

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 96113489

C12N 15/31 (2006.01)

※申請日期： 96.4.17

※IPC 分類：

C12N 1/20 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

重組之減毒梭狀芽胞桿菌及疫苗

RECOMBINANT ATTENUATED CLOSTRIDIUM ORGANISMS AND
VACCINE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商先靈葆雅有限公司

SCHERING-PLOUGH LTD.

代表人：(中文/英文)

艾德華 H 梅哲

MAZER, EDWARD H.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士盧森納市威街20號

WEYSTRASSE 20, P.O. BOX, CH-6000 LUCERNE 6, SWITZERLAND

國籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 馬克 D 庫容朗
COCHRAN, MARK D.
2. 葛瑞 彼得森
PETERSEN, GARY
3. 史蒂芬 V 賴爾
LAIR, STEVEN V.
4. 理查 辛尼克
SYNENKI, RICHARD

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 美國 U.S.A.
4. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年04月17日；60/792,553

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

1. 食品工業發展研究所；中華民國96年7月17日；BCRC 910358

2. 食品工業發展研究所；中華民國96年7月17日；BCRC 910359

國外生物材料 【格式請依：寄存國家；機構；日期；號碼 順序註記】

1. 美國；American Type Culture Collection (ATCC)；2006年02月07日；PTA-7364

2. 美國；American Type Culture Collection (ATCC)；2006年02月07日；PTA-7365

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於減毒梭狀芽孢桿菌(*Clostridium*)生物體、製備及使用該等之方法、及突變蛋白 α -毒素和編碼其之核酸。

【先前技術】

厭氧細菌病原體係農業生產之嚴重的經濟負擔。梭狀芽孢桿菌家族細菌代表一特殊的負擔，乃因此等細菌可致使家禽及其他有經濟價值的家畜患嚴重疾病。控制此等生物體之先前努力依賴於衛生處理及在動物飼料中投與抗生素。

特定言之，產氣莢膜梭狀芽孢桿菌("*C. perfringens*")係一種發現於土壤、衰變有機物質中之厭氧細菌，且係人類及動物之腸道菌叢的一部分。將產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之不同菌株標識為生物型A至生物型E，視所產生毒素之光譜而定 [Justin等人，*Biochemistry* 41, 6253-6262 (2002); McDonel (1986) PHARMACOLOGY OF BACTERIAL-TOXINS; F Dorner及J Drews (編輯) Pergamon Press, Oxford]。生物型A菌株作為各類別壞疽及腸道疾病之病原具有特別重要性。一種由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌引起的特別嚴重的腸道疾病係壞疽性腸炎(業內亦稱作"壞死性腸炎")，一種可導致人類及飼養動物二者患壞死病、敗血症、及溶血病之腸壞疽[參見，Pearson等人，*J. Am. Vet. Med.* 188 (11):1309-10 (1986); Al-Sheikhy及Truscott, *Avian*

Dis. 21 (2):256-63 (1977)]。對於禽類，例如，雞(紅原雞 (*Gallus gallus*))而言，壞疽性腸炎係一個非常嚴重的問題。A型或C型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌可引起重大的損失，尤其在肉用仔雞生產中[Ficken及Wages, *Necrotic Enteritis*, In *Diseases of Poultry*, 第10版, 第261-264頁 (1997)]。除與壞死性腸炎暴發相關之損失外，據報導，產氣莢膜梭狀芽孢桿菌相關性疾病亦會損害畜群之生產能力[Lovl及Kaldhusdal, *Avian Pathology* 30:73-81 (2001)]。如上所述，在動物飼料中加入抗菌劑係最常見的控制方法。然而，抗菌劑(例如，抗生素)成本較高且人們對細菌抗性提高之擔心日盛。

近來，人們已試圖提供可抵抗有害梭狀芽孢桿菌菌種之疫苗。舉例而言，Lovland等人[*Avian Pathology* 33(1): 83-92 (2004)]證實候選疫苗係基於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型及C型類毒素及氫氧化鋁佐劑。據報導，對母雞實施接種可產生特異性抗體以保護子代免受由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌亞臨床挑戰引起的腸道損傷。自去毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌毒素製備的基於其他類毒素之疫苗已為人們所知[參見，例如，美國專利第4,292,307號，該案闡述如下之類毒素：A型、B型及D型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌、水腫梭菌 (*Cl. Oedematiens*)、及敗毒梭菌 (*Cl. Septicum*)]。

亦建議使用重組類毒素製劑。舉例而言，Titball等人[美國專利第5,851,827號、第6,403,094號、及第5,817,317號]報導編碼抗原性產氣莢膜梭狀芽孢桿菌肽之核酸、以及該

等肽自身、及自該等肽製備之疫苗。例如，闡述了具有天然產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之胺基酸殘基261至300，但缺少天然毒素之鞘磷脂水解酶(hydrolyzins)功能域及磷脂酶C的肽。亦報導了此等肽可誘導抵抗該天然毒素之免疫保護。另外，美國專利第6,610,300號闡述了基於突變蛋白產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 β -毒素之抗原性片段的疫苗。

然而，無論類毒素疫苗係源自天然生物體抑或以重組方式獲得，製備及向有免疫接種需要之動物投與類毒素蛋白均被視為沉重的經濟負擔，特殊環境下(例如，治療可能對整個有機體疫苗之其他組份過敏或敏感的人)除外。而且，基於蛋白質/類毒素之疫苗通常需要重複加強疫苗以維持完全效能。

另一建議解決方案係改造可產生代替野生型毒素之突變蛋白 α -毒素的抗原活性病毒。舉例而言，Bennett等人 [*Viral Immunol.* 12(2):97-105 (1999)]已闡明表現產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之無毒性C功能域的重組牛痘病毒載體。遺憾的是，儘管在過去20年裏建議使用若干重組牛痘疫苗，但對安全性(活的感染性牛痘病毒會釋放至其中該感染性牛痘病毒可傳播給彼等對此病毒無抗性之人的環境中)的擔心仍長期存在。

已知產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之 α -毒素(*plc*基因)具有若干生物活性，包括溶血活性、磷脂酶C活性、鞘磷脂酶活性、磷酸二酯酶活性、及致死活性。在此項技術中，有許多關於可降低毒性之此 α -毒素變突的報導。Schoepe等人

[*Infect. and Immun.* 69(11): 7194-7196 (2001)]闡述一種可產生無毒性 α -毒素之自然產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株。然而，修飾此菌株以產生抵抗除毒性野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌種外之其他變異體的免疫保護將比較困難。

Williamson及Titball [*Vaccine* 11(12):1253-1258 (1993)]證實該毒素自胺基酸殘基247至胺基酸殘基370之單獨區域足以針對由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌在實驗上所產生氣性壞疽來免疫接種小鼠。Alape-Girón等人 [*Eur. J. Biochem.* 267:5191-5197 (2000)]已經報導取代Asp269、Asp336、Tyr275、Tyr307、及Tyr331可減少 α -毒素毒性。Nagahama等人 [*Infect. and Immun.* 65:3489-3492 (1997)]報導替換Asp-56、Asp-130、或Glu-152可減少 α -毒素毒性。Nagahama等人 [*J. Bacteriology* 177:1179-1185 (1995)]報導在產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素中使用中性胺基酸(例如，甘胺酸)取代68位處之組胺酸可導致該突變蛋白 α -毒素之溶血活性、磷脂酶C活性、鞘磷脂酶活性以及致死活性之完全喪失。據信，此單一胺基酸變化可滅活該蛋白質之3個鋅結合功能域中的一個。然後，將藉由取代His68所滅活的鋅結合功能域表示為Zn₂ [Justin等人，*Biochemistry* 41:6253-6262 (2002)]。

儘管有上述說明，但此項技術中仍需要一種可廣泛地保護飼養家畜(包括禽類，例如，雞)免受梭狀芽孢桿菌菌種(包括產氣莢膜梭狀芽孢桿菌)感染之安全、經濟且有效的方法。

不應將本文任一參考文獻之引用詮釋為認可此參考文獻係作為本申請案之"先前技術"使用。

【發明內容】

為了克服此項技術中上述缺點，本發明提供編碼產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白的核酸分子。在一個這種實施例中，該核酸分子編碼包含減去至少18個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列的突變蛋白 α -毒素，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在另一實施例中，該核酸分子編碼包含減去至少12個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列的突變蛋白 α -毒素，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在又一實施例中，該核酸分子編碼包含減去至少9個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列的突變蛋白，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在再一實施例中，該核酸分子編碼包含減去至少6個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列的突變蛋白，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在又一實施例中，該核酸分子編碼包含減去至少3個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列的突變蛋白，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。

在一個實施例中，本發明之核酸分子編碼其中自SEQ ID NO: 3胺基酸序列缺失不大於48個連續胺基酸殘基之突變蛋白。在另一實施例中，核酸分子編碼其中自SEQ ID NO: 3胺基酸序列缺失不大於36個連續胺基酸殘基之突變蛋白。在再一實施例中，核酸分子編碼突其中自SEQ ID NO:

3胺基酸序列缺失不大於24個連續胺基酸殘基之突變蛋白。在又一實施例中，本發明之核酸分子編碼突其中自SEQ ID NO: 3胺基酸序列缺失不大於18個連續胺基酸殘基之突變蛋白。

在一特定實施例中，本發明提供編碼其中自SEQ ID NO: 3胺基酸序列缺失9個連續胺基酸殘基(其中一個係His₆₈)之突變蛋白的核酸分子。在一此類別之特定實施例中，該核酸分子編碼其中所缺失9個連續胺基酸殘基係介於SEQ ID NO: 3之Tyr₆₂至Trp₇₀之間的突變蛋白。在一更具體實施例中，該核酸分子編碼其中此等缺失9個連續胺基酸殘基係藉由單一白胺酸殘基替換之突變蛋白。

在另一實施例中，該核酸分子包含SEQ ID NO: 2之核苷酸序列，其中核苷酸268-294缺失。在此類別之特定實施例中，SEQ ID NO: 2核苷酸序列之核苷酸268-294藉由編碼單一白胺酸殘基之3個核苷酸替換。

本發明亦提供產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白。在一個這種實施例中，該突變蛋白 α -毒素包含減去至少18個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在另一實施例中，該突變蛋白包含減去至少12個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在又一實施例中，該突變蛋白包含減去至少9個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在再一實施例中，該突變蛋白包

含減去至少6個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。在又一實施例中，該突變蛋白包含減去至少3個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3胺基酸序列，其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。

在一個實施例中，本發明之突變蛋白包含不大於48個自SEQ ID NO:3胺基酸序列缺失的連續胺基酸殘基。在另一實施例中，該突變蛋白包含不大於36個自SEQ ID NO:3胺基酸序列缺失的連續胺基酸殘基。在再一實施例中，該突變蛋白包含不大於24個自SEQ ID NO:3胺基酸序列缺失的連續胺基酸殘基。在又一實施例中，該突變蛋白包含不大於18個自SEQ ID NO:3胺基酸序列缺失的連續胺基酸殘基。

在一特定實施例中，本發明提供其中9個連續胺基酸殘基(其中一個係His₆₈)自SEQ ID NO:3胺基酸序列缺失之實質無毒性突變蛋白。在此類別之更具體實施例中，所缺失9個連續胺基酸殘基係介於SEQ ID NO:3之Tyr₆₂至Trp₇₀之間。在又一更具體實施例中，此等缺失9個連續胺基酸在該突變蛋白之胺基酸序列中係藉由單一白胺酸殘基替換。

本發明進一步提供減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體具有核酸分子，該核酸分子編碼整合入其染色體中之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素的實質無毒性突變蛋白。此整合核酸分子較佳定位於與編碼野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體中野生型 α -毒素

之核酸分子位置同源的染色體位置。因此，本發明之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體因缺少功能性野生型 *plc* 基因而可為實質無毒性的。如本文所例示，該減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體可為 A 型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌。

在本發明之一特定實施例中，該減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體係產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054 (ATCC 寄存編號 PTA7364)。在本發明之另一特定實施例中，該減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體係產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053 (ATCC 寄存編號 PTA7365)。

可自係哺乳動物或禽類之宿主動物分離藉由本發明方法減毒之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。此等哺乳動物可包括：牛、羊及豬。適當的禽類之實例包括雞、火雞、鴨、家鴿、鵝、野鴿、天鵝、山鶉、及松雞。

本發明亦提供疫苗。此等疫苗可包含本發明之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。本發明之疫苗亦可包含藥理學上可接受之緩衝劑、賦形劑、及/或佐劑。

另外，本發明提供誘導針對動物中產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之免疫性的方法。一個這種實施例包括對該動物投與免疫有效劑量之本發明疫苗。本發明之疫苗可藉由許多途徑投與，包括：經口、肌內、靜脈內、皮內、皮下及鼻內。可將本發明之疫苗施與動物飼料之表面上及/或噴灑於該等動物上以便於經口投與。本發明進一步提供包含本發明疫苗之動物飼料。

本發明亦提供另外表現至少一種基因(編碼非產氣莢膜梭狀芽孢桿菌多肽)之本發明減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。在一個這種實施例中，一或多個非產氣莢膜梭狀芽孢桿菌多肽係細菌多肽，例如，來自大腸桿菌(*E. coli*)、沙門氏菌(*salmonella*)、勞森氏菌(*lawsonia*)、或彎曲桿菌(*campylobacter*)等之抗原性蛋白及/或其組合。另一選擇為，或與之組合，非產氣莢膜梭狀芽孢桿菌多肽可為非細菌多肽。此等非細菌多肽之實例包括哺乳動物或禽類蛋白質，例如，細胞介素(cytokine)，如雞IL-18；病毒，如輪狀病毒或冠狀病毒；及寄生蟲，如艾美球蟲屬(*eimeria*)、等孢子球蟲屬(*isospora*)、及隱孢子蟲屬(*cryptosporidium*)。

在另一態樣中，本發明提供一種可選擇性地結合至自產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白缺失之抗原決定部位的抗體。此等抗體可區分該實質無毒性突變蛋白與野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素。

本發明亦提供包含本發明之抗體的測試套組，其可用於識別動物個體是否已接種疫苗或者已自然感染產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。

因此，本發明亦提供識別及/或區分已自然感染產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物與一接種減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物的方法。在一個這種實施例中，該方法具體包括使來自該動物之流體試樣與抗體接觸，該抗體可選擇性地結合至發現於野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌

α -毒素中之抗原決定部位，其自本發明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白缺失。因此，該抗體可區分彼等已經接種本發明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白(及/或表現該突變蛋白之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體)的動物與彼等感染或曾感染野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素者。下一步驟係測定該抗體是否與該流體試樣反應，例如，結合至該流體試樣所含抗原。當該抗體與該流體試樣反應時，可將該動物識別為已經自然感染產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之個體。

【實施方式】

因此，本發明提供以相對於天然或野生型梭菌屬毒素不具有可檢測毒性及/或實質低毒性之突變蛋白形式表現一或多種梭菌屬(*Clostridia*)毒素(例如， α -毒素)之經改造梭菌屬生物體及培養物。較佳地，本發明之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌突變型生物體可作為活疫苗容易地投與動物。亦提供本發明之突變蛋白產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素以及編碼該等突變蛋白之核酸分子、用於表現 α -毒素之載體、及使用該等之方法。

為了清楚地闡述本發明，可界定如下若干術語。疫苗係一種包含免疫原及其他醫藥上可接受之可選成份(在某些實施例中，包括適宜佐劑)的組合物。本文所用術語"免疫原"描述一種在被導入動物中時激發免疫應答之組合物、物質或載體。出於本發明之目的，本發明涵蓋包含任一能夠表現本發明突變蛋白 α -毒素或將本發明突變蛋白 α -毒素

導入擬免疫接種動物中之載體的免疫原。載體包括(例如)在將該載體導入動物中時可表現本發明突變蛋白 α -毒素之本發明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌或其他適宜微生物。載體亦包括業內已知核酸分子，例如，質粒及諸如此類，其在直接導入動物中時可藉由(例如)進入動物細胞並在動物中表現突變蛋白 α -毒素來表現本發明之突變蛋白 α -毒素。免疫原亦可為單獨或作為適宜疫苗組合物之一部分使用的蛋白質，例如本發明之 α -毒素。

除非另有說明，否則本文所用術語"免疫接種"及"接種"係同義的且可互換使用以描述免疫原至動物之導入從而在該動物中產生免疫應答。所產生免疫應答可為治療動物提供保護免疫性，此可限制或減少經接種動物之臨床病狀，例如，氣性壞疽及/或死亡率，然後用有毒劑量之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌種(對其而言，本發明之疫苗係保護性的)激發該等經接種動物。

將術語"佐劑"定義為可刺激免疫系統之一或多種物質。在本文中，佐劑可用於增強對一或多種疫苗抗原/分離物之免疫應答。可在投與該疫苗之前、同時或之後對靶動物投與佐劑。本發明之佐劑可自許多來源之任一個獲得，該等來源包括自然源、重組體來源；及/或以化學方式合成等。用作佐劑之化學化合物之實例包括但不限於含鋁化合物；可代謝及不可代謝之油；嵌段聚合物；ISCOM(免疫刺激複合物)；維他命及礦物質(包括但不限於維他命E、維他命A、硒、及維他命B12)；Quil A (皂苷)；以不同水

平與聚烯基聚酯交聯的基於交聯丙烯酸之聚合物(例如，丙-2-烯酸聚合物)，如以商標CARBOPOL®出售者；及/或均勻分佈於水中之微米級油滴的乳液，例如，以商標Emulsigen®出售者。

時常明確稱作免疫刺激劑之佐劑的其他實例包括：細菌及真菌細胞壁組份(例如，脂多糖、脂蛋白、糖蛋白、胞壁醯肽、 β -1,3/1,6-葡聚糖)、源自植物之各種複雜的碳水化合物(例如，聚糖、醋孟南(acemannan))、源自動物之各種蛋白質及肽(例如，激素、細胞介素、協同刺激因子)、及源自病毒及其他來源之核酸(例如，雙鏈RNA、CpG)。另外，任一數量的各上述物質之組合可提供佐劑效果，因此，其可形成本發明之佐劑。

本文所用術語"抗體"欲涵蓋多株抗體、單株抗體、及/或其片段或重組體衍生物，包括納入抗體可變結構域之經改造結合蛋白質。

如本文所用，本發明 α -毒素蛋白之胺基酸殘基的殘基編號及位置係基於對產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13所闡述的編號系統。產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13 α -毒素由GenBank登記編號NC 003366報導，如由SEQ ID NO: 1所闡明。該完整的蛋白質之長度係398個胺基酸。藉由下文所列示突變蛋白載體編碼之 α -毒素對應於具有胺基酸殘基90-98缺失之SEQ ID NO: 1蛋白質。在該蛋白質突變期間有一28個胺基酸信號序列裂開。因此，所列示缺失對應於長度為370個胺基酸之成熟蛋白質的胺基酸殘基62-70(SEQ

ID NO: 3)。

編碼本發明 α -毒素蛋白之DNA的密碼子編號係基於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13之*plc*基因，如GenBank登記編號NP 560952中所報導及如SEQ ID NO: 2所示。 α -毒素之編碼序列在產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13中為自核苷酸48590至49786。本文所例示之兩個構建體中之密碼子缺失對應於NP 560952基因之核苷酸48857至(且包括)48883。此缺失發現於 α -毒素基因內且對應於SEQ ID NO: 2之編碼序列中的核苷酸268-294。

此外，為方便說明而使用單數術語，但並不欲受限於此。因此，舉例而言，所提及包含一種產氣莢膜梭狀芽孢桿菌細胞之組合物係包括所提及的一或多種此等細胞。亦應理解，本發明並不限於本文所揭示之特定構型、過程步驟、及材料，此等構型、過程步驟、及材料可有些許變化。亦應理解，本文所用專業術語僅出於闡述特定實施例之目的而使用且並非欲受限於此，因為本發明之範圍僅受限於隨附之申請專利範圍及其相等物。

在本發明之一個特定態樣中，提供"實質無毒性"的產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之非逆轉性突變體，即，可表現具有極小或無毒性之免疫原性 α -毒素進而使其適於用作保護性疫苗的生物體。因此，本發明之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體相對於野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體具有充分減少的毒性，以致在接種此疫苗之動物中可有效激發抗- α -毒素或抗-產氣莢膜梭狀芽孢桿菌免疫反應的條件下使用

時，可容許用作疫苗或抗原。因此，本發明之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體相對於野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌係"減毒的"。

短語"實質無毒性"亦欲用於具有充分低或無毒性之上述免疫原性 α -毒素突變蛋白，進而亦使其適用於保護性疫苗。

例如，藉由下列業內已知試驗中之一個來量測毒性減少：於試驗動物組中之溶血活性、磷脂酶C活性、鞘磷脂酶活性、磷酸二酯酶活性、及一般致死活性。一般而言，藉由此等標準試驗不可檢測殘餘毒性。儘管如此，相對於衍生突變蛋白之野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之相等數量感染性單元的毒性，可證明最小量(例如自約 10^{-4} 至約 10^{-2})之一或多種此等活性的存在於獸醫環境中係可接受的。

在一個實施例中，採用產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之生物型A菌株實踐本發明，其作為各類別壞疽及腸道疾病之病原具有特別的重要性。特定言之，產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之 α -毒素係缺失-減毒之目標，乃因此毒素之減毒足以致使產氣莢膜梭狀芽孢桿菌相對於野生型菌株係極不具有致死性。

概言之，本發明之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌*plc*基因表現突變蛋白 α -毒素。突變蛋白 α -毒素具有一包含Zn²⁺環之His以及側接殘基在內的缺失以大大地降低任一恢復突變至毒性形式的可能性。現在已發現：Zn²⁺環His殘基(例如，SEQ

ID NO: 3之His₆₈)之缺失以及側接Zn₂環His殘基之額外殘基的缺失可提供保留足夠免疫原性的 α -毒素以在接種本發明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之動物中誘導保護免疫性而亦不可能經歷恢復突變至編碼野生型 α -毒素。可能缺失的額外殘基相對於His₆₈在C-末端方向及/或在N-末端方向上缺失，且在此等方向之任一個上，該等額外殘基之數量可介於約4個至約60個殘基之間。或者，His₁₄₈及側接殘基可類似地缺失。

相對於SEQ ID NO: 3，除包含His₆₈缺失之外，本發明突變蛋白 α -毒素之一個實施例亦包含來自His₆₈位置之任一側(在C-末端或N-末端方向上)的至少30個胺基酸殘基缺失。在另一實施例中，相對於SEQ ID NO: 3，除包含His₆₈缺失之外，本發明突變蛋白 α -毒素亦包含來自His₆₈之任一側的至少20個胺基酸殘基缺失。在又一替代實施例中，相對於SEQ ID NO: 3，除包含His₆₈缺失之外，本發明突變蛋白 α -毒素亦包含來自His₆₈之任一側的至少5個胺基酸殘基缺失。在再一實施例中，相對於SEQ ID NO: 3，本發明之突變蛋白 α -毒素包含自約殘基62至約殘基70之缺失。視情況，該等缺失胺基酸殘基可藉由一或多個其他殘基(例如，單一白胺酸殘基)替換。

在又一實施例中，突變蛋白產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素係自產氣莢膜梭狀芽孢桿菌或者自欲用作研究試劑之替代重組生物體、及/或在診斷測試套組或分析中作為(例如)抗- α -毒素抗體之靶產生或分離。突變蛋白產氣莢膜梭狀

芽孢桿菌 α -毒素蛋白之又一用途係在不能夠接受接種本發明減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物(例如,人類)的特殊疫苗中。

另外,本發明提供相對於本發明 α -毒素突變蛋白可特異性地結合至野生型 α -毒素的抗體。

在另一實施例中,提供一種以優選方式結合至野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素蛋白同時對本發明突變蛋白 α -毒素呈現最小結合或不結合(例如,避免結合至具有如上文所詳述缺失之 α -毒素突變蛋白)的抗體。因此,所提供抗體可用於區分該缺失突變蛋白 α -毒素與野生型 α -毒素,從而亦可用於區分接種本發明疫苗之動物與已感染野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之動物。產生及篩選此等選擇性抗體之方法為業內所知。類似地,亦可產生可識別本發明突變蛋白 α -毒素但不識別野生型蛋白質的抗體。本發明之抗體可為多株抗體、單株("mAb")抗體或保留選擇性結合性質之此等抗體的片段或改造片段或衍生物。

已經詳盡地闡述了用於製備及篩選單株抗體之技術[參見,例如,Stites等人(編輯)*Basic and Clinical Immunology*(第4版),Lange Medical Publications,Los Altos,California(1988);Harlow及Lane,*Antibodies: A Laboratory Manual*,CSH Press(1988);Goding,*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*(第2版),Academic Press,New York(1986);及Kohler和Milstein,*Nature* 256:495-497(1975),所有該等文獻之全文均以引用方式併入本文中]。

例如，但不限於此，藉由使用經純化野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -蛋白質(例如，與適宜佐劑之組合)實施接種可在諸如小鼠或雞等適宜動物中產生免疫應答。舉例而言，為了免除野生型 α 蛋白質之毒性，該免疫原可為對應於缺失殘基之肽，且若需要可藉由與適宜佐劑組合或藉由偶聯至適宜載體蛋白質來增強該肽之免疫原性。與載體蛋白質之偶聯為業內所知，且可藉由(例如)提供具有終端半胱胺酸之肽並使用馬來醯亞胺偶聯化學或磺基琥珀酸亞胺基4-[N 馬來醯亞胺基]環己烷-1-羧酸酯連接子(來自Pierce)將該肽偶聯至鑰孔蟲血蘭素(KLH)或牛血清白蛋白(BSA)來完成此偶聯。在不需要終端半胱胺酸時亦可採用碳化二亞胺連接子。

對於單株抗體製備而言，可自經免疫接種動物獲得脾淋巴細胞，自該等淋巴細胞製備雜交瘤，且可獲得一或多種表現抗- α 蛋白質之潛在的適宜雜交瘤。篩選抵抗突變蛋白及野生型 α -蛋白質之雜交瘤，並識別、選殖及使用表現僅結合該野生型 α -毒素之抗體的雜交瘤以產生僅結合野生型 α 蛋白質之單株抗體。視情況，獲得來自識別雜交瘤無性繁殖系之cDNA，且在其他業內已知表現系統中產生重組抗體或抗體片段。

如上文所述，一般而言，接種之一個潛在缺點係所得接種動物在使用所形成抵抗天然菌株之抗體測試感染時可能產生假陽性從而阻礙感染動物之識別。因此，本發明提供一種用於區分已經感染天然產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體

之動物個體與使用本發明突變蛋白 α -毒素接種之動物的測試套組。

一個這種測試套組包括一定量的對本發明突變蛋白 α -毒素呈現最小結合或不結合之選擇性抗-野生型 α -毒素抗體。該測試套組亦可包括足以實施至少一個診斷試驗之其他適宜試劑。在另一實施例中，使用可易於檢測之標誌部分(例如，任一業內已知的酵素標誌，如過氧化物酶；螢光標記物，如螢光素；珠體，包括磁性小珠；及諸如此類)對該抗體實施標記(tagged或labeled)。視情況，該套組可進一步包括選擇性地結合至選擇性抗-野生型 α -毒素抗體的標記抗體。免疫分析法為此項技術所熟知，且包括三明治型免疫分析法、競爭性免疫分析法、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)及其他。

本發明亦提供用於識別及區分感染自然(即，野生型)產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物與使用包含本發明減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之疫苗接種的動物的方法，其按照(例如)下列步驟實施：

(a)使來自該動物之流體試樣與自上述選擇性抗-野生型 α -毒素抗體接觸，該選擇性抗-野生型 α -毒素抗體對本發明突變蛋白 α -毒素呈現最小結合或不結合；及

(b)測定該抗體是否與該流體試樣反應；

其中當該抗體與該流體試樣反應時，該動物被識別為已經感染天然產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物。

製備減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株

可按照下列實施將野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌分離物轉化成適於作為疫苗投與之減毒或實質無毒性菌株的方法。可使用僅編碼 α -毒素突變蛋白之基因替換位於細菌染色體上之 α -毒素(*plc*)基因，從而使該產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體不能夠產生野生型 α -毒素。概言之，產生疫苗生物體之方法包括但不限於下列常用步驟，不必按順序出現。

(1) 識別欲藉由接種加以保護之動物類別及所獲得的一或多種用於篩選目的之臨床分離物。對於 α -毒素而言，此步驟通常為可選步驟，乃因來自一動物物種之分離物更不可能為其他動物物種提供保護。

(2) 藉由(例如)PCR或其他業內已知核酸擴增技術使用適宜側接引物以擴增來自產氣莢膜梭狀芽孢桿菌分離物之*plc*基因並使用適宜引物實施擴增以產生期望缺失突變。或者，可探測適當文庫。

(3) 形成包含缺失*plc*基因之自殺載體，其中產氣莢膜梭狀芽孢桿菌複製源已經移除，及/或可在產氣莢膜梭狀芽孢桿菌中複製之複製源完全不存在；且在任一情況下，包含毗鄰突變*plc*基因之適宜可選標誌，例如，抗生素標誌。隨後可藉由(例如)電穿孔或其他業內已知方法將此載體插入產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體中。

(4) 選擇其中已經將突變蛋白*plc*基因成功地整合入細菌染色體中之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。此可藉由於可選試劑(例如，對應於可選標誌之抗生素)存在下培養步驟(3)

之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體來實施。舉例而言，可在抗生素選擇下生長之唯一產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體可為彼等已藉由同源重組將自殺載體及其抗生素抗性基因直接整合入細菌染色體中者。因此，此等生長產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體可具有兩個毗鄰 *plc* 基因，一個係野生型而另一個可能具有缺失突變。

(5) 選擇已經受另一重組事件之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，該重組事件可移除該等可選標誌(例如，抗生素標誌)以及野生型 *plc* 基因。此可藉由於不存在可選試劑(例如，抗生素)時培養(4)之生物體並在血瓊脂上選擇非溶血性純系來實施。

由於藉由同源重組完成突變蛋白核酸之插入，因此編碼該突變蛋白 α -毒素之核酸分子係在與編碼野生型 α -毒素之核酸分子之定位同源的染色體位置納入，該野生型 α -毒素係存於未減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌中。

更具體而言，可自患病動物或其他來源獲得產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之野外分離物。開始，將自相關野外分離物獲得的基因組DNA插入適宜雙重微生物往復載體(例如，具有可選標記(如，抗生素標記)之往復質粒)中以評定其可轉化性。概言之，適宜往復載體可包含1個、2個、3個或更多個下列特徵：選殖位點、產氣莢膜梭狀芽孢桿菌複製源、大腸桿菌複製源、及抗生素抗性基因及/或可選標記。適用於此目的或容易地適應於此目的之業內已知載體包括(例如)Roberts等人所述重組往復質粒 pHR106 [*Appl*

Env Microbiol 54: 268-270 (1988)] ; Bannam等人所述 pJIR 750 及 pJIR 751 質粒 [*Plasmid* 29:233-235 (1993)] ; Matsushita 等人之無啟動子 pPSV 啟動子選擇載體 [1994, *Plasmid* 31, 317-319] ; Lyras 等所述往復質粒 pJIR1456 及 pJIR1457 [1988, *Plasmid* 39, 160-164] ; 及 Kim 等人所述 pAK201 往復載體 [1989, *Appl Environ Microbiol* 55, 360-365] , 該等文獻之內容全部以引用方式併入本文中。產氣英膜梭狀芽孢桿菌複製源之移除可將往復載體轉變成自殺載體。

舉例而言，一種往復質粒係 pJIR418，由 Sloan 等人在 1992, *Plasmid* 27, 207-219 闡述，該文獻以引用方式併入本文中。

產生 $\geq 10^4$ 轉化體/微克質粒 DNA 且對抗生素標誌(例如，氯黴素或紅黴素)敏感之分離物係缺失之潛在候選者。來自候選菌株之基因組 DNA 隨後用作候選菌株之 *plc* (α -毒素) 基因及側接序列之長程 PCR 的模板。舉例而言，如下文所列示，使用產氣英膜梭狀芽孢桿菌菌株 13 染色體以識別用於擴增編碼該 α -毒素之基因的引物。隨後使用此等引物以自另一菌株選殖 α -毒素基因，該另一菌株係 CP6 家禽分離物。

在對 PCR 產物實施亞選殖後，對 α -毒素基因及側接區實施測序並繪製限制性內切酶譜。藉助側接限制酶切位點合成新穎寡核苷酸引物並將兩次不同的擴增之產物選殖至適宜自殺質粒(已經移除產氣英膜梭狀芽孢桿菌複製源)，例

如，下文所列示質粒 1192-23.1 中以形成具有該缺失之期望疫苗菌株。

藉由任一業內已知標準方法將所提供對分離物具有特異性之自殺載體插入對應動物的產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株中。舉例而言，此可藉由電穿孔完成。當將該自殺載體插入產氣莢膜梭狀芽孢桿菌(不具有產氣莢膜梭狀芽孢桿菌複製源)中時，該自殺載體不能夠在細胞質中複製，且除非其成功地整合入細菌染色體中，否則不可存活。成功的整合體係可於抗生素(對應於剛剛導入的抗生素標記基因)存在下生長之最佳生物體。

儘管在下文所列示載體中採用氯黴素及/或紅黴素標誌，但可採用任一業內已知可選標誌基因。

此等重組體事件係自野生型 *plc* 基因與缺失 *plc* 基因質粒 DNA 之同源性形成。將所得重組細菌稱為整合體。該整合體含有在 *plc* 基因基因座受到整合之導入同源性載體的拷貝。因此，所得整合體包括 *plc* 基因之兩個拷貝：初始正常的拷貝及導入缺失版本。所導入抗生素抗性基因係定位於 *plc* 基因之兩個拷貝之間。在 *plc* 基因之兩個拷貝之間可能發生極少的隨機重組事件。此重組事件可能產生兩種結果中的一種。在這兩種情形中，均已經移除介入兩個 *plc* 基因(包括抗性基因)拷貝之間的 DNA。在第一種結果中，恢復該正常的或野生型 *plc* 基因進而回收不具有抗生素標誌之初始母體菌株。在第二種結果中，野生型 *plc* 基因經缺失拷貝替換，產生不具有抗生素標誌之期望 α -毒素缺失

體構建體。

自培養基移除抗生素可使彼等已經受重組之細菌存活並複製。隨後，藉由於不存在表現野生型 α -毒素之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌通常所呈現溶血現象時血瓊脂上之生長狀況來識別缺失重組純系。

擬接受接種之動物

概言之，可產生減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌疫苗並可自其分離有用的產氣莢膜梭狀芽孢桿菌野生型菌株的動物包括任一對其而言產氣莢膜梭狀芽孢桿菌感染係一問題之動物。相關脊椎動物包括禽類、哺乳動物及魚，且具體而言係具有經濟及/或農業重要性之動物。下文所列舉動物係彼等預期可受益於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌疫苗及/或自其可獲得有用的產氣莢膜梭狀芽孢桿菌野生型分離物者。儘管可能的情形時常係任一此疫苗包含最初自擬接受接種之動物種屬或物種分離的組份，但此並非必需條件。

此等動物之非限制性列表包括彼等禽類、牛、羊等家族以及水生動物(例如，可實施水產養殖及/或自野外捕獲並在銷售前於容納槽中保持存活一段時間者)。此等包括魚，例如，鱒魚或鮭魚、及其他出於經濟效益而養殖或捕獲之物種。非脊椎動物水生動物包括龍蝦、螃蟹、軟體動物類，例如魷魚、章魚、蛤、牡蠣、muscles、扇貝、及諸如此類。應理解：禽類可包括(例如)雞、火雞、鵝、鴨等。應理解：牛可包括(例如)畜牛、肉牛、小菜牛等。應理解：羊可包括(例如)羔羊等。

出於本發明之目的，應理解：術語"魚"可包括但不限於魚之 *Teleosti* 分組，即，硬骨魚類。*Teleosti* 分組包括鮭目 (*Salmoniformes* order)(其包括鮭科 (*Salmonidae*) 家族) 及鱸形目 (*Perciformes* order)(其包括刺臀魚科 (*Centrarchidae*) 家族)。

潛在魚受試者之實例包括鮭科家族、鮪科 (*Serranidae*) 家族、鯛科 (*Sparidae*) 家族、慈鯛科 (*Cichlidae*) 家族、刺臀魚科 (*Centrarchidae*) 家族、三線石鱸 (three-Line Grunt)(三線雞魚 (*Parapristipoma trilineatum*))、及藍眼豹 (Blue-Eyed Plecostomus)(琵琶 (*Plecostomus spp*))。

鮭科家族

| 分類群名稱 | 常用名 |
|---|--|
| 鯡形白鮭 (<i>Coregonus clupeaformis</i>) | 湖泊白鮭 |
| 霍氏白鮭 (<i>Coregonus hoyi</i>) | 霍氏白鮭 (Bloater) |
| 大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus keta</i>) | 狗鮭 (Chum salmon) |
| 駝背大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) | 粉色鮭魚 |
| 銀大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) | 銀鮭 (Coho Salmon) (銀色鮭魚 (Silver Salmon)) |
| 孟蘇大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus masou</i>) | 櫻鮭 (孟蘇鮭魚 (masou salmon)) |
| 納爾卡大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus nerka</i>) | 撒克愛鮭 (Sockeye Salmon) |
| 大鱗大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>) | 切奴克鮭魚 (chinook Salmon) |
| 真柱白鮭 (<i>Prosopium cylindraceum</i>) | 圓白鮭 (round whitefish) |
| 克拉克大麻哈魚 (<i>Oncorhynchus clarki</i>) | 切喉鱒 |
| 麥奇鈎吻鱒 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | 彩虹鱒 |

| | |
|--|---|
| 大西洋鮭(<i>Salmo salar</i>) | 大西洋鮭魚 |
| 褐鱒(<i>Salmo trutta</i>) | 褐色鱒魚 |
| 褐鱒X紅點鱒 (<i>S. fontinalis</i>) | 雜種虎鱒(Tiger hybrid-trout) |
| 北極紅點鮭(<i>Salvelinus alpinus</i>) | 北極嘉魚(Arctic charr) |
| 強壯紅點鮭 (<i>Salvelinus confluentus</i>) | 公牛鱒 |
| 溪紅點鮭(<i>Salvelinus fontinalis</i>) | 溪流鱒 |
| 白斑紅點鮭 (<i>Salvelinus leucomaenis</i>) | 日本嘉魚(白斑嘉魚) |
| 花羔紅點鮭(<i>Salvelinus malma</i>) | 花羔紅點斑鮭(Dolly varden) (宮部紅點鮭(Miyabe charr)) |
| 湖紅點鮭(<i>Salvelinus namaycush</i>) | 湖泊鱒魚 |
| 茴魚(<i>Thymallus thymallus</i>) | 河鱒 |

鮭科家族之某些成員

| 分類群名稱 | 常用名 |
|---|-------|
| 捷鋸鮭(<i>Centropristis ocyurus</i>) | 堤海鱸 |
| 費城鋸鮭(<i>Centropristis philadelphicus</i>) | 岩海鱸 |
| 條紋鋸鮭(<i>Centropristis striata</i>) | 黑海鱸 |
| 侏沙鮭(<i>Diplectrum bivittatum</i>) | 矮小沙河鱸 |
| 美麗沙鮭(<i>Diplectrum formosum</i>) | 沙河鱸 |
| 金緣石斑魚(<i>Epinephelus flavolimbatus</i>) | 黃邊鼻鱸 |
| 黑緣石斑魚(<i>Epinephelus morio</i>) | 紅鼻鱸 |
| 橫帶鮭(<i>Serranus phoebe</i>) | 發光鮭 |
| 堊鮭(<i>Serranus tortugarum</i>) | 堊鱸 |

鯛科家族之某些成員

| 分類群名稱 | 常用名 |
|--|------------------------|
| 南方羊鯛(<i>Archosargus probatocephalus</i>) | 羊鯛 |
| 菱羊鯛(<i>Archosargus rhomboidalis</i>) | 海鯛 |
| 羊頭蘆鯛(<i>Calamus penna</i>) | 羊鯛真鯛(Sheepshead porgy) |
| 菱體兔牙鯛(<i>Lagodon rhomboides</i>) | 菱體兔齒鯛(Pinfish) |
| 真鯛(<i>Pagrus Major</i>) | 紅海鯛 |
| 耳鯛(<i>Sparus aurata</i>) | 烏頰魚海鯛 |
| 門齒鯛(<i>Stenotomus chrysops</i>) | 變色窄牙鯛(Scup) |

慈鯛科家族之某些成員

| 分類群名稱 | 常用名 |
|---|--|
| 寬體寶麗鯛(<i>Aequidens latifrons</i>) | 藍突額麗魚(Blue acara) |
| 白獅王(<i>Cichlasoma nigrofasciatum</i>) | 剛果慈鯛(Congo cichlid) |
| <i>Crenichichla</i> sp. | 梭型鯛(Pike cichlid) |
| 大神仙魚(<i>Pterophyllum scalare</i>) | 天使魚 |
| 莫桑比克羅非魚(<i>Tilapia mossambica</i>) | 莫桑比克口育魚類 (Mozambique mouth breeder) |
| 吳郭魚(<i>Oreochromis</i> spp) | 羅非魚(<i>Tilapia</i>) |
| 奧利亞羅非魚(<i>Sarotherodon aurea</i>) | 金色羅非魚(Golden <i>Tilapia</i>) |

刺臀魚科家族之某些成員

| 分類群名稱 | 常用名 |
|--|---|
| 岩鈍鱸(<i>Ambloplites rupestris</i>) | 岩鱸 |
| 太陽鱸(<i>Centrarchus macropterus</i>) | 日鱸(Flier) |
| 黑斑小日鱸(<i>Elassoma evergladei</i>) | 埃弗格來茲小太陽魚 (Everglades pigmy sunfish) |
| 小日鱸(<i>Elassoma okefenokee</i>) | 奧克小太陽魚 (Okefenokee pigmy sunfish) |
| 橫帶小日鱸(<i>Elassoma zonatum</i>) | 帶狀小太陽魚 |
| 藍點九刺日鱸 (<i>Enneacanthus gloriosus</i>) | 藍點太陽魚 |
| 暗色九刺日鱸(<i>Enneacanthus obesus</i>) | 帶狀太陽魚 |
| 紅胸太陽魚(<i>Lepomis auritus</i>) | 紅腹太陽魚 |
| 藍太陽魚(<i>Lepomis cyanellus</i>) | 藍綠鱗鰓太陽魚(Green sunfish) |
| 藍太陽魚X駝背太陽魚 | 藍綠鱗鰓太陽魚X瓜仁太陽魚 |
| 駝背太陽魚(<i>Lepomis gibbosus</i>) | 瓜仁太陽魚(Pumpkinseed) |
| 太陽魚(<i>Lepomis gulosus</i>) | 貪食太陽魚(Warmouth) |
| 橙點太陽魚(<i>Lepomis humilis</i>) | 橙點太陽魚(Orange-spotted sunfish) |
| 藍鰓太陽魚(<i>Lepomis macrochirus</i>) | 藍鰓魚 |
| 長耳太陽魚(<i>Lepomis megalotis</i>) | 長耳太陽魚(Longear sunfish) |
| 紅眼黑鱸(<i>Micropterus coosae</i>) | 淺灘鱸(Shoal bass) |
| 小口黑鱸(<i>Micropterus dolomieu</i>) | 小嘴鱸 |
| 斑點黑鱸(<i>Micropterus punctulatus</i>) | 斑點鱸 |
| 大口黑鱸(<i>Micropterus salmoides</i>) | 大嘴鱸 |

白刺蓋太陽魚(*Pomoxis annularis*) 刺蓋太陽魚(White crappie)
 黑刺蓋太陽魚
 (*Pomoxis nigromaculatus*) 暗刺蓋太陽魚(Black crappie)

在另一實施例中，動物係伴侶動物或人。出於本發明之目的，應理解：術語"伴侶動物"包括所有動物—馬(馬科)、貓(貓科)、狗(犬科)、及齧齒類動物(包括小鼠、大鼠、豚鼠、兔種)、及禽類(例如，家鴿、鸚鵡)、及諸如此類。

接受此接種之鳥類可與商業性家禽業或非商業性家禽業相關。此等包括(例如)鴨科(*Anatidae*)，例如天鵝、鵝、及鴨；鴿科(*Columbidae*)，例如野鴿及家鴿(如，馴養家鴿)；雉科(*Phasianidae*)，例如山鶉、松雞及火雞；*Thesienidae*，例如家雞；鸚鵡科(*Psittacine*)，例如長尾鸚鵡、金剛鸚鵡(macaws)、及普通鸚鵡(例如，作為寵物飼養或用於收集銷售者)。雞列示於下文中。

野生型分離物之來源

一般而言，可使用最初自任一如上文所述相關感染動物及/或自環境分離之野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌開始製備本發明之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。該環境包括任一含有可存活產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體及/或可存活產氣莢膜梭狀芽孢桿菌孢子之材料，包括(例如)受污染食物、土壤、水、動物墊料、糞便、及諸如此類。

Justin等人[*Biochemistry* 41, 6253-6262 (2002)]對來自在序列及生物化學性質方面幾乎一致之不同產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株的 α -毒素實施了特徵分析。然而，Justin等人

亦闡述自禽類來源(天鵝)分離之菌株，該菌株與其他菌株相比具有呈現大程度的序列變異及變化底物特異性之 α -毒素。出於此原因，吾人認為最佳分離物可為在轉化成減毒形式時可產生抵抗產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之許多其他天然菌株之 α -毒素的保護免疫性者。然而，若兩分離物間之 α -毒素可能發生變異，則較佳情形經常為對來自需要抗-產氣莢膜梭狀芽孢桿菌疫苗之動物物種的產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體實施分離及減毒。下文所列示分離物係自雞分離得並在此物種中測試。

疫苗

本發明之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體通常調配成醫藥上可接受之疫苗組合物。該等疫苗組合物係依照投藥途徑調配且可與活性抗原劑相容。該活性抗原劑為例如本發明之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型生物體的一或多種菌株。視情況，該疫苗組合物亦可包含一或多種無毒性 α -蛋白質與該等減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型生物體組合。

舉例而言，該疫苗組合物中所含之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型生物體實質上均為活的且可存活的，雖然對於某些特定情況，例如為使某些人或免疫缺陷(immune-compromised)動物免疫，該疫苗只含殺死之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型生物體。

該疫苗組合物包含生理學上可相容之緩衝劑及/或鹽，視情況合併佐劑及/或免疫增強劑或刺激劑(共同投與或者

連續投與，例如在接種疫苗之前或之後)。

適合之免疫刺激劑包括，但不限於，細胞介素、生長因子、趨化因子(chemokines)、來自淋巴細胞、單核細胞、淋巴器官細胞之細胞培養物的上清液、細胞製劑或細胞提取物(例如金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或脂多糖製劑)、促細胞分裂劑(mitogens)、或佐劑(包括小分子量藥物)。免疫刺激劑可在培育期間任何時刻卵內投與。在特定態樣中，該免疫刺激劑可以含有減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型生物體之培養基投與。

投與疫苗之方法

上述本發明疫苗係藉由例如下列途徑之一種或組合注射或接種而投與：經口、鼻內、非經腸、皮下、劃破、及/或肌內，以業內已知之任何適合調配物，例如相容之緩衝劑及/或生理學上可接受之鹽水，視情況合併佐劑及/或免疫增強劑或刺激劑投與(共同投與或者連續投與，例如在接種疫苗之前或之後)。對於經口服用疫苗/接種疫苗方法，可輕易地採用此項技術中已知之任何生理學上適宜的緩衝劑或懸浮劑。另外，可將該組合物納入(例如混合入)飲用水中或噴塗至食物顆粒上、撒施於或噴塗於玉米或其他穀物上、及諸如此類。

胃腸道係產氣莢膜梭狀芽孢桿菌感染之常見位點，且因此口服亦屬於一種接種方法。預計，胃腸道中本發明活減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之存在可在胃腸道之黏膜層產生局部保護免疫反應且亦可以競爭方式用於防止野生

型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之後續定居。

對於禽類(例如家禽，包括雞、鴨、鵝等)而言，口服方法或卵內注射係特別有用的接種途徑。卵內途徑列示於下文中且自激發孵化雞來產生自動免疫及保護。

藉由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌表現之外源基因

藉助上述實例中所發展技術，將任一非天然基因(即，產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之外源基因)視情況插入產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之染色體DNA中。對於異種蛋白表現而言，可實施保護側接 α -毒素基因之序列、 α -毒素啟動子及其信號序列的基因融合。在一個實施例中，可使用外源基因替換大部分 plc 基因編碼序列。插入基因下游之 plc 基因之其餘核苷酸係在框架外，且因此不產生功能性 α -毒素。或者，可將外源基因於框架內插入至編碼 α -毒素突變蛋白之核苷酸序列，形成 α -毒素-異種蛋白融合蛋白。

可藉助(例如)N-末端FLAG標記序列及適當的限制酶切位點合成外源基因之寡核苷酸引物。可將該PCR產物選殖至自殺載體中；將FLAG標記及外源基因插入具有 α -毒素信號序列之框架內。該異種蛋白係在 α -毒素啟動子控制下表現且由 plc 信號序列靶定進行分泌。可藉由西方點漬分析使用抗-FLAG抗體監測上清液培養基中所分泌異種蛋白。

可將任一適宜外源基因以此方式插入產氣莢膜梭狀芽孢桿菌基因組中。此等包括(例如)來自胃腸道病原體之DNA編碼抗原，包括(例如)諸如大腸桿菌、沙門氏菌屬、彎曲

桿菌屬、勞森氏菌屬、及諸如此類細菌之抗原性蛋白；諸如艾美球蟲屬、等孢子球蟲屬、隱孢子蟲屬及諸如此類寄生蟲之抗原性蛋白；及諸如輪狀病毒、冠狀病毒及諸如此類病毒之抗原性蛋白，以免疫接種經此重組產氣莢膜梭狀芽孢桿菌治療之動物。可藉由此重組產氣莢膜梭狀芽孢桿菌表現之其他蛋白包括治療性蛋白質或肽。視情況，此等包括胃腸道之內源性肽，包括三葉因子或任一類別之業內已知細胞介素，例如，雞IL-18、及諸如此類。

一種此產氣莢膜梭狀芽孢桿菌構建體表現雞IL-18蛋白質。含有基因融合之活細菌的投與可遞送治療劑量之IL-18至腸且因不產生 α -毒素而對宿主動物相對無害。亦可使用此系統表現其他治療劑。

本文引用了許多參考文獻，各文獻之全部內容以引用方式併入本文中。出於說明目的，本發明包括下列具體實例且除非另有說明，否則該等實例並非欲限制本發明之範圍。

實例1

產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素缺失體同源載體

製造用於構建產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素缺失體之同源質粒載體1162-55-20。將該質粒納入若干重要的成份；大腸桿菌質粒pUC18之複製區；產氣莢膜梭狀芽孢桿菌氣黴素(*catP*)及紅黴素(*ermBP*)抗性基因(二者亦在大腸桿菌中表現)；及藉由特定9個胺基酸缺失滅活之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素基因(*plc*)。按照下列以若干步驟製造質粒

1162-55-20。

首先，自產氣莢膜梭狀芽孢桿菌(菌株CP6)之近期禽類分離物選殖*plc*基因。使用產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13之序列(Genbank NC 003366; SEQ ID NO: 2)設計擬用於選殖*plc*基因之寡核苷酸引物。自Sigma Genosys, Woodlands, TX購得此等及所有後續引物。定位於*yplc*基因(CPE0035)內之上游引物，即5' AGCTGCATAAGCAAAAGTTCCA ACTC 3' (SEQ ID NO: 14)對應於菌株13之核苷酸47675-47700(SEQ ID NO: 2)。定位於*cobW*基因(CPE0037)內之下游引物，即5' GCAGAAACTCTTCTTAGACCTATTCTTTTAGGC 3' (SEQ ID NO: 15)係與菌株13之核苷酸50597-50629互補。在長程聚合酶鏈反應(PCR)中一起使用此等引物及來自產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株CP6之基因組DNA。可自菌株13之已知序列(如圖1中所示)預知自上游*yplc*基因至下游*cob W*基因之2955個鹼基對的產物。 α -毒素啟動子、信號序列及*plc*基因(CPE0036)編碼序列包含於此片段中，即，介於上游*yplc*基因與下游*cob W*基因之間。隨後將PCR 2955個鹼基對片段選殖至產生質粒1162-52.1之選殖用載體pCR-Blunt (Invitrogen公司，Carlsbad, CA)中。自此片段(SEQ ID NO: 22；且對應多肽係SEQ ID NO: 23)測定菌株CP 6之2955個鹼基對片段之*plc*編碼區的核苷酸序列且證實該核苷酸序列與產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13之*plc*基因的核苷酸序列(SEQ ID NO: 2)實質同源。

接下來，自往復質粒 pJIR418 選殖大腸桿菌複製區及產氣莢膜梭狀芽孢桿菌抗性基因 (Sloan 等人，1992, *Plasmid* 27, 207-219; Genebank M77169)。使用限制酵素 Bam HI 及 Spe I 消化質粒 pJIR418 並用 Klenow 聚合酶填充末端。大片段之連接反應產生質粒 1162-45.1 並恢復 Bam HI 限制酶切位點。此質粒保留大腸桿菌複製區，但不同於 pJIR418，其不含有產氣莢膜梭狀芽孢桿菌複製源。因此，該質粒能夠在大腸桿菌中但不可在產氣莢膜梭狀芽孢桿菌中自主複製。

在下一步驟中，將 *plc* 基因之 C-末端部分亞選殖至中間體質粒 1162-45.1。使用 Bam HI 及 Eco RI 消化質粒 1162-52.1 釋放一 1742 個鹼基對片段，其含有 α -毒素基因之 C-末端部分，自定位於 *plc* 基因下游之唯一 Bam HI 位點經由 *cobW* 基因至定位於母體質粒多選殖位點之 Eco RI 位點內的。在定位於質粒 1162-45.1 多選殖位點內之 Bam HI 位點與 Eco RI 位點之間選殖該 1742 個鹼基對片段。在所得質粒 1162-53.7 中，*plc* 基因之 C-末端部分與親本質粒之 *catP* 及 *ermBP* 基因係在相同轉錄取向上。

在最後一步中，將該 *plc* 基因之 N-末端部分選殖至質粒 1162-53.7 之唯一 Bam HI 位點。此可藉由製造源自在質粒 1162-52.1 中亞選殖的 α -毒素基因之 PCR 片段來完成。上游引物，即 5' ggatccAGCTGCATAAGCAAAAGTTCCA ACTC 3' (SEQ ID NO: 16) 與先前所述 *yplc* 引物 (SEQ ID NO: 4) 係一致的，只是包含側接 Bam HI 位點 (小寫字母)。定位於 α -

毒素基因內之下游引物，即 5' ggatccaATGCATTCTTATCATAATCTGGATAAGTAGAACC 3' (SEQ ID NO: 17)與菌株13之核苷酸48824-48857互補且包含側接Bam HI限制酶切位點及間隔子核苷酸以保持閱讀框架(小寫字母)。將自PCR與此等引物及質粒1162-52-1模板DNA形成之Bam HI片段選殖至質粒1162-53.7之唯一Bam HI位點。分離在相同轉錄取向上含有兩個*plc*基因區之質粒。此質粒1162-55.20含有具有期望9個胺基酸缺失並在野生型毒素之ala 61與asp 71之間添加有一leu殘基的*plc*基因(參見圖2)。該質粒之DNA測序確認該閱讀框架及24個密碼子(編碼8個胺基酸殘基)淨缺失。

實例2

產氣莢膜梭狀芽孢桿菌重組體CPERF001之構建

使用下列策略將在實例1中所構建*plc*基因之缺失型式導入產氣莢膜梭狀芽孢桿菌。該同源載體1162-55.20被稱為產氣莢膜梭狀芽孢桿菌"自殺質粒"，乃因其產氣莢膜梭狀芽孢桿菌複製源已經移除。

當將此質粒轉化成產氣莢膜梭狀芽孢桿菌時，其不能夠複製且不可存活。然而，倘若將該經轉化細菌置於氯黴素及/或紅黴素選擇下，則質粒DNA可能因與*plc*基因之同源性而被迫重組至細菌基因組中。所得重組細菌被稱為整合體。該整合體含有在*plc*基因基因座受到整合之導入同源載體的拷貝。因此，所得整合體含有兩個*plc*基因拷貝：初始正常拷貝及導入缺失型式。所導入抗性基因定位於兩

個 *plc* 基因拷貝之間。當自該整合體去除抗生素選擇時，在兩個 *plc* 基因拷貝之間發生重組。此重組事件可能產生兩種結果中的一種。在這兩種情形中，均已經移除介入兩個 *plc* 基因(包括抗性基因)拷貝間之 DNA。在第一種結果中，恢復該正常的 *plc* 基因從而可回收初始母體菌株。在第二種結果中，正常的 *plc* 基因經缺失拷貝替換，產生期望 α -毒素缺失體構建體。由於缺失體菌株之 α -毒素經滅活，所以此菌株係非溶血性的。因此，可藉由在血瓊脂平板上篩選非溶血性純系來識別期望缺失體整合體。

由於期望形成所需整合體之重組事件以低頻率發生，因此關鍵是使用具有高轉化效率之母體產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株。因此，分析產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之若干近期禽類分離物的轉化效率。使用經輕微修飾(闡述於下文中)之如 Allen 及 Blaschek (*Applied and Environmental Microbiology* 54:2322 (1988)) 所述往復質粒 pJIR418 轉化該等分離物。菌株 1240 呈現最高轉化效率(參見表 1)， 9.2×10^6 個轉化體/微克 pJIR418 質粒 DNA。選擇此菌株作為構建缺失體 CPERF001 之親本菌株。選擇菌株 29 作為 CPERF002 之親本菌株。

表 1

| 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌禽類分離物之轉化效率 | |
|----------------------|-------------------|
| 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型菌株 | 轉化體/微克pJIR418 |
| 29 | 3.6×10^4 |
| 23 | 5.6×10^2 |
| 1220 | 4.0×10^6 |
| 1240 | 9.2×10^6 |
| CP-2 | 無 |
| 1230 | 7.1×10^3 |
| 5227 | 無 |
| 5230 | 無 |

上文所列舉野生型菌株之來源係 Dr. J. Glenn Songer,
Dept. of Veterinary Sciences and Microbiology,
University of Arizona, Tucson, Arizona 85721

以 1:25 稀釋來自 TSYC 培養基 (30 克/公升胰酶大豆肉湯，5 克/公升酵母菌提取物，0.5 克/公升半胱胺酸) 之過夜厭氧培養物的產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 1240 個細胞並使之生長至 $A_{600} = 0.5436$ 。在將 100 毫升細胞以 $18,000 \times g$ 離心 10 分鐘後，藉由將細胞重新懸浮於等體積之預還原蔗糖磷酸鎂 ("SMP"，以 270 mM 蔗糖，1 mM $MgCl_2$ ，7 mM $NaPO_4$ ，pH 7.3 製備) 緩衝液中兩次繼而形成具有 0.5 毫升 SMP 之最終再懸浮液來製備電穿孔勝任細胞。此形成約 2.0 毫升最終體積。

在 0.2 公分吸收池中使用 4 微克質粒 1162-55.20 對若干等份 (100 微升) 細胞實施電穿孔。在 1.37 千伏、100 歐姆電阻及 50 微法拉電容下使用 Bio-Rad Gene Pulser II。在電穿孔後，立刻使用 2.0 毫升預還原胰酶大豆酵母菌半胱胺酸培

養基("TSYC"係以30克胰酶大豆肉湯、5克酵母菌提取物、0.5克半胱胺酸、950毫升水製備)稀釋細胞並在37°C下將其於厭氣瓶中培養3個小時。在回收期後，將細胞稀釋物置於TSYC+25微克/毫升氯黴素平板上。將此等平板在37°C下，於厭氣瓶中培育過夜。

在過夜生長之後，觀測到每微克1162-55.20 DNA平均有50個氯黴素抗性菌落。使7個推定的整合體之各菌落在非選擇性TSYC培養基中生長至出現4個連續出芽並將其置於非選擇性血瓊脂平板上。該等非選擇性原液之一即1192-31.7呈現若干非溶血性菌落。將21個此等非溶血性菌落補綴於非選擇性主平板並將複製物置於TSYC+氯黴素平板上。21個菌落中有2個對氯黴素敏感。

使1個氯黴素敏感性推定缺失體，即1192-32.14與1240野生型及整合體1192-31.7一起生長並置於血瓊脂平板上。1240野生型菌株顯示清晰的 β 溶血區而1192-32.14缺失體係非溶血性菌落之純淨培養物並將其重命名為CPERF001。

其他血液平板用作主平板並將複製物置於非選擇性及選擇性培養基上。1240野生型及CPERF001均對氯黴素及紅黴素敏感。正如吾人所預期，整合體1192-31.7對氯黴素及紅黴素二者均具有抗性。

為了排除抗生素抗性基因存在但不在CPERF001中表現之可能性，合成用於PCR反應之對氯黴素及紅黴素基因具有特異性之PCR引物。自野生型菌株、整合體菌株及CPERF001菌株製備基因組DNA並將其用作抗生素基因引

物之PCR反應的模板。PCR分析之結果顯示正響應僅來自自殺質粒及整合體而非母體1240或缺失體CPERF001。此確認抗性基因序列之預期損失。

為了確認 α -毒素基因內之缺失，藉由PCR使用適當的 α -毒素特異性引物擴增圍繞該缺失之1086 bp區。對經擴增片段實施選殖並測序。測序結果確認自 α -毒素基因之tyr 62至trp 70有9個胺基酸缺失及單一leu插入(參見圖2A-2C)。

分析CPERF001之滅活 α 類毒素蛋白表現。在無氧生長6個小時以後，收集若干等份(1毫升)細胞並離心之。藉由聚丙烯醯胺凝膠電泳分析15微升未經濃縮上清液培養基並使用針對重組 α -毒素蛋白之兔子多株抗體對其實施西方點漬分析(*Vaccine* 11(12): 1253-1258 (1993))。結果顯示：對於 α 類毒素蛋白而言，特異性抗體可與期望大小之蛋白質反應。

CPERF001係產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型菌株之經基因改造缺失體。此菌株分泌產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之滅活類毒素形式。由於此菌株不再表現活性 α -毒素但保留大部分毒素抗原性，因此其可用作疫苗以防止由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌引起的疾病。

實例3

產氣莢膜梭狀芽孢桿菌重組體CPERF002之構建

為了補償產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株29之較低轉化效率(參見上表1)，構建新穎同源載體。將該新穎載體納入直接

自菌株29基因組選殖之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌序列中。預計，此可產生更有效的重組步驟。該新穎載體係按照下列製造之1192-38.3。

在第一步驟中，自往復質粒pJIR418選殖大腸桿菌複製區及產氣莢膜梭狀芽孢桿菌抗性基因(Sloan等人, *Plasmid* 27, 207 (1992); Genebank M77169)。使用限制酵素NdeI消化質粒pJIR418。大片段之連接反應產生質粒1192-23.1。此質粒缺少產氣莢膜梭狀芽孢桿菌複製源，但不同於實例1中所構建質粒1162-45.1，其保留pJIR418之完整的多選殖位點。

在下一步驟中，將*plc*基因之C-末端部分亞選殖至中間體質粒1192-23.1中。來自菌株29之基因組DNA用作長程PCR之模板。擴增自Bam HI位點至CPE0038基因之一部分的*plc*基因(α -毒素)區域。上游*plc*引物，即5' CTGGGATCCTGATACAGATAATAATTTCTCAAAGGAT 3' (SEQ ID NO: 18)對應於菌株13之核苷酸48880-48916 (Genbank NC. 003366)。CPE0038基因內之下游引物，即5' actctgcagTTGTCATATCAATTAATAACTATAATCCC 3' (SEQ ID NO: 19)與菌株13之核苷酸51244-51275互補且含有包含Pst I限制酶切位點在內的側接核苷酸(小寫字母)。獲得2402個鹼基對之產物並用限制酵素Bam HI及Pst I消化之。使用經Bam HI及Pst I消化之1192-23.1的大片段連接此片段以產生質粒1192-36.10。

在最後一步驟中，藉由PCR選殖*plc*基因之N-末端部分。

上游引物，即 5' actgagctcCTAGACACTTTGCTTCAATATTTGGGAA 3' (SEQ ID NO: 20) 對應於菌株 13 之核苷酸 46513-46540 且包含側接核苷酸及 Sac I 位點 (小寫字母)。下游引物，即 5' actggatccGCATTCTTATCATAATCTGGATAAGTAGAACC 3' (SEQ ID NO: 21) 與菌株 13 之核苷酸 48824-48855 互補且包括側接核苷酸及 Bam HI 位點。產生 2363 個鹼基對產物並使用 Sac I 及 Bam HI 限制酵素消化此產物。將經消化片段與經 Sac I 及 Bam HI 消化之 1192-36.10 的大片段連接以產生質粒 1192-38.3。側接 1192-38.3 中 *plc* Bam HI 位點之區的後續測序確認了自 tyr 62 至 trp 70 之 9 個胺基酸缺失。

使用質粒 1192-38.3 對產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 29 細胞實施電穿孔。上文顯示菌株 29 係以 3.6×10^4 個轉化體/微克 pJIR418 質粒 DNA 之效率轉化。使菌株 29 細胞生長並按照實例 2 中對其實施電穿孔，只是在 3 小時回收期後使用液體選擇技術。不是平板接種而是以 12 毫升 TSYC+25 微克/毫升氣黴素稀釋若干等份 (0.67 毫升) 細胞並使其在 37°C 下於厭氣瓶中生長過夜。使用此修飾，乃因菌株 29 相對於 1240 具有較低轉化及平板接種效率之故。在過夜生長之後，再次在選擇培養基中稀釋細胞。隨後使來自二次出芽之細胞在無選擇時傳代 5 次，然後將其平板接種於血瓊脂平板上。來自血瓊脂平板之菌落均為溶血性的。隨後將 2 個血液平板一式兩份平板接種至 TSYC、TSYC+25 微克/毫升氣黴素及 TSYC+50 微克紅黴素平板。所有菌落均對紅黴素敏

感但130個菌落中僅有1個對氣黴素敏感。將此菌落1192-45.4B重命名為CPERF002。使用 α -毒素特異性引物對來自CPERF002之基因組DNA實施PCR分析，顯示 α -毒素陽性帶。此帶較來自野生型菌株29 DNA之對應帶更小。對氣黴素及紅黴素抗性基因具有特異性之引物不能夠擴增CPERF002 DNA但自質粒1192-38.3顯示強陽性帶。對CPERF002 α -毒素實施測序，確認9個胺基酸缺失(參見圖3)。

分析CPERF002之滅活 α 類毒素蛋白表現。在無氧生長6個小時以後，收集若干等份(1毫升)的細胞並離心之。藉由聚丙烯醯胺凝膠電泳分析15微升未經濃縮上清液培養基並使用針對重組 α -毒素蛋白之兔子多株抗體對其實施西方點漬分析(*Vaccine* 11(12): 1253-1258 (1993))。結果顯示：對於 α 類毒素蛋白而言，特異性抗體可與期望大小之蛋白質反應。

CPERF002係產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型菌株之經基因改造缺失體。此菌株分泌產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之滅活類毒素形式。由於此菌株不再表現活性 α -毒素但保留大部分毒素抗原性，因此其可用作疫苗以防止由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌引起的疾病。

實例4

產氣莢膜梭狀芽孢桿菌缺失體疫苗

評定實例2及實例3中所述CPERF001及CPERF002缺失體疫苗菌株提供針對野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌挑戰之保

護的能力。將該研究之第一部分設計為測定所投與活疫苗菌株對孵化蛋之孵化率是否具有任何不利影響。實驗群組之分配及安全性結果闡述於表2中。

表2

安全性結果

| 群組* | 疫苗(劑量)** | 孵化蛋之數量 (%) |
|-----|---|------------|
| 1 | CPERF001 (0.8×10^2) ^x | 18 (90%) |
| 2 | CPERF001 (0.8×10^3) | 17 (85%) |
| 3 | CPERF001 (0.8×10^4) | 11 (55%) |
| 4 | CPERF001 (0.8×10^5) | 16 (80%) |
| 5 | CPERF002 (1.9×10^2) | 16 (80%) |
| 6 | CPERF002 (1.9×10^3) | 17 (85%) |
| 7 | CPERF002 (1.9×10^4) | 14 (70%) |
| 8 | CPERF002 (1.9×10^5) | 12 (60%) |
| 9 | 菌株1240 (1.5×10^3) | 16 (80%) |
| 10 | 菌株29 (3.7×10^3) | 13 (65%) |
| 11 | 培養基對照 | 19 (95%) |
| 12 | 未接種對照 | 18 (90%) |

* 20個蛋每群組

** 在孵化18天時以卵內方式投與100微升劑量(IM)

^x以菌落形成單位("cfu")量測每個劑量之效價。

在投與 10^3 或更少劑量(群組1、2、5及6)時，此等群組並非較僅接種培養基之群組(群組11)或未經接種之群組(群組12)具有明顯更低的孵化率。在最低劑量時，CPERF001顯示與培養基對照相同且較未經接種對照群組更佳的孵化率。

由於較高劑量之缺失體可對蛋孵化率具有不利影響，因此該研究之有效部分僅包含每一缺失體之2個最低劑量的群組。使用(野生型)產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株激發此等

群組以及培養基對照鳥類(群組11)，該菌株CP6係在鳥有20、21及22天大時以約 10^8 cfu/毫升/只鳥經口投與。在25天大時對所有鳥實施屍體檢剖並使有下文所概述壞死性腸炎評定量表對小腸內損傷實施打分。

| 0記分 | 壞死性腸炎1+ | 壞死性腸炎2+ | 壞死性腸炎3+ | 壞死性腸炎4+ |
|-----------------------------------|--|---|--|-------------------------|
| 在小腸上無NE肉眼可見損傷；腸具有正常的彈性(在打開後自動卷回)。 | 腸壁薄且軟垂(在打開時腸保持平坦且不會卷回至正常位置)；有過量或黏稠黏液覆蓋於黏膜上或者病灶或多病灶使黏膜中度變紅或漿膜管充血。 | 單一或少數多病灶區使腸壁變紅並腫脹；單一或少數多病灶區使腸黏膜出現潰瘍或壞死。 | 大量多病灶區使腸黏膜出現壞死及潰瘍±黏膜表面上大量出血或出現血纖蛋白層或壞死碎屑(土耳其浴巾外觀)。 | 具有NE肉眼可見損傷記分2+或以上之死亡動物。 |

可依照 Charles Hofacre, D.V.M., M.A.M., Ph.D., University of Georgia, Poultry Diagnostic and Research Center, 953 College Station Road, Athens, GA 30602對記分實施較小改動。

在研究結束時對來自未經接種對照群組(未受激發)之五(5)只鳥實施屍體檢剖以確認在研究過程中未暴露於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌。結果示於表3中。

表 3
擬保護之治療群組* 結果

| 群組* | 疫苗 | 卵內疫苗劑量(cfu) | 使用產氣莢膜梭狀芽孢桿菌激發時之大小(天) | 數量 | 平均值 |
|-----|----------|-----------------|-----------------------|----|------|
| 1 | CPERF001 | 1×10^2 | 20、21及22 | 9 | 0.67 |
| 2 | CPERF001 | 1×10^3 | 20、21及22 | 13 | 0.46 |
| 5 | CPERF002 | 1×10^2 | 20、21及22 | 12 | 1.33 |
| 6 | CPERF002 | 1×10^3 | 20、21及22 | 12 | 1.08 |

| | | | | | |
|----|-------|---|----------|----|------|
| 11 | 培養基對照 | 無 | 20、21及22 | 15 | 1.80 |
| 12 | 無 | 無 | 未受激發 | 5 | 0.00 |

*在25天大時實施屍體檢剖

與群組11相比，群組1及群組2各自之記分在統計學上明顯更低(Wilcoxon Exact Rank Sum Test $p \leq 0.0250$)。群組5及群組6之平均記分較群組11更低但在統計學上無不同(Wilcoxon Exact Rank Sum Test $p \geq 0.2177$)。依照David Siev所述程序 [*Journal of Modern Applied Statistical Methods*, 第4卷, No. 2, 500-508 (2005)]對疫苗效率實施評定。當與群組11對比時，將疫苗在降低疾病嚴重性方面之效率評定為54%(群組1)、65%(群組2)、20%(群組5)及27%(群組6)。

實例5

產氣莢膜梭狀芽孢桿菌豬缺失體之構建

使用上文實例1及實例2中所用策略來自產氣莢膜梭狀芽孢桿菌豬菌株構建 α -毒素缺失突變體。開始，使用質粒pJIR418對來自患病豬之野外分離物實施電穿孔以評定其可轉化性。產生 $\geq 10^4$ 個轉化體每微克質粒DNA並對氣黴素或紅黴素敏感之分離物係缺失之候選者。

來自候選菌株之基因組DNA用作 plc (α -毒素)基因及側接序列之長程PCR的模板。在亞選殖PCR產物之後，對 α -毒素基因及、側接區實施測序並繪製限制性內切酶譜。藉助側接限制酶切位點合成新穎寡核苷酸引物並將2次獨立擴增之產物選殖至自殺質粒1192-23.1以製造如實例1中所

述27個鹼基對缺失。

將該豬自殺載體電穿孔至對應產氣莢膜梭狀芽孢桿菌之豬菌株並使用上文實例2中所述方法分離缺失突變體。藉由血瓊脂平板上不存在 β 溶血作用及藉由對 α -毒素基因實施DNA測序來確認缺失突變體。

此構建體係產氣莢膜梭狀芽孢桿菌A型菌株之經基因改造缺失體。此菌株分泌產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之滅活類毒素形式。由於此菌株不再表現活性 α -毒素但保留大部分毒素'抗原性，因此其可用作疫苗以防止豬患由產氣莢膜梭狀芽孢桿菌引起的疾病。

生物寄存

下列生物材料之培養物已經由下列國際寄存機構寄存：

美國典型培養物保藏中心(ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A.，在滿足國際認可用於專利程序目的之布達佩斯微生物寄存條約(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure)要求的條件下寄存。

| 生物體 | 登記編號 | 寄存日期 |
|---|---------|-----------|
| 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054 | PTA7364 | 2006年2月7日 |
| 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053 | PTA7365 | 2006年2月7日 |

【圖式簡單說明】

圖1闡明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素編碼區之基因組圖。圖中展示用於構建CPERF001之兩個大片段(1182鹼基對及1746鹼基對)各自之定位。圖中亦指出所形成的27鹼基對缺失之定位。"Yplc"表示yplc基因(CPE0035)；"plc"表示編碼 α -毒素(磷脂酶C)之基因且"CobW"表示下游基因。

圖2A闡明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株CP6之plc基因之一部分的序列[SEQ ID NO: 4；此係CP6之plc基因片段之SEQ ID NO: 22的一部分(即，核苷酸262-300)]及對應肽序列(SEQ ID NO: 5)，其中下劃線表示用於形成該缺失之BamH1內切核酸酶限制酶切位點。

圖2B闡明用於在母體產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株1240中形成缺失之引物的序列(SEQ ID NO: 6)，此形成缺失體CPERF001。下劃線表示該引物中所含BamH1限制酶切位點以便於構建該缺失。圖中亦闡明對應肽(SEQ ID NO: 7)。

圖2C闡明CPERF001 (SEQ ID NO: 8；核苷酸103-117)中及對應肽(SEQ ID NO: 9)中所形成缺失之序列。下劃線表示復原BamH1內切核酸酶限制酶切位點。

圖3A再次闡明產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株CP6之plc基因之一部分的序列[SEQ ID NO: 4，核苷酸262-300]及對應肽序列(SEQ ID NO: 5)，其中下劃線表示用於形成該缺失之BamH1內切核酸酶限制酶切位點。

圖3B闡明用於在母體產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株29中形成缺失之引物的序列(SEQ ID NO: 10)，此形成缺失體

CPERF002。圖中亦闡明對應肽(SEQ ID NO:11)。

圖 3C 闡明 CPERF002 中所形成缺失之序列(SEQ ID NO: 12)及對應肽(SEQ ID NO: 13)。

序列表

<110> 瑞士商先靈葆雅有限公司
 <120> 重組之滅毒梭狀芽孢桿菌生物體及疫苗
 <130> AH06175
 <140> 096113489
 <141> 2007-04-17
 <150> 60/792,553
 <151> 2006-4-17
 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 13
 <400> 1

Met Lys Arg Lys Ile Cys Lys Ala Leu Ile Cys Ala Thr Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Trp Ala Gly Ala Ser Thr Lys Val Tyr Ala Trp Asp Gly Lys
 20 25 30
 Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr Gln Gly Val Ser
 35 40 45
 Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser Lys Asn Glu Pro Glu Ser Val Arg Lys
 50 55 60
 Asn Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asn Met His Glu Leu Gln Leu Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His
 85 90 95
 Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp Asn Asn Phe Ser Lys Asp Asn Ser Trp
 100 105 110
 Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser Gln Ile Arg Lys
 115 120 125
 Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly Asn Tyr Lys Gln
 130 135 140

Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp
145 150 155 160

Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly His
165 170 175

Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile
180 185 190

Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr Ala Asp Ile Leu
195 200 205

Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe
210 215 220

Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala Ser Met Ser His
225 230 235 240

Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser
245 250 255

Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser
260 265 270

Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala
275 280 285

Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met
290 295 300

Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met
305 310 315 320

Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr
325 330 335

Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met
340 345 350

Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro
355 360 365

Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp
370 375 380

Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys
 385 390 395

<210> 2
 <211> 1197
 <212> DNA
 <213> 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 13

<400> 2
 atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctacgc tagcaactag cctatgggct 60
 ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaagattg atggaacagg aactcatgct 120
 atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaaatgatc tgtccaaaaa tgaaccagaa 180
 agtgtaagaa aaaacttaga gatttttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct 240
 acttatccag attatgataa gaatgcatat gatctatata aagatcattt ctgggacatc 300
 gatacagata ataatttctc aaaggataat agttgggtatt tagcttattc tatacctgac 360
 acaggggaat cacaaataag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga 420
 aactataaac aagctacatt ctatcttggg gaggctatgc actattttgg agatatagat 480
 actccatata atcctgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgaa 540
 acttttgcag aggaaagaaa agaacagtat aaaataaaca cagcaggttg caaaactaat 600
 gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaggatttta atgcatggtc aaaagaatat 660
 gcaagagggt ttgctaaaac aggaaaatca atatactata gtcattgctag catgagtcac 720
 agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca 780
 gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga 840
 aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca 900
 gatgactaca tgtattttgg aatcaaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg 960
 gacaaccag gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaatataaa 1020
 gatgaaaatc taaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca 1080
 gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagttgta 1140
 gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa 1197

<210> 3
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 13

<400> 3

Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr

<400> 6
aatgcattgg atcc

14

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 寡肽

<400> 7

Asn Ala Leu Asp
1

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> 寡核苷酸

<400> 8
aatgcattgg atcct

15

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 寡肽

<400> 9

Asn Ala Leu Asp Pro
1 5

<210> 10
<211> 14
<212> DNA
<213> 寡核苷酸

<400> 10
aatgcggatc cagt

14

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> 寡肽

<400> 11

Asn Ala Asp Pro
1

<210> 12
<211> 12
<212> DNA
<213> 寡核苷酸

| | | |
|---|--|----|
| <400> 12 | | |
| aatgcggatc ct | | 12 |
| <210> 13 | | |
| <211> 4 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> 寡肽 | | |
| <400> 13 | | |
| Asn Ala Asp Pro | | |
| 1 | | |
| <210> 14 | | |
| <211> 26 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 寡核苷酸 | | |
| <400> 14 | | |
| agctgcataa gcaaaagttc caactc | | 26 |
| <210> 15 | | |
| <211> 33 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 寡核苷酸 | | |
| <400> 15 | | |
| gcagaaactc ttcttagacc tattctttta ggc | | 33 |
| <210> 16 | | |
| <211> 32 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 寡核苷酸 | | |
| <400> 16 | | |
| ggatccagct gcataagcaa aagttccaac tc | | 32 |
| <210> 17 | | |
| <211> 41 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 寡核苷酸 | | |
| <400> 17 | | |
| ggatccaatg cattcattatc ataactctgga taagtagaac c | | 41 |
| <210> 18 | | |
| <211> 37 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 寡核苷酸 | | |
| <400> 18 | | |
| ctgggatcct gatacagata ataatttctc aaaggat | | 37 |

<210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸

 <400> 19
 actctgcagt tgtcatatca attaaattaa ctataatccc 40

<210> 20
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸

 <400> 20
 actgagctcc tagacacttt gcttcaatat ttgggaa 37

<210> 21
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸

 <400> 21
 actggatccg cattcttatac ataatctgga taagtagaac c 41

<210> 22
 <211> 1197
 <212> DNA
 <213> 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 CP6

 <400> 22
 atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctgcg tagcaactag cctatgggct 60
 ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaaaattg atggaacagg aactcatgct 120
 atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaaatgatc tgtctaaaaa tgaaccagaa 180
 agtgtaagaa aaaacttaga gattttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct 240
 acttatccag attatgataa gaacgcctat gatctatac aagatcattt ctgggatcct 300
 gatacagata ataatttctc aaaggataat agttggtatt tagcttattc tatacctgac 360
 acaggggaat cacaaataag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga 420
 aactataaac aagctacatt ctatcttga gaggctatgc actattttgg agatatagat 480
 actccatata atcctgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgag 540
 acttttgcag aggaaagaaa agaacagtat aaaataaaca cagcaggttg caaaactaat 600
 gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaagatttta atgcatggtc aaaagaatat 660
 gcaagagggt ttgctaaaac aggaaaatca atatactata gtcatgctag catgagtcac 720
 agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca 780
 gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga 840

aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca 900
gatgactaca tgtatTTTTGG aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg 960
gacaaccag gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaattaaaa 1020
gatgaaaatc taaaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca 1080
gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagttgta 1140
gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa 1197

<210> 23

<211> 398

<212> PRT

<213> 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株 CP6

<400> 23

Met Lys Arg Lys Ile Cys Lys Ala Leu Ile Cys Ala Ala Leu Ala Thr
1 5 10 15

Ser Leu Trp Ala Gly Ala Ser Thr Lys Val Tyr Ala Trp Asp Gly Lys
20 25 30

Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr Gln Gly Val Ser
35 40 45

Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser Lys Asn Glu Pro Glu Ser Val Arg Lys
50 55 60

Asn Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asn Met His Glu Leu Gln Leu Gly Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His
85 90 95

Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp Asn Asn Phe Ser Lys Asp Asn Ser Trp
100 105 110

Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser Gln Ile Arg Lys
115 120 125

Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly Asn Tyr Lys Gln
130 135 140

Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp
145 150 155 160

Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly His
 165 170 175

Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile
 180 185 190

Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr Ala Asp Ile Leu
 195 200 205

Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe
 210 215 220

Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala Ser Met Ser His
 225 230 235 240

Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser
 245 250 255

Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser
 260 265 270

Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala
 275 280 285

Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met
 290 295 300

Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met
 305 310 315 320

Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr
 325 330 335

Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met
 340 345 350

Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro
 355 360 365

Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp
 370 375 380

Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys
 385 390 395

五、中文發明摘要：

本發明揭示表現實質無毒性 α -毒素之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌(*Clostridium perfringens*)生物體。所表現之 α -毒素係一種缺失突變蛋白，相對於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌株13之成熟 α -毒素之 α -毒素，缺少包含His₆₈的至少9個連續胺基酸殘基。本發明亦揭示編碼該等突變蛋白之減毒生物體以及此等減毒生物體作為疫苗之用途。

六、英文發明摘要：

The present invention discloses attenuated *Clostridium perfringens* organisms that express a substantially nontoxic alpha-toxin. The expressed alpha-toxin is a deletion mutein that relative to the alpha-toxin of the mature alpha-toxin of *Clostridium perfringens* strain 13, is missing at least nine consecutive amino acid residues including His68. The present invention also discloses attenuated organisms that encode the muteins, as well as the use of such attenuated organisms as vaccines.

公告本

十一、圖式：

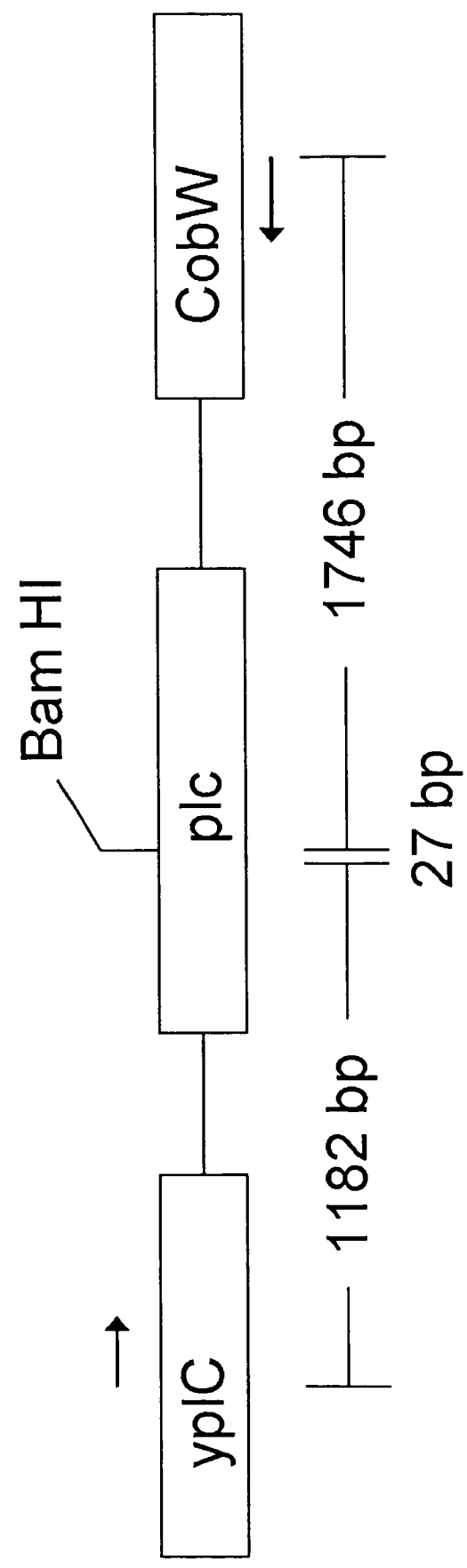


圖 1

SEQ ID NO: 4 -AAC GCC TAT GAT CTA TAT CAA GAT CAT TTC TGG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 5 -Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro-

圖 2A

SEQ ID NO: 6 -AAT GCa ttg gat cc
 SEQ ID NO: 7 -Asn Ala Leu Asp

圖 2B

SEQ ID NO: 8 -AAT GCA TTG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 9 -Asn Ala Leu Asp Pro-

圖 2C

SEQ ID NO: 4 -AAC GCC TAT GAT CTA TAT CAA GAT CAT TTC TGG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 5 -Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro-

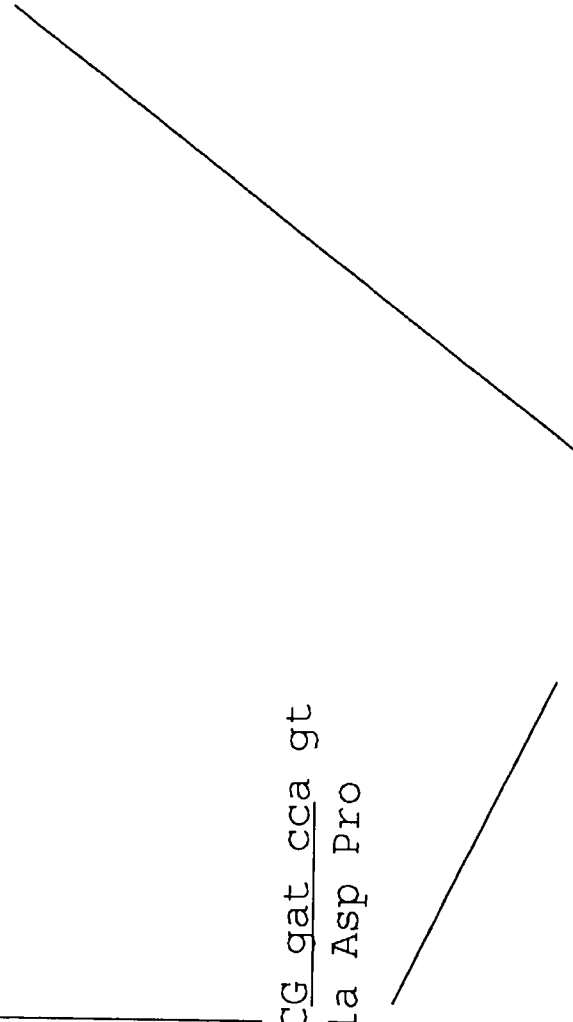
圖 3A

SEQ ID NO: 10 -AAT GCG gat cca gt
 SEQ ID NO: 11 -Asn Ala Asp Pro

圖 3B

SEQ ID NO: 12 -AAT GCG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 13 -Asn Ala Asp Pro-

圖 3C



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

99年10月5日修(訂)正本

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種編碼產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium perfringens*) α -毒素之實質無毒性突變蛋白的核酸分子，其中該突變蛋白 α -毒素包含減去至少9個但不大於48個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；且其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。
2. 如請求項1之核酸分子，其中該突變蛋白 α -毒素包含減去至少12個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；且其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。
3. 如請求項2之核酸分子，其中該突變蛋白 α -毒素包含減去至少18個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；且其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。
4. 如請求項1之核酸分子，其中該突變蛋白 α -毒素包含減去Tyr₆₂至Trp₇₀範圍之9個連續胺基酸殘基的SEQ ID NO: 3。
5. 如請求項1之核酸分子，其包含SEQ ID NO: 2之核酸序列；其中該核酸分子之核苷酸268-294缺失。
6. 如請求項5之核酸分子，其中該等缺失核苷酸係由一個編碼單一Leu殘基之核苷酸序列替代。
7. 一種產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白，其中該突變蛋白 α -毒素包含減去至少9個但不大於48個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；且其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。
8. 如請求項7之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性

- 突變蛋白，其中該突變蛋白 α -毒素包含減去至少12個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；且其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。
9. 如請求項8之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白，其中該突變蛋白包含減去至少18個連續胺基酸殘基之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；且其中該等缺失胺基酸殘基之一係His₆₈。
 10. 如請求項7之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白，其中Tyr₆₂至Trp₇₀範圍之9個連續胺基酸殘基缺失且由單一Leu殘基替代。
 11. 一種減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其係藉由將如請求項1之核酸分子整合入未減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之染色體中所構建，藉此將野生型 α -毒素基因以如請求項1之核酸分子取代。
 12. 如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其係實質無毒的。
 13. 如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該核酸分子位於染色體上之位置與編碼未減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌中存在之野生型 α -毒素之核酸分子之位置同源。
 14. 如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其係A型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌。
 15. 如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中用於構建之未減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌可自哺乳動物

或禽類之宿主動物分離。

16. 如請求項15之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該哺乳動物係選自牛、羊、及豬組成之群。
17. 如請求項15之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該禽類係雞、火雞、鵝、鴨、天鵝、野鴿(dove)、家鴿(pigeon)、松雞、或山鶉(partridge)。
18. 如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其包含至少一個編碼非產氣莢膜梭狀芽孢桿菌多肽之基因。
19. 如請求項18之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該非產氣莢膜梭狀芽孢桿菌多肽係非細菌多肽。
20. 如請求項19之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該非細菌多肽係禽類或哺乳動物多肽。
21. 如請求項20之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該非細菌多肽係禽類多肽。
22. 如請求項20之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該非細菌多肽係細胞介素(cytokine)。
23. 如請求項22之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其中該細胞介素係雞IL-18。
24. 一種疫苗，其包含如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體。
25. 如請求項24之疫苗，其進一步包括一或多種下列物質：
藥理學上可接受之緩衝劑、賦形劑、或佐劑。
26. 一種免疫有效劑量之如請求項24之疫苗的用途，其係用於製造一種用於誘發動物對於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌免

疫性的藥物。

27. 如請求項26之用途，其中藉由下列途徑之一或多種投與該疫苗：經口、肌內、靜脈內、皮內、皮下、或鼻內。
28. 如請求項26之用途，其中該疫苗施於動物飼料之表面上。
29. 如請求項26之用途，其中該疫苗噴灑於動物以便於經口投藥。
30. 一種動物飼料，其包含如請求項24之疫苗。
31. 一種抗體，其可選擇性地結合於一個存在於產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素中，但不存在於如請求項7之產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素之實質無毒性突變蛋白中之抗原決定部位(epitope)，其中該抗體可區分該實質無毒性突變蛋白與野生型產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 α -毒素。
32. 一種測試套組，其用於識別動物個體是否已自然感染產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其包含如請求項31之抗體。
33. 一種識別已自然感染產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物與用如請求項11之減毒產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體接種之動物的方法，該方法包括：
 - (a)使該動物之流體試樣與如請求項31之抗體接觸，
 - (b)測定該抗體是否與該流體試樣反應；其中當該抗體與該流體試樣反應時，該動物識別為已自然感染產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體之動物。
34. 一種產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其係具有ATCC寄

存編號PTA7364之CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054(BCRC寄存編號BCRC 910359)。

35. 一種產氣莢膜梭狀芽孢桿菌生物體，其係具有ATCC寄存編號PTA7365之CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053(BCRC寄存編號BCRC 910358)。