

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 1/04

A61K 35/74 A61K 39/02

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97180328.5

[43]公开日 1999 年 12 月 29 日

[11]公开号 CN 1239997A

[22]申请日 97.12.5 [21]申请号 97180328.5

[30]优先权

[32]96.12.5 [33]US[31]60/032,423

[86]国际申请 PCT/GB97/03375 97.12.5

[87]国际公布 WO98/24882 英 98.6.11

[85]进入国家阶段日期 99.6.4

[71]申请人 扇形支撑剑桥有限公司

地址 英国诺丁汉

[72]发明人 A·G·图纳克里夫 D·T·威尔史

B·J·罗瑟 K·S·德哈利瓦尔

C·克拉克

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 41 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 保存原核细胞的方法和由此获得的组合物

[57]摘要

本发明提供干燥和稳定原核细胞的方法,及由此获得的组合物。首先在足以诱导细胞内海藻糖的条件下培养或温育细胞,将其悬浮于稳定液中并干燥,形成一种固态玻璃。所得产物在室温下有贮存稳定性,贮存后几乎不丧失生存力。

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

权利要求书

1. 一种保存原核细胞的方法，它包括以下步骤：
 - a) 将原核细胞的细胞内海藻糖浓度提高至对提高贮存稳定性有效的量；
 - b) 将步骤 a) 中获得的原核细胞与一种包含稳定剂的干燥液相混合；以及
 - c) 在一定条件下干燥步骤 b) 的产物，该条件足以产生具有低于约 5% 残余湿度的玻璃形式的稳定剂。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中提高细胞内海藻糖浓度的方法选自：在足以增强细胞内海藻糖产生的摩尔渗透压浓度中培养、表达重组海藻糖合成酶基因以及引入外源海藻糖。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中摩尔渗透压浓度至少是约 350 毫摩尔渗透压-1.5 摩尔渗透压。
4. 根据权利要求 2 的方法，其中摩尔渗透压浓度至少是约 400 毫摩尔渗透压-1 摩尔渗透压。
5. 根据权利要求 2 的方法，其中摩尔渗透压浓度至少是约 300 毫摩尔渗透压。
6. 根据权利要求 2 的方法，其中摩尔渗透压浓度至少是约 500 毫摩尔渗透压。
7. 根据权利要求 2 的方法，其中通过加入至少一种盐提高摩尔渗透压浓度，其中该盐选自 Na_2PO_4 、 KH_2PO_4 、 NH_4Cl 、 NaCl 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、盐酸硫胺素或其任何组合。
8. 根据权利要求 1 的方法，其中原核细胞是细菌。
9. 根据权利要求 8 的方法，其中该细菌选自埃希氏杆菌属、芽孢杆菌属、沙门氏菌属或弧菌属。
10. 根据权利要求 1 的方法，其中该稳定剂是海藻糖。
11. 根据权利要求 10 的方法，其中海藻糖的细胞内浓度至少是约 100mM。

12. 根据权利要求 1 的方法, 其中该稳定剂是非还原糖类。
13. 根据权利要求 12 的方法, 其中干燥液包含至少约 25% 的非还原糖类。
14. 根据权利要求 12 的方法, 其中干燥液包含至少约 45% 的非还原糖类。
15. 根据权利要求 12 的方法, 其中非还原糖类选自: 海藻糖、麦芽糖醇 (4-邻- β -D-葡吡喃糖基-D-葡糖醇)、乳糖醇 (4-邻- β -D-半乳吡喃糖基-D-葡糖醇)、palatinit[GPS (α -D-葡吡喃糖基-1 $\rightarrow$ 6-山梨糖醇) 和 GPM (α -D-葡吡喃糖基-1 $\rightarrow$ 6-甘露醇) 的一种混合物]、GPS、GPM 及氢化麦芽寡糖和麦芽寡糖。
16. 根据权利要求 1 的方法, 其中干燥包括以下步骤:
 - a) 蒸发溶液以获得糖浆;
 - b) 将糖浆暴露于压力降低的外部压力下和足以导致糖浆沸腾的温度下; 以及
 - c) 去除湿气, 以使残余湿度不超过约 5%。
17. 根据权利要求 16 的方法, 其中真空最初是大约 30mT, 初始温度大约 40 $^{\circ}$ C。
18. 根据权利要求 1 的方法, 其中步骤 c) 进一步包括步骤 i) 保持大约 40 $^{\circ}$ C 的温度约 16 小时; 以及 ii) 以每分钟大约 2.5 $^{\circ}$ C 的速度以约 2 $^{\circ}$ C 的增加量将温度逐渐升高至约 80 $^{\circ}$ C, 其中每次增加持续约 12 分钟。
19. 根据权利要求 1 的方法, 其中该玻璃具有不超过约 2.5% 的残余湿度。
20. 根据权利要求 1 的方法, 其中该玻璃是发泡的玻璃基质。
21. 一种根据权利要求 1 的方法所获得的组合物。
22. 根据权利要求 21 的方法, 其中该溶剂是水。
23. 根据权利要求 1 的方法, 其进一步包括步骤 d) 通过加入一种合适的溶剂重建原核细胞。
24. 一种重建干燥的、稳定的原核细胞的方法, 其包括以足以达到生存力的量将一种合适的溶剂加入权利要求 1 所获得的干燥的原核细胞中。

说明书

保存原核细胞的方法和由此获得的组合物

技术领域

本发明涉及保存细胞的领域。更具体而言，它涉及干燥和稳定原核细胞的方法，及由此获得的组合物。

背景技术

活原核细胞，尤其是细菌，已被日益广泛地用于重要的医学、农业和工业应用。农业或环境应用包括生物杀虫剂和生物除污。医学应用包括活细菌在疫苗中的应用，以及用于药物产品或许多工业组合物的产生。活菌疫苗的应用增多，使生物工程学以及对传染病治疗的集中研究在过去的二十年中显著增长。

当根据希望的结果和费用来保存其能被有效使用的生存力时，细菌细胞必须能被贮存一段特定时间。已证实贮存生存力是一个主要的困难。保存活原核细胞的方法具有几个严重的缺点，例如是耗费能量的并且需要冷藏。此外，现有的保存方法不能提供令人满意的经贮存后的生存力，特别是当细胞贮存于环境温度或更高的温度时。

冷冻干燥通常用于原核细胞的保存和贮存。然而，它具有所不希望的特性，如显著降低生存力以及费时、耗费能源，因此是昂贵的。冷冻干燥包括将细胞置于溶液中，冷冻该溶液，并在一定条件下将冷冻的固体暴露于真空，在该条件下通过升华作用去除水和其它任何挥发性的成分而保留固体。产生的干燥制剂包含原核细胞。

尽管冷冻干燥十分普遍，但冷冻干燥的细菌在环境温度下是不稳定的，因此需要通过冷藏来贮存。然而，即使冷藏时细胞也能快速丧失生存力。可以通过赋形剂如冷冻保护剂的使用，使该方法引起的损害降低至一定程度。然而，冷冻保护剂随后可与干燥的细胞反应，影响冷冻干燥的原核细胞在贮存中固有的不稳定性。

用于制备干燥的、据称稳定的原核细胞制剂的其它方法如环境温度干

干燥、喷雾干燥、液体制剂以及含冷冻保护剂的细菌培养物的冷冻也有缺点。关于原核生物的干燥耐受性的综述，见 Potts (1994) 微生物学综述 (Micro. Rev.) 58: 755-805。环境温度干燥技术去除了冷冻步骤及与冷冻相关的对物质的损伤，这些技术在水的去除方面更加快速和节约能源。Crowe 等人 (1990) 低温生物学 (Cryobiol.) 27: 219-231。然而，环境温度干燥通常不能产生令人满意的生存力。喷雾干燥法造成有限的贮存时间和生存力的降低，甚至当使用稳定的赋形剂时也如此。综述见 Lievens 和 van't Reit (1994) 生化工程学/生物工程学进展 (Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.) 51:45-63;72-89。液体制剂仅可提供短期的稳定并且需要冷藏。冷冻的细菌培养物导致对细菌细胞壁的实质性损伤和生存力的损失，通过冷冻保护剂的使用仅仅可以缓解但不消除这种后果。而且，这些冷冻的培养物也需要冷藏贮存。

海藻糖 (α -D-葡吡喃糖基- α -D-葡吡喃糖苷) 是天然发生的、非还原二糖，最初发现它在特定的植物和动物中与脱水的防止有关，这些植物和动物能不被损伤地干燥，并能在再水合时复苏。已显示海藻糖可用于防止脱水过程中蛋白质、病毒和食品的变性。见美国专利号 4,891,319; 5,149,653; 5,026,566; Blakeley 等人 (1990) 柳叶刀 (Lancet) 336: 854-855; Roser (1991 年 7 月) 食品科学和技术趋势 (Trends in Food Sci. and Tech.) 10: 166-169; Colaco 等人 (1992) 国际生物工程学 (Biotechnol. Internat.) 1:345-350; Roser (1991) 生物药物学 (BioPharm.) 4: 47-53; Colaco 等人 (1992) 生物/技术 (Bio/Tech) 10: 1007-1011; 以及 Roser 等人 (1993 年 5 月) 新科学家 (New Scientist) 25-28 页。海藻糖二水合物是可商业获得的优质生产规范 (GMP) 级的结晶制剂。EP 专利公开文本 639 645 A1 中描述了一种从淀粉中制备海藻糖的方法。该方法包括两个步骤，淀粉的酶生物转化产生海藻糖糖浆，通过结晶作用从糖浆中回收糖。

细菌能够通过积累和/或合成钾及少数类型的有机分子(包括某些糖)来对抗渗透压休克。在不含任何渗透保护化合物的葡萄糖-无机物培养基中，细菌如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的渗透调节包括海藻糖的内源产生。Larsen 等人 (1987) 微生物学档案 (Arch. Microbiol.) 147: 1-7; Dinnbier

等人 (1988) 微生物学档案 150: 348-357; Giaever 等人 (1988) 细菌学杂志(J. Bacteriol.) 170: 2841-2849; 以及 Welsh 等人 (1991) 普通微生物学杂志(J. Gen. Microbiol.)137: 745-750。

保存原核细胞的一种方法是在海藻糖的存在下冷冻干燥。见例如, Israeli 等人 (1993) 低温生物学 30: 519-523。然而, 该方法不能提供令人满意的生存力。Israeli 等人在 100mM 海藻糖的存在下冷冻干燥大肠杆菌, 但仅报道了干燥样品在 21℃ 下暴露于空气后 4 天的存活数据。以后的研究检测了在海藻糖存在下冷冻干燥的大肠杆菌和 *Bacillus fluoringiensis* 的存活率。Leslie 等人 (1995) 应用环境微生物学(Appl. Env. Microbiol.)61: 3592-3597。仅报道干燥样品暴露于空气后 4 天的存活数据。

在海藻糖存在下将冷冻干燥的大肠杆菌与空气干燥 (在氮气中密封) 的大肠杆菌相对比的另一个研究报道, 贮存 25 周的细胞其存活率为每毫升大约 10^7 到超过 10^{10} 菌落形成单位 (CFU), 但细胞贮存于 4℃。Louis 等人 (1994) 应用微生物学和生物工程学 (Appl. Microbiol. Biotechnol.)41: 684-688。

由于活细菌应用的增加和现有的关于在贮存期间保持细菌生存力的问题, 所以迫切需要廉价地干燥和稳定原核细胞的方法。特别希望的是发展允许将干燥的原核细胞贮存于环境温度下、即不需要冷藏的方法。在此描述的方法通过提供干燥的、显著的贮存稳定性的原核细胞以满足这种需要, 这些细胞保留生存力而不需要冷藏。

在此引用的所有参考文献由此全部引入作为参考。

发明概述

本发明包括产生干燥的、稳定的原核细胞的方法。本发明也包括通过这些方法产生的组合物, 以及重建这些原核细胞的方法。

因此, 一方面, 本发明提供保存原核细胞的方法, 包括在将细胞内海藻糖浓度提高至对提高贮存稳定性有效的量的条件下培养原核细胞, 将原核细胞与包含一种稳定剂如海藻糖的干燥液相混合, 以及干燥原核细



胞以产生具有低于约 5% 的残余湿度的一种玻璃 (glass)。

附图简述

图 1 显示由多种生物的基因所编码的海藻糖合成酶氨基酸序列的比较：1. 乳酸克鲁维酵母菌 (*Kluyveromyces lactis*)；2. 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)；3. 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)；4. 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；5. 麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 和 6. 大肠杆菌 (分别为 SEQ ID NOS:1-6)。

图 2 是检测海藻糖合成酶基因在大肠杆菌和沙门氏菌 (*Salmonella*) 中存在的 Southern 印迹的中等程度显色。左侧的水平线分别代表 23、9.3、6.6、4.4、2.3、2.0 和 0.56kb 的分子量标准参照物 (λ HindIII)。

图 3 是描述在 37°C 贮存后大肠杆菌 NCIMB 9484 稳定性的图。圆圈表示细胞内海藻糖诱导，三角代表无海藻糖诱导。

图 4 是描述在 45% 海藻糖和 1.5% Kollidon 90 的制剂中 Tg 与残余湿度之间关系的图。

图 5 是描述在 45% 海藻糖和 0.1% CMC 的制剂中残余湿度与干燥时间长度之间关系的图。FTS 干燥方案是 30mT ST 40°C (x 小时)。

图 6A 和图 6B 是描述高摩尔渗透压浓度条件 (0.5M NaCl) 对细胞内海藻糖浓度之影响的图。图 6A 显示细胞内海藻糖浓度的积累和大肠杆菌在 Evans 培养基和 0.5M NaCl 中 37°C 生长的生长曲线。图 6B 显示细胞内海藻糖浓度的积累和大肠杆菌在缺乏 NaCl 的 Evans 培养基中 37°C 生长的生长曲线。在 A 和 B 两者中，圆圈代表诱导的海藻糖浓度，正方形代表于 600nm 处测定的细胞生长 (吸光度)。

图 7 是通过渗透压休克对海藻糖诱导之前和之后，沙门氏菌中细胞内海藻糖浓度的 HPLC 分析的一系列摹图的再现。

图 8 是描述在 45% 海藻糖和 0.1% CMC 的制剂中细胞生存力和干燥时间长度之间关系的图。FTS 干燥方案是 30mT ST 40°C (x 小时)。

图 9 是描述鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 在 37°C 生长期间细胞内海藻糖 (●) 和蛋白质 (■) 浓度的图。



图 10 是描述海藻糖诱导的(●)和非诱导的(▲)鼠伤寒沙门氏菌 1344 在 37℃ 贮存后的百分恢复度的图。

施行本发明的方式

我们发现通过诱导细胞内海藻糖产生至对于增强贮存稳定性有效的量，并在稳定剂存在下干燥细胞能干燥和稳定原核细胞。在此描述的稳定原核细胞的方法能用于产生干燥、稳定的细菌，该细菌可用于药理学治疗、预防、农业和工业应用。

由在此公开的方法所获得的原核细胞是非常稳定的：通过这些方法稳定的细菌甚至在环境温度或高于环境温度下贮存后仍保留高生存力。在这些条件下干燥的细菌经干燥后保留大约 50-80% 的生存力。此外，通过这些方法稳定的细菌经贮存后显示低于 10% 的生存力损失，即使在可达至少 37℃ 的温度下贮存 6 周之久后仍如此。干燥和贮存中这种稳定程度显著大于以前报道的使用其它方法的程度。稳定的细胞能被贮存于室温下，因此不需冷藏。根据条件，通常能在 24 小时内完成干燥，这节约了能量和费用以及增强了生存力。

本发明的方法和组合物促进了许多急需的、有用的产品开发，这些产品包括但不限于：(i) 干燥稳定形式的活菌疫苗；(ii) 干燥稳定形式的活细菌 *neutraceutical*；(iii) 干燥稳定形式的其它活细菌药物产品，例如用于阴道或尿道感染的治疗；(iv) 用于商业产品如用于乳品工业的干燥稳定形式的活细菌起始培养物；(v) 用于农业、生态或生物除污应用的干燥稳定形式的活细菌，如杀虫剂；以及 (vi) 用于生物工程工业的干燥稳定形式的活细菌培养物。

当在此使用时，“原核细胞”是显示原核生物特性的细胞，是本领域众所周知的一个术语。原核生物一般是单细胞的生物体，缺少细胞器（如线粒体、叶绿体和高尔基体）、细胞骨架和分离的核。原核细胞的实例包括细菌，如真细菌、蓝细菌(*cyanobacteria*)，和 *prochlorophyte*；古细菌；和其它微生物如立克次氏体、支原体、螺旋体和衣原体。对于本发明来说，原核生物能够合成海藻糖。这种能力可以是天然的或由重组技术所

赋予的。能通过测定细胞内海藻糖的浓度来测定合成海藻糖的能力，这在以下描述。优选地，原核细胞是细菌。

稳定剂优选地是糖类。“糖类”包括但不限于单糖、二糖、三糖、寡糖及其相应的糖醇、多羟基化合物，如糖类衍生物和化学修饰的糖类、羟乙基淀粉和糖共聚物。天然的和合成的糖类都适于在此应用。合成的糖类包括但不限于那些糖苷键被硫醇键或碳键代替的糖类。D 和 L 两种形式的糖类都可以使用。对于本发明来说，糖类优选地是非还原性的。优选地，非还原糖是海藻糖。以下提供了优选的非还原糖的其它实例。

“提高细胞内海藻糖浓度”的条件是起始、促进、允许和/或提高细胞内海藻糖合成率的条件，以及/或者与在没有这些条件下生长或温育细胞相对比，提高细胞内海藻糖的量的条件。以下详细讨论了刺激海藻糖细胞内产生的条件（包括优选的条件）。这些条件的实例包括但不限于在应激条件如渗透压休克（即高盐条件）下生长细胞。刺激细胞内海藻糖产生的条件也可通过以下方法实现，例如，抑制海藻糖的降解率、表达重组基因以及诱导外源海藻糖的摄取。

“环境”是一个技术术语，指实行所述方法的空间的空气压力或湿度或温度。环境温度也被称为室温，通常为大约 15-25℃。

“残余湿度”是通过在此所述的方法干燥原核细胞后残余的水的量（以重量百分数表示）。如以下更详细讨论的，能通过 Karl/Fischer 库仑计测定残余湿度。

“玻璃”是本领域众所周知的一个术语，尤其应用于糖类玻璃。对于本发明来说，“玻璃”指充分丧失水分后所获得的非结晶的、透明的、固态的物理状态。

当在此使用时，“发泡的玻璃基质”（FGM）指一种包含糖类的玻璃，它包含分散在玻璃中的气泡，产生泡沫。对于本发明来说，发泡的玻璃基质包含低于约 5% 的残余湿度，优选地低于约 4% 的残余湿度，更优选地低于约 2% 的残余湿度。

“高摩尔渗透压浓度”指生长培养基中过量的溶质浓度。“过量的”溶质浓度意思是溶质浓度（通常是盐）超过细胞在天然环境中存在和/或



生长的水平。

“生存力”是本领域众所周知的一个术语，在此一致使用意思是指有功能的活生物的表现，如新陈代谢和细胞分裂。测定生存力的方法在本领域中已知，并在此描述。

本发明包括产生稳定的原核细胞的方法和由此产生的细胞。这些方法包括提高细胞内海藻糖的步骤，优选地通过在一定条件下培养或温育原核细胞，在此条件下将细胞内海藻糖浓度提高至对提高贮存稳定性有效的量；将原核细胞与干燥液相混合，该干燥液包含一种稳定剂、优选地非还原糖类如海藻糖；以及干燥产生的混合物，以便产生具有低于约 5% 残余湿度的一种玻璃。

生长原核细胞以提高细胞内海藻糖浓度

为实施本发明的方法，能在提高细胞内海藻糖浓度的条件下生长原核细胞。可使用如下所述的本领域的标准方法测定细胞内的海藻糖。任何包含海藻糖合成酶基因的原核细胞，特别是细菌，无论是内源的或重组的，都应该能够产生细胞内海藻糖。

已知许多类型的原核细胞合成海藻糖。包含海藻糖合成酶基因的细菌的实例包括但不限于：肠细菌(*Enterobacteriaceae*)，如沙门氏菌和埃希氏杆菌(*Escherichia*) (例如鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌)；嗜盐菌和耐盐菌，如红螺菌属(*Ectothriorhodospira*) (例如红绿外硫红螺菌(*E. halochloris*))；微球菌属(*micrococcaceae*)，如微球菌(*Micrococcus*) (例如藤黄微球菌(*M. luteus*))；根瘤菌(*Rhizobium*)种，如大豆根瘤菌(*R. japonicum*)和豌豆根瘤菌菜豆生物变种(*R. leguminosarum* bv *phaseoli*)；蓝细菌和分枝杆菌(*Mycobacteria*)种，如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)和耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)。多种生物的基因所编码的海藻糖合成酶的比较显示于图 1 中。已显示其它几种细菌具有海藻糖合成酶基因，它们都与大肠杆菌基因高度同源。这些细菌包括恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putidae*) 和杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)。

例如，可以通过对现有的核酸（和/或蛋白质）数据库搜索编码（或对应于）海藻糖合成酶基因氨基酸序列共有区之序列的存在，来实现测定一种特别的细菌种是否包含海藻糖合成酶基因。细菌具有两个参与海藻糖合成的基因（即，T-磷酸合成酶和 T-6-P 磷酸酶），而酵母至少具有三个基因。通常，用对酵母基因特异的探针搜索也能鉴定细菌基因，尽管它具有较低的同源性得分。海藻糖合成酶的氨基酸序列比较显示细菌、酵母和真菌间的同源性，并且能从这些比较中确定更特异的搜索和筛查探针（图 1）。另外，从用编码全部海藻糖合成酶基因或其功能性部分的 DNA 探查测试细胞，能产生基因组 DNA 的 Southern 印迹。图 2 显示大肠杆菌和两株沙门氏菌的海藻糖合成酶基因的 Southern 印迹。

可通过在应激条件下培养细胞来获得细胞内海藻糖的增多，这些条件例如渗透压休克、热或氧限制（休克）、碳/氮饥饿或以上的任意组合。另外，使用参与海藻糖降解的酶（即海藻糖酶）的抑制剂如有效霉素，也导致细胞内海藻糖的积累。合适的条件能通过经验确定，并在本领域人员的技术之内。不束缚于特定的理论时，应激条件下海藻糖产生的诱导可引发有益于保存的其它分子（如甜菜碱和陪伴蛋白）的合成或积累。

对于细菌特别是埃希氏杆菌，能通过在高摩尔渗透压浓度的条件下生长细胞来刺激海藻糖的产生，即该条件下溶质（通常是盐）浓度足以刺激海藻糖产生。因此，本发明包括在一定的摩尔渗透压浓度下培养原核细胞，其浓度为至少约 350 毫摩尔渗透压到约 1.5 摩尔渗透压，优选地至少约 400 毫摩尔渗透压到 1 摩尔渗透压，更优选地 250 毫摩尔渗透压至 500 毫摩尔渗透压。本发明也包括在至少约 300 毫摩尔渗透压、优选地至少约 400 毫摩尔渗透压、更优选地至少约 500 毫摩尔渗透压的摩尔渗透压浓度下培养原核细胞。通常，需要约 200 毫摩尔渗透压的最小盐浓度，但能通过经验得出有效的浓度。单一的盐足以刺激海藻糖产生，例如，200mM NaCl、KCl 和 CaCl_2 均刺激细胞内海藻糖的产生，表明细胞内海藻糖产生不依赖于所使用的作用或生长培养基中氯化物的浓度。然而，当使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时，与在 KCl、NaCl 和 CaCl_2 存在下的产生相比，仅产生大约一半量的海藻糖。也能使用盐的组合。另外，当用于提高培养

基的摩尔渗透压浓度时，非渗透溶质如山梨糖醇和/或葡萄糖能有助于海藻糖积累的刺激。

能用于提高摩尔渗透压浓度的盐的实例包括但不限于，磷酸钠 (Na_2PO_4)；磷酸钾 (KH_2PO_4)；氯化铵 (NH_4Cl)；氯化钠 (NaCl)；硫酸镁 (MgSO_4)；氯化钙 (CaCl_2)；盐酸硫胺素或其任意组合。在一个优选实施方案中，基本培养基包含大约 0.5M 的盐。甚至更优选地，0.5M 盐由以下组成： Na_2PO_4 6g/l； KH_2PO_4 3 g/l； NH_4Cl 0.267 g/l； NaCl 29.22g/l；1M MgSO_4 1ml/l；0.1M CaCl_2 (1ml/l)；盐酸硫胺素 1ml/l；以及终浓度为 2.5% w/v 的葡萄糖。充足的葡萄糖对于碳源和海藻糖的产生是有用的。测定足够的葡萄糖浓度可通过经验确定，并且这在本领域人员的技术之内。

刺激和/或诱导海藻糖产生所需的盐浓度（即摩尔渗透压浓度）取决于所用的原核细胞的属、种和/或株。优选地，细胞在含盐的基本培养基中生长。可商业获得的基本培养基中补加希望的盐和其它溶质，尽管基本培养基不是必需的，并且也可使用确定成分培养基。起始和达到希望的细胞内海藻糖浓度水平所需的时间将依摩尔渗透压浓度的水平以及所用原核细胞的属、种和/或株的不同而不同，并且能通过经验确定。海藻糖的合成通常开始于将细胞置于为刺激海藻糖产生而设计的条件下 1 小时之内。通常，在大肠杆菌中，将细胞置于刺激海藻糖产生的条件下后大约 15-20 小时，细胞内海藻糖的量达到最大。

为了通过渗透压休克诱导细胞内海藻糖的产生，培养基中盐的总浓度应该至少是约 0.2M，优选地至少约 0.4M，更优选地至少约 0.5M。对于大肠杆菌，盐的总浓度不应该超过 0.6M。在大约高于 0.6M 时，大肠杆菌中细胞内海藻糖的产生下降。希望的结果所需的盐浓度可根据所用的属/种/株而不同，并且能通过经验确定。

也可使用本领域众所周知的重组方法增加细胞内的海藻糖。例如，能用包含编码适当的海藻糖合成酶基因的 DNA 序列的 DNA 质粒转染原核细胞。合适的基因可从广泛的多种来源获得，这些来源如图 1 所述基因和最近鉴定的其它基因的数量所示。随后该基因与一个合适的启动子有

效地连接，该启动子可以是组成型的或可诱导的。许多参考文献中描述了重组方法，如“分子克隆：实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)”第二版 (Sambrook 等人，1989)。

能使用本领域已知的测定法测定细胞内海藻糖，如通过与电化学检测和葡萄糖测定（使用海藻糖酶的 Trinder 测定）相结合的高压液相层析（HPLC）用于海藻糖的定量酶测定。薄层层析能用作不同糖类分离的一种定性方法。折射率检测提供了定量检测糖的另一种方法。

通过 HPLC 测定海藻糖的方法中，破裂细胞，细胞内海藻糖优先溶解于 70%乙醇中，随后通过氯仿抽提去除三酰甘油。通过将海藻糖浓度（用标准曲线确定）乘以由上清液终体积除以沉淀体积的分数，确定细胞内海藻糖的浓度。实施例 1 提供了该测定法的更详细的描述。

优选地，细胞内海藻糖的浓度至少是约 50mM；更优选地，至少约 100 mM；更优选地，至少约 150 mM；更优选地，至少约 200 mM；更优选地，至少约 250 mM；以及甚至更优选地，至少约 300 mM。我们发现，如果细胞内海藻糖浓度低于约 30mM，则使用在此所述的方法之细菌的稳定性显著降低。因此，本发明包括在刺激海藻糖细胞内产生的条件下培养原核细胞，其中海藻糖的细胞内浓度达到至少约 30mM，优选地至少约 50mM，优选地至少约 100mM，更优选地至少约 150mM，更优选地至少约 200mM，更优选地至少约 250mM，以及甚至更优选地至少约 300mM。

刺激细胞内海藻糖产生所需的时间尤其依赖于原核细胞的本性（包括属、种和/或株）和海藻糖诱导发生的条件（即，是否通过渗透压休克、缺氧等等）。对于通过渗透压休克的海藻糖诱导，达到细胞内海藻糖的最大浓度所需的时间依次依赖于摩尔渗透压浓度的程度以及使用的特定的盐。例如，在大肠杆菌中，硫酸铵（ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）刺激细胞内海藻糖浓度的量约为 NaCl、 CaCl_2 或 KCl 的一半。对于在 0.5M 盐基本培养基中的大肠杆菌，最大细胞内海藻糖浓度发生于约 10-17 小时内，至渗透压休克后 17 小时有显著诱导作用（实施例 1；图 6）。

本领域的技术人员容易明白，也能通过其它方法如将海藻糖引入细胞

来达到希望的细胞内海藻糖浓度。这可通过以下方法实现，例如，在海藻糖存在下培养细胞，而使细胞经受透化细胞壁和细胞膜的条件。这些条件的实例包括但不限于，引起膜相变的条件（如冷却和加热的循环或渗透压休克）和电穿孔。如上所述能确定用于这些条件的细胞内海藻糖浓度。引起膜相变的条件特别适用于革兰氏阴性菌。

因此，本发明的一个实施方案是保存原核细胞的一种方法，它包括以下步骤：在以此处所述的方法将细胞内海藻糖浓度提高至对于提高贮存稳定性有效的水平的条件下培养原核细胞，将原核细胞与一种包含稳定剂的干燥液相混合，以及干燥原核细胞以便产生具有低于约 5%残余湿度的一种玻璃。

将原核细胞与干燥液混合

细胞内海藻糖升高至希望的程度后，通过例如离心收获原核细胞，并重悬浮于一种包含稳定剂、优选地非还原糖类如海藻糖的干燥液中。

特别优选的非还原糖类是海藻糖、麦芽糖醇（4-邻- β -D-葡吡喃糖基-D-葡萄糖醇）、乳糖醇（4-邻- β -D-半乳吡喃糖基-D-葡萄糖醇）、palatinit[GPS（ α -D-葡吡喃糖基-1 $\rightarrow$ 6-山梨糖醇）和 GPM（ α -D-葡吡喃糖基-1 $\rightarrow$ 6-甘露醇）的一种混合物]及其各自的糖醇成分 GPS 和 GPM 以及氢化麦芽寡糖和麦芽寡糖。

除海藻糖外，合适的稳定剂包括但不限于，选自糖醇和其它直链多元醇的多羟基化合物的非还原糖苷。其它有用的稳定剂包括新海藻糖、乳新海藻糖、半乳糖基-海藻糖、蔗糖、乳蔗糖、棉子糖、水苏糖和松三糖。如专利申请 PCT/GB95/01967 中所述，具有轻微还原活性的糖类如麦芽己糖、麦芽庚酮糖、琼脂糖(Sepharose) 和葡聚糖(Dextran)也能与美拉反应抑制剂使用。美拉反应抑制剂也能用来改进不稳定的还原糖类如蔗糖的性能。

干燥液中非还原糖类的浓度依赖于几个变量，最特别的是所稳定的原核细胞的属、种和/或株以及干燥方法。对于大肠杆菌，非还原糖类（海藻糖）的浓度优选地是至少约 25%，更优选地至少约 35%，甚至更优选

地至少约 45% (w/v)。优选地，糖类浓度应该低于约 50%，因为较高的浓度可妨碍有效的干燥。

构成干燥液基础的溶剂可以是许多物质中的任一个，只要它不显著影响细胞的生存力。优选地，该溶剂是水。

干燥液能任选地包含有利于原核细胞总稳定性的添加剂。通常，优选的添加剂提高干燥液的粘度，随后通过有较高 T_g s 的更有效的泡沫产生增强干燥方法。添加剂的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮 (Kollidon 系列: 12、17、25、30、90; BASF)、羧甲基纤维素 (Blanose HF; Aqualon)、羟丙基纤维素和羟乙基淀粉 (HES; MW 200,000)。优选地，Kollidon 90 以大约 1.5% 的浓度存在于干燥液中。优选地，羧甲基纤维素的浓度是大约 0.1%。特别优选的是包含约 45% 海藻糖和约 1.5% Kollidon 90 或约 0.1% 羧甲基纤维素的干燥液。其它能使用的添加剂包括挥发性盐，其有助于有效的干燥 (通过形成泡沫)。挥发性盐的实例包括但不限于碳酸氢铵、氯化铵、乙酸铵和硫酸铵。然而，当使用这些盐时，可能是由 pH 和盐特异性作用引起的较低生存力可阻碍更有效的干燥。

加入原核细胞的干燥液体积以及由此所得干燥液中原核细胞的密度可以不同。然而，太低的细胞密度成比例地增加了每个细胞的干燥时间；太高的密度可相反地影响泡沫形成和干燥的速度和/或效率。而且，太高的细胞密度能导致细胞产生的较高浓度的抗发泡剂。优选地，细胞密度是大约每毫升 $4-8 \times 10^9$ 个细胞 (CFU)，尽管已成功地使用了高达每毫升 2×10^{10} 个细胞的密度。通常，干燥液的体积显著低于用于提高细胞内海藻糖浓度的培养基的体积。任选的体积将根据细胞和溶质的类型略微不同，并能容易地通过经验确定。

干燥原核细胞

将原核细胞悬浮于干燥液中再干燥细胞，以便形成一种玻璃。能使用本领域已知的方法实现干燥，这些方法包括但不限于空气 (即环境温度) 干燥、喷雾干燥和冷冻干燥。当在此使用时，包含干燥的原核细胞的玻璃优选地具有低于约 5% 的残余湿度含量。

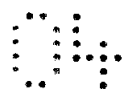
优选地在低于环境的压力（即真空）下进行干燥。优选地，该压力是大约 0.1-0.075 托(Torr)/毫米汞柱。更优选地，压力是大约 0.075-0.05 托/毫米汞柱。最优选地，压力是大约 0.05-0.03 托/毫米汞柱，并且外部温度是大约 40℃。

优选地，在冷冻温度之上和真空下发生干燥，以便形成发泡的玻璃基质（FGM）。PCT/GB96/0136。冷冻条件下的真空干燥将导致较低的生存力。为了形成真空，可使用具有真空压力和外部温度控制、优选地具有可编程控制的真空干燥器。作为一个实例，一种泵能够提供 0.01 托/毫米汞柱的真空，并能在 15-20 分钟后将产物容器抽真空至 0.2-0.01 托/毫米汞柱。在本工作中使用的机器是 FTS Systems Inc. (Stone Ridge, 纽约) 的具有一个 VP-62P 真空泵和一个 FD-0005-A 冷凝器组件的 TDS 0007-A 型，或者是 Labconco, Inc. (Kansas City) 的具有一个 Lyph-lock 12 冷凝器单位和一个 Edwards E2M8 两级真空泵的 77560 型号。

外部压力的降低至少具有两个希望的作用。第一，它降低了气相中溶剂的蒸汽压力，因此加速了蒸发和干燥。提高的蒸发速率引起蒸发冷却，除非应用外热替换蒸发潜热。在真空下，这种能量输入限制了干燥的速率。因此，升高外部温度的作用令人惊讶地是加快干燥的速率而不升高样品的温度。降低的外部压力的第二个作用是急剧降低样品的沸点。因此能通过样品温度的非常适度的升高进行沸腾，这对样品没有有害的影响。

优选地，干燥以两个阶段发生：首先，保持外部温度恒定一段时间；其次，升高外部温度直到干燥完成。能逐渐升高温度，例如，1 小时 10 度，或者更优选地，能以相等的增加量升高温度，每次增加后保持恒定一段时间。在一个实施方案中，温度于大约 40℃ 保持约 16 小时，随后在以下的约 4 个小时中逐渐升高温度至大约 80℃。

在一个优选实施方案中，原核细胞如下干燥：将压力调节至 30mT，40℃ 的初始托盘温度 16 小时；随后以每分钟 2.5℃ 的速度以 2℃ 的增加量升高托盘温度至 80℃，每次增加保持约 12 分钟。按照该方案，发泡一般发生于干燥开始 60 分钟内，并在 24 小时内完成干燥过程，基本上不损



害生存力。实施例 6 提供了一种方案。

也形成 FGM，方法包括从干燥液中蒸发大量溶剂以获得糖浆，将糖浆暴露于足以引起糖浆沸腾或发泡的压力和温度下，去除湿气以使残余湿度不超过约 4%，优选地约 3%，更优选地约 2.5%。

在第一个干燥步骤中，蒸发溶剂以获得糖浆。一般地，“糖浆”被定义为具有大约 10^6 - 10^7 帕斯卡秒的粘度的溶液。糖浆不被解释为固定的浓度，但它是从混合物中蒸发大部分溶剂的结果。一般地，糖浆是包含形成玻璃基质的材料和/或添加剂和/或原核细胞的粘稠混合物，其浓度显著高于初始混合物。一般地，在足以去除约 20%-90%溶剂的条件下进行蒸发步骤，获得糖浆。糖浆的粘性是优选地，以使在糖浆沸腾时，从充分形成气泡所提供的增大的表面积中蒸发致使其玻璃化。

在真空下，持续快速干燥，直到样品的粘度开始升高。此时，通过粘稠糖浆水分子降低的淌度减低蒸发冷却的速度，样品温度升高直到其达到降低的压力下的沸点。沸腾时，由于糖浆的发泡引起液气界面区的大量增加。这种增大的蒸发表面引起干燥率的急速增长，并且液体泡沫干燥为固体玻璃泡沫（FGM）。一般地，这在沸腾不久后发生。

沸腾步骤的温度可以高于或低于环境温度。优选地，沸腾步骤的外部温度是大约 5-80℃。更优选地，外部温度是大约 5-60℃；甚至更优选地，大约 5-35℃。

干燥过程导致气泡的形成，这大大增加了糖浆的蒸发表面区。这允许残余溶剂的蒸发增强，FGM 玻璃化为由沸腾步骤产生的固体泡沫气泡。能通过样品温度的升高确定沸腾步骤的终点，样品温度优选地保持足以确保完全干燥的一段时间。最佳时间随样品而不同，但它易于被本领域的技术人员所确定。

可同时加工不同的容器形状和大小。理想地，使用的容器大小足以包含初始混合物，并适应由此形成的干燥细胞的体积。通常，使用 3ml 药物管瓶。能使用任何这种管瓶，包括 Wheaton 塑造的管瓶和 tube-cut 管瓶。优选地，管瓶是防潮的，以便消除由于样品吸收潮气引起的任何有害的影响。

能使用本领域已知的测定法如 Karl Fischer 库仑计法和重量法测定残余湿度含量。对于使用库仑计的残余湿度测定，用甲酰胺提取残余湿汽，随后用库仑计测定。使用以下公式确定样品的百分湿度 (w/w)：

$$\frac{\text{检测样品-空白} \times 10^3 \times 10^2}{\text{干燥样品的重量 (mg)} \times 10^2 \times 10^3} \% \text{残余湿度}$$

实施例 2 提供了该测定法的更详细的描述。优选地，残余湿度等于或低于约 5%，更优选地低于约 4%，更优选地等于或低于约 3%，甚至更优选地等于或低于约 2.5%。如上所述当通过逐渐升高温度更快速地干燥细胞时，残余湿度可下降至 2% 以下。能容易地通过经验确定不同细胞型的允许最大值。通常，大于约 5% 的残余湿度对于生存力是有害的。这尤其根据使用的属/种/株、在干燥液中使用非还原糖类的浓度和类型、干燥方法以及贮存类型而不同。

产生的包含干燥的、稳定的原核细胞的玻璃或 FGM 应具有对于保存细胞足够高的 T_g 。“ T_g ”指玻璃经受向液相转变时的温度。决定 T_g 的变量包括但不限于干燥制剂的残余湿度的量和所用稳定剂的类型。通常，蛋白质和多糖升高 T_g ，而盐通常降低 T_g 。图 4 说明 T_g 和百分残余湿度之间的关系。

对于本发明来说， T_g 应该至少是约 70℃，优选地至少约 75℃，更优选地至少约 80℃，甚至更优选地至少约 85℃，最优选地至少约 90℃。能使用本领域的标准技术如差示扫描量热法测定 T_g 。通常， T_g 越高则允许的贮存温度越高。

达到希望的残余湿度和/或 T_g 所需的时间长度依赖于几个变量，其包括但不限于样品大小、压力和温度。通常干燥样品时间越长则残余湿度越低（因此 T_g 越大）。图 5 显示残余湿度和干燥时间长度之间的关系。能在少至 20 小时内、更通常地在约 24 小时内完成干燥。如上所述，在干燥中逐渐升高温度能减少干燥时间，而不显著降低细胞的生存力（实施例 6）。

通过在此公开的方法所干燥的原核细胞能在环境温度或更高的温度下贮存不同长度的时间。干燥的、稳定的原核细胞能贮存的时间长度将尤其依赖于原核细胞的属、种和/或株、细胞内海藻糖产生的程度和/或浓度、干燥液中稳定剂的浓度和类型、进行干燥的方案、干燥后残余湿度的量以及可接受的生存力的程度。

稳定细胞的重建

干燥后能通过加入一种合适的溶剂重建原核细胞。因此，本发明包括重建通过在此所述的方法获得的原核细胞的方法。用于重建的溶剂的性质和量将依赖于原核细胞以及它们的用途。本领域的技术人员能通过经验来确定。通常，能用水溶剂重建细胞。如果细胞被用作药物，则优选地用生理学上可接受的无菌缓冲液重建。

如果原核细胞被用作疫苗，并因此用作免疫原性剂，则能以足以增强对免疫原的免疫应答的量加入一种佐剂。能在干燥前将该佐剂加入原核细胞，例如，霍乱 B 型毒素亚单位能与霍乱弧菌(*V. cholera*)同时干燥。另外，佐剂能与原核细胞分开重建。

合适的佐剂包括但不限于，氢氧化铝、明矾、QS-21（美国专利号 5,057,540）、DHEA（美国专利号 5,407,684 和 5,077,284）及其衍生物（包括盐）和前体（例如 DHEA-S）、 β -2 微球蛋白（WO 91/16924）、胞壁酰二肽、胞壁酰三肽（美国专利号 5,171,568）、单磷脂脂 A（美国专利号 4,436,728；WO 92/16231）及其衍生物（例如 DetoxTM）、以及 BCG（美国专利号 4,726,947）。其它合适的佐剂包括但不限于铝盐、鲨烯混合物（SAF-1）、胞壁酰肽、皂苷衍生物、分枝杆菌壁制剂、分枝菌酸衍生物、非离子型封闭共聚物表面活性剂、Quil A、霍乱毒素 B 亚单位、聚磷腈及衍生物、以及免疫刺激复合物（ISCOM），如 Takahashi 等人（1990）自然(Nature)344: 873-875 所述。

对于兽医应用和动物中的抗体产生，能使用弗氏佐剂的促有丝分裂成分。佐剂的选择部分地依赖于在佐剂存在下疫苗的稳定性、施用途径和佐剂可接受的调控性，特别是当准备用于人类时。例如，美国食品与药



物管理局 (FDA) 批准明矾在人中用作佐剂。

能使用本领域已知的许多技术的任一个测定细胞的生存力 (即存活率), 例如, 对于菌落形成单位 (CFU) 的平板测定。生存力能在任何时间测定, 包括干燥细胞之前和之后立即测定以及在贮存期间的不同时间测定。所希望的是在重建之后但在细胞应用和/或施用之前测定生存力。

对于平板测定, 在希望的时间用希望的溶剂重建细胞, 溶剂通常用体积至少等于干燥细胞体积的无菌蒸馏水。振摇后, 将重建的培养物溶液在无机培养基 (例如去除碳源的 M9) 中稀释 (通常 10-倍), 并在 30 分钟内更优选地在 15 分钟内将其一式三份再涂板于适当的养分上。37°C 温育 18-24 小时后, 测定菌落形成单位 (CFU) 的数量。存活率计算为 0 时间菌落计数的百分数。实施例 2 中提供了平板生存力测定的更详细的描述。

用此处方法制备的细胞的组合物

本发明也包括包含通过在此所述的方法获得的原核细胞的组合物。这些组合物包括但不限于, 根据在此所述的方法制备的干燥的原核细胞和重建的原核细胞。这些组合物可进一步包含任何药学可接受的载体或赋形剂, 它们在本领域中是众所周知的。

提供下列实施例说明本发明但并不限制本发明。鼠伤寒沙门氏菌 1344 和伤寒沙门氏菌 Ty21a 从英国 South Mimms 的国家生物学标准和对照研究所 (National Institute of Biological Standard and Control) 获得。

实施例 1

渗透压休克对在大肠杆菌中细胞内海藻糖产生的作用

将大肠杆菌 NCIMB 株 9484 培养于包含用于提高渗透压的多种试剂之一的 Evans 培养基 (pH7.0, 表 1) 中。在初始 Evans 培养基中 37°C 温育过夜后, 用在氮源限制的 Evans 培养基中生长的 4ml 大肠杆菌培养物接种 200ml 培养的 Evans 渗透压休克培养基。

表 1. Evans 培养基和 Evans 渗透压休克培养基

	初始 Evans 培养基	渗透压休克 Evans 培养基
葡萄糖	140mM	10g/l 葡萄糖
NH ₄ Cl	5 mM	3-5g/l NH ₄ Cl (15mM)
KCl	5 mM	0.5M NaCl=29.22g/l
Na ₂ SO ₄	1.8 mM	1.8 mM
柠檬酸	1 mM	1 mM
MgCl ₂	0.3 mM	0.3 mM
CaCl ₂	0.5 mM	0.5 mM
NaH ₂ PO ₄	5.6 mM	5.6 mM
Na ₂ HPO ₄	20 mM	20 mM
ZnSO ₄	3.8 mM	3.8 mM
FeCl ₂	50 mM	50 mM
MnCl ₂	25 mM	25 mM
CuCl ₂	2.5 mM	2.5 mM
H ₃ BO ₃	2.5 mM	2.5 mM
CoCl ₂	0.5 mM	0.5 mM
氯霉素	50mg/升	50 mg/升

如下所述在渗透压休克起始后不同时间测定细胞内海藻糖的浓度。

细胞内海藻糖浓度的测定

如下使用高压液相层析 (HPLC) 测定海藻糖的细胞内浓度。海藻糖标准的制备方法包括, 首先制备在 70%乙醇中的 10mM 海藻糖, 随后使用 70%的乙醇作为稀释剂从 10mM 到 10nM 10 倍系列稀释。将 30μl 标准置于一个微量管中, 将微量管置于 80℃水浴中 5 分钟, 记录温育后上清液的初始体积。以 13,000 转/分离心微量管 10 分钟, 吸出上清液。向上清液中加入等体积的氯仿后, 振摇样品并以 13,000 转/分离心 10 分钟。再重复氯仿抽提两次。用去离子水将上清液的终体积调节至 500μl。通过测定不同浓度的样品生成校准曲线。

制备细胞样品用于分析，方法是通过结合海藻糖在 70%乙醇中优先溶解的超声处理（可使用任何其它的方法如研钵和研杵、渗透压裂解、珠）破裂细胞壁，随后通过氯仿抽提去除三酰甘油。将 1ml 细胞悬液等分至一个微量管中，以 13,000 转/分离心 10 分钟。用 100 μ l 70%乙醇（初始体积）重悬浮沉淀。通过测定细胞重悬浮后初始体积的相对增长来确定沉淀的体积。细胞悬液在 80℃ 水浴中温育 5 分钟。将管以 13,000 转/分离心 10 分钟，吸出上清液。加入等体积的氯仿，重复离心步骤。一共进行三次氯仿抽提。用去离子水将上清液的终体积调节至 500 μ l。

使用 Dionex CarboPac PA 100 分析柱与 Dionex ED40 脉冲安培电化学检测器通过 HPLC（Beckman Instruments）完成海藻糖的定量。初始细胞沉淀的总海藻糖浓度被确定为提取的终体积和沉淀体积的分数乘以测定的海藻糖浓度，使用以下公式：

$$\frac{\text{上清液的终体积}}{\text{沉淀体积}} \times \text{海藻糖浓度}$$

上清液的终体积是最终氯仿抽提后保留的水体积。沉淀体积不同于加入 100 μ l 70%乙醇后重悬浮的沉淀。使用海藻糖浓度曲线确定形成的海藻糖的浓度。

获得的结果显示于图 6 中。渗透压休克起始后 15-17 小时观察到细胞内海藻糖浓度的显著增长，峰值在不到 20 小时处。

实施例 2

使用海藻糖稳定和重建大肠杆菌

将大肠杆菌（9484 株）置于基本培养基的 100ml 分批培养物中，该培养基与 M9（基本培养基）有关，但具有高（0.5M）盐含量（Na₂HPO₄, 6g/l; KH₂PO₄, 3g/l; NH₄Cl, 0.267g/l; NaCl, 29.22g/l; 1M MgSO₄, 1ml/l; 0.1M CaCl₂, 1ml/l; 盐酸硫胺素, 1ml/l; 终浓度为 2.5% w/v 的葡萄糖）。这是“改良的 M9 培养基”。细胞在 37℃ 振荡生长 22 小时。也制备对照培养物，其中对培养基补加了 20mM 甜菜碱，海藻糖合成显著降低。取

出培养物样品，如实施例 1 所述进行海藻糖测定（3×1ml），用 Bradford 测定法（3×10ml; Bio-Rad）进行蛋白质估计。

10,000 转/分离心 10 分钟收获两个 25ml 等份的检测和对照培养物。将细胞沉淀重悬浮于 5ml 的 45%海藻糖、1.5%聚乙烯吡咯烷酮（Kollidon 90; BASF）或 0.1%羧甲基纤维素（Blancoes HF; Aqualon）中。然后将悬液合并为 10ml 的总体积，且有 $4-8 \times 10^9$ 细菌/ml 的典型密度，将 300μl 等份分配至 3ml 药物管瓶中。

根据以下方案在改良的 FTS 冷冻干燥器中不经冷冻地在真空下干燥细菌：真空，30mT；初始托盘温度为 40℃ 16 小时，随后以每分钟 2.5℃ 的速度以 2℃ 的增加量提升至 80℃，每次增加有 12 分钟的保持时间。开始干燥大约 60 分钟内发生起泡。

残余湿度含量如下测定。将 1ml 甲酰胺小心地分配至含海藻糖中之干燥细菌的每个管瓶中。向一个空瓶中加入 1ml 甲酰胺用作对照。通过在室温下混合 15 到 20 分钟提取残余湿度。用于分析，使用一次性针头和注射器将 100μl 空白（对照）甲酰胺加入反应容器中，记录用库仑计（Karl/Fischer）测定的值。注意不要将空气引入甲酰胺样品，因为空气中含有水蒸汽。检测（和对照）样品以双份测定。用库仑计测定的值等于水的微克数。检测样品减空白除以 100 等于样品中每微升甲酰胺的水的微克数。干燥样品的百分湿度（w/w）为：

$$\frac{\text{测试样品}-\text{空白} \times 10^3 \times 10^2}{\text{干燥样品的重量 (mg)} \times 10^2 \times 10^3} \%$$

使用平板测定法在完成后立即测定生存力及在 37℃ 贮存中的不同时间测定生存力。对于平板测定，使用减去碳源的基本培养基作为无菌稀释剂进行细胞的系列 10-倍稀释。

将第 6 个稀释管中的 30μl 细胞悬液加入 3 个 LB（Luria-Bertuni）平板的每一个中，用无菌玻璃涂布器将培养物涂布至平板的整个表面。平板在 37℃ 温育过夜，计数菌落。

$$X = \text{菌落数} \times 33-1/3 \times 1 \times 10^6 \text{ 稀释部分 CFU/ml}$$

在 37℃ 贮存达 45 天的结果显示于图 3 中。在干燥后立即重建的样品中观察到海藻糖诱导的细胞之生存力大于 50% (一般 50-80%)。更有意义地, 干燥细胞贮存后甚至在 37℃ 贮存 45 天后, 未观察到活细胞回复的进一步损失 (图 3)。

实施例 3

Southern 印迹分析检测海藻糖合成酶基因的存在

使用标准方法从大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌 1344 (1344) 和伤寒沙门氏菌 Ty21a (Ty21a) 中制备 DNA。用限制性内切核酸酶 HindIII(H)、EcoRI(R)或 BamHI(B)消化大肠杆菌和沙门氏菌的基因组 DNA, 在 0.8%TBE (Tris-硼酸盐电泳缓冲液) 琼脂糖凝胶上分离, 在尼龙滤膜上进行印迹。使用 ³²P-标记的探针筛查滤膜, 该探针对应于在大肠杆菌中编码海藻糖合成酶基因的大肠杆菌的 otsA/B 区。杂交后, 以低严格条件洗滤膜。对于大肠杆菌将凝胶对 X-射线胶片曝光过夜, 对于沙门氏菌 (Salmonella spp) 曝光三天。

如图 2 所示在两株沙门氏菌中都检测到海藻糖合成酶基因的存在。当在较高严格条件下洗涤滤膜时, 检测到较模糊的条带。

实施例 4

沙门氏菌中海藻糖合成的诱导

鼠伤寒沙门氏菌 (1344) 在含或不含 0.5M NaCl 的 M9 (基本) 培养基中 37℃ 生长过夜。如实施例 1 所述离心收获细胞, 用 HPLC 分析法分析细胞内海藻糖浓度。结果显示于图 7 中。在高盐培养基中的生长显示 4-5 倍的海藻糖合成诱导。

实施例 5

Tg 与残余湿度之间的关系

如实施例 2 所述在含高盐的 M9 培养基中生长大肠杆菌 (9484 株)。用于干燥, 将细胞悬浮于含 45%海藻糖和 1.5% Kollidon 90 的干燥水溶

液中，如实施例 2 所述在真空下干燥 3-24 小时。于不同时间收集细胞，对相同样品的等份测定残余水含量和 T_g ，以排除任何可能的瓶间差异。 T_g 与残余湿度的关系的结果显示于图 4 中。

实施例 6

较慢和较快干燥对生存力的影响的比较

在实施例 2 所述的改良的 M9 培养基中生长大肠杆菌（9484 株）。用于干燥，将细胞悬浮于含 45%海藻糖和 0.1%羧甲基纤维素（Blanose H.F., Aqualon）的干燥水溶液中。

随后是两个不同的干燥方案：（a）压力 30mT；外部温度 40℃ 16 小时，随后以 0.04℃/分钟的速度和 2℃的增加量升高（跃升）温度至 80℃，每次增加保持约 60 分钟（慢干燥）；（b）压力 30mT；外部温度 40℃ 16 小时，随后以 2.5℃/分钟的速度以 2℃的增加量升高温度至 80℃，每次增加保持约 12 分钟（快干燥）。

干燥后立即测定生存力。由快干燥制备的样品生存力不亚于由慢干燥制备的样品。对“快”干燥的样品观察到大约 48%到 52%范围的回复率，而对“慢”干燥的样品观察到大约 40%到 52%范围的回复率。平均地，“快”干燥的样品显示比“慢”干燥的样品更高的生存力。

干燥时间长度对生存力的影响显示于图 8 中。干燥液包含 45%海藻糖和 0.1% CMC；FTS 干燥方案是 30mT ST 40℃ 不同时间。

实施例 7

细胞内海藻糖诱导后不同赋形剂对稳定大肠杆菌 9894 外膜作用的比较

如实施例 2 所述，将大肠杆菌 9894 株接种于与 M9 相关但有高盐含量的（0.5M）基本培养基的 100ml 分批培养物中。细胞在振荡培养箱中 37℃ 生长 22 小时（早期稳定期）。取出培养样品进行海藻糖测定（3×1ml），用 Bradford 测定法（3×10ml；Bio-Rad）进行蛋白质估计。海藻糖浓度表示为 $\mu\text{mol}(\text{mg 蛋白质})^{-1}$ 。

使用含电化学检测的离子交换层析测定海藻糖的细胞内浓度。校准标

准的制备方法是，首先在水中制备 1mM 海藻糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖标准的贮存液，随后用水作为稀释剂从 1mM 到 2.5 μ M 系列稀释。

将 1ml 细胞悬液等分至一个微量管中，13,000 转/分离心 10 分钟，去除上清液。将细胞沉淀重悬浮于 200 μ l 80%乙醇中。通过在 80℃ 水浴中破裂细胞壁 10 分钟，利用所有细胞内糖在 80%乙醇中的优先溶解，制备细胞悬液用于分析。离心悬液，吸出上清液。向上清液中加入等体积的氯仿，振荡，离心样品，通过氯仿抽提去除三酰甘油。将水相转移至新 Eppendorf 管中，重复氯仿抽提。将水相等分至 HPLC 管瓶中，真空干燥，随后用 500 μ l 无菌水再水合。

使用 Dionex CarboPac PA 分析柱与 Dionex ED40 脉冲安培电化学检测器通过 HPLC (Dionex DX-500) 完成海藻糖的定量。从校准曲线确定海藻糖的浓度。

10,000 转/分离心 10 分钟从每个摇瓶中收获两个 30ml 等份。将细胞沉淀重悬浮于 8ml 25-45%糖、0.1%CMC(羧甲基纤维素钠; Blancoes 7HF; Aqualon) 中。然后将悬液合并为 16ml 的总体积及 $4-8 \times 10^9$ CFU/ml 的典型细胞密度，将 300 μ l 等份分配至 3ml 药物管瓶中。

使用以下方案不经冷冻地在真空下干燥细菌：真空，30mT；初始托盘温度为 40℃ 16 小时，随后以 2.5℃/分钟的速度以 2℃ 的增加量提升至 80℃，每次增加有 12 分钟的保持时间。初始干燥 60-120 分钟之间发生起泡。

如实施例 2 所述使用平板测定法在干燥步骤完成之前和之后立即测定生存力，并在 37℃ 贮存中的不同时间测定生存力。也测定残余湿度含量和玻璃转变温度。

在 37℃ 贮存的结果显示于表 2 中。使用非还原糖海藻糖、palatinit 或乳糖醇作为稳定外膜的赋形剂，大肠杆菌于 37℃ 贮存 6 周后，未观察到活细胞回复的明显损失。更显著地，对于还原糖葡萄糖，观察到大于 99% 的损失。

表 2. QT4 干燥完成后即刻及 37℃ 贮存 3 周和 6 周后大肠杆菌 9484 活细胞的回复

37℃ 贮存后的活细胞回复百分率			
赋形剂	第 0 天	第 3 周	第 6 周
海藻糖	36	52	45
Palatinit	49	49	51
乳糖醇	42	36	34
葡萄糖	0.8	0.1	0.05

实施例 8

QT4（实施例 2 的方法）和冷冻干燥的大肠杆菌之比较

将大肠杆菌 NCIMB 9484 株接种于改良的 M9 培养基的 250ml 分批培养物中。实施例 2 中描述了该培养基的成分。细胞在振荡培养箱中 37℃ 生长 24 小时直到早期稳定期。如实施例 7 所述取出培养物样品进行海藻糖测定（6×1ml），用 Bradford 测定法（5×10ml）进行蛋白质估计。

从摇瓶中取出 8 个 25ml 的等份，通过 10,000 转/分离心 10 分钟收获细菌。将细胞沉淀重悬浮于 8ml 45%糖、0.1%CMC（羧甲基纤维素钠；Blancoes 7HF; Aqualon）中。然后将细胞悬液合并为 64ml 的总体积及 $0.5-1.2 \times 10^9$ CFU/ml 的典型细胞密度。将 300μl 和 500μl 等份分配至 3ml 药物管瓶中，分别进行发泡和冷冻干燥步骤。

如实施例 2 所述使用 QT4 发泡方案不经冷冻在真空下干燥细菌。用以下方案冷冻干燥细菌：以 2.5℃/分钟提升至 -40℃ 的起始托盘温度；于 -40℃ 在 30mT 的真空压力下进行初次干燥，保持 40 小时；通过以 0.05℃/分钟从 -40 到 30℃ 的提升进行第二次干燥，保持 12 小时。

如实施例 2 所述使用平板测定法在干燥步骤完成之前和之后立即测定生存力，并在 37℃ 贮存 3 周后测定生存力。也测定残余湿度含量和玻璃转变温度。

在 37℃ 贮存的结果显示于表 3 中。37℃ 贮存 3 周后，在通过 QT4 方法干燥的细菌中或冷冻干燥的细菌中都未观察到细菌生存力的明显损

失。QT4-干燥的细菌的残余湿度含量和玻璃转变温度分别是 $1.85 \pm 0.2\%$ 和 $69.05 \pm 5.0^\circ\text{C}$ 。冷冻干燥细菌的 T_g 是 $104.5 \pm 2.1^\circ\text{C}$ ，残余湿度含量是 $0.70 \pm 0.2\%$ 。

表 3. QT4 干燥与冷冻干燥对 37°C 贮存后大肠杆菌 9484 活细胞回复的比较

37℃ 贮存后的活细胞回复百分率		
	第 0 天	第 3 周
QT4sys (干燥)	43.7 ± 10.3	45.1 ± 8.5
QT4sys (对照)	2.51 ± 0.2	<0.01
冷冻干燥	30.6 ± 3.6	30.1 ± 3.7
冷冻干燥 (对照)	1.83 ± 0.6	<0.01

实施例 9

鼠伤寒沙门氏菌在高盐培养基中 37°C 生长期间海藻糖的细胞内积累

鼠伤寒沙门氏菌 1344 在含或不含 0.5M NaCl (NaCl , 29.22 g l^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.66 g l^{-1} ; K_2HPO_4 , 10.5 g l^{-1} ; KH_2PO_4 , 4.5 g l^{-1} ; MgSO_4 , 0.1 g l^{-1} ; 色氨酸, 20mg l^{-1} ; 终浓度为 $2.5\% \text{ w/v}$ 的葡萄糖) 的基本沙门氏菌生长培养基的分批培养物中 37°C 生长 106 小时。定期取出样品, 如实施例 7 所述通过 Bradford 测定法进行蛋白质测定, 通过 HPLC 进行细胞内海藻糖测定。海藻糖浓度表示为 μmol 海藻糖 (mg 蛋白质) $^{-1}$ 。

如图 9 所示, 在接种后 30 和 76 小时之间观察到明显的海藻糖浓度, 48 小时后达到 $0.53\mu\text{mol}$ 海藻糖 (mg 蛋白质) $^{-1}$ 的最大值。

实施例 10

使用海藻糖在 37°C 对鼠伤寒沙门氏菌 1344 的稳定

鼠伤寒沙门氏菌 1344 在含 0.5M NaCl 的基本沙门氏菌生长培养基的分批培养物中生长。细胞在振荡培养箱中 37°C 生长 60 小时, 在早期稳定期离心收获。也制备不含盐基本培养基的对照培养物, 并在稳定期收获, 在此期间海藻糖合成显著降低, 因为没有渗透应激。

10,000 转/分离心 10 分钟从每个摇瓶中收获两个 25ml 的等份。重悬浮细胞沉淀，并在适当的生长培养基中洗涤。将获得的细胞沉淀重悬浮于 8ml 45%海藻糖、0.1%CMC (Blanoes 7HF, Aqualon) 中。然后将细胞悬液合并为 16ml 的总体积及 $2-4 \times 10^9$ CFU/ml 的典型细胞密度，将 300 μ l 等份分配至 3ml 药物管瓶中。如实施例 2 所述不经冷冻在真空下干燥细菌。发泡发生于初始干燥的 60-120 分钟间。

取出培养物样品 (3 $\times$ 1ml)，通过 Bradford 测定法 (3 $\times$ 10ml; Bio-Rad) 进行海藻糖测定和蛋白质估计。如实施例 7 所述，海藻糖浓度表示为 μ mol (mg 蛋白质)⁻¹。如实施例 2 所述使用平板测定法在干燥步骤完成之前和之后立即测定生存力，并在 37 $^{\circ}$ C 贮存期间的不同时间测定生存力。也测定残余湿度含量和玻璃转变温度。

37 $^{\circ}$ C 贮存的结果显示于图 12 中。在被渗透诱导以积累细胞内海藻糖的鼠伤寒沙门氏菌 1344 中，贮存 6 周后未观察到生存力的明显损失。显著地，对于未诱导的细菌观察到大于 99% 的损失。

实施例 11

海藻糖-6-磷酸合成酶 (otsA) 基因在大肠杆菌 (NCIMB 9484) 和沙门氏菌 (Salmonella spp) 中存在的确定

经 OD_{260/280nm} 和琼脂糖凝胶分析鉴定从大肠杆菌 9484、鼠伤寒沙门氏菌 1344 和伤寒沙门氏菌 Ty21a 中提取的基因组 DNA。分开制备每个 DNA 制品，以确保无交叉污染。然后使用该 DNA 与简并引物（其中第三个碱基的每一个都被替换为选择的碱基或肌苷，以容许任何序列改变）、猜测体引物（序列选择基于沙门氏菌特异的密码子选择）和大肠杆菌引物（完全基于大肠杆菌序列）准备 PCR 反应，如表 4 所示。每一组至少产生一个阳性反应。相关片段进行低熔点凝胶电泳，并纯化。

表 4. 大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌 1344 和伤寒沙门氏菌 Ty21a 的 *otsA* 基因探针

靶 DNA	<i>otsA</i> 基因 (片段大小/应用)	使用的引物组
大肠杆菌 9484	700bp/序列	基于大肠杆菌
大肠杆菌 9484	150bp/Southern 探针	基于大肠杆菌
鼠伤寒沙门氏菌 1344	700bp/序列	猜测体 (沙门氏菌密码子选择)
鼠伤寒沙门氏菌 1344	150bp/Southern 探针	猜测体 (沙门氏菌密码子选择)
伤寒沙门氏菌 Ty21a	700bp/序列	猜测体 (沙门氏菌密码子选择)
伤寒沙门氏菌 Ty21a	400bp/序列	基于大肠杆菌

将 700bp 片段连接至 pCR3.1, 然后转移至感受态细胞并测序。获得的 *otsA* 的序列数据显示, 鼠伤寒沙门氏菌 1344 和大肠杆菌 9484 之间有 77% 的序列同源性。序列数据也证明, 两个沙门氏菌属的菌株之间总数 715 个碱基中只有 6 个不同。

尽管为了清晰和理解起见已用图表和实施例的方式相当详细地描述了以上的发明, 但本领域的技术人员应当明白, 可以施行某些改变和修饰。因此, 描述和实施例不应解释为限制本发明的范围, 附加的权利要求书描绘了发明范围。



序列表

(1) 一般信息

(i) 申请人: **Tunnacliffe, Alan G.**

Welsh, David T.

Dhaljwal, Kamaljit S.

Colaco, Camilo

(ii) 发明名称: **保存原核细胞的方法和由此获得的组合物**

(iii) 序列数目: **6**

(iv) 联系地址:

(A) 地址: **ABLEHITE, ALAN J at MARKS 7 CLERK**

(B) 街道: **57-60 LINCOLN'S INN FIELDS**

(C) 城市: **LONDON**

(D) 州:

(E) 国家: **英国**

(F) 邮政编码(ZIP): **WC2A 3LS**

(v) 计算机可读信息:

(A) 介质类型: **软盘**

(B) 计算机: **IBM PC 兼容机**

(C) 操作系统: **PC-DOS/MS-DOS**

(D) 软件: **PatentIn Release # 1.0, Version #1.30**

(vi) 当前申请数据:

(A) 申请号:

(B) 递交日:

(C) 分类:

(viii) 代理人/代理机构信息:

(A) 姓名: Polizzi, Catherine M.

(B) 登记号: 40,130

(C) 文献/卷号: 26374-30017.00

(ix) 通讯信息:

(A) 电话: (415)813-5600

(B) 传真: (415)494-0792

(D) 电传: 706141 MRSNFOERS SFO

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 488 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑类型: 线性

(xi) SEQ ID NO: 1 的序列描述

```

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

```



Glu Leu Leu Glu Lys Phe Asn Ala Ile Pro Ile Phe Leu Ser Asp Glu
85 90 95

Val Ala Asp Leu His Tyr Asn Gly Phe Ser Asn Ser Ile Leu Trp Pro
100 105 110

Leu Phe His Tyr His Pro Gly Glu Ile Thr Phe Asp Asp Thr Ala Trp
115 120 125

Leu Ala Tyr Asn Glu Ala Asn Met Ala Phe Ala Asp Glu Ile Glu Gly
130 135 140

Asn Ile Asn Asp Asn Asp Val Val Trp Val His Asp Tyr His Leu Met
145 150 155 160

Leu Leu Pro Glu Met Ile Arg Gln Arg Val Ile Ala Lys Lys Leu Lys
165 170 175

Asn Ile Lys Ile Gly Trp Phe Leu His Thr Pro Phe Pro Ser Ser Glu
180 185 190

Ile Tyr Arg Ile Leu Pro Val Arg Gln Glu Ile Leu Lys Gly Val Leu
195 200 205

Ser Cys Asp Leu Ile Gly Phe His Thr Tyr Asp Tyr Ala Arg His Phe
210 215 220

Leu Ser Ala Val Gln Arg Ile Leu Asn Val Asn Thr Leu Pro Asn Gly
225 230 235 240

Val Glu Phe Asp Gly Arg Phe Val Asn Val Gly Ala Phe Pro Ile Gly
245 250 255

Ile Asp Val Glu Thr Phe Thr Glu Gly Leu Lys Gln Asp Ala Val Ile
260 265 270

Lys Arg Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ser Phe Lys Gly Cys Lys Ile Ile
275 280 285

Ile Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Val Pro Gln Lys Leu
290 295 300

His Ala Leu Glu Val Phe Leu Gly Ala His Pro Glu Trp Ile Gly Lys
305 310 315 320

Val Val Leu Val Gln Val Ala Val Pro Ser Arg Gly Asp Val Glu Glu
325 330 335

Tyr Gln Tyr Leu Arg Ser Val Val Asn Glu Leu Val Gly Arg Ile Asn
340 345 350

Gly Gln Phe Gly Thr Ala Glu Phe Val Pro Ile His Phe Met His Arg
355 360 365

Ser Ile Pro Phe Gln Glu Leu Ile Ser Leu Tyr Ala Val Ser Asp Val
370 375 380

Cys Leu Val Ser Ser Thr Arg Asp Gly Met Asn Leu Val Ser Tyr Glu
385 390 395 400

Tyr Ile Ser Cys Gln Glu Glu Lys Lys Gly Thr Leu Ile Leu Ser Glu
405 410 415

Phe Thr Gly Ala Ala Gln Ser Leu Asn Gly Ala Leu Ile Val Asn Pro
 420 425 430
 Trp Asn Thr Asp Asp Leu Ala Glu Ser Ile Asn Glu Ala Leu Thr Val
 435 440 445
 Pro Glu Glu Lys Arg Ala Ala Asn Trp Glu Lys Leu Tyr Lys Tyr Ile
 450 455 460
 Ser Lys Tyr Thr Ser Ala Phe Trp Gly Glu Asn Phe Val His Glu Leu
 465 470 475 480
 Tyr Arg Leu Gly Ser Ser Asn Asn
 485

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 495 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑类型: 线性

(xi) SEQ ID NO: 2 的序列描述

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



Asn Val Lys Val Gly Trp Phe Leu His Thr Pro Phe Pro Ser Ser Glu
180 185 190

Ile Tyr Arg Ile Leu Pro Val Arg Gln Glu Ile Leu Lys Gly Val Leu
195 200 205

Ser Cys Asp Leu Val Gly Phe His Thr Tyr Asp Tyr Ala Arg His Phe
210 215 220

Leu Ser Ser Val Gln Arg Val Leu Asn Val Asn Thr Leu Pro Asn Gly
225 230 235 240

Val Glu Tyr Gln Gly Arg Phe Val Asn Val Gly Ala Phe Pro Ile Gly
245 250 255

Ile Asp Val Asp Lys Phe Thr Asp Gly Leu Lys Lys Glu Ser Val Gln
260 265 270

Lys Arg Ile Gln Gln Leu Lys Glu Thr Phe Lys Gly Cys Lys Ile Ile
275 280 285

Val Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Val Pro Gln Lys Leu
290 295 300

His Ala Met Glu Val Phe Leu Asn Glu His Pro Glu Trp Arg Gly Lys
305 310 315 320

Val Val Leu Val Gln Val Ala Val Pro Ser Arg Gly Asp Val Glu Glu
325 330 335

Tyr Gln Tyr Leu Arg Ser Val Val Asn Glu Leu Val Gly Arg Ile Asn
340 345 350

Gly Gln Phe Gly Thr Val Glu Phe Val Pro Ile His Phe Met His Lys
355 360 365

Ser Ile Pro Phe Glu Glu Leu Ile Ser Leu Tyr Ala Val Ser Asp Val
370 375 380

Cys Leu Val Ser Ser Thr Arg Asp Gly Met Asn Leu Val Ser Tyr Glu
385 390 395 400

Tyr Ile Ala Cys Gln Glu Glu Lys Lys Gly Ser Leu Ile Leu Ser Glu
405 410 415

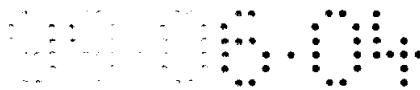
Phe Thr Gly Ala Ala Gln Ser Leu Asn Gly Ala Ile Ile Val Asn Pro
420 425 430

Trp Asn Thr Asp Asp Leu Ser Asp Ala Ile Asn Glu Ala Leu Thr Leu
435 440 445

Pro Asp Val Lys Lys Glu Val Asn Trp Glu Lys Leu Tyr Lys Tyr Ile
450 455 460

Ser Lys Tyr Thr Ser Ala Phe Trp Gly Glu Asn Phe Val His Glu Leu
465 470 475 480

Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ala Thr Lys Asn
485 490 495



(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 517 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑类型: 线性

(xi) SEQ ID NO: 3 的序列描述

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



Arg Leu Leu Gly Leu Thr Thr Thr Pro Asn Gly Ile Glu Phe Gln Gly
225 230 235 240

Lys Ile Ile Ala Cys Gly Ala Phe Pro Ile Gly Ile Asp Pro Glu Lys
245 250 255

Phe Glu Glu Gly Leu Lys Lys Glu Lys Val Gln Lys Arg Ile Ala Met
260 265 270

Leu Glu Gln Lys Phe Gln Gly Val Lys Leu Met Val Gly Val Asp Arg
275 280 285

Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Val Pro Gln Lys Leu His Ala Leu Glu Val
290 295 300

Phe Leu Ser Asp His Pro Glu Trp Val Gly Lys Val Val Leu Val Gln
305 310 315 320

Val Ala Val Pro Ser Arg Gln Asp Val Glu Glu Tyr Gln Asn Leu Arg
325 330 335

Ala Val Val Asn Glu Leu Val Gly Arg Ile Asn Gly Lys Phe Gly Thr
340 345 350

Val Glu Phe Met Pro Ile His Phe Leu His Lys Ser Val Asn Phe Asp
355 360 365

Glu Leu Ile Ala Leu Tyr Ala Val Ser Asp Ala Cys Ile Val Ser Ser
370 375 380

Thr Arg Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Tyr Glu Tyr Ile Ala Thr Gln
385 390 395 400

Lys Lys Arg His Gly Val Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala
405 410 415

Gln Ser Leu Asn Gly Ser Ile Ile Ile Asn Pro Trp Asn Thr Glu Glu
420 425 430

Leu Ala Gly Ala Tyr Gly Glu Ala Val Thr Met Ser Asp Glu Gln Arg
435 440 445

Ala Leu Asn Phe Ser Lys Leu Asp Lys Tyr Val Asn Lys Tyr Thr Ser
450 455 460

Ala Phe Trp Gly Gln Ser Phe Val Thr Glu Leu Thr Arg Ile Ser Glu
465 470 475 480

His Ser Ala Glu Lys Phe His Ala Lys Lys Ala Ser Phe Ser Asp Asn
485 490 495

Asn Ser Glu Asn Gly Glu Pro Ser Asn Gly Val Glu Thr Pro Ala Gln
500 505 510

Glu Gln Val Ala Gln
515



Glu Ile Tyr Arg Val Leu Pro Val Arg Asn Glu Ile Leu Glu Gly Val
195 200 205

Leu Asn Cys Asp Leu Val Gly Phe His Thr Tyr Asp Tyr Ala Arg His
210 215 220

Phe Leu Ser Ala Cys Ser Arg Ile Leu Asn Leu Ser Thr Leu Pro Asn
225 230 235 240

Gly Val Glu Tyr Asn Gly Gln Met Val Ser Val Gly Thr Phe Pro Ile
245 250 255

Gly Ile Asp Pro Glu Lys Phe Ser Asp Ala Leu Lys Ser Asp Val Val
260 265 270

Lys Asp Arg Ile Arg Ser Ile Glu Arg Arg Leu Gln Gly Val Lys Val
275 280 285

Ile Val Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Val Pro Gln Lys
290 295 300

Phe His Ala Phe Glu Val Phe Leu Glu Gln Tyr Pro Glu Trp Val Gly
305 310 315 320

Lys Val Val Leu Val Gln Val Ala Val Pro Ser Arg Gln Asp Val Glu
325 330 335

Glu Tyr Gln Asn Leu Arg Ala Val Val Asn Glu Leu Val Gly Arg Ile
340 345 350

Asn Gly Arg Phe Gly Thr Val Glu Tyr Thr Pro Ile His Phe Leu His
355 360 365

Lys Ser Val Arg Phe Glu Glu Leu Val Ala Leu Tyr Asn Val Ser Asp
370 375 380

Val Cys Leu Ile Thr Ser Thr Arg Asp Gly Met Asn Leu Val Ser Tyr
385 390 395 400

Glu Tyr Ile Cys Thr Gln Gln Glu Arg His Gly Ala Leu Ile Leu Ser
405 410 415

Glu Phe Ala Gly Ala Ala Gln Ser Leu Asn Gly Ser Ile Val Ile Asn
420 425 430

Pro Trp Asn Thr Glu Glu Leu Ala Asn Ser Ile His Asp Ala Leu Thr
 435 440 445
 Met Pro Glu Lys Gln Arg Glu Ala Asn Glu Asn Lys Leu Phe Arg Tyr
 450 455 460
 Val Asn Lys Tyr Thr Ser Gln Phe Trp Gly Pro Lys Leu Cys Arg
 465 470 475

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 498 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑类型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) SEQ ID NO: 5 的序列描述

Met Thr Ser Arg Gly Asn His Gly Ser Lys Thr Ser Ser Asp Lys His
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Ser Asp Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val Asp
 20 25 30
 Gln Val Arg Leu Pro Asp Gly Thr Ala Ile Trp Lys Arg Ser Pro Gly
 35 40 45
 Gly Leu Val Thr Ala Leu Glu Pro Leu Leu Arg Gln Arg Arg Gly Ala
 50 55 60

Trp	Val	Gly	Trp	Pro	Gly	Val	Ile	Asn	Asp	Asn	Val	Asp	Leu	Asp	Leu	
65					70					75					80	
Thr	Ile	Lys	Ser	Ile	Val	Gln	Asp	Gly	Leu	Thr	Leu	Tyr	Pro	Val	Arg	
			85						90					95		
Leu	Asn	Thr	His	Asp	Val	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser	Asn	Ala	
			100					105					110			
Thr	Leu	Trp	Pro	Leu	Tyr	His	Asp	Val	Ile	Val	Lys	Pro	Ile	Tyr	His	
		115					120					125				
Cys	Glu	Trp	Trp	Glu	Arg	Tyr	Val	Asp	Val	Asn	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	
	130					135					140					
Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Ala	Tyr	Gly	Gly	Thr	Val	Trp	Val	Gln	Asp	
145					150					155					160	
Tyr	Gln	Leu	Gln	Leu	Val	Pro	Lys	Met	Leu	Arg	Ile	Met	Arg	Pro	Asp	
				165					170					175		
Leu	Thr	Ile	Gly	Phe	Phe	Leu	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Pro	Val	Glu	Leu	
			180					185					190			
Phe	Met	Gln	Ile	Pro	Trp	Arg	Thr	Glu	Ile	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Gly	
		195					200					205				
Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Phe	His	Leu	Thr	Ser	Gly	Ala	Gln	Asn	Phe	Leu	
	210					215					220					
Phe	Leu	Ser	Arg	His	Leu	Leu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Arg	Gly	Leu	Val	
225					230					235					240	
Gly	Val	Arg	Ser	Arg	Phe	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ser	His	Thr	Val	
				245					250					255		
Gln	Val	Gly	Ala	Phe	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ser	Lys	Glu	Ile	Asp	Gln	
			260					265					270			
Ala	Thr	Arg	Asp	Arg	Asn	Val	Arg	Arg	Arg	Ala	Arg	Glu	Ile	Arg	Ala	
		275					280					285				
Glu	Leu	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Asp	Arg	Leu	Asp	
	290					295					300					
Tyr	Thr	Lys	Gly	Ile	Asp	Val	Arg	Leu	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Leu	Leu	
305					310					315					320	

Ala Glu Gly Arg Ala Lys Arg Asp Asp Thr Val Leu Val Gln Leu Ala
325 330 335

Thr Pro Ser Arg Glu Arg Val Glu Ser Tyr Lys Ile Leu Arg Asn Asp
340 345 350

Ile Glu Arg Gln Val Gly His Ile Asn Gly Glu Tyr Gly Glu Val Gly
355 360 365

His Pro Val Val His Tyr Leu His Arg Pro Ile Pro Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Ile Ala Phe Tyr Val Ala Ser Asp Val Met Leu Val Thr Pro Leu Arg
385 390 395 400

Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Tyr Val Ala Cys Arg Asn Asp
405 410 415

Leu Gly Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Thr Gly Ala Ala Ala Glu
420 425 430

Leu Arg Gln Ala Tyr Leu Val Asn Pro His Asp Leu Glu Gly Val Lys
435 440 445

Asp Thr Ile Glu Ala Ala Leu Asn Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Arg
450 455 460

Arg Met Arg Ser Leu Arg Arg Gln Val Leu Ala His Asp Val Asp Arg
465 470 475 480

Trp Ala Arg Ser Phe Leu Asp Ala Leu Ala Glu Ala Pro Ala Arg Asp
485 490 495

Ala Thr

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 473 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑类型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) SEQ ID NO: 6 的序列描述



Ser Arg Leu Val Val Val Ser Asn Arg Ile Ala Pro Pro Asp Glu His
1 5 10 15
Ala Ala Ser Ala Gly Gly Leu Ala Val Gly Ile Leu Gly Ala Leu Lys
20 25 30
Ala Ala Gly Gly Leu Trp Phe Gly Trp Ser Gly Glu Thr Gly Asn Glu
35 40 45
Asp Gln Pro Leu Lys Lys Val Lys Lys Gly Asn Ile Thr Trp Ala Ser
50 55 60
Phe Asn Leu Ser Glu Gln Asp Leu Asp Glu Tyr Tyr Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Asn Ala Val Leu Trp Pro Ala Phe His Tyr Arg Leu Asp Leu Val Gln
85 90 95
Phe Gln Arg Pro Ala Trp Asp Gly Tyr Leu Arg Val Asn Ala Leu Leu
100 105 110
Ala Asp Lys Leu Leu Pro Leu Leu Gln Asp Asp Asp Ile Ile Trp Ile
115 120 125
His Asp Tyr His Leu Leu Pro Phe Ala His Glu Leu Arg Lys Arg Gly
130 135 140
Val Asn Asn Arg Ile Gly Phe Phe Leu His Ile Pro Phe Pro Thr Pro
145 150 155 160
Glu Ile Phe Asn Ala Leu Pro Thr Tyr Asp Thr Leu Leu Glu Gln Leu
165 170 175
Cys Asp Tyr Asp Leu Leu Gly Phe Gln Thr Glu Asn Asp Arg Leu Ala
180 185 190
Phe Leu Asp Cys Leu Ser Asn Leu Thr Arg Val Thr Thr Arg Ser Ala
195 200 205
Lys Ser His Thr Ala Trp Gly Lys Ala Phe Arg Thr Glu Val Tyr Pro
210 215 220
Ile Gly Ile-Glu Pro Lys Glu Ile Ala Lys Gln Ala Ala Gly Pro Leu
225 230 235 240
Pro Pro Lys Leu Ala Gln Leu Lys Ala Glu Leu Lys Asn Val Gln Asn
245 250 255
Ile Phe Ser Val Glu Arg Leu Asp Tyr Ser Lys Gly Leu Pro Glu Arg
260 265 270

Phe Leu Ala Tyr Glu Ala Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Gln His His Gly
 275 280 285
 Lys Ile Arg Tyr Thr Gln Ile Ala Pro Thr Ser Arg Gly Asp Val Gln
 290 295 300
 Ala Tyr Gln Asp Ile Arg His Gln Leu Glu Asn Glu Ala Gly Arg Ile
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Tyr Gly Gln Leu Gly Trp Thr Pro Leu Tyr Tyr Leu Asn
 325 330 335
 Gln His Phe Asp Arg Lys Leu Leu Met Lys Ile Phe Arg Tyr Ser Asp
 340 345 350
 Val Gly Leu Val Thr Pro Leu Arg Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys
 355 360 365
 Glu Tyr Val Ala Ala Gln Asp Pro Ala Asn Pro Gly Val Leu Val Leu
 370 375 380
 Ser Gln Phe Ala Gly Ala Ala Asn Glu Leu Thr Ser Ala Leu Ile Val
 385 390 395 400
 Asn Pro Tyr Asp Arg Asp Glu Val Ala Ala Ala Leu Asp Arg Ala Leu
 405 410 415
 Thr Met Ser Leu Ala Glu Arg Ile Ser Arg His Ala Glu Met Leu Asp
 420 425 430
 Val Ile Val Lys Asn Asp Ile Asn His Trp Gln Glu Cys Phe Ile Ser
 435 440 445
 Asp Leu Lys Gln Ile Val Pro Arg Ser Ala Glu Ser Gln Gln Arg Asp
 450 455 460
 Lys Val Ala Thr Phe Pro Lys Leu Ala
 465 470

说明书附图

```

0 -----
0 -----
493 FSDNNSENGEFSNGVETFAQEQVAQ
0 -----
0 -----
458 TFPKLA-----

```

图 1

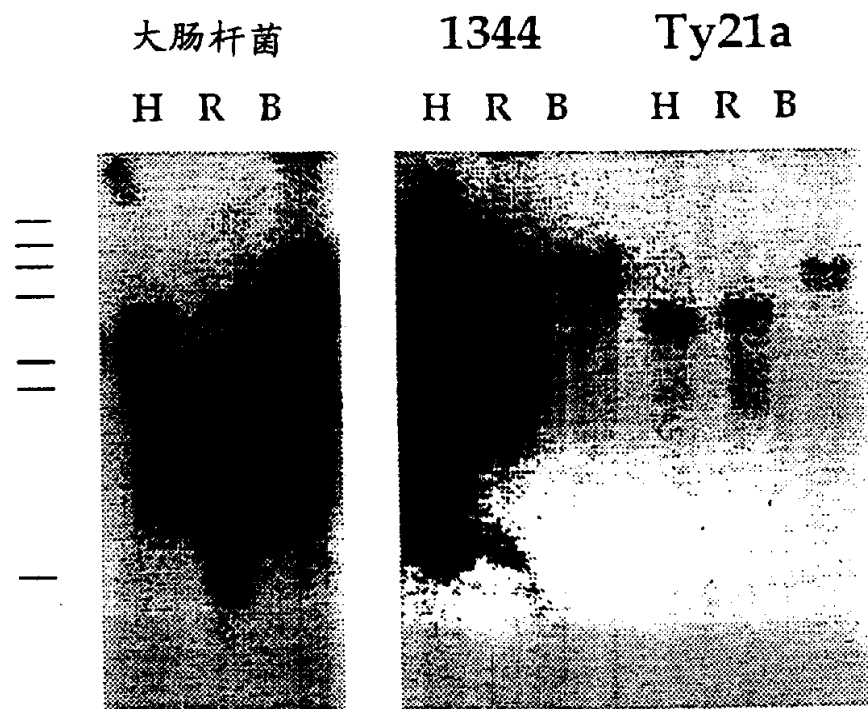


图 2

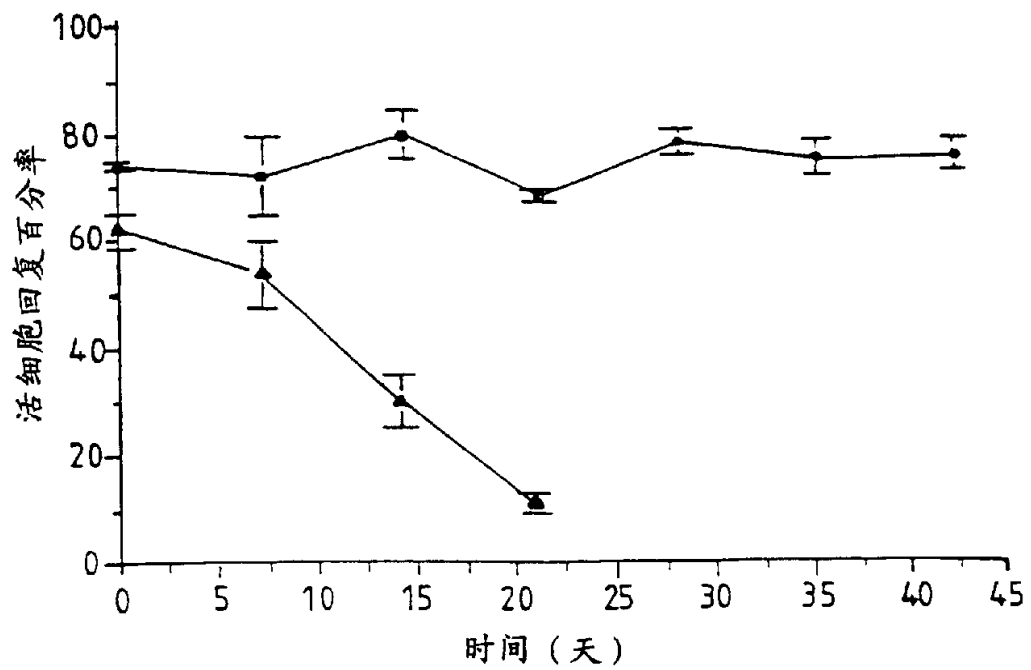


图 3

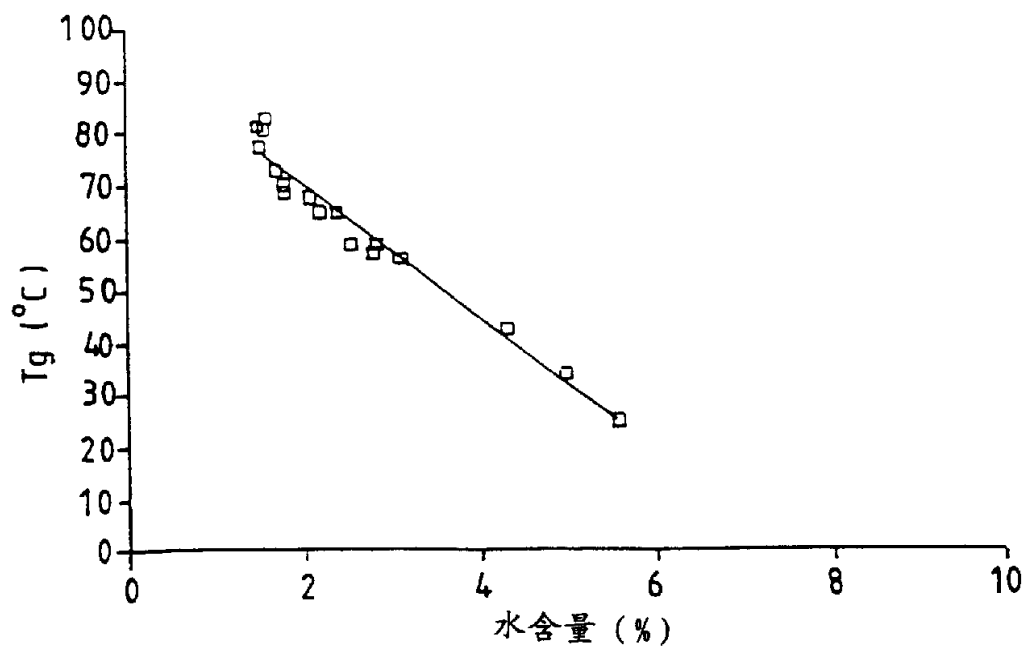
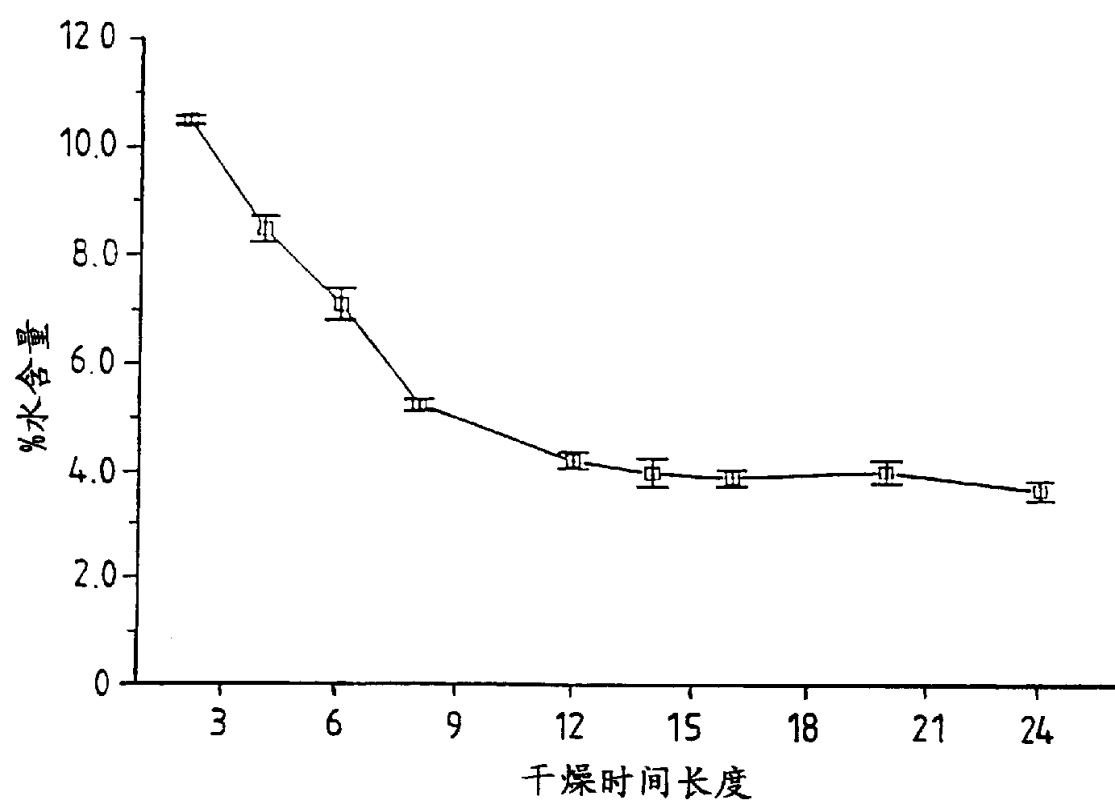


图 4



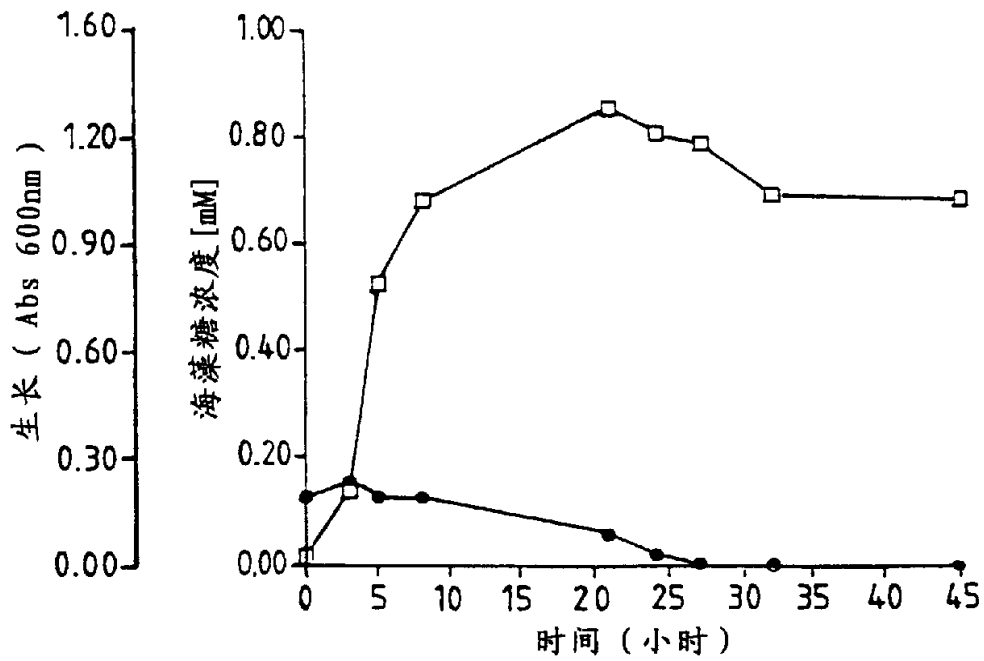
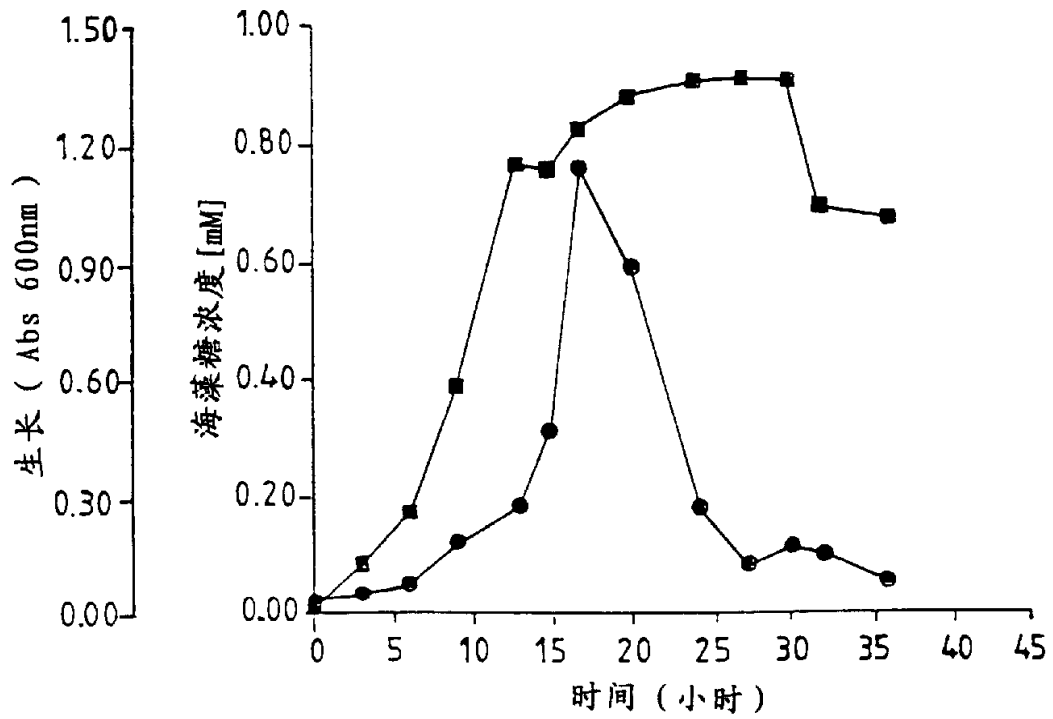


图 6

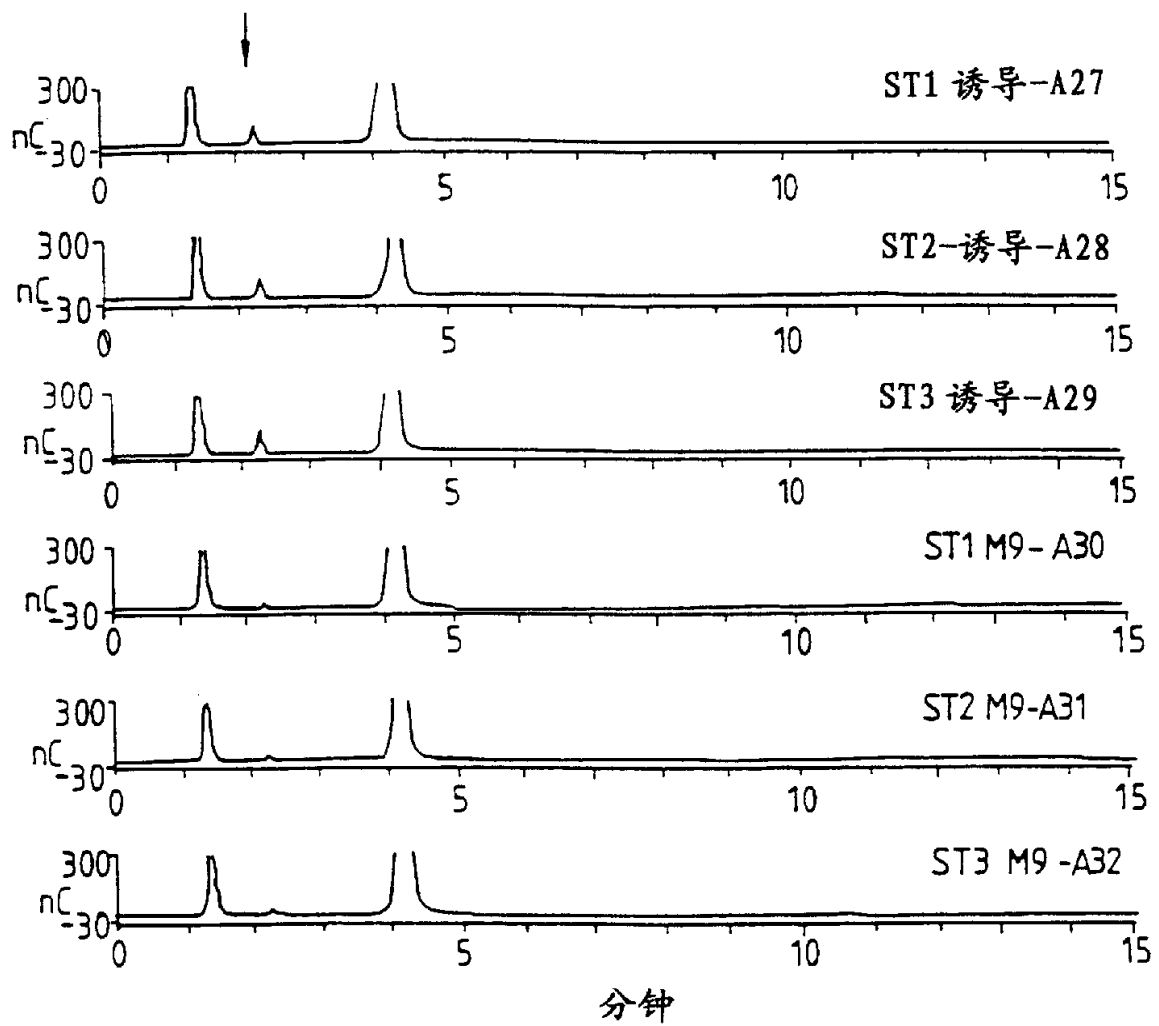


图 7

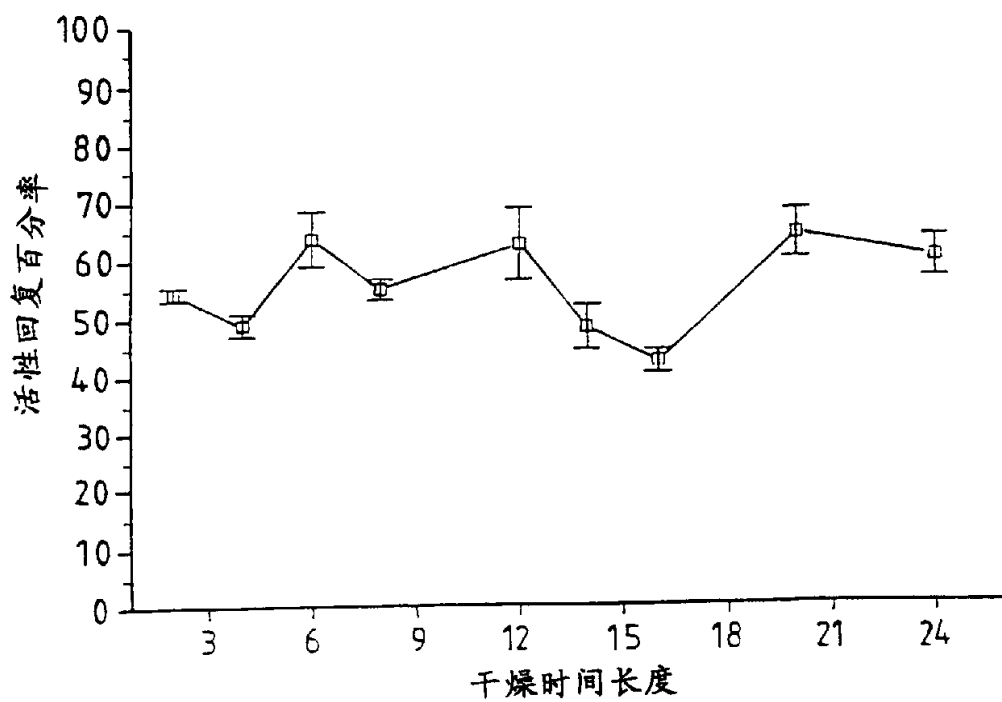


图 8

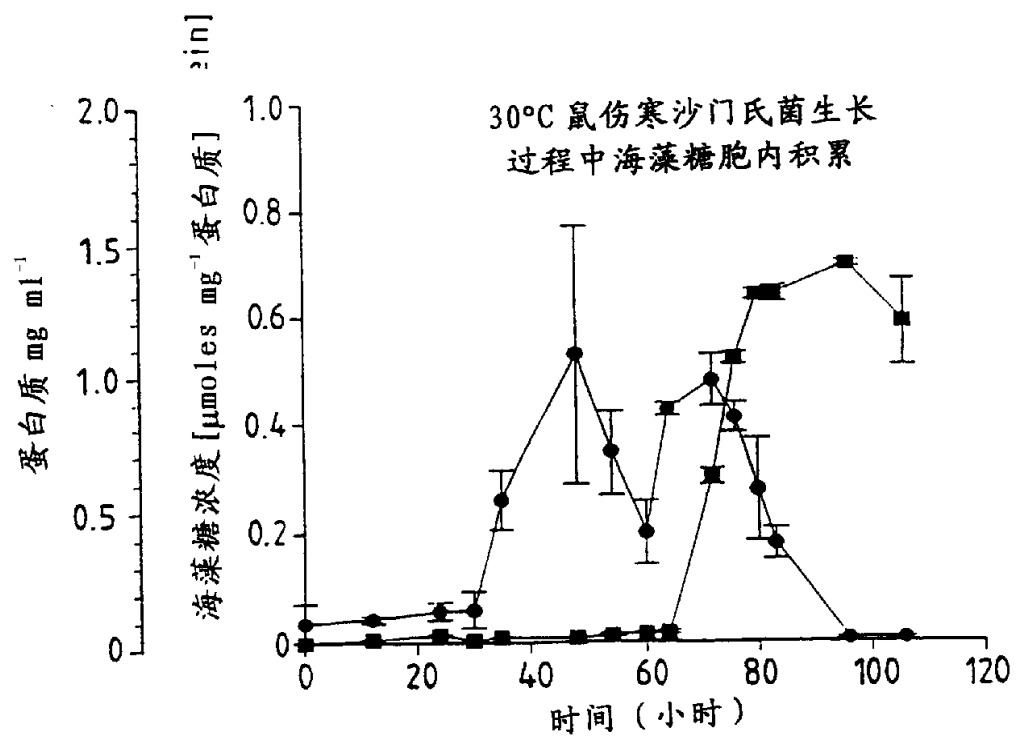


图 9

● [Tre]_i
 ■ 蛋白质浓度

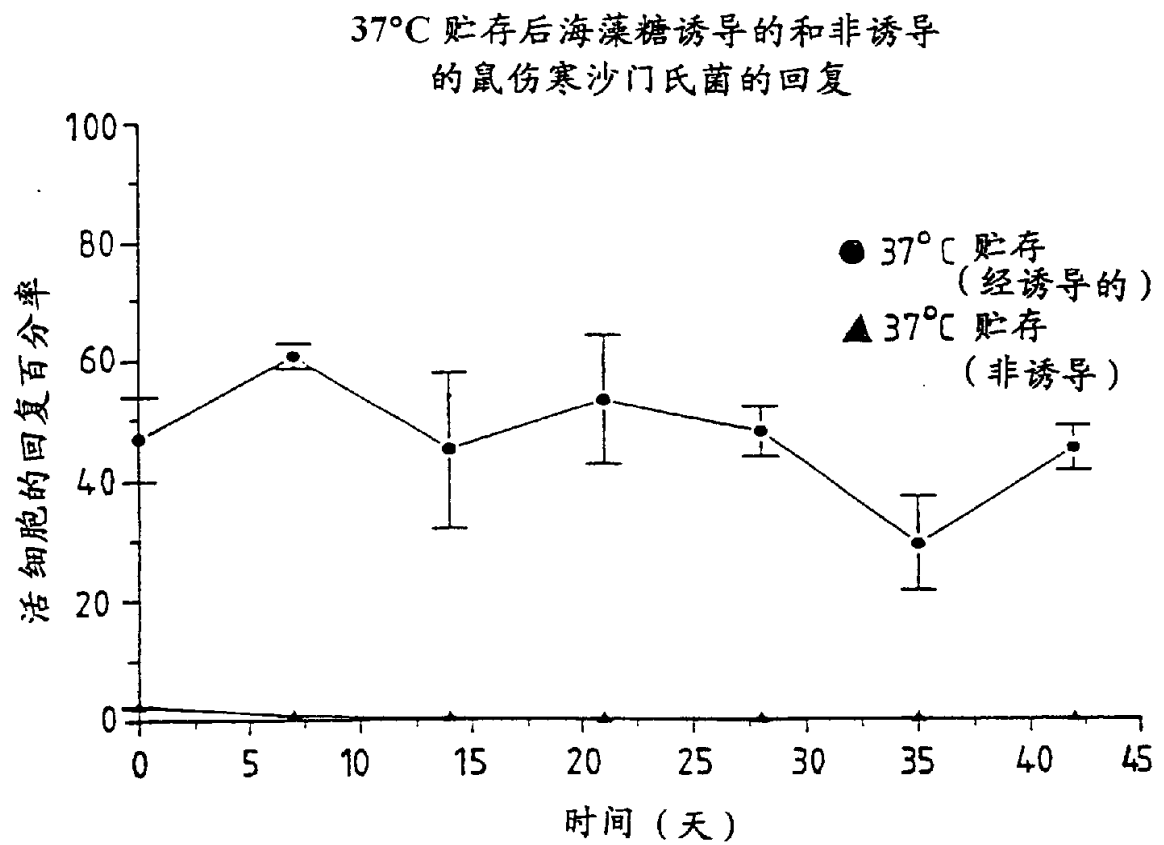


图 10