



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104244940 B

(45)授权公告日 2018.07.20

(21)申请号 201380020380.9

(22)申请日 2013.02.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104244940 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(30)优先权数据

1202681.1 2012.02.16 GB

1220158.8 2012.11.08 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.10.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/050367 2013.02.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/121214 EN 2013.08.22

(73)专利权人 阿克索生物医药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 J·马赫达维 D·阿拉奥尔登

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 韩蕾

(51)Int.Cl.

A61K 31/191(2006.01)

A61K 31/164(2006.01)

A61K 33/26(2006.01)

A61K 39/02(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

(56)对比文件

W0 03/040351 A1,2003.05.15,

审查员 金武

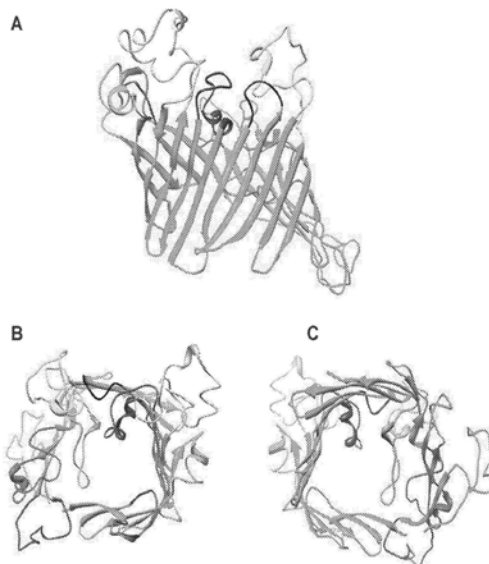
权利要求书4页 说明书32页 附图17页

(54)发明名称

减少胃肠道的弯曲杆菌定植

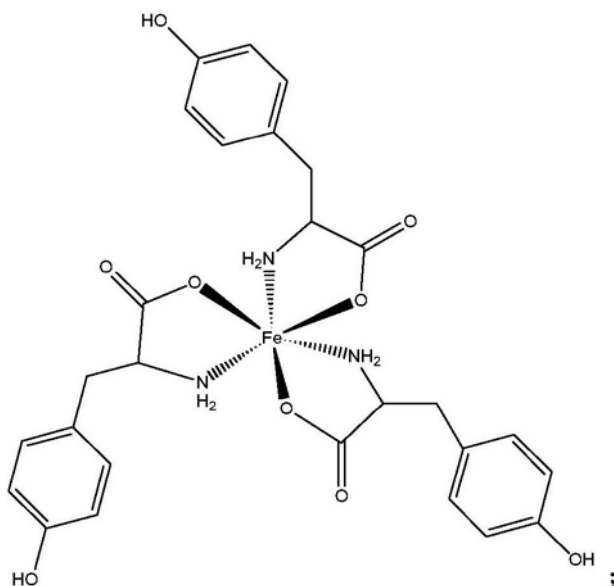
(57)摘要

弯曲杆菌(Campylobacter)是英国和工业化世界最常报导的造成胃肠炎的细菌。本发明涉及一种预防或减少动物胃肠道的弯曲杆菌定植的方法。因此,本发明提供一种用于对动物进行消毒的方法,其包含向所述动物投予有效量的至少一种与弯曲杆菌的MOMP或FlaA结合的化合物以减少存在于所述动物的胃肠道中的弯曲杆菌的数目。本发明还提供一种用于预防或减少从一只动物到另一只动物的弯曲杆菌感染的传播的方法。



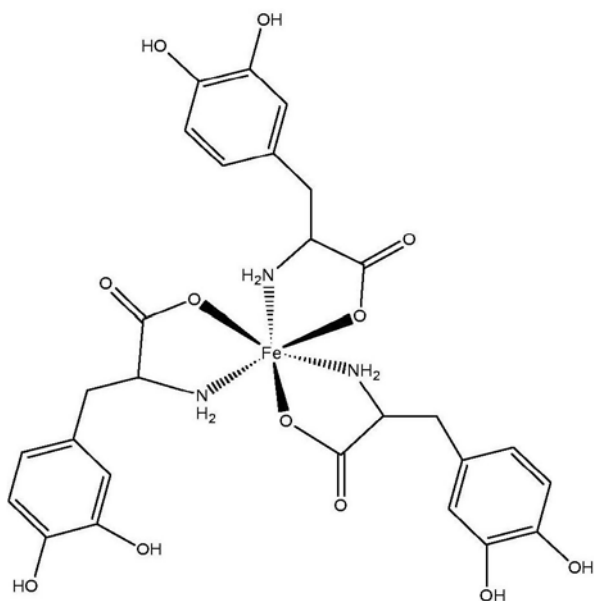
1. 一种选自自由

a) 酪氨酸与Fe III的络合物



b) 奎尼酸铁; 和

c) 3,4-二羟基苯丙氨酸与Fe III的络合物



所组成的群组的化合物在制备药物中的应用;

其中,所述药物用于选自以下的方法:

一种减少存在于动物的胃肠道中的弯曲杆菌的数目并因此对所述动物进行消毒的方法;

一种预防或减少动物胃肠道的弯曲杆菌定植的方法;或

一种预防弯曲杆菌在动物的胃肠道中形成生物膜,或减少动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量,并因此对所述动物进行消毒的方法。

2. 至少一种如前述权利要求1所定义的化合物在制备用于减少动物胃肠道的弯曲杆菌定植并因此在屠宰之前对所述动物进行消毒的方法的药物中的应用;所述方法包含以下步

骤:

i) 向所述动物投予有效量的至少一种如前述权利要求1所定义的化合物以减少存在于所述动物的胃肠道中的弯曲杆菌的数目;

ii) 屠宰所述动物。

3. 至少一种如前述权利要求1所定义的化合物在制备用于预防弯曲杆菌在动物的胃肠道中形成生物膜,或减少动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量,并因此在屠宰之前对所述动物进行消毒的方法的药物中的应用;所述方法包含以下步骤:

i) 向所述动物投予有效量的至少一种如前述权利要求1所定义的化合物以预防弯曲杆菌在所述动物的胃肠道中形成生物膜,或减少所述动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量;

ii) 屠宰所述动物。

4. 至少一种如前述权利要求1所定义的化合物在制备用于预防或减少从一只动物到另一只动物的弯曲杆菌感染的传播的方法的药物中的应用;

所述方法包含向所述动物投予有效量的如前述权利要求1所定义的化合物以预防弯曲杆菌在所述动物的胃肠道中形成生物膜,或减少所述动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量。

5. 至少一种如前述权利要求1所定义的化合物在制备用于在屠宰之前预防或减少从一只动物到另一只动物的弯曲杆菌感染的传播的方法的药物中的应用;所述方法包含以下步骤:

i) 向所述动物投予有效量的至少一种如前述权利要求1所定义的化合物以预防弯曲杆菌在所述动物的胃肠道中形成生物膜,或减少所述动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量;

ii) 屠宰所述动物。

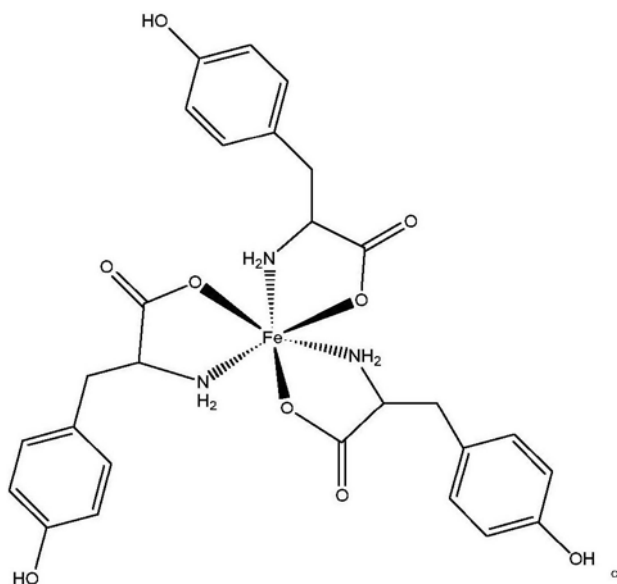
6. 根据前述权利要求1-5中任一项所述的应用,其中所述化合物以包含化合物的动物饲料、动物饮用水或饲料补充物的形式存在。

7. 根据前述权利要求4或5所述的应用,所述药物用于预防或减少弯曲杆菌感染在动物群内蔓延。

8. 根据前述权利要求7所述的应用,其中所述药物用于预防弯曲杆菌感染在鸡群内蔓延。

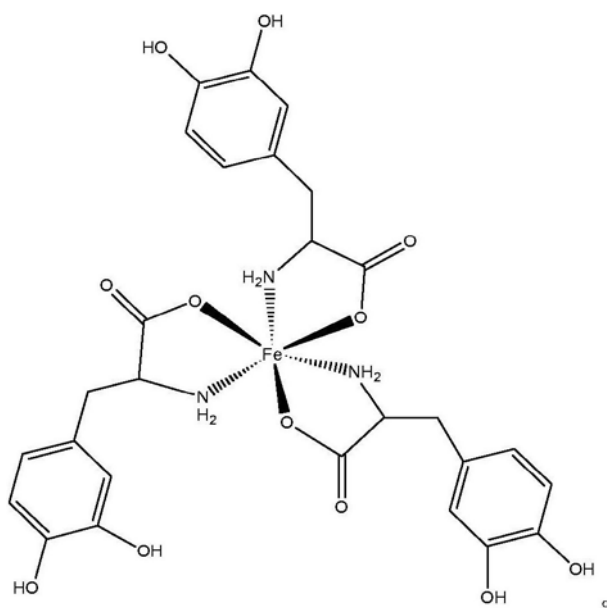
9. 根据前述权利要求1-5中任一项所述的应用,其中所述弯曲杆菌为空肠弯曲杆菌或大肠弯曲杆菌。

10. 根据权利要求1所述的应用,其中所述化合物为酪氨酸与Fe III的络合物



11. 根据权利要求1所述的应用,其中所述化合物为奎尼酸铁。

12. 根据权利要求1所述的应用,其中所述化合物为3,4二羟基苯丙氨酸与Fe III的络合物



13. 根据前述权利要求1-5、10、11和12中任一项所述的应用,其中所述化合物经口投予。

14. 根据前述权利要求1-5、10、11和12中任一项所述的应用,其中所述化合物在所述动物的饲料或饮水中投予所述动物。

15. 根据前述权利要求1-5、10、11和12中任一项所述的应用,其中所述化合物在屠宰所述动物之前的第1天至第10天每日投予。

16. 根据前述权利要求1-5、10、11和12中任一项所述的应用,其中所述化合物在屠宰所述动物之前的第3天至第5天每日投予。

17. 根据前述权利要求1-5、10、11和12中任一项所述的应用,其中所述化合物在屠宰之前的多于10天向鸡投予,以预防弯曲杆菌感染在鸡群内传播。

18. 根据前述权利要求1-5、10、11和12中任一项所述的应用,其中所述化合物以每千克

所述动物体重每天0.3-32毫克的量投予。

19. 一种如前述权利要求1、10、11和12中任一项所定义的化合物在制备用于减少肉中的弯曲杆菌的量的方法的药物中的应用,所述方法包含以下步骤:

- (i) 为动物或动物群提供如前述权利要求中任一项所定义的化合物;和
- (ii) 从所述动物制备肉制品。

20. 根据前述权利要求19所述的应用,其中所述化合物以包含化合物的动物饲料、动物饮用水或饲料补充物的形式存在。

21. 根据前述权利要求1、10、11或12中任一项所述的应用,其中所述动物选自牛、绵羊、猪、山羊、鹿、鱼、贝类和家禽。

22. 根据前述权利要求21所述的应用,其中所述动物为家禽。

23. 根据前述权利要求22所述的应用,其中所述家禽为鸡、鹅、或鸭。

24. 根据前述权利要求22所述的应用,其中所述家禽为火鸡。

25. 根据前述权利要求22所述的应用,其中所述动物为鸡。

26. 根据前述权利要求21所述的应用,其中所述动物是在动物群中。

27. 根据前述权利要求22所述的应用,其中所述动物是在动物群中。

28. 根据前述权利要求23所述的应用,其中所述动物是在动物群中。

29. 根据前述权利要求25所述的应用,其中所述动物是在动物群中。

30. 一种对食品进行消毒的方法,其包含向所述食品投予有效量的如权利要求1、10、11和12中任一项所定义的化合物以减少所述食品中的弯曲杆菌的量。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述食品为可供人类食用的食物。

32. 根据权利要求30或31所述的方法,其中所述食品为肉制品。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述肉制品为新鲜肉制品或加工肉制品。

34. 根据权利要求32所述的方法,其中所述肉制品为冷却肉制品、冷冻肉制品或烹熟肉制品。

35. 根据权利要求32所述的方法,其中所述肉制品选自牛肉、羔羊肉、猪肉、鸭肉、鸡肉、鹅肉、兔肉、鱼肉或贝类肉制品。

36. 根据权利要求32所述的方法,其中所述肉制品为火鸡肉。

37. 一种如前述权利要求1、10、11和12中任一项所定义的化合物在对食品消毒的应用,其包括向所述食品投予有效量的所述化合物以减少存在于所述食品中的弯曲杆菌的数目。

38. 根据权利要求37所述的应用,其中所述食品为可供人类食用的食物。

39. 根据权利要求37或38所述的应用,其中所述食品为肉制品。

40. 根据权利要求39所述的应用,其中所述肉制品为新鲜肉制品或加工肉制品。

41. 根据权利要求39所述的应用,其中所述肉制品为冷却肉制品、冷冻肉制品或烹熟肉制品。

42. 根据权利要求39所述的应用,其中所述肉制品选自牛肉、羔羊肉、猪肉、鸭肉、鸡肉、鹅肉、兔肉、鱼肉或贝类肉制品。

43. 根据权利要求39所述的应用,其中所述肉制品为火鸡肉。

44. 一种如权利要求1、10、11和12中任一项所定义的化合物用于制造预防或治疗人类的弯曲杆菌感染的药物的应用。

减少胃肠道的弯曲杆菌定植

技术领域

[0001] 本发明涉及一种预防或减少动物胃肠道的弯曲杆菌 (*Campylobacter*) 定植的方法。具体来说,其涉及减少或预防家禽胃肠道的弯曲杆菌定植。其还涉及结合到弯曲杆菌表面上的粘附素的化合物预防细菌粘附到动物胃肠道壁和治疗人类和动物中的弯曲杆菌感染的用途。

背景技术

[0002] 弯曲杆菌是英国和工业化世界最常报导的造成胃肠炎的细菌。空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*) 引起约90%的弯曲杆菌感染,其余大部分由大肠弯曲杆菌 (*C. coli*) 造成。弯曲杆菌形成多种鸟类和家畜的天然胃肠菌群的一部分,但鸡被认为是构成人类感染的最大来源。尽管受感染的鸡每克肠内含物携带高达 10^8 个菌落形成单位 (cfu),但其为无症状的。肉,具体来说鸡肉,通常在屠宰期间被包括弯曲杆菌的肠内含物污染。在人类中,弯曲杆菌种引起在严重程度方面从轻度水样腹泻到血痢变化的疾病。在患者的小亚群中,急性期疾病后面是严重后遗症,包括格林-巴利综合症 (Guillain-Barré syndrome) 和反应性关节炎。

[0003] 因此,受到极大关注的是提供一种降低和预防肉被弯曲杆菌污染的风险并且因此降低和预防人类感染弯曲杆菌的风险的方法。另外受到关注的是提供对于人类感染弯曲杆菌 (弯曲杆菌症 (campylobacteriosis)) 的新颖治疗。

发明内容

[0004] 因此,本发明提供一种用于对动物进行消毒的方法,其包含向所述动物投予有效量的至少一种与弯曲杆菌的MOMP或FlaA结合的化合物以减少存在于所述动物的胃肠道中的弯曲杆菌的数目。

[0005] 本发明还提供一种用于对动物进行消毒的方法,其包含向所述动物投予有效量的至少一种与弯曲杆菌的MOMP或FlaA结合的化合物以预防所述弯曲杆菌在所述动物的胃肠道中形成生物膜或减少所述动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量。

[0006] 本发明还提供一种用于预防或减少弯曲杆菌感染从一只动物传播到另一只,例如预防或减少弯曲杆菌感染在动物群内蔓延,例如预防弯曲杆菌感染在鸡群内蔓延的方法;所述方法包含向所述动物,例如所述动物群,例如所述鸡群投予有效量的至少一种与弯曲杆菌的MOMP或FlaA结合的化合物以预防所述弯曲杆菌在所述动物的胃肠道中形成生物膜或减少所述动物的肠道中由弯曲杆菌形成的生物膜的量。

[0007] 本发明的方法可以通过预防或减少弯曲杆菌粘附到所述动物的胃肠道而允许消毒、预防生物膜形成以及减少弯曲杆菌在动物之间的传播。此为有利的,因为在屠宰动物时,动物胃肠道中的弯曲杆菌越少,来自动物的肉被弯曲杆菌污染的风险越低。动物胃肠道中的弯曲杆菌越少,弯曲杆菌在动物胃肠道中形成生物膜的几率越低。动物胃肠道中的弯曲杆菌越少,弯曲杆菌将从一只动物蔓延到另一只 (例如在动物群内蔓延) 的几率越低。

[0008] 本发明的方法可用于减少任何动物胃肠道的弯曲杆菌定植的量。特别有利的是向将屠宰以供人类食用的动物,如牛、羊、猪、山羊、鹿、鱼、贝类和家禽提供化合物。家禽包括用于人类食用的鸟类,如鸡、鹅、火鸡和鸭。特别有利的是使用本发明的化合物以减少或预防家禽(特别是鸡)胃肠道的弯曲杆菌定植,因为鸡是使人类感染弯曲杆菌的主要来源。

[0009] 弯曲杆菌是在一极或两极具有单一鞭毛的革兰氏阴性、螺旋棒形细菌。其属于ε变形菌纲并且与螺旋杆菌(Helicobacter)以及沃廉菌(Wolinella)紧密相关。尽管这些物种相关,但其具有极不相同的培养要求和不同宿主。弯曲杆菌种通常存活在动物,特别是鸡的消化道中而螺旋杆菌存活在人类的胃中。尽管培养要求挑剔,但弯曲杆菌种,特别是空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌是重要的人类病原体,引起不同严重程度的胃肠炎。在正常情况下,胃肠炎是自限性的,但与弯曲杆菌症相关联的后遗症,如格林-巴利综合症潜在地威胁生命。弯曲杆菌存在多种不同的储藏所,但最重要的是被污染的肉,特别是家禽。

[0010] 可以通过本发明的方法减少动物胃肠道中的弯曲杆菌的数目。在一个实施例中,用本发明的化合物处理的动物胃肠道中的弯曲杆菌的菌落形成单位(cfu)的数目可以减少50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一个实施例中,可以从通过本发明的方法处理的动物胃肠道实质上根除弯曲杆菌。

[0011] 10000cfu弯曲杆菌对于成功的鸡定植为足够的。1000cfu弯曲杆菌足以感染人类并且引起人类疾病。因此,有效量的本发明的化合物为足以将动物胃肠道中的弯曲杆菌的数目减少到不太可能引起人类感染的数目的化合物。如果人类食用来自感染动物的肉而将被其摄取的弯曲杆菌的cfu的数目可能与屠宰动物时动物胃肠道中的弯曲杆菌的数目相关但也取决于其它因素,如屠宰动物时被动物胃肠道的内含物污染的肉的量。

[0012] 有效量的本发明的化合物为足以预防动物胃肠道的弯曲杆菌定植的化合物。

[0013] 在一个实施例中,本发明的化合物可以使得弯曲杆菌毒性较小和较不能够使人类感染,即使胃肠道中的弯曲杆菌的总数并未减少。在此实施例中,向动物授予本发明的化合物可以影响弯曲杆菌的代谢并且使其不太适应环境以使其无法定植胃肠道并且不大可能传播到其它动物或人类。

[0014] 向动物提供的有效量的化合物应足以提供所需程度的弯曲杆菌定植的减少。这可以取决于化合物类型和/或动物尺寸。在一个实施例中,有效量的化合物可以是每千克动物体重每天0.3到32毫克。

[0015] 本发明的方法优选地减少胃肠道的弯曲杆菌种,例如空肠弯曲杆菌或大肠弯曲杆菌定植。

[0016] 此为有利的,因为空肠弯曲杆菌是英国和工业化世界最常报导的造成胃肠炎的细菌。空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)引起约90%的弯曲杆菌感染,其余大部分由大肠弯曲杆菌造成。弯曲杆菌形成多种鸟类和家畜的天然胃肠菌群的一部分并且因此存在当屠宰动物时污染这些动物的畜体的高风险。

[0017] 用于本发明的方法中的化合物优选地为阻断弯曲杆菌表面上的MOMP或FlaA与胃肠道细胞的相互作用的化合物。优选地,化合物结合到MOMP或FlaA并且竞争性地或非竞争性地抑制弯曲杆菌上的MOMP或FlaA与胃肠道细胞的结合。优选地,用于本发明中的化合物可以结合到空肠弯曲杆菌表面上的MOMP。优选地,用于本发明的方法中的化合物特异性地结合到MOMP的氨基酸残基Arg³⁵²、Lys²⁷⁸、Lys³⁸⁵、Asn²⁵⁸、Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵、Ile³³⁷、Arg³⁸¹、

Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷中的至少一者。在另一实施例中,本发明的化合物减少MOMP的氨基酸残基Arg³⁵²、Lys²⁷⁸、Lys³⁸⁵、Asn²⁵⁸、Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵、Ile³³⁷、Arg³⁸¹、Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷中的至少一者与动物胃肠道之间的相互作用。

[0018] 在一个实施例中,用于本发明的方法中的化合物可以是天然人类组织血型抗原或合成人类组织血型抗原。

[0019] 天然人类组织血型抗原是天然存在于人类红血球上的糖。其还在上皮细胞,如胃肠道衬里细胞的表面上表达并且可以分泌于如唾液和母乳的体液中。

[0020] 普通人类组织血型抗原 (BgAg) 由一组复杂及多态性的表达于红血球表面层上以及内皮和多种上皮细胞和分泌物的碳水化合物组成。其结构中的细微差异引起抗原性中的重大差异。其共性为I型和II型核心糖结合物,其在添加到红血球表面之前在骨髓中通过H-(海藻糖基)转移酶分别海藻糖基化为H-I和H-II。(11).海藻糖基化聚糖为产生A、B和路易斯(Lewis)血型抗原的表位的其它糖基化反应的直接底物。ABO (或ABH) 和路易斯BgAg已在流行病学上与对于若干感染因子的敏感性相关联。

[0021] 人类血型抗原 (BgAg) 包括H-I抗原、H-II抗原、路易斯抗原Le^b和Le^x和Le^y。

[0022] 结合到弯曲杆菌上的粘附素(例如MOMP或FlaA)的人类组织血型抗原预防或减弱弯曲杆菌粘附到胃肠道的上皮细胞的能力。

[0023] 合成人类组织血型抗原可以是化学结构与天然人类组织血型抗原相同的分子,但其在人体外制得,例如其可以从合适的试剂以合成方式制得或可以在其它有机体(如细菌、真菌或真核生物)中制得并且转基因地表达。在另一实施例中,合成人类组织血型抗原可以是与天然人类组织血型抗原结合到MOMP或FlaA的相同部分的分子。合成人类组织血型抗原可以是糖或糖蛋白或糖脂。可以在合成人类组织血型抗原用于本发明的方法中之前使用一或多个纯化步骤,例如色谱步骤对其进行纯化。

[0024] 合成人类组织血型抗原可用于抑制在MOMP和/或flaA与上皮细胞之间的结合或粘附。其可结合到MOMP和/或FlaA并且预防或减少MOMP或FlaA粘附到上皮细胞以及减少或预防动物胃肠道的弯曲杆菌定植。

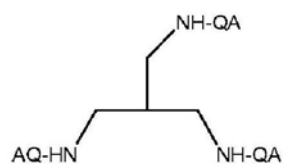
[0025] 合成人类组织血型抗原可以是糖,例如结构与天然人类组织血型抗原(如H-I抗原、H-II抗原、路易斯抗原Le^b、Le^x或Le^y)相同的糖类。

[0026] 用于本发明的方法中的化合物可以是结构与天然人类组织血型抗原不同但粘附到MOMP和/或FlaA并且预防或减少MOMP或FlaA粘附到上皮细胞以及减少或预防胃肠道的弯曲杆菌定植的化合物。化合物可以是糖或寡糖。

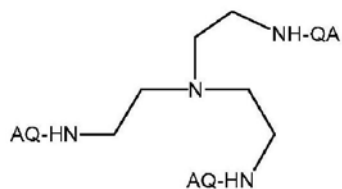
[0027] 优选地,化合物是粘附到MOMP的分子。适当地,化合物是可以与糖基化或未糖基化形式的MOMP的第7环相互作用的分子。

[0028] 用于本发明的方法中的化合物可为奎尼酸铁。用于本发明的方法中的化合物可具有以下结构中的一者:

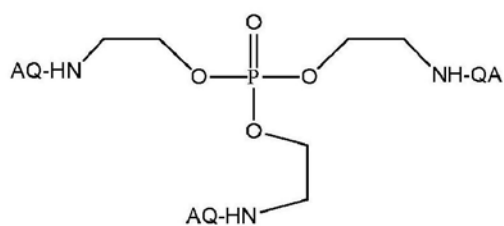
a)



b)

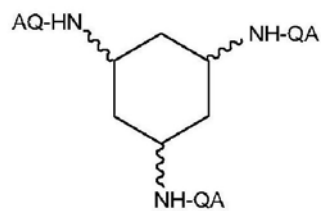


c)

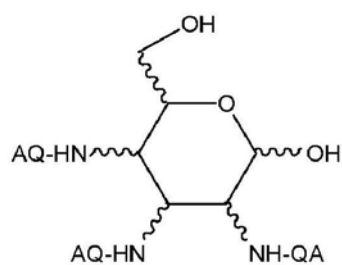


[0029]

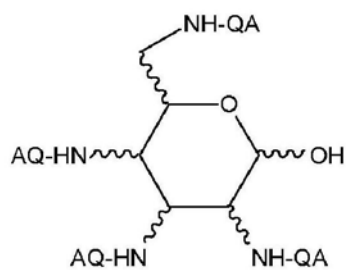
d)



e)

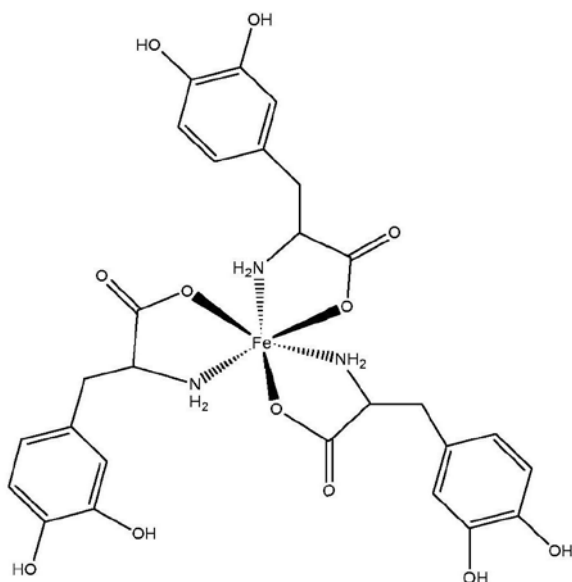


f)



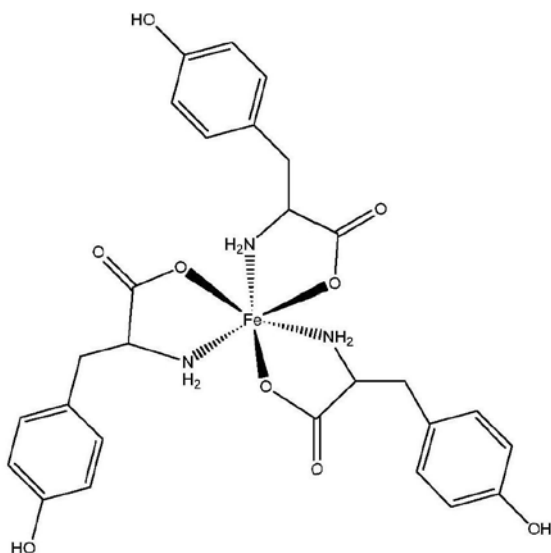
[0030] g) DOPA与(3,4二羟基苯丙氨酸)Fe III的络合物

[0031]



[0032] h) 酪氨酸与Fe III的络合物

[0033]



[0034] 用于本发明的方法中的化合物可具有与奎尼酸铁类似的结构。用于本发明中的化合物可为具有与人类组织血型抗原的结构类似的结构化合物。

[0035] 用于本发明的方法中的化合物可经口投予。此为有利的，因为经口向动物投予化合物为容易的。经口投予也是确保化合物到达胃肠道的投予化合物的优选方法。

[0036] 优选地，可在动物饲料或饮水中投予化合物。

[0037] 在本发明的方法中，可在动物寿命期间的任何时间向动物投予化合物。在一个实施例中，在屠宰动物之前的一段时间，至少一天一次地向动物投予化合物。举例来说，可在屠宰之前的1至10天、优选地1至8天、1至6天、1至4天或持续2或1天向动物投予化合物。在一个实施例中，可在屠宰之前的1至4天向动物投予单一剂量的化合物。在一个实施例中，可在屠宰之前的3天、4天或5天每天向动物投予化合物。弯曲杆菌通常在屠宰之前的7至10天定植于鸡。因此，在一个实施例中，可在屠宰之前少于10天向鸡投予化合物以在屠宰之前对鸡进行消毒和减少鸡的胃肠道定植。在另一实施例中，可以在动物胃肠道的弯曲杆菌定植之前向动物投予本发明的化合物以预防动物胃肠道的弯曲杆菌定植。在一个实施例中，在屠

宰之前的10天以上向鸡投予本发明的化合物以预防弯曲杆菌在鸡群内传播。

[0038] 在屠宰之前的较短时间向动物投予化合物为有利的,因为动物胃肠道中的弯曲杆菌的量在屠宰时减小以使得弯曲杆菌污染畜体的风险较低。

[0039] 在本发明的一个实施例中,可以具有34-340 μ M (0.02-0.2g/L) 的浓度范围的溶液形式以0.3-32毫克/天/千克的剂量向动物投予化合物。0.2g/L的浓度在感染后前三天期间对定植具有影响,并且还对弯曲杆菌结合到血型抗原具有影响,可使其减小60%。在另一实施例中,可以2g/L的浓度投予化合物,其可预防动物胃肠道的弯曲杆菌定植和/或将动物胃肠道中的弯曲杆菌数目减少到实质上零。

[0040] 在另一实施例中,本发明提供一种减少肉中的弯曲杆菌的量的方法,其包含以下步骤:

[0041] 为动物提供根据前述权利要求中任一项所定义的化合物;和从动物制备肉制品。动物可为任何类型的动物,优选地为家禽,优选地为鸡。

[0042] 在另一实施例中,本发明提供一种鉴别用于动物消毒的化合物、预防或减少弯曲杆菌粘附到胃肠道或治疗人类或动物的弯曲杆菌感染的方法,所述方法包含以下步骤:

[0043] a) 提供MOMP或糖基化MOMP的模拟;

[0044] b) 选择在MOMP的第4环与第7环之间的空腔内适合的候选分子或选择与MOMP的氨基酸残基Arg³⁵²、Lys²⁷⁸、Lys³⁸⁵、Asn²⁵⁸、Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵、Ile³³⁷、Arg³⁸¹、Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷中的至少一者相互作用的候选分子。

[0045] 可通过将化合物对接到MOMP的计算机模拟模型中以发现适合人类组织血型抗原与MOMP结合的MOMP的结合位点的分子来选择化合物。

[0046] 优选地,化合物为可与MOMP的氨基酸残基Arg³⁵²、Lys²⁷⁸、Lys³⁸⁵、Asn²⁵⁸、Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵、Ile³³⁷、Arg³⁸¹、Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷中的至少一者相互作用的分子。

[0047] 优选地,化合物为可与MOMP的氨基酸残基Arg³⁵²、Lys²⁷⁸和Lys³⁸⁵中的至少一或多个或MOMP的残基Asn²⁵⁸和Lys²⁷⁸中的至少一或多个或至少残基352和385相互作用的分子。化合物可至少与MOMP的残基Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵和/或Ile³³⁷或MOMP的残基Lys²⁷⁸、Arg³⁵²和Arg³⁸¹中的至少一或多个或MOMP的Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷中的至少一个相互作用。

[0048] 糖基化MOMP与Le^b的相互作用中的主要贡献者为残基Arg³⁵²、Arg³⁸¹和Lys²⁷⁸,而仅残基352和278与非糖基化MOMP与Le^b的相互作用有关。残基Arg³⁵²、Arg³⁸¹在所检测的所有序列中保守,而残基Lys²⁷⁸在一些菌株中半保守并且经Arg置换。此氨基酸的分子特性表明其将能够通过以与残基Arg³⁵²、Arg³⁸¹类似方式的氢键形成介导BgAg结合。

[0049] 本发明人已构建糖基化MOMP的计算机模拟模型。MOMP的计算机模拟模型可用于鉴别当结合到MOMP时与各种人类组织血型抗原接触的氨基酸残基。此计算机模拟模型允许在待研究MOMP经糖基化时,在其中发生构形变化。此可为有利的,因为其允许选择可与MOMP相互作用的其它化合物,具体来说可结合到已鉴别的氨基酸的化合物。可随后体内或体外测试这些化合物以检查其是否结合到MOMP蛋白。

[0050] 弯曲杆菌,具体来说空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)经由鞭毛的主要亚单位蛋白(flaA)和主要外膜蛋白(MOMP)粘附到人类组织血型抗原。据显示MOMP在苏氨酸²⁶⁸处经糖基化。通过计算机模拟建模技术显示此糖基化对MOMP的构形具有显著影响并且增加MOMP与人类组织血型抗原的粘附。

[0051] 已鉴别为结合到各种天然人类组织血型抗原的MOMP的残基包括MOMP的Arg³⁵²、Lys²⁷⁸、Lys³⁸⁵、Asn²⁵⁸、Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵、Ile³³⁷、Arg³⁸¹、Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷。选择可在本发明中使用的候选分子为有利的,因为其通过与MOMP结构中的这些残基中的一或多个者相互作用结合到MOMP。

[0052] 一旦已经计算机模拟选择化合物,可制得所述化合物并且经测试以测量与MOMP蛋白的体外或体内结合。可制备一定量的选定化合物以用于本发明的方法中。

[0053] 对本发明的方法有用的化合物可作为饲料成分或作为饲料补充物包括于动物饲料中。动物饲料、饲料成分或饲料补充物可适合于任何动物,特别是待屠宰以供人类食用的动物,优选地为家禽,更优选地为鸡。

[0054] 可以液体或固体形式或以粉末形式向动物提供对本发明的方法有用的化合物。其可作为饲料或动物食物中的成分或饲料或食物补充物中的成分而被包括。在一个实施例中,在鸡饲料中或以与鸡饲料混合的饲料成分形式向鸡提供化合物。

[0055] 饲料可为预期用于或适合于被动物食用的食物。食物或食品可为预期用于或适合于被人类食用的食物。

[0056] 本发明提供一种对食品或食物消毒的方法,其包含向食品投予有效量的如前述权利要求中任一项所定义的化合物以减少食品中的弯曲杆菌的量。

[0057] 此为有利的,因为其降低食用食品的人类感染弯曲杆菌的风险。

[0058] 食品或食物可供人类食用,具体来说食物可为肉制品,例如新鲜肉制品、加工肉制品、冷却肉制品、冷冻肉制品或烹熟肉制品。肉制品可为例如牛肉、羔羊肉、猪肉、鸭肉、鸡肉、鹅肉、火鸡肉、兔肉、鱼肉或贝类肉制品。优选地,肉制品可为家禽肉制品,更优选地鸡肉制品。

[0059] 本发明还提供一种如在本发明中定义的化合物,用于预防或治疗人类弯曲杆菌感染。如在本发明中定义的化合物可用于制造用于预防或治疗人类弯曲杆菌感染的药物。

[0060] 可向人类提供化合物以预防或治疗人类感染弯曲杆菌(弯曲杆菌症)。此为有利的,因为化合物预防或减少弯曲杆菌粘附到胃肠道中的上皮细胞。此可预防或减少弯曲杆菌感染,因为弯曲杆菌通过对接到在胃肠道细胞上表达的人类组织血型抗原上而粘附到人类胃肠道中的细胞。化合物可与上皮细胞上的天然人类组织血型抗原竞争与MOMP和FlaA的结合并且因此减少结合到细胞的弯曲杆菌的量。

[0061] MOMP的计算机模拟模型可用于开发或改进用于人类的针对弯曲杆菌的疫苗。

[0062] MOMP的计算机模拟模型可用于开发或改进用于鸟类(优选地为家禽,更优选地为鸡)的针对弯曲杆菌的疫苗。

[0063] 亚单位(或杀死的)疫苗相对于活疫苗具有多种优势,包括安全性和生产、储存以及配送的简易性。到目前为止,经口投予的亚单位疫苗仅获得有限成功。关于此的原因假设为缺乏经口传递到适当位点以便产生免疫介导保护。所述假设为最适当位点应为肠粘膜。所述传递需要以粘膜佐剂呈递抗原。当前,不存在用于鸟类的已知粘膜佐剂。

[0064] 最近,已开发多种用于哺乳动物粘膜疫苗接种方案的传递系统。一种所述系统利用非离子亲水性免疫调节剂、普朗尼克(Pluronic)嵌段共聚物F127和多糖壳聚糖调配成微球体(李(Lee),达西尔瓦(Da Silva)等人2008)。壳聚糖由于其生物可用性、生物相容性、生物降解性、高电荷密度和非毒性而用于多种生物医学应用中。另外,已显示此材料弱化上皮

细胞层的紧密接合,允许摄入抗原和减少粘液纤毛清除率,进而减少抗原去除。尽管此材料似乎在开发哺乳动物疫苗和药物传递系统中有价值,但其尚未在鸟类中进行测试。

[0065] 使用离子胶凝方法以三聚磷酸盐 (TPP) 制得所述微球体。简单来说,在磁力搅拌下将2%乙酸中的0.25%壳聚糖逐滴添加到15w/v% TPP中。对混合物进行声波处理并且通过离心从TPP溶液去除MS珠粒、用蒸馏水洗涤并且再悬浮于PBS中。随后通过在37℃下共培育隔夜将抗原装载到珠粒上。在培育之后,对悬浮液进行离心以分离珠粒与未装载抗原 (MOMP/F1aA)。通过装载前和装载后的蛋白溶液的蛋白浓度分析测定抗原摄入水平。

[0066] 本发明提供一种治疗或预防人类弯曲杆菌感染的方法,其包含向人类投予有效量的如前述权利要求中任一项所定义的化合物。

[0067] 本发明提供一种试剂盒,其包含:

[0068] a) 至少一种如本发明中所述的化合物和任选的关于使用试剂盒的说明书。

附图说明

[0069] 现在接着是仅作为实例的参看附图的本发明的实施方式,在所述附图中:

[0070] 图1显示可溶糖结合物,即H-II、Le^b或Le^y对菌株NCTC11168连接到一系列BgAg的竞争效应。A) ELISA板涂布有精选的BgAg。通过从BgAg吸收率减去BSA (阴性对照) 值计算特异性结合。通过在将细胞添加到ELISA板之前用可溶糖结合物预培育细胞使菌株NCTC11168与BgAg的结合得到显著抑制 ($p < 0.05$)。误差条;重复三次的值的平均值 $\pm$ SEM,重复实验的次数为3。各组条从左侧到右侧为NCTC11168、NCTC11168-H-II、NCTC11168-Leb、NCTC11168-Ley。

[0071] B) 通过使用再标记方法鉴别来自菌株NCTC11168的BgAg结合蛋白。在45和59kDa的尺寸鉴别两种蛋白,其分别对应于MOMP和F1aA。

[0072] 图2显示A) 在不存在抑制剂 (未经处理, NT) 的情况下和在存在低结合菌株Cj-281 (S3-表1) 的纯化MOMP (MOMP (-)) 的情况下菌株NCTC11168与H-II糖结合物的结合的抑制。来自NCTC11168的纯化MOMP (MOMP (+)), 和用H-II糖结合物预培育NCTC11168细菌细胞 (H-II)。预处理所有检测的MOMP和H-II已显著减少 ($p < 0.001$, ***) 细菌结合到H-II抗原。相比之下, MOMP (-) 由于对于H-II抗原的较低亲和力而具有相比于H-II或MOMP (+) 的较低影响。B) ELISA板涂布有精选的BgAg。通过从405nm下的BgAg吸收率减去BSA (阴性对照) 值计算特异性结合。关于与Le^b、H-II、H-I、Le^x和Le^a的结合,已检测菌株NCTC11168和Cj-266 (高结合菌株, S3-表1) 以及对应 $\Delta f1aA$ 突变体。t检验确认在菌株NCTC11168中,在突变体中可见的结合减少显著 (Le^b; $p = 2.5E-05$, H-II; $p = 0.012$, H-I; $p = 0.001$, Le^x; $p = 0.029$ 和 Le^a; $p = 0.000$)。但是, Cj-266 $\Delta f1aA$ 突变对结合无影响,其指示结合能力通过MOMP蛋白得到补偿。各组条从左侧到右侧为: NCTC11168、11168- $\Delta f1aA$ 、Cj-266、Cj-266 $\Delta f1aA$ 。C) 在菌株NCTC11168和Cj-266二者中构建 $\Delta f1aA$ 的双突变 (DM) 和MOMP蛋白中的糖基化位点的单一置换 (Thr²⁶⁸经Gly置换), 并且检测与Le^b H-I和H-II的结合。结合在NCTC11168-MOMP^{T/G}中显著减少,但在Cj-266-MOMP^{T/G}中结合减少不显著。不过, t检验确认在NCTC11168-DM和Cj-266-DM中可见的结合减少,突变体为显著的 ($p < 0.05$)。各组条从左侧到右侧为: Leb、H-II、H-I。

[0073] 图3显示用于蛋白鉴别和糖基化肽表征二者的通过LC-MS/MS的质谱分析的概述。

A) 基峰色谱图: 胰蛋白酶肽装载于在线耦合C18柱上并且洗脱到质谱仪中以用于分析。B和

C) 在 m/z 978.91下的双电荷糖基化肽的MS前体扫描C) 选定离子的CID-MS/MS光谱。D) 使用生物素标记凝集素检测来自不同菌株的纯化MOMP的聚糖成分。GSL II: 加纳籽 (*Griffonia simplicifolia*) (西非单叶豆 (*Bandeiraea*)) 凝集素II, DSL: 曼陀罗 (*Datura Stramonium*) 凝集素, ECL: 鸡冠刺桐 (*Erythrina cristagalli*) 凝集素, LEL: 番茄 (*Lycopersicon esculentum*; tomato) 凝集素, STL: 马铃薯 (*Solanum tuberosum*; potato) 凝集素, VVA: 长柔毛野豌豆 (*Vicia villosa*) 凝集素和木菠萝凝集素: 木菠萝全缘石楠 (*Artocarpus integrifolia*) 凝集素。

[0074] 相比于其它使用的凝集素, 木菠萝凝集素显示与NCTC11168纯化MOMP的显著结合。木菠萝凝集素特异性识别Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (T-抗原) 和/或GalNAc。E) 通过使用针对T-抗原的抗体展示其它分析以证实木菠萝凝集素特异性。相比于从野生型菌株NCTC11168纯化的MOMP, MOMP纯化形式菌株255、281 (低结合临床分离株) 和MOMP^{T/G}不展示与木菠萝凝集素或抗-T抗原的显著结合。误差条=重复三次的值的平均值 $\pm$ SED, 第2个, 两个独立实验(P值)。对于每一对条: 左手侧条-木菠萝凝集素, 右手侧条-抗-T抗原。

[0075] 图4显示在外膜(OM)的疏水性部分的大致边界中的MOMP(A, 右侧)和糖基化MOMP(A, 左侧)的图示。B) 在RMSD为1.291的情况下, MOMP的最低能量结构(绿色)叠加于糖基化MOMP的最低能量结构(洋红色)上。环以色彩显示: β 股为绿色, L1(残基41-60, 红色), L2(残基87-109, 洋红色), L3(残基128-147, 橙色), L4(残基169-200, 黄色), L5(残基227-233, 黑色), L6(残基256-274, 蓝色), L7(残基296-333, 灰色), L8(残基360-379, 青色)和L9(残基399-414, 紫色)。

[0076] 图5显示从细胞外侧查看的MOMP主链的立体草图: β 股为绿色, L1(红色), L2(洋红色), L3(橙色), L4(黄色), L5(黑色) (L5), L6(蓝色), L7(灰色), L8(青色)和L9(紫色)以及其侧视图。通过将配体引入到糖基化MOMP的空腔中诱导糖基化基团中的构形变化。与Le^b(A)和H-II(D)的络合物。另外, 以浅蓝色显示的氢键与MOMP(B和E)和其糖基化形式(C和F)与分别在其活性位点中的Le^b和H-II的相互作用有关。

[0077] 图6显示可在本发明中使用的化合物的实例。

[0078] 图7显示一系列组织血型抗原对生物膜形成的影响。在NCTC11168-WT和在存在和不存在游离糖的情况下的对应突变体 Δ f1aA和MOMP-T/G之间比较生物膜形成。A) 与突变体相比, 在野生型菌株中可见生物膜形成的最显著减少。但是, MOMP268T/G菌株的生物膜形成与 Δ f1aA相当, 其表明MOMP的O-糖基化也对此形成起重要作用。对于每一组条, 从左侧到右侧为: NCTC11168、NCTC11168(糖)、MOMP-T/G、MOMP-T/G(糖)。B) 除core-II以外观测到类似结果, 其它检测的糖显著减少生物膜形成。对于每一组条, 从左侧到右侧为: NCTC11168、NCTC11168(糖)、 Δ f1a A、 Δ f1a A(糖)。

[0079] 图8显示在从细胞外侧查看MOMP主链的立体草图的情况下, 来自MD模拟的MOMP的最低能量结构。MOMP通过外膜形成亲水性通道。 β -桶OMP的折叠促进三聚体组装和将通道整合到外膜中。此外, 二维结晶学分析显示MOMP在结构上与三聚细菌孔蛋白家族相关。CD光谱分析还展示折叠单体主要包含 β 片层二级结构, 其与孔蛋白的所谓的 β -桶结构一致。MOMP折叠单体能够在与嵌入到三聚体中的单体具有相同传导特性的人工脂质双层中形成通道, 其表明折叠单体是MOMP孔蛋白的功能单元。

[0080] 图9显示用于结合到MOMP的分子的建模的分子。

- [0081] 图10显示用野生型弯曲杆菌菌株NCT11168-0或突变弯曲杆菌菌株MOMP^{268T/G}攻击的小鸡的定植水平。
- [0082] 图11显示奎尼酸铁1,3,4,5-四羟基环己烷甲酸。
- [0083] 图12显示使用BgAg (Core-I、Core-II、H-I、H-II、Leb、Ley和Lex) 通过ELISA来分析奎尼酸铁Fe (QA)₃对空肠弯曲杆菌的粘附的抑制潜能。
- [0084] 图13显示使用BgAg (Core-I、Core-II、H-I、H-II、Leb、Ley和Lex) 通过ELISA来分析奎尼酸铁Fe (QA)₃对空肠弯曲杆菌的粘附的抑制潜能。
- [0085] 图14显示在FeQ (0.034mM) 处理之后小鸡的空肠弯曲杆菌11168-0定植。
- [0086] 图15显示在FeQ (0.34mM) 处理之后小鸡的空肠弯曲杆菌11168-0定植。
- [0087] 图16显示在属/种水平下用FeQ处理的群体的宏基因组分析。
- [0088] 图17显示在门水平下用FeQ处理的群体的宏基因组分析。1-莱R (Ley R), 贝克德F (Bäckhed F), 特恩博P (Turnbaugh P), 洛祖波内C (Lozupone C), 奈特R (Knight R), 戈登J (Gordon J) (2005). “肥胖改变消化道微生物生态学 (Obesity alters gut microbial ecology)”. 美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA) 102 (31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102. PMC 1176910. PMID 16033867
- [0089] 2-莱R, 特恩博P, 克莱因S (Klein S), 戈登J (2006). “微生物生态学:与肥胖相关联的人类消化道微生物 (Microbial ecology:human gut microbes associated with obesity)”. 自然 (Nature) 444 (7122):1022-3. doi:10.1038/4441022a. PMID 17183309.
- [0090] 3-特恩博P, 莱R, 马霍瓦尔德M (Mahowald M), 马格里尼V (Magrini V), 马迪斯E (Mardis E), 戈登J (2006). “能量收集能力增强的肥胖相关消化道微生物群落 (An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest)”. 自然444 (7122):1027-31. doi:10.1038/自然05414. PMID 17183312.

具体实施方式

- [0091] 空肠弯曲杆菌是人类食源性胃肠炎的重要病因。不管空肠弯曲杆菌感染的高患病率和医疗重要性, 仍未充分了解发病机制的基本方面, 特别是宿主与病原体之间的详细分子相互作用。人类组织血型抗原 (BgAg) 通常被粘膜生物针对性地作为在侵入之前进行粘附的杠杆。使用再标记方法, 将空肠弯曲杆菌对应的结合表面暴露BgAg的粘附素鉴别为鞭毛的主要亚单位蛋白 (FlaA) 和主要外膜蛋白 (MOMP)。FlaA的O-糖基化先前已被报导, 并且为丝状体组装和调节鞭毛功能所需的。纯化MOMP样FlaA经O-糖基化。所述O-糖基化定位到 Thr²⁶⁸并且被提议为Gal β ₁₋₃-(GalNAc)₃- α 1-Thr²⁶⁸。MOMP Thr²⁶⁸/Gly的定点置换导致与BgAg的结合显著减少。此外, 分子动力学 (MD) 模拟建模技术表明MOMP的O-糖基化对蛋白的构形具有显著影响。
- [0092] 因此, 空肠弯曲杆菌使用表面暴露蛋白的O-糖基化调节构形和结合能力。
- [0093] 预防和治疗人类弯曲杆菌感染和其后果受宿主与病原体之间的详细分子相互作用的不充分了解妨碍。
- [0094] 本发明人的研究已显示空肠弯曲杆菌特异性结合所有人类BgAg, 并且鉴别引起结合的细菌配体。这些是鞭毛蛋白FlaA和主要外膜蛋白MOMP。
- [0095] 本发明研究还已发现MOMP经O-糖基化, 并且与已显示经O-糖基化的FlaA共用共同

BgAg结合位点。MOMP的糖基化使其经历构形变化,所述构形变化相比于未糖基化MOMP蛋白改变其对于结合BgAg的亲合力,且因此改变其对于识别BgAg的亲合力。构形MOMP表位在宿主免疫性中重要,并且由于在感染期间的阳性免疫选择而可能在表面暴露区域中出现变异。鉴别外膜中的空肠弯曲杆菌的蛋白糖基化概况有助于理解不同主体中的空肠弯曲杆菌菌株的不同致病性。

[0096] 本发明研究已创造糖基化MOMP的计算机模拟模型,其已用于鉴别介导细菌结合到BgAg的氨基酸。对于结合到BgAg必需的模型和氨基酸可用于鉴别候选药物靶点。模型也可以用于预测将结合到MOMP并且可以减少携带MOMP的弯曲杆菌粘附到细胞壁的分子。

[0097] 本发明研究已发现BgAg可以抑制细菌粘附和生物膜形成并且已鉴别可用于(a)治疗罹患弯曲杆菌症的人类;(b)预防鸡的弯曲杆菌属定植;和(c)消除感染群中的鸡定植的分子。

[0098] 降低人类感染弯曲杆菌属的风险的先前尝试包括采用编码弯曲杆菌蛋白,具体来说鞭毛蛋白的核酸的疫苗的使用(US2007/2049553)。

[0099] 这完全不同于使用特定化合物阻断弯曲杆菌的配体结合位点并且因此抑制鸡胃肠道中的弯曲杆菌粘附和定植的本发明的方法。作为模拟物或合成人类组织血型抗原和合成糖(如奎尼酸铁(Fe-Q))的化合物可用于本发明中。

[0100] 实例

[0101] 空肠弯曲杆菌结合大范围的人类BgAg。

[0102] 为测定结合空肠弯曲杆菌的BgAg的范围和特异性,将Core-I、Core-II、H-I、H-II、Le^b、Le^x和Le^y固定于专业化96孔ELISA板中并且用对数期地高辛(digoxigenin)(Dig)标记的空肠弯曲杆菌菌株NCTC11168进行培育。菌株结合到所有检测的BgAg,程度仅最低限度地在BgAg之间改变(S1-图)。

[0103] 从埃索赛普公司(IsoSep)(瑞典)获得血型抗原。实验室菌株(ATCC11168)获自ATCC库并且临床菌株来自属于朱利安M.凯特里(Julian M.Ketley)教授(英国莱斯特LE17RH的莱斯特大学(University of Leicester,Leicester LE17RH,UK)遗传学系)的收藏。

[0104] 用可溶BgAg预培育细菌或涂布板抑制结合,证实特异性(图1A)。另外,进行通过共培养空肠弯曲杆菌菌株NCTC11168和Caco-II细胞的粘附分析。可溶H-II造成结合到宿主细胞的细菌的显著减少(S2-图)。另外,固定BgAg的相同范围用于测试空肠弯曲杆菌的39个临床分离株的能力。所有空肠弯曲杆菌分离株结合到所有检测的BgAg,尽管程度可变(S3-表)。进行各糖之间的相关性分析和主要组分分析。其使得能够观测相关性-糖彼此结构上越接近(S4-表),其在结合能力方面越类似(S4-图)。

[0105] 幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)BgAg结合粘附的高度特异性与我们关于空肠弯曲杆菌的发现形成对比,所述空肠弯曲杆菌似乎结合到大范围的相关抗原。这可以反映幽门螺旋杆菌具有极受限宿主范围(仅使人类感染),而空肠弯曲杆菌能够在大范围的鸟类和哺乳动物中产生感染并且可能已通过加宽其特异性和使其在不同宿主中的存活率最大化获得进化优势。

[0106] 空肠弯曲杆菌FlaA和MOMP介导与大范围的人类BgAg的结合。

[0107] 为鉴别和纯化结合BgAg的细菌粘附素,使用再标记技术。通过质谱法将图1B中的

两个产生的蛋白质带分别鉴别为主要外膜蛋白 (MOMP, 45kDa) 和FlaA (主要鞭毛组分, 59kDa)。空肠弯曲杆菌MOMP为多功能孔蛋白并且对于细菌存活为必需的; 预测其包含分离周质与外露表面环的跨外膜 β 支架。其通过在遗传上极多样的porA基因编码并且porA表面环的变化性提供免疫选择强有力地影响此蛋白的多样性的证据。有趣的是, 在第4环中形成假定氨基酸序列和长度的最大变化。

[0108] 在天然条件下从菌株NCTC11168纯化MOMP并且抑制ELISA和共焦实验显示纯化MOMP和H-II二者均显著抑制NCTC11168与H-II抗原的结合 (图2A)。构建菌株NCTC11168和Cj-266 (临床分离株, S3-表) 中的 $\Delta flaA$ 的缺失突变体。除了菌株NCTC11168中的 Le^x 以外, 这已经显著降低与所有检测的BgAg的结合能力 (图2B)。相比之下, 菌株Cj-266中的 $\Delta flaA$ 缺失未展现减少的与BgAg的结合 (图2B), 其表明MOMP本身足以粘附到BgAg。

[0109] 可以通过将突变体离心到组织培养细胞上部分恢复侵入性特性, 表明活动力是所涉及的主要但并非唯一因素。此处, 我们鉴别对应空肠弯曲杆菌粘附素, 其介导细菌结合到BgAg。

[0110] MOMP268T/G定植小鸡的能力

[0111] 测定MOMP268T/G定植小鸡的能力。通过经口管饲用 3×10^3 cfu野生型菌株NCTC11168-0或其同基因突变体MOMP268T/G攻击6周龄鸟类 ($n=10$ /组)。在攻击后的7天在来自各组的鸟类中测定盲肠定植水平。结果显示与野生型相比, MOMP^{268T/G}组中的盲肠的几何平均定植水平显著减少 (参见图10)。另外, 检测到突变菌株侵入鸡肝脏中的能力。结果显示与野生型菌株相比, MOMP^{268T/G}完全不能够侵入。这些结果证实MOMP糖基化在建立体内定植中的重要性和生物相关性。图10中小于100的值为任意图象, 并且未回收弯曲杆菌。

[0112] 奎尼酸铁; 空肠弯曲杆菌粘附的抑制剂

[0113] 已显示包括咖啡酸和奎尼酸的多种酚类化合物 (巴卡尔 (Baqaar) 等人) 具有高水平的体外抗氧化活性和其它潜在的促进健康作用。另外, 奎尼酸存在于茶、咖啡、水果和蔬菜中。具体来说, 植物将低分子量D-(-)-奎尼酸 (巴卡尔等人) 用于铁的活动化并且通过代谢路径中的细胞结构进一步使用此金属 (梅尼罗 (Menelaou) 等人, 2009)。

[0114] 奎尼酸铁Fe (QA)₃鉴别为对于空肠弯曲杆菌与BgAg的粘附具有有前景的体外和体内抑制作用。

[0115] 使用BgAg (Core-I、Core-II、H-I、H-II、Leb、Ley和Lex) 通过ELISA来分析奎尼酸铁Fe (QA)₃对空肠弯曲杆菌的粘附的抑制潜能。用34 μ M Fe (QA)₃预培育空肠弯曲杆菌并且也通过用Fe (QA)₃ (其在此时结合到BgAg) 对空肠弯曲杆菌进行后处理分析特异性抑制。结果显示Fe (QA)₃对结合赋予90%的抑制, 而单独的奎尼酸未对所有检测的BgAg提供对于空肠弯曲杆菌结合的抑制。另外, 来自含有Fe (QA)₃的细菌培养物 (MH) 方法的结果还展示对于微生物粘附的可再现抑制。另外, 细菌连续传代 (P) 到含有Fe (QA)₃的新板不引起关于结合能力的任何抗性 (参见图12和图13)。

[0116] 为进一步阐明Fe (QA)₃影响生长的特性, 我们研究向培养基添加Fe (QA)₃的影响。以不同浓度的Fe (QA)₃ (34和340 μ M) 进行补充不影响空肠弯曲杆菌NCTC11168菌株的生长。

[0117] 体内分析针对空肠弯曲杆菌与BgAg的粘附的这些抑制特性。将奎尼酸铁用作添加到水 (0.034-0.34mM) 中的添加剂并且用作粘附到并且因此定植于鸡肠道中的空肠弯曲杆菌NCTC11168菌株的抑制剂。通过经口管饲用 $3 \times 10^{3-5}$ cfu野生型菌株NCTC11168-0攻击6周

龄鸟类(n=10/组)。在攻击后3天和7天在来自各组的鸟类中测定盲肠定植水平。

[0118] 参见图14和图15,所述络合物通过抑制细菌粘附素(如MOMP(通过模型确认)和FlaA)与宿主肠上皮中的对应结合位点之间的结合而显著减少粘附到肠粘膜和上皮衬里的空肠弯曲杆菌(0.34mM浓度下的2-3Log)。

[0119] 在属/种水平下用FeQ处理的群体的宏基因组分析中,在第7天在经FeQ处理与未经处理的鸟类之间可见差异,群体发生变化,其中拟杆菌门,尤其是粪拟杆菌(*Bacteroides feacalis*)增加(1,2,3)。

[0120] MOMP经O-糖基化。

[0121] 弯曲杆菌用可以构成蛋白质量的至多10%的O-连接的聚糖特异性地修饰其鞭毛蛋白。这些修饰对于鞭毛组装为必需的,并且因此影响毒性调节蛋白分泌、胃肠道的细菌定植、自体凝集和生物膜形成。

[0122] 在如A.舍甫琴科(A. Shevchenko),M.维尔姆(M. Wilm),O.沃姆(O. Vorm),M.曼(M. Mann),分析化学(Anal Chem) 68,850(1996年3月1日)中所述的胶内蛋白质消化之后,在天然条件下从菌株NCTC11168和Cj-281纯化MOMP并且通过Nanoflow LC-MS/MS FT/ICR进行分析。来自两个菌株的胰蛋白酶消化的MOMP肽的迁移基本上相同,除了对应于氨基酸268-278、对应于预测的第6环的一个肽:菌株NCTC11168肽显示较大质量;MS/MS分析确认Thr-268经Hex-(Hex N-乙酰胺)₃(其中Hex可为葡萄糖或半乳糖)的糖基化引起观察到的变化(图3A、图3B和图3C)。临床分离株的FASTA序列比对表明菌株NCTC11168的第6环上的Thr-268似乎在52%的分离株中保守。

[0123] 在菌株NCTC11168和临床分离株Cj-266的MOMP上进行Thr²⁶⁸到Gly的定点置换(产生MOMP^{268T/G},S5-表)。此置换造成蛋白质迁移的明显变化,强有力地表明其糖基化的损失(S5)。在ELISA分析中检测到此突变体结合到一系列BgAg的能力并且显示与每一检测的BgAg的结合减少(图2A)。另外,观测到生物膜形成减少,其指示MOMP的O-糖基化在此背景下起重要作用(S8-图A和图B)。

[0124] PglB和PseD转移酶对MOMP糖基化的作用。

[0125] 鞭毛蛋白是唯一已报导的经O-糖基化的空肠弯曲杆菌蛋白并且聚糖构成此蛋白重量的大约10%。附着于弯曲杆菌鞭毛的主要O-聚糖为pseudaminic酸或legionaminic酸的衍生物,其为与唾液酸有关的C9糖。另外,相关人类胃病原体幽门螺旋杆菌也类似于空肠弯曲杆菌地用Pse使其鞭毛O-糖基化,并且修饰对于细菌活动力和鞭毛组装为所需的。

[0126] 有趣的是,归因于空肠弯曲杆菌亚种jejun 81-176中的Pse生物合成A基因(pseA)的突变的Pse5Am的特异性损失产生自体凝集的损失和对体外肠上皮细胞的粘附和侵入减少以及雪貂模型中的毒性减少。

[0127] 另外,作为假定PseAm转移酶的PseD显示pseD中的突变在鞭毛蛋白上缺乏PseAm并且未能自体凝集。

[0128] 一般蛋白糖基化(Pgl)路径涉及若干关键“Pgl”酶,其中PglB对于蛋白质N-糖基化,即第一聚糖分子转移到靶蛋白的特定Asn残基至关重要。

[0129] 为了评估PseD和PglB转移酶对空肠弯曲杆菌MOMP糖基化的贡献和其对细菌结合活性的作用,在菌株Cj81-176中创造pglB缺失突变体且在菌株NCTC11168中创造pseD缺失;pglB缺失对MOMP凝胶迁移、聚糖染色(数据未示出)或与检测的BgAg中的任一个的细菌结合

无可检测的影响(S7-图A)。但是,菌株NCTC11168-pseD缺失导致与所有检测的BgA的结合和生物膜形成的显著减少(数据未示出)。

[0130] 这些发现表明空肠弯曲杆菌菌株NCTC11168编码与蛋白的翻译后修饰有关的转移酶,其在细菌粘附中起重要作用并且展现不寻常的翻译后修饰;在Thr²⁶⁸处的O-连接的Hex-(HexNAc)₃。这些翻译后修饰可经历相位变化并且也可以在从一代空肠弯曲杆菌到下一代的结构方面变化,并且在免疫逃逸中起作用。

[0131] 此外,这些发现提供对MOMP结构的新洞察并且解决长期存在的关于介导细菌结合到BgAg的粘附分子的问题。发病机制和对如定植、侵入的过程和刺激宿主炎症反应的能力的影响的研究仍待阐明。

[0132] 测定MOMP聚糖组合物。

[0133] 凝集素试剂盒用于测定MOMP糖基化成分。试剂盒由7种具有重叠特异性的不同凝集素组成。凝集素阵列中的纯化NCTC11168-MOMP显示与木菠萝凝集素的显著结合和与GSL和LEL较小程度的结合(图3D)。在半乳糖特异性凝集素中,在文献中被称为木菠萝凝集素的来自木菠萝全缘石楠(*Artocarpus integrifolia*)的凝集素展现对于人类肿瘤特异性汤姆森-弗雷登雷希二糖(Thomsen-Friedenreich disaccharide)(T-抗原,Gal β ₁₋₃GalNAc α ₁-Ser/Thr)的特异性。

[0134] 此外,为证实木菠萝凝集素结合特异性,针对从不同菌株(NCTC11168-MOMP、NCTC11168MOMP^{268T/G}和两个具有低结合活性的临床分离株;Cj281和Cj-255)分离的纯化MOMP使用单克隆抗T-抗原。图3E显示抗T-抗原抗体和木菠萝凝集素与纯化NCTC11168-MOMP特异性地反应。NCTC11168-MOMP与木菠萝凝集素以及抗T抗原相互作用但从低结合菌株分离的MOMP和NCTC11168MOMP^{268T/G}并非如此的观察结果(图3E)指示菌株NCTC11168-MOMP可能为T-抗原的O-连接的三聚体形式(Gal β ₁₋₃GalNAc β ₁₋₄GalNAc β ₁₋₄GalNAc α ₁-Thr²⁶⁸)。

[0135] MOMP经在此呈现的T-抗原糖基化提供关于糖基化对于空肠弯曲杆菌与路易斯抗原(Lewis antigen)的结合活性和在MOMP免疫原性中的作用的重要洞察。进一步测定其它N-和O-糖基化外膜蛋白可以阐明在未来基于糖结合物的疫苗的开发。

[0136] 聚糖在MOMP与BgAg结合中的作用

[0137] 计算机技术和新建模技术的进展已促进在原子水平模拟肽折叠。尽管革兰氏阴性(gram-negative)细菌在其孔蛋白的一级序列中具有相当不同的同源性,在其 β -桶结构中显著类似。因此,我们采用来自食酸丛毛单胞菌(*Comamonas acidovorans*)(1E54.pdb)的 β -桶结构作为模板并且基于此假设构建我们的模型。为了更好地理解MOMP糖基化在空肠弯曲杆菌与BgAg结合中的作用,此处我们呈现MOMP的结构和分子动态特性以及其糖基化形式。

[0138] 构建初始结构并且显示具有9个环和18个 β 股。从分子动力学(MD)模拟获得的在300开尔文(K)下的最低能量结构表示于S9-图A和图B中。此结构在残基268处经糖基糖基化。将从MD模拟获得的糖基化MOMP(gly-MOMP)的最低能量结构叠加在MOMP的最低能量结构上以查看通过引入糖基化诱导的构形变化(如图4B中所呈现)。其显示主要变化出现在大致由残基169-200、256-274和296-333构建的第4、第6和第7环中,其中第6环带有糖基。但是,其显示在桶中呈现较小变化。外膜疏水性部分中的两个蛋白的大致边界通过图4A中表示的水平线指示。有趣的是,如图4中表明,半乳糖基残基与Arg³²⁸残基具有有利相互作用,但当

与H-II络合时,糖基化残基经历相当大的构形变化,其中此相互作用消失并且基团倾向于朝向第4环移动以与Thr¹⁸⁶和Thr¹⁸⁷相互作用(图4A)。相比之下,在gly-MOMP与Le^b的情况下不会出现此构形变化。

[0139] MOMP蛋白具有如S9-图A和图B中所见的管状空腔,预期其能够容纳极大分子。将路易斯抗原模拟物1型路易斯碳水化合物决定簇(Le^b)和2型H-II抗原(S9-流程2)对接到MOMP和gly-MOMP的空腔中。这些络合物经计算以用于MD模拟。来源于络合物的MD模拟的平均能量列于S9-表中。在MOMP的空腔内引入配体对环,尤其是第4和第7环的构形变化产生显著影响。这两个环在包括其它环的环中最长并且相比于其它环显然经历显著构形变化。有趣的是,发现gly-MOMP具有相对稳定结构,因为据显示此络合物仅第7环略微经历构形变化。这可能意味着糖基化增强蛋白的稳定性并且允许其通过对其宿主的分子拟态而为免疫惰性的。

[0140] 对应MOMP氨基酸介导与Le^b和H-II抗原的结合。两种蛋白与Le^b和H-II的络合物所涉及的相互作用表示于图5A至图5F中。这些桶状蛋白的通道很大程度上含有精氨酸和赖氨酸残基,其可能负责识别这些糖。显而易见的是与MOMP相比,gly-MOMP与Le^b具有有利相互作用。残基Arg³⁵²、Lys²⁷⁸和Lys³⁸⁵似乎是糖基化蛋白与Le^b经由氢键的相互作用中的主要贡献者,而仅残基Asn²⁵⁸和Lys²⁷⁸涉及MOMP与Le^b的相互作用。残基352和385为β-桶7的成员,β-桶7为第7环的一部分。如较早提及,此环大多在分子动态模拟期间经历构形变化(图4B)。糖基与此环相互作用,因此导致对于相互作用有利的构形变化,并且因此导致这些残基的良好定向以与Le^b相互作用。糖基夹在第4环与第7环之间,可能影响这些环的动力学,因此有助于蛋白的结合能力。计算还显示糖基化蛋白具有相比于MOMP更有利的范德华力(van der Waals;vdw)相互作用。似乎相比于MOMP,残基Leu²⁹⁰、Tyr²⁹⁴、Phe³⁹⁵和Ile³³⁷良好地定位于gly-MOMP络合物中的Le^b的疏水性表面上(图5B和图5C)。此反映于两种络合物之间的67千卡/摩尔vdw能量差异中。似乎H-II以与Le^b类似的模式结合到蛋白。残基Lys²⁷⁸、Arg³⁵²和Arg³⁸¹与两种蛋白与H-II的络合物有关(图5E和图5F)。唯一差异在于残基Asp²⁶¹和Ser³⁹⁷,第一个与MOMP的络合物有关且第二个与gly-MOMP有关。无法解释H-II络合物通过MMPBSA获得的极大结合能量但仍显示gly-MOMP比MOMP自身更好地与H-II结合。

[0141] 从MD计算收集的其它结果为两个蛋白的空腔内的配体的构形和对准。其显示两个配体具有如S9-图2A、图2B中表明的蛋白活性位点中的不同构形定向。

[0142] 总之,尽管以较短MD模拟时间和在隐式救助培养基中进行MD模拟,但其仍显示相比于主要外膜蛋白的亲本蛋白,主要外膜蛋白的糖基化提供较好构形变化且因此提供较好结合亲和力且因此提供对于路易斯抗原的较好识别。构形MOMP表位在宿主免疫性中为重要的,并且由于在感染期间的阳性免疫选择而可能在表面暴露区域中出现变异。使用有高度辨识力的核苷酸序列,已在基因分型研究中利用porA多样性来鉴别具有潜在流行病学关联性的空肠弯曲杆菌感染的临床表现的病例。有趣的是,已提出宿主免疫反应在定义在抗原上更同种的克隆络合物中起一定作用,并且这也可以反映生态位适应。举例来说,从人类和鸡相关菌株分离的MOMP序列的比对表明其在第4环显著不同,因此第4环的变异可能影响细菌结合能力并且因此影响生态位适应。

[0143] 此外,鉴别空肠弯曲杆菌的蛋白糖基化概况,主要是那些与外膜相关的蛋白糖基化概况为理解不同宿主中的空肠弯曲杆菌菌株的不同致病性的基础。可以挖掘模型用于生

物学关注的子网,如表明候选药物靶点的必需氨基酸。重要的是,可以通过实验验证发现一些低可信度相互作用为生物学上重要的。

[0144] 此处产生的通过MOMP介导的空肠弯曲杆菌与Le^b和H-II抗原的相互作用的模型实质上增加我们关于迄今为止对于空肠弯曲杆菌外膜检测的蛋白和其糖基化以及在相互作用中的作用的了解。

[0145] 因此,结构糖生物学将在阐明通过MOMP/FlaA蛋白介导宿主-细菌相互作用的其它聚糖结构、决定性地促成对这些细菌凝集素的新聚糖受体的鉴别和验证中起关键作用。此信息将对改进和设计新疗法以克服空肠弯曲杆菌感染极其重要。

[0146] 生物膜形成

[0147] 已展示自体凝集(AAG)对于多种病原体的毒性至关重要,并且可以在粘附、小菌落形成、生物膜形成以及对酸和吞噬作用的耐性中起一定作用。在关于空肠弯曲杆菌的AAG的两个先前研究(N.三泽(N.Misawa),M.J.布拉泽(M.J.Blaser),感染与免疫(Infect Immun) 68,6168(2000年11月)和N.J.哥登(N.J.Golden),D.W.艾奇逊(D.W.Acheson),感染与免疫 70,1761(2002年4月))中,似乎存在与肠上皮细胞的粘附或侵入的关联。

[0148] 检测flaA突变和/或MOMP-T/G置换对生物膜的影响。在微好氧条件下于42℃下的聚苯乙烯板上经48小时产生生物膜,并且用结晶紫进行染色,随后通过在A₅₉₅处使用ELISA读取器的不透明度测量对其进行评估。在不添加糖的对照样品中,菌株NCTC11168-ΔflaA缺失和MOMP^{T/G}的生物膜形成显著低于野生型菌株(WT)。从先前研究已知,鞭毛蛋白的O-连接的糖基化对于鞭毛丝状体的恰当组装为所需的,此外,flaA突变导致因活动力降低的生物膜形成的减少。为测定宿主BgAg在抑制生物膜形成中的作用,将各种抗原添加到用不同菌株接种的培养基中。在培养基中存在游离糖结构的情况下观测到生物膜形成减少;在WT中可见最显著的下降。对于野生型菌株,相比于其它检测的BgAg,H-II产生90%的最高减少,并且接着是减少80%的Le^b结构。或许,较大减少是由于较高亲和力,其影响平衡方程,并且需要较长时间来分离游离糖与表面分子以及防止生物膜形成。

[0149] 不过,结合亲和力越强,生物膜形成中的中断越多。这些数据表明BgAg与鞭毛蛋白和MOMP上的AAG和生物膜决定子竞争,还确认模型的有效性以及强调O-糖基化在生物膜形成中的关键作用(图7-图A和图B)。

[0150] 重复此实验并且获得相同图案。考虑到板的位置可能影响生长;我们在不同板上的相同位置添加样品和其对照物。另外,我们从每一个样品获取等分试样并且在CCDA上生长,其显示生长全部相同。

[0151] MOMP蛋白的最低能量结构。

[0152] 使用再折叠蛋白频繁进行来自革兰氏阴性细菌的外膜蛋白的功能和结构研究。尽管目前可获得细菌OMP(外膜蛋白)的若干结构,但这些蛋白中的许多仍在结构和功能上未充分表征。产生用于空肠弯曲杆菌MOMP的模型以研究糖基化对MOMP构形的影响以及其在细菌结合活性中的作用。模型可用于预测未表征蛋白的功能和用于绘制空肠弯曲杆菌和其它原核生物中的功能路径。数据可以提供理解动态生物过程,如空肠弯曲杆菌初步附着到组织血型抗原的框架。

[0153] 来自不同细菌分离株的porA的比对

[0154] 使用BLOSUM权矩阵对从Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)下载的空肠

弯曲杆菌主要外膜序列进行CLUSTAL W(1.81)多序列比对。另外,将三个非结合(NB)和三个高结合(HB)临床分离株添加到此系列中(内部测序)。氨基酸位置是指菌株NCTC11168(P80672)中的位置。

[0155] 比对显示糖基化MOMP与Le^b经由氢键的相互作用的主要贡献者为残基352(Arg)、381(Arg)和278(Lys),而仅残基352和278与非糖基化MOMP与Le^b的相互作用有关。出于此目的,表明来自不同患者的空肠弯曲杆菌分离株的MOMP活性位点的氨基酸序列比对已充分稳定。有趣的是,残基278(Lys)在16个分离株中半保守且能够以与残基381(Arg)和352(Arg)类似的方式通过氢键介导结合的Arg置换。

[0156] 另外,这些序列的比对还表明其在第4环显著不同但第4环与第7环之间的结合袋相对保守。关于MOMP宿主关联的决定性研究将需要来自多种宿主的分离株的糖基化分析数据。探究所有空肠弯曲杆菌的这些关系的复杂化因素可能是其定植多个宿主并进而经历暴露于多种不同免疫反应的能力。

[0157] 此外,在这一研究中,MOMP蛋白中的糖基化位点Thr²⁶⁸在52%比对的细菌分离株中保守,其表明Thr在268位置中的重要作用。

[0158] 计算机建模

[0159] 通过在由TUBITAK(土耳其科学技术研究委员会(Scientific and Technologic Research Council of Turkey))维护的TR-GRID的Linux/Intel PC丛集上使用AMBER(版本10.0)(40)程序套件进行所有分子动态模拟。使用以下氨基酸序列起始模拟:SEQ ID No.1 (MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVVDVSGVLRVRYDTGNFDKNFVNNSNLNNSKQDHKYRAQVNFSAIADNFKAFVQFDYNAADGGYGANGIKNDQKGLFVRQLYLYTNTEDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAAEQGADLLEHSNISTTSNQAPFKVDSVGNLYGAAVGSYDLAGGQFNPQLWLAYWDQVAFYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHANGNLFALKGSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNGDTGRNIFGYVTGGYTFNETVRVGADFYVGGTKTEAANHLGGGKKLEAVARVDYKYSPKLNFSAFYSYVNLDDQGVNTNES ADHSTVRLQALYKF)。使用这些类别的蛋白的二级结构的相似性的想法构建模型。通过使用来自如S.比斯瓦斯(S.Biswas),M.M.穆罕默德(M.M.Mohammad),L.莫维莱亚努(L.Movileanu),B.范登博格(B.van den Berg),结构(Structure)16,1027(2008年7月)中所述的食酸丛毛单胞菌(1E54.pdb)和铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)(2QTK.pdb)的阴离子选择性孔蛋白的外膜蛋白骨架作为建立β-桶的模板来起始构建MOMP的核心结构。HyperChem(HyperChemTM专业版7.51)、chimera(UCSF)和AMBER中执行的LEaP模块的组合用于建立核心和添加环和转角。在对β-桶的残基的10kcal mol⁻¹ Å⁻²的限制的情况下,持续200ps的时段以四个步骤将初始结构从0开尔文(K)加热到325K以避免环的构形变化对β-桶的影响,接着是在无任何限制的情况下,再持续200ps的时段以四个步骤进行从0K到325K的模拟。系统在300K下另外模拟8ns的时段。使用如在AMBER中执行的程序的pmemd(粒子网格瓦尔德分子动力学(Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics))模型进行所有分子动力学(MD)模拟。采用ff99SB力场并且使用广义Born模型合并溶剂化效应,如AMBER中所执行。选择较低能量结构并且使用如在AMBER中执行的xleap如流程1中所示,在残基268(Thr)处使Gal(β1-3)-GalNAc(β1-4)-GalNAc(β1-4)-GalNAc-α连接于蛋白对此进行糖基化。将Glycam04力场用于碳水化合物单元。Thr位点链的氧的电荷从-0.6761变成-0.4599并且分配原子类型OS。二甲醚(CT-OS-CG)和二甲氧甲烷

(H2-CG-OS-CT)的角和二面角参数用于碳水化合物键的糖基化角和二面角。

[0160] 在对蛋白主链的 $10\text{kcal mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$ 的限制的情况下,以500步的最陡下降最小化接着500步的共轭梯度最小化使系统最小化,且在400K下加热10ps的时段以避免不良接触和使碳水化合物基团呈良好形状。在无任何限制的情况下持续200ps的时段将系统从0K加热到325K,接着持续3.5ns的时段在300K下进行模拟。

[0161] 由AMBER(第10版)的ptraj模块对轨迹进行络合物系统的均方根差(RMSD)分析。通过使用Chimera(UCSF)呈现3D结构,并且通过XMGRACE组合程序显示RMSD图形。

[0162] 进行对接计算以使如流程2可见的路易斯抗原(Le^b)和H-II抗原容纳在蛋白的空腔内。使用DOCK 6.0进行 Le^b 的对接。以默认设置进行对接以在结合位点获得 Le^b 的一群可能的构形和定向。将结合袋中心周围的球体定义为用于对接运行的结合袋。由于Dock 6.0程序采用sphgen产生球体且因此出于技术原因,sphgen无法处理大于99999个球体,形成环的残基经剥离且因此仅通过形成空腔的 β -桶进行球体和网格的计算。随后记录获得的 Le^b 的座标并且使用AMBER中执行的antechamber为其分配一般amber力场(GAFF)的AM1-Bcc(具有键结和电荷校正的Austian模型)、原子部分电荷和原子类型。Xleap用于在组合命令下使 Le^b 容纳在MOMP的空腔内以及产生拓扑/参数和坐标档案。 Le^b 的原子类型变为Glycam04力场中描述的那些。系统经最小化,接着是持续约6.0ns的300K下的MD模拟。将相同程序应用于糖基化蛋白。

[0163] MM/PBSA计算:此研究应用称为M2的挖掘最小值算法(Mining Minima algorithm)的第二代形式分析主体-客体络合物于水中的结合反应。使用MM/PBSA方法,将AMBER(第9版)的MM-PB/SA模块应用于计算每一络合物的结合自由能(ΔG_{bind})。对于每一络合物,从络合物轨迹的最后1ns获取总数为200的快照。在构形搜索和评定位形积分期间,通过简化但快速的广义Born模型计算Welec。随后朝向泊松方程(Poisson equation)的更准确但耗时的有限差分解校正每一能量孔的静电溶剂化能量。将每一原子的介电空腔半径设定成对于水的溶剂探针半径 $1.4\text{\AA}$ 和原子的范德华力半径的平均值,并且分子与溶剂之间的介电边界为溶剂可及分子表面。溶剂化计算使用80的水介电常数。MM/PBSA方法可以在概念上概述为:

$$[0164] \quad \Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - [G_{\text{host}} + G_{\text{ligand}}] \quad (1)$$

$$[0165] \quad G = E_{\text{gas}} + G_{\text{sol}} - TS \quad (2)$$

$$[0166] \quad E_{\text{gas}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{ele}} \quad (3)$$

$$[0167] \quad G_{\text{sol}} = G_{\text{PB}} + G_{\text{SA}} \quad (4)$$

$$[0168] \quad H = E_{\text{gas}} + G_{\text{sol}} \quad (5)$$

$$[0169] \quad G_{\text{sol}} = G_{\text{PB}} + G_{\text{SA}} \quad (6)$$

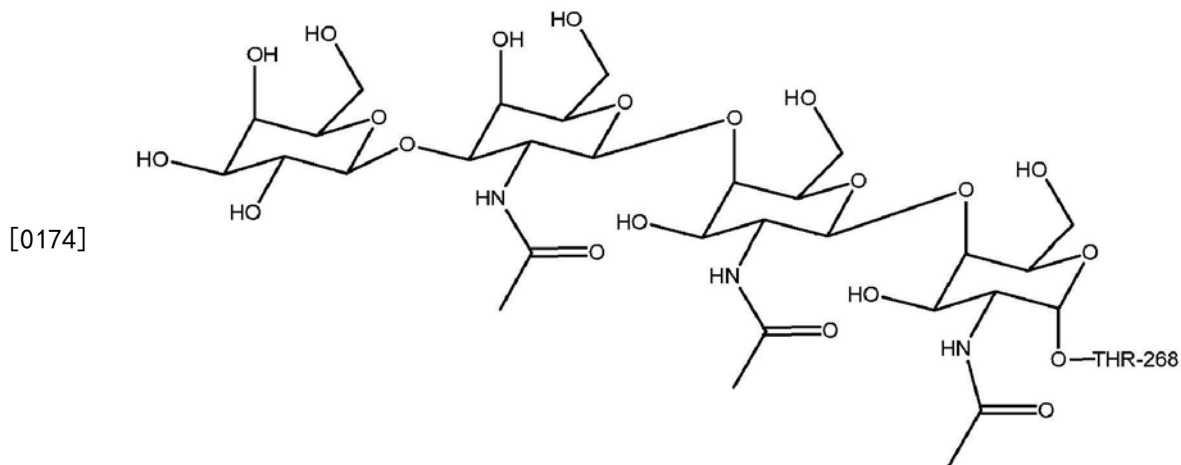
$$[0170] \quad H = E_{\text{gas}} + G_{\text{sol}} \quad (7)$$

$$[0171] \quad S_{\text{tot}} = S_{\text{vib}} + S_{\text{trans}} + S_{\text{rot}} \quad (8)$$

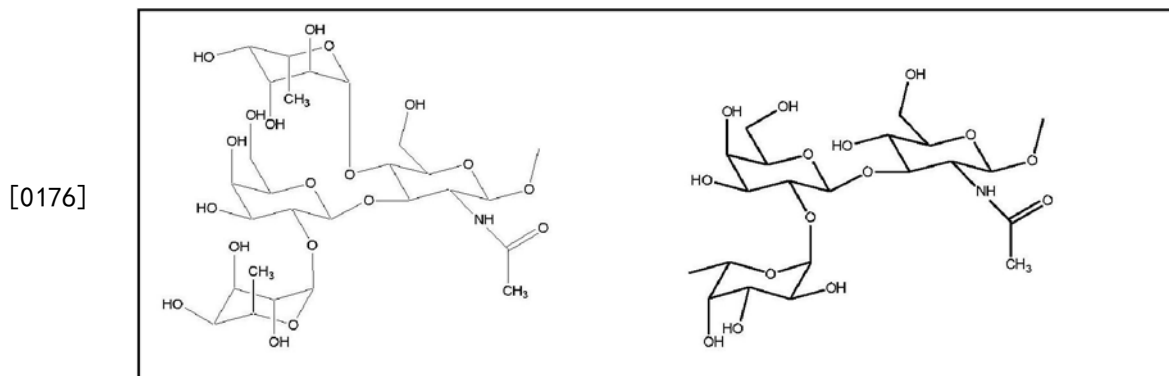
$$[0172] \quad \Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (9)$$

[0173] 其中 G_{complex} 、 G_{host} 和 G_{ligand} 分别为如方程(1)所示的络合物、宿主和配体种类的绝对自由能。其中的每一个通过对气相中的内能(E_{gas})、溶剂化自由能(G_{sol})和振动熵项方程(方程2)求和计算。 E_{gas} 为标准力场能量,包括来自共价键和扭转角度以及非共价范德华力的应变能和静电能(方程3)。通过PB/SA模型计算溶剂化自由能 G_{sol} ,所述模型将溶剂化自由能切

分为静电分量 (GPB) 和非极性分量 (GSA) 的总和 (如方程8中所示), S_{tot} 为包含平移 (S_{trans})、振动 (S_{vib}) 和旋转 (S_{rot}) 熵作为每一种类的气相的总熵 (如方程6中所示)。在本发明研究中, 熵项不包括在计算中。



[0175] 流程1.糖基化基团Gal (β 1-3)-GalNAc (β 1-4)-GalNAc (β 1-4)-GalNAc α 1-Thr的结构。



[0177] 流程2.所用配体的结构为I型和II型路易斯抗原。路易斯b (左侧) H-II抗原 (右侧)。

[0178] 建立和开发用于抑制剂的Amber参数

[0179] 1) 抑制剂的电荷推导

[0180] 模型分成两个片段, 一个包括披覆有NHMe的奎尼酸盐 (图9中的 (1)) 并且另一个包括N,N-双-(2-氨基乙基) 乙烷-1,2-二胺核心 (图9中的 (2)), 其进一步简化为披覆有乙酰基的N,N-二甲基乙烷-1,2-二胺 (图9中的 (3))。第一阶段为使奎尼酸酰胺和乙酰胺残基最优化。这是在理论的合理高水平下通过QM方法进行, 其通过采用高斯 (Gaussian) 03组合程序的MP2/6-31G*进行。将奎尼酸的初始x射线结构用于奎尼酸酰胺。下一阶段为对于可以通过RESP程序最终读取的两个最佳化几何形状中的每一个计算ESP。HF/6-31G*作为理论水平用于推导两个结构的ESP。将在amber中执行的RESP程序用于推导每一片段的电荷。从每一片段去除披覆乙酰基和NHMe并且使用xleap构建模型。ff99SB文库用于为模型建立文库档案, 其包含如原子类型、键、角和二面角的参数。为模型记录拓扑和坐标档案。

[0181] 2) 使用分子动态模拟的构形搜索

[0182] 在真空中以总共1000步使结构最小化; 500步最陡下降 (ncyc=500) 接着是500步共轭梯度 (maxcyc-ncyc), 接着以7步、每步100ps从0K加热到700K。系统在700K下另外运行

1ns。选择少数构形最小值且将其冷却到300K,其中的每一个在300K下另外运行5ns。从这些运行中选择若干具有最小能量的构形且其为最小化amber,接着通过B3LYP/6-31G*理论水平下的量子力学计算来定位具有最低能量的结构。

[0183] 来自不同空肠弯曲杆菌分离株的porA的比对。

[0184] 使用BLOSUM权矩阵对从Uniprot数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 下载的弯曲杆菌空肠主要外膜序列进行CLUSTAL W(1.81)多序列比对。另外,将三个非结合(NB)和三个高结合(HB)临床分离株添加到此系列中(内部测序)。在本申请案中提及的氨基酸位置是指菌株NCTC11168(P80672)SEQ ID No.1中的氨基酸位置。

[0185]

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKLVKLSLVA	ALAAGAFSAA	NATPLEEAIK	DVDVSGVRLY	RYDTGNFDKN	FVNNSNLNNS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
KQDHKYRAQV	NFSAAIADNF	KAFVQFDYNA	ADGGYGANGI	KNDQKGLFVR	QLYLTYTND
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
VATSVIAGKQ	QLNLIWTDNA	IDGLVGTGVK	VVNSIDGLT	LAAFAVDSFM	AAEQGADLLE
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
HSNISTTSNQ	APFKVDSVGN	LYGAAAVGSY	DLAGGQFNPQ	LWLAYWDQVA	FFYAVDAAYS
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
TTIFDGINWT	LEGAYLGNSL	DSELDDKTHA	NGNLFALKGS	IEVNGWDASL	GGLYYGDKEK
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
ASTVVIEDQG	NLGSLLAGEE	IFYTTGSRLN	GDTGRNIFGY	VTGGYTFNET	VRVGADFPYVG
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
GTKTEAANHL	GGGKKLEAVA	RVDYKYSPKL	NFSAFYSYVN	LDQGVNTNES	ADHSTVRLQA
LYKF					

[0186] 注释“*”、“:”、“.”分别是指恒等、保守、半保守氨基酸取代。

Hb1
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB2
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB0
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Hb2
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
NB1
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q9F791
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Hb3
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
D3FNB0
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB1
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB8
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAA5
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB6
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LA95
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
P80672 (SEQ ID No. 1)
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAC5
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAA2
[0187] MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB7
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB9
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LA91
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
NB2
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LA98
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
A3ZHA2
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q9F792
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAC0
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q0GF63
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LAB3
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFVN-NSNLNN 59
Q2LA93
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGTFDKNWGT P NSNLND 60
Q2LAA0
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGTFDKNWGT P NSNLND 60
Q2LAC1
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGTFDKNWGT P NSNLND 60
Q2LAC4
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGTFDKNWGT P NSNLND 60
Q2LA94
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGTFDKNWGT P NSNLND 60
Q2LA92
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFLN-NSNLNN 59

Q2LAA4
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFIN-NSNLNN 59
Q2LA89
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYDTGNFDKNFIN-NSNLNN 59
NB3
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDVDVSGVLRIRYETSN-DWSNANFGSGIS- 58
Q2LAA9
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYETSN-DWSNANFGSGIS- 58
B5QHE5
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LA96
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LAB4
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LA97
MKLVKLSLVAALAASAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LAA7
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q9F788
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LA87
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LA90
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNANFGSGIS- 58
Q2LAA3
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYESSN-PWSNGNYGSGIS- 58
Q0GF62
MKLVKLSLVAALAAGAFSAANATPLEEAIKDIDVSGVLRIRYDTSN-DWNNAGFGSGIS- 58

*****: *****.*****:*****:.. . .*.:

[0188]

Hb1
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB2
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB0
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Hb2
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
NB1
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q9F791
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Hb3
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
D3FNB0
SKQNHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB1
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB8
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAA5
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB6
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LA95
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
P80672 (SEQ ID No. 1)
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAADGGY----GANGIKNDQKGLFVRQLYLT 115
Q2LAC5
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAVDGGT----GVNNVKNKAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LAA2
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAQVQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB7

NKQDHKYRAQVNFSAAIADDFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB9
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNTEKGLFVRQLYLT 115
Q2LA91
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
NB2
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LA98
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
A3ZHA2
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
Q9F792
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LAC0
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVGNVKNAEKGLFVRQLYLT 115
Q0GF63
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNVTNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LAB3
NKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNATNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LA93
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNKTNAEKGLFVRQLYLT 116
Q2LAA0
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNKTNAEKGLFVRQLYLT 116
Q2LAC1
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFVQFDYNAVDGGT----GVDNATNAQKGFVRQLYLT 116
Q2LAC4
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFVQFDYNAVDGGT----GVDNATNAQKGFVRQLYLT 116
Q2LA94
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFIQFDYNAVDGGT----GVDNATNAEKGLFVRQLYLT 116
Q2LA92
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFVQFDYNAVDGGT----GVDNATNAEKGLFVRQLYLT 115
Q2LAA4
[0189] SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFVQFDYNAADGGT----GVDNATNAQKGLFVRQLYLT 115
Q2LA89
SKQDHKYRAQVNFSAAIADNFKAFVQFDYNAADGGY----GANEIKNDQKGLFVRQLYLT 115
NB3
GKQDHKYRAQVNFSAASADNFKAFVQFDYSQADGGY----GADSI SNTSDTLSVRQLYLT 114
Q2LAA9
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GADSI SNTSDTLSVRQLYLT 114
B5QHE5
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GADSI SNTSDTLSVRQLYLT 114
Q2LA96
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GADSI SNTSDTLSVRQLYLT 114
Q2LAB4
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GTDSI SNTSDTLTVRQLYLT 114
Q2LA97
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GTDSI SNTSDTLTVRQLYLT 114
Q2LAA7
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GTDSI SNTSDTLTVRQLYLT 114
Q9F788
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GTDSI SNTSDTLTVRQLYLT 114
Q2LA87
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GTDSI SNTSDTLTVRQLYLT 114
Q2LA90
GKQDHKYRAQVNFSGAISDNFKAQFDYNSQDGGY----GADSI SNTSDTLTVRQLYLT 114
Q2LAA3
GKQDHKYRAQVNFNTAIADNFKAQFDYNSKDGGY----GENSI SNTSDTLSVRQLYLT 114
Q0GF62
GKQTHNYRAQINFSGAIADNFKAQFDYAAVDGGYNVTNGTGNQRNDQNSLTVRQLYLT 118
.
** *:****:*. * :*:****:***** *** * . * .. : *****
Hb1
YTNEDEVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNSIDGLTLAAFAVDSFMAAEQG 175

Q2LAB2
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAB0
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Hb2
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
NB1
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q9F791
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Hb3
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVANNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
D3FNB0
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAB1
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAB8
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAA5
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAB6
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LA95
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
P80672 (SEQ ID No. 1)
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAC5
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q2LAA2
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q2LAB7
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q2LAB9
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q2LA91
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
NB2
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q2LA98
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
A3ZHA2
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q9F792
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q2LAC0
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAADS FMAEEQG 175
Q0GF63
YTNEVDVATSVIAGKQQLNFIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175
Q2LAB3
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMTAEQG 175
Q2LA93
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 176
Q2LAA0
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 176
Q2LAC1
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMATEQG 176
Q2LAC4
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMATEQG 176
Q2LA94
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMATEQG 176
Q2LA92
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGVDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMATEQG 175
Q2LAA4
YTNEVDVATSVIAGKQQLNLIWTDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAVDSFMAEEQG 175

[0190]

Q2LA89
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGIDGLVGTGVKVINNSIDGLTLAAFAVDSFMAAEQG 175
NB3
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEEVPA 174
Q2LAA9
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEEVPA 174
B5QHE5
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNAIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LA96
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNAIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LAB4
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LA97
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LAA7
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q9F788
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LA87
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNAIDGLVGTGVKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LA90
YTNEVDVATSVIAGKQQLNFIWTNDNAIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q2LAA3
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNGVDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAMDSFNEASDT 174
Q0GF62
YTNEVDVATSVIAGKQQLNTIWTNDNDIDGLVGTGIKVVNNSIDGLTLAAFAVDSYNTDE-- 176

***** :*****: ** ***** **:

[0191] Hb1
AD-----LLGHS-TTS----TTQKAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB2
AD-----LLGHS-TTSTH-TTQKAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 223
Q2LAB0
AD-----LLGHS-TTS----TTQKAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Hb2
AD-----LLGQS-TIS----TTQNAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
NB1
AD-----LLGQS-TIS----TTQNAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q9F791
AD-----LLGQS-TIS----TTQNAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Hb3
AD-----LLGQS-TIS----TTQNAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
D3FNB0
AD-----LLGKS-TIS----TTQKAAPFQADSLGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB1
AD-----LLGQS-TIS----TTQKAAPFQADSLGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB8
AD-----LLGQS-TIS----TTQKAAPFQADSLGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAA5
TD-----LLGQS-TIS----TTQNTAPFQADSLGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB6
TD-----LLGQS-TIS----TTQNTALFQADSLGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LA95
AD-----LLGHSNTST----ATPNQVPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 221
P80672 (SEQ ID No. 1)
AD-----LLEHS-NIS----TTSNQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAC5
AD-----LLGHS-NIS----TTSKQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAA2
AD-----LLGHS-TTSTT----QATAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB7
AD-----LLGHS-TTSTT----QATAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB9

AD-----LLEHS-TISTT----QNAAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LA91
AD-----LLGHS-NISTT---NANQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 221
NB2
AD-----LLGHS-NIST----TPNQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LA98
AD-----LLGHR-NISTI---TPNQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 221
A3ZHA2
AD-----LLGHS-NISTT---S-NQVPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q9F792
AD-----LLGHS-NISTT---S-NQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAC0
AD-----LLGHS-NTSTA---TPNQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 221
Q0GF63
AE-----LLGHS-NIS----TTSNQAPFKVDSVGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 220
Q2LAB3
AD-----LLGHN-----GSQFNPDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 213
Q2LA93
SD-----LVG-----ANN-TFKVDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 213
Q2LAA0
SD-----LVG-----ANNSTFKVDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 214
Q2LAC1
SD-----LVG-----HNGSQFNPDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 214
Q2LAC4
SD-----LVG-----HNGSQFNPDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 214
Q2LA94
SD-----LVG-----HNGSKFSPDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 214
Q2LA92
SD-----LLGQSTYVSND---KNNDSFKLDSIGNLYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 222
Q2LAA4
AD-----LLGHS-NIS--S-AN-NSAPFKLDSIGNLYGGAAVGSYEFLGGQFNPQ 220
Q2LA89
AD-----LLGHS-NIS--S-AKPNIAPFKLDSIGNLYGGAAVGSYEFLGGQFNPQ 221
NB3
TT-----TNG-FNKGNV--NGDGDVSSALDWSKNIYGAAAIGSYDLIGGQFNPQ 220
Q2LAA9
TT-----TNGNFNKGNV--NGDGDVSSALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 221
B5QHE5
TVTITQD-NSQKITGVQFNRGNP--KGDSDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 231
Q2LA96
TVTITQD-NSQKITGVQFNRGNP--KGDSDVSGALDWSKNIYGATAIGSYDIAGGQFNPQ 231
Q2LAB4
TVTITQD-SNQKITGVQFNRGNP--KGDSDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 231
Q2LA97
TVTITQD-SSQKITGVQFNRGNP--KGDGDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDITGGQFNPQ 231
Q2LAA7
TVTITQD-NNQKITGVQFNRGNP--KGDSDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 231
Q9F788
TVTITQD-NNQKITGVQFNRGNP--KGDSDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 231
Q2LA87
TVTITQD-NNQKITGVQFNRGNP--KGDSDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 231
Q2LA90
TVTITQD-SSQKITGVQFNRGNP--KGDGDASGALDWSKNIYGAAAIGSYDLAGGQFNPQ 231
Q2LAA3
TVIITQD-PSSNKITGVQFNRGNP--KGDGDVSGALDWSKNIYGAAAIGSYDIAGGQFNPQ 232
Q0GF62
-----QGYKDNNGRPDLTYTGDAQYLTWG-NIYGAAAVGSYDLAGGQFNPQ 222

:.:.*:*.:.: *****

(Ser 262) (Thr 268)

Hb1
LWLAYWDQVAFYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDKTHAN----- 271
Q2LAB2

LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	274
Q2LAB0	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Hb2	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
NB1	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q9F791	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Hb3	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
D3FNB0	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELNDKTHAN-----	271
Q2LAB1	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAB8	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAA5	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAB6	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LA95	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDTTHAN-----	272
FIG 672 (SEQ ID No. 1)	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAC5	
LWLAYWDQVTFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAA2	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAB7	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LAB9	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LA91	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	272
NB2	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q2LA98	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	272
A3ZHA2	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDKTHAN-----	271
Q9F792	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDQTHAN-----	271
Q2LAC0	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDTTHAN-----	272
Q0GF63	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSIDSELDDTTHAN-----	271
Q2LAB3	
LWLAYWDQVAFYYALDASYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSVDSDLDSRYAN-----	264
Q2LA93	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSVDSDLNSAEHAN-----	264
Q2LAA0	
LWLAYWDQVAFYYALDVSYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELNDKTHAN-----	265
Q2LAC1	
LWLAYWDQVAFYYALDASYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSVDSDLDSAKYAN-----	265
Q2LAC4	
LWLAYWDQVAFYYALDASYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSVDSDLDSARYAN-----	265
Q2LA94	
LWLAYWDQVAFYYALDASYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSVDSDLNSAEYAN-----	265
Q2LA92	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSLDSELDDRTYAN-----	273
Q2LAA4	
LWLAYWDQVAFYYAVDAAYSTTIFDGINWTLEGAYLGNSIDSELDKTTHAN-----	271
Q2LA89	

[0193]

LWLAYWDQVAFFYAVDAAYSTTIFDGINWTLGAYLGNSIDSELDKTHTN----- 272
NB3
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWSIEGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 272
Q2LAA9
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWSIEGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 273
B5QHE5
LWLAYMSDNAFLYALDATYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 283
Q2LA96
LWLAYMSDNAFLYALDATYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 283
Q2LAB4
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 283
Q2LA97
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWSIEGAYLGNSVDNKLKDRLGVA-----N 283
Q2LAA7
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 283
Q9F788
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 283
Q2LA87
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 283
Q2LA90
LWLAYMSDNAFLYALDAAYSTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLNVA-----N 283
Q2LAA3
LWLAYMSDNAFLYALDAAYNNTTIFDGINWTLGAYLGNSVDNKLKDRLDAA-----N 284
Q0GF62
LWLAYMSDNAFLYALDLAYNNTTIFDGINWSIEGAYLGNSVDNKLKDRFHAAGDPRESSAAN 282

***** .: :*:~* :*.****:****:~*****:~*~*~* .

(Seq 278)

[0194]

Hb1
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAB2
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 334
Q2LAB0
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Hb2
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
NB1
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q9F791
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Hb3
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
D3FNB0
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAB1
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAB8
GNLFAL*GTIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAA5
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAB6
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LA95
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 332
P80672 (SEQ ID No. 1)
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAC5
GNLFAL*GTIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAA2
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
Q2LAB7
GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331

Q2LAB9
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
 Q2LA91
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 332
 NB2
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
 Q2LA98
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 332
 A3ZHA2
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
 Q9F792
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
 Q2LAC0
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 332
 Q0GF63
 GNFFAL*GGIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLSSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
 Q2LAB3
 GNFFAL*GGIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVIIDDQGNLSSLLAGEEIFYTTGSRLNG 324
 Q2LA93
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 324
 Q2LAA0
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVAIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 325
 Q2LAC1
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 325
 Q2LAC4
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 325
 Q2LA94
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 325
 Q2LA92
 GNLFAL*GSIEVNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNLGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 333
 Q2LAA4
 GNLFAL*RGSVELNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNIGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 331
 [0195] Q2LA89
 GNLFAL*RGSVELNGWDASLGGLYYGDKEKASTVVIEDQGNIGSLLAGEEIFYTTGSRLNG 332
 NB3
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKATVTTIEDQGNIGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 332
 Q2LAA9
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKATVTTIEDQGNIGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 333
 B5QHE5
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKITVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 343
 Q2LA96
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKITVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 343
 Q2LAB4
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKITVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 343
 Q2LA97
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKVTVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 343
 Q2LAA7
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKVTLTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTNGSNLNG 343
 Q9F788
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKVTLTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTNGSNLNG 343
 Q2LA87
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKVTLTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTNGSNLNG 343
 Q2LA90
 GNFFAL*RGTVENVNGWDATLGGLYYGDKDNLTVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 343
 Q2LAA3
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKATVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTRGSNLNG 344
 Q0GF62
 GNFFAL*RGTVENVNGWDASLGGLYYGKKDKFTVTTIEDQGNLGSLLAGEEIFYTHGSRLNG 342

 :*:* :*:*****:*****.*:: : . *:***:.******:***** **.***

 (Arg 352) (Arg 381)
 Hb1
 DTGRNIFGYVTGGYTFNETV*VGAD*FVYGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA*VDYKYSPKL 390

Q2LAB2
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 393
Q2LAB0
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Hb2
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
NB1
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q9F791
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Hb3
DTGRNIFGYVTGGYTFNEIV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
D3FNB0
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEATN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAB1
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEATN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAB8
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEATN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAA5
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEATN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAB6
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEATN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LA95
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 391
P80672 (SEQ ID No. 1)
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAC5
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAANHLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 391
Q2LAA2
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAB7
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAB9
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LA91
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 391
NB2
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEDTA-HVGGGKKLEAVA~~RV~~VNYKYSPL 390
Q2LA98
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEDTA-HVGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 391
A3ZHA2
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q9F792
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAC0
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAS-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 391
Q0GF63
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAS-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390
Q2LAB3
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 383
Q2LA93
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAS-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 383
Q2LAA0
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAG-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 384
Q2LAC1
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 384
Q2LAC4
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAAN-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 384
Q2LA94
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEATT-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 384
Q2LA92
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTEAVG-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 392
Q2LAA4
DTGRNIFGYVTGGYTFNETV~~RV~~GAD~~FV~~YGGTKTETAG-HLGGGKKLEAVA~~RV~~VDYKYSPL 390

[0196]

* * * * *

[0197]

36

	Q2LA89	NFSAFY\$YVNLDEGVNTKESADHSTVRLQALYKF	425
	NB3	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	420
	Q2LAA9	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	421
	B5QHE5	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q2LA96	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q2LAB4	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
[0198]	Q2LA97	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q2LAA7	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q9F788	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q2LA87	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q2LA90	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	431
	Q2LAA3	NFSAFY\$YVNVDVT---DPESTHHDAVRLQALYKF	432
	Q0GF62	NFSAFY\$YVNVDRT---DPESTHHDAVRLQALYKF	430
		*****:*	
		**:.*	
		::*****	

[0199] 糖基化MOMP与Le^b的相互作用中的主要贡献者为残基Arg³⁵²、Arg³⁸¹和Lys²⁷⁸,而仅残基352和278与非糖基化MOMP与Le^b的相互作用有关;图5(纸质)。残基Arg³⁵²、Arg³⁸¹在所检测的所有序列中保守,而残基Lys²⁷⁸在一些菌株中半保守并且经Arg置换。此氨基酸的分子特性表明其将能够以与残基Arg³⁵²、Arg³⁸¹类似方式通过氢键形成介导BgAg结合。

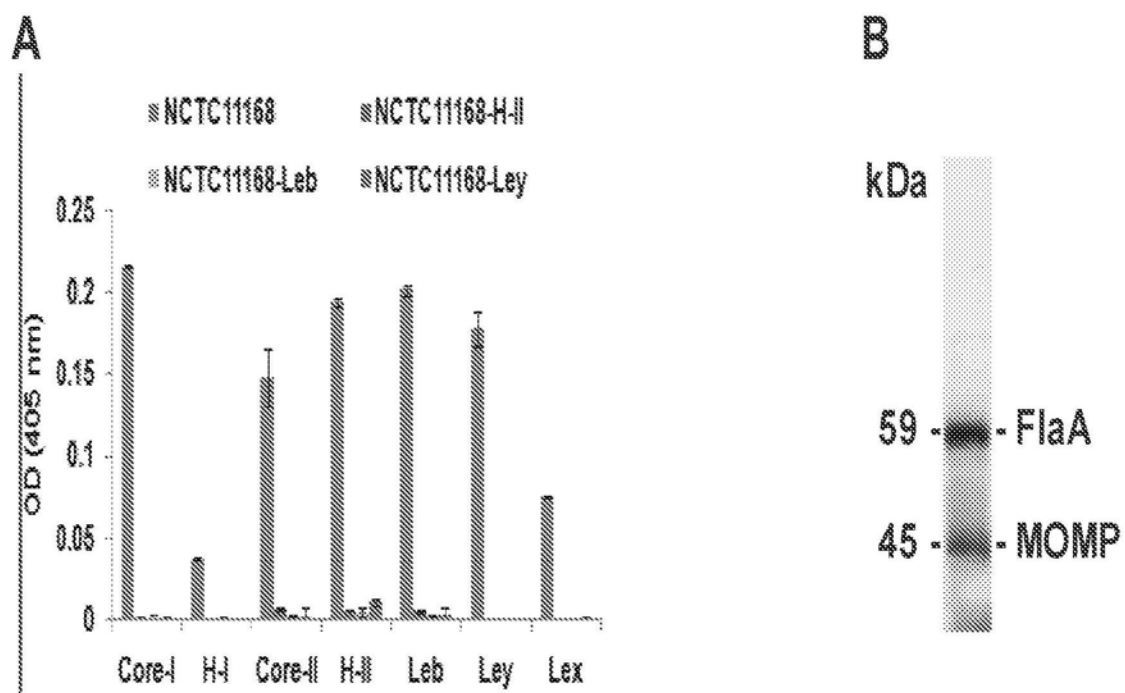


图1

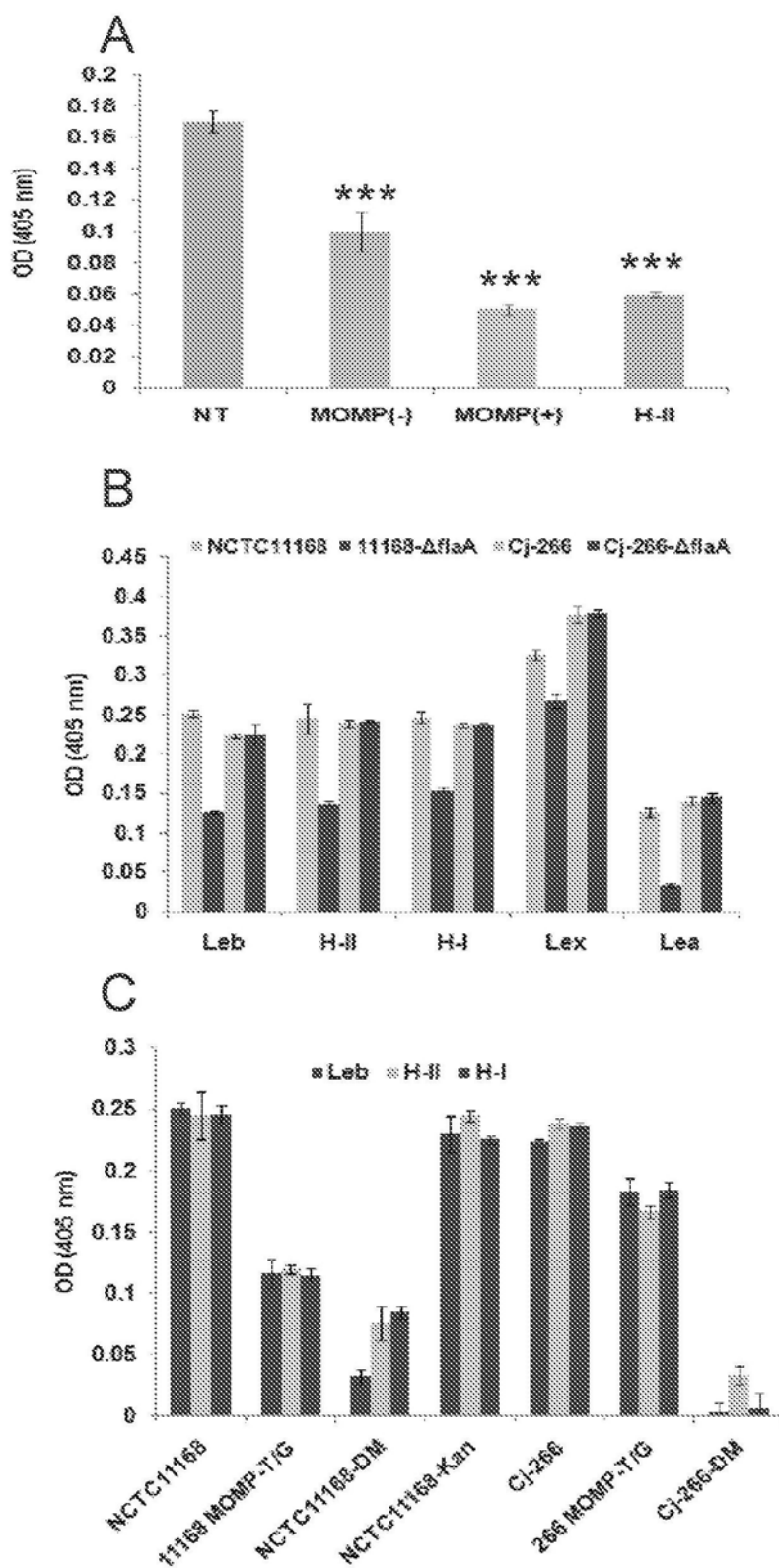


图2

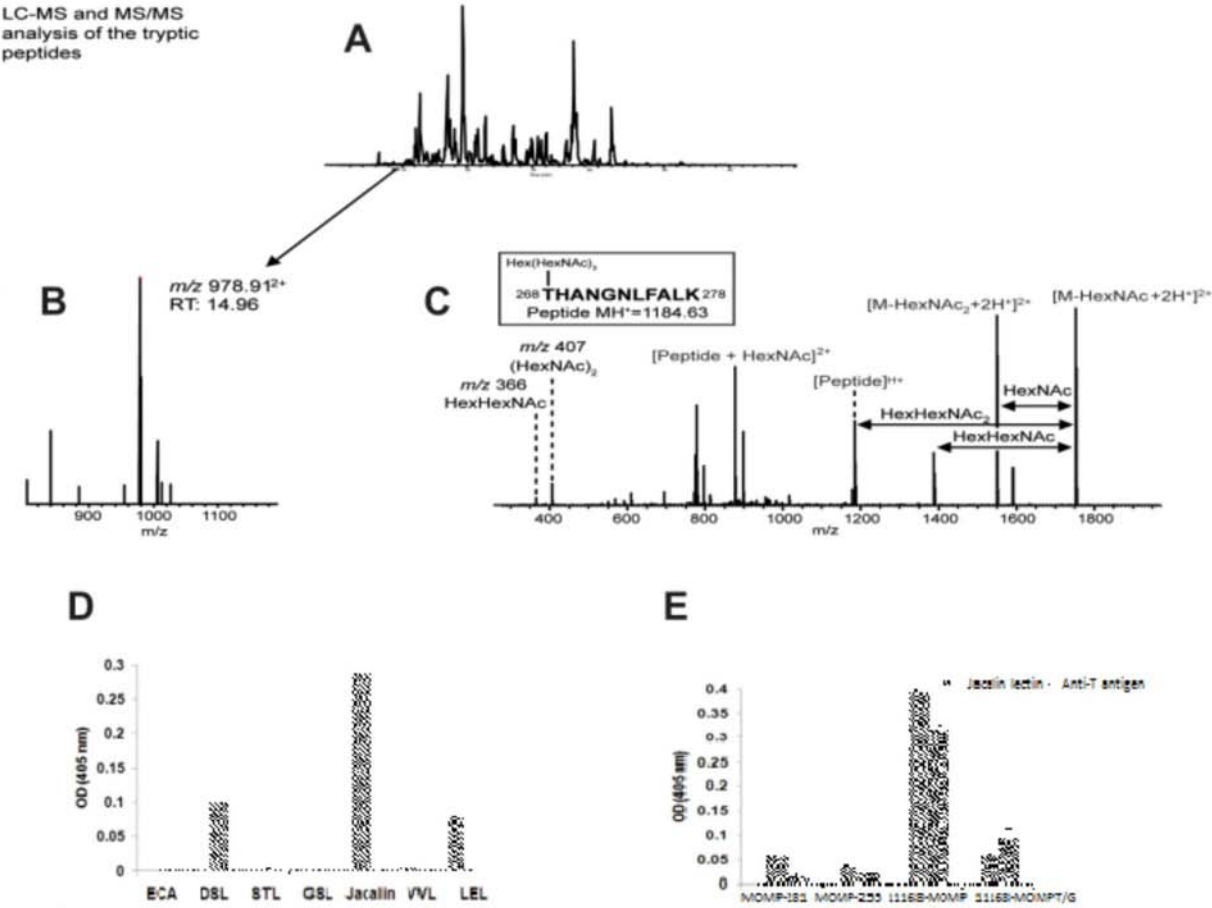


图3

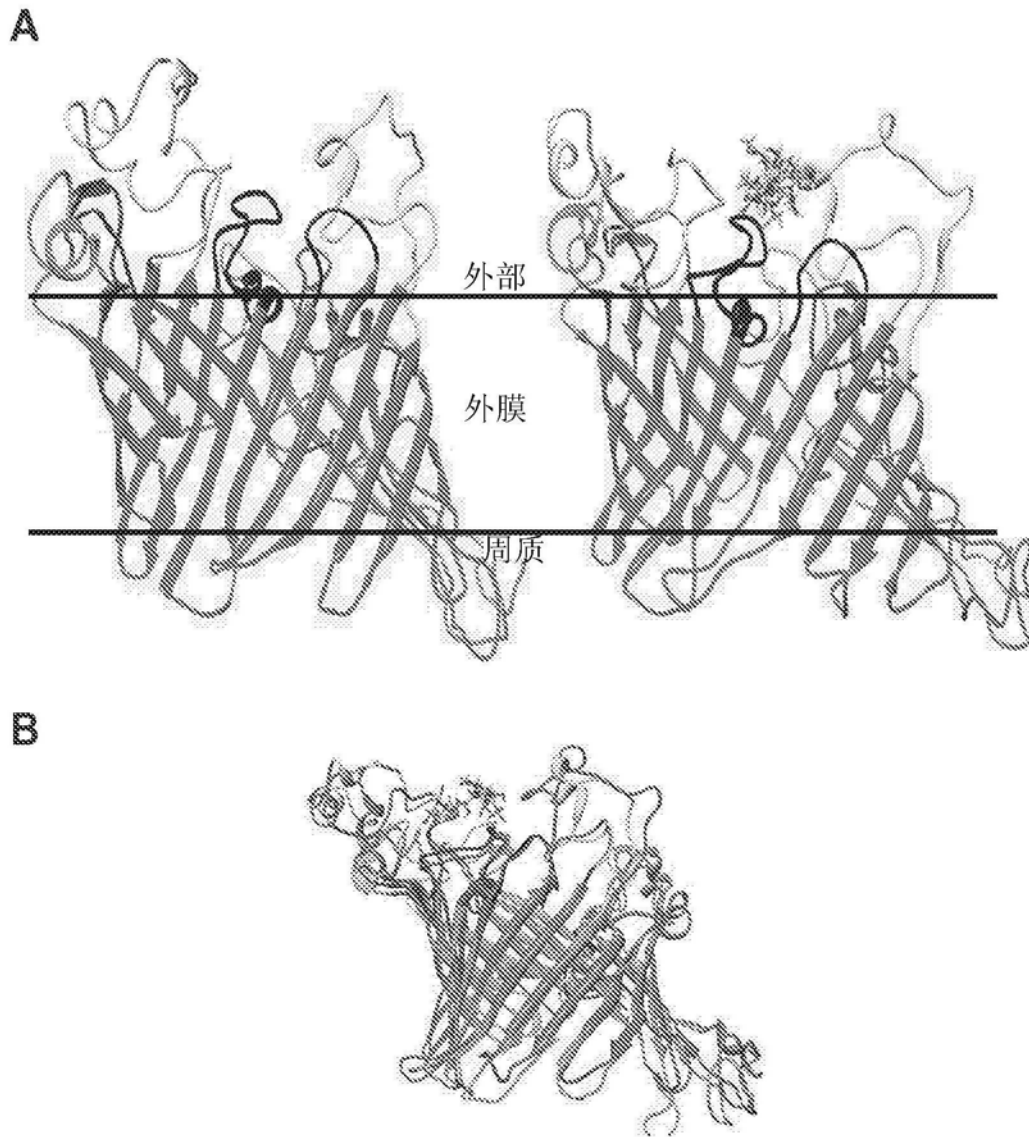


图4

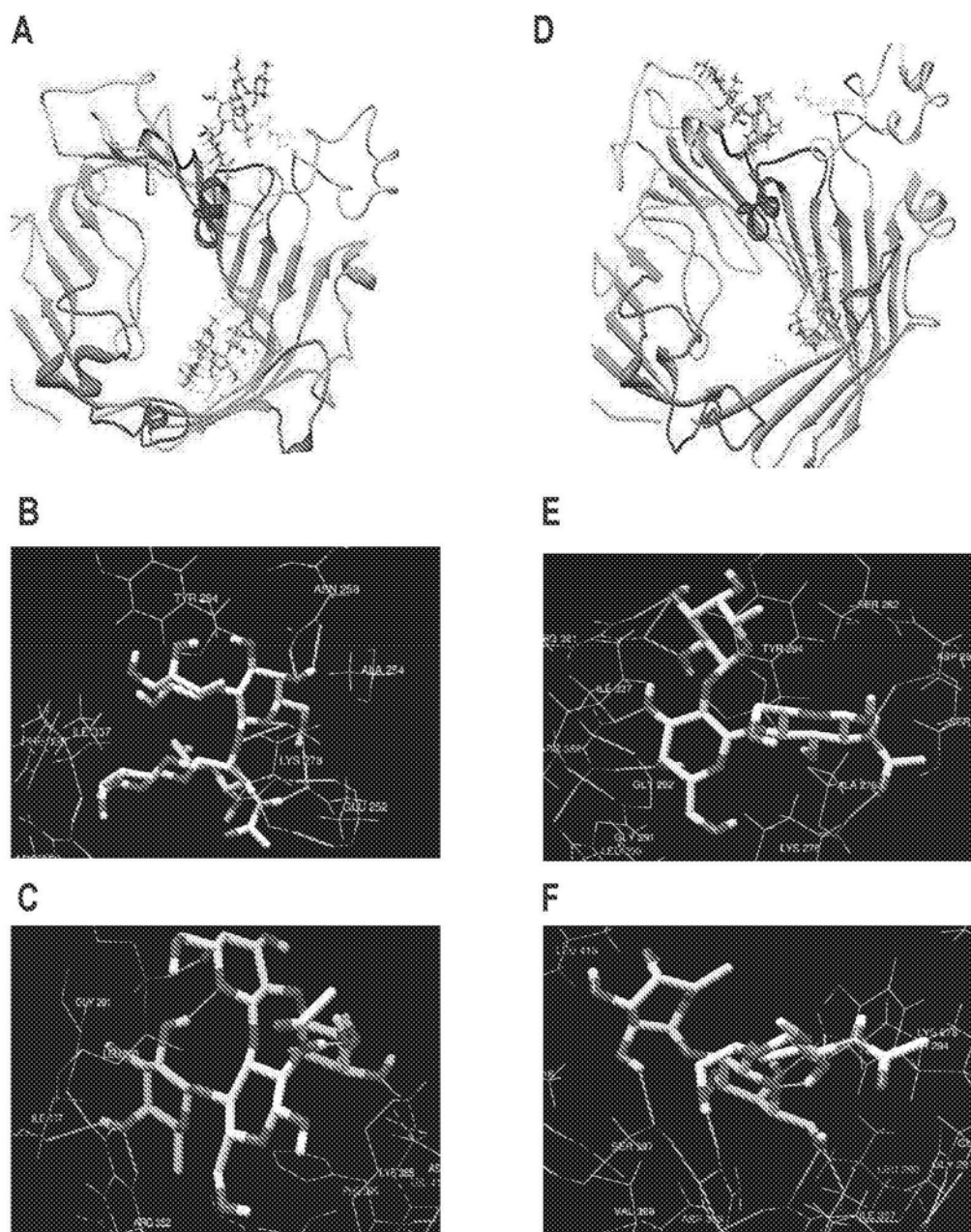


图5

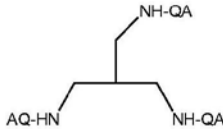
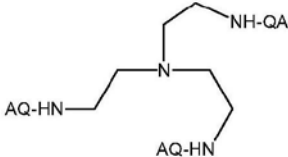
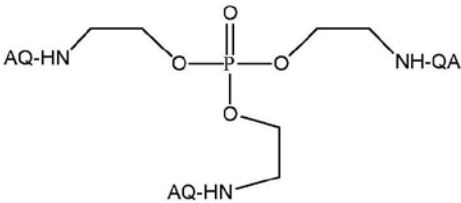
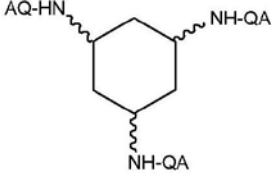
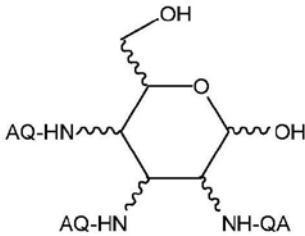
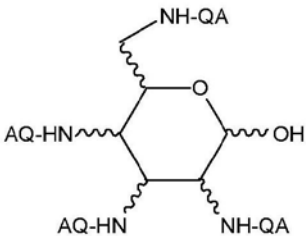
a		N-[3-奎尼氨基-2-(奎尼氨基-甲基)-丙基]-奎尼酰胺	GATRIQ
b		N-{2-[双-(2-奎尼氨基-乙基)-氨基]-乙基}-奎尼酰胺	ETDAQ
c		磷酸三-(2-奎尼氨基-乙基)酯	PATQ
d		N-(3,5-双-奎尼氨基-环己基)-奎尼酰胺	CH135TQ
e		N-(4,5-双-奎尼氨基-2-羟基-6-羟甲基-四氢-吡喃-3-基)-奎尼酰胺	PY234TQ
f		N-(4,5-双-奎尼氨基-2-羟基-6-奎尼氨甲基-四氢-吡喃-3-基)-奎尼酰胺	PY2346TE TQ

图6

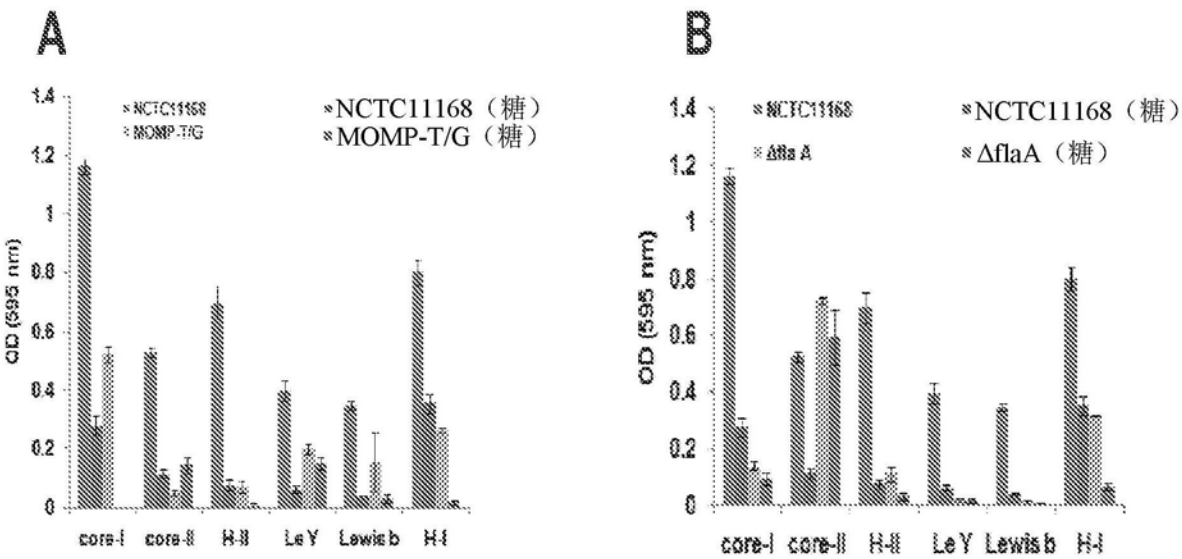


图7

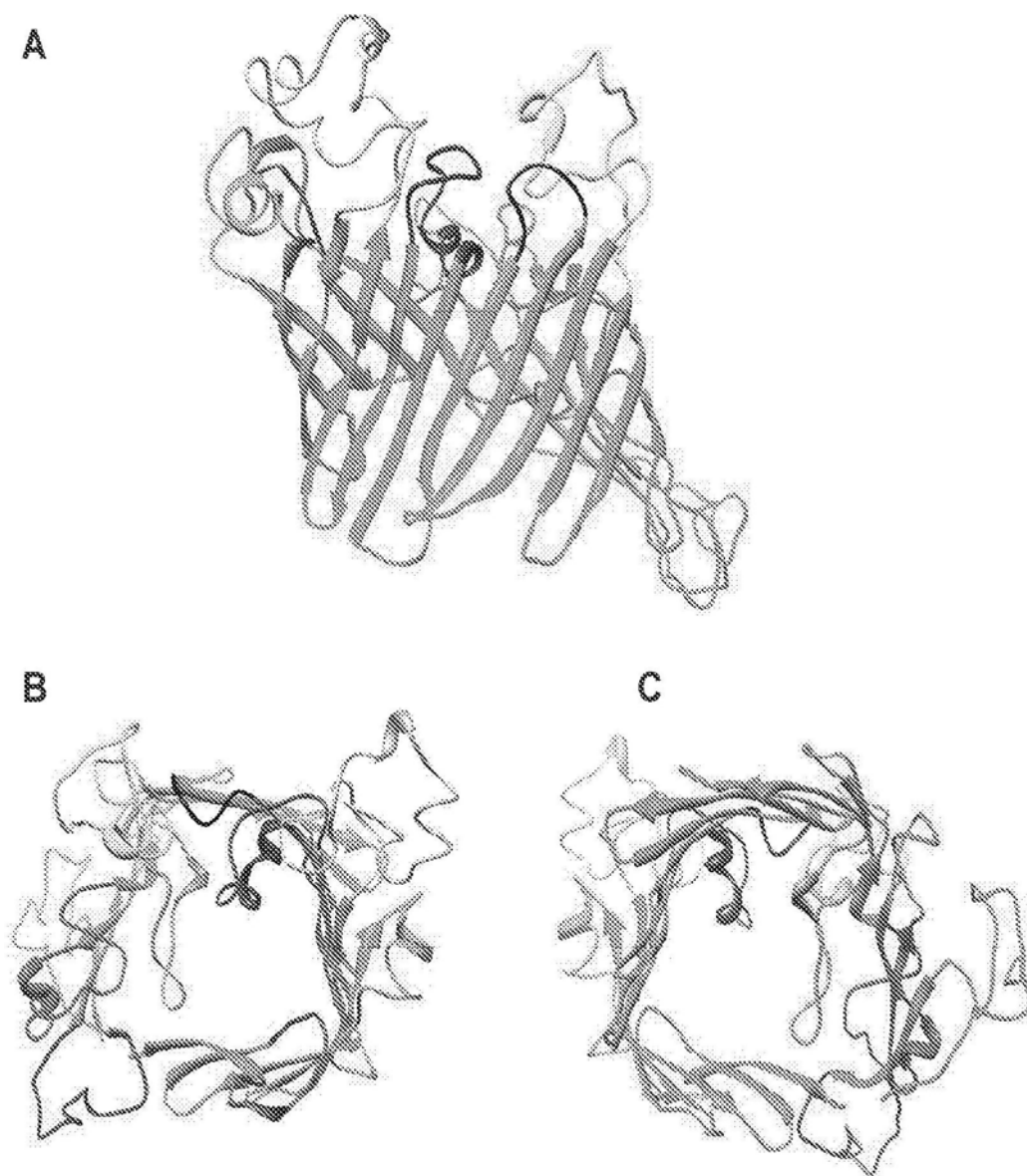


图8

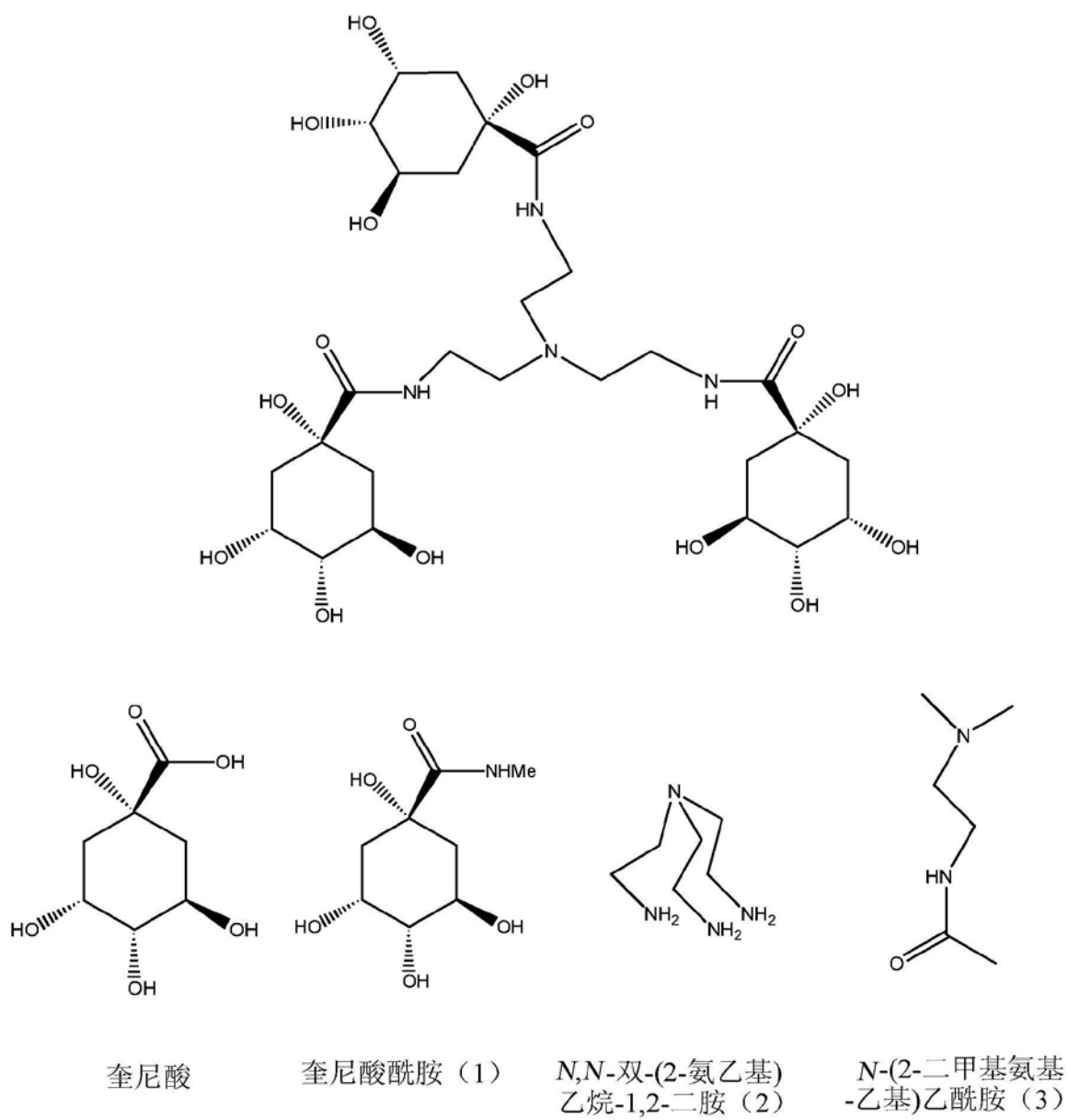


图9

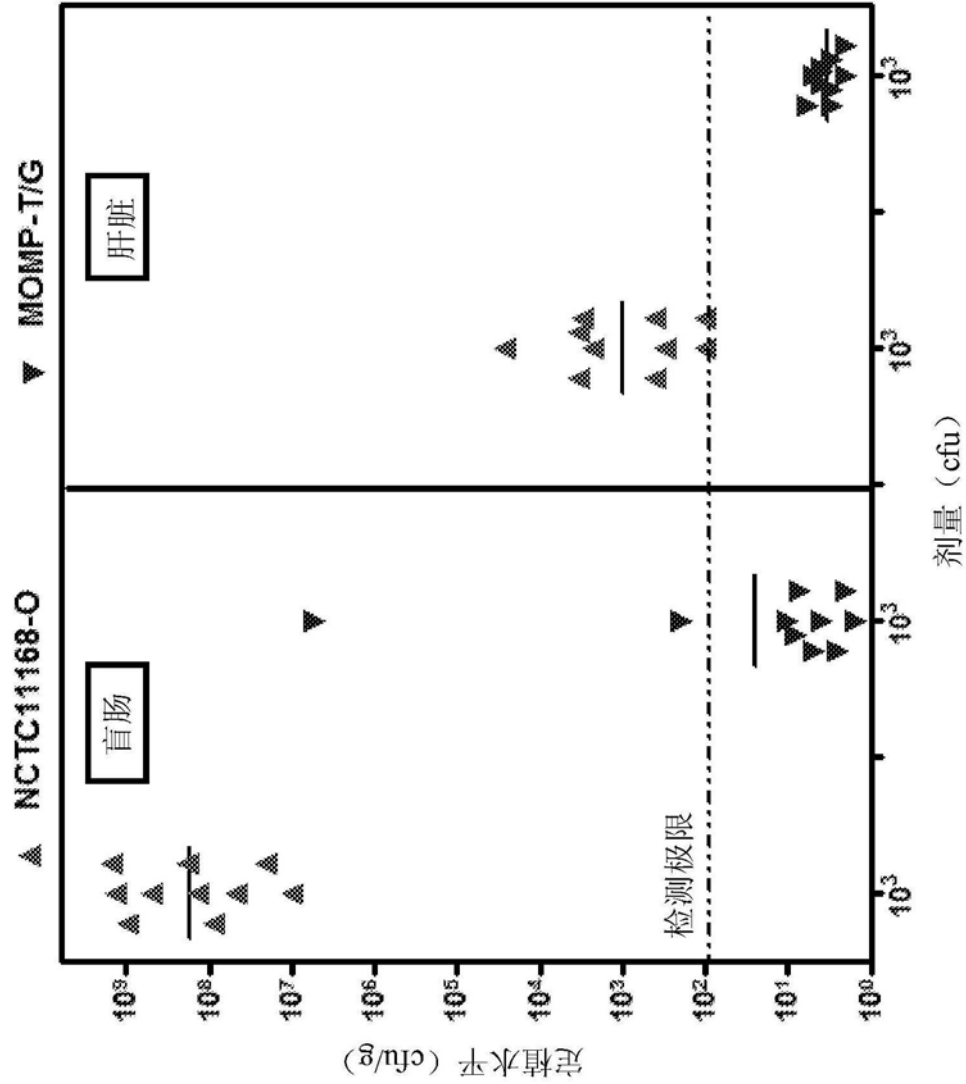


图10

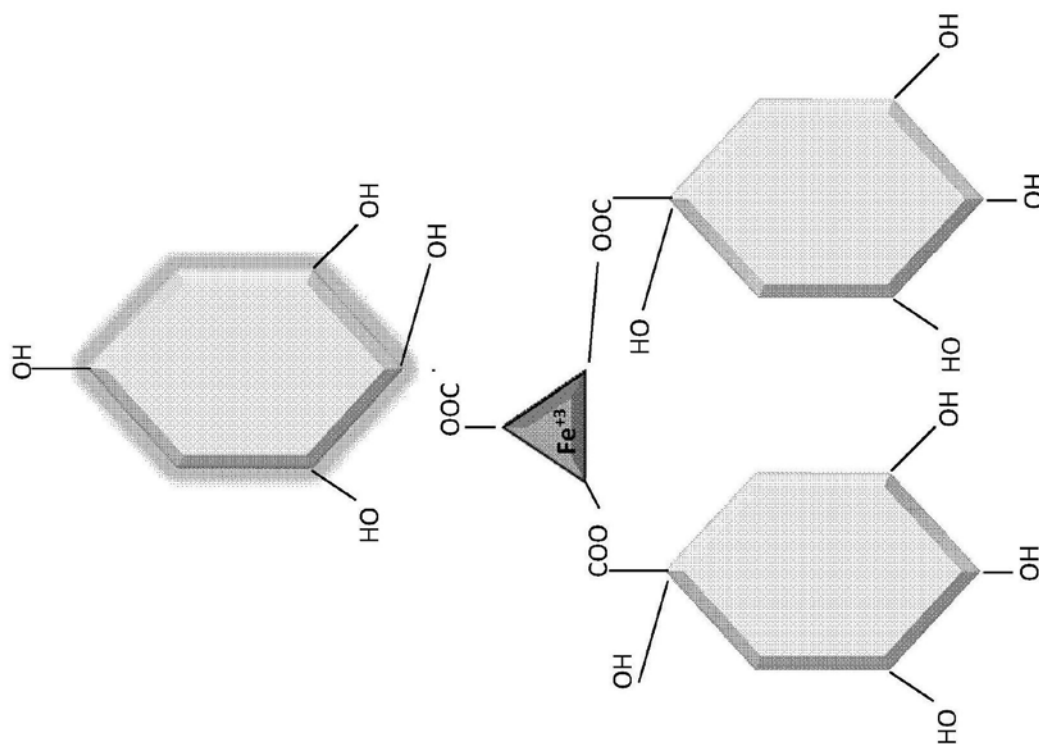


图11

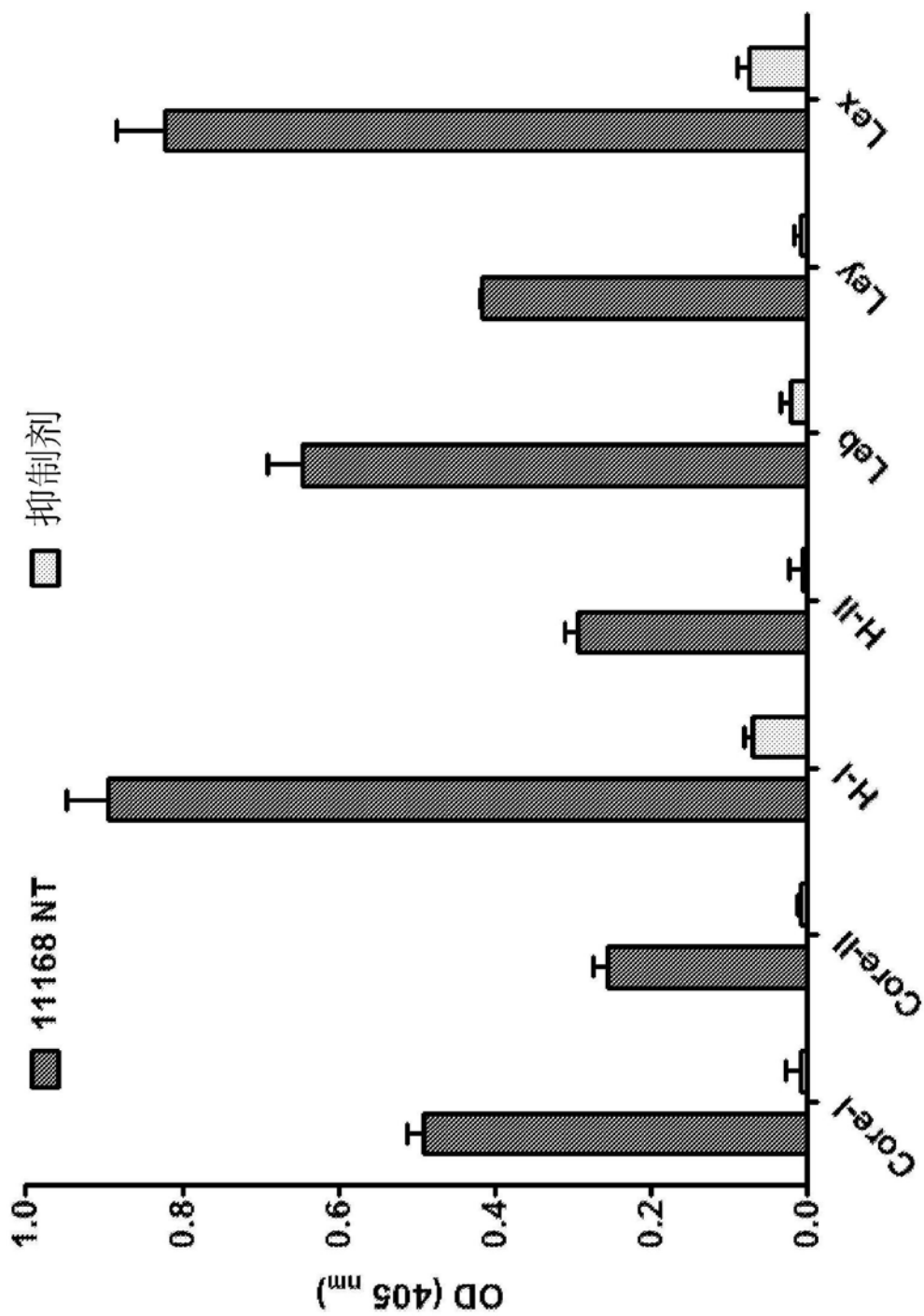


图12

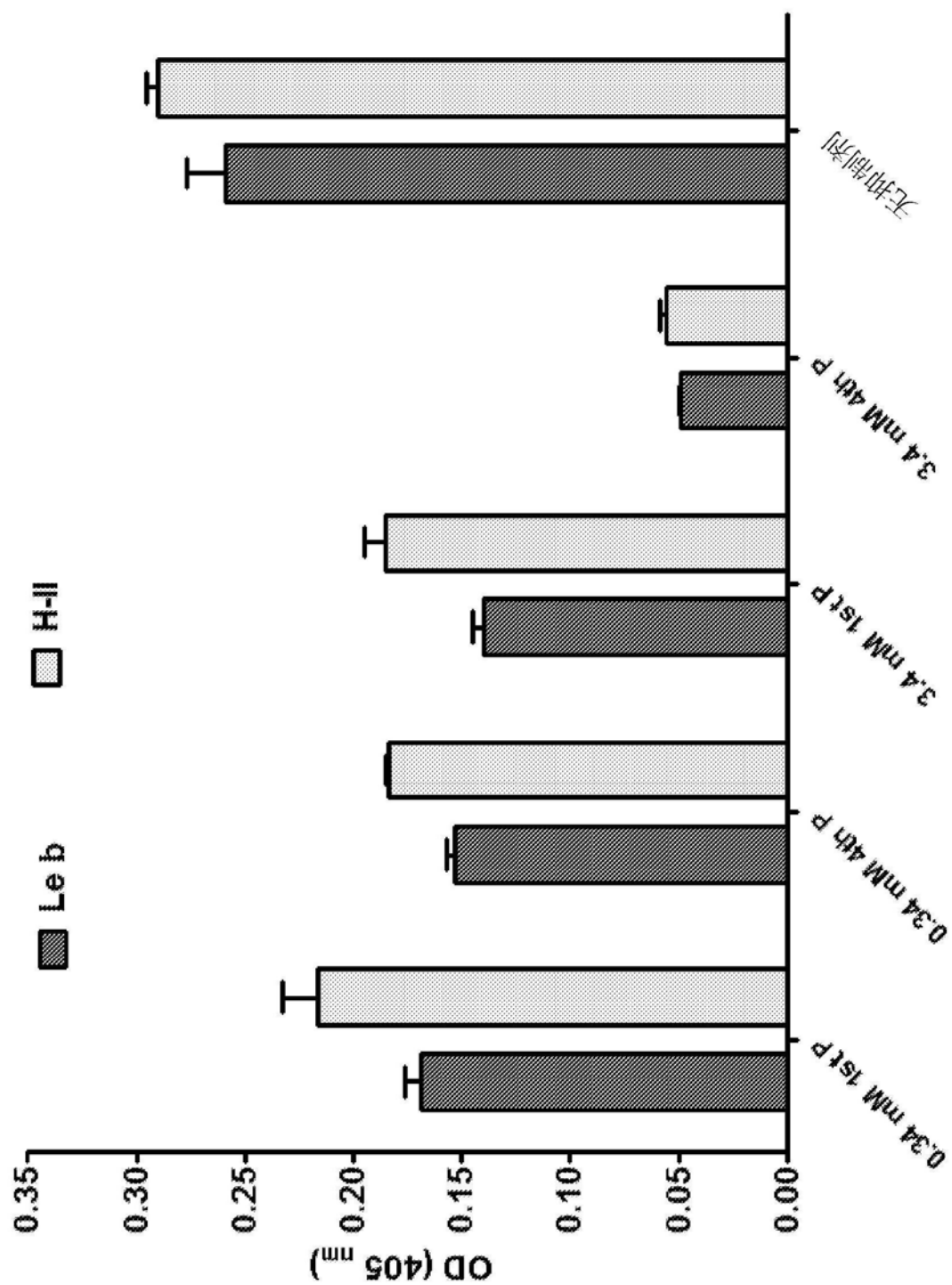


图13

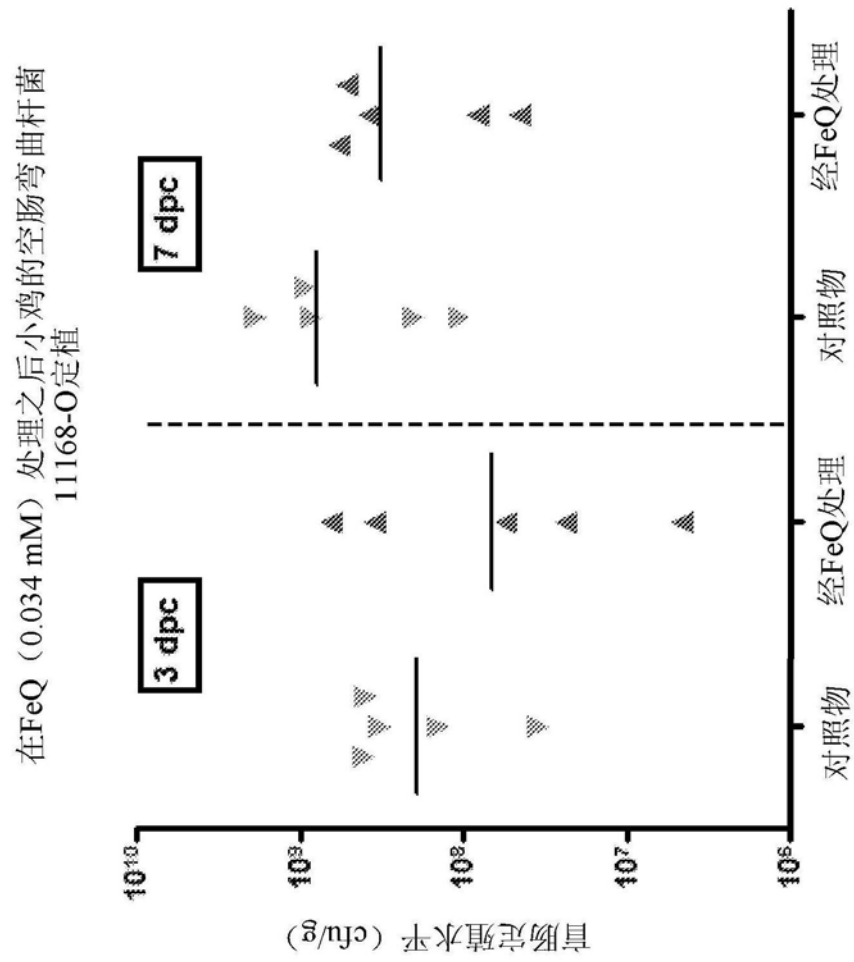


图14

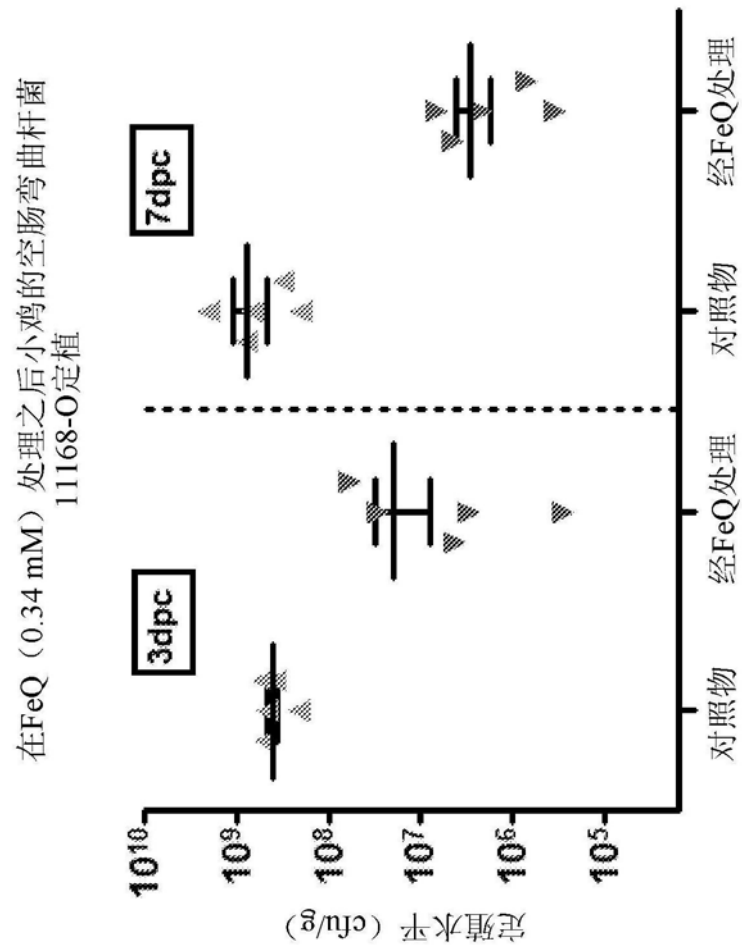


图15

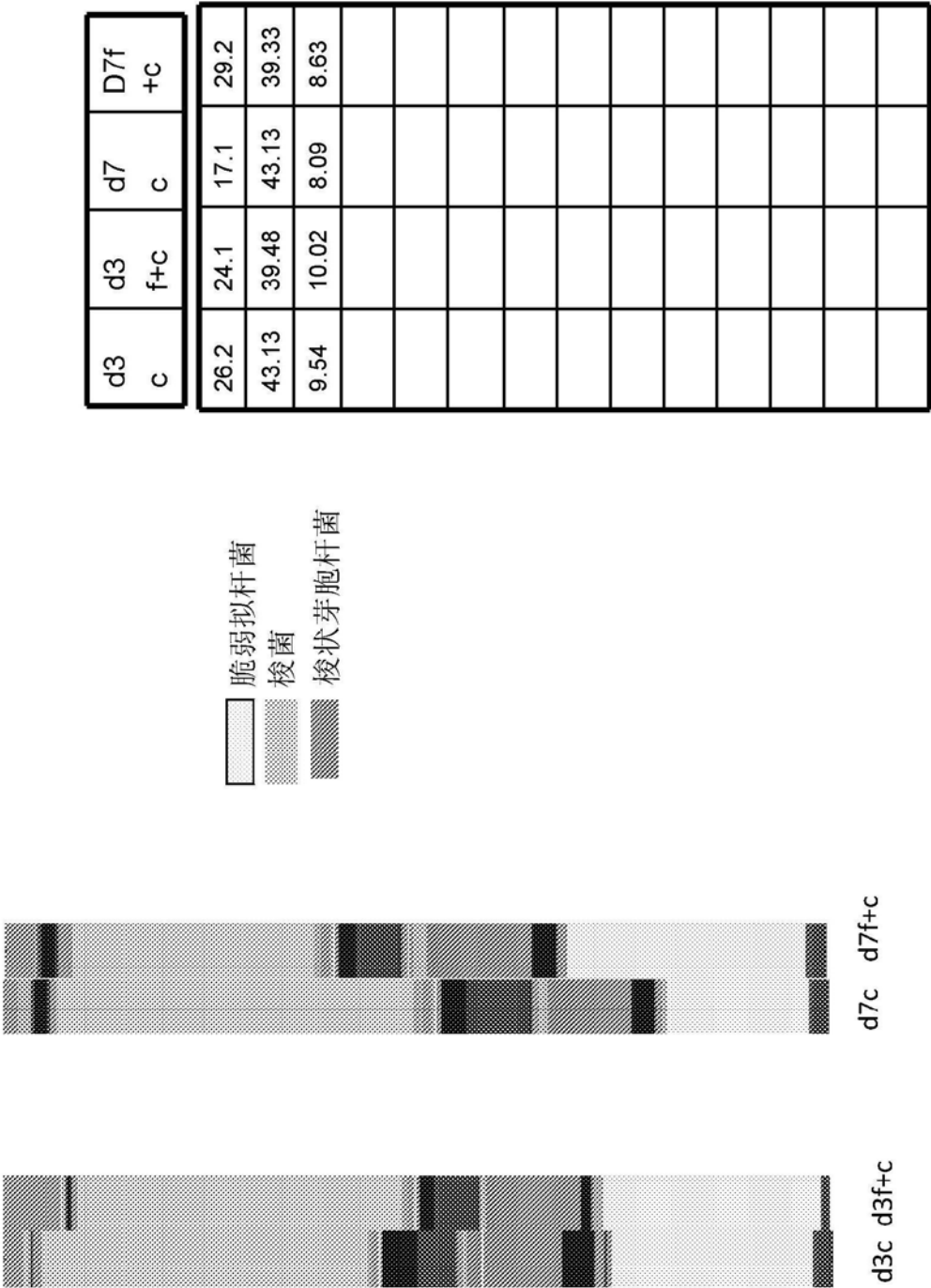


图16

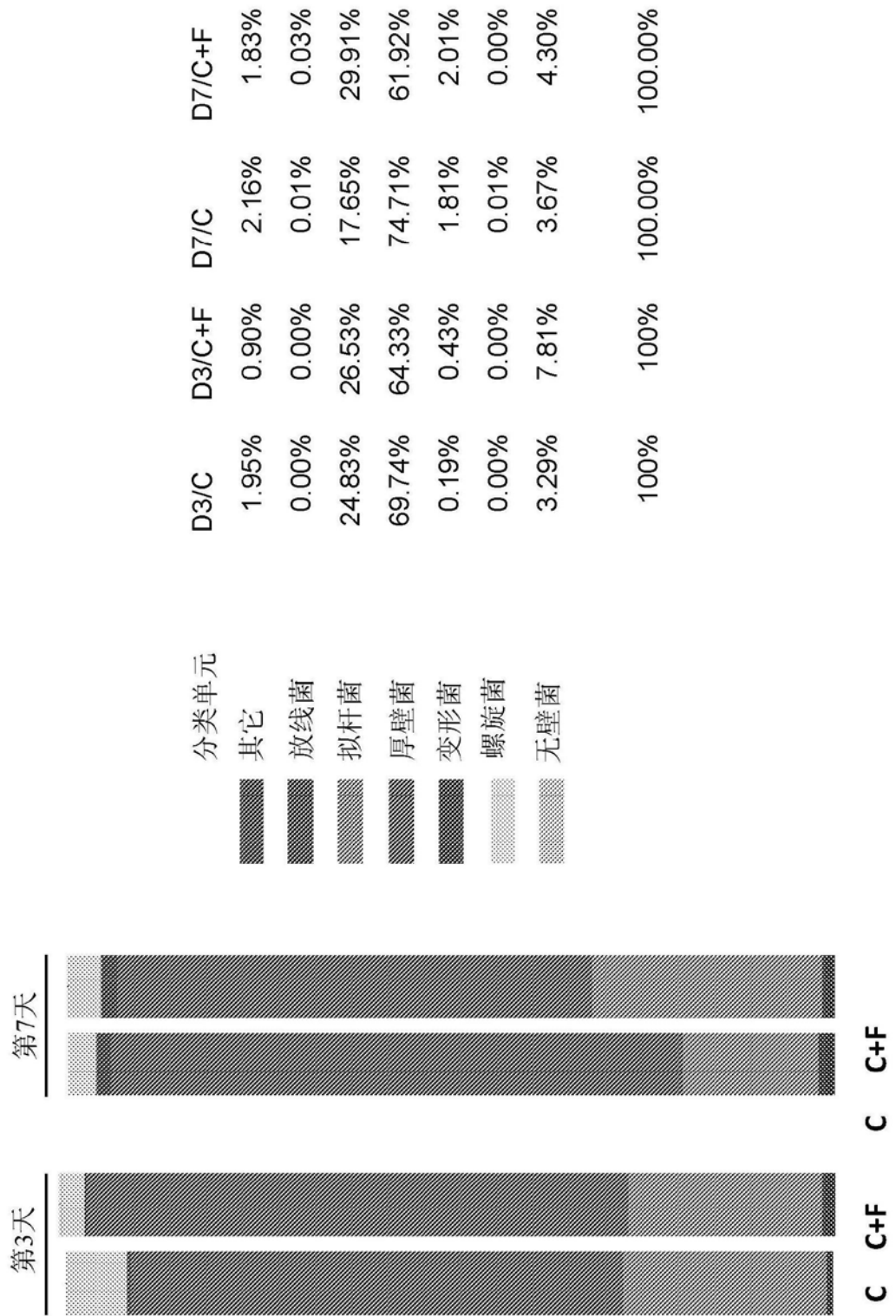


图17