基金会有限公司
地址 美国佛罗里达州
[72] 发明人 J·D·希尔曼
审查员 颜 丛

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 卢新华 周慧敏

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 4 页

[54] 发明名称 龋齿的替补疗法
[57] 摘要

本发明描述了以乳酸产生缺陷和重组醇脱氢酶 (ADH) 产生为特点的重组变异链球菌。 这些重组变异链球菌适用于预防、治疗龋齿的方法。

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

1. 一种重组变异链球菌株，其特征在于 a) 乳酸产生缺陷和 b) 产生重组醇脱氢酶。
2. 权利要求 1 的菌株，其中乳酸产生缺陷是因为乳酸脱氢酶基因
5 的缺陷。
3. 权利要求 1 的菌株，其中所述重组醇脱氢酶的基因是运动发酵单胞菌的醇脱氢酶基因。
4. 权利要求 3 的菌株，其中运动发酵单胞菌醇脱氢酶基因编码醇脱氢酶 II。
- 10 5. 权利要求 1 的菌株，其中所述重组醇脱氢酶的基因是鼠链球菌醇脱氢酶基因。
6. 权利要求 1 的菌株，其中该菌株进一步的特征为产生细菌素。
7. 权利要求 6 的菌株，其中细菌素分子量低于 1000 道尔顿，并对细菌素敏感性变异链球菌株具有抗菌活性。
- 15 8. 权利要求 1 的菌株，其中该菌株为 D-丙氨酸营养缺陷型。
9. 权利要求 8 的菌株，其中该菌株在丙氨酸消旋酶基因上有缺陷。
10. 权利要求 1 的菌株，其中该菌株由 JH 1000 或其变异株衍生而来。
11. 一种重组变异链球菌株，其特征在于 1) 乳酸产生缺陷；2)
20 产生重组醇脱氢酶；和 3) 产生对细菌素敏感性变异链球菌株有抗菌活性的细菌素。
12. 权利要求 11 的菌株，其中该菌株为变异链球菌株 JH 1000 变异株。
13. 权利要求 12 的菌株，其中该菌株为相对于变异链球菌株 JH 1000
25 可产生升高水平的细菌素的变异链球菌 JH 1000 的变异株。
14. 权利要求 13 的菌株，其中该变异链球菌 JH 1000 变异株为变异链球菌 JH 1140 或其变异株。
15. 权利要求 11 的菌株，其中该菌株为 D-丙氨酸营养缺陷型。
16. 权利要求 15 的菌株，其中该菌株在丙氨酸消旋酶上有缺陷。

17. ATCC 登录号为 55676 的变异链球菌株 JH 1140。
18. 一种产生重组变异链球菌株的方法，该菌株的特征在于乳酸产生缺陷和产生重组的醇脱氢酶，该方法包括以下步骤：
用编码醇脱氢酶的基因转化变异链球菌株，以及
5 在乳酸合成途径中引入突变使得该突变引起乳酸产生缺陷。
19. 权利要求 18 的方法，其中乳酸合成途径中的突变为乳酸脱氢酶基因上的缺陷。
20. 权利要求 18 的方法，其中醇脱氢酶为运动发酵单胞菌的醇脱氢酶。
- 10 21. 权利要求 18 的方法，其中变异链球菌株产生对细菌素敏感性变异链球菌株有抗菌活性的细菌素。
22. 权利要求 21 的方法，其中该变异链球菌株为 JH 1000 变异株。
23. 权利要求 22 的方法，其中变异链球菌株 JH 1000 变异株为变异链球菌株 JH 1140。
- 15 24. 权利要求 18 的方法，其中该菌株为 D-丙氨酸营养缺陷型。
25. 权利要求 24 的方法，其中该菌株在丙氨酸消旋酶上含有缺陷。
26. 权利要求 1-17 中任一项所述的重组变异链球菌株在制备用于降低龋齿易感宿主的龋齿发病率或严重性的药物中的用途。
27. 一种用于降低龋齿发病率或严重性的药物组合物，包括：
20 重组变异链球菌株，该菌株具有 1) 重组醇脱氢酶基因和 2) 乳酸产生缺陷，和
药用载体。
28. 权利要求 27 的组合物，其中该重组变异链球菌产生对细菌素敏感性变异链球菌株有抗菌活性的细菌素。
- 25 29. 权利要求 27 的组合物，其中乳酸产生缺陷是因为乳酸脱氢酶基因上有缺陷。
30. 权利要求 27 的组合物，其中重组醇脱氢酶基因是运动发酵单胞菌的醇脱氢酶基因。
31. 权利要求 27 的组合物，其中该重组变异链球菌株为 D-丙氨酸营养缺陷型。
- 30 32. 权利要求 31 的组合物，其中该重组变异链球菌菌株在丙氨酸

消旋酶基因上有缺陷。

33. 权利要求 31 的组合物，其中该组合物中还含有 D-丙氨酸。

34. 权利要求 27 的组合物，其中该组合物中还含有调味剂。

35. 权利要求 27 的组合物，其配制成漱口水、牙膏、咀嚼胶、牙
5 线、可嚼药片、亲液胶或培养基。

龋齿的替补疗法关于联邦赞助研究的声明

- 5 本发明通过国家牙科研究所，公共卫生署基金第 DEO 4529 号，至少部分受到联邦政府的基金资助。政府对本发明享有一定的权力。

发明背景发明领域

- 10 本发明涉及龋齿预防的方法与组合物。

相关领域说明

- 15 某种细菌在宿主中形成菌落的能力由许多因素决定，例如细菌的代谢需要，以及该菌与已先存在的细菌菌群的相互作用。细菌间的相互作用通常可分为“正性的”或“负性的”。在正性相互作用中，一种“效应物”细菌菌株改变微环境而有利于第二种，“靶”有机体形成菌落。在负性相互作用中，效应物菌株改变微环境从而减弱或完全阻止靶细菌形成菌落。在宿主中竞争形成菌落的细菌间的负性相互作用通常被称为细菌的干扰。

- 20 利用细菌间的干扰作用，以一种非致病性效应物菌株替代致病菌株的治疗方案称为替补疗法。成功的替补疗法需要这样的效应物菌株：1）非致病性，2）改变微环境从而阻止病原体的定居或过度生长，3）在易感宿主中持续定居防止靶病原体的再感染，并攻击性地取代易感组织中为宿主固有菌群一部分的病原体。

- 25 众所周知龋齿由口腔中生长的细菌所引起。人类中引起龋齿的主要病原菌为变异链球菌。变异链球菌与产生龋齿有关的典型特征包括产生乳酸的能力及其在牙釉质上聚积的能力（即形成牙斑）（Gibbons 等，1969 年，《细菌学杂志》（J. Bacteriol.）98 卷 341 - 346 页；Makinen 等，1972 年，《国际牙科杂志》（Int. Dent. J.）22 卷 362 - 386 页和 Jordan，1965 年，《纽约科学院年报》（Ann. N. Y. Acad. Sci.）131 卷，30 905 - 912 页）。应用替补疗法原理，需要分离一种非龋齿致病性效应变异链球菌菌株，如某种乳酸合成缺陷的变异链球菌菌株。龋齿替补疗法的

应用进展近来已有综述（ Hillman 等， 1986 年， 见： 《口腔研究中的新生物技术》（ New Biotechnologies in Oral Research ） H. M. Myers， 编， S. Karger. Basel, Switzerland 出版， 1 - 17 页）。

生产一种适用于龋齿替补疗法的乳酸缺陷型变异链球菌菌株， 遇到了相当大的困难。 乳酸合成缺陷对变异链球菌是致死性的。 Abhyanakar 等（ 1985 年， 《牙科研究杂志》（ J. Dent. Res. ） 64 卷， 1267 - 1271 页）利用一种含有已存在（自发的）影响丙酮酸代谢的突变的非典型变异链球菌株， 通过化学诱变， 获得了一种乳酸脱氢酶（ IDH ） - 缺陷的变异链球菌突变株。 然而， 该菌株中化学诱导和自发产生的突变仍不典型。 而且， 化学诱导的非典型突变能恢复成野生型， 从而具有致病性， 产生龋齿现象。 后来在其它变异链球菌株中产生 LDH - 缺陷型的尝试也失败了（ Hillman 等， 1994 年， 《感染与免疫》（ Infect. Immun. ） 62 卷， 60 - 64 页； Chen 等， 1994 年， 《细菌学杂志》（ J. Bacteriol. ） 176 卷， 1542 - 1545 页）。

很清楚， 本领域需要一种稳定， 乳酸缺陷型， 非龋齿致病性的变异链球菌菌株， 适用于防止和/或治疗龋齿的替补疗法。

发明概述

本发明基于以下发现： 通过在与乳酸合成路径有关的基因中导入突变可获得乳酸缺陷型变异链球菌株， 并通过在该菌株中导入一个重组醇脱氢酶（ adh ）基因以避免该突变的致死性。 重组的 adh 防止该细菌中代谢产物（如丙酮酸）的堆积， 从而避免乳酸缺陷的致死性。 该策略可用来生产适合龋齿替补疗法的变异链球菌株。

总的来说， 本发明以在龋齿易感宿主中预防和/或治疗龋齿的方法和组合物为特征。

本发明的一个特色为一种重组变异链球菌株， 该菌株的特征在于乳酸产生缺陷（如由于乳酸脱氢酶活性的丧失）， 和替代的重组醇脱氢酶（ ADH ）的产生。 “乳酸产生缺陷”或“乳酸缺陷”指重组变异链球菌株相对于野生型变异链球菌产生乳酸的量大为降低。 优选“乳酸缺陷型”重组变异链球菌产生的乳酸几乎检测不到。 本发明的特色还在于生产本发明中重组菌株的方法。

优选的重组变异链球菌菌株具有以下特征： 1) 乳酸产生缺陷； 2)

重组醇脱氢酶的产生；和 3) 产生对细菌素敏感性变异链球菌株具有抗菌活性的细菌素；和 4) 可任选为营养缺陷型（例如 D - 丙氨酸营养缺陷型）。

另外优选的重组变异链球菌菌株为乳酸产生缺陷型，能产生重组醇脱氢酶，并为营养缺陷型（例如为 D - 丙氨酸营养缺陷型）。

本发明的另一特色在于一种药物组合物，包括重组乳酸缺陷、重组 ADH - 产生的变异链球菌及药用载体。

本发明的特色还在于一种在龋齿易感宿主中降低龋齿发病率和严重性的方法，该方法为给龋齿易感宿主口服能有效替代宿主口腔中致龋齿变异链球菌剂量的重组变异链球菌株，该重组菌株具有 1) 重组的醇脱氢酶基因和 2) 乳酸产生缺陷。

本发明的另一特色在于维持宿主口腔内 D - 丙氨酸营养缺陷型细菌（如，D - 丙氨酸营养缺陷型变异链球菌）的组合物，含有能够维持 D - 丙氨酸营养缺陷型细菌生长的 D - 丙氨酸。

本发明的一个优点为重组变异链球菌 1) 为乳酸缺陷型，从而不会引起龋齿，和 2) 能有效地替代宿主口腔中能引起龋齿的变异链球菌菌株。

本发明的另一个优点为，重组的变异链球菌菌株为 D - 丙氨酸营养缺陷型，该菌株的定居可通过给予 D - 丙氨酸得到控制。

本发明的其它特点和优点可以从下述的优选实施方案和权利要求中显示。

附图简述

图 1 示运动发酵单胞菌醇脱氢酶 II 的氨基酸序列（SEQ ID NO: 1）和 DNA 序列（SEQ ID NO: 2）。

图 2 示葡萄糖对变异链球菌菌株 CH4ts 和 NG8（对照）的生长，存活，及胞内丙酮酸浓度的影响。符号：MG8 加葡萄糖，——□——；NG8 不加葡萄糖，——○——；CH4ts 加葡萄糖，——○——；CH4ts 不加葡萄糖，——△——。

图 3 示葡萄糖浓度和温度对 10 % 稀释率的变异链球菌菌株 CH4ts 连续培养的影响。图 A 符号：——□——，光密度；——○——，葡萄糖浓度；图 B 符号：——○——，pH；——□——，乳酸浓度；——△——，理论洗出；——○——，乙醇浓度；——□——，三羟基丁酮浓度。

图4示葡萄糖浓度和温度对0.6%稀释率的变异链球菌菌株CH4ts连续培养的影响。符号：——□——，光密度；——○——，葡萄糖；——○——，理论洗出。

发明详述

- 5 龋齿由通常生活在口腔中的变异链球菌产生的乳酸及其聚积引起。但是，由于变异链球菌中乳酸产生途径的突变对细菌是致死的，因此将乳酸缺陷型变异链球菌导入口腔，取代产生乳酸的变异链球菌是不可能的。

- 10 本发明基于以下发现：能存活的乳酸缺陷型变异链球菌菌株可通过导入编码重组醇脱氢酶（ADH）的核酸转化菌株产生，同时在乳酸合成途径中引入突变，而获得重组产生ADH的乳酸缺陷型菌株。重组的ADH阻止了细菌代谢产物的堆积，从而消除了乳酸缺陷的致死性。该策略可用来生产适合龋齿替补疗法的重组变异链球菌菌株。

本发明中重组变异链球菌菌株

- 15 “重组变异链球菌菌株”是利用多种重组核酸技术（即涉及DNA或RNA人工操作的技术）中的任何一种，产生的变异链球菌非天然产生菌株。总的来说，本发明中重组变异链球菌菌株至少有以下特征：1）乳酸产生缺陷，和2）重组醇脱氢酶（ADH）的产生。

- 20 优选的重组变异链球菌菌株还具有以下特征，即能产生对细菌素敏感性变异链球菌菌株具有抗菌活性的细菌素。这里所指的“细菌素”，是变异链球菌菌株JH 1000产生的特异性细菌素或细菌素样毒素（Hillman等，1984年，《感染与免疫》（Infect. Immun.）44卷，141-144页）。变异链球菌JH 1000产生的细菌素表观分子量低于1000Da，并对细菌素敏感性变异链球菌菌株具有抗菌活性。细菌素的产生为变异链球菌与通常存在于口腔内，不产生细菌素的变异链球菌菌株提供了选择优势。本发明重组变异链球菌菌株产生的细菌素，可以消除固有的细菌素敏感性变异链球菌菌株，从而干扰细菌素敏感性菌株的定居，促进重组变异链球菌菌株在口腔中的生长。

- 30 出于能够控制本发明中重组变异链球菌菌株在口腔中生长的愿望，优选的重组变异链球菌菌株对通常不存在于哺乳动物宿主口腔中的有机物质应该为营养缺陷型，再优选的为D-氨基酸营养缺陷型，更加优选的为D-丙氨酸营养缺陷型。营养缺陷型菌株的生长可通过调节该菌株营养

缺陷的有机物的量而得到控制。因此，如果需要除去宿主中的重组变异链球菌，只要停止供应该菌株营养缺陷的特异有机物，就可终止细菌的生长。

因此，本发明的重组变异链球菌菌株具有以下特征：1) 乳酸缺陷，
5 和 2) 产生重组的 ADH，进一步的特征为 3) 产生细菌素，和/或 4) 对某特异有机物营养缺陷，优选 D - 氨基酸营养缺陷，更优选 D - 丙氨酸营养缺陷。现将详细阐述本发明的每一种重组变异链球菌菌株的生产。

用于生产本发明重组变异链球菌菌株的亲本变异链球菌株

10 用于生产本发明重组变异链球菌菌株的变异链球菌株可为任何一株变异链球菌。用于生产本发明重组变异链球菌菌株的优选变异链球菌株对通常生活在口腔中的野生型变异链球菌株，应具有选择优势。选择优势可通过能促进该菌株在口腔中生存的诸多特性中的任何一种（如抗菌化合物的产生，相对代谢需求，相对生长率、代谢物清除剂的产生），和取
15 代生活在口腔中的固有菌株而获得。并且，本发明重组变异链球菌菌株的定居基本上不破坏其它非变异链球菌株（如与产生龋齿无关的正常菌群）的定居。例如，用产生高水平细菌素的变异链球菌 JH 1000 的变异株感染人志愿者，结果该菌株取代了口腔中固有致龋齿变异链球菌株（推测部分是因为 JH 1000 菌株产生的细菌素）而没有影响口腔中其它固有
20 革兰氏阳性菌（Hillman 等，1987 年，《牙科研究杂志》（J. Dent. Res.）66 卷，1092 - 1094 页）。

优选的变异链球菌株产生变异链球菌 JH 1000 的细菌素。更优选的重组变异链球菌菌株来自相对于变异链球菌 JH 1000 能产生更多细菌素的变异链球菌 JH 1000 变异株。“变异株”是经过遗传修饰的细菌，相
25 对于来源的亲本菌株显示表型的改变。表型改变可以是诸多遗传损伤中任意一种的结果，如改变位于：1) 与结构基因操纵相连的启动子（如导致基因转录的增强）；和/或 2) 编码特异产物的结构基因（如产物活性增强）。遗传损伤是野生型核酸序列的改变，其结果是导致细菌表型的改变。

30 例如，变异链球菌 JH 1000 的“细菌素变异株”是相对于变异链球菌 JH 1000 亲本菌株具有增强的细菌素活性的细菌。优选变异链球菌 JH 1000 变异株的细菌素活性相对于其亲本变异链球菌有所提高，优选提高

约 10 倍，再优选约 1.5 - 5 倍，最优选约 2 - 4 倍，通常较亲本变异链球菌 JH 1000 菌株提高约 3 倍。这些变异株细菌素活性增强的原因可以是：相对于亲本菌株细菌素的产量增加，和/或产生的细菌素相对于野生型变异链球菌细菌素具有增强的抗菌活性。

- 5 “变异株”可通过本领域众所周知的多种方法产生，如诱变（即将细菌暴露于诱变剂），筛选自发突变体，或用重组技术进行遗传操作。诱变可通过将细菌暴露在紫外灯下，或任何化学诱变剂下，按本领域熟知的方法完成（例如甲基磺酸乙酯（EMS），亚硝酸，羟胺，核苷酸类似物（如 5 - 溴尿嘧啶，2 - 氨基嘌呤），或交联剂（如吡啶））。产生变异菌株的方法是本领域众所周知的（参见，如 Sambrook 等，1989 年《分子克隆：实验室手册》（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）第二版，冷泉港实验室出版，冷泉港，纽约）。

- 15 “自发突变”为天然发生的突变，即没有人为的直接遗传操作，或暴露于诱变剂。自发突变体的筛选可通过培养菌株，并通过，如，变异菌株产生或过量产生的某种特异因子，如细菌素，来筛选所需的变异株。筛选自发突变株的方法在本领域是众所周知的（参见，如 Sambrook 等，上文）。

- 20 用重组技术产生变异株的方法也为本领域熟知（参见，如 Sambrook 等，1989 年，上文）。例如，细菌素活性增强的变异链球菌 JH 1000 变异株可通过编码细菌素 DNA 的多拷贝表达，和/或能提高转录水平的细菌素启动子的突变而产生。

醇脱氢酶基因

- 25 由于乳酸合成缺陷对变异链球菌是致死性的（Hillman 等，1994 年，《感染与免疫》（Intect. Immun.）62 卷，60 - 64 页；Hillman 等，1994 年《细菌学杂志》（J. Bacteriol.）176 卷，1542 - 1545 页），重组乳酸缺陷型变异链球菌的缺陷必须通过重组醇脱氢酶（ADH）的产生来弥补。重组 ADH 的产生防止了代谢物，如丙酮酸，的堆积，否则将引起乳酸缺陷型变异链球菌的死亡。

- 30 “重组 ADH 的产生”指重组的变异链球菌株表达具有功能的 ADH 酶，该酶利用重组 DNA 技术引入变异链球菌中（即用编码 ADH 酶的 DNA 转化变异链球菌）。“转化”指新的 DNA（即相对细胞为外源性 DNA）进入细胞后诱导的永久性（即稳定的）遗传改变。

编码 ADH 的 DNA 可从任何有机体中获得, 优选的是从细菌中获得, 再优选的是运动发酵单胞菌或鼠链球菌, 最优选的是运动发酵单胞菌。编码 ADH 的 DNA 也可从变异链球菌中获得, 因此, 导入的编码 ADH 的 DNA 与变异链球菌中固有的 adh 基因结合, 在变异链球菌的基因组中形成多拷贝的编码 ADH 的 DNA。或者, 重组的 ADH 可通过在变异链球菌 adh 基因的调控机制中引入一突变而产生 (例如在 adh 启动子上引入突变从而提高 adh 基因的转录)。优选的重组 ADH 是运动发酵单胞菌的醇脱氢酶 II, 该酶已被克隆与测序 (Genbank Accession No. M15394; Conway 等, 1987 年《细菌学杂志》(J. Bacteriol.) 169 卷, 2591 - 2597 页, 在此引入作为参考)。运动发酵单胞菌醇脱氢酶 II 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 和 DNA 序列 (SEQ ID NO: 2) 见图 1 所示。

鉴定、克隆、稳定转化及表达编码感兴趣 DNA (如 ADH) 的 DNA 片段的方法已常规化, 并为本领域熟知 (参见, 例如 Sambrook 等, 1989 年《分子克隆: 实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) 第二版, 冷泉港实验室出版, 冷泉港, 纽约)。例如, 分离编码 ADH 的 DNA 可通过从基因组 DNA, 或已有的该基因克隆中对该序列进行 PCR 扩增而完成。重组 ADH 的表达可通过将 adh 结构基因与一在变异链球菌中有利于表达的启动子 (如 spaP 或天然 ldh 启动子) 操纵连接而完成。

功能性 ADH 的产生可通过, 如用本领域熟知的传统的 ADH 活性法 (例如 NAD 依赖的乙醇氧化法) 进行 (Neal 等, 1986 年, 《欧洲生物化学杂志》(Eur. J. Biochem.) 154 卷, 119 - 124 页, 在此引入作为参考)。

25 乳酸缺陷型变异链球菌的产生

“乳酸缺陷”或“乳酸产生缺陷”指变异链菌株产生的乳酸量较野生型变异链球菌显著降低。优选的“乳酸缺陷型”重组变异链球菌产生的乳酸量几乎检测不到。

本发明重组变异链球菌的乳酸缺陷是乳酸合成途径缺陷的结果。“缺陷”是编码基因的 DNA 改变, 从而阻碍了功能性基因产物的表达。“缺陷”包括导致基因转录和/或翻译的抑制或显著降低的改变。“缺陷”也包括结构基因的改变, 从而导致转录和翻译的基因产物无功能性, 或相

对于野生型基因产物其功能显著降低。

“乳酸合成途径的缺陷”是阻止或显著降低乳酸产量的遗传缺陷。

乳酸合成途径缺陷可包括，例如，促进乳酸合成的酶的遗传损伤，和/或与编码乳酸合成所必需酶的结构基因操纵相连的启动子的损伤。优选的

- 5 乳酸合成途径缺陷是因为编码乳酸脱氢酶的基因（ldh）的缺陷（例如ldh结构基因的缺陷，和/或与ldh结构基因操纵连接的启动子的缺陷）。具有LDH缺陷的变异链球菌株称作LDH⁻菌株。

- 乳酸合成途径缺陷可通过诱变（即将细菌暴露于诱变剂下），自发突变株的筛选，或应用重组技术进行遗传操作而引入。如上所述，以上
- 10 每种技术均为本领域熟知（参见，例如 Sambrook 等，上文）。优选的乳酸合成途径缺陷可应用重组技术引入，如将缺陷型ldh结构基因导入细菌，随后发生位点特异性重组，野生型ldh被缺陷型ldh取代。变异链球菌ldh基因已被克隆，其核苷酸序列也已确定（GenBank accession No. M72545），重组的ldh基因已在大肠杆菌中表达（Duncan 等，1991年
- 15 《感染与免疫》（Infect. Immun.）59卷，3930 - 3934页；Hillmam等，1990年，《感染与免疫》（Infect. Immun.）58卷，1290 - 1295页，在此引入作为参考）。

营养缺陷型重组变异链球菌株的产生

- 在某些情况下需除去宿主口腔中生活的重组变异链球菌，感染的重
- 20 组变异链球菌优选为营养缺陷型。“营养缺陷型”细菌是指为了生长，除了碳源外，还需某种特异有机物质的细菌。例如，“D - 丙氨酸营养缺陷型细菌”是指没有D - 丙氨酸就不能生长的细菌。尽管营养缺陷型细菌在所需的有机物质缺乏时常能短时期存在（即存活但不生长），但其维持需定期供应该有机物质。

- 25 例如，D - 丙氨酸营养缺陷型细菌需定期供应D - 丙氨酸才能生长并维持在小生境如口腔中定居。由于哺乳动物通常不能产生D - 氨基酸，而且D - 丙氨酸也不能由正常菌群中的有机体分泌，因而D - 丙氨酸营养缺陷型细菌不能从宿主口腔的正常环境中获得D - 丙氨酸。因此，本发明治疗方法中营养缺陷型细菌的应用提供了这样的优点，即口
- 30 腔中重组变异链球菌的生长可通过停止供应特异有机营养物，如D - 丙氨酸而被阻断。

细菌的营养缺陷可通过多种本领域熟知的技术产生，例如化学诱

变，自发突变体的筛选，和/或重组技术（例如转座子诱变，用缺陷的或无功能的基因重组置换）（参见，例如 Sambrook 等，上文）。优选的营养缺陷型变异链球菌株可通过自发突变体的筛选，或重组方法（例如在 D - 氨基酸合成途径中引入缺陷）获得。优选的 D - 丙氨酸营养缺陷型变异链球菌株可通过在编码丙氨酸消旋酶的基因中引入缺陷而产生，该酶可将 L - 丙氨酸转换为 D - 丙氨酸。几种不同细菌中编码丙氨酸消旋酶的基因已被克隆（嗜热脂肪芽孢杆菌，Tanizavua 等，1988 年，《生物化学》（Biochem）27 卷，1311 - 16 页；枯草芽孢杆菌，Ferrari 等，Subtilis，1985 年《生物技术》（Biotechnol.）（NY）3 卷，1003 - 7 页；大肠杆菌，Lobocka 等，1994 年《细菌学杂志》（J. Bacteriol.）176 卷，1500 - 10 页；鼠伤寒沙门氏菌，Galakatos 等，1986 年《生物化学》（Biochem）23 卷，3255 - 60 页；和鼠伤寒沙门氏菌，Wasserman 等，1984 年《生物化学》23 卷，5182 - 7 页）。

含本发明中重组变异链球菌的药物组合物

“药物组合物”是适于给龋齿易感患者口腔用药的本发明中重组变异链球菌株的组合物。通常说，本发明中的药物组合物包括重组变异链球菌株和适于药用的载体。“适于药用的载体”指能将重组变异链球菌株导入至宿主口腔中的媒介物，该媒介物与细菌细胞和宿主细胞的生存相容。适用于本发明中活的重组变异链球菌菌株给药的适于药用的载体对本领域的技术人员来说是熟知的。适于药用的载体的筛选有赖于许多因素，包括用于给药的变异链球菌株，以及用于导入重组变异链球菌的制剂。

适用于本发明重组变异链球菌导入的药用载体包括，但不限于，盐水缓冲液（如磷酸缓冲盐水），适于药用的培养基（如 Luria 肉汤，脑心浸液肉汤（BHI）），或其它可保持细菌生存能力的溶液。另外，这样的药用载体可以为水溶液或非水溶液，悬浮液，和乳浊液。许多适于存活或冻干菌口腔用药的药用载体在本领域是众所周知的（参见，例如，《雷明顿氏药物科学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）第 18 版，1990 年，Mack Publishing Co., Easton PA，在此引入作为参考；及药物组合物 LACTINEX™，一种用于存活乳酸杆菌口腔用药的商品制剂）。

本发明的重组变异链球菌株可被配制成任何适于口腔用药的组合物。例如，重组变异链球菌株可用重组变异链球菌培养物配制成亲液胶或细胞膏，或者直接将重组变异链球菌培养物进行口腔用药。重组变异链球菌也可以漱口水、牙膏、牙线、咀嚼胶或可咀嚼药片的形式给药。

- 5 药物组合物还应包括维持组合物中细菌存活的营养物。药物组合物尚可包括能提高组合物的适口性和/或使患者更易接受，而不降低组合物效果的调味剂、着色剂、芳香剂、或其它化合物。制备口腔用药制剂的方法在本领域是众所周知的（参见，例如，《雷明顿氏药物科学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）第18版，上文，在此引入
10 作为参考）。

维持本发明中营养缺陷型重组变异链球菌生存的组合物

- 口腔中重组营养缺陷型变异链球菌株必须定期供应其营养缺陷的有机物才能维持其定居。长时间缺乏该有机物，营养缺陷型菌株将停止生长并不能在口腔中持久定居。例如，在D-丙氨酸缺乏时，D-丙氨酸
15 营养缺陷型菌株将因细胞壁的削弱而溶菌。本发明治疗方法中应用营养缺陷型变异链球菌株，为在发生任何不希望的副作用时消除该菌株提供了一个“自动保险”机制。然而，由于本发明重组变异链球菌株与口腔中正常生长的固有变异链球菌株相似，因此产生不希望的副作用的可能性很小。

- 20 本发明中营养缺陷型重组变异链球菌在口腔中定居的维持可通过营养缺陷维持量的该菌株营养缺陷的有机物的口腔给药来实现。“细菌营养缺陷维持量”指足以维持营养缺陷型细菌在口腔中生存的有机物的量。例如，若重组变异链球菌为D-丙氨酸营养缺陷，“D-丙氨酸细菌营养缺陷维持量”为足以维持D-丙氨酸营养缺陷型菌株在宿主口腔
25 中生存的D-丙氨酸的量。通常，单剂量D-丙氨酸细菌营养缺陷维持量的D-丙氨酸含约1-100mg，优选约5-75mg，更优选约10-50mg，最优选约20-25mg的D-丙氨酸。D-丙氨酸在溶液形式的药物组合物中的浓度范围约为0.01-167mg/ml（后者为D-丙氨酸在25℃水中的饱和溶液），优选约0.1-50mg/ml，更优选约1-25mg/ml。
30 D-丙氨酸在药物组合物中的浓度可根据所用的载体以及D-丙氨酸在该特异载体中的饱和度而有所变化。

维持营养缺陷型重组变异链球菌在口腔中生存所必需的有机物可用多种方式配制。例如，若重组变异链球菌为 D - 丙氨酸营养缺陷型，维持 D - 丙氨酸营养缺陷型菌株的组合物可配制成漱口水，咀嚼胶，牙线，牙膏，可咀嚼药片，或任何其它适于对宿主口腔用药的形式。除有机物（例如 D - 丙氨酸）外，组合物中还可含有可提高组合物的适口性和/或使患者更易接受而不影响组合物中有机物作用的调味剂、着色剂、芳香剂或其它化合物。

为本发明重组变异链球菌口腔用药以及该菌株在口腔中的维持而配制的药物组合物必须不影响口腔以及口腔中生长的任何有用正常菌群的内在特征。适于口腔用药的制剂的制备方法在本领域是众所周知的（参见，例如，《雷明顿氏药物科学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）第 18 版，Gennaro 编，1990 年，Mack Publishing Co., Easton, PA，在此引入作为参考）。

给药

本发明重组变异链球菌可用于任何龋齿易感宿主，优选变异链球菌可在其口腔中生长的宿主，再优选哺乳动物宿主（如人，犬，马，猫科动物，羊等），更优选的宿主为人。重组变异链球菌株可给任何年龄的宿主用药，如儿童时期，青春期，或成年时期。

本发明重组变异链球菌株可以多种方式进行口腔用药。例如，重组变异链球菌菌株可以悬浮液，可咀嚼药片，药丸，胶囊，持续释放的制剂（例如含重组变异链球菌株的口腔植入物）或亲液粉的形式进行给药。重组变异链球菌株也可通过将亲液胶（lyophil），培养物，或细胞膏直接用于患者牙齿而进行给药。只要治疗组合物是用于口腔，任何给药方式都是可以的。优选重组变异链球菌可通过直接将细菌细胞悬液用于患者的牙齿而给药，例如通过刷牙和牙线。

通常，给予患者的重组变异链球菌的量是足以取代宿主口腔中致龋齿变异链球菌株的量。“足以取代宿主口腔中致龋齿变异链球菌株的量”是指足以使重组变异链球菌株在口腔中生长，并消除口腔中产生乳酸并致龋齿的固有变异链球菌株（例如通过细菌间对营养的竞争和/或通过重组变异链球菌株产生的细菌素）的量。用于本发明中药物组合物的术语“单位剂量”指适用于受体单位剂量的物理法划分单位，每单位含经计算与所需稀释剂，即载体或赋形剂，可共同产生预期疗效的预先确定量

的活性物质（如活的重组变异链球菌）。

根据不同患者的不同情况，如身高，体重，年龄，病情（如产生乳酸并致龋齿的固有变异链球菌的粘着性和/或数目）和对治疗的反应（如宿主口腔对细菌生长的敏感性），具体的剂量可有较宽的变动范围。确定适宜的用药方式与剂量的方法通常由现职牙医或其他临床医生根据实际情况确定。这样的确定方式对本领域的普通技术人员来说是常规的（参见，例如，《雷明顿氏药物科学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）第18版，Gennaro编，Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990）。

通常，给予患者的重组变异链球菌数量约为 $10^2 - 10^{15}$ 个菌体，优选约为 $10^3 - 10^{14}$ 个菌体，更优选约为 $10^5 - 10^{12}$ 个菌体，通常约 10^{11} 个菌体。合适的给药剂量可通过足以使链球菌属的细菌在动物模型口腔中生长的量来推算，例如鼠链球菌在鼠口腔中的生长。合适的剂量也可通过产细菌素菌株变异链球菌 JH 1000 及其表达不同水平细菌素活性的变异株在人口腔中生长的合适剂量来估算（Hillman等，1987年，《牙科研究杂志》（J. Dent. Res.）66卷，1092 - 1094页，在此引入作为参考）。

可多剂量应用重组变异链球菌株以达到在口腔中生长并取代宿主固有致龋齿变异链球菌株的目的。通常，本发明的重组变异链球菌株仅需给予患者一次。若重组变异链球菌株为营养缺陷型，该菌株的生长必须通过给予含合适有机物的组合物来维持。例如，若重组变异链球菌株为D-丙氨酸营养缺陷型，必须给予D-丙氨酸使该菌株在口腔中持续定居。D-丙氨酸，或其它合适的有机物，通常一星期至少给药一次，优选一天至少一次，更优选一天至少二次，并能作为患者常规牙齿护理的一部分给药，例如，作为牙膏，牙线或漱口水的成份。

重组变异链球菌株在宿主口腔中成功定居可通过培养患者口腔中的细菌来证实，重组菌株的鉴定，可通过例如重组ADH的产生，细菌素的产生，ELISA，在选择性pH指示物培养基中的生长或其它本领域熟知的细菌鉴定方法来进行。

下面的实施例旨在对本发明进行详细说明而非对本发明加以限制。尽管它们在可能用到的方法中是典型的，但对本领域的普通技术人员来说也可采用他们熟知的其它方法。

实施例

实施例 1: 材料与方法

菌株, 质粒, 与生长条件

- 产生变异链球菌菌株 CH4ts (Chen 等, 1994 年, 《细菌学杂志》
5 (J. Bacteriol.) 176 卷, 1542 - 1545 页) 和分离变异链球菌菌株 NG8
(Lee 等, 1989 年, 《感染与免疫》(Imfect. Immun.) 57 卷, 3306
- 3313 页) 的方法在此之前已有描述。用于克隆的大肠杆菌菌株 DH5 α
可容易得到。含克隆的运动发酵单胞菌丙酮酸脱羧酶 (PDC) 基因的质
粒 pLO1276 (Conway 等, 1987 年, 《细菌学杂志》(J. Bacteriol.)
10 169 卷, 949 - 954 页), 含克隆的运动发酵单胞菌醇脱氢酶 II (adh)
基因的质粒 pLO1286 (Conway 等, 1987 年, 《细菌学杂志》(J.
Bacteriol.) 169 卷, 2591 - 2597 页), 含克隆的变异链球菌 spaP 基因
的以 pCR2 为基础的质粒 pCR3 - 8 (Crowley 等, 1995 年, 《牙科研
究杂志》(J. Dent. Res.) 74 卷摘要 No. 1511)、以及含来自变异链球
15 菌的四环素抗性基因的质粒 pVA981 (Tobian 等, 1984 年, 《细菌学杂
志》(J. Bacteriol.) 160 卷, 556 - 563 页) 的构建在此之前均已有描
述。上面引用的每篇参考文献在此引入作为上述质粒的构建, 以及列举
菌株的产生或分离的相应描述的参考。

- CH4ts 的分批和连续培养物在添加了 0.5 % 胰蛋白胨和 1 % 葡萄糖的
20 Carlsson 合成培养基 (Carlsson 等, 1970 年, 《龋齿研究》(Caries Res.)
4 卷, 297 - 304 页) 中生长。用于 ADH 活性试验的细菌在添加 1 % 葡
萄糖的 Todd - Hewitt 肉汤中生长。在适宜的情况下还应用了氨苄青霉
素 (50 μ g/ml), 四环素 (10 μ g/ml), 和红霉素 (5 μ g/ml)。

培养物试验

- 25 分批和连续培养样品在指定时间移出, 并确定其 pH 及 550nm 处
的光吸收。4 $^{\circ}$ C 离心移去细胞, 得到的无细胞液用酶学方法检测葡萄糖、
乙醇、和乳酸 (Sigma 化学公司, St. Louis, MO), 并用气 - 液色谱
法 (Hillman 等, 1987 年, 《感染与免疫》(Infect. Immun.) 55 卷,
1399 - 1402 页) 分析 3 - 羟基丁酮。用磷酸缓冲盐水 (PBS) 离心洗
30 涤细胞团一次, 并用化学法 (Friedman 等, 1957 年, 见 S. P. Colowick
与 N. O. Kaplan 编《酶学方法》(Methods in Enzymology) Academic
Press, Inc. New York, 第 414 - 418 页) 测定胞内丙酮酸浓度。图

中所列数据为两次实验结果的平均值。

醇脱氢酶活性试验

- 200ml 大肠杆菌和变异链球菌过夜培养物的菌体于 4 °C 离心收集并用 100mM KPO₄ 缓冲液 (pH 8.5) 洗涤两次。细胞用重悬于 1ml 缓冲液并通过弗氏细胞压碎器以 15,000 psi 压力破碎。4 °C 离心 30 分钟除去菌体碎片。无菌体抽提液保存在冰上并按 Neale 等的方法 (Neale 等, 1986 年, 《欧洲生物化学杂志》 (Eur. J. Biochem.) 154 卷, 119 - 124 页) 进行 NAD 依赖的乙醇氧化试验。

乳酸脱氢酶活性试验

- LDH 活性试验按前述方法 (Hillman 等, 1990 年, 《感染与免疫》 (Infect. Immun.) 58 卷, 1290 - 1259 页) 进行。概括地说, LDH 活性试验为用分光光度计在 340nm 处检测果糖 - 1,6 - 二磷酸 (FDP) 和丙酮酸依赖的 NAPH 的氧化。反应混合物包括 100μmol 磷酸钾, pH 6.2, 0.2μmol NADH, 10μmol 丙酮酸钠, 和 1 - 5μl 待测样品, 终体积为 1ml。测量活性的本底水平 1 分钟后, 加入 20μmol FDP 启动反应。

实施例 2：用于在变异链球菌中表达的运动发酵单胞菌 adh 结构基因的克隆

- 质粒 pADH 含有与变异链球菌 spaP 基因调控序列融合的运动发酵单胞菌 adh 开放阅读框。pADH 可如下构建, 首先用 SacI 和 DraIII 消化质粒 pCR3 - 8, 然后用绿豆核酸酶处理消化后的 DNA 以除去绝大部分 spaP 基因, 只保留其启动子、核糖体结合位点、和开放阅读框 5' 端的 52 个碱基。线性质粒 pCR3 - 8 质粒的 4.2 kb 片段用琼脂糖凝胶电泳回收。

- 用正向 (5' CTTCTTCAACTTTTTATATTCCTTTCG (SEQ ID NO: 3)) 和反向 (5' CGGAGGCATTGTTTG (SEQ ID NO: 4)) 合成引物以聚合酶链反应 (PCR) 由质粒 pLO1286 中扩增除了转录起始密码子 (ATG) 和另外一个 (G) 碱基之外的运动发酵单胞菌 adh 基因完整的开放阅读框。用琼脂糖凝胶电泳回收扩增片段, 并用绿豆核酸酶和多核苷酸激酶处理, 最后连入 pCR3 - 8 片段与 spaP 形成可转译的融合基因。所得质粒 pADH 用于转化大肠杆菌 DH5α 菌株。DH5α 的转化体在含氨苄青霉素的 LB 培养基上筛选。用限制性内切酶分析确定 pADH 插入序列的正确大小与方向。

在克隆到变异链球菌中之前, 将含有来自变异链球菌的四环素抗性基因的质粒 pVA981 的 3.5 kb HincII 片段 (Tobian 等, 1984 年, 《细菌学杂志》(J. Bacteriol.) 160 卷, 556 - 563 页) 插入 pADH 的 ScaI 位点, 将 pADH 转变为 pADH - tet。pADH - tet 构建物用于转化 DH5 α , 在含四环素的 Luria 肉汤培养基 (LB) 上筛选出的转化体用于试验对氨苄青霉素的敏感性。最后按 Perry 和 Kuramitsu 的方法 (Perry 等, 1981 年, 《感染与免疫》(Infect. Immun.) 32 卷, 1295 - 1297 页) 用 pADH - tet 转化变异链球菌。

10 实施例 3: 葡萄糖浓度对分批培养的 CH4ts 和 NG8 生长的影响

CH4ts (ldh^{ts}) 及其亲本菌株变异链球菌 NG8 的过夜分批培养物, 在 30 °C 下生长。CH4ts 含一乳酸脱氢酶 (LDH) 温度敏感突变。CH4ts 的 LDH 在 30 °C 时如同野生型, 但培养温度升至 42 °C 时, 热不稳定的 LDH 将失活。因此该菌株可用于实验检测 LDH 在变异链球菌 LDH 突变体的致死性中的作用。洗涤后的细胞用含和不含葡萄糖的新鲜配制的培养基 1:1000 稀释, 并在 42 °C 水浴中培养。在图 2 (图 A) 所示的时间, 通过将样品涂布于脑心浸液 (BH1) 平板并将平板 30 °C 培养以计数活菌。结果表明, 葡萄糖缺乏时 (虚线), CH4ts (空心三角) 和 NG8 (空心圆) 的表现相同: 3 小时后停止生长, 随后细胞逐渐死亡 (半衰期 = 23.5 小时)。但是, 当葡萄糖存在时 (实线), 与其亲本 (空心方框) 不同, CH4ts (空心圆) 在 3 小时内停止生长并加速了细菌的死亡 (半衰期 = 12.1 小时)。这个差异在时间上与丙酮酸在突变体菌体内高浓度的聚积相关 (图 2B)。

25 实施例 4: 葡萄糖和温度对连续培养的 CH4ts 和 NG8 的生长及终产物终度的影响

CH4ts 在恒化反应罐中 30 °C 生长至饱和。在培养温度升至 42 °C 之前, 提供每小时 0.1 稀释率的培养基流入液, 维持 72 小时。在 3 小时内, 细胞密度开始以与理论洗出率相同的速率下降, 表明细胞生长停止 (图 3)。这与反应罐中观察到的葡萄糖浓度的升高相关。

当连续培养实验用每小时 0.006 的稀释率重复时, 当温度升至 42 °C 时, 可获得 CH4ts 的稳定生长 (图 4)。紧跟着温度的改变, 与预期的

洗出率一致，乳酸浓度降低。乳酸产生的终止伴随着乙醇和 3 - 羟基丁酮产生的开始，导致连续培养物 pH 的逐渐升高。在整个实验期间，葡萄糖浓度仍检测不到。

5 这些数据表明在限制葡萄糖条件下，连续培养的 CH4ts 于 42 °C 可获得稳定生长。在限制葡萄糖条件下，CH4ts 的表现如同化学诱导的鼠链球菌 LDH 缺陷突变株，以提高乙醇和 3 - 羟基丁酮的产量来代替乳酸的产生（Hillman 等，1987 年，《感染与免疫》（*Infect. Immun.*）55 卷，1399 - 1042 页）。这些结果与发酵和酶学研究的结果相符，表明变异链球菌具有可调节的丙酮酸代谢替代途径。在合适的培养条件下，除乳酸
10 外，野生型变异链球菌还产生大量的甲酸、乙酸、乙醇和 3 - 羟基丁酮（Yamada 等，1975 年，《细菌学杂志》（*J. Bacteriol.*）124 卷，55 - 61 页；Hillman 等，1987 年，《感染与免疫》（*Infect. Immun.*）55 卷，1399 - 1402 页）。但是，这些替代途径显然不足以弥补 LDH 活性的缺乏。

15

实施例 5：ADH 的产生消除了变异链球菌 LDH⁻致死性

用含有与变异链球菌 spaP 调控序列融合的运动发酵单胞菌 adh 开放阅读框的 pADH 转化的大肠杆菌株 DH5 α 可表达克隆的 ADH 活性（特异活性为 6.95 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白）。这个结果与以前发表的结果一致，即
20 spaP 启动子和核糖体结合位点（rbs）在大肠杆菌中是有活性的（Lee 等，1988 年，《感染与免疫》（*Infect. Immun.*）56 卷，2114 - 2119 页）。其 ADH 活性水平约为用 pLO1286 转化的 DH5 α 中的 ADH 活性水平（特异活力为 41.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白）的 17%，pLO1286 具有原始克隆的 adh 基因和来自运动发酵单胞菌的调控序列。来自 pVA981（pADH
25 - tet）的四环素抗性基因的插入对 pCR2 骨架上氨苄青霉素抗性基因的打断并不影响 ADH 活性水平。

一微克的 pADH - tet 用于转化 CH4ts。坎贝尔型重组将 spaP::adh 融合基因引入 CH4ts 的染色体。插入位点尚未鉴定，但可能在 spaP 或内源性 adh 基因的同源区。在 42 °C，含四环素的培养基中生长以选择转化
30 的 CH4ts。从长出的几百个克隆中，一称作 CH4ts::adh 的纯化分离株，与其野生型祖亲本 NG8（ADH 特异活性，< 1.0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白）相比，具有明显更高的 ADH 活性（特异活性，60.43 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白）。

在添加 2 % 葡萄糖的 Todd - Hewitt 肉汤中, CH4ts::adh 与 NG8 在 42 °C 生长 48 小时。CH4ts::adh 的无菌体培养液比 NG8 的无菌体培养液 (pH 4.0 , 乙醇含量 < 1mM) 具有更高的 pH (4.7) 和乙醇含量 (21.60mM)。用更高 (5 , 10 或 20 %) 浓度的葡萄糖可得到相同的
5 结果。

在添加了 0.5 % 胰蛋白胍和 1 % 不同碳源的合成培养基中, 对 CH4ts::adh 和 NG8 在 42 °C 的生长作了比较 (表 1)。

表 1. 野生型和补充 ADH 的 LDH 缺陷型变异链球菌的生长特性

碳源	倍增时间(小时)		产量(O.D. ₅₅₀)		乳酸(mM)		乙醇(mM)	
	NG8	CH4ts::ADH	NG8	CH4ts::ADH	NG8	CH4ts::ADH	NG8	CH4ts::ADH
葡萄糖	2.1	2.0	0.94	1.08	20.1	0	1.4	21.2
半乳糖	4.8	2.4	0.68	0.99	19.3	0	1.3	18.9
乳糖	1.9	2.2	0.95	1.03	19.9	0	0.1	19.9
甘露糖醇	4.5	2.0	0.36	0.94	5.9	0	4.5	26.2
山梨糖醇	8.0	3.0	0.35	0.97	3.8	0	3.6	26.1
蔗糖	2.6	3.4	0.78	0.74	20.4	0	0	19.7

10 上述结果为两次独立实验的平均值。

除乳酸和乙醇外的其它发酵终产物未测定。

当葡萄糖, 乳糖或蔗糖作为碳源时 (CH4ts::adh NG8) 的生长速率与产量相当。当半乳糖, 山梨糖醇, 甘露糖醇作为碳源时, CH4ts::adh
15 比 NG8 具有短得多的倍增时间和更高的产量。生长在任何碳源中的 CH4ts::adh 的培养液中均检测不到乳酸, 而其乙醇含量比 NG8 培养液中高得多。

这些数据表明, 在相同的生长条件下, 重组变异链球菌株 CH4ts::adh 比 NG8 野生型对照菌株表现出高得多的 ADH 活性水平。而且, CH4ts
20 转化体可在非允许温度条件下生长, 表明克隆的 ADH 活性消除了 LDH 缺陷引起的代谢障碍。

这些数据进一步表明，当葡萄糖，乳糖或蔗糖作为唯一碳源且生产产量也相当时，CH4ts::adh与NG8的生长速率与生长产量相似。但是，在需氧条件下，NG8在甘露糖醇和山梨糖醇中生长差，而CH4ts::adh却生长良好。这个结果表明克隆的ADH活性提供了足够量的乙醇作为多元醇代谢中产生的大量电子的吸收库。NG8在半乳糖中生长也较差。还不清楚为什么在这种碳源中CH4ts::adh比NG8生长要好，这种碳源通过变异链球菌中塔格糖6-磷酸途径代谢（Hamilton等，1979年，《细菌学杂志》（J. Bacteriol.）140卷，1102-1104页），特别是因为它们在乳糖中的生长情况是相当的。

10

实施例6：丙酮酸脱羧酶的产生并不消除变异链球菌LDH⁻致死性

与实施例2-5所述相似的研究用于确定LDH缺陷是否能被丙酮酸脱羧酶的产生所弥补。来自运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶（pdc）基因（Conway等，1987年，《细菌学杂志》（J. Bacteriol.）169卷，949-954页）与spaP融合，并通过如运动发酵单胞菌adh基因所述的自杀载体导入CH4ts中。四环素抗性、表达PDC的转化体分离后在上述的非允许温度42℃下进行生长试验。表达克隆的PDC活性的LDH⁻变异链球菌在非允许温度下不能生长。这些结果表明变异链球菌中LDH⁻缺陷的致死性不能被PDC的产生消除。而且，这些数据还表明ADH浓度在LDH缺陷型变异链球菌的丙酮酸代谢中并未饱和。

20

实施例7：JH 1000和产生更高水平细菌素活性的JH 1000变异株的分离

变异链球菌株JH 1000的分离已有描述（Hillman等，1984年，《感染与免疫》（Infect. Immun.）44卷，141-144页）。概括地说，JH 1000从在含杆菌肽的轻唾液琼脂上的115种被测物中获得的变异链球菌新分离株中得到鉴定。在延迟拮抗试验中JH 1000抑制所有其它变异链球菌株和多种实验室菌株的生长。有证据表明（Hillman等，1984年，《感染与免疫》（Infect. Immun.）44卷，141-144页）JH 1000产生一种小的（小于1000Da），稳定的抗生素样，细菌素样化合物，该化合物现已鉴定。该化合物被称作变异链球菌细菌素。微生物学和血清学试验证明JH 1000是变异链球菌菌种中的一个代表。细菌素敏感性变异菌株，无论是天然产生的，还是化学诱变的，对细菌素的杀伤性有抗性的菌株

30

还未被鉴定。这个结果表明，与大多数抗生素不同，遭受抗性野生型（致病）菌株超感染的风险极小。

按本领域熟知的方法（Hillman, 1978 年，《感染与免疫》（*Infect. Immun.*）21 卷，206 - 212 页），用甲基磺酰乙酯（EMS）对 JH 1000 菌株进行化学诱变。JH 1005 为 EMS 诱导的 JH 1000 变异株的一个例子。通过将待测菌株在肉汤培养基中生长 8 小时或更长时间，可鉴定出产生高水平细菌素的变异株。离心培养物除去菌体，取 20 μ l 培养上清在微滴定板的孔中系列稀释，将含有靶菌株（通常为鼠链球菌 BHT - 2, Str^R）和 1mg/ml 链霉素的 100 μ l 顶层琼脂加到每个孔中。孵育过夜后，测定阻止指示菌株生长的最低稀释度。

用这种覆盖物方法，JH 1000 的 EMS 诱变（JH 1005）和自发（JH 1140）变异株被发现，它们可产生提高了约 3 倍的细菌素样活性水平。JH1000 以及 JH 1000 变异株，能产生乳酸，因而不适宜于替补疗法以预防和/或治疗龋齿。

实施例 8：人口腔中变异链球菌 JH 1000 变异株的生长

细菌素活性提高的 JH 1000 变异株在啮齿类动物和人口腔中的生长已有描述（Hillman 等，1987 年，《牙科研究杂志》（*J. Dent. Res.*）66 卷，1092 - 1094 页）。概括地说，用含有标准牙齿预防的感染法将 JH 1000 或 JH 1000 变异株用于人志愿者牙齿，随后用含约 10^{11} JH 1000 或 JH 1000 变异株的细菌悬液刷牙或用牙线洗牙。

细菌素活性水平与细菌在口腔中的生长能力紧密相关。用 JH 1005 菌株感染一年以后，口腔中固有的变异链球菌逐渐被 JH 1005 所代替。另外，在三个被试者中，有两个变异链球菌总数明显降低。

实施例 9：用转座子诱变变异链球菌株产生变异链球菌的重组突变株

质粒 pTV1 - OK 是在变异链球菌和大肠杆菌中能条件复制的乳酸乳球菌质粒 pWV01 的 repA(ts)衍生物（Leenhouts 等，1991 年，《质粒》（*Plasmid*），26 卷，55 - 66 页）。它在质粒骨架上带有在大肠杆菌和变异链球菌中均能表达的卡那霉素抗性基因，并含有一为变异链球菌提供红霉素抗性的转座子 Tn917。

将 pTV1 - OK 质粒转入变异链球菌 JH 1005 菌株, 在含卡那霉素的 BHI 琼脂中于 28 °C 筛选转化细菌。用 1mg pTV1 - OK DNA 转化 JH 1005 , 可产生四种卡那霉素抗性转化体, 与早期实验的转化频率一致 (Hillman 等, 1994 年, 《感染与免疫》 (Infect. Immun.) 62 卷, 60 - 64 页)。如 Camilli 等所述 (1990 年, 《细菌学杂志》 (J. Bacteriol.) 172 卷, 3738 - 3744 页) , 通过升温 (45 °C) 产生宿主染色体 DNA 中 Tn917 插入的独立库。概括地说, 在允许温度 (28 °C) 并存在卡那霉素条件下生长的饱和培养物以 1/50 或 1/100 传代培养。温度升至 45 °C 并过夜培养后, 在含选择浓度红霉素的 BHI 琼脂上涂布样品以分离在宿主染色体上插入有 Tn917 的插入体。发现在总共 10^9 个克隆形成单位中有 10^5 保留了对这种抗生素的抗性。百分之九十随机挑选的红霉素抗性克隆通过复制斑显示出对卡那霉素敏感。这个发现说明 90 % 的红霉素抗性克隆是 pTV1 - OK 的丢失与 Tn917 转座入 JH 1005 染色体的共同结果。用 Southern 杂交分析随机选出的红霉素抗性突变株, 结果表明 Tn917 转座是随机的并导致单一染色体插入。Southern 杂交分析也表明 10 % 的红霉素抗性/卡那霉素抗性克隆是在 JH 1005 染色体上带有完整的 pTV1 - OK 质粒的复制子融合的结果。

卡那霉素敏感克隆的独立库用于检测细菌素产生, 对 1 % 甘氨酸的敏感性, 酸敏感性, 以及依赖甘露糖醇厌氧生长的不可能性或在 D - 丙氨酸供应缺乏时生长的不可能性。每类突变体的分离频率范围约 $1 - 2 \times 10^{-3}$ 。

对两种细菌素缺乏突变株的 Southern 杂交分析表明至少存在两个不连锁的与细菌素产生有关的基因和至少三个与酸敏感有关的不连锁的基因座。通过自然转化, 将从 JH 1005 分离得到的 Tn917 诱导的酸敏感等位基因转入 NG8 后, 转座子 (编码红霉素抗性) 与突变体表型以高频率共遗传。这种连锁表明 Tn917 引起的损伤与突变体表型有关。在天然可转化的菌株 NG8 中, 在温度升高后以相似的转座频率和质粒丢失率也可获得 Tn917 突变体库。

应用标记获救技术已在大肠杆菌中克隆了一个与细菌素产生有关的基因。突变体的染色体 DNA 用 EcoRI 完全消化 (EcoRI 不能在 Tn917 内酶切) 并连入 pUC19 多克隆序列的 EcoRI 位点中。将文库转化 MC1061 并筛选氨苄青霉素抗性, 将能生长的克隆影印至含红霉素的培养基中。

两个能生长的克隆含有在点杂交分析中与 Tn917 探针反应的质粒 DNA。近来，应用 Tn917 的红霉素近端和红霉素远端以外的引物对这些质粒进行了测序。

这是一个利用 Tn917 在变异链球菌和口腔链球菌中成功的诱变。以前应用如 pTV1 或 pLTV3 构建物的失败（Youngman, 1987 年, 见 Hardy 编, 《质粒: 一项实用方法》(Plasmids: A practical approach), IRL Press, Oxford 79 - 103 页; Camilli 等, 1990 年, 《细菌学杂志》(J. Bacteriol.) 172 卷, 3738 - 3744 页) 是因为质粒骨架不能在变异链球菌中复制。利用乳球菌复制子 pWV01Ts 的复制功能, 发现 pTV1 - OK 在变异链球菌允许温度下能稳定维持, 从而为非允许温度下 Tn917 转座的发生提供了足够的机会。因此, 上述方法可用于生产营养缺陷型变异链菌株, 以及具有期望表型的其它变异链球菌衍生菌株, 以用于本发明。

15 实施例 10: LDH^- , ADH^+ , 产生细菌素的变异链球菌株的构建

JH 1000 的 *ldh* 基因已被克隆和测序（Hillman 等, 1990 年, 《感染与免疫》(Infect. Immun.) 58 卷, 1290 - 1295 页; Duncan 等, 1991 年, 《感染与免疫》(Infect. Immun.) 59 卷, 3930 - 3934 页)。概括地说, 用 pBR322 作为载体, 将 JH 1000 *ldh* 基因克隆到大肠杆菌 MC 1061 菌株中。一个含 *ldh* 基因的克隆, p10 - 5, 通过与寡核苷酸探针的杂交得到鉴定, 该探针根据从 JH 1000 中纯化的 LDH 蛋白的氨基末端序列推导得出（Hillman 等, 1990 年, 《感染与免疫》(Infect. Immun.) 58 卷, 1290 - 1295 页)。这个结果通过 p10 - 5/MC1061 转化体无菌体粗提液中的 JH 1000 LDH 活性得到证实。克隆的 *ldh* 的核苷酸序列业已确定, 其调控信号及开放阅读框也已推断出。JH 1000 *ldh* 基因的序列可与从 GenBank 中获得, 登录号 M72545 (描述 LDH SM)。克隆的 *ldh* 基因可用限制性内切酶 HpaI 消化 p10 - 5 构建物而灭活。这导致从 *ldh* 开放阅读框中除去了 510 个碱基, 从而永久地灭活了该基因。用琼脂糖凝胶电泳回收消化物中合适大小的 DNA 片段, 用绿豆核酸酶处理以产生平头末端, 与牛小肠磷酸酶反应去磷酸。

用 PCR 扩增运动发酵单胞菌 *adh* 基因完整的开放阅读框 (除了以鸟苷酸残基取代的头三个碱基和在开放阅读框末端加上一个可翻译和转

录的密码子)。凝胶纯化后,这个片段用绿豆核酸酶处理产生平头末端,与多核苷酸激酶反应磷酸化。这个产物与上述的 p10 - 5 产物连接并转化入大肠杆菌 DH5 α , 用氨苄青霉素抗性筛选。纯化克隆的透化细胞随后按上述方法检测 ADH 活性。纯化 ADH 阳性克隆的质粒并用限制性图谱检测以证实其遗传结构。

通过去除 pBR322 骨架上的氨苄青霉素抗性基因,并用来自 pVA981 的四环素抗性基因取代,以进一步修饰一个这样的遗传结构。用这一质粒结构转化 JH 1140, 转化体在含有四环素的培养基中筛选。纯化长出的异源二倍体转化体,在 Todd - Hewitt 肉汤中生长过夜,以合适的稀释度涂布于葡萄糖四氮唑培养基上。在烛罐中孵育 3 天后,长出的红色克隆,表明了 LDH 的缺失(或表明酸产量降低),分离纯化红色克隆,作为假定的 LDH 缺陷突变体。

通过测定 2 天的陈旧肉汤培养物的乳酸和乙醇产量,并通过 Southern 杂交分析以及通过上述的分光光度法测定无菌体抽提物的 LDH 活性来证实该转化体的表型与基因型。这些菌株的乳酸产量应该检测不到,而在含 1 % 或更多葡萄糖的肉汤中,培养基中的乙醇含量应约为 25mM。这些转化体中的 LDH 活性应当检测不到。

通过在有氧和无氧环境下,检测亲本与转化体在不同碳源中的生长情况进一步鉴定转化体菌株的特性。在增代时间和细胞产量方面,转化体应与亲本菌株生长得一样好或者更好。为了精确评估不同生长条件下的发酵终产物,亲本和转化体菌株也在恒化培养条件下生长。在所有培养条件下转化体菌株产生的乳酸应检测不到,仅在需氧培养时,产生大量 3 - 羟基丁酮。

用常规和/或无菌大鼠,在齧齿大鼠模型中检测了转化体的致齧齿能力。转化体应不产生齧齿,而亲本菌株应使齧齿的发病率增高并使齧齿更严重。转化体和亲本菌株的蚀斑产量和细菌素产量也进行了测定。

因为转化体菌株至少在最小程度上满足了上述要求(即乳酸产生缺陷,并不致齧齿),该转化体是适用于预防和治疗齧齿的重组变异链球菌株。

下面的菌株在 1995 年 6 月 7 日或之前,已保藏于美国典型培养物保藏中心, 1301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC)

保藏物	ATCC 登录号
JH 1000	登录号 55677
JH 1140	登录号 55676

- 5 该保藏根据《国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约》的条款和细则进行。这确保活培养物自保藏之日起维持 30 年。根据布达佩斯条约, 该细菌可由 ATCC 取得, 并且申请人保证以下条件一经满足, 即可向公众永久和无限制地提供该培养物的后代, 所述条件为相关的美国专利获得授权或任何相关的美国或外国专利申请向公众公开, 申请人
- 10 并且保证可向美国专利与商标局长根据 35 U. S. C § 122 和局长条令(包括 37 CFR § 1.14, 细节参考 886 OG 638)指定的人提供该培养物的后代。本申请的受让人已同意如果保存的培养物在适宜条件下培养而死亡或丢失或破坏, 接到通知后将尽快用同种培养物的活标本替换该培养物。可获得本保存菌株不能被理解为允许在与任何政府的主管部门依其
- 15 专利法授予的权力相抵触的情况下使用本发明。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请者: University of Florida Research Foundation, Inc.

(ii) 发明题目: 龋齿的补偿疗法

5 (iii) 序列数: 4

(iv) 联系地址:

(A) 联系人: Fish & Richardson P. C.

(B) 街道: 4225 Executive Square, Suite 1400

(C) 城市: La Jolla

10 (D) 州: California

(E) 国家: 美国

(F) 邮编: 92037

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘

15 (B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: Patent In Release #1.0, 版本 #1.30

(vi) 当前申请资料:

(A) 申请号: PCT/US96/09667

20 (B) 申请日: 1996 年 6 月 7 日

(C) 分类:

(viii) 律师/代理人资料:

(A) 姓名: Wetherell, John R.

(B) 注册号: 31, 678

25 (C) 参考/文献号: 07397/002WO1

(ix) 电讯资料:

(A) 电话: (619) 678 - 5070

(B) 电传: (619) 678 - 5099

30 (2) SEQ ID NO: 1 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1747 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

5 (ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 432 .. 1581

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 1:

```

AAAGGCAAAA TCGGTAACCA CATCTCAATT ATTAAACAAT ACTTCATAAT AAAAAGACAA      60
CTTTTTTCATA ATTTGCATAA GTCTTGATGT AAAAAATACA TATTTAGAAA GAACAAGCAG      120
CCTTGCTCAT CACCGCTGTC GCGAGTAGAA AAATCTCGGC TTTCAGAAAA AGAGGCCGCT      180
TCGTTAAACA GACTATAAAT GTGCTGGAAT AAAGCGAACC CCTTGATCTG ATAAAACTGA      240
TAGACATATT GCTTTTGCGC TGCCCGATTG CTGAAAATGC GTAAAAGGTG ATTTTACTCG      300
TTTTCAGGAA AAACTTTGAG AAAACGTCTC GAAAACGGA TTAACGCA AAAACAATAG      360

AAAGCGATTT CGCGAAAATG GTTGTTTTTCG GGTGTTGCT TTAACACTAGT ATGTAGGGTG      420
AGGTTATAGC T ATG GCT TCT TCA ACT TTT TAT ATT CCT TTC GTC AAC GAA      470
          1      5      10
          Met Ala Ser Ser Thr Phe Tyr Ile Pro Phe Val Asn Glu

ATG GGC GAA GGT TCG CTT GAA AAA GCA ATC AAG GAT CTT AAC GGC AGC      518
Met Gly Glu Gly Ser Leu Glu Lys Ala Ile Lys Asp Leu Asn Gly Ser
          15      20      25

GGC TTT AAA AAT GCG CTG ATC GTT TCT GAT GCT TTC ATG AAC AAA TCC      566
Gly Phe Lys Asn Ala Leu Ile Val Ser Asp Ala Phe Met Asn Lys Ser
          30      35      40      45

GGT GTT GTG AAG CAG GTT GCT GAC CTG TTG AAA GCA CAG GGT ATT AAT      614
Gly Val Val Lys Gln Val Ala Asp Leu Leu Lys Ala Gln Gly Ile Asn
          50      55      60

TCT GCT GTT TAT GAT GGC GTT ATG CCG AAC CCG ACT GTT ACC GCA GTT      662
Ser Ala Val Tyr Asp Gly Val Met Pro Asn Pro Thr Val Thr Ala Val
          65      70      75

CTG GAA GGC CTT AAG ATC CTG AAG GAT AAC AAT TCA GAC TTC GTC ATC      710
Leu Glu Gly Leu Lys Ile Leu Lys Asp Asn Asn Ser Asp Phe Val Ile
          80      85      90

TCC CTC GGT GGT GGT TCT CCC CAT GAC TGC GCC AAA GCC ATC GCT CTG      758
Ser Leu Gly Gly Gly Ser Pro His Asp Cys Ala Lys Ala Ile Ala Leu
          95      100      105

GTC GCA ACC AAT GGT GGT GAA GTC AAA GAC TAC GAA GGT ATC GAC AAA      806
Val Ala Thr Asn Gly Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Gly Ile Asp Lys
          110      115      120      125

TCT AAG AAA CCT GCC CTG CCT TTG ATG TCA ATC AAC ACG ACG GCT GGT      854
Ser Lys Lys Pro Ala Leu Pro Leu Met Ser Ile Asn Thr Thr Ala Gly
          130      135      140

```

ACG GCT TCT GGA ATG ACG CGT TTC TGC ATC ATC ACT GAT GAA GTC CGT	902
Thr Ala Ser Gly Met Thr Arg Phe Cys Ile Ile Thr Asp Glu Val Arg	
145 150 155	
CAC GTT AAG ATG GCC ATT GTT GAC CGT CAC GTT ACC CCG ATG GTT TCC	950
His Val Lys Met Ala Ile Val Asp Arg His Val Thr Pro Met Val Ser	
160 165 170	
GTC AAC GAT CCT CTG TTG ATG GTT GGT ATG CCA AAA GGC CTG ACC GCC	998
Val Asn Asp Pro Leu Leu Met Val Gly Met Pro Lys Gly Leu Thr Ala	
175 180 185	
GCC ACC GGT ATG GAT GCT CTG ACC CAC GCA TTT GAA GCT TAT TCT TCA	1046
Ala Thr Gly Met Asp Ala Leu Thr His Ala Phe Glu Ala Tyr Ser Ser	
190 195 200 205	
ACG GCA GCT ACT CCG ATC ACC GAT GCT TGC GCC TTG AAG GCT GCG TCC	1094
Thr Ala Ala Thr Pro Ile Thr Asp Ala Cys Ala Leu Lys Ala Ala Ser	
210 215 220	
ATG ATC GCT AAG AAT CTG AAG ACC GCT TGC GAC AAC GGT AAG GAT ATG	1142
Met Ile Ala Lys Asn Leu Lys Thr Ala Cys Asp Asn Gly Lys Asp Met	
225 230 235	
CCA GCT CGT GAA GCT ATG GCT TAT GCC CAA TTC CTC GCT GGT ATG GCC	1190
Pro Ala Arg Glu Ala Met Ala Tyr Ala Gln Phe Leu Ala Gly Met Ala	
240 245 250	
TTC AAC AAC GCT TCG CTT GGT TAT GTC CAT GCT ATG GCT CAC CAG TTG	1238
Phe Asn Asn Ala Ser Leu Gly Tyr Val His Ala Met Ala His Gln Leu	
255 260 265	
GGC GGC TAC TAC AAC CTG CCG CAT GGT GTC TGC AAC GCT GTT CTG CTT	1286
Gly Gly Tyr Tyr Asn Leu Pro His Gly Val Cys Asn Ala Val Leu Leu	
270 275 280 285	
CCG CAT GTT CTG GCT TAT AAC GCC TCT GTC GTT GCT GGT CGT CTG AAA	1334
Pro His Val Leu Ala Tyr Asn Ala Ser Val Val Ala Gly Arg Leu Lys	
290 295 300	
GAC GTT GGT GTT GCT ATG GGT CTC GAT ATC GCC AAT CTC GGT GAT AAA	1382
Asp Val Gly Val Ala Met Gly Leu Asp Ile Ala Asn Leu Gly Asp Lys	
305 310 315	
GAA GGC GCA GAA GCC ACC ATT CAG GCT GTT CGC GAT CTG GCT GCT TCC	1430
Glu Gly Ala Glu Ala Thr Ile Gln Ala Val Arg Asp Leu Ala Ala Ser	
320 325 330	
ATT GGT ATT CCA GCA AAT CTG ACC GAG CTG GGT GCT AAG AAA GAA GAT	1478
Ile Gly Ile Pro Ala Asn Leu Thr Glu Leu Gly Ala Lys Lys Glu Asp	
335 340 345	
GTG CCG CTT CTT GCT GAC CAC GCT CTG AAA GAT GCT TGT GCT CTG ACC	1526
Val Pro Leu Leu Ala Asp His Ala Leu Lys Asp Ala Cys Ala Leu Thr	
350 355 360 365	
AAC CCG CGT CAG GGT GAT CAG AAA GAA GTT GAA GAA CTC TTC CTG AGC	1574
Asn Pro Arg Gln Gly Asp Gln Lys Glu Val Glu Glu Leu Phe Leu Ser	
370 375 380	

GCT TTC T AATTTCAAAA CAGGAAAACG GTTTTCCGTC CTGTCTTGAT TTTCAAGCAA 1631
Ala Phe

ACAATGCCTC CGAATTTCTAA TCGGAGGCAT TTGTTTTTGT TTATTGCAAA AACAAAAAAT 1691

ATTGTTACAA ATTTTACAG GCTATTAAGC CTACCGTCAT AAATAATTTG CCATTT 1747

5

(2) SEQ ID NO: 2 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 438 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

10

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ala Ser Ser Thr Phe Tyr Ile Pro Phe Val Asn Glu Met Gly Glu
 1           5           10           15
Gly Ser Leu Glu Lys Ala Ile Lys Asp Leu Asn Gly Ser Gly Phe Lys
          20           25           30
Asn Ala Leu Ile Val Ser Asp Ala Phe Met Asn Lys Ser Gly Val Val
          35           40           45
Lys Gln Val Ala Asp Leu Leu Lys Ala Gln Gly Ile Asn Ser Ala Val
          50           55           60
Tyr Asp Gly Val Met Pro Asn Pro Thr Val Thr Ala Val Leu Glu Gly
          65           70           75           80
Leu Lys Ile Leu Lys Asp Asn Asn Ser Asp Phe Val Ile Ser Leu Gly
          85           90           95
Gly Gly Ser Pro His Asp Cys Ala Lys Ala Ile Ala Leu Val Ala Thr
          100          105          110
Asn Gly Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Gly Ile Asp Lys Ser Lys Lys
          115          120          125
Pro Ala Leu Pro Leu Met Ser Ile Asn Thr Thr Ala Gly Thr Ala Ser
          130          135          140
Gly Met Thr Arg Phe Cys Ile Ile Thr Asp Glu Val Arg His Val Lys
          145          150          155          160
Met Ala Ile Val Asp Arg His Val Thr Pro Met Val Ser Val Asn Asp
          165          170          175
Pro Leu Leu Met Val Gly Met Pro Lys Gly Leu Thr Ala Ala Thr Gly
          180          185          190
Met Asp Ala Leu Thr His Ala Phe Glu Ala Tyr Ser Ser Thr Ala Ala
          195          200          205
Thr Pro Ile Thr Asp Ala Cys Ala Leu Lys Ala Ala Ser Met Ile Ala
          210          215          220

```

Lys Asn Leu Lys Thr Ala Cys Asp Asn Gly Lys Asp Met Pro Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu Ala Met Ala Tyr Ala Gln Phe Leu Ala Gly Met Ala Phe Asn Asn
 245 250 255
 Ala Ser Leu Gly Tyr Val His Ala Met Ala His Gln Leu Gly Gly Tyr
 260 265 270
 5 Tyr Asn Leu Pro His Gly Val Cys Asn Ala Val Leu Leu Pro His Val
 275 280 285
 Leu Ala Tyr Asn Ala Ser Val Val Ala Gly Arg Leu Lys Asp Val Gly
 290 295 300
 Val Ala Met Gly Leu Asp Ile Ala Asn Leu Gly Asp Lys Glu Gly Ala
 305 310 315 320
 10 Glu Ala Thr Ile Gln Ala Val Arg Asp Leu Ala Ala Ser Ile Gly Ile
 325 330 335
 Pro Ala Asn Leu Thr Glu Leu Gly Ala Lys Lys Glu Asp Val Pro Leu
 340 345 350
 Leu Ala Asp His Ala Leu Lys Asp Ala Cys Ala Leu Thr Asn Pro Arg
 355 360 365
 Gln Gly Asp Gln Lys Glu Val Glu Glu Leu Phe Leu Ser Ala Phe
 370 375 380

15 (2) SEQ ID NO: 3 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

20 (D) 拓扑学: 线性

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 3:

CTTCTTCAAC TTTTATATT CCTTTCG

27

(2) SEQ ID NO: 4 资料:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 15 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

30 (xi) 序列表述: SEQ ID NO: 4:

CGGAGGCATT GTTTG

15

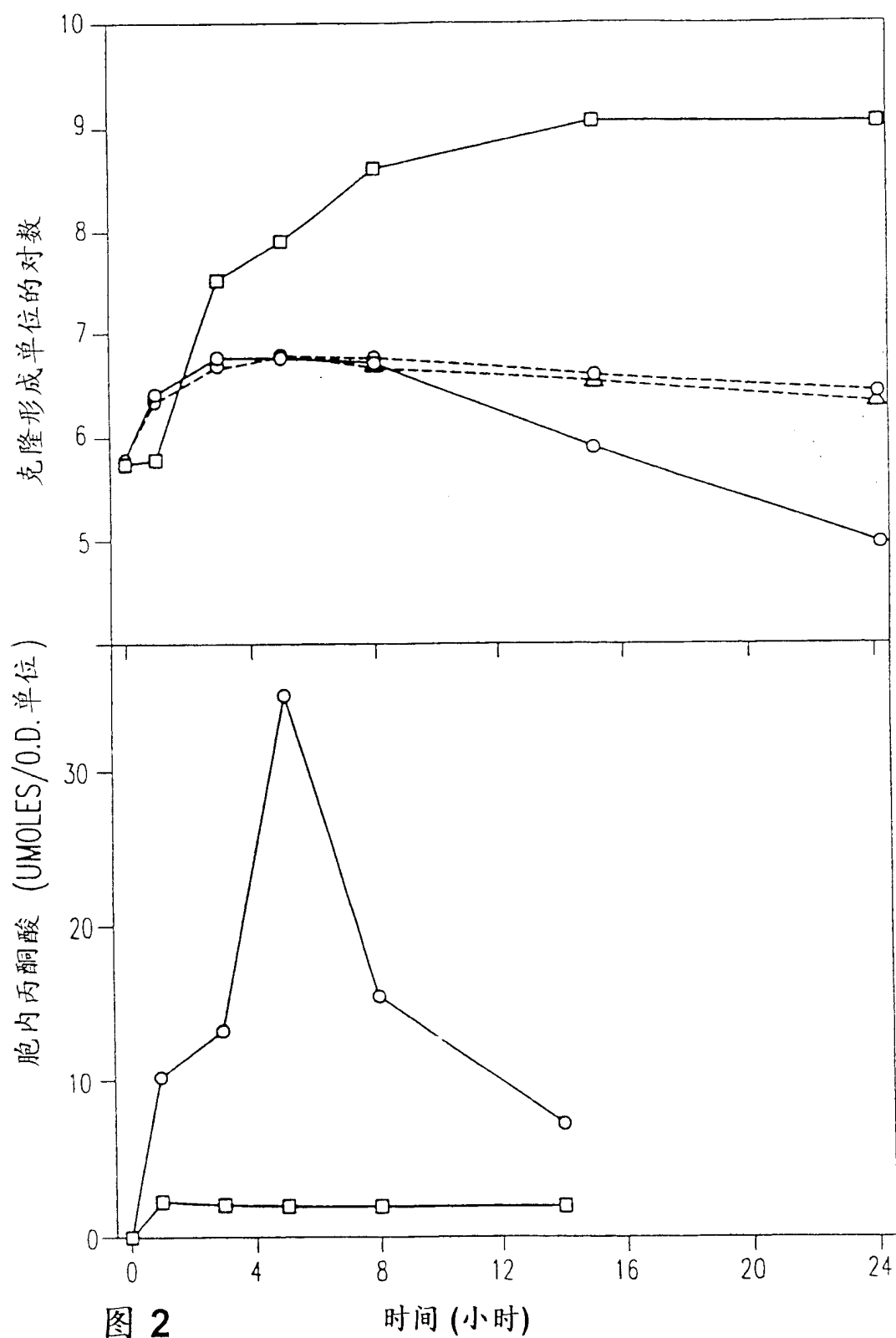
本发明前面的描述是为了举例说明和解释。它应被理解为在不背离本发明的精神与范围的条件下可进行许多修改。因此，下面的权利要求应被视为包括所有这样的修改。

MASSTFYIPFVNEMGECSLEKAIKDLNGSGFKNALIVSDAFMNK
 SCVVKQVADLLKAQGINSAVYDGVMPNPTVTAVLEGLKILKDNNSDFVISLGGGSPHD
 CAKAIALVATNGGEVKDYEGIDKSKKPALPLMSINTTACTASEMTRFCIITDEVHRVK
 MAIVDRHVTPMVSVNÖPLLMVGMPKGLTAATGMDALHAFEAYSSTAATPITDACALK
 AASMIKLNKLTACONGKDMPPAREAMAYAQFLAGMAFNNASLGYVHAMAHQLGGYNNLP
 HGVCNAVLLPHVLAYNASWAGRLKDVGVAMGLDIANLGDKEGAEATIQAVRDLAASI
 GIPANLTELGAKKEDVPLLADHALKDACALTNPRQGDQKEVEELFLSAF (SEQ ID NO:1)

图 1 a

1	aaaggcaaaa	tcggtaocca	catctcaatt	atlaaaccaat	acttcataat	aaaaagacac
61	ctttttcata	atttgcataa	glcttgatgt	aaaaaolaco	tolttagaaa	gaacaogcag
121	ccttgctcat	caccgctgtc	gcgagtagaa	aatctcggc	tttcagaaaa	agaggccgct
181	tcgttaoaca	gactataaat	gtgctggaat	aaagcgaaac	ccttgatctg	ataaaactga
241	tagocatatt	gcttttgcgc	tgcccgattg	ctgaaatgc	glaaaagggtg	attttactcg
301	ttttcaggca	aaactttgag	aaaacgtctc	gaaaacggga	tiaaaacgca	aaaoccatag
361	aaagcgattt	cgcgaaaatg	gttgttttcg	ggttgttgct	ttaaactagt	atgtagggtg
421	aggttatagc	tatggcttct	tcoacttttt	atatctcttt	cglcaacgaa	atgggcgaag
481	gttcgcttga	aaaagcaatc	aaggatctta	acggcagcgg	ctttaaaaat	gcgctgatcg
541	tttctgatgc	tttcatgaac	aaatccgggtg	ttgtgaagca	ggttgcigac	ctgttgaag
601	cacaggggat	taattctgct	gtttatgatg	gcgttatgcc	gaacccgact	gttaccgcag
661	ttctggaagg	ccttaagatc	ctgaaggata	acaattcaga	cttcgtcatc	tccctcgggtg
721	gtggttctcc	ccatgactgc	gccaaagcca	tcgctctggt	cgcacccaat	gggtgtgaag
781	tcaaagacta	cgaaggatc	gacaaatcta	cgaaacctgc	cctgcctttg	atgtcaatcc
841	ocacgacggc	tggtacggct	tctgaataga	cgcgtttctg	catcatcaat	gatgaagtc
901	gtcacgltta	gatggccatt	gttgaccgtc	acgttaccac	gatggtttcc	gtcaacgatc
961	ctctgttgat	gglttggtatg	ccaaaaggcc	tgaccgcccgc	caccggtatg	gatgctctga
1021	cccacgcatt	tgaagcttat	tcitcaacgg	cagctactcc	gatcaccgat	gctltgcctt
1081	tgaaggetgc	gtccatgate	gctaaagalc	tgaaagcccgc	ttgcgacaac	ggtaaggata
1141	tgccagctcg	tgaagctatg	gcttatgcc	aatlctctgc	tggtatggcc	ttcaaccaacg
1201	cttcgcttgg	ttatgtccat	gctatggctc	cccagltggg	cggctactac	aaactgcgcgc
1261	atgggtctctg	caacgctggt	ctgcttccgc	atgttctggc	ttataacgcc	tctgtcgttg
1321	ctggctctct	gaagagcgtt	gggtgtgcta	tggtctctga	tatcgccaat	ctcgggtgata
1381	agaagggcgc	agaagccacc	attcaggetg	ttcgcgatct	ggctgcttcc	atttggtattc
1441	cagcaaatct	gaccgagctg	gggtctaaga	agaagatgt	gccgcttctt	gctgaccacg
1501	ctctgaagaa	tgettgtgct	ctgaccaacc	cgcgtcaggg	tgatcagaaa	gaagttgaag
1561	aaclcttccct	gagcgctttc	taatttcaaa	acaggaaaac	ggttttccgt	cctgtcttga
1621	ttttcaagca	aaatgtcct	ccgatttcta	atcggaggca	tttgtttttg	tttattgcaa
1681	aaacaaaaaa	tattgttaca	aatttttaca	ggctattaag	cttaccgtca	taataaatlt
1741	gccattt	(SEQ ID NO:2)				

图 1 b



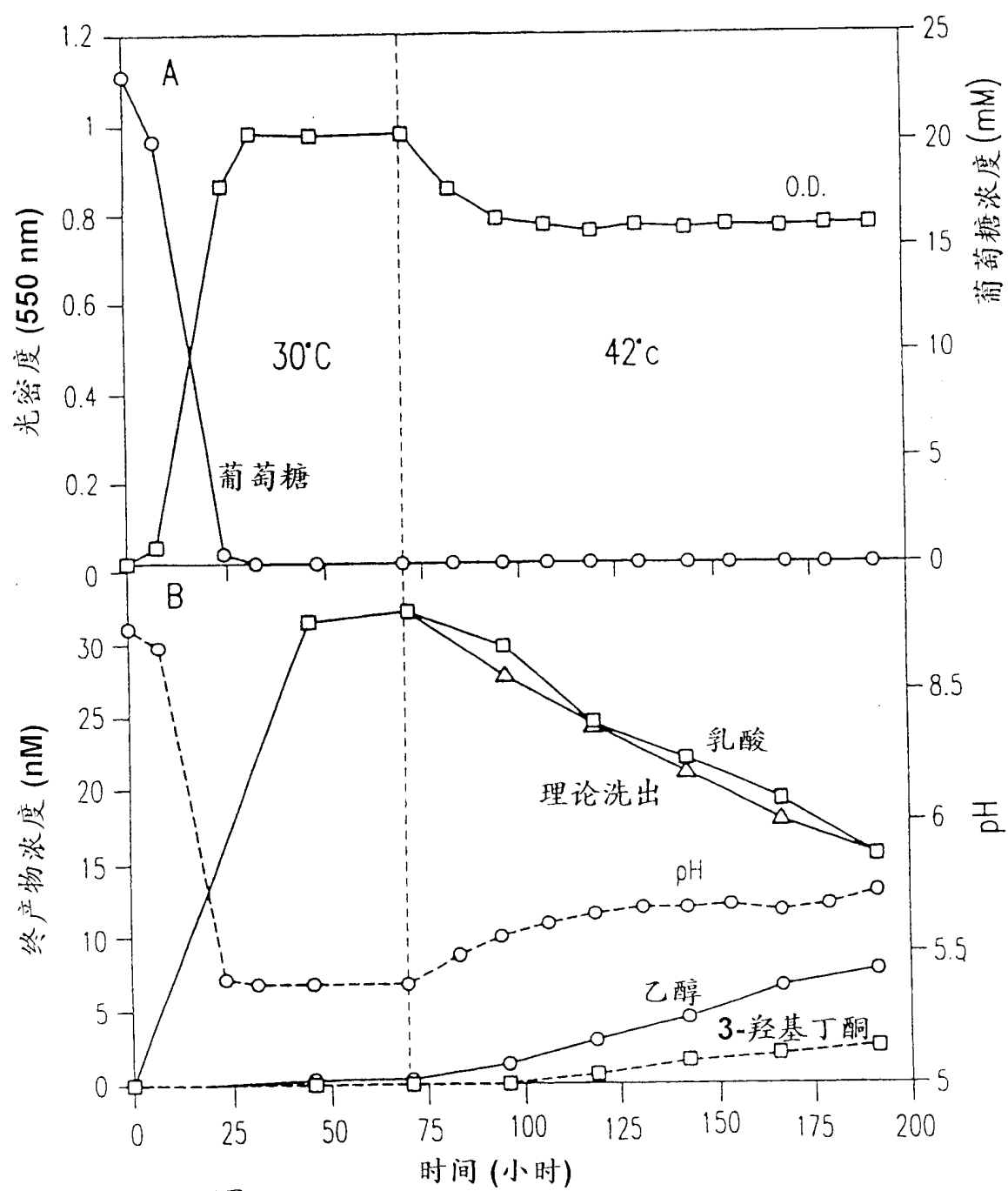


图 3

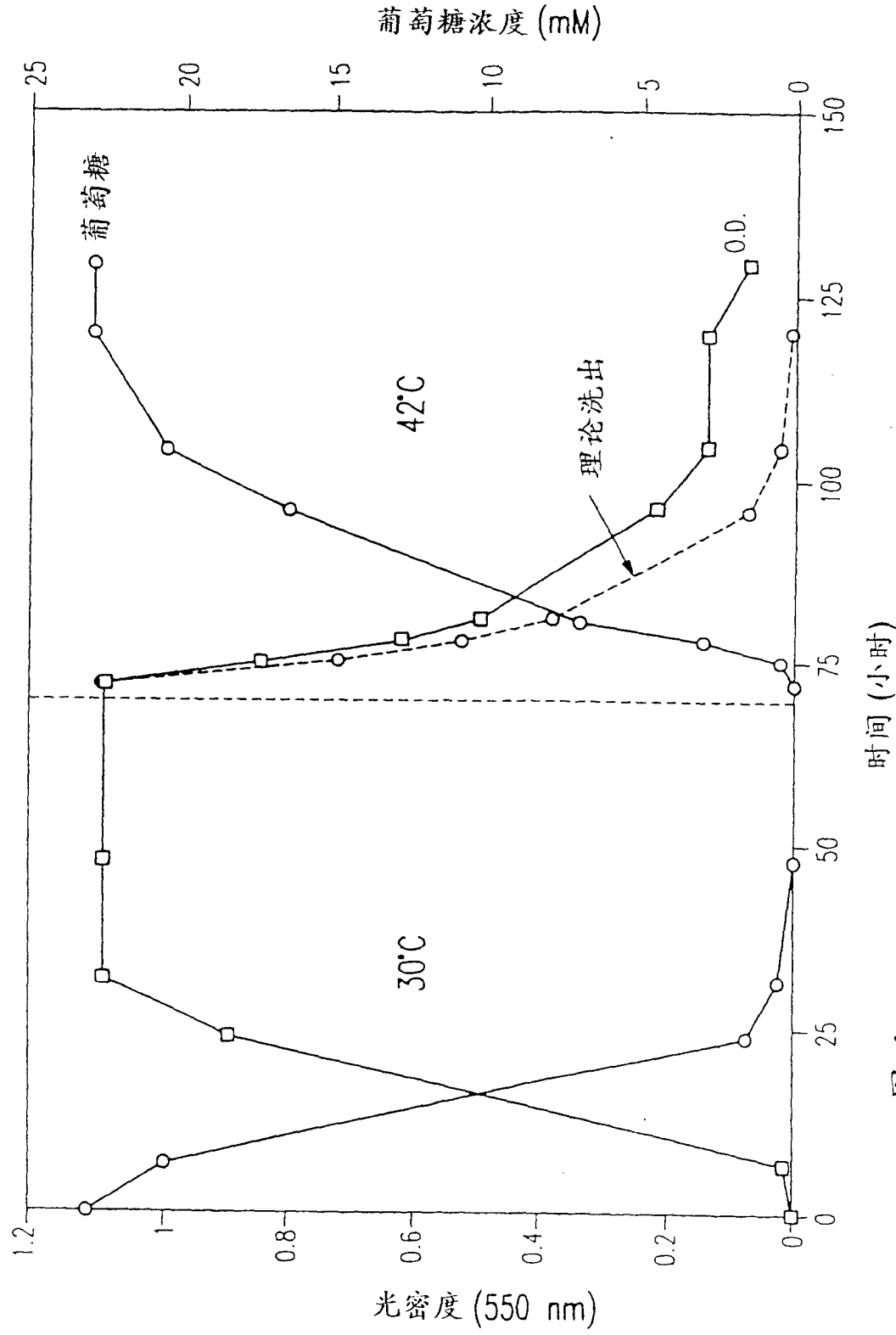


图 4