(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101848997 B
(45)授权公告日 2013.06.19

(21)申请号 200780101116.2
(22)申请日 2007.11.30
(30)优先权数据
10-2007-0103512 2007.10.15 KR
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.04.15
(86)PCT申请的申请数据
PCT/KR2007/006147 2007.11.30
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/051290 EN 2009.04.23
(73)专利权人 生物领先公司
地址 韩国大田市
专利权人 韩国生命工学研究院
忠南大学校产学协力团
(72)发明人 成文喜 金哲仲 夫夏玲 金智渊
金英淑 许龙春
(74)专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006
代理人 徐金国
(51)Int.Cl.
C12N 15/02(2006.01)
(56)对比文件
CN 1355881 A,2002.06.26, 说明书全文.
CN 1384757 A,2002.12.11, 说明书全文.
CN 1788019 A,2006.06.14, 说明书全文.
审查员 唐华东

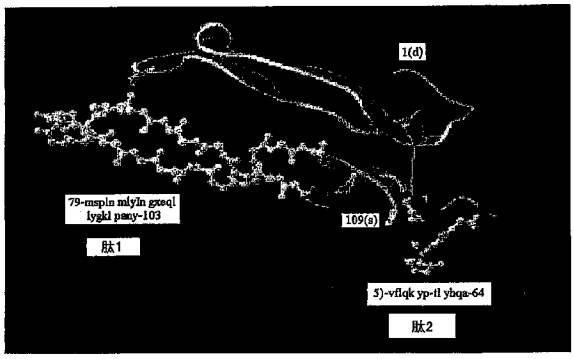
权利要求书1页 说明书14页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

用于Myo-2肽多聚体和肌生成抑制素的融合蛋白表面表达载体以及由其转化的微生物

(57)摘要

本发明涉及其中肌生成抑制素成熟蛋白与来自肌生成抑制素的抗原肽Myo-2多聚体融合的融合蛋白、含有编码所述融合蛋白的多聚核苷酸的表面表达载体、使用所述载体转化的重组微生物以及含所述微生物作为有效成分的饲料添加剂或者药物组合物。根据本发明的饲料添加剂或者药物组合物可用于家畜或家禽的肌肉发育和肌肉生长调节，以及用于预防并治疗肌肉退化性疾病或者肌肉消耗性疾病诸如肌肉营养不良、肌肉萎缩等等。另外，转化的菌株显示了相同的效果，即便在其培养之后菌株本身直接被使用时也是如此，因此是非常经济的。



CN 101848997 B

1. 一种来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽，其由序列 1 的氨基酸序列构成。

2. 一种由 4 个权利要求 1 的来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽构成的 Myo-2 肽多聚体。

3. 一种融合蛋白，其中肌生成抑制素成熟蛋白与权利要求 2 的 Myo-2 肽多聚体融合。

4. 一种细胞表面表达载体，所述表达载体包含编码肌生成抑制素成熟蛋白的基因和编码权利要求 2 的 Myo-2 肽多聚体的核苷酸序列，所述基因和序列可操作地连接到一个或多个选自下组的基因，所述组由编码多聚 - γ - 谷氨酸合成酶复合物的 pgsB、pgsC 和 pgsA 基因所组成。

5. 根据权利要求 4 所述的细胞表面表达载体，其特征在于，所述肌生成抑制素来自哺乳动物或者鸟类。

6. 一种转化有权利要求 4 的细胞表面表达载体的重组乳酸菌。

7. 一种制备在细胞表面表达融合蛋白的乳酸菌的方法，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白，所述方法包括下列步骤：

(a) 通过培养权利要求 6 的所述重组乳酸菌在其细胞表面上表达融合蛋白，该融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白；以及

(b) 收集在细胞表面上表达所述肌生成抑制素成熟蛋白的乳酸菌。

8. 一种在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的饲料添加剂，其含有由权利要求 7 的方法制备的乳酸菌作为有效成分，所述乳酸菌在其细胞表面上表达融合蛋白，该融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白。

9. 一种在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的组合物，其含有由权利要求 7 的方法制备的乳酸菌作为有效成分，所述乳酸菌在其细胞表面上表达融合蛋白，该融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白。

10. 一种预防或治疗退化性疾病或者肌肉消耗性疾病的药物组合物，其含有由权利要求 7 的方法制备的乳酸菌作为有效成分，所述乳酸菌在其细胞表面上表达融合蛋白，该融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白。

11. 一种在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的饲料添加剂，其含有权利要求 3 的融合蛋白作为有效成分。

12. 一种在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的组合物，其含有权利要求 3 的融合蛋白作为有效成分。

13. 一种预防或治疗退化性疾病或者肌肉消耗性疾病的药物组合物，其含有权利要求 3 的融合蛋白作为有效成分。

用于 Myo-2 肽多聚体和肌生成抑制素的融合蛋白表面表达载体以及由其转化的微生物

技术领域

[0001] 本发明涉及其中肌生成抑制素成熟蛋白与来自肌生成抑制素抗原肽 Myo-2 的多聚体融合的融合蛋白、含有编码所述融合蛋白的多聚核苷酸的表面表达载体、使用所述载体转化的重组微生物以及含有所述微生物作为有效成分的饲料添加剂或者药物组合物。

背景技术

[0002] GDF-8(生长分化因子 -8) 也被称为作为生长控制因子的肌生成抑制素,其选择性负性调节 (negative regulate) 骨骼肌生长,于 1997 年被发现 (McPherron 等人, Nature, 387 :83,1997)。发现肌生成抑制素的研究组宣布,由于它们的高肌肉量和柔嫩肉质而质量很高的两种母牛即 Belgianblue 和 Piedmontese 在编码肌生成抑制素的基因中发生了突变,其导致肌肉发育 (McPherron 和 Lee,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,94 :12457,1997),并报道了这些品种的双肌动物 (double-muscle animal) 的平均肌肉量比普通动物的平均肌肉量增加了 20 ～ 25%。

[0003] 在实验上,肌生成抑制素敲除 (myostatin-knockout) 的小鼠也显示了骨骼肌量的增加,从肌生成抑制素阴性小鼠分离的肌肉大约比从野生型小鼠分离的肌肉重 2-3 倍。已经报道敲除小鼠总体重比野生型小鼠的总体重高大约 35%,并且肌生成抑制素缺失小鼠的肌纤维比正常小鼠的肌纤维多 80%,并且在敲除小鼠中观察到的骨骼肌增加由肌纤维的异常生长以及肌纤维数目的增加引起。

[0004] 作为选择性负性调节骨骼肌生长的生长控制因子的肌生成抑制素属于 TGF-α(转化生长因子 -α) 超家族 (super family),由 375 个氨基酸前体构成,在小鼠 (mice)、大鼠 (rat)、人、猪、鸡、火鸡中具有大约 109 个氨基酸残基的相同 C- 末端片段,并且 C- 末端区域只有 3 个氨基酸残基与猴子、母牛和绵羊不同。C- 末端区域被预测包括肌生成抑制素的生理活性部分。在各个物种的进化中肌生成抑制素显示了高保存率,暗示肌生成抑制素在生物学肌肉控制中是必须因子 (McPherron 和 Lee,Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 94 :12457,1997)。

[0005] 肌生成抑制素表达被限制到骨骼肌,并且其在脂肪组织中低水平表达。看起来肌生成抑制素似乎起到骨骼肌生长的负性调节的作用,但是在成年个体中肌生成抑制素的生理学作用仍然未知。虽然肌生成抑制素的生理作用的研究集中在异常生长或者其在肌肉损伤后的再生能力,也知道肌生成抑制素抑制脂肪组织的生长。但是,尚不知道肌生成抑制素是否在局部或者全身起作用以调节动物生长。

[0006] 近来,正在进行有关失活或抑制肌生成抑制素的研究,施加作用以便负性调节骨骼肌的生长。代表性的研究包括开发治疗剂以治疗人类疾病,包括肌肉损耗疾病 (muscle-wasting disease) 诸如肌肉营养不良或者肌肉萎缩,或者由 AIDS、癌症以及类似疾病引起的肌肉损失,以及开发用于高质量肉类家畜生长的饲料添加剂。此外,由于当肌生成抑制素作为肌肉增强的辅助添加剂被开发时,其由于肌肉量的增加而抑制身体脂肪积

累，预期其对于肥胖病治疗是有效的，因此其研究还在进行。

[0007] 有关通过抑制肌生成抑制素蛋白的功能诱导肌肉生长方法的两个代表性的研究正在进行。一个是揭示并使用抑制肌生成抑制素活性以抑制其功能的各种蛋白质(follastatin，II 型突变 activin 受体，肌生成抑制素前体多肽等)，另一个是通过使用肌生成抑制素多肽、其序列以及突变序列进行动物免疫生产肌生成抑制素多肽的抗体。

[0008] 据报道，脊椎动物中肌生成抑制素免疫原的生产导致内源肌生成抑制素活性的降低，由此显示了生物学效应诸如体重增加、肌肉量的增加、肌细胞数目的增加、肌肉细胞大小的增加、身体脂肪的减少、肌肉强度的增加等等。但是，由于在胚胎形成过程中肌纤维的数目和类型是遗传上程序化的，在完全生长好的饲养动物中肌生成抑制素活性的降低没有导致肌纤维数目的增加，其可能对肉质、饲养特性和脂肪比例产生负面影响，但在显示肌生成抑制素活性降低的动物中由于异常肌肉生长引起的体重和生长速度的增加在牛肉、猪肉和家禽肉类生产方面提供了有效方法。

[0009] 但是，大多数研究通过人工合成计肌生成抑制素多肽或其序列来进行，或者通过将他们在大肠杆菌中表达之后分离并纯化来进行制备，这导致成本效率低下，因此难以将他们应用于工业应用。

[0010] 在家畜工业中，通过增加饲料效率来提高动物生长速度的各种饲养程序被开发并改进。在这些方法中，医学途径包括将抗生素或者类抗生素化合物给药到饲养动物，或者将激素诸如生长激素给药到饲养动物。但是，将抗生素或者类抗生素化合物给药到饲养动物被禁止，因为其可引起诱导抗生素交叉阻抗的问题。另外，在将生长激素给药到饲养动物的情况下，其缺点在于成本巨大，短期治疗由于生长速度的半寿期短而被重复，并且保留在得自使用其处理的动物肉中的生长激素可引起人类健康问题。由于医疗方法的困难，通过增加饲料效率来增强动物生长速度的各种饲养程序正在继续被开发。

[0011] 通过将所需蛋白与微生物细胞表面连接的表达技术被称为细胞表面展示技术。细胞表面展示技术是使用微生物诸如细菌或酵母的表面蛋白作为表面锚定基序 (surface anchoring motif) 在细胞表面表达外源蛋白，并在广泛范围内被使用，包括重组活体疫苗的生产，多肽 / 抗体库的构建和筛选，全细胞吸附和生物交换催化剂。该技术的应用范围基于在细胞表面上表达的蛋白质的种类来确定，因此细胞表面展示技术的工业应用潜能可以说是巨大的。

[0012] 对于成功的细胞表面展示来说，表面锚定基序是最重要的。能够在细胞表面上有效表达外源蛋白质的基序的选择和开发是这种技术的核心。因此，具有下列性质的表面锚定基序应当被选择。首先，其应当具有帮助外源蛋白穿过细胞内膜并到达细胞表面的分泌信号。第二，其应当具有帮助外源蛋白与细胞膜外表面稳定连接的目标信号。第三，其应当在细胞表面上大量表达但很少或者几乎不影响细胞生长。第四，其应当稳定表达而不受蛋白质尺寸的影响，不引起外源蛋白三维结构的变化。但是，满足上述所有要求的表面锚定基序仍未被开发。

[0013] 已知并且迄今为止还在使用的细胞表面锚定基序广义上被分成四种，即膜外蛋白、脂蛋白、分泌蛋白和表面蛋白诸如鞭毛蛋白。在革兰氏阴性菌的情况下，存在于细胞膜外的蛋白质，诸如 LamB，PhoE(Charbit 等人，J. Immunol.，139 :1658，1987 ；Agterberg 等人，Vaccine，8 :85，1990) 和 OmpA 主要被使用。此外，脂蛋白诸如 TraT(Felici 等人，J. Mol.

Biol.,222:301,1991),PAL(肽葡聚糖相关脂蛋白)(Fuchs等人,Bio/Technology,9:1369,1991)和Lpp(Francisco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,489:2713,1992)也被使用。此外,外源蛋白的表达还试图使用FimA,菌毛蛋白(fimbriae protein)诸如1型菌毛FimH粘附素(Hedegaard等人,Gene,85:115,1989),或者纤毛蛋白(pili protein)诸如PapA纤毛亚单位作为表面锚定基序。另外,报道了冰核蛋白(ice nucleation protein)(Jung等人,Nat.Biotechnol.,16:576,1998;Jung等人,Enzyme Microb.Technol.,22:348,1998;Lee等人,Nat.Biotechnol.,18:645,2000),产酸克雷伯菌(Klebsiella oxytoca)的支链淀粉酶(Kornacker等人,Mol.Microbiol.,4:1101,1990),奈瑟氏球菌属(Neisseria)的IgA蛋白酶(Klauser等人,EMBO J.,9:1991,1990),大肠杆菌粘附素AIDA-1(E.coli adhesinAIDA-1),志贺氏菌属(Shigella)的VirG蛋白,Lpp和OmpA融合蛋白可被用作表面锚定基序。

[0014] 在使用革兰氏阳性菌的情况下,报道了疟疾抗原使用来自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的蛋白质A和FnBPB蛋白质作为表面锚定基序有效表达。另外,报道了乳酸菌表面外壳蛋白在革兰氏阳性菌诸如来自化脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的M6蛋白的表面表达和表面蛋白中使用(Medaglini,D等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,92:6868,1995),炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)的S-层蛋白EA1,枯草芽孢杆菌(Bacillussubtilis)CotB等也被用作表面锚定基序。

[0015] 同时,本发明的发明人已经开发了在微生物表面上使用pgsBCA基因编码来自芽孢杆菌(Bacillus sp.)菌株的多聚-γ-谷氨酸合成酶复合物的有效表达外源蛋白的新载体作为新表面锚定基序,以及在使用该载体转化的微生物表面上表达大量外源蛋白的方法(韩国专利注册号10-0469800)。

[0016] 进行了许多研究试图在其中通过基因工程技术使用上面描述的表面锚定基序能够进行大量生产的细菌中稳定表达病源微生物的抗原或抗原表位。据报道,特别是当在非病源细菌表面上表达的外源免疫原活体口服给药时,可诱导比现有使用减毒病原菌或病毒的疫苗的免疫应答更持久更强的免疫应答。这种免疫反应的诱导可通过对已知活细菌的体内免疫应答来诱导,所述活细胞由于细菌表面结构起到增加表面表达外源蛋白抗原性的佐剂作用。使用这种表面表达系统的非病原菌的重组活体疫苗的开发值得注意(noticeable)。

[0017] 因此,本发明的发明人付出了极大的努力来开发在微生物表面上有效表达能够诱导对肌生成抑制素的强免疫性的肌生成抑制素融合蛋白的方法,结果他们发现,当其中Myo-2多聚体与肌生成抑制素融合的融合蛋白在使用pgsBCA基因编码的来自芽孢杆菌(Bacillus sp.)菌株的多聚-γ-谷氨酸合成酶复合物作为表面锚定基序乳酸菌表面上表达时,所述融合蛋白在其表面上被有效表达,证实在细胞表面上表达所述融合蛋白的乳酸菌的口服给药增加了血液中抗体的产生以及体重和肌肉量,由此完成本发明。

发明内容

[0018] 本发明的目的在于提供来自肌生成抑制素的Myo-2多肽和所述Myo-2多肽的多聚体。

[0019] 本发明的另一目的在于提供其中肌生成抑制素蛋白与所述Myo-2肽多聚体融合

的融合蛋白。

[0020] 本发明的又一目的在于提供包括编码所述融合蛋白的基因的细胞表面表达载体，以及使用所述表面表达载体转化的重组微生物。

[0021] 本发明的再一目的在于提供制备在其细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物的方法。

[0022] 此外，本发明的另一目的在于提供含有所述融合蛋白或在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物的饲料添加剂。

[0023] 本发明的还一目的在于提供含有所述融合蛋白和在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物的药物组合物。

[0024] 为了实现上述目的，本发明提供了来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽和 Myo-2 肽多聚体，所述肽具有序列 1 的氨基酸序列，所述多聚体包括 2 ～ 8 个来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽。

[0025] 本发明还提供了其中所述 Myo-2 多聚体与肌生成抑制素成熟蛋白融合的融合蛋白。

[0026] 本发明还提供了细胞表面表达载体以及使用所述表面表达载体转化的重组微生物，所述表面表达载体包含编码肌生成抑制素的成熟蛋白基因和编码 Myo-2 肽多聚体的核苷酸序列，所述基因和序列可操作地连接到一个或多个选自下组的基因，该组由编码多聚 - γ - 谷氨酸合成酶复合物的 pgsB，pgsC 和 pgsA 基因所组成。

[0027] 本发明还提供了制备在细胞表面表达融合蛋白微生物的方法，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽 (Myo-2) 的多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白，所述方法包括下列步骤 :(a) 通过培养所述重组微生物在细胞表面上表达融合蛋白，该融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽的多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白的融合蛋白 ;以及 (b) 收集在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物，该融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽的多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白。

[0028] 另外，本发明提供了在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的饲料添加剂，其含有在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物作为有效成分。

[0029] 另外，本发明提供了在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的组合物，其含有在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物作为有效成分。

[0030] 本发明还提供了预防或治疗退化性疾病或者肌肉消耗性疾病的药物组合物，其含有在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物作为有效成分。

[0031] 此外，本发明提供了在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的饲料添加剂，其含有所述融合蛋白作为有效成分。

[0032] 本发明还提供了在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的组合物，其含有所述融合蛋白作为有效成分。

[0033] 本发明还提供了预防或治疗退化性疾病或者肌肉消耗性疾病的药物组合物，其含有所述融合蛋白作为有效成分。

[0034] 另外，本发明还提供了在动物中增加肌肉细胞的尺寸或数量的方法，其包括使用所述饲料添加剂或者药物组合物对动物进行给药。

[0035] 通过下列详细描述和随附的权利要求书，本发明的上述和其他目的、特征和实施

方式将更清楚地被理解。

附图说明

[0036] 图 1 是图示的根据本发明的小鸡肌生成抑制素成熟蛋白预测 3D 结构和抗原区(Myo-1,Myo-2)。

[0037] 图 2 显示了由使用根据本发明的抗原肽和鸡肌生成抑制素成熟蛋白免疫的肉种鸡 (broiler breeder) 产的蛋孵化的小鸡体重增加的速度。

[0038] 图 3 显示了构建根据本发明的 Myo-2 肽多聚体的亚单位结构。

[0039] 图 4a 显示了本发明的表达融合蛋白的表面表达载体 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom 的遗传图谱,所述融合蛋白含有与来自鸡肌生成抑制素的抗原肽 (4xMyo-2) 多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白 ;图 4b 显示了表达鸡肌生成抑制素成熟蛋白的表面表达载体 pHCE2LB :pgsA-CMyom 的遗传图谱。

[0040] 图 5 显示了在细胞中利用 pgsA 专一性抗体进行免疫印迹分析的结果,所述细胞通过培养使用本发明的 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 和 pHCE2LB :pgsA-CMyom 转化的乳酸菌得到的。

[0041] 图 6a 显示了通过 ELISA(酶联免疫吸附测定)测定的以本发明的 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom 和 pHCE2LB :pgsA-CMyom 转化的干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 口服给药的小鼠血清中针对 4xMyo-2-CMyom 抗原的抗体滴度 ;图 6b 是显示进行口服给药的小鼠中体重的变化的测定结果 (A :使用 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化的乳酸菌给药组 ;B :使用 pHCE2LB :pgsA-CMyom 转化的乳酸菌给药组 ;C :使用常规乳酸菌给药的对照组)。

[0042] 图 7 显示了通过使用本发明的 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 和 pHCE2LB:pgsA-CMyom 转化的干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 口服给药的小鼠血清中存在的抗体引起的肌细胞中信号转导 (signaling) 抑制效果 (A :使用在细胞表面上表达融合蛋白 4xMyo-2-CMyom 的乳酸菌给药组 ;B :使用在细胞表面上表达 CMyom 的乳酸菌给药组 ;C :使用常规乳酸菌给药的对照组)。

[0043] 图 8 显示了通过 ELISA 测定的使用干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 经喂养口服给药的鸡血清中针对鸡肌生成抑制素成熟抗原的 IgG 抗体滴度,其中干酪乳杆菌已经由本发明的 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化以使 4xMyo-2-CMyom 在其表面上表达。

[0044] 图 9a 是显示使用干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 经喂养口服给药的鸡的体重变化的测定结果,其中干酪乳杆菌已经由本发明的 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化以使 4xMyo-2-CMyom 在其表面上表达,图 9b 显示了在实验完成时鸡平均体重 (6 周)。

[0045] 图 10 显示使用干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 经喂养口服给药的鸡的饲养效率,其中干酪乳杆菌已经由本发明的 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化以使 4xMyo-2-CMyom 在其表面上表达。

具体实施方式

[0046] 在一个方面,本发明涉及具有序列 1 的氨基酸序列的来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽,以及包括 2-8 个来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽的 Myo-2 肽多聚体,和其中肌生成抑制素

成熟蛋白与 Myo-2 肽多聚体融合的融合蛋白。

[0047] 在本发明中，基于预测的肌生成抑制素成熟蛋白的 3D 结构选择 Myo-2 肽，并将 Myo-2 肽给药到肉用种禽，结果证实，由使用 Myo-2 肽注射的肉用种鸡产的蛋孵化的小鸡显示了增加的体重增量。

[0048] 根据本发明的来自肌生成抑制素的 Myo-2 肽在体内显示了针对肌生成抑制素蛋白的抗原性，其使个体能够使用 Myo-2 免疫以增加体重，并且通过聚合 2 ～ 8 个 Myo-2 肽得到 Myo-2 肽多聚体以便增强 Myo-2 针对肌生成抑制素的抗原性。通过将肌生成抑制素成熟蛋白与所述 Myo-2 肽多聚体结合得到的融合蛋白显示了针对肌生成抑制素的极高的抗原性，由此增加了肌肉量。

[0049] 在本发明中，为了得到在微生物表面上表达的其中肌生成抑制素成熟蛋白与 Myo-2 肽多聚体融合的融合蛋白，构建了一种融合蛋白，其中含有与 Myo-2 肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白的融合蛋白与多聚 - γ - 谷氨酸合成酶复合物融合。

[0050] 在本发明中，作为由 pgsB，pgsC 和 pgsA 编码的膜外蛋白的多聚 - γ - 谷氨酸合成酶复合物由于其氨基酸的初级结构和性质而具有许多作为在细胞表面上表达外源蛋白的表面锚定基序的优点。也就是说，其具有的优点在于 ：第一，其可在细胞表面上丰富表达以便合成并向细胞外分泌多聚 - γ - 谷氨酸 ；第二，在细胞周期的静止期过程中在合成表达的多聚 - γ - 谷氨酸中涉及的膜外蛋白也可被稳定保持 ；第三，其具有从细胞表面突出的结构（尤其是在 pgsA 的情况下）；第四，由于膜外蛋白 (pgsBCA) 来源于革兰氏阳性菌的表面，其可在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的表面上稳定表达。

[0051] 在本发明中，作为含有编码所述多聚 - γ - 谷氨酸合成酶复合物的基因 (pgsB，pgsC 和 pgsA) 的细胞表面表达载体，可使用通过从产多聚 - γ - 谷氨酸的所有芽孢杆菌 (Bacillus sp.) 菌株得到 pgsBCA 构建的细胞表面表达载体，并且优选含有在来自 chungkookjang 纳豆菌 (Bacillus subtilisvar.)(KCTC 0697BP) 的多聚 - γ - 谷氨酸合成中涉及的膜外蛋白基因的细胞表面表达载体，但不限于此。例如，通过使用与 chungkookjang 纳豆菌 (Bacillus subtilis var.) 中存在的 pgsBCA 基因的碱基序列至少具有 80％同源性的来自其他菌株的 pgsBCA 基因制备的表达载体的使用也落入本发明的范围之内。

[0052] 在另一方面，本发明涉及细胞表面表达载体以及使用所述表面表达载体转化的重组微生物，该表面表达载体含有与编码肌生成抑制素成熟蛋白的基因和编码 Myo-2 肽多聚体的核苷酸序列以及可操作地连接到所述基因和序列的选自下组的一个或多个基因，所述组由和编码多聚 - γ - 谷氨酸合成酶复合物的 pgsB、pgsC、pgsA 基因所组成。

[0053] 在本发明中，所述肌生成抑制素优选来自哺乳动物或鸟类（家禽）。并且所述重组微生物优选选自下组的任何一种，包括大肠杆菌 (E.coli)，伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhi)，鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonellatyphimurium)，霍乱弧菌 (Vibrio cholerae)，牛型结核杆菌 (Mycobacteriumbovis)，志贺氏菌属 (Shigella)，芽胞杆菌属 (Bacillus)，乳酸菌，葡萄球菌属 (Staphylococcus)，棒状杆菌 (Corynebacteria)，单核细胞增多性李司忒菌 (Listeria monocytogenes) 和链球菌属 (Streptococcus)，更优选地是，重组微生物为乳酸菌。

[0054] 本发明中的肌生成抑制素是选择性负性调节骨骼肌生长的生长控制因子，属于

TGF-α（转化生长因子-α）超家族，并由375个氨基酸前体构成，并且在本发明中，肌生成抑制素蛋白的成熟域是通过从氨基酸前体中缺失分泌信号和前结构域(prodomain)得到的显示肌生成抑制素活性的部分。

[0055] 在本发明中，肌生成抑制素优选来自哺乳动物、鸟类或者鱼类。在进化过程中肌生成抑制素在各个物种中显示了高保存性，并在大鼠(mice)、小鼠(rat)、人、猪、鸡和火鸡中具有大约109个氨基酸的相同C-末端片段，并且仅有3个C-末端区域氨基酸残基与猴子、母牛和绵羊中不同。其被预期这些C-末端区域可能包括肌生成抑制素的生物学活性部分。

[0056] 在还一方面，本发明还提供了制备微生物的方法，所述微生物具有在细胞表面表达的融合蛋白，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽(Myo-2)的多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白，所述方法包括下列步骤：(a)通过培养所述重组微生物在细胞表面上表达融合蛋白，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽的多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白；以及(b)收集在细胞表面上表达所述融合蛋白的微生物，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽的多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白的融合蛋白。

[0057] 本发明的融合蛋白以与由pgsB、pgsC和pgsA编码的融合的形式被表达，所述多聚-γ-谷氨酸合成酶蛋白是包含在表达载体中的多聚-γ-谷氨酸合成酶复合物，并且融合蛋白由所述多聚-γ-谷氨酸合成酶蛋白转移到微生物的表面上并在其上定位。

[0058] 由于融合蛋白在微生物的表面上表达而不失去其功能，所述融合蛋白能够以在微生物表面上表达的状态被使用，因此它们能够以在微生物表面上表达的状态给药到动物以在动物体内诱导针对肌生成抑制素的免疫反应。

[0059] 根据本发明，当在细胞表面上表达其中肌生成抑制素与来自肌生成抑制素的肽的多聚体融合的融合蛋白的微生物经口服给药到鼠时，针对融合蛋白的抗体有效产生，并且与使用不在细胞表面上表达融合蛋白的微生物经口服给药的对照鼠相比，鼠显示了体重增加。另外，其显示了在肌细胞中对于肌生成抑制素信号转导方面的高抑制效果。

[0060] 此外，针对鸡肌生成抑制素的抗体滴度在使用本发明的在细胞表面上表达融合蛋白的微生物给药的肉鸡(broiler)中很高，所述融合蛋白含有与肌生成抑制素成熟蛋白融合的来自肌生成抑制素的肽多聚体融，并且与对照组相比肉鸡体重增加。

[0061] 在另一方面，本发明涉及在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的饲料添加剂，其含有通过上述方法制备并在细胞表面上表达融合蛋白的微生物作为有效成分，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋。

[0062] 在还一方面，本发明涉及在动物中促进肌肉生长或者改善体重增加的组合物，其含有通过相同方法制备并在细胞表面上表达融合蛋白的微生物作为有效成分，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白。

[0063] 在又一方面，本发明涉及预防或治疗退化性疾病或者肌肉损耗性疾病的药物组合物，其含有通过上述方法制备并在细胞表面上表达融合蛋白的微生物作为有效成分，所述融合蛋白含有与来自肌生成抑制素的肽多聚体融合的肌生成抑制素成熟蛋白。

[0064] 在再一方面，本发明涉及通过将所述饲料添加剂或者组合物给药到动物来增加动物中肌细胞的大小和数目的方法。在本发明中，所述给药优选口服给药。

[0065] 本发明的预防或治疗退化性疾病或者损耗性疾病的药物组合物是口服人用疫苗，并可被用于预防和治疗退化性疾病和肌肉损耗性疾病诸如肌肉营养失调和肌肉萎缩。

[0066] 本发明的药物组合物可口服给药、作为食物消化、皮下或腹膜注射，或者鼻腔给药到动物和人。

[0067] 利用本发明的肌生成抑制素融合蛋白的肌生成抑制素抗体的诱导以及通过诱导的抗体降低肌生成抑制素活性的方法在病原微生物中不引起与交叉抗性有关的问题，并且 TGF-α 家族的其他成员与肌生成抑制素之间的同源性在氨基酸水平为 30-40％的非常低的同源性，因此，其在体内不引起有关针对内源肌生成抑制素 (GDF-8) 的抗体的交叉反应性的问题。

[0068] 另外，不存在保留在从动物得到的肉中的外源给药的生长激素的可能性。此外，与诸如皮埃蒙特牛 (Piemontese) 和比利时蓝牛 (Belgian Blue) 牛品种有关的伦理问题（许多牛犊 (calve) 通过剖腹产 (Caesarean section) 出生并且其他器官的尺寸被减小）可通过直到出生后整个生长阶段的肌生成抑制素表达的降低调节 (down-regulating) 而完全解决。事实上，这些繁殖的双肌动物不需要分娩牛犊，因此饲养的用于肉类生产的这些动物不需要抗肌生成抑制素处理。

[0069] 本发明的药物组合物可根据常规方法制成各种制剂，例如口服制剂诸如粉末、颗粒、片剂、胶囊、悬浮剂、乳剂、糖浆和气雾剂，外用制剂，栓剂和无菌注射剂。本发明的组合物还可使用载体、赋形剂和稀释剂制成制剂，诸如乳糖，葡萄糖，蔗糖，山梨醇，甘露糖，木糖醇，赤藻糖醇，麦芽糖醇，淀粉，阿拉伯树胶 (gum acasia)，藻酸盐，白明胶，磷酸钙，硅酸钙，纤维素，甲基纤维素，微晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，水，甲基羟基苯甲酸，丙基羟基苯甲酸，胸腺活化调节因子 (tarc)，硬脂酸镁和矿物油。

[0070] 对于制备来说，药物组合物可使用稀释剂或者赋形剂诸如填料、膨胀剂、结合剂、湿润剂、崩解剂和表面活性剂制成制剂。用于口服给药的固体制剂的例子包括药片，丸剂，粉末，颗粒，胶囊等，并且固体制剂通过将至少一种赋形剂例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、白明胶等混合到药物组合物中制成制剂。除赋形剂之外，润滑剂诸如硬脂酸镁、胸腺活化调节因子等也可在本发明的组合物中使用。用于口服给药的液体制剂的例子包括悬浮剂、溶液、乳液、糖浆等，并且所述液体形式可含有稀释剂诸如水和液体石蜡，以及赋形剂诸如湿润、增甜剂、矫臭剂、防腐剂等。用于注射给药的制剂的例子包括灭菌注射液、非水溶液、悬浮液、乳液、冻干剂 (lyophilized preparation) 和栓剂。可注射酯诸如 ethylolate 和菜油诸如丙二醇和橄榄油可被用作非水溶液和悬浮液。栓剂可通过使用基质诸如半合成脂肪酸酯 (witepsol)、硬聚乙二醇 (macrogol)、Tween61、可可油、月桂油 (laurin oil)、甘油 - 白明胶等来制备。

[0071] 本发明的药物组合物的实际给药量可根据相关情形来确定，包括患者体重、治疗条件、患者症状的严重程度、给药时间段和所选途径、药物类型等等，但对于本领域技术人员来说，组合物可被正确给药。本发明的组合物可以单日剂量给药或者每日多剂量给药。合适的组合物剂量为 10 ～ 500mg/kg 每天，优选 50 ～ 300mg/kg 每天以达到所需效果。但是，上述剂量范围并不是想以以任何方式限制本发明的范围。

[0072] 本发明的药物组合物可经多种途径给药到哺乳动物，包括大鼠、小鼠、家畜、人类等。给药途径包括口服、直肠或静脉内、肌肉、皮下、子宫内膜、侧脑室 (intracerebroventicular) 给药途径。

[0073] 实施例

[0074] 此后，将通过实施例更详细地描述本发明。但是，应当理解，这些实施例仅仅用于解释的目的，而不解释为对本发明的范围的限制。

[0075] 特别是，在下列实施例中，虽然成熟形式的肌生成抑制素被用作用于融合蛋白的肌生成抑制素基因，但编码能够增强针对肌生成抑制素成熟蛋白的蛋白质的基因也可与其结合使用。

[0076] 此外，虽然在多聚-γ-谷氨酸合成中涉及的膜外蛋白基因中pgsBCA得自chungkookjang纳豆菌(Bacillus subtilis var.)(KCTC 0697BP)以便在下列实施例中使用，不管是使用得自所有产多聚-γ-谷氨酸的芽孢杆菌(Bacillus sp.)的pgsBCA基因制备的载体或者使用这些载体转化的微生物也落入本发明的范围之内。例如使用来自其他菌株的pgsBCA基因的疫苗载体的制备或者其使用也将落入本发明的范围之内，所述来自其他菌株的pgsBCA基因与在chungkookjang纳豆菌(Bacillus subtilis var.)中存在的pgsBCA基因的碱基序列至少具有80％同源性的。

[0077] 此外，虽然在下列实施例中仅仅使用pgsBCA基因中的pgsA基因制备表面表达载体，且分析了其实施例的结果，但是使用pgsBCA基因的全部或部分的疫苗载体的构建也落入本发明的范围之内。

[0078] 另外，在下列实施例中，仅仅乳酸菌(Lactobacillus)被用作用于表达载体的宿主，但对本领域技术人员来说显而易见的是，当通过本发明的方法转化除所述细菌之外的革兰氏阴性菌或者革兰氏阳性菌时也可得到相同的结果。

[0079] 同样在下列实施例中只用使用疫苗载体转化的微生物本身被应用到鼠、家禽和猪的情况。但是，鉴于动物饲料添加剂和疫苗相关技术领域的知识，应当理解的是，即便当从所述微生物中粗提的肌生成抑制素成熟蛋白或者从所述微生物纯化的表达蛋白被应用到动物时，也可得到相同的结果。

[0080] 实施例1：肌生成抑制素肽的抗原位点确定

[0081] 为了增强针对肌生成抑制素的免疫性的诱导，在预测的肌生成抑制素的3D结构的基础上确定肌生成抑制素的两个抗原位点(Myo-1和Myo-2)并肌生成抑制素成熟蛋白被纯化并经皮给药到肉用种鸡(broilerbreeder hen)。从免疫母鸡的蛋中孵化出小鸡，并比较小鸡之间的增强的生长速度。

[0082] 如图1所示，基于预测的肌生成抑制素成熟蛋白的3D结构，Myo-1(序列2)和Myo-2(序列1)被确定为肽上的抗原位点。在该实验中，三个实验组：纯化肌生成抑制素成熟蛋白给药组(mAV组)，Myo-1-给药组和Myo-2-给药组，以及对照组被使用，每组包括5只种禽(4雌1雄)。

[0083] 为了初步经皮给药，将1mg溶解的通过在大肠杆菌(E.coli)中表达的纯化鸡肌生成抑制素基因(序列4)得到的成熟肌生成抑制素蛋白，以及作为载体蛋白与完全弗式佐剂以1：1的混合比例混合的与KLH结合的合成肽Myo-1和Myo-2(Anygen,Korea)各1mg分别经皮给药到雌性种禽。三周后，将与不完全弗式佐剂以1：1的混合比混合的每种肽经皮给药到雌性种禽以便第二次经皮给药。再过三周后，以与第二次经皮给药相同的方式进行第三次经皮给药。将从由免疫的种鸡产的蛋孵化的小鸡饲养到28日龄，在每组中测定小鸡的体重增加。

[0084] 如上所述，作为分析饲养到当它们准备上市的时间的28日龄的鸡的体重增加的

结果，如图 2 所示，在纯化的肌生成抑制素成熟蛋白给药组 (mAV 组) 中，与对照组相比鸡显示体重增加了 10％ (体重增加，bodyweight gain)，使用 Myo-2 肽给药组的鸡显示体重增加了 13％，其增加最高，与对照组相比使用 Myo-1 肽给药组的鸡没有显示体重增加。因此认为，将纯化的肌生成抑制素成熟蛋白和 Myo-2 肽给药到种禽亲本鸡在后代由于母亲的抗体传递而诱导了较高的体重增加。

[0085] 实施例 2 :4Myo-2 肽多聚体 (4xMyo-2) 和表面表达载体 (pHCE2LB : pgsA-4xMyo-2-CMyom) 的构建

[0086] 其重复数是 4 的倍数的多聚体使用来自肌生成抑制素的肽和肌生成抑制素成熟蛋白 (4xMyo-2) 给药的种禽母鸡所产的蛋孵化的鸡中显示最高体重增加的鸡中编码 Myo-2 肽的基因构建，并将其 C 末端与编码鸡肌生成抑制素成熟蛋白 (CMyom) 的基因融合，由此构建了表面表达载体 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom。

[0087] 为了合成用于构建 4Myo-2 肽多聚体的亚单位，将具有核苷酸序列序列 5 和序列 6 的引物稀释至浓度分别为 10pM/μL，等体积混合，并在 37℃下反应 1 小时，接着如图 3 所示使用 BamHI 和 KpnI 在双侧消化形成 Myo-2 亚单位，由此通过将 Myo-2 亚单位插入到 pRSET(A)(Invitrogen，USA) 载体的 BamHI 和 KpnI 限制酶位点以构建 pRSET(A) :Myo-2。

[0088] 序列 5 :5′ -gatccgtttttcttcaaaagtatccacatacacatcttgttcatcaagctggtggttc aagatct ggtac-3′

[0089] 序列 6 :5′ -cagatcttgaaccaccagcttgatgaacaagatgtgtatgtggatactttgaagaaa a acg-3′

[0090] 使用克隆到 pCRT7/NT-TOPO(Invitrogen，USA) 中的 1.3kb 的鸡肌生成抑制素基因作为模板和具有序列 7 和序列 8 的核苷酸序列的引物进行 PCR 反应以扩增编码鸡肌生成抑制素成熟蛋白的基因。将使用限制酶 BglII 和 KpnI 切割的扩增片段插入到 pRSET(A) : Myo-2 载体的 BglII 和 KpnI 限制位点，由此构建 pRSET(A) :Myo-2-CMyom 载体。

[0091] 序列 7 :5′ -agatctgtcgacgaggtcagagttacagac-3′

[0092] 序列 8 :5′ -ggtacctctagattattagtcgactcatgagcacccgcaacg-3′

[0093] 使用 T4 连接酶将通过使用 BglII 和 KpnI 限制酶消化所述 pRSET(A) :Myo-2-CMyom 载体得到的 DNA 片段与通过使用 BglII 和 KpnI 限制酶消化 pRSET(A) :Myo-2-CMyom 得到的载体连接，由此构建含有编码两个亚单位 Myo-2 肽的基因的重复的载体 pRSET(A) : 2xMyo-2-CMyom。

[0094] 使用上面所述的相同方法，通过将 2XMyo-2-CMyom 重复插入到 pRSET(A) : 2xMyo-2-CMyom 的 BglII 和 KpnI 的限制位点构建 pRSET(A) :4xMyo-2-CMyom。

[0095] 来自芽孢杆菌 (Bacillus sp.) 的在多聚 - γ - 谷氨酸合成中涉及的膜外蛋白基因 pgsBCA 中，利用 pgsA 基因构建了能够表面表达编码目标蛋白的基因及肌生成抑制素成熟蛋白的 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom(图 4a) 和 pHCE2LB :pgsA-CMyom(图 4b)，所述目标蛋白以革兰氏阴性和革兰氏阳性微生物为宿主，融合了鸡肌生成抑制素 4xMyo-2 和肌生成抑制素成熟蛋白。

[0096] 将通过使用限制酶 BamHI 和 KpnI 消化构建的 pRSET(A) :4xMyo-2-CMyom 得到的 4xMyo-2-CMyom 以及通过使用被克隆到 pCRT7/NT-TOPO(Invitrogen，USA) 中的鸡肌生成抑制素基因进行 PCR 得到的 CMyom 片段，按照译码密码子连接到在 pHCE2LB :pgsA 的

多聚 -γ- 谷氨酸合成中涉及的膜外蛋白基因 pgsA 的 C- 末端，pHCE2LB :pgsA 是分别使用 BamHI 和 XbaI 限制位点切除了表面表达载体 pHCE2LB :pgsA-HPVL1（使用 pHCE2LB : pgsA-HPVL1 转化的 KCTC10349BP :E. coli）的 HPVL1 片段而得。

[0097] 实施例 3 :pgsA :4xMyo-2-CMyom 和 pgsA :CMyom 的细胞表面表达

[0098] 检查了其中含有被融合到成熟蛋白的 4xMyo-2 肽多聚体的融合蛋白与 pgsA 融合的融合蛋白和与 pgsA(pgsA :CMyom) 融合的成熟蛋白是否在使用含有编码肌生成抑制素融合蛋白的基因的表面表达载体 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化的乳酸菌和使用在实施例 2 中构建的含有编码肌生成抑制素成熟蛋白的基因的表面表达载体 pHCE2LB : pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化的乳酸菌中表达。

[0099] 为了表达分别与在多聚 -γ- 谷氨酸合成中涉及的 pgsA 基因的 C- 末端融合的 4xMyo-2-CMyom 蛋白和 CMyom 蛋白，将使用 pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 转化的干酪乳杆菌 (Lactobacilluscasei) 菌株和使用 pHCE2LB :pgsA-CMyom 转化的干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 菌株在 MRS 培养基 (Lactobacillus MRS，BectonDickinson and Company Sparks，USA) 中 30℃下静止培养，由此诱导表面表达。融合蛋白表达使用培养的细胞通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳和使用 pgsA 专一性抗体的免疫印迹确认。

[0100] 特别是，将表达诱导的干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 菌株的整个细胞与以相同的细胞浓度制备的蛋白质变性以便制备样品。将样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，并转移到 PVDF（聚偏二氟乙烯，polyvinylidene-difluoride) 膜 (Bio-Rad) 上。将蛋白质片断已经被转移到其上的 PVDF 膜通过在封闭缓冲液 (50mM Tris HCl，5％脱脂奶，pH 8.0) 中摇动 1 小时封闭，然后，与 1000 倍稀释的来自兔的多克隆抗 -pgsA 初级抗体在封闭缓冲液中反应 1 小时。反应完全后，使用缓冲液对膜进行洗涤并在封闭缓冲液中使用一万倍稀释的 HRP 结合的抗兔次级抗体反应 1 小时。反应完全后，使用缓冲液对膜进行洗涤。通过加入底物 (lumigenPS-3acridan，H_2O_2) 将洗涤的膜进行显色步骤，由此使用 CCD 相机确认融合蛋白与 pgsA 专一性抗体之间的专一性结合（图 5）。

[0101] 在图 5 中，对照、CMyom 和 4xMyo-2-CMyom 分别表示没有被转化的干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei)、干酪乳杆菌 /pHCE2LB :pgsA-CMyom 和干酪乳杆菌 /pHCE2LB : pgsA-4xMyo-2-CMyom。如图 5 所示，确认专一性融合蛋白 pgsA-CMyom(about 55.5kDa) 和专一性融合蛋白 pgsA-4xMyo-2-CMyom(about 66.9kDa) 在每个乳酸菌的全细胞中存在。结果表明，大约 55.5kDa 和大约 66.9kDa 的带是 pgsA-CMyom 融合蛋白和 pgsA-4xMyo-2-CMyom 融合蛋白，因为 pgsA 具有大约 42kDa 的大小，CMyom 蛋白具有大约 13.5kDa 的大小，并且 4xMyo-2-CMyom 蛋白具有 24.9kDa 的大小。

[0102] 实施例 4 :由在小鼠的细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 的乳酸菌的免疫应答的诱导以及由此产生的体重变化

[0103] 将具有使用实施例 3 中描述的相同方法在其表面上表达融合蛋白的干酪乳杆菌对小鼠口服给药，以检查由在干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 的表面上表达的 pgsA-4Myo-2-CMyom 融合蛋白和 pgsA-CMyom 融合蛋白诱导的免疫应答和体重变化。

[0104] 特别是，在将干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei)/pHCE2LB :pgsA-CMyom 和干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei)/pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 培养以收集细胞之后，使用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 将收集的细胞洗涤，并且将在细胞表面上具有表达抗原乳酸菌口

服给药到 6 周龄 C57BL/6 小鼠。此时，在实验中使用两个实验组（10 只小鼠 / 组）：第一组使用在其表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌处理，第二组使用在其表面上表达 CMyom 蛋白的乳酸菌处理。并且以一天为间隔将它们口服给药到每组 5 次，一周之后，以一天为间隔使用单剂量的在其表面上表达抗原的乳酸菌（$5x10^9$ 个细胞）口服给药五次。并且以其中仅仅培养乳酸菌的培养液对对照组 C57BL/6 小鼠以相同的时间表给药。

[0105] 在初始口服给药 3 周后，收集小鼠血清并通过 ELISA 测定血清中针对 4xMyo-2-CMyom 的 IgG 抗体滴度。图 6a 显示了小鼠血清中针对 4xMyo-2-CMyom 的 IgG 抗体滴度，(A) 是使用在其表面上表达 4xMyo-2-CMyom 的乳酸菌给药的组，试验组 (B) 使用在其表面上表达 CMyom 的乳酸菌给药，并且对照组 (C) 普通干酪乳杆菌 (Lactobacilluscasei) 给药。

[0106] 将纯化的 4xMyo-2-Myom 融合蛋白抗原以 0.1M 碳酸氢盐缓冲液 ($NaHCO_3$，pH 9.6) 稀释至 100ng/100μL 的浓度，加入到 ELISA 板中 (100μL/well) 并在 4℃下反应过夜。然后使用 300μL/ml PBS-T(PBS+0.05% Tween 20) 将板洗涤三次，并将 300μL 5%脱脂奶加入到每个孔中，然后在室温下反应 3 小时。在以上面描述的相同方式将板洗涤三次之后，将标准品及第一抗体在 5%脱脂奶中稀释至 1 ： 10 到 1 ： 6400 的范围，并将 100μL 稀释液加入到每个孔中，然后在室温下反应 3 小时。以上面描述的相同方式将孔洗涤五次，并将结合体 (conjugate，次级抗体）在 5%脱脂奶中以 1 ： 5000 稀释，然后在室温下反应 1 小时。然后，以上面描述的相同方式将孔洗涤五次，并与颜色形成试剂 TMB 反应 30 分钟，以 50μL 终止液终止颜色形成，然后通过 ELISA 阅读仪在 450nm 处进行测定，由此检查针对 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的抗体产生。

[0107] 如图 6a 所示，可以确定的是，使用在其细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 的干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 给药的 C57BL/6 小鼠的血清中，与对照组相比针对 4xMyo-2-CMyom 的 IgG 抗体滴度明显更高。因此认为，根据本发明的在细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的微生物可有效地产生针对 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的抗体。

[0108] 另外，在初始口服给药后，每周测定一次 C57BL/6 小鼠的体重，比较和分析各组之间的体重差别。结果，如图 6b 所示，从给药之后大约 4 周开始，在使用在细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 的乳酸菌给药的组中 C57BL/6 小鼠的体重明显高于使用表达 CMyom 的乳酸菌给药的组和对照组的体重，并且随着时间的流逝，在组之间观察到体重的明显差别。增强的体重增加现象是因为本发明的在干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 表面上表达的 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的抗体起到了具有上述效果的作用。

[0109] 实施例 5：由在其表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌诱导的抗体在小鼠肌肉中的信号转导抑制效果

[0110] 在其表面表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌和在其表面表达 CMyom 蛋白的乳酸菌使用实施例 4 中描述的相同方法口服给药到小鼠之后，为了检查在小鼠细胞中的信号转导抑制效果，在小鼠中诱导的抗体在 A-204 细胞中中和肌生成抑制素的能力以各种浓度被测定。

[0111] 具体地，将 A-204 细胞以 $1x10^5$ 个细胞 / 孔的密度分散到 96- 孔板中，在 CO_2 培养箱中培养 24 小时，并将 0.2μg 的 pGL(CAGA)12DNA 和 0.5μg 的 lipofectamine 2000 转染试剂 (lipofectamine 2000，Invitrogen，USA) 分别在 50μg 的 Opti-MEM 中稀释，5 分钟之后，

将两个管中的培养基混合并静置 20 分钟。此后，将含有 pGL(CAGA)12DNA 和 lipofectamine 2000 的 100μL 混合物分散到含有 A-204 细胞的 96 孔板的每个孔中，并在 4 ～ 6 小时之后，将 96 孔板中的培养基弃去并替换成新鲜的 DMEM。24 小时之后，在 5% CO_2 培养箱中将细胞在无血清培养基中 37℃下培养 6 小时。以各种浓度稀释的 10ng/ml 肌生成抑制素 (mGDF-8，R&D 系统）和针对肌生成抑制素蛋白的鼠抗体在冰上反应 1 小时，并分散到 96 孔板的每个孔中培养 6 小时。使用荧光素酶测定系统 (Promega,USA) 测定上清液以测定通过在与抗体反应之后剩余的未反应肌生成抑制素蛋白的信号转导诱导的 A-204 细胞中的荧光素酶活性，由此测定抗体中和 A-204 细胞中肌生成抑制素的能力。

[0112] 图 7 显示了通过测定荧光素酶活性检测的肌细胞中小鼠血清肌生成抑制素信号转导抑制效果。A 是使用在细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌给药组，B 是使用在细胞表面上表达 CMyom 蛋白的乳酸菌给药组，C 是使用普通乳酸菌给药的对照组。结果，使用在细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的给药组诱导了最高水平的抗体，表明 4xMyo-2-CMyom 给药组在肌细胞中肌生成抑制素的抑制方面具有非常显著的效果。

[0113] 实施例 6 :由在肉禽的细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌的免疫应答的诱导以及由此产生的体重变化

[0114] 使用干酪乳杆菌 /pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom，检查了在种禽鸡中针对 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的免疫应答的诱导和体重变化。

[0115] 使用与干酪乳杆菌 /pHCE2LB :pgsA-4xMyo-2-CMyom 混合的用于 Cobb 种禽鸡的配套饲料 (assorted feed) 进行实验。具体地，培养转化的乳酸菌并收获，然后使用缓冲液 (PBS，pH 7.4) 洗涤以便冻干，由此与配套饲料混合以便用于实验。

[0116] 将包括 72 只 Cobb 雌性种禽鸡的实验组和包括 72 只 Cobb 雌性种禽鸡的对照组用于实验，并将它们饲养 6 周。将实验组使用混合有 0.2％的在细胞表面上表达 4xMyo-2-CMyom 的乳酸菌冻干粉 ($8.1x10^5$ 个细胞 /g) 的配套饲料饲养 1、2 和 3 周，并在 4、5 和 6 周单独使用配套饲料饲养。将对照组从 1 到 6 周仅仅使用配套饲料饲养。

[0117] 在开始实验 6 之后，取实验组和对照组的鸡血清，并通过 ELISA 测定鸡血清中肌生成抑制素成熟蛋白的 IgG 抗体滴度。

[0118] 结果，如图 8 所示，可以确认使用与在其表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌冻干粉混合的配套饲料喂养的实验组的抗体滴度高于仅仅使用配套饲料饲养的对照组的抗体滴度。因此，可以看出，肌生成抑制素成熟蛋白的抗体滴度在鸡中通过在其表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌有效地产生。

[0119] 另外，每周测定在其表面上表达 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的乳酸菌喂养的实验组中的鸡和使用普通乳酸菌饲养的对照组的鸡的体重，分析两组之间鸡体重的差别。

[0120] 结果，如图 9a 所示，在显示对照组与实验组之间的体重差别的图形中，观察到两组之间的体重差别每周都增加。另外，作为在 6 周后比较并分析实验组和对照组中小鼠的平均体重的结果，如图 9b 所示，在实验组中，与对照组相比平均体重增加了 6.6％。增强的体重增加现象是因为本发明的针对干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei) 的表面上表达的 4xMyo-2-CMyom 融合蛋白的抗体起到了具有上述效果的作用。

[0121] 另外，实验组和对照组的饲料效率被测定并以显示饲料摄入 / 体重的图形表示。结果，如图 10 所示，在实验组中，与对照组相比饲料效率增加了 7.4％。

[0122] 工业实用性

[0123] 如上面详细描述的那样，根据本发明的饲料添加剂或者药物组合物可被用于家畜和家禽肌肉发育和肌肉生长调节，以及用于预防或治疗肌肉损耗性疾病和退化性疾病诸如肌肉营养障碍、肌肉萎缩等。另外，转化菌株显示了相同效果，即便在菌株培养后起本身被直接使用，因此是非常经济的。

[0124] 虽然已经参照特别说明的实施方式对本发明进行了详细描述，但本发明不由这些实施方式限定，而是仅由随附的权利要求书限定。对本领域技术人员来说应当理解的是可对这些实施方式进行改变或修改，都不偏离本发明的范围和精神。

FP10KR993.ST25
序列表
<110> 生物领先公司
韩国生命工学研究院
忠南国立大学产学协力团

<120> 用于 Myo-2 肽多聚体和肌生成抑制素的融合蛋白表面表达载体以及由其转化的微生物

<130>FP10KR993

<140>PCT/KR2007/006147
<141>2007-11-30

<160>8

<170>PatentIn version 3.2

<210>1
<211>15
<212>PRT
<213>Artificial

<220>
<223>Myo-2 peptide

<400>1

Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
1 5 10 15

<210>2
<211>24
<212>PRT
<213>Artificial

<220>
<223>Myo-1 peptide

<400>2

Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile
1 5 10 15
Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
20

<210>3
<211>122
<212>PRT
<213>Gallus sp.

<400>3

Glu Val Arg Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly
1 5 10 15
Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
20 25 30
Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
35 40 45
Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe
50 55 60
Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg
65 70 75 80
Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
85 90 95
Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
100 105 110
Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
115 120

<210>4
<211>1128
<212>DNA
<213>Gallus sp.

<400>4
atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgcagatcgc ggttgatccg 60

gtggctctgg atggcagtag tcagcccaca gagaacgctg aaaaagacgg actgtgcaat 120
gcttgtacgt ggagacagaa tacaaaatcc tccagaatag aagccataaa aattcaaatc 180
ctcagcaaac tgcgcctgga acaagcacct aacattagca gggacgttat taagcagctt 240
ttacccaaag ctcctccact gcaggaactg attgatcagt atgatgtcca gagggacgac 300
agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caaccgagac gattatcaca 360
atgcctacgg agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aaccaaaatg ttgcttcttt 420
aagtttagct ctaaaataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattatg gatatacttg 480
aggcaagtcc aaaaacctac aacggtgttt gtgcagatcc tgagactcat taagcccatg 540
aaagacggta caagatatac tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa cccaggcact 600
ggtatctggc agagtattga tgtgaagaca gtgctgcaaa attggctcaa acagcctgaa 660
tccaatttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagactg gacgagatct tgctgtcaca 720
ttcccaggac cgggtgaaga tggattgaac ccatttttag aggtcagagt tacagacaca 780
ccgaaacggt cccgcagaga ttttggcctt gactgtgatg agcactcaac ggaatcccga 840
tgttgtcgct acccgctgac agtggatttc gaagcttttg gatgggactg gattatagca 900
cctaaaagat acaaagccaa ttactgctcc ggagaatgcg aatttgtgtt tctacagaaa 960
tacccgcaca ctcacctggt acaccaagca aatcccagag gctcagcagg cccttgctgc 1020
acacccacca agatgtcccc tataaacatg ctgtatttca atggaaaaga acaaataata 1080
tatggaaaga taccagccat ggttgtagat cgttgcgggt gctcatga 1128

<210>5
<211>70
<212>DNA
<213>Artificial

<220>
<223>primer

<400>5
gatccgtttt tcttcaaaag tatccacata cacatcttgt tcatcaagct ggtggttcaa 60
gatctggtac 70

<210>6
<211>62
<212>DNA
<213>Artificial

<220>
<223>primer

<400>6
cagatcttga accaccagct tgatgaacaa gatgtgtatg tggatacttt tgaagaaaaa 60
cg 62

<210>7
<211>30
<212>DNA
<213>Artificial

<220>
<223>primer

<400>7
agatctgtcg acgaggtcag agttacagac 30

<210>8
<211>42
<212>DNA
<213>Artificial

<220>
<223>primer

<400>8
ggtacctcta gattattagt cgactcatga gcacccgcaa cg 42

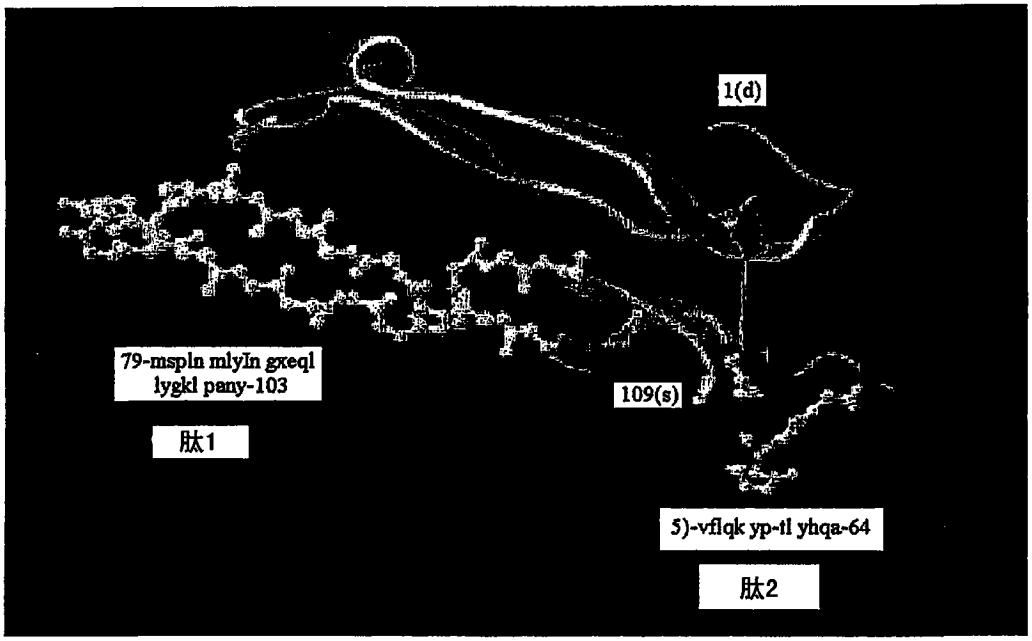
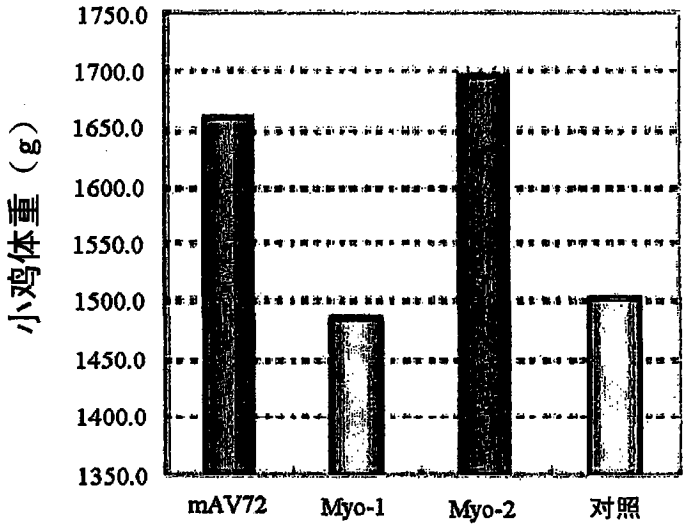


图 1



	mAV72	Myo-1	Myo-2	对照
平均	1659.71	1486.44	1695.46	1502.51

图 2

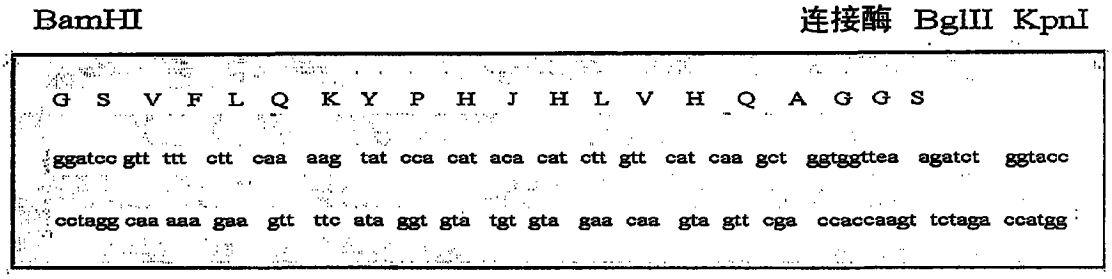

BamHI
连接酶 BglII KpnI
G S V F L Q K Y P H J H L V H Q A G G S
ggatcc gtt ttt ctt caa aag tat cca cat aca cat ctt gtt cat caa gct ggtggttca agatct ggtacc
cctagg caa aaa gaa gtt ttc ata ggt gta tgt gta gaa caa gta gtt cga ccaccaagt tctaga ccatgg

图 3

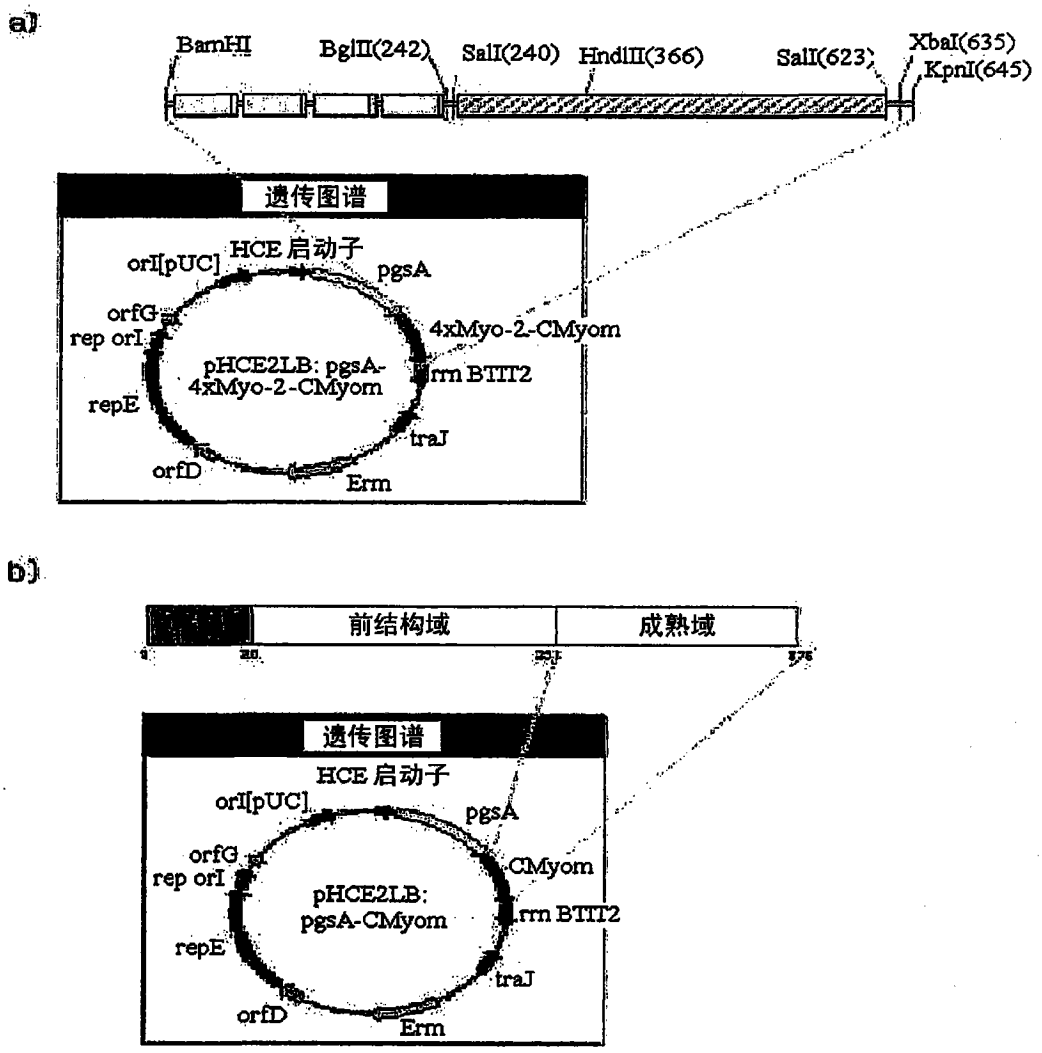

a)
BamHI
BglII(242)
SalI(240)
HindIII(366)
SalI(623)
XbaI(635)
KpnI(645)
遗传图谱
HCE 启动子
oriI[pUC]
pgsA
orfG
rep oriI
4xMyo-2-CMyom
pHCE2LB: pgsA-4xMyo-2-CMyom
rrn BTIT2
repE
traJ
orfD
Erm
b)
前结构域
成熟域
遗传图谱
HCE 启动子
oriI[pUC]
pgsA
orfG
rep oriI
CMyom
pHCE2LB: pgsA-CMyom
rrn BTIT2
repE
traJ
orfD
Erm

图 4

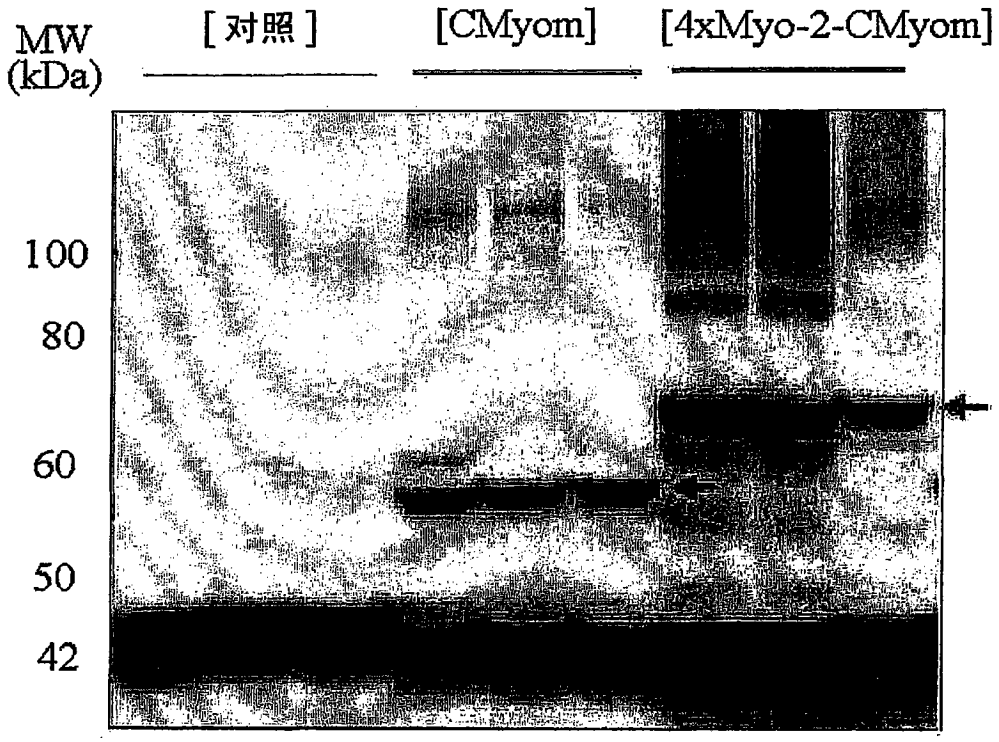

MW
(kDa)
[对照]
[CMyom]
[4xMyo-2-CMyom]
100
80
60
50
42

图 5

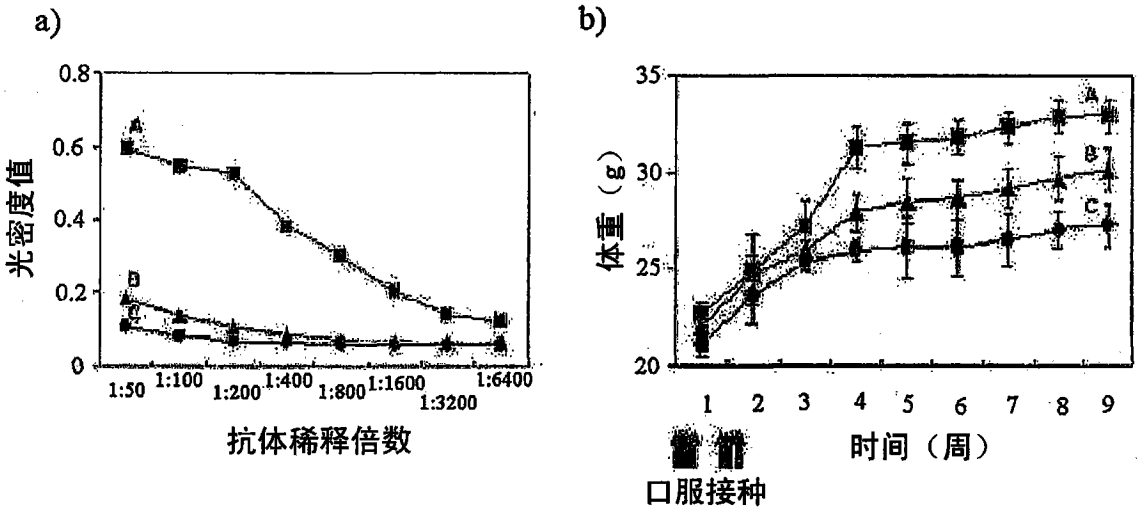

a)
光密度值
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
1:6400
抗体稀释倍数
b)
体重（g）
35
30
25
20
1
2
3
4
5
6
7
8
9
时间（周）
口服接种

图 6

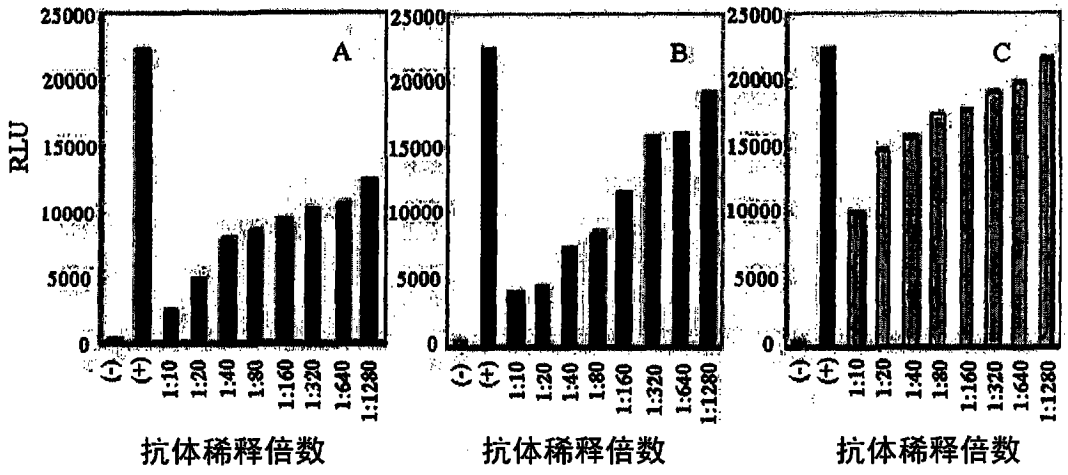

A
B
C
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
(-)
(+)
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
1:640
1:1280
抗体稀释倍数
抗体稀释倍数
抗体稀释倍数

图 7

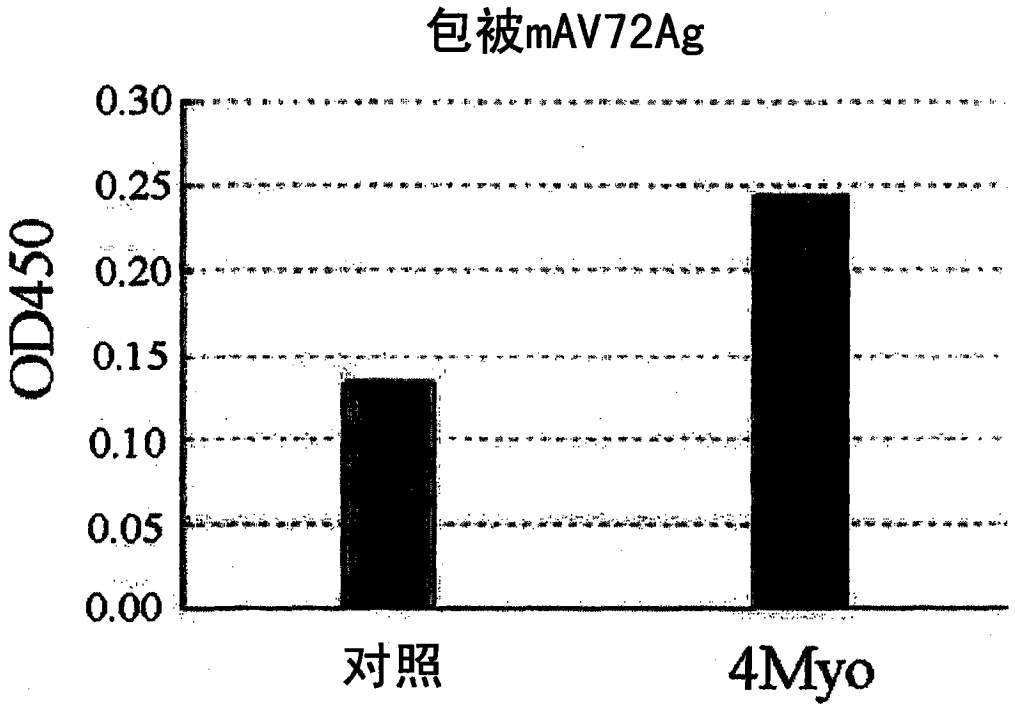

包被mAV72Ag
OD450
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
对照
4Myo

图 8

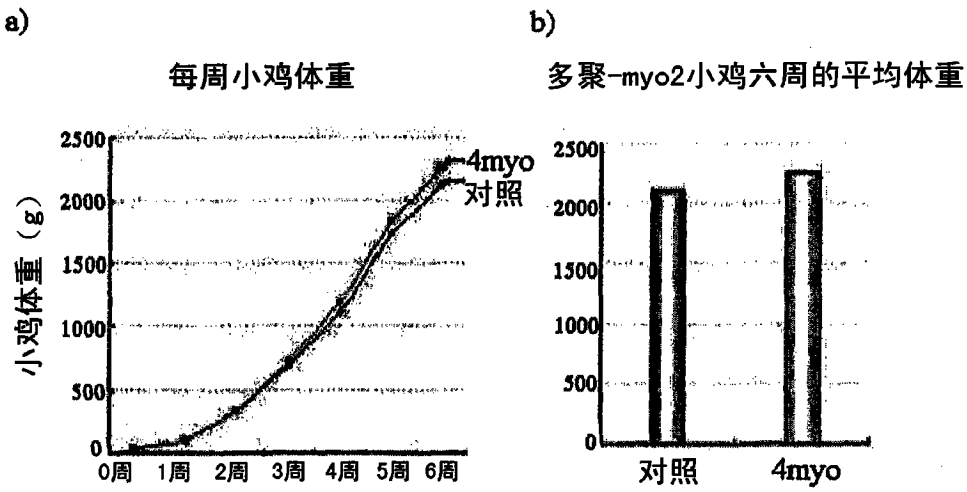

a)
每周小鸡体重
小鸡体重（g）
2500
2000
1500
1000
500
0
0周 1周 2周 3周 4周 5周 6周
4myo
对照
b)
多聚-myo2小鸡六周的平均体重
2500
2000
1500
1000
500
0
对照
4myo

图 9

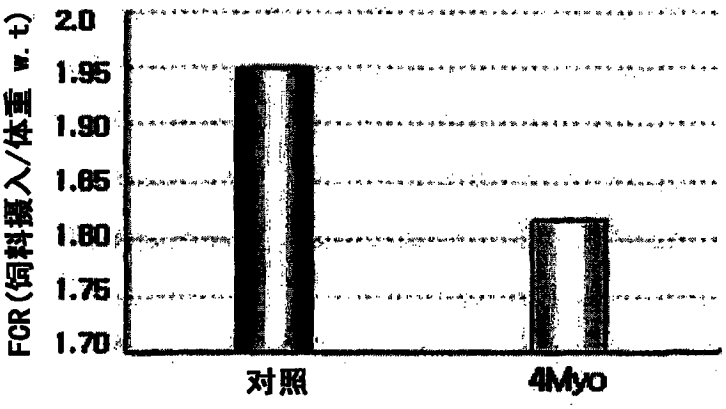

FCR(饲料摄入/体重 w.t)
2.0
1.95
1.90
1.85
1.80
1.75
1.70
对照
4Myo

图 10