



(10) 授权公告号 CN 111278456 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 09

(21) 申请号 201880067004.8

(22) 申请日 2018.10.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111278456 A

(43) 申请公布日 2020.06.12

(30) 优先权数据
62/574,068 2017.10.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/078522 2018.10.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/077028 EN 2019.04.25

(83) 生物保藏信息
CNCM I-5247 2017.10.11

(73) 专利权人 里尔巴斯德研究所
地址 法国里尔
专利权人 国家医疗保健研究所

(72) 发明人 阿内-索菲·德布里
多米尼克·拉兹 卡米尔·洛赫特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.
A61K 39/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101400783 A, 2009.04.01
US 5395764 A, 1995.03.07
Nathalie Mielcarek et al.. “Live Attenuated B. pertussis as a Single-Dose Nasal Vaccine against Whooping Cough”. 《PLoS Pathogens》. 2006, 第2卷 (第2期), 第662-670页.

Anne-Sophie Debie et al.. “Construction and evaluation of Bordetella pertussis live attenuated vaccine strain BPZE1 producing Fim3”. 《Vaccine》. 2018, 第36卷第1345-1352页.

审查员 张真真

权利要求书2页 说明书11页
序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

表达血清3型菌毛的鲍特菌属菌株

(57) 摘要

开发了一种产生Fim3的BPZE1衍生物, 所述衍生物具有足够稳定的fim3表达以在小鼠中提供针对仅产生Fim3的临床百日咳鲍特菌分离株的改善的保护。BPZE1f3中的fim3表达不会改变针对Fim2+菌株的保护功效, 也不会改变针对既不产生Fim2也不产生Fim3的菌株的保护功效。

1. 一种疫苗,所述疫苗包含药学上可接受的载体和减毒活鲍特菌属菌株,所述减毒活鲍特菌属菌株通过在fim3基因的启动子区域中的13胞嘧啶区段中添加单个胞嘧啶:鸟嘌呤碱基对来修饰fim3基因的启动子区域来增加BvgA介导的fim3基因转录的激活而被工程化以稳定地产生Fim3,其中所述减毒活鲍特菌属菌株保留了在哺乳动物受试者的肺部定殖以及诱导针对鲍特菌感染的保护性免疫应答的能力。

2. 根据权利要求1所述的疫苗,其中所述减毒活鲍特菌属菌株稳定地产生Fim2。

3. 根据权利要求1所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性百日咳毒素 (PTX)、功能性皮肤坏死毒素 (DNT) 和功能性气管细胞毒素 (TCT)。

4. 根据权利要求1所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

5. 根据权利要求1所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏PTX、功能性DNT和功能性TCT。

6. 根据权利要求2所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

7. 根据权利要求2所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

8. 根据权利要求2所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

9. 根据权利要求1所述的疫苗,其中所述疫苗以单一剂型提供,所述单一剂型包含至少 1×10^6 个菌落形成单位 (CFU) 的所述菌株。

10. 一种鲍特菌属菌株,所述鲍特菌属菌株指定为BPZE1f3,其以注册号CNCM I-5247保藏于法国微生物菌种保藏中心 (CNCM)。

11. 一种减毒活鲍特菌属菌株在制备用于保护哺乳动物受试者免受百日咳的疫苗中的用途,所述减毒活鲍特菌属菌株通过在fim3基因的启动子区域中的13胞嘧啶区段中添加单个胞嘧啶:鸟嘌呤碱基对来修饰fim3基因的启动子区域来增加BvgA介导的fim3基因转录的激活而被工程化以稳定地产生Fim3,其中当所述疫苗被使用时,所述疫苗被施用至所述哺乳动物受试者,其中所述疫苗包含药学上可接受的载体和所述减毒活鲍特菌属菌株,其中所述减毒活鲍特菌属菌株保留了在所述哺乳动物受试者的肺部定殖以及诱导针对鲍特菌感染的保护性免疫应答的能力。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述减毒活鲍特菌属菌株稳定地产生Fim2。

13. 根据权利要求11所述的用途,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

14. 根据权利要求11所述的用途,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

15. 根据权利要求11所述的用途,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

16. 根据权利要求12所述的用途,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

17. 根据权利要求12所述的用途, 其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少两种毒力因子: 功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

18. 根据权利要求12所述的用途, 其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

19. 根据权利要求11所述的用途, 其中所述菌株为BPZE1f3, 其以注册号CNCM I-5247保藏于法国微生物菌种保藏中心(CNCM)。

表达血清3型菌毛的鲍特菌属菌株

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年10月18日提交的美国临时专利申请序列号62/574,068的优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII格式电子递交的序列表,并且将该序列表通过引用以其全文特此并入。创建于2018年10月10日的所述ASCII副本被命名为7056-0091_SL,并且大小是1,833字节。

[0005] 关于联邦资助研究的声明

[0006] 不适用。

技术领域

[0007] 本发明总体上涉及微生物学、免疫学、疫苗学、血清流行病学、生物化学和医学领域。更具体地,本发明涉及经修饰以表达血清3型菌毛的减毒活鲍特菌属(*Bordetella*)菌株及其在疫苗中的用途。

背景技术

[0008] 顿咳或百日咳是一种可能会危害生命(尤其是在幼小婴儿中)的严重呼吸道疾病,并且根据世界卫生组织,尽管全球疫苗接种覆盖率超过85%,但其发病率在一些国家仍在上升。然而,它还会感染青少年和成人,且在青少年和成人中症状通常是非典型的,因此,此病在这些年龄组中经常无法确诊。但即使青少年和成人保持无症状,他们也可以将致病物百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*)传播给未接受初级疫苗接种系列保护的幼小婴儿。实际上,最近在美国和英国对百日咳鲍特菌感染进行的小波分析结合临床分离株的光动力学分析表明,无症状传播是近期百日咳病复发的主要原因。此外,无症状百日咳鲍特菌感染可能并不是无关紧要的,因为流行病学证据表明百日咳鲍特菌感染可能与自身免疫性疾病(例如,乳糜泻、多发性硬化症、以及甚至阿尔茨海默病)有关。

[0009] 当前可获得的全细胞疫苗或无细胞疫苗在三剂初级疫苗接种剂量后对降低顿咳的发病率非常有效。然而,与先感染百日咳鲍特菌相反,它们在减少无症状定殖方面效果不佳,如最近建立的狒狒模型所示。尽管接种疫苗的狒狒在实验性感染百日咳鲍特菌后受到针对百日咳疾病的保护,但它们很容易被感染并将生物体传播给同窝狒狒,即使没有症状也是如此。总而言之,这些观察结果说明了目前可获得的疫苗的缺点,并需要保护针对疾病和感染两者的新疫苗。

[0010] 基于观察到针对百日咳鲍特菌定殖的最佳保护方式是先感染,已开发出一种可以通过鼻途径施用的减毒活疫苗,以尽可能模拟自然感染而不引起疾病。称为BPZE1的疫苗株缺乏编码皮肤坏死毒素的基因,可产生遗传脱毒的百日咳毒素,并且通过用大肠杆菌ampG基因替代百日咳鲍特菌ampG基因而缺乏气管细胞毒素产生。已显示BPZE1在临床前模型中(包括在严重免疫功能低下的小鼠中)是安全的,并且在体外和体内连续传代至少12个月后

是遗传稳定的。在单次鼻施用后,它通过保护性CD4+T细胞和抗体两者保护小鼠免受百日咳鲍特菌激发,并且显示在单次鼻接种疫苗后这种保护是长期的。最近还显示,与未接种疫苗的狒狒相比,它可将狒狒中的百日咳鲍特菌鼻咽感染降低99.992%。现已成功完成了BPZE1的首次应用于人体的I期临床试验,并且发现BPZE1在成人中是安全的,能够瞬时定殖于人的鼻咽并能在所有定殖的个体中诱导针对所有测试抗原的免疫应答。

[0011] 百日咳鲍特菌产生两种血清学不同的菌毛,由Fim2或Fim3作为主要菌毛亚基组成。这些菌毛参与细菌到呼吸道上皮细胞的附着。尽管BPZE1仅产生Fim2,它还产生数百种其他抗原(例如,百日咳毒素、FHA和百日咳杆菌粘附素)。因此,它已显示诱导针对多种多样的百日咳鲍特菌临床分离株(包括仅产生Fim3的那些)的显著保护。

发明内容

[0012] 本文描述的是BPZE1f3(于2017年10月11日以注册号CNCM I-5247保藏在法国微生物菌种保藏中心(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes,CNCM)(法国F-75724巴黎15区(Cedex)博士大街(rue du Docteur Roux)25号巴斯德研究所(Institut Pasteur)))的开发,衍生自产生血清2型菌毛(Fim2)和血清3型菌毛(Fim3)两者的BPZE1的百日咳鲍特菌属菌株。鉴于BPZE1产生数百种不同的可以被免疫应答所靶向的无菌毛抗原,预期添加单一新抗原不会对细菌的保护作用产生太多影响。出人意料地发现,用BPZE1f3疫苗接种显著改善了针对产生Fim3而不产生Fim2的某些临床分离株的保护作用。

[0013] 在下文实例部分所述的研究中,鼻内小鼠激发模型用于检查产生Fim2的BPZE1和产生Fim2和Fim3的BPZE1f3的保护潜能,以针对不同血清型的临床分离株进行保护。两种疫苗株似乎都诱导针对所有检查的临床分离株的显著保护。然而,针对仅产生Fim3的临床分离株,BPZE1f3提供比BPZE1显著更好的保护,从而在一定程度上证实了血清特异性保护。

[0014] 已经鉴定多种Fim2和Fim3亚型。这些亚型包括两种Fim2亚型(即Fim2-1、Fim2-2),它们彼此之间仅有单个氨基酸差异。Fim2-1在位置174处携带精氨酸,而Fim2-2在所述位置携带赖氨酸。Fim3亚型由6个不同的等位基因编码。Fim3-2与Fim3-1的区别在于位置87处的单个氨基酸取代:在Fim3-1和Fim3-2中分别为丙氨酸和谷氨酸。除在位置87处的谷氨酸取代之外,Fim3-3还携带Fim3-1中的苏氨酸到Fim3-3中的丙氨酸的改变。fim3-4等位基因与fim3-1的区别仅在于单个沉默的核苷酸多态性,而其他五个等位基因的区别在于三个密码子不同,每个密码子导致主要菌毛亚基中的一个氨基酸改变。考虑到各种亚型之间的微小序列差异,BPZE1f3可能针对所有亚型都起保护作用。

[0015] 为诱导对菌毛抗原的免疫应答,这些抗原的产生必须在活的百日咳鲍特菌疫苗株中足够稳定。Fim2和Fim3产生的稳定性值得特别关注,因为已描述了从一种血清型到另一种血清型的相变(尤其在感染期间),并且所述相变可以由疫苗压力驱动。从高菌毛产生到低菌毛产生的这种相变取决于fim启动子区域内C链(string)中存在的胞嘧啶的数量。此C链中的胞嘧啶数量可能影响fim启动子的-10区与BvgA结合位点之间的距离,BvgA是表达fim和其他百日咳鲍特菌毒力基因所需的转录激活因子。长期以来已知具有重复碱基对序列的DNA区域(主要在C链中)特别易于添加或缺失单个碱基。由于BPZE1f3是通过在启动子区域的13C区段中添加单个C:G碱基对而构建以允许fim3表达,因此认为fim3表达不稳定。但是,出乎意料的是,在BPZE1f3通过小鼠传代数次后,第一次传代后回收的细菌100%仍然

是Fim3+以及Fim2+。在随后的传代(至多3次)期间,接近90%的细菌仍表达fim3和fim2两者,这表明fim表达足够稳定以诱导血清型特异性免疫,如通过BPZE1f3针对仅产生Fim3的临床分离株的保护作用所证实的。

[0016] 因此,本文描述的是经工程化以稳定地产生Fim3的减毒活鲍特菌属菌株,其中所述减毒活鲍特菌属菌株保留了在哺乳动物受试者的肺部定殖以及诱导针对鲍特菌感染的保护性免疫应答的能力(例如,所述鲍特菌属菌株指定为BPZE1f3)。所述减毒活鲍特菌属菌株可以是还稳定地产生Fim2的菌株。还可以确定本文所述的减毒活鲍特菌属菌株缺乏以下毒力因子中的至少一种(1、2或3种):功能性百日咳毒素(PTX)、功能性皮肤坏死毒素(DNT)和功能性气管细胞毒素(TCT)。

[0017] 本文还描述了如下疫苗,所述疫苗包括本文提及的经工程化以稳定地产生Fim3的减毒活鲍特菌属菌株和药学上可接受的载体。疫苗能以单一剂型提供,所述单一剂型包含至少 1×10^6 (例如,至少 1×10^6 、 5×10^6 、或 1×10^7)个菌落形成单位(CFU)的菌株。

[0018] 本文进一步描述了保护哺乳动物受试者(例如人)免受百日咳的方法,所述方法包括以下步骤:向所述哺乳动物受试者施用疫苗,所述疫苗包括药学上可接受的载体和经工程化以稳定地产生Fim3的减毒活鲍特菌属菌株,其中所述减毒活鲍特菌属菌株保留了在哺乳动物受试者的肺部定殖以及诱导针对鲍特菌感染的保护性免疫应答的能力。

[0019] 如本文所用,“稳定地产生”抗原的细菌菌株是可以通过宿主动物传代至少一次(例如1、2、3、4、5或更多次)而未损失超过50%(或超过60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、或99%)的所述抗原的表达的细菌菌株。例如,经工程化以稳定地产生Fim3的分离的鲍特菌属菌株是经遗传修饰以表达Fim3并经小鼠传代后(例如通过下文实例部分中所述的方法)保留至少50%(例如,50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、或99%)的Fim-3的表达的菌株。

[0020] 提及“功能性”毒力因子意指细菌菌株具有所述毒力因子(与所述毒力因子的野生型形式相比)的至少50%的酶促活性。“已确定缺乏至少一种毒力因子”的细菌菌株是如下菌株,所述菌株经工程化以表达与衍生其的亲本菌株相比少于70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%的所述毒力因子的酶促活性或功能活性。

[0021] 除非另有定义,本文所用的所有技术术语均与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的具有相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,但下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用以其全文并入。在发生冲突的情况下,以包括定义的本说明书为准。另外,下文所讨论的具体实施例只为说明而非意在限制。

附图说明

[0022] 图1A是示出BPZE1(以菱形表示)和BPZE1f3(以正方形表示)产生Fim2的图。

[0023] 图1B是示出BPZE1(以菱形表示)和BPZE1f3(以正方形表示)产生Fim3的图。

[0024] 图2A是示出在改良的斯坦纳-斯科尔特(Stainer-Scholte)培养基中BPZE1(以菱形表示)和BPZE1f3(以正方形表示)的体外生长的图。

[0025] 图2B是示出在完全合成的蒂斯(Thijs)培养基中BPZE1(以菱形表示)和BPZE1f3(以正方形表示)的体外生长的图。

[0026] 图3是示出鼻接种 10^6 个CFU的BPZE1(以黑色表示)或BPZE1f3(以灰色表示)的小鼠的肺定殖的图,其中在指定时间点测量肺中的细菌载量。

[0027] 图4是一系列图(4A-4E),其示出了BPZE1诱导的和BPZE1f3诱导的针对临床百日咳鲍特菌分离株的保护,其中小鼠经鼻接受 10^5 个CFU的BPZE1(黑色条柱)或BPZE1f3(灰色条柱)、或者不进行处理(白色条柱)。疫苗接种四周后,用 10^6 个CFU的1617pF1(A)、403pF1(B)、P134(C)、1412pF1(D)或403pF3(E)激发小鼠。激发后3小时(小图的左侧部分,D0)或第7天(小图的右侧部分,D7),测量肺中的细菌载量,并呈现为CFU的平均值和标准差。每组使用三只(对于D0)或五只(对于D7)小鼠。***, $p < 0.001$ 。

[0028] 图5是比较BPZE1诱导的和BPZE1f3诱导的针对副百日咳鲍特菌(*B. paraptussis*)的保护的图,其中小鼠经鼻接受 10^6 个CFU的BPZE1(黑色条柱)或BPZE1f3(灰色条柱)、或者不进行处理(白色条柱)。疫苗接种两个月后,用 10^6 个CFU的副百日咳鲍特菌激发小鼠。激发后3小时(小图的左侧部分,D0)或第7天(小图的右侧部分,D7),测量肺中的细菌载量,并呈现为CFU的平均值和标准差。每组使用三只(对于D0)或五只(对于D7)小鼠。***, $p < 0.001$ 。

[0029] 图6是示出由BPZE1f3产生Fim2和Fim3的稳定性的图,其中BPZE1f3在小鼠中传代三次,并且每次传代(P1至P3),使用抗Fim2和抗Fim3单克隆抗体通过全细胞ELISA分析94个菌落中是否存在Fim2(白色条柱)和Fim3(黑色条柱)。

具体实施方式

[0030] 本文描述的是产生Fim3的BPZE1衍生物,所述衍生物具有足够稳定的fim3表达以在小鼠中提供针对仅产生Fim3的临床百日咳鲍特菌分离株的改善的保护。BPZE1f3中的fim3表达不会改变针对Fim2+菌株的保护功效,也不会改变针对既不产生Fim2也不产生Fim3的菌株的保护功效。下文描述的实施例示出了这些方法的代表性实例。尽管如此,从这些实施例的描述来看,基于下文提供的描述可以完成和/或实践本发明的其他方面。

[0031] 一般方法

[0032] 本文描述了涉及常规微生物学、免疫学、分子生物学和医学技术的方法。微生物学方法描述于Methods for General and Molecular Microbiology[普通和分子微生物学方法](第3版),Reddy等人编辑,ASM Press[ASM出版社]。免疫学方法在本领域中通常是已知的,并且描述于方法论专著中,如Current Protocols in Immunology[免疫学实验指南],Coligan等人编辑,John Wiley&Sons[约翰威利父子公司],纽约。分子生物学的技术详细描述于以下专著中,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第2版,第1-3卷,Sambrook等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],Cold Spring Harbor[冷泉港],纽约,2001;和Current Protocols in Molecular Biology[当代分子生物学实验手册],Ausubel等人编辑,Greenlee Publishing and Wiley-Interscience[格林出版与威利交叉科学],纽约。医疗治疗的一般方法描述于:McPhee和Papadakis,Current Medical Diagnosis and Treatment[当代医学诊断与治疗]2010,第49版,McGraw-Hill Medical[麦格劳-希尔医学],2010;和Fauci等人,Harrison's Principles of Internal Medicine[哈里森内科学原理],第17版,McGraw-Hill Professional[麦格劳-希尔专业出版],2008。

[0033] 产生Fim3的鲍特菌属菌株

[0034] 缺乏Fim3表达的鲍特菌属物种(例如百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌、和支气管炎鲍特菌(*Bordetella bronchiseptica*))可以经工程化以产生Fim3(例如,Fim3-1、Fim3-2、Fim3-3、或Fim3-4),并以其他方式如下文所述减毒。这些产生Fim3的细菌可用于治疗和/或预防由鲍特菌属物种引起的有症状或无症状的呼吸道感染以及其他显示BPZE1有效的病症(例如,过敏症和哮喘)。经工程化以产生Fim3的鲍特菌属菌株也可用于预防鲍特菌感染的传播。减毒的、产生Fim2/Fim3的百日咳鲍特菌优选用于人受试者。用于在制备产生Fim3的细菌中使用的鲍特菌属菌株可从自然来源(例如,定殖的受试者)分离或从多种培养物保藏中获得。可以通过下文所述方法制备经工程化以产生Fim3的鲍特菌属菌株。

[0035] 因为鲍特菌属致病菌株的减毒不足可能在受试者体内引起病理性感染,所以优选的是,经工程化以产生Fim3的鲍特菌属菌株具有较低水平的其他毒力因子。另一方面,为了确保产生Fim3的鲍特菌属菌株能够定殖于受试者并对呼吸道炎症发挥保护作用,它不能被过度减毒。可以通过使菌株突变以减少其产生以下一种或多种(例如1、2、3、4、5或更多种)来实现减毒:百日咳毒素(PTX)、皮肤坏死毒素(DNT)、气管细胞毒素(TCT)、腺苷酸环化酶(AC)、脂多糖(LPS)、丝状血凝素(FHA)、百日咳杆菌粘附素或任何bvg调节组分。制备此类突变体的方法描述于本文以及美国专利号9,119,804和美国专利申请序列号15/472,436中。在下文呈现的实验中,鲍特菌属菌株经工程化以产生缺乏DNT和TCT且产生无遗传活性的PTX的Fim3。它能够在受试者的呼吸道中定殖并诱导受试者中的保护性免疫应答。

[0036] 配制品/剂量/施用

[0037] 可将经工程化以产生Fim 3的鲍特菌属菌株配制成为用于向受试者施用的疫苗。将合适数目的活细菌与药学上合适的赋形剂或载体(如磷酸盐缓冲盐水溶液、蒸馏水、乳液(如油/水乳液)、各种类型的润湿剂、无菌溶液等)混合。在一些情况下,疫苗可以被冻干,并且然后在施用前重构。使用与粘膜(特别是鼻、支气管或肺)施用相容的药学上合适的赋形剂或载体对于定殖于呼吸道的目的是优选的。参见作为本领域的标准文本的Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]以及USP/NF。

[0038] 当配制用于粘膜施用时,每个剂量的疫苗可以包括足够数目的鲍特菌属活细菌以导致在呼吸道的定殖,例如大约(即, $\pm 50\%$) 5×10^3 至 5×10^9 个细菌,这取决于接受它的哺乳动物的体重和年龄。对于向人受试者的施用,剂量可包括大约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、或 1×10^{10} 个产生Fim3的鲍特菌属活细菌。所述剂量可以一次或多次(2、3、4、5、6、7、8次或更多次)施用,间隔为1、2、3、4、5或6天,或1、2、3、4、5或6周,或1、2、3、4、5、6或12个月。通常,施用足量的疫苗以导致定殖以及保护性应答。在诱导的保护性应答减弱后再施用另外的量。

[0039] 引发免疫应答以保护免受百日咳的方法

[0040] 通过将疫苗内的细菌沉积在呼吸道中的任何合适的方法,可以将本文所述的疫苗施用于哺乳动物受试者(例如,人、人类儿童或新生儿、人类成人、处于发展百日咳并发症的高风险的人、患有肺病的人、和处于免疫抑制或将变得处于免疫抑制的人)。例如,可以通过吸入或鼻内引入(例如使用吸入器、注射器、吹入器、喷雾装置等)施用疫苗。在施用单剂量为 1×10^4 至 1×10^7 (例如, 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、或 $1 \times 10^7 \pm 10\%$ 、 20% 、 30% 、 40% 、 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、或 90%)的活细菌通常足以诱导针对发展鲍特菌

感染(例如百日咳)的保护性免疫,可以间隔4天或更多天(例如,4、5、6或7天;或1、2、3、4、5、6、7或8周)施用一个或多个(1、2、3、4或更多个)另外的剂量,直到产生足够的保护性免疫应答为止。可以通过本领域已知的方法(如定量鲍特菌特异性抗体的效价和测量鲍特菌抗原特异性T细胞的应答(例如,使用ELISPOT测定法))来评估保护性免疫应答的发展。在疫苗诱导的保护性免疫应答减弱的情况下(例如,自最后一次接种疫苗后1、2、3、4、5、10年或更多年后),可以再次向施用受试者疫苗以增强抗鲍特菌免疫应答。

[0041] 实例

[0042] 材料与方法

[0043] 培养条件

[0044] 所有百日咳鲍特菌属菌株在搅拌下在如所述的改良的斯坦纳-斯科尔特(Stainer Scholte,SS)培养基(Imaizumi等人,Infect Immun[感染与免疫]1983;41:1138-43)中或在完全合成的蒂斯(Thijs)培养基(Thalen等人,J Biotechnol[生物技术杂志]1999;75:147-59)中,在含有10%(v/v)羊血的鲍金(Bordet Gengou,BG)琼脂上生长。培养基中补充有适当的抗生素(对于携带pFUS2 BctA1的菌株,100ug/ml的链霉素,或10ug/ml的庆大霉素)。

[0045] 细菌菌株

[0046] 先前已描述了百日咳鲍特菌BPSM和BPZE1,以及本研究中使用的副百日咳鲍特菌(Mielcarek等人,PLoS Pathog[科学公共图书馆病原学]2006;2:e65;Menozzi等人,Infect Immun[感染与免疫]1994;62:769-78)。百日咳鲍特菌菌株B0403、B1412、B1617和B0005(菌株134Pillmer)来自RIVM保藏公司(RIVM collection)(比尔特霍芬,荷兰)。出于反选择的目的,将一些临床分离株用pFUS2 BctA1自杀质粒进行电穿孔,以获得对庆大霉素的抗性,如Antoine等人所述(J Meth Mol Biol[分子生物学杂志]2005;351:799-809)。如下文所述,通过PCR验证pFUS2BctA1运载体插入到染色体DNA的位点,并通过ELISA检查暴露在表面的Fim2和/或Fim3的水平,从而检查电穿孔后庆大霉素抗性衍生物。通过选择百日咳鲍特菌B0005的链霉素衍生物获得菌株P134S。除通过rps1基因中的突变介导的链霉素抗性外,菌株P134S还携带fimC基因的突变,从而导致菌毛产生的减少。大肠杆菌SM10(Simon等人,Bio/Technology[生物技术]1983;1:784-91)用于将多种质粒构建体缀合到百日咳鲍特菌中。

[0047] Fim3阳性BPZE1衍生物BPZE1f3的构建

[0048] 为构建BPZE1f3,将位于BPZE1的fim3基因的启动子区域(即fim3 ATG密码子的75bp上游)的13C区段替换为14C区段,以触发fim3的转录。首先在亲本菌株中将含有启动子区域的整个fim3基因座删除,然后用带有14C区段的fim3基因座替换。通过使用以下寡核苷酸(SPfim3UP2:GAGCTCTTTACCGCGGCCGAGTTGTTTCATCAATG和ASPfim3LO2:GGATCCATCATCGAGACCGACTGG)将包含所述基因座的2265-bp PCR片段进行扩增,并将其克隆到pBluescript II SK+质粒(Addgene公司)的SacI和BamHI限制性位点中。通过SphI限制性从得到的质粒中除去含有整个基因座的904-bp片段以获得pSKfim3UPL0。将pSKfim3UPL0的1351-bp SacI-BamHI片段插入pJQ200mp18rpsL的SacI和BamHI位点中(Antoine, J.Mol.Biol.[分子生物学杂志](2005)351,799-809)。然后如先前所述(Mielcarek等人,PLoS Pathog[科学公共图书馆病原学]2006;2:e65),使用缀合将重组质粒用于BPZE1中的双重同源重组。使用寡核苷酸SPfim3UP2和ASPfim3LO2,通过PCR检查转移接合子中整个

fim3基因座的缺失。如下,将启动子中含有14C区段的整个fim3基因座进行重新引入。通过GeneArt®基因合成(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher SCIENTIFIC))合成了包含整个基因座的911-bp合成基因,所述基因座含有14C区段。使用位于合成片段末端的SphI位点以将其插入pSKfim3UPL0的SphI位点,从而产生pSKfim3+。通过限制性来检查插入的正确方向。此质粒的2256-bp SacI-BamHI片段被转移到pJQ200mp18rpsL的相同限制性位点中,导致pJQfim3+。此质粒用于进行双重同源重组以获得BPZE1f3。使用寡核苷酸SPfim3UP2和ASPfim3LO2通过PCR验证了重组菌株。

[0049] Fim2和Fim3产生的分析

[0050] 首先通过在56°C加热30分钟将百日咳鲍特菌菌株灭活。然后将热灭活的菌株在96孔板(Nunc Maxi Sorp公司)中以0.075的600nm的光密度(OD)包覆,并在37°C下孵育过夜,直到孔干燥。然后用100μl含1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS Tween 0.1%(PBST)将孔封闭。将Fim2和Fim3单克隆抗体(NIBSC公司,分别为04/154和04/156)添加至PBST(v/v)中从1/50至1/36450的系列稀释液中。在洗涤三次后,将板与PBST中的100μl辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(南方生物技术公司(Southern Biotech))一起孵育。在洗涤五次后,将板用100μl的HRP底物TMB溶液(因特奇公司(Interchim))在室温下孵育30min。通过添加50μl的1M H₃PO₄停止反应。用Biokinetic读取器EL/340微板在450nm下测量OD。

[0051] DNA测序

[0052] 根据制造商的说明书,使用Phusion高保真DNA聚合酶(赛默飞世尔科技公司(Thermofisher))或KAPA HiFi DNA聚合酶(卡帕生物系统公司(Kapa Biosystems))进行染色体DNA的PCR扩增。将PCR片段用QiaQuick PCR纯化试剂盒(凯杰公司(Qiagen))进行纯化,并用用于扩增的引物进行测序。先前已描述了用于ptxP的PCR扩增的引物ptxP Up和ptxP Low(Mooi等人,Emerg Infect Dis[新兴传染病]2009;15:1206-13)。先前已描述了用于局部prn的PCR扩增的引物prn AF和prn AR(Mooi等人,Emerg Infect Dis[感染与免疫]1998;66:670-5)。引物fim2 Up 5'-AGCTAGGGGTAGACCACGGA-3'和fim2 Low5'-ATAACTCTTCTGGCGCCAAG-3'用于fim2的扩增和测序。引物fim3 Up5'-CATGACGGCACCCCTCAGTA-3'和fim3 Low5'-TTCACGTACGAGCGAGATA-3'用于fim3的扩增和测序。

[0053] 小鼠感染实验

[0054] BALB/c小鼠从查尔斯河(Charles River,法国拉尔布雷勒(1'Abresle,France))获得并且在无特定病原体条件下维持在巴斯德研究所里耳分院(Institut Pasteur de Lille)的动物设施中。通过腹膜内注射麻醉混合物(氯胺酮+阿托品+安定)对六周龄的BALB/c小鼠进行轻度镇静,然后如先前所述,鼻腔内(i.n.)施用20μl含有10⁶个菌落形成单位(CFU)的百日咳鲍特菌BPZE1或BPZE1f3的PBS(Mielcarek等人,PLoS Pathog[科学公共图书馆病原学]2006;2:e65)。将每组三只小鼠在鼻内施用后的选定时间点处死并且收集其肺,在PBS中均质化并且以连续稀释液铺板到BG-血液琼脂上以在37°C下孵育三到四天计数CFU。

[0055] 小鼠保护实验

[0056] 如上所述,给六周龄的BALB/c小鼠鼻内接种10⁵个CFU的百日咳鲍特菌BPZE1或BPZE1f3。四周后,在20μl的PBS中,用10⁶个CFU百日咳鲍特菌BPSM、指示的临床百日咳鲍特

菌分离株或副百日咳鲍特菌激发裸鼠和接种疫苗的小鼠。在3小时和第7天分别确定每组3只和5只小鼠的肺定殖。

[0057] Fim2和Fim3产生的稳定性

[0058] 在20 μ l的PBS中,将10⁶个CFU的BPZE1f3施用至镇静的小鼠。14天后,收集肺,将其均质化并铺板在BG琼脂上。3-4天后,将94个单独的菌落接种到含有100 μ l PBS/孔的96孔板中。含有BPZE1的对照孔作为阴性对照,并且含有BPZE1f3的对照孔作为阳性对照。通过在630nm处的OD测量来确定每孔中存在的细菌的量。干燥后,如上所述通过全细胞ELISA评估Fim3和Fim2的存在。在用含有1%BSA的100 μ l PBST封闭步骤后,在100 μ l PBST中,将细菌在一小时期间与抗Fim3单克隆抗体04/156或抗Fim2单克隆抗体04/154以1/1350稀释液一起进行孵育。在洗涤并与PBST中的100 μ l辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(南方生物技术公司(Southern Biotech))一起孵育后,用100 μ l HRP底物TMB溶液(因特奇公司(Interchim))揭示液评估Fim3或Fim2的存在。通过添加50 μ l的1M H₃PO₄停止反应。用Biokinetic读取器EL/340微板在450nm下测量OD。

[0059] 结果

[0060] BPZE1f3的构建。

[0061] 为了构建产生Fim3的BPZE1衍生物,首先从BPZE1中删除fim3基因。使用BPZE1染色体DNA作为模板,通过PCR将fim3的上游和下游侧翼区进行扩增,并将其在非复制性运载体pJQ200mp 18rpsL中剪接在一起(Antoine,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志](2005)351,799-809)。然后通过将BPZE1的fim3基因与含有重组质粒的大肠杆菌SM10缀合后进行等位基因交换而将所述基因删除。得到的菌株BPZE1 Δ fim3用于将fim3基因和功能性启动子一起重新整合到原始fim3基因座中。原始启动子的13-C区段被14-C区段取代,从而允许fim3表达,并与fim3可读框一起插入pSKfim3UPL0中。通过与大肠杆菌SM10:pJQFim3+的缀合,将得到的质粒pJQFim3+缀合到BPZE1 Δ fim3中。由此产生BPZE1f3。

[0062] 分别使用Fim2特异性和Fim3特异性单克隆抗体,通过全细胞ELISA分析BPZE1f3中Fim2和Fim3的产生。如图1A所示,BPZE1和BPZE1f3都产生了等量的Fim2。相比之下,Fim3仅由BPZE1f3产生,并且用整个BPZE1提取物上的Fim3特异性抗体仅检测到背景吸光度(图1B)。两种菌株在斯坦纳-斯科尔特(Stainer Scholte)培养基和完全合成的蒂斯(Thijs)培养基中同样生长良好(图2),这表明Fim3的产生并不影响BPZE1f3的生长特征。

[0063] 通过BPZE1f3进行小鼠定殖。

[0064] 为评估由BPZE1f3产生的Fim3在小鼠呼吸道定殖中的潜在作用,用10⁶个CFU的BPZE1或BPZE1f3感染成年小鼠,并且将每组3只小鼠在感染后第3、7、14、21和28天处死以定量其肺中的细菌载量。如图3所示,在所分析的全部时间点上,两个菌株的小鼠肺定殖的能力是相同的,这表明Fim3的产生既没有增强也没有阻碍BPZE1在鼠呼吸道中定殖的能力。

[0065] BPZE1介导的和BPZE1f3介导的针对百日咳鲍特菌临床分离株的保护。

[0066] 为检验BPZE1和BPZE1f3针对临床分离株的相对保护作用,所述分离株相对于在产生Fim2和Fim3方面有所不同,我们使用了次优的免疫方案,其中用10⁵个CFU疫苗株对小鼠进行鼻内免疫,并在一个月后用10⁶个CFU激发菌株感染。使用此方案,是因为它最适合于检测疫苗批次之间的潜在差异,原因是标准疫苗接种方案(在使用10⁶个CFU疫苗株两个月后,通过用10⁶个CFU激发菌株感染)通常会在激发后第7天完全清除。

[0067] 针对来自RIVM公司(比尔特霍芬,荷兰)的百日咳鲍特菌培养物保藏中的四种不同的临床分离株测试了这两种疫苗株的效力。这五种菌株在Fim2和Fim3产生方面具有以下特征:1617F1(Fim2+Fim3-)、403pF1(Fim2+Fim3-)、P134(Fim2-Fim3-)、1412pF1(Fim2-Fim3+)和403pF3(Fim2+Fim3+)。这些菌株的基因组关键特征在下表I中呈现。接种疫苗和激发感染后,在感染后3小时和第7天测量肺中激发菌株的细菌载量。

[0068] 表I.百日咳鲍特菌菌株的关键基因组特征。

	<i>Pptx</i> ¹	<i>fim2</i>	<i>fim3</i>	血清型	<i>Prn</i> ³	<i>ptx-s1</i> ⁴
BPSM	P1	<i>fim2-1</i> ²	<i>fim3-1</i> ²	2+/3-	<i>prn-1</i>	<i>ptxA2</i>
BPZE1	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2+/3-	<i>prn-1</i>	<i>ptxA2</i> (R9K, E129G)
BPZE1f3	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2+/3+	<i>prn-1</i>	<i>ptxA2</i> (R9K, E129G)
[0069] B1412 pF1	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2-/3+	<i>prn-1</i>	<i>ptxA1</i>
B1617 pF1	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2+/3-	<i>prn-1</i>	<i>ptxA1</i>
B0403 pF1	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2+/3-	<i>prn-1</i>	<i>ptxA2</i>
B0403 pF3	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2+/3+	<i>prn-1</i>	<i>ptxA2</i>
P134S	P1	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>	2-/3-	<i>prn-1</i>	<i>ptxA2</i>

[0070] ¹百日咳毒素基因的启动子类型。

[0071] ²菌毛基因的基因型

[0072] ³百日咳杆菌粘附素基因等位基因

[0073] ⁴百日咳毒素亚基S1等位基因

[0074] 与未接种疫苗的小鼠的细菌载量相比,BPZE1和BPZE1f3针对1617pF1、403pF1、P134和403pF3具有同样良好的保护作用,在感染后第7天,在每种情况下将细菌载量降低了4至5个log(图4)。接种疫苗BPZE1的小鼠和接种疫苗BPZE1f3的小鼠之间无统计学上的显著差异。然而,当用1412pF1(仅产生Fim3而不产生Fim2的菌株)激发小鼠时,BPZE1f3似乎比BPZE1的保护显著更好(图4D)。与未接种疫苗的小鼠相比,BPZE1疫苗接种导致细菌载量差异为4个log,而BPZE1f3将这种保护提高至5个log差异。当激发感染后3小时测量CFU时,观察到接种疫苗小鼠和未接种疫苗小鼠之间细菌载量无统计学上显著的降低,这表明,正如预期的,所有小鼠都接受了相同的激发剂量。这些结果表明,针对于仅产生Fim3的菌株,BPZE1f3的效力相对于BPZE1有所改善,而针对产生Fim3和Fim2或产生Fim2且不产生Fim3的菌株、或针对不产生菌毛的菌株的保护没有得到改善。

[0075] BPZE1介导的和BPZE1f3介导的针对副百日咳鲍特菌的保护。

[0076] 还测试了BPZE1f3针对副百日咳鲍特菌的效力。在这种情况下,使用10⁶个CFU疫苗

株,然后在接种疫苗两个月后用 10^6 个CFU的副百日咳鲍特菌激发。先前已经显示,尽管激发感染后第7天未达到完全清除,此方案仍可导致强有力的保护,(Mielcarek等人,PLoS Pathog[科学公共图书馆病原学]2006;2:e65)。感染副百日咳鲍特菌后第7天,与未接种疫苗的小鼠相比,接种疫苗BPZE1和BPZE1f3的小鼠的肺中细菌载量均显示明显降低(4至5个log之间)(图5)。在接种疫苗BPZE1和BPZE1f3的小鼠之间未见统计学差异,这表明Fim3的产生未提供优势,也无害于针对副百日咳鲍特菌感染的保护。

[0077] BPZE1f3产生Fim3的稳定性。

[0078] 由于BPZE1和BPZE1f3之间唯一的遗传差异是fim3启动子的C链(BPZE1中的13C和BPZE1f3中的14C)中的C的量,并且由于C链在百日咳鲍特菌中易发生相移变化(Willems等人,EMBO J[欧洲分子生物学学会杂志]1990;9:2803-9),在小鼠的疫苗株体内传代后,对BPZE1f3产生Fim3和Fim2的稳定性都进行了评估。用 10^6 个CFU的BPZE1f3感染小鼠,并且收集感染后14天在肺中存在的细菌,并将其铺板在BG琼脂上。生长后,将94个单独的菌落接种到96孔板中。收集剩余的菌落并施用于小鼠进行第二次传代,然后2周后进行第三次传代。每次传代,将94个单独的菌落接种到含有100 μ l的PBS/孔的96孔板中。含有BPZE1的对照孔作为阴性对照,并且含有BPZE1f3的对照孔作为阳性对照。通过在630nm处的OD测量来确定每孔中存在的细菌的量。干燥后,通过全细胞ELISA评估Fim3和Fim2的存在。在第一次传代后,发现94个克隆中的94个均产生Fim3和Fim2两者。在第二次传代后,有97.9%的菌落产生了Fim2,并且96.8%的菌落产生了Fim3;以及在第三次传代后,产生Fim3和Fim2的菌落数分别为87.23%和97.9%(图6),这表明fim3表达相对稳定,且3次体内传代后仅损失12.77%。

[0079] 本发明还提供以下项目:

[0080] 1.一种疫苗,所述疫苗包含药学上可接受的载体和经工程化以稳定地产生Fim3的减毒活鲍特菌属菌株,其中所述减毒活鲍特菌属菌株保留了在哺乳动物受试者的肺部定殖以及诱导针对鲍特菌感染的保护性免疫应答的能力。

[0081] 2.根据项目1所述的疫苗,其中所述减毒活鲍特菌属菌株稳定地产生Fim2。

[0082] 3.根据项目1所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性百日咳毒素(PTX)、功能性皮肤坏死毒素(DNT)和功能性气管细胞毒素(TCT)。

[0083] 4.根据项目1所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0084] 5.根据项目1所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0085] 6.根据项目2所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0086] 7.根据项目2所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0087] 8.根据项目2所述的疫苗,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0088] 9.根据项目1所述的疫苗,其中所述疫苗以单一剂型提供,所述单一剂型包含至少 1×10^6 个菌落形成单位(CFU)的所述菌株。

[0089] 10.所述鲍特菌属菌株指定为BPZE1f3。

[0090] 11.一种保护哺乳动物受试者免受百日咳的方法,所述方法包括以下步骤:向所述哺乳动物受试者施用疫苗,所述疫苗包含药学上可接受的载体和经工程化以稳定地产生Fim3的减毒活鲍特菌属菌株,其中所述减毒活鲍特菌属菌株保留了在哺乳动物受试者的肺部定殖以及诱导针对鲍特菌感染的保护性免疫应答的能力。

[0091] 12.根据项目11所述的方法,其中所述减毒活鲍特菌属菌株稳定地产生Fim2。

[0092] 13.根据项目11所述的方法,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自自由以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0093] 14.根据项目11所述的方法,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自自由以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0094] 15.根据项目11所述的方法,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0095] 16.根据项目12所述的方法,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自自由以下组成的组的至少一种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0096] 17.根据项目12所述的方法,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏选自自由以下组成的组的至少两种毒力因子:功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0097] 18.根据项目12所述的方法,其中已确定所述减毒活鲍特菌属菌株缺乏功能性PTX、功能性DNT和功能性TCT。

[0098] 19.根据项目11所述的方法,其中所述菌株为BPZE1f3。

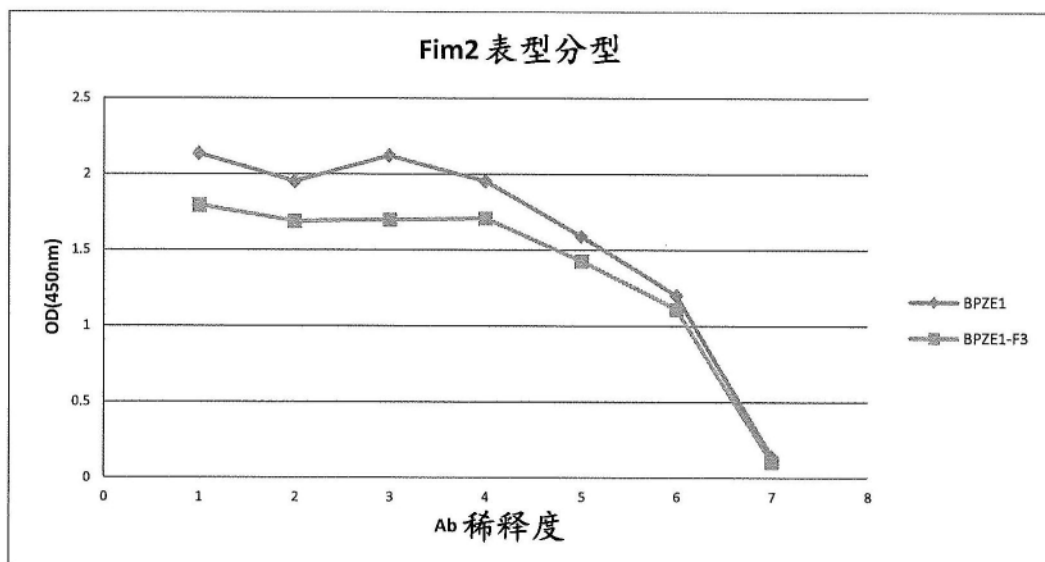
[0099] 其他实施例

[0100] 应当理解的是,虽然已经结合其具体实施方式对本发明进行了描述,但是前述的描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围是由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点以及修改都在以下权利要求的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 里尔巴斯德研究所 (INSTITUT PASTEUR DE LILLE)
- [0003] 国家医疗保健研究所 (INSERM)
- [0004] <120> 表达血清3型菌毛的鲍特菌属菌株
- [0005] <130> 7056-0091
- [0006] <140>
- [0007] <141>
- [0008] <150> 62/574,068
- [0009] <151> 2017-10-18
- [0010] <160> 6
- [0011] <170> PatentIn 3.5版
- [0012] <210> 1
- [0013] <211> 36
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <220>
- [0017] <221> 来源
- [0018] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸“
- [0019] <400> 1
- [0020] gagctcttta ccgcggccgc cagttgttca tcaatg 36
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 24
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> 人工序列
- [0025] <220>
- [0026] <221> 来源
- [0027] <223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸“
- [0028] <400> 2
- [0029] ggatccatca tcgagaccga ctgg 24
- [0030] <210> 3
- [0031] <211> 20
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列
- [0034] <220>
- [0035] <221> 来源
- [0036] <223> /注释=“人工序列的描述:合成引物“
- [0037] <400> 3
- [0038] agctaggggt agaccacgga 20

[0039]	<210> 4
[0040]	<211> 20
[0041]	<212> DNA
[0042]	<213> 人工序列
[0043]	<220>
[0044]	<221> 来源
[0045]	<223> /注释=“人工序列的描述:合成引物“
[0046]	<400> 4
[0047]	ataactcttc tggcgccaag 20
[0048]	<210> 5
[0049]	<211> 20
[0050]	<212> DNA
[0051]	<213> 人工序列
[0052]	<220>
[0053]	<221> 来源
[0054]	<223> /注释=“人工序列的描述:合成引物“
[0055]	<400> 5
[0056]	catgacggca cccctcagta 20
[0057]	<210> 6
[0058]	<211> 20
[0059]	<212> DNA
[0060]	<213>人工序列
[0061]	<220>
[0062]	<221> 来源
[0063]	<223> /注释=“人工序列的描述:合成引物“
[0064]	<400> 6
[0065]	ttcacgtacg aggcgagata 20

A



B

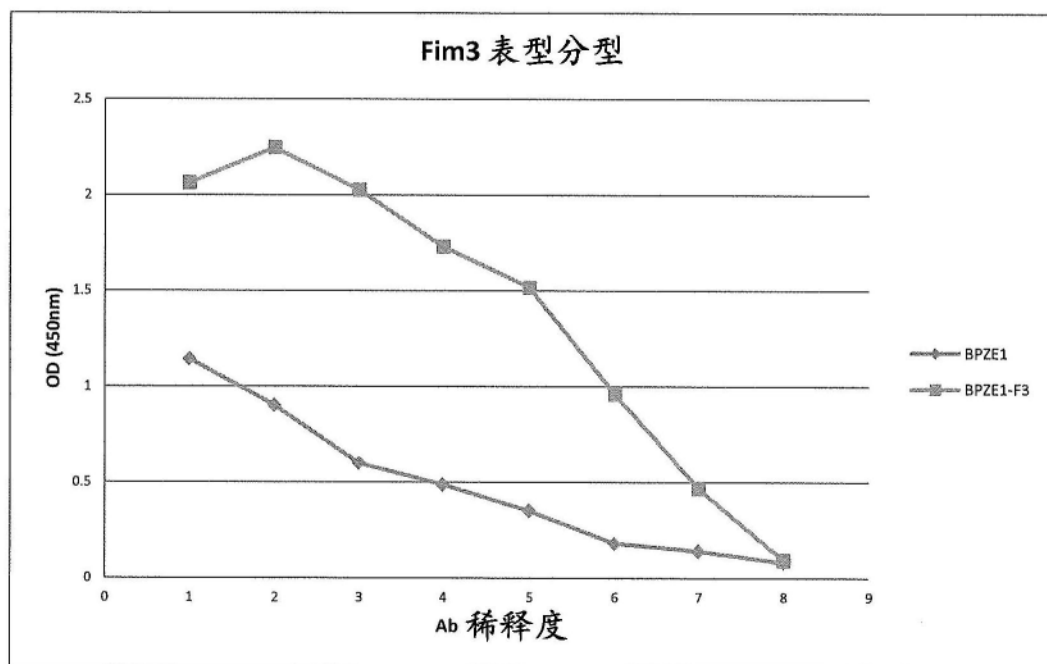
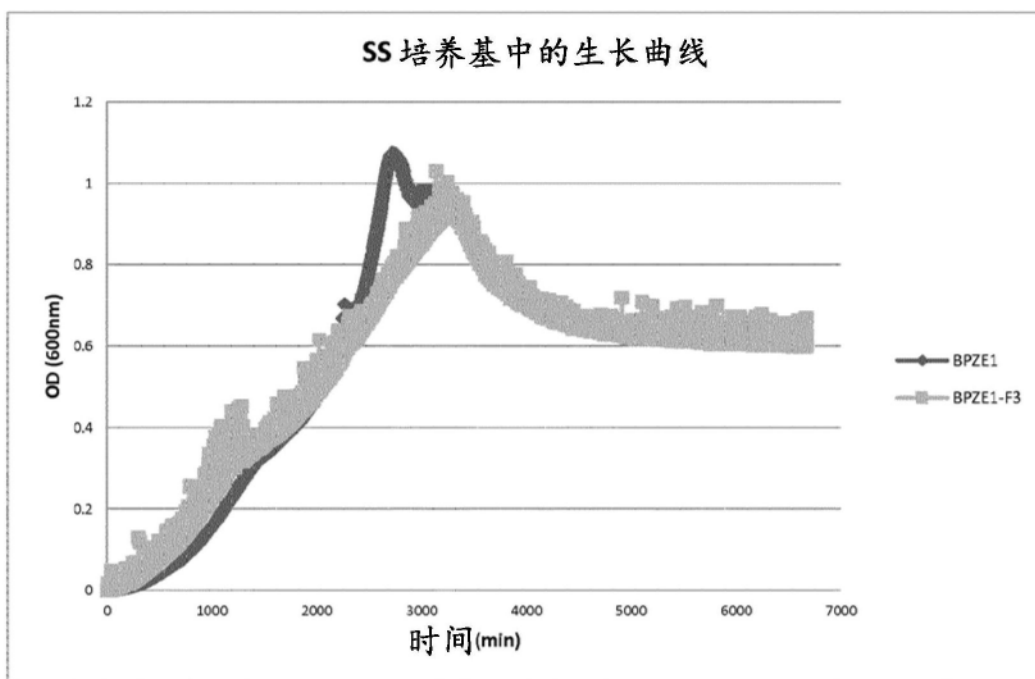


图1

A



B

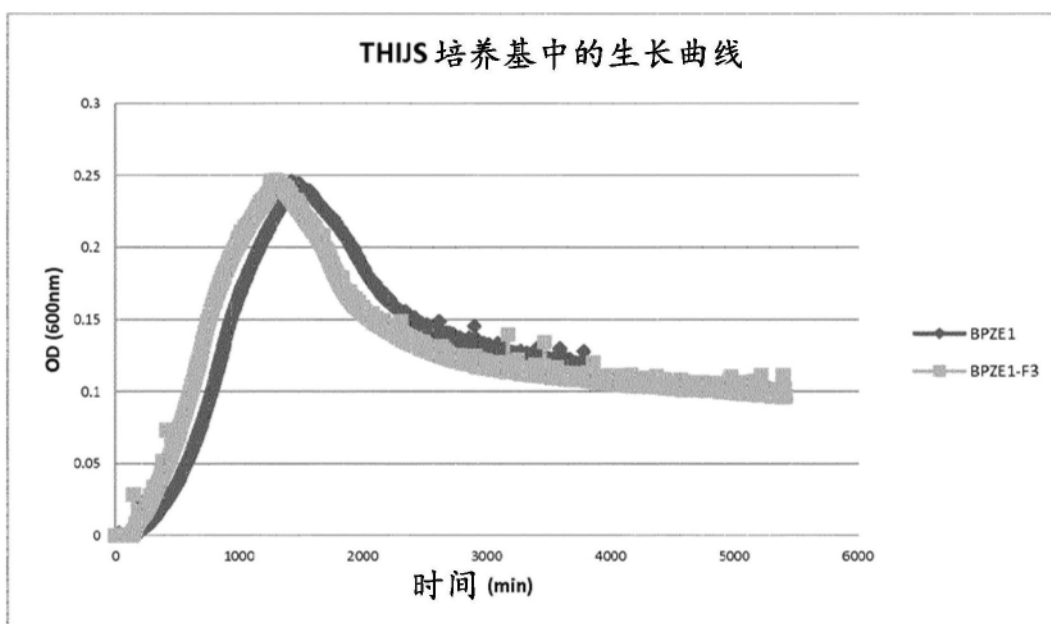


图2

BPZE1 和 BPZE1f3 定殖

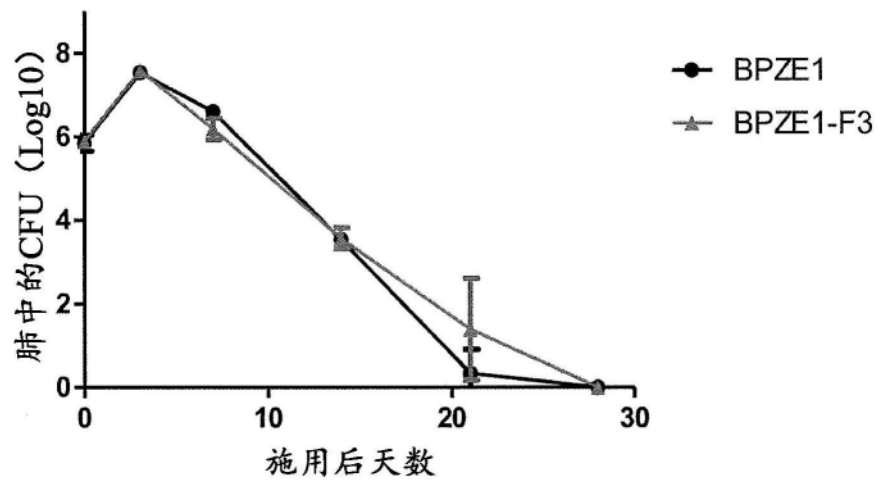


图3

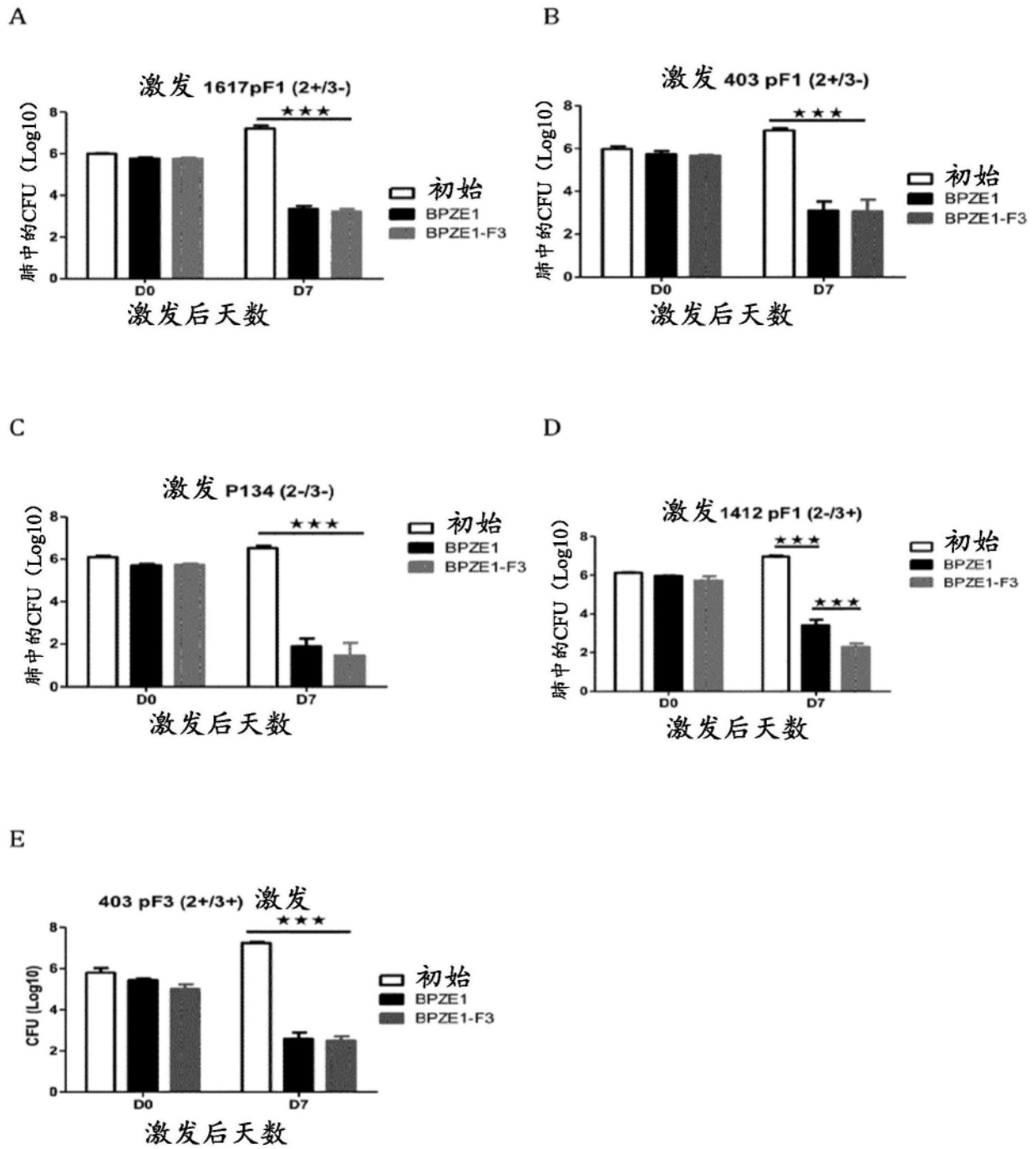


图4

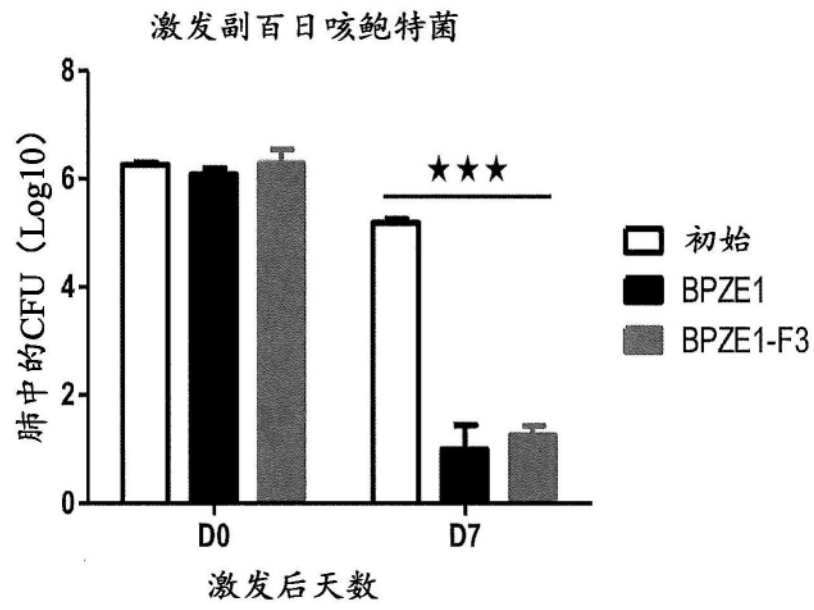


图5

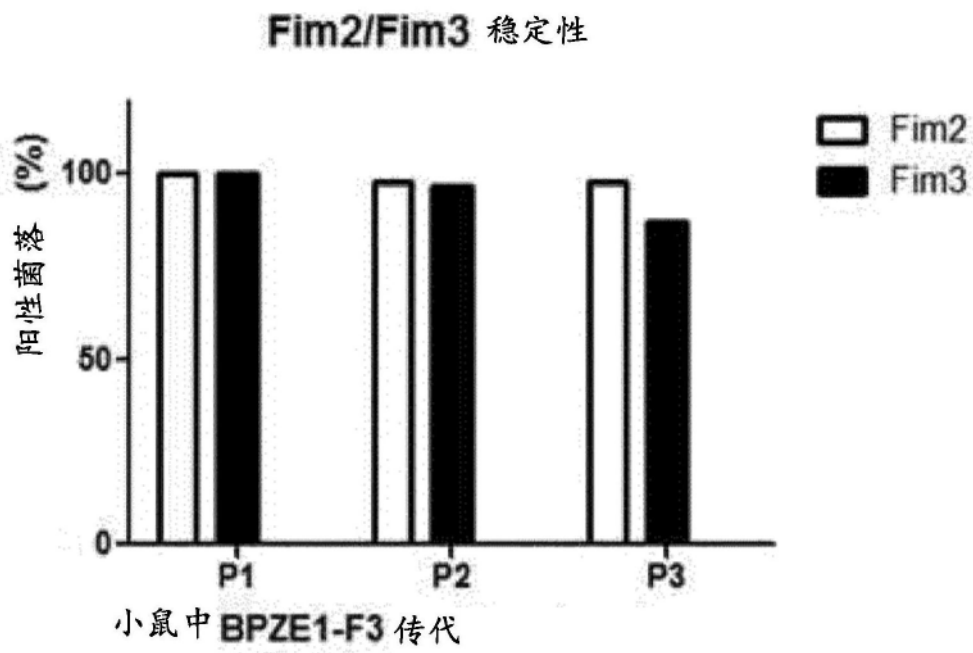


图6