



(10) 授权公告号 CN 114340652 B

(45) 授权公告日 2025.02.14

(21) 申请号 202080051512.4

(22) 申请日 2020.05.13

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114340652 A

(43) 申请公布日 2022.04.12

(30) 优先权数据  
62/847,832 2019.05.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.01.14

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2020/070048 2020.05.13

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/232471 EN 2020.11.19

(73) 专利权人 芝加哥大学  
地址 美国伊利诺斯州

(72) 发明人 奥拉夫·施内温德

多米尼克·米西亚卡斯 孙艳  
金焕文 石苗苗 陈新海

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11413  
专利代理师 邱俊霞 王春伟

(51) Int.Cl.  
A61K 38/16 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
C07K 14/31 (2006.01)

(56) 对比文件  
Miaomiao Shi等.A protein A based  
Staphylococcus aureus vaccine with  
improved safety.Vaccine.2021,第39卷(第29  
期),3907-3915.

审查员 李丹阳

权利要求书2页 说明书88页  
序列表27页 附图23页

(54) 发明名称

包含葡萄球菌蛋白A(SpA)变体的方法和组  
合物

(57) 摘要

实施方案涉及用于预防或治疗细菌感染,特  
别是葡萄球菌感染的方法和组合物。实施方案涉  
及改进的非产毒蛋白A(SpA)变体。

1. 一种由SpA变体组成的分离的多肽,所述SpA变体包含变体结构域A至E,其中结构域D多肽如SEQ ID NO:2所示,结构域E多肽如SEQ ID NO:3所示,结构域A多肽如SEQ ID NO:4所示,结构域C多肽如SEQ ID NO:5所示,并且结构域B多肽如SEQ ID NO:6所示,其中所述SpA变体:

- (i) 在结构域A中SEQ ID NO:4的第7位和第8位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换;  
在结构域B中SEQ ID NO:6的第7位和第8位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换;  
在结构域C中SEQ ID NO:5的第7位和第8位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换;  
在结构域D中SEQ ID NO:2的第9位和第10位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换;  
在结构域E中SEQ ID NO:3的第6位和第7位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换;和
- (ii) 在结构域A中SEQ ID NO:4的第31位具有谷氨酸置换;  
在结构域B中SEQ ID NO:6的第31位具有谷氨酸置换;  
在结构域C中SEQ ID NO:5的第31位具有谷氨酸置换;  
在结构域D中SEQ ID NO:2的第33位具有谷氨酸置换;  
在结构域E中SEQ ID NO:3的第30位具有谷氨酸置换;和

其中相对于阴性对照,所述分离的多肽未可检测地交联血液中的IgG和IgE或激活嗜碱性粒细胞或肥大细胞,并且其中SpA变体中唯一的置换是(i)和(ii)。

2. 根据权利要求1所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽对于来自人IgG的VH3的 $K_A$ 结合亲和力小于 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 。

3. 根据权利要求1所述的分离的多肽,其中所述SpA变体对于VH3的 $K_D$ 结合亲和力大于 $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ 。

4. 一种包含权利要求1至3中任一项所述的分离的多肽的组合物。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述组合物包含除分离的多肽外少于总蛋白质的量1重量%的蛋白质。

6. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述组合物还包含佐剂。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述分离的多肽与佐剂偶联。

8. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述佐剂包括明矾。

9. 根据权利要求4所述的组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。

10. 根据权利要求4的组合物在制备用于引发针对葡萄球菌的安全免疫应答的疫苗中的用途,其中向人患者施用有效量的根据权利要求4所述的组合物。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述葡萄球菌包括金黄色葡萄球菌的WU1或JSNZ菌株。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中所述葡萄球菌包括ST88型分离物或现在适应于动物的任何其他葡萄球菌。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的用途,其中所述人患者是儿科患者。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述儿科患者为2岁或小于2岁。

15. 根据权利要求10至12中任一项所述的用途,其中所述人患者为65岁或大于65岁。

16. 根据权利要求10至12中任一项所述的用途,其中所述人患者是卫生保健工作者。

17. 根据权利要求10至12中任一项所述的用途,其中所述分离的多肽或组合物以四次剂量施用,并且其中剂量之间的间隔为至少四周。

18. 根据权利要求10至12所述的用途,其中所述组合物还包含佐剂。
19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述分离的多肽与佐剂偶联。
20. 根据权利要求18所述的用途,其中所述佐剂包括明矾。
21. 根据权利要求18所述的用途,其中所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。
22. 根据权利要求4所述的组合物在制备用于治疗或预防对象的葡萄球菌感染的疫苗中的用途。
23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述葡萄球菌包括金黄色葡萄球菌的WU1或JSNZ菌株。
24. 根据权利要求22所述的用途,其中所述葡萄球菌包括ST88型分离物或现在适应于动物的任何其他葡萄球菌。
25. 根据权利要求22所述的用途,其中所述对象是人患者。
26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述人患者是儿科患者。
27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述儿科患者为2岁或小于2岁。
28. 根据权利要求25所述的用途,其中所述人患者为65岁或大于65岁。
29. 根据权利要求25所述的用途,其中所述人患者是卫生保健工作者。
30. 根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中所述分离的多肽或组合物以四次剂量施用,并且其中剂量之间的间隔为至少四周。
31. 根据权利要求22所述的用途,其中所述葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。
32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述葡萄球菌对一种或多种治疗具有抗性。
33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述葡萄球菌对甲氧西林具有抗性。
34. 根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中向所述对象施用所述分离的多肽或组合物多于一次。
35. 根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中所述组合物经口施用、肠胃外施用、皮下施用、肌内施用或静脉内施用。
36. 根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中向所述对象施用包含第二葡萄球菌抗原的组合物。
37. 根据权利要求36所述的用途,其中所述第二葡萄球菌抗原是Emp、EsxA、EsxB、EsaC、Eap、Ebh、EsaB、Coa、vWbp、vWh、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、IsdC、ClfA、ClfB和SasF中的一种或多种。
38. 根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中所述对象是哺乳动物。
39. 根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中所述对象未表现来自分离的多肽或组合物的任何毒性迹象。
40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述对象未表现来自分离的多肽或组合物的任何过敏性休克迹象。
41. 根据权利要求4所述的组合物在制备在对象中使葡萄球菌去定植或防止葡萄球菌定植或再定植的药物中的用途,其中向所述对象施用有效量的所述组合物。

## 包含葡萄球菌蛋白A (SpA) 变体的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年5月14日提交的美国临时专利申请第62/847832号的优先权，其通过引用整体并入本文。

### 背景

[0003] 本发明是在美国国立卫生研究院颁发的授予编号为AI038897和AI052474的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0004] I. 技术领域

[0005] 本发明一般地涉及免疫学、微生物学和病理学领域。更特定地，本发明涉及包含细菌蛋白A变体的方法和组合物，其可用于引发针对细菌的免疫应答。

[0006] II. 背景

[0007] 近年来，随着血管内装置使用的增加，社区获得性感染和医院获得性感染的数量有所增加。医院获得性（院内）感染是发病率和死亡率的主要原因，特别是在美国，每年感染超过200万患者。最常见的感染是尿路感染（占感染的33%），其次是肺炎（15.5%）、手术部位感染（14.8%）和原发性血流感染（13%）（Emorl和Gaynes, 1993）。

[0008] 医院病原体主要包括金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌（主要是表皮葡萄球菌）、肠球菌属、大肠杆菌和铜绿假单胞菌。尽管这些病原体引起的感染数量大致相同，但它们可以产生的疾病的严重程度与抗生素耐药性菌株的频率相结合，从而平衡了金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌作为最重要的医院病原体的排名。

[0009] 葡萄球菌可通过产生毒素或入侵的方式引起人和其他动物中的多种疾病。葡萄球菌毒素也是食物中毒的常见原因，因为细菌可以在储存不当的食物中生长。

[0010] 表皮葡萄球菌是一种正常的皮肤共生菌，它也是一种重要的导致受损医疗器械感染和手术部位感染的机会性病原体。被表皮葡萄球菌感染的医疗器械包括心脏起搏器、脑脊液分流器、连续流动的腹膜透析导管、整形外科器械和人工心脏瓣膜。

[0011] 金黄色葡萄球菌是医院感染的最常见原因，具有显著的发病率和死亡率。它是某些骨髓炎、心内膜炎、化脓性关节炎、肺炎、脓肿和中毒性休克综合征病例的原因。金黄色葡萄球菌可以在干燥的表面上存活，从而增加传播的机会。任何金黄色葡萄球菌感染都可以导致葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征，这是一种对吸收到血液中的外毒素的皮肤反应。它还可以引起一种可能危及生命的称为脓毒症的败血症。存在的问题是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）已成为医院获得性感染的主要原因。

[0012] 通常用抗生素治疗金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌感染，青霉素是首选药物，而万古霉素用于耐甲氧西林菌株。对抗生素表现出广谱耐药性的葡萄球菌菌株的百分比变得越来越普遍，对有效的抗菌疗法构成威胁。此外，最近出现的耐万古霉素金黄色葡萄球菌菌株引起了人们的担忧，即MRSA菌株正在出现和传播而没有有效的疗法。

[0013] 目前正在研究使用针对葡萄球菌抗原的抗体替代抗生素治疗葡萄球菌感染。该疗法包括施用多克隆抗血清（W000/15238、W000/12132）或用抗脂磷壁酸的单克隆抗体治疗

(W098/57994)。

[0014] 另一种方法是使用主动疫苗接种来产生针对葡萄球菌的免疫应答。已对金黄色葡萄球菌基因组进行测序并鉴定了许多编码序列(W002/094868、EP0786519),这可实现对潜在抗原的鉴定。表皮葡萄球菌(W001/34809)也是如此。作为这种方法的改进,其他人已经从被葡萄球菌感染患者的超免疫血清中鉴定出可被识别的蛋白质(W001/98499、W002/059148)。

[0015] 金黄色葡萄球菌向细胞外环境分泌过多的毒力因子(Archer,1998;Dinges等人,2000;Foster,2005;Shaw等人,2004;Sibbald等人,2006)。像大多数分泌的蛋白质一样,这些毒力因子通过Sec信号通路跨质膜转运。通过Sec信号通路分泌的蛋白质带有N端前导肽,一旦前蛋白参与Sec易位子,该前导肽便会被前导肽酶除去(Dalbey和Wickner,1985;van Wely等人,2001)。最近的基因组分析表明,放线菌和厚壁菌门的成员编码了一个其他的分泌系统,该系统以独立于Sec的方式识别蛋白质子集(Pallen,2002)。结核分枝杆菌的ESAT-6(早期分泌抗原靶标6kDa)和CFP-10(培养滤液抗原10kDa)代表了这种在结核分枝杆菌中称为ESX-1或Snm的新型分泌系统的第一个底物(Andersen等人,1995;Hsu等人,2003;Pym等人,2003;Stanley等人,2003)。在金黄色葡萄球菌中,由Ess通路(ESAT-6分泌系统)分泌两种类似的被称为Es A和Es B的ESAT-6xx的样因子,(Burts等人,2005)。

[0016] 针对金黄色葡萄球菌或其产生的外蛋白的第一代疫苗取得了有限的成功(Lee,1996)。仍然需要开发针对葡萄球菌感染的有效疫苗。也需要用于治疗葡萄球菌感染的其他组合物。

[0017] 在本申请中,术语“约”根据其在细胞和分子生物学领域中的简单和普通含义使用,以表明包括用于确定该值的装置或方法的误差标准偏差的值。

[0018] 与术语“包括”一起使用时,不使用数量词可以意味着“一个”,但也可以与“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的含义一致。

[0019] 如本文所用,术语“或”和“和/或”用于描述相互组合或相互排斥的多个组分。例如,“x、y和/或z”可以指单独的“x”、单独的“y”、单独的“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或“x或y或z”。特别考虑到可以从实施方案特别地排除x、y或z。

[0020] “包含”、“具有”、“包括”、“特征在于”或“含有”是包容性的或开放式的,不排除其他的、未列举的元件或方法步骤。

[0021] 组合物和使用方法可以“包括”在整个说明书中公开的任何成分或步骤、“基本上由”或“由”在整个说明书中公开的任何成分或步骤“组成”。短语“由.....组成”不包括未指定的任何元件、步骤或成分。短语“基本上由.....组成”将所述主题的范围限制为指定的材料或步骤,以及不会对其基本特征和新颖特征产生实质性影响的材料或步骤。考虑在术语“包括”的上下文中描述的实施方案也可以在术语“由.....组成”或“基本上由.....组成”的上下文中实施。

[0022] 特别考虑,关于本发明的一个实施方案所讨论的任何限制都可以适用于本发明的任何其他实施方案。此外,本发明的任何组合物可用于本发明的任何方法中,并且本发明的任何方法可用于生产或利用本发明的任何组合物。实施例中描述的实施方案的方面也可以不同实施例或申请中其他地方实施的实施方案,例如发明内容、具体实施方式、权利要求和附图说明中的实施方案。

[0023] 通过以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得明显。然而应当理解是,详细描述和特定实施例虽然表明了本发明的特定实施方案,但仅作为说明给出,因为由该详细描述,本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言将变得明显。

### 发明内容

[0024] 本发明提供了改进的蛋白A变体的组合物和方法,该变体与免疫球蛋白的VH3的结合降低,以降低它们的毒性,同时刺激防止葡萄球菌疾病的体液免疫应答。在某些实施方案中,改进的蛋白A变体刺激体液免疫应答,其可以(i)防止定植和(ii)导致活跃定植个体的去定植。

[0025] 在一些实施方案中,组合物和方法涉及包含变体蛋白A(SpA)的分离的多肽,其(i)在每个结构域A至E中对应于结构域D的第9位和第10位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换和(ii)在每个结构域A至E中对应于结构域D的第33位具有谷氨酸置换,其中相对于阴性对照,该多肽未可检测地交联血液中的IgG和IgE或激活嗜碱性粒细胞或肥大细胞。在一些实施方案中,认为变体SpA区域不能交联血液中的IgG和/或IgE和/或激活嗜碱性粒细胞,从而对人患者造成显著的安全性或毒性问题或在人患者中造成显著的过敏性休克风险。在一些实施方案中,与SpA变体相比,来自人IgG的VH3的 $K_A$ 结合亲和力降低,其中SpA变体由将每个结构域A至E中对应于结构域D中的第9位和第10位的谷氨酰胺残基置换为赖氨酸和将结构域A至E中对应于结构域D的第36位和第37位的天冬氨酸置换为丙氨酸组成( $SpA_{KKAA}$ )。在一些实施方案中,与 $SpA_{KKAA}$ 相比,SpA变体对来自人IgG的VH3的 $K_A$ 结合亲和力降低至少1/2。在一些实施方案中, $K_A$ 结合亲和力可以通过本文公开的任何方法检测。在一些实施方案中,与 $SpA_{KKAA}$ 相比,SpA变体对来自人IgG的VH3的 $K_A$ 结合亲和力降低至少1/1.2、1/1.3、1/1.4、1/1.5、1/1.6、1/1.7、1/1.8、1/1.9、1/2、1/2.1、1/2.2、1/2.3、1/2.4、1/2.5、1/2.6、1/2.7、1/2.8、1/2.9、1/3或小于1/3倍(或其可推导出的任何范围)。在某些实施方案中,与 $SpA_{KKAA}$ 相比,SpA变体对来自人IgG的VH3的 $K_A$ 结合亲和力降低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%或多于300%(或其可推导出的任何范围)。当然,可以理解,可以使用相同或可比较的测定进行对比。在一些实施方案中,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 小于约 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 。在一些实施方案中,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 小于约 $3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.9 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.7 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.4 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.1 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.9 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.7 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.4 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.1 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.9 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.7 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.4 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.1 \times 10^5 M^{-1}$ (或其可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,包含SpA变体的分离的多肽在结构域A至E中对应于结构域D的第36位和第37位处不具有置换。在一些实施方案中,SpA变体中唯一的置换是(i)在每个结构域A至E中对应于结构域D的第9和第10位谷氨酰胺残基处的赖氨酸置换和(ii)在每个结构域A至E中对应于结构域D中的第33位的谷氨酸置换(称为 $SpA_{Q9,10K/S33E}$ )。在一些实施方案中,分离的多肽由SpA变

体组成。在一些实施方案中,分离的多肽由SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>组成。

[0026] 在一些实施方案中,存在包含变体蛋白A (SpA) 的分离的多肽,其 (i) 在每个结构域A至E中对应于结构域D第9位和第10位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换和(ii) 在每个结构域A至E中对应于结构域D第33位具有苏氨酸置换,其中相对于阴性对照,该多肽未可检测地交联血液中的IgG和IgE或激活嗜碱性粒细胞或肥大细胞。在一些实施方案中,认为变体SpA区域不能交联血液中的IgG和/或IgE和/或激活嗜碱性粒细胞,从而对人患者造成显著的安全性或毒性问题或在人患者中造成显著的过敏性休克风险。在一些实施方案中,其中与由将每个结构域A至E中对应于结构域D中第9位和第10位的谷氨酰胺残基置换为赖氨酸和将结构域A至E中对应于结构域D中第36位和第37位的天冬氨酸置换为丙氨酸组成的SpA变体(SpA<sub>KKAA</sub>)相比,来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 降低。在一些实施方案中,与SpA<sub>KKAA</sub>相比,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 降低至少1/2。在一些实施方案中,可以通过本文公开的任何方法检测 $K_A$ 结合亲和力检测。在一些实施方案中,与SpA<sub>KKAA</sub>相比,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 降低了至少1/1.2、1/1.3、1/1.4、1/1.5、1/1.6、1/1.7、1/1.8、1/1.9、1/2、1/2.1、1/2.2、1/2.3、1/2.4、1/2.5、1/2.6、1/2.7、1/2.8、1/2.9、1/3或小于1/3(或其可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,与SpA<sub>KKAA</sub>相比,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 降低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%或多于300%(或其可推导出的任何范围)。当然,可以理解,可以使用相同或可比较的测定进行对比。在一些实施方案中,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_A$ 小于约 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 。在一些实施方案中,SpA变体对来自人IgG的VH3的 $K_A$ 结合亲和力小于约 $3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.9 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.7 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.4 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.1 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.9 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.7 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.4 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.1 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.9 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.8 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.7 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.4 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.3 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $0.1 \times 10^5 M^{-1}$ (或其可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,包含SpA变体的分离的多肽在结构域A至E中对应于结构域D中的第36位和第37位不具有置换。在一些实施方案中,SpA变体中唯一的置换是(i) 在每个结构域A至E中对应于结构域D中第9位和第10位的赖氨酸置换谷氨酰胺残基和(ii) 在每个结构域A至E中对应于结构域D中第33位的苏氨酸置换(称为SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>)。在一些实施方案中,分离的多肽由SpA变体组成。在一些实施方案中,分离的多肽由SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>组成。

[0027] 在一些实施方案中,组合物和方法涉及SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>。下文在SpA变体的上下文中讨论的任何实施方案都可以特定地用SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>实施,其具有与毒性和/或过敏性休克相关的活性降低的关键优势。在某些实施方案中,存在在人患者中引发针对葡萄球菌的安全免疫应答的方法,包括向人患者施用有效量的包含SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>的组合物。在某些实施方案中,存在在对象中引发针对葡萄球菌的安全免疫应答的方法,包括向对象施用有效量的包含SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>的组合物。对象可以是实验室动物或工业动物,例如牛、猪、绵羊或任何其他为人食用而生长的动物,并且可能患有葡萄球菌感染,例如乳腺炎。

[0028] 在一些实施方案中,组合物和方法涉及SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>。下文在SpA变体的上下文中讨

论的任何实施方案都可以特定地用SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>实施,其具有与毒性和/或过敏性休克相关的活性降低的关键优势。在某些实施方案中,存在在人患者中引发针对葡萄球菌的安全免疫应答的方法,包括向人患者施用有效量的包含SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>的组合物。

[0029] 在一些实施方案中,组合物和方法涉及包含变体蛋白A (SpA) 的分离的多肽,所述变体蛋白A (SpA) (i) 在每个结构域A至E中对应于第9位和第10位的谷氨酰胺残基处具有赖氨酸置换和(ii) 在每个结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第29位和/或第33位具有至少一个其他氨基酸置换,其中SpA变体对来自人IgE的VH3的结合亲和力 $K_D$ 大于 $1.0 \times 10^{-4}$ MM。在相同或其他的实施方案中,SpA变体对来自人IgE的VH3的结合亲和力 $K_D$ 大于 $1.0 \times 10^{-6}$ MM。

[0030] 实施方案包括产生可安全用于人的蛋白A变体,特别不能与免疫细胞表面的Fc受体结合的VH3独特型IgG和IgE分子的变体重链结合交联,所述免疫细胞能够释放组胺等免疫介质,从而引发血管渗漏和过敏反应。

[0031] 在变体SpA的每个结构域A、B、C、D和E(结构域A至E)中进行氨基酸置换,这意味着对应于在结构域D(即SEQ ID NO:2)中第9位和第10位谷氨酰胺残基的氨基酸被置换了;结构域A、B、C和E中相应氨基酸进行了相同的氨基酸置换。实施方案涉及SpA,其中在每个结构域A至E中对应于结构域D中第9位和第10位的谷氨酸残基已被置换为赖氨酸残基。

[0032] 在某些实施方案中,SpA变体对来自人IgG的VH3的结合亲和力 $K_D$ 大于约 $1.0 \times 10^{-4}$ M、 $5.0 \times 10^{-4}$ M、 $1.0 \times 10^{-3}$ M、 $5.0 \times 10^{-3}$ M、 $1.0 \times 10^{-2}$ M、 $5.0 \times 10^{-2}$ M、 $1.0 \times 10^{-1}$ M、 $5.0 \times 10^{-1}$ M(或其可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,来自人IgG的VH3的结合亲和力大于约 $1.0 \times 10^{-2}$ M或 $5.0 \times 10^{-2}$ M。在相同或其他的实施方案中,SpA变体对于来自人IgE的VH3的结合亲和力 $K_D$ 大于约 $1.0 \times 10^{-6}$ M、 $5.0 \times 10^{-6}$ M、 $1.0 \times 10^{-5}$ M、 $5.0 \times 10^{-5}$ M、 $1.0 \times 10^{-4}$ M、 $5.0 \times 10^{-4}$ M、 $1.0 \times 10^{-3}$ M、 $5.0 \times 10^{-3}$ M、 $1.0 \times 10^{-2}$ M、 $5.0 \times 10^{-2}$ M、 $1.0 \times 10^{-1}$ M或 $5.0 \times 10^{-1}$ M(或其可推导出的任何范围)。SpA及其变体与Ig之间的亲和力可以用纯化的人IgG(来自混合血清)和纯化的人单克隆抗体(曲妥珠单抗人IgG1 VH3克隆抗体和IgE曲妥珠单抗)进行检测。可以使用ELISA和/或表面等离子体共振进行检测。

[0033] 在特定的实施方案中,变体SpA在每个结构域A至E中包含对应于SEQ ID NO:2的第29位的氨基酸置换。在某些情况下,对应于第29位的氨基酸的置换是丙氨酸、亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸或谷氨酰胺。在一些实施方案中,变体SpA包含对应于第29位的氨基酸的置换,即丙氨酸、苯丙氨酸或精氨酸。在其他实施方案中,置换不具有以下氨基酸之一:亮氨酸、脯氨酸、谷氨酸、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸或谷氨酰胺。在一些实施方案中,变体SpA在每个结构域A至E中包含对应于SEQ ID NO:2的第33位的氨基酸置换。在特定的实施方案中,对应于第33位的氨基酸的置换是丙氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺。在特定情况下,用苯丙氨酸、谷氨酸或谷氨酰胺进行置换。在其他实施方案中,不用丙氨酸或赖氨酸进行置换。在一些SpA变体中,存在如本文所述的每个结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第29位和第33位的置换。这些变体可以与或不与每个结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2中的第36位和第37位之一或两者的氨基酸置换组合。在某些情况下,第36位和第37位都有置换。在一些情况下,对应于第36位和第37位的氨基酸置换是丙氨酸残基置换天冬氨酸残基。

[0034] 在一些实施方案中,变体SpA多肽包含变体结构域A至E(意指具有变体结构域A、变体结构域B、变体结构域C、变体结构域D和变体结构域E的多肽)并且每个变体结构域与蛋白

A结构域D多肽 (SEQ ID NO:2)、结构域E (SEQ ID NO:3)、结构域A (SEQ ID NO:4)、结构域C (SEQ ID NO:5)、结构域B (SEQ ID NO:6) 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或96%的同一性。或者,变体SpA多肽包含变体结构域A至E (意指具有变体结构域A、变体结构域B、变体结构域C、变体结构域D和变体结构域E的多肽) 并且就氨基酸而言 (除了那些特别明确表达为具有氨基酸置换),每个变体结构域与蛋白A结构域D多肽 (SEQ ID NO:2)、结构域E (SEQ ID NO:3)、结构域A (SEQ ID NO:4)、结构域C (SEQ ID NO:5)、结构域B (SEQ ID NO:6) 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。换言之,在第9位、第10位和第29位具有置换的SpA变体可以具有结构域A至E,否则与非变体序列100%相同。在某些实施方案中,例如,变体SpA包含变体结构域A至E,该结构域在SEQ ID NO:2中相应的第9位、第10位、第29位、第33位、第36位和/或第37位以外不包含任何氨基酸置换。

[0035] 在特定实施方案中,变体SpA包含仅由变体结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第9位、第10位和第29位的氨基酸置换组成。在某些其他的实施方案中,变体SpA包含仅由变体结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第9位、第10位和第33位的氨基酸置换组成。在其他实施方案中,变体SpA包含仅由变体结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第9位、第10位、第29位和第33位的氨基酸置换组成。此外,其他实施方案中涉及变体SpA,该变体SpA包含仅由变体结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第9位、第10位、第29位、第36位和第37位的氨基酸置换组成。在另外的实施方案中,变体SpA包含仅由变体结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第9位、第10位、第33位、第36位和第37位的氨基酸置换组成。在其他实施方案中,变体SpA包含仅由变体结构域A至E中对应于SEQ ID NO:2的第9位、第10位、第29位、第33位、第36位和第37位的氨基酸置换组成。

[0036] 在其他实施方案中,变体SpA是分离的多肽的一部分。分离的多肽可以包括也可以不包括不来自蛋白A的区域。在某些情况下,非蛋白A片段是第二抗原片段,其可以是也可以不是葡萄球菌抗原片段。在某些实施方案中,该片段可包含Emp、EsxA、EsxB、EsaC、Eap、Ebh、EsaB、Coa、vWbp、vWh、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、IsdC、ClfA、ClfB和/或SasF片段。

[0037] 实施方案包括蛋白A变体在用于治疗细菌和/或葡萄球菌感染的方法和组合物中的用途。本申请还提供了包含蛋白A变体或其免疫原性片段的免疫原性组合物。在某些方面,免疫原性片段是蛋白A结构域D片段。此外,本发明提供了可用于治疗 (例如,限制对象中的葡萄球菌脓肿形成和/或持续存在) 或预防细菌感染的方法和组合物。在某些情况下,刺激免疫应答的方法包括向对象施用有效量的组合物,所述组合物包括或编码全部或部分蛋白A变体多肽或抗原,以及在某些方面的其他细菌蛋白。其他细菌蛋白包括但不限于 (i) 分泌毒力因子和/或细胞表面蛋白或肽,或 (ii) 编码分泌毒力因子和/或细胞表面蛋白的重组核酸分子或肽。

[0038] 在一些实施方案中,存在涉及SpA变体的方法。方法包括治疗对象体内的葡萄球菌感染、引发对象体内针对葡萄球菌的免疫应答、预防对象体内的葡萄球菌感染、防止对象体内葡萄球菌的定植或重新定植、减少对象体内葡萄球菌的定植或重新定植、治疗对象体内的葡萄球菌感染而无显著毒性、和/或诱导杀死对象体内的葡萄球菌。步骤可以包括向对象施用有效量的SpA变体或包含SpA变体的组合物。由于现有的感染或感染风险,对象可能需要治疗或预防。

[0039] 在某些实施方案中,对象未表现出来自分离的多肽或组合物的任何毒性迹象。在另外的实施方案中,对象没有表现出来自分离的多肽或组合物的任何过敏性休克的迹象。在某些实施方案中,评估对象的毒性迹象,其可包括过敏性休克的迹象。

[0040] 多肽可以配制成药学上可接受的组合物。组合物还可以包含至少或至多1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、或19种其他的葡萄球菌抗原或其免疫原性片段(例如Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla(例如H35突变体)、IsdC、SasF、vWbp或vWh)。可与蛋白A变体组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa(GenBank CAC80837)、Aap(GenBank基因库号AJ249487)、Ant(GenBank基因库NP\_372518)、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运蛋白、MHCII类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNAIII激活蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5,801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白(参见PCT公开WO2007/113222、WO2007/113223、WO2006/032472、WO2006/032475、WO2006/032500,它们各自通过引用整体并入本文)。葡萄球菌抗原或免疫原性片段可以与蛋白A变体同时施用。葡萄球菌抗原或免疫原性片段和蛋白A变体可以以相同的组合物施用。蛋白A变体也可以是编码蛋白A变体的重组核酸分子。重组核酸分子可以编码蛋白A变体和至少一种葡萄球菌抗原或其免疫原性片段。如本文所用,术语“调节”包含词语“增强”或“抑制”的含义。活性的“调节”可以是活性的增加或减少。本文所用的术语“调节剂”是指影响部分功能的化合物,包括蛋白质、核酸、基因、生物体或类似物的上调、诱导、刺激、增强、抑制、下调或抑制。

[0041] 在某些实施方案中,方法和组合物使用或包括或编码全部或部分蛋白A变体或抗原。在其他方面,蛋白A变体可以与分泌因子或表面抗原组合使用,包括但不限于一种或多种分离的Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp或vWh中的多肽或其免疫原性片段。可与蛋白A变体组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运蛋白、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni-ABC转运蛋白、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。在某些实施方案中,Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh、52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶

原结合蛋白 (US6288214)、EFB (FIB)、弹性蛋白结合蛋白 (EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白 (US6008341)、纤维连接蛋白结合蛋白 (US5840846)、FnbA、FnbB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运体、MHC II类似物 (US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白 (RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF (WO 00/12689)、SdrG/Fig (WO 00/12689)、SdrH (WO 00/12689)、SEA外毒素 (WO 00/02523)、SEB外毒素 (WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白 (US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白中的1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或多于10种可以从配方中明确排除。

[0042] 在另一方面,分离的蛋白A变体是多聚化的,例如二聚化或两种或多于两种的多肽或肽段的线性融合。在本发明的某些方面,组合物包含1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种或多于20种分离的细胞表面蛋白或其片段的多聚体或多联体。多联体是具有一个或多于一个重复肽单元的线性多肽。SpA多肽或片段可以是连续的或由间隔物或其他肽序列隔开,例如,一种或多于一种其他的细菌肽。在另一方面,多聚体或多联体中包含的其他多肽或肽可包括但不限于Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh或其免疫原性片段中的1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种。可与蛋白A变体组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白 (WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原结合蛋白 (US6288214)、EFB (FIB)、弹性蛋白结合蛋白 (EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白 (US6008341)、纤维连接蛋白结合蛋白 (US5840846)、FnbA、FnbB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运蛋白、MHC II类似物 (US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白 (RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF (WO 00/12689)、SdrG/Fig (WO 00/12689)、SdrH (WO 00/12689)、SEA外毒素 (WO 00/02523)、SEB外毒素 (WO 00/02523)、SitC和Ni-ABC转运蛋白、SitC/MntC/唾液结合蛋白 (US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。

[0043] 术语“蛋白A变体”或“SpA变体”是指包括SpA IgG结构域的多肽,该结构域具有两种或多于两种破坏与Fc和V<sub>H</sub>3结合的氨基酸置换。在某些方面,SpA变体包括变体结构域D肽,以及SpA多肽及其片段的变体,它们是无毒的并且刺激针对葡萄球菌蛋白A和/或表达这种蛋白的细菌的免疫应答。

[0044] 实施方案还包括在对象体内引发针对葡萄球菌属细菌或葡萄球菌的免疫应答的方法,该方法包括向对象提供有效量的蛋白A变体或其片段。在某些方面,在对象中引发针对葡萄球菌或葡萄球菌的免疫应答的方法包括向对象提供有效量的1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种或多于19种分泌蛋白和/或细胞表面蛋白或其片段/片段。分泌蛋白或细胞表面蛋白包括但不限于Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp和/或vWh蛋白及其免疫原性片段。可与蛋白A变体组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白 (WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原结合蛋白 (US6288214)、EFB (FIB)、弹性蛋白结合蛋白

(EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运蛋白、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni-ABC转运蛋白、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。

[0045] 包括方法、组合物和多肽实施方案的实施方案包括其中葡萄球菌包含金黄色葡萄球菌的WU1或JSNZ菌株的特定实施方案。在一些实施方案中,葡萄球菌包含ST88型分离物。

[0046] 在一些实施方案中,本文所述的对象或患者,例如人患者是儿科患者。儿科患者是指未满18岁的患者。在一些实施方案中,患者最少或最多1岁、2岁、3岁、4岁、5岁、6岁、7岁、8岁、9岁、10岁、11岁、12岁、13岁、14岁、15岁、16岁、17岁、18岁、19岁、20岁、25岁、30岁、35岁、40岁、45岁、50岁、55岁、56岁、57岁、58岁、59岁、60岁、61岁、62岁、63岁、64岁、65岁、66岁、67岁、68岁、69岁、70岁、71岁、72岁、73岁、74岁、75岁、76岁、77岁、78岁、79岁、80岁、85,或90岁(或其可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,儿科患者为2岁或小于2岁。在一些实施方案中,儿科患者为小于1岁。在一些实施方案中,儿科患者为小于6个月。在一些实施方案中,儿科患者为2个月或小于2个月。在一些实施方案中,儿科患者为65岁或大于65岁。在一些实施方案中,人患者是卫生保健工作者。在一些实施方案中,患者是将接受外科手术的患者。

[0047] 在一些实施方案中,将分离的多肽或组合物分四次给病人服用,并且其中剂量之间的间隔为至少四周。在一些实施方案中,分离的多肽以4次剂量或恰好以4次剂量施用。在一些实施方案中,分离的多肽或组合物以至少、至多或恰好以1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次或8次剂量施用。在一些实施方案中,第一剂在6至8周龄时施用。在一些实施方案中,所有四个剂量在2岁或2岁之前施用。在一些实施方案中,多肽或组合物将在2个月、4个月、6个月和12个月至15个月时作为四次剂量系列施用。最早可在6周龄时给予第1剂。施用之间的间隔可为约4周至8周。在某些实施方案中,第四剂在大约12个月至15个月时施用,并且在第三剂之后至少2个月施用。

[0048] 实施方案包括包含多肽、肽或蛋白质的组合物,所述多肽、肽或蛋白质为或至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同或类似于蛋白质A,或者是分泌的细菌蛋白质或细菌细胞表面蛋白质的第二种蛋白质或肽。在另外的实施方案中,组合物可包括多肽、肽或蛋白质,其为或至少为70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同或类似于蛋白A结构域D(SEQ ID NO:2)、结构域E(SEQ ID NO:3)、结构域A(SEQ ID NO:4)、结构域C(SEQ ID NO:5)、结构域B(SEQ ID NO:6),或为编码蛋白A结构域D、结构域E、结构域A、结构域C或结构域B多肽的核酸序列。在某些方面,蛋白A多肽片段将具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。相似性或同一性,优选同一性是本领领域已知的,并且可以使用许多不同的程序来鉴定蛋白质(或核酸)是否与已知序列具有序列同一性或相似性。使用本领领域已知的标准技术确定序列同一性和/或相似性,这些技术包括但不限于Smith&Waterman(1981)的局部序列同一性算法、Needleman&Wunsch(1970)的序列同一性比对算法、Pearson&Lipman(1988)的相似性搜索方法,这些算法的计算机实现(威斯康星州遗传学软件包Genetics Computer Group,575 Science Drive,威斯康星州麦迪逊市的GAP,

BESTFIT, FASTA和TFASTA), Devereux等人(1984)描述的最佳拟合序列程序, 优选地使用默认设置或通过检查。优选地, 通过使用本领域技术人员已知并且容易确定的比对工具来计算同一性百分比。同一性百分比基本上是相同氨基酸的数量除以比较的氨基酸总数乘以一百。

[0049] 另外的实施方案还包括刺激对象对葡萄球菌的保护性或治疗性免疫应答的方法, 包括向对象施用有效量的组合物, 所述组合物包括(i) SpA变体, 例如变体SpA结构域A至E多肽或其肽; 或(ii) 编码此类SpA变体多肽或其肽的核酸分子, 或(iii) 施用SpA变体结构域D多肽与本文所述的细菌蛋白质的任意组合或排列。在优选的实施方案中, 组合物不是葡萄球菌。在某些方面对象可以是人、牛、猪、绵羊或山羊或任何其他为人食用而生长的动物, 并且可能感染葡萄球菌, 例如乳腺炎。在另一方面, 将组合物配制成药学上可接受的制剂。葡萄球菌可以是金黄色葡萄球菌。

[0050] 另外的实施方案还包括疫苗, 其包含具有分离的SpA变体多肽或本文所述的蛋白质或肽的任何其他组合或排列, 其中所述组合物能够刺激针对葡萄球菌的免疫应答细菌。疫苗可包含分离的SpA变体多肽, 或所述蛋白质或肽的任何其他组合或排列。在本发明的某些方面, 分离的SpA变体多肽, 或所描述的蛋白质或肽的任何其他组合或排列是多聚化的, 例如二聚化的或多联体的。在另一方面, 疫苗组合物被其他葡萄球菌蛋白质污染了少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.05% (或其可推导出的任何范围)。组合物还可以包含分离的非SpA多肽。通常疫苗包含佐剂。在某些方面, 本发明的蛋白质或肽与佐剂连接(共价或非共价), 优选佐剂与蛋白质化学缀合。在一些实施方案中, 佐剂包括明矾。在一些实施方案中, 佐剂包括本文所述的佐剂。

[0051] 在另外的实施方案中, 疫苗组合物是具有编码全部或部分SpA变体多肽或本文所述的蛋白质或肽的任何其他组合或排列的重组核酸的药学上可接受的组合物, 其中该组合物能够刺激针对葡萄球菌的免疫应答。疫苗组合物可以包含编码全部或部分SpA变体多肽或本文所述的蛋白质或肽的任何其他组合或排列的重组核酸。在某些实施方案中, 重组核酸含有异源启动子。优选地, 重组核酸是载体。更优选地, 载体是质粒或病毒载体。在某些方面, 疫苗包括含有核酸的重组非葡萄球菌。重组非葡萄球菌可以是沙门氏菌或其他革兰氏阳性菌。疫苗可以包含药学上可接受的赋形剂, 更优选地佐剂。在某些实施方案中, 佐剂包括明矾或本文所述的佐剂。

[0052] 另外的实施方案包括刺激对象对葡萄球菌属细菌的保护性或治疗性免疫应答的方法, 包括向对象施用有效量的SpA变体多肽或其片段的组合物, 并且还包含Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp或vWh中的一种或多种蛋白或肽。在优选的实施方案中, 组合物包含非葡萄球菌属细菌。在另一方面, 将组合物配制成药学上可接受的制剂。治疗对象的葡萄球菌可以是金黄色葡萄球菌。本发明的方法还包括包含1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种或多种于19种的SpA变体组合物分泌的毒力因子和/或细胞表面蛋白, 例如Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp或vWh的各种组合。在某些方面, 疫苗制剂包括Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp和vWh。在某些方面, 抗原组合可包括(1) SpA变体和IsdA; (2) SpA变体和ClfB; (3) SpA变

体和SdrD; (4) SpA变体和H1a或H1a变体; (5) SpA变体和C1fB、SdrD和H1a或H1a变体; (6) SpA变体、IsdA、SdrD和H1a或H1a变体; (7) SpA变体、IsdA、C1fB和H1a或H1a变体; (8) SpA变体、IsdA、C1fB和SdrD; (9) SpA变体、IsdA、C1fB、SdrD和H1a或H1a变体; (10) SpA变体、IsdA、C1fB和SdrD; (11) SpA变体、IsdA、SdrD和H1a或H1a变体; (12) SpA变体、IsdA和H1a或H1a变体; (13) SpA变体、IsdA、C1fB和H1a或H1a变体; (14) SpA变体、C1fB和SdrD; (15) SpA变体、C1fB和H1a或H1a变体;或(16) SpA变体、SdrD和H1a或H1a变体。

[0053] 在某些方面,对于长时间或持续生长或脓肿形成而言,递送本发明组合物的细菌将受到限制或减弱。在另外的方面,SpA变体可以在减毒细菌中过表达以另外的增强或补充免疫应答或疫苗制剂。

[0054] 术语“EsxA蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型EsxA多肽及其片段以及刺激针对葡萄球菌EsxA蛋白的免疫应答的变体。

[0055] 术语“EsxB蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型EsxB多肽及其片段的蛋白质,以及刺激针对葡萄球菌EsxB蛋白的免疫应答的变体。

[0056] 术语“SdrD蛋白质”是指包括从葡萄球菌分离的野生型SdrD多肽及其片段的蛋白质,以及刺激针对葡萄球菌SdrD蛋白质的免疫应答的变体。

[0057] 术语“SdrE蛋白”是指包括从葡萄球菌属细菌及其片段中分离的野生型SdrE多肽,以及刺激针对葡萄球菌属细菌SdrE蛋白的免疫应答的变体。

[0058] 术语“IsdA蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型IsdA多肽,以及刺激针对葡萄球菌IsdA蛋白的免疫应答的变体。

[0059] 术语“IsdB蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型IsdB多肽,以及刺激针对葡萄球菌IsdB蛋白的免疫应答的变体。

[0060] 术语“Eap蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型Eap多肽及其片段,以及刺激针对葡萄球菌Eap蛋白的免疫应答的变体。

[0061] 术语“Ebh蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型Ebh多肽及其片段,以及刺激针对葡萄球菌Ebh蛋白的免疫应答的变体。

[0062] 术语“Emp蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型Emp多肽及其片段,以及刺激针对葡萄球菌Emp蛋白的免疫应答的变体。

[0063] 术语“EsxB蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型EsxB多肽及其片段的蛋白质,以及刺激针对葡萄球菌EsxB蛋白的免疫应答的变体。

[0064] 术语“EsxC蛋白”是指包括从葡萄球菌分离的野生型EsxC多肽及其片段的蛋白质,以及刺激针对葡萄球菌EsxC蛋白的免疫应答的变体。

[0065] 术语“SdrC蛋白”是指包括从葡萄球菌属细菌及其片段中分离的野生型SdrC多肽,以及刺激针对葡萄球菌属细菌SdrC蛋白的免疫应答的变体。

[0066] 术语“C1fA蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型C1fA多肽,以及刺激针对葡萄球菌C1fA蛋白的免疫应答的变体。

[0067] 术语“C1fB蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型C1fB多肽,以及刺激针对葡萄球菌C1fB蛋白的免疫应答的变体。

[0068] 术语“Coa蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型Coa多肽,以及刺激针对葡萄球菌Coa蛋白的免疫应答的变体。

[0069] 术语“H1a蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型H1a多肽,以及刺激针对葡萄球菌H1a蛋白的免疫应答的变体。

[0070] 术语“IsdC蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型IsdC多肽,以及刺激针对葡萄球菌IsdC蛋白的免疫应答的变体。

[0071] 术语“SasF蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型SasF多肽,以及刺激针对葡萄球菌SasF蛋白的免疫应答的变体。

[0072] 术语“vWbp蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型vWbp多肽,以及刺激针对葡萄球菌vWbp蛋白的免疫应答的变体。

[0073] 术语“vWh蛋白”是指包括来自葡萄球菌及其片段的分离的野生型vWh多肽,以及刺激针对葡萄球菌vWh蛋白的免疫应答的变体。

[0074] 免疫应答是指生物体中的体液反应、细胞反应或体液反应和细胞反应同时进行。免疫应答的检测可以通过以下方式进行,这些方式包括但不限于测定特异性识别蛋白质或细胞表面蛋白的抗体的存在或数量、测定T细胞激活或增殖、和/或测定在一种或多于一种细胞因子的活性或表达方面的调节。

[0075] 在某些方面,多肽或片段可以具有与参考多肽的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%或多于99%同一性的序列。术语“相似性”是指多肽的序列与参考多肽或与参考多肽构成的保守置换具有一定百分比的氨基酸同一性。

[0076] 本文所述的多肽可以包括或排除在SEQ ID NO:1-6的第1位、第2位、第3位、第4位、第5位、第6位、第7位、第8位、第9位、第10位、第11位、第12位、第13位、第14位、第15位、第16位、第17位、第18位、第19位、第20位、第21位、第22位、第23位、第24位、第25位、第26位、第27位、第28位、第29位、第30位、第31位、第32位、第33位、第34位、第35位、第36位、第37位、第38位、第39位、第40位、第41位、第42位、第43位、第44位、第45位、第46位、第47位、第48位、第49位、第50位、第51位、第52位、第53位、第54位、第55位、第56位、第57位、第58位、第59位、第60位、第61位、第62位、第63位、第64位、第65位、第66位、第67位、第68位、第69位、第70位、第71位、第72位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位、第78位、第79位、第80位、第81位、第82位、第83位、第84位、第85位、第86位、第87位、第88位、第89位、第90位、第91位、第92位、第93位、第94位、第95位、第96位、第97位、第98位、第99位、第100位、第101位、第102位、第103位、第104位、第105位、第106位、第107位、第108位、第109位、第110位、第111位、第112位、第113位、第114位、第115位、第116位、第117位、第118位、第119位、第120位、第121位、第122位、第123位、第124位、第125位、第126位、第127位、第128位、第129位、第130位、第131位、第132位、第133位、第134位、第135位、第136位、第137位、第138位、第139位、第140位、第141位、第142位、第143位、第144位、第145位、第146位、第147位、第148位、第149位、第150位、第151位、第152位、第153位、第154位、第155位、第156位、第157位、第158位、第159位、第160位、第161位、第162位、第163位、第164位、第165位、第166位、第167位、第168位、第169位、第170位、第171位、第172位、第173位、第174位、第175位、第176位、第177位、第178位、第179位、第180位、第181位、第182位、第183位、第184位、第185位、第186位、第187位、第188位、第189位、第190位、第191位、第192位、第193位、第194位、第195位、第196位、第197位、第198位、第199位、第200位、第201位、第202位、第203位、第204位、第205位、第206位、第207位、第208位、第209位、第210位、第211位、第212位、第213位、第214位、第215位、第216位、第217位、第

218位、第219位、第220位、第221位、第222位、第223位、第224位、第225位、第226位、第227位、第228位、第229位、第230位、第231位、第232位、第233位、第234位、第235位、第236位、第237位、第238位、第239位、第240位、第241位、第242位、第243位、第244位、第245位、第246位、第247位、第248位、第249位、第250位、第300位、第400位、第500位、第550位、第1000位或多于第1000位或其可推出的任何范围处的连续氨基酸。

[0077] 如本文所述的多肽片段可包括SEQ ID NO:1-6的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个或多于1000个或其可推出的任何范围的连续氨基酸。

[0078] 组合物可以配制成药学上可接受的组合物。在本发明的某些方面，葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。

[0079] 在另一个方面，组合物可以向对象施用多于一次，并且可以施用1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、15次、20次或多于20次。组合物的施用包括但不限于口服、非肠道、皮下、肌内、静脉内或其各种组合，包括吸入。

[0080] 在另外的实施方案中，组合物包含编码本文所述多肽或其片段的重组核酸分子。通常，编码本文所述多肽的重组核酸分子包含异源启动子。在某些方面，本发明的重组核酸分子是载体，在其他方面，载体是质粒。在某些实施方案中，载体是病毒载体。在某些方面，组合物包括含有或表达本文所述多肽的重组非葡萄球菌。在特定方面，重组非葡萄球菌属细菌是沙门氏菌或另一种革兰氏阳性细菌。组合物通常施用于哺乳动物，例如人对象，但施用于能够引发免疫应答的其他动物的治疗是值得考虑的。在另外一方面的方面，含有或表达多肽的葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。在另外的实施方案中，免疫应答是保护性免疫应答。

[0081] 在另外的实施方案中，组合物包含编码一种或多于一种的Eap、Ebh、Emp、EsaB、

EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、SpA、vWbp 或vWh蛋白或肽或其变体的重组核酸分子中的全部或部分。可与本文所述的多肽组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运蛋白、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运蛋白、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。在特定方面,细菌是重组非葡萄球菌,例如沙门氏菌或其他革兰氏阳性细菌。

[0082] 本发明的组合物通常施用于人对象,但对于能够引发对葡萄球菌的免疫应答的其他动物,特别是牛、马、山羊、绵羊和其他家畜,即哺乳动物,也考虑施药。

[0083] 在某些方面,葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。在另外的实施方案中,免疫应答是保护性免疫应答。在更另外的方面,本发明的方法和组合物可用于预防、改善、减少或治疗组织或腺体的感染,例如乳腺,特别是乳腺炎和其他感染。其他方法包括但不限于预防性地减少没有表现出感染迹象的对象的细菌负担,特别是那些怀疑或有可以被目标细菌定植的对象,例如,在住院、治疗和/或康复期间有或将有感染风险或易受感染的患者。

[0084] 关于本发明的一个方面所讨论的任何实施方案也适用于本发明的其他方面。特别地,在SpA变体多肽或肽或核酸的上下文中讨论的任何实施方案可以针对其他抗原实施,例如Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh、52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EP、BFPBA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运体、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白(或核酸),反之亦然。还应理解Eap、Ebb、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh、52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FPBA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性ABC转运蛋白、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg<sup>2+</sup>转运体、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III激活蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋

白 (US5801234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白中的1种或多于1种可以从权利要求的组合中明确排除。

[0085] 本发明的实施方案包括含有或不含细菌的组合物。组合物可以包含或不包含减毒的或活的或完整的葡萄球菌。在某些方面,组合物包含非葡萄球菌属细菌的细菌或不含葡萄球菌属细菌。在某些实施方案中,细菌组合物包含分离的或重组表达的葡萄球菌蛋白A变体或对编码相同的核苷酸。组合物可以是或包括重组改造的葡萄球菌,其已经以包含细菌的分泌的毒力因子或细胞表面蛋白特异性改变的方式发生了改变。例如,可以重组修饰细菌以表达比未经修饰时所表达的更多的毒力因子或细胞表面蛋白。

[0086] 术语“分离的”可以指基本上不含其来源的细胞物质、细菌物质、病毒物质或培养基(当通过重组DNA技术产生时)或化学前驱体或其他化学品的核酸或多肽(化学合成时)。此外,分离的化合物是指可以作为分离的化合物施用于对象的化合物;换言之,如果该化合物粘附在柱子上或嵌入琼脂糖凝胶中,则不能简单地将其视为“分离的”。此外,“分离的核酸片段”或“分离的肽”是非天然存在的片段和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白质片段。

[0087] 本发明的部分,例如多肽、肽、抗原或免疫原,可以共价或非共价地缀合或连接至其他部分,例如佐剂、蛋白质、肽、支持物、荧光部分或标记。术语“缀合物”或“免疫缀合物”广泛用于定义一个部分与另一种药剂的有效缔合,并不旨在仅指任何类型的有效缔合,并且尤其是不限于化学“缀合”。特别要考虑的是重组融合蛋白。本发明的组合物还可包含佐剂或药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,佐剂包括明矾或本文所述的佐剂。佐剂可以与本发明的多肽或肽共价或非共价偶联。在某些方面,佐剂与蛋白质、多肽或肽化学偶联。

[0088] 术语“提供”根据其通常含义用于表示“提供或提供使用”。在一些实施方案中,通过施用蛋白质直接提供蛋白质,而在其他实施方案中,通过施用编码蛋白质的核酸有效地提供蛋白质。在某些方面,本发明考虑包含核酸、抗原、肽和/或表位的各种组合的组合物。

[0089] 对象将患有(例如,被诊断为患有葡萄球菌感染)、将被怀疑患有或将有葡萄球菌感染的风险。本发明的组合物包括免疫原性组合物,考虑其中所述抗原或表位的含量有效地达到考虑目的。更特定地,有效量是指刺激或引发免疫应答或提供对感染的抵抗、改善或减轻所必需的活性成分的量。在更特定的方面,有效量预防、减轻或改善疾病或感染的症状,或延长接受治疗的对象的存活时间。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文提供的详细公开内容。对于本发明方法中使用的任何制剂,可以首先从体外研究、细胞培养和/或动物模型测定来估计有效量或剂量。例如,可以在动物模型中配制剂量以实现所需的免疫应答或循环抗体浓度或滴度。这些信息可用于更准确地确定对人体的有用剂量。

[0090] 在一些实施方案中,本公开的多肽(SpA变体)在嗜碱性粒细胞组胺释放实验中提供小于或等于20%、19.5%、19%、18.5%、18%、17.5%、17%、16.5%、16%、15.5%、15%、14.5%、14%、13.5%、13%、12.5%、12%、11.5%、11%、10.5%、10%、9.5%、9%、8.5%、8%、7.5%、7%、6.5%、6%、5.5%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、或0%(或其可推导出的任何范围)的组胺释放。

[0091] 实施例部分中的实施方案应理解为适用于本发明所有方面的本发明实施方案。

[0092] 权利要求中使用的术语“或”用于表示“和/或”，除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的，尽管本公开支持仅指替代方案和“和/或”的定义。还考虑的是使用术语“或”列出的任何内容也可被明确排除。

[0093] 在本申请中，术语“约”用于指示包括用于确定该值的装置或方法的误差标准偏差的值。

[0094] 根据长期存在的专利法，除非特别说明，当在权利要求书或说明书中与“包括”一词结合使用时，“一个”一词表示一个或多个。

[0095] 由以下详细描述，本发明的其他目的、特征和优点将变得明显。然而应当理解，详细描述和特定实施例虽然表明了本发明的特定实施方案，但仅作为说明给出，因为从该详细描述中，本领域技术人员由此将明白在本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

## 附图说明

[0096] 为了获得并详细理解本发明的上述特征、优点和目的以及其他将变得清楚的事项，附图简要概括的本发明的更特定的描述和某些实施方案。这些附图构成了说明书的一部分。然而，应当注意的是附图说明了本发明的某些实施方案，因此不应被认为它们范围受到了限制。

[0097] 图1A至E金黄色葡萄球菌ST88分离出小鼠病原体WU1。(A)来自金黄色葡萄球菌WU1和金黄色葡萄球菌Newman(一种人临床分离株)的vwb基因产物的结构域结构和序列同源性。显示了vWbp与其信号肽(S)、D1结构域和D2结构域(负责结合和激活宿主凝血酶原)、接头(白框)和C端纤维蛋白原结合结构域(C)的百分比氨基酸(aa)同一性。(B)对Newman菌株(WT,野生型)及其 $\Delta$ coa、 $\Delta$ vwb、 $\Delta$ coa-vwb和 $\Delta$ c1fA变体、菌株WU1、JSNZ、USA300LAC及其 $\Delta$ vwb变体的金黄色葡萄球菌全培养样品的免疫印迹进行了用于使用多克隆兔抗体的vWbp( $\alpha$ vWbp)、Coa( $\alpha$ Coa)、H1a( $\alpha$ H1a)和C1fA( $\alpha$ C1fA)的制备的分析。(C)针对vWbp-C结构域的多克隆抗体可识别来自菌株JSNZ和WU1的vWbp等位基因变体以及来自菌株USA300LAC的vWbp。(D至E)在12个显微镜视野中检测人(D)或小鼠(E)血浆中Syto-9染色的金黄色葡萄球菌菌株的凝集以作为聚集细菌的平均大小和标准误差，使用双向ANOVA和Sidak多重比较测试与WT成对比较评估统计学显著性。\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ 。

[0098] 图2A-B金黄色葡萄球菌WU1持续地在于C57BL/6小鼠的鼻咽部定植。用 $1 \times 10^8$ CFU的指定金黄色葡萄球菌WU1或PBS对照鼻内接种C57BL/6小鼠群( $n = 10$ )并每周在喉咙中擦拭以计算细菌负荷。每个点表示每只小鼠的CFU数量。给定日期每组动物的中值和标准偏差由水平线和误差条表示。

[0099] 图3A-B C57BL/6小鼠的持续定植需要金黄色葡萄球菌蛋白A(SpA)的WU1表达。(A)菌株USA300LAC、Newman、WU1的金黄色葡萄球菌裂解物的免疫印迹，用SpA- ( $\alpha$ SpA)和分选酶A特异性抗体( $\alpha$ SrtA)检测无spa表达质粒(pspa)和有spa表达质粒(pspa)的WU1的 $\Delta$ spa变体。(B)C57BL/6小鼠群( $n = 10$ )鼻内接种 $1 \times 10^8$ CFU的金黄色葡萄球菌WU1或其 $\Delta$ spa变体，并每周对动物的口咽进行擦拭以计算细菌负荷。每个点表示每只小鼠的CFU数量。给定日期每组动物的中值和标准偏差由水平线和误差条表示。细菌定植数据集采用双向方差分析和Sidak多重比较检验进行分析；两组动物之间的统计学显著差异(\*\*\* $p = 0.0003$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ )用星号表示。

[0100] 图4用SpA<sub>KKAA</sub>对C57BL/6小鼠进行免疫接种可促进金黄色葡萄球菌WU1的去定植。用50 $\mu$ g经CFA或PBS模拟在CFA中乳化的纯化重组SpAKKAA免疫C57BL/6小鼠,并在11天后用50 $\mu$ g用IFA或PBS模拟在IFA中乳化的重组SpAKKAA加强免疫。在定植实验的第0天,用 $1 \times 10^8$ CFU的金黄色葡萄球菌WU1鼻内接种C57BL/6小鼠组(n=10)的小鼠。每周间隔擦拭动物的口咽以计算细菌负荷。每个点表示每只小鼠的CFU数量。给定日期每组动物的中值和标准偏差由水平线和误差条表示。细菌定植数据集采用双向方差分析和Sidak多重比较检验进行分析;两组动物之间的统计学显著差异(\*p<0.05;\*\*p<0.01)用星号表示。

[0101] 图5用SpA<sub>KKAA</sub>对BALB/c小鼠进行免疫接种可促进金黄色葡萄球菌WU1的去定植。用50 $\mu$ g用CFA或PBS模拟在CFA中乳化的纯化重组SpA<sub>KKAA</sub>免疫BALB/c小鼠,并在11天后用50 $\mu$ g用IFA或PBS模拟在IFA中乳化的重组SpA<sub>KKAA</sub>加强免疫。在定植实验的第0天,用 $1 \times 10^8$ CFU的金黄色葡萄球菌WU1鼻内接种BALB/c小鼠组(n=10)的小鼠。每周间隔擦拭动物的口咽以计算细菌负荷。每个点表示每只小鼠的CFU数量。给定日期每组动物的中值和标准偏差由水平线和误差条表示。细菌定植数据集采用双向方差分析和Sidak多重比较检验进行分析;两组动物之间的统计学显著差异(\*p<0.05;\*\*p<0.01;\*\*\*\*p<0.0001)用星号表示。

[0102] 图6用SpA<sub>KKAA</sub>对BALB/c小鼠进行免疫接种可促进金黄色葡萄球菌JSNZ从鼻咽部的清除。用50 $\mu$ g用CFA或PBS模拟在CFA中乳化的纯化重组SpA<sub>KKAA</sub>免疫BALB/c小鼠,并在11天后用50 $\mu$ g用IFA或PBS模拟在IFA中乳化的重组SpA<sub>KKAA</sub>加强免疫。在定植实验的第0天,用 $1 \times 10^8$ CFU的金黄色葡萄球菌JSNZ鼻内接种BALB/c小鼠组(n=10)的小鼠。每周间隔擦拭动物的口咽以计算细菌负荷。每个点表示每只小鼠的CFU数量。给定日期每组动物的中值和标准偏差由水平线和误差条表示。细菌定植数据集采用双向方差分析和Sidak多重比较检验进行分析;两组动物之间的统计学显著差异(\*p<0.05;\*\*p<0.01)用星号表示。

[0103] 图7A-C改进的SpA疫苗A:SpA<sub>KKAA</sub>变体、SpA<sub>KKAA/A</sub>变体和SpA<sub>KKAA/F</sub>变体的描述。B:变体与人IgG的结合亲和力。C:变体与人IgE的结合亲和力。

[0104] 图8A-B结合力的检测。A:SpA变体的蛋白质印迹。B:变体对标记分子变体的酶联免疫吸附测定。

[0105] 图9A-B蛋白质A是金黄色葡萄球菌在小鼠鼻腔中的持续定植所必须的。

[0106] 图10蛋白质A氨基酸序列比对。深灰色:与人Fc $\gamma$ 片段相互作用的氨基酸;浅灰色:与人Fab片段相互作用的氨基酸;星号表示与人Fc $\gamma$ 和Fab片段相互作用的氨基酸,红色:与人Fc $\gamma$ 片段相互作用的氨基酸

[0107] 图11表面等离子体激元共振(SPR)分析表明Z结构域(SpA B结构域中的G29A)无法与F(ab)<sub>2</sub>片段结合。

[0108] 图12A-B针对G29的新SpA\*变体。

[0109] 图13针对G29的新SpA\*变体。

[0110] 图14针对G29的新SpA\*变体。

[0111] 图15针对G29的新SpA\*变体。

[0112] 图16实施例2中另外描述的罗勒组胺释放测定的描述。

[0113] 图17A-B葡萄球菌蛋白A(SpA)。(A)图说明了在细菌表面上的细胞壁SpA的SpA前驱体的一级结构,(其中SPA前驱体的N端信号肽被信号肽酶切割,5个免疫球蛋白结合结构域(IgBDs-指定为E,D,A,B,C),细胞壁跨越结构域指定区域Xr,LysM结构域用于肽聚糖结合,C

端LPXTG分选信号被分选酶A切割),以及从细胞壁包膜中释放并扩散到宿主组织中的释放的SpA分子的一级结构。(B)分泌和分选酶A介导的SpA细胞壁锚定和金黄色葡萄球菌释放肽聚糖连接的SpA。

[0114] 图18A-B SpA与人IgG的Fc $\gamma$ 结构域的结合阻断了抗体的效应区(Fc和补体受体的结合)和吞噬细胞对金黄色葡萄球菌的调理吞噬作用。葡萄球菌蛋白A的免疫逃避属性。(A)金黄色葡萄球菌表面的细胞壁锚定SpA结合人IgG(IgG1、IgG2和IgG4)的Fc $\gamma$ 并阻断抗体的效应区以触发对细菌的调理吞噬作用。(B)图说明了人IgG的一级结构、其抗原结合互补位(紫色)效应物(C1q、Fc $\gamma$ Rs、FcRn)和SpA结合位点。

[0115] 图19A-B葡萄球菌蛋白A的免疫逃避属性。(A)SpA在金黄色葡萄球菌感染期间的免疫逃避功能。细胞壁锚定的SpA位于金黄色葡萄球菌的表面,结合人IgG的Fc $\gamma$ 并阻断抗体的效应区以触发对细菌的调理吞噬作用。释放的SpA交联人IgG和IgM(B细胞受体)的V $_H$ 3独特型变体重链,以激活B细胞增殖、类别转换、体细胞超突变和V $_H$ 3独特型抗体的分泌,这些抗体可以被SpA交联但不识别金黄色葡萄球菌抗原,从而阻止针对金黄色葡萄球菌的适应性免疫应答的发展和保护性免疫的建立。(B)图说明了SpA与V $_H$ 3独特型B细胞受体(IgM)的结合和交联以及CD79AB信号传导的激活。

[0116] 图20A-B重组SpA、SpA<sub>KKAA</sub>、SpA<sub>AA</sub>和SpA<sub>KKAA</sub>的免疫球蛋白结合结构域(IgBDs)。(A)图说明了N端有多组氨酸标签的重组SpA的IgBDs的一级结构,用于通过亲和层析从大肠杆菌的细胞质中Ni-NTA的纯化。IgBD-E结构域的氨基酸序列如下所示。指出了每个IgBD(H1、H2和H3)的三个 $\alpha$ -螺旋的位置。SpA<sub>KK</sub>和SpA<sub>KKAA</sub>在Q<sup>9,10</sup>K(Gln<sup>9,10</sup>Lys)处有氨基酸置换。SpA<sub>KK</sub>和SpA<sub>KKAA</sub>在D<sup>36,37</sup>A(Asp<sup>36,37</sup>Lys)处有氨基酸置换。编号是指氨基酸在B-IgBD中的位置。(B)SpA的五个IgBD的氨基酸序列比对。保守氨基酸用点(.)表示。对齐中的间隙用破折号(-)表示。非保守氨基酸以单字母代码列出。据Graille等人报道,(138),参与IgG Fc $\gamma$ 结合的SpA残基以红色突出显示。负责V $_H$ 3重链结合的SpA残基以绿色突出显示。粉色残基(Q<sup>32</sup>)有助于Fc $\gamma$ 和V $_H$ 3结合。

[0117] 图21A-B SpA相关的V $_H$ 3交联活性和过敏反应。(A)图说明了人激活Fc $\gamma$ 和Fc $\epsilon$ 受体的结构及其V $_H$ 3独特型IgG和IgE配体。(B)嗜碱性粒细胞或肥大细胞上分别与Fc $\gamma$ R和Fc $\epsilon$ R受体结合的V $_H$ 3独特型IgG或IgE的SpA交联触发了组胺、炎症介质以及促进过敏反应、血管舒张和休克的细胞因子的释放。尽管(B)中没有描述,肥大细胞和嗜碱性粒细胞都表达Fc $\gamma$ R和Fc $\epsilon$ R受体,并对与Fc $\gamma$ R结合的V $_H$ 3独特型IgG的SpA交联或与Fc $\epsilon$ R受体结合的V $_H$ 3独特型IgE的SpA交联反应,释放组胺、促炎介质和细胞因子。

[0118] 图22SpA疫苗候选在小鼠中的过敏活性。 $\mu$ MT小鼠(n=5)通过耳内皮内注射用VH3 IgG致敏。24小时后静脉注射候选疫苗抗原或PBS对照组,然后注射伊文思蓝。在30分钟后从耳组织中提取染料后,通过620nm的分光光度计检测对染料的外渗进行定量。数据来自三个独立的实验。使用Bonferroni多重比较检验进行单向方差分析以对数据进行统计分析。符号:ns,无意义;\* ,P<0.05;\*\* ,P<0.01;\*\*\* ,P<0.001;\*\*\*\* ,P<0.0001。

[0119] 图23A-B用VH3 IgE使肥大细胞脱粒培养的人肥大细胞(LAD2)致敏过夜,洗涤,未经处理(PBS)或暴露于SpA 1小时作为阳性对照或试验品SpA<sub>KKAA</sub>、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>、SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>或SpA-KR。在细胞颗粒以及在上清液中测量 $\beta$ -己糖胺酶和组胺水平。显示了 $\beta$ -氨基己糖苷酶(A)的百分比和组胺(B)的释放量。使用Bonferroni多重比较检验进行单向方差分析以对

数据进行统计分析。符号:ns,无意义;\*, $P < 0.05$ ;\*\*, $P < 0.01$ ;\*\*\*, $P < 0.001$ ;\*\*\*\*, $P < 0.0001$ 。

[0120] 图24A-E用SpA<sub>KKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>进行免疫可促进渐进式去定植。用 $1 \times 10^8$ CFU的金黄色葡萄球菌WU1鼻内接种C57BL/6小鼠群( $n=10$ )。(A、B、D)每周在小鼠喉咙中擦拭以计算细菌负荷。(C、E)接种后每周收集粪便样本以计算细菌负荷。在图(A)中,用佐剂-PBS或-SpA<sub>KKAA</sub>进行动物免疫。在图(B至C)中,用佐剂-SpA<sub>KKAA</sub>或-SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>进行动物免疫,对同一组动物的喉咙(B)和粪便样本(C)中的细菌负荷进行监测。在图(D至E)中,用佐剂-PBS或-SpA<sub>KKAA</sub>或-SpA<sub>KKAA</sub>或-SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或-SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>进行动物免疫;对同一组动物的喉咙(D)和粪便样本(E)中的细菌负荷进行监测。每个方块表示每个咽拭子每m升或每克粪便的CFU数量。给定日期每组动物的中值和标准偏差由水平线和误差线表示。使用Sidak多重比较检验对数据进行双向方差分析(\*, $P < 0.05$ )。在图(D-E)中,每组数据(每组1至8个)分别代表来自模拟、SpA<sub>KKAA</sub>、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>的数据。在图B和图C中,两组之间没有发现统计学差异。

[0121] 图25A-C SpA候选疫苗在血流感染小鼠模型中的保护活性。用SpA<sub>KKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>或PBS对照组对三周大的BALB/c小鼠( $n=15$ )进行免疫。在第11天进行模拟或加强免疫。在第20天,将小鼠采血以评估针对候选疫苗的血清半最大抗体滴度,在v轴上表示为SpA\*。每组三个条形从左到右分别代表SpA<sub>KKAA</sub>、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>。(A)在第21天,将 $5 \times 10^6$ CFU的金黄色葡萄球菌USA300(LAC)刺激小鼠右眼眶周静脉窦。激发后15天,将动物安乐死以计算肾脏中的葡萄球菌负荷(B)并计算脓肿病变(C)。使用Bonferroni多重比较检验进行单向方差分析以对数据进行统计分析。符号:ns,无意义;\*, $P < 0.05$ ;\*\*, $P < 0.01$ ;\*\*\*, $P < 0.001$ ;\*\*\*\*, $P < 0.0001$ 。

[0122] 图26A-C SpA候选疫苗和SpA中和单克隆抗体3F6之间的相互作用。用SpA<sub>KKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>或PBS对照组包被的酶联免疫吸附测定孔板连续稀释3F6抗体、来自HEK293 F细胞的重组rMAb 3F6(A,rMAb 3F6)或小鼠杂交瘤单克隆抗体(B,hMAb 3F6)。(C)使用GraphPad Prism软件计算的结合常数。

## 具体实施方式

[0123] 金黄色葡萄球菌是人皮肤和鼻孔的共生菌,是血液、皮肤和软组织感染的主要原因(Klebens等,2007)。最近葡萄球菌病死亡率的急剧上升归因于通常对抗生素不敏感的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株的传播(Kennedy等,2008)。在一项大型回顾性研究中,MRSA感染的发生率为美国所有住院患者的4.6%(Klebens等,2007)。美国94300名MRSA感染者的年度医疗保健费用超过24亿美元(Klebens等,2007)。当前的MRSA流行引发了一场公共卫生危机,需要通过开发预防性疫苗来解决(Boucher和Corey,2008)。迄今为止,尚未获得FDA许可的预防金黄色葡萄球菌疾病的疫苗。

[0124] 本发明人在此描述了蛋白A(葡萄球菌的细胞壁锚定表面蛋白)用于产生可用作亚单位疫苗的变体。葡萄球菌感染的发病机制始于细菌通过外伤、手术伤口或医疗器械侵入皮肤或血流(Lowy,1998)。虽然入侵的病原体可能会被吞噬和杀死,但葡萄球菌也可以逃避先天免疫防御和器官组织中的种子感染,诱导吸引巨噬细胞、中性粒细胞和其他吞噬细胞的炎症反应(Lowy,1998)。免疫细胞对感染部位的响应性入侵伴随着液化性坏死,因为宿主

试图阻止葡萄球菌的传播并允许清楚坏死的组织碎片(Lam等,1963)。此类病变可通过显微镜观察到,包括坏死组织、白细胞和中央细菌病灶的细胞增生区域(Lam等,1963)。除非葡萄球菌脓肿通过手术引流并用抗生素治疗,否则播散性感染和败血症会导致死亡(Sheagren,1984)。

#### [0125] I. 葡萄球菌抗原

##### [0126] A. 葡萄球菌蛋白A(SpA)

[0127] 葡萄球菌蛋白A(SpA)结合免疫球蛋白,从而使金黄色葡萄球菌能够逃避宿主免疫应答。SpA与Fc $\gamma$ 的结合可阻断IgG抗体的效应区和免疫细胞对葡萄球菌的调理吞噬作用。V<sub>H</sub>3独特型IgM的变体重链的SpA交联触发B细胞增殖和V<sub>H</sub>3克隆抗体的分泌,这些抗体不能与金黄色葡萄球菌的抗原决定簇结合。此外,肥大细胞和嗜碱性粒细胞上V<sub>H</sub>3独特型IgG和IgE的SpA交联促进组胺释放和过敏反应。早期的工作开发了具有Fc $\gamma$ 和变体重链结合缺陷的SpA<sub>KKAA</sub>。在临床前研究中作为疫苗进行检测时,SpA<sub>KKAA</sub>会引发SpA中和抗体并保护动物免受金黄色葡萄球菌定植和入侵性疾病的侵害。下面的实施例显示SpA<sub>KKAA</sub>保留了V<sub>H</sub>3独特型IgG和IgE的交联活性,并引发过敏反应,表明它在人中使用是不安全的。我们证明了缺乏V<sub>H</sub>3重链交联和过敏活性的SpA变体会引发SpA中和抗体并保护动物免受金黄色葡萄球菌定植和血液感染。因此,无法交联V<sub>H</sub>3独特型免疫球蛋白的SpA变体可用于预防人金黄色葡萄球菌的定植和入侵性疾病。

##### [0128] B. 由金黄色葡萄球菌引起的定植和疾病

[0129] 金黄色葡萄球菌在人的鼻咽和胃肠道定植,并且发现在大约三分之一的人口中是一种持久的定植菌(14)。剩下的人口间歇性地被金黄色葡萄球菌定植(14)。几乎所有人都会在儿童时期产生针对金黄色葡萄球菌的某些分子决定簇的抗体(99)。然而,这些免疫应答不会影响金黄色葡萄球菌的定植或预防入侵性疾病(99)。定植是金黄色葡萄球菌社区或医院获得性入侵性疾病的关键风险因素,包括软组织、伤口、肺、骨骼、血流和手术部位感染(14,100,58,6)。在美国,340万例金黄色葡萄球菌社区获得性感染(CAI)和340000例医院获得性感染(HAI)需要抗生素和/或手术治疗(49至51)。7%的CAI和22%的HAI感染了抗生素耐药金黄色葡萄球菌菌株,称为MRSA(耐甲氧西林金黄色葡萄球菌),并与治疗失败和不良疾病结果(包括死亡)有关(85)。所有金黄色葡萄球菌疾病的特征是它的复发,即在5个病例中有4个复发感染是由同一菌株引起的,并且受感染的宿主无法建立保护性免疫(16)。可以阻止定植和预防入侵性疾病的葡萄球菌疫苗的开发代表了一项紧迫的、未满足的临床需求。尽管几种候选疫苗已经进行了临床功效测试,但产品未能达到其临床终点(59至60,101)。

##### [0130] C. 葡萄球菌蛋白A(SpA)是关键的免疫逃避决定因素

[0131] 葡萄球菌蛋白A(SpA)是一种分选酶A锚定的表面蛋白,是一种关键的免疫逃避决定因素,可在金黄色葡萄球菌定植和感染期间阻止保护性免疫的发展(75,33,102,48)。所有临床金黄色葡萄球菌分离株都携带葡萄球菌蛋白A(*spa*)的基因,该基因产生由N端YSIRK/GxxS信号肽组成的前驱体产物,然后是4至5个免疫球蛋白结合结构域、区域X重复(Xr)、LysM结构域和LPXTG分选信号(29,32,103)(图17A)。SpA前驱体存在于细菌细胞质中,并通过其N端YSIRK/GxxS信号肽进入隔膜处的分泌途径(68,104)。一旦跨过隔膜,C端LPXTG分选信号被分选酶A切割,在其活性位点半胱氨酸残基和LPXTG基序(105至108)中苏氨酸

(T)的羧基之间形成硫酯中间体(图17B)。硫酯中间体通过脂质II[C55-(P04)2-MurNAc(L-Ala-D-iGlu-L-Lys(NH<sub>2</sub>-Gly5)-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc]中氨基(NH<sub>2</sub>-)的亲核激发分解的,在C端苏氨酸和五甘氨酸交叉桥之间产生酰胺键(107,109)。然后将SpA-脂质II中间体掺入跨壁肽聚糖并展示在细菌表面(108,70)。

[0132] 细菌表面的细胞壁锚定SpA与IgG的Fc $\gamma$ 结构域结合并禁用抗体的效应区,从而保护葡萄球菌免受宿主免疫细胞的调理吞噬杀伤(OPK)(48,76)(图18)。在复制过程中,葡萄球菌将部分肽聚糖和肽聚糖连接的SpA(此处称为释放的蛋白A或释放的SpA)释放到宿主环境中,这是由于胞壁溶解酶活性会降解隔膜附近的跨壁(110,111)(图17B)。释放的SpA以L-Ala-D-iGln-L-Lys(SpA-LPET-Gly5)-D-Ala-Gly4(46)的结构系在壁肽上。释放的SpA激活VH3独特型B细胞受体(BCRs或IgM),从而促进B细胞增殖以及通过产生活化的浆母细胞(75,33)促进VH3独特型IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的分泌(图19)。

[0133] D. SpA的免疫球蛋白结合和毒性属性

[0134] SpA的N端免疫球蛋白结合结构域(IgBD)(称为E、D、A、B和C的134至137,72个氨基酸残基的三螺旋折叠)分别与人IgG1、IgG2和IgG4的Fc $\gamma$ 结构域结合(112-116,71)(图20)。SpA不与人IgG3的Fc $\gamma$ 结构域结合,这是唯一具有短血浆半衰期的IgG亚类(113,117)。五种IgBD中的每一种还结合包括IgM(BCR)、IgG、IgE、IgD和IgA的VH3克隆人免疫球蛋白的变体重链(75,48,76,118-135,43)(图19)。IgBD的结合位点不重叠,允许每个SpA模块同时结合抗体的Fc $\gamma$ 和VH3重链(48)(图20)。SpA的一个关键特性是它能够干扰抗体的效应区(Fc $\gamma$ ),包括免疫细胞OPK所必需的Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)和C1q的结合位点(71,72,136,137)(图18B)。在人免疫系统中,54%的IgM(缺乏Fc $\gamma$ )和外周血B细胞与SpA相互作用(75,73,74)。SpA结合仅限于VH3基因家族的变体重链产物,与其他具有较少基因的主要和次要VH基因相比,该家族包含22个基因:VH1[11个基因]、VH2[2个基因]、VH4[11个基因]、VH5[2个基因]、VH6[1个基因]和VH7[1个基因](138)。在定植和入侵性疾病期间,释放的SpA交联VH3克隆B细胞受体并触发抗体(IgG、IgA、IgD和IgE)的分泌,这些抗体虽然通过体细胞超突变适应以改善变体重链与SpA的结合,但不能将葡萄球菌决定簇识别为抗原(15)(图19)。这种B细胞超抗原活性(BCSA,即释放的SpA的VH3结合活性)负责阻止在定植或入侵性疾病期间对金黄色葡萄球菌的保护性免疫的发展(102,48,139)(图19)。

[0135] 当将纯化的蛋白质注射到人或动物体内时,SpA的免疫球蛋白结合特性也与毒性有关。例如,20%至30%的豚鼠IgM通过其变体重链(VH3-独特型)与SpA相互作用(76);将纯化的SpA(500 $\mu$ g)注射到豚鼠的血液中会产生过敏性休克,包括烦躁、呼吸窘迫和死亡(140)。即使剂量为0.01 $\mu$ g,SpA也会导致豚鼠血管渗漏(140)。在小鼠中,只有5%至10%的IgM通过其变体重链(VH3-独特型)与SpA相互作用(76)。小鼠对SpA诱导的过敏反应具有抵抗力,但是当静脉注射人IgG时,这些动物可以通过从激活的嗜碱性粒细胞和肥大细胞中释放组胺转化并屈服于SpA注射(141,142)(图21)。用H1受体组胺拮抗剂美吡拉敏预处理动物可预防SpA诱发的过敏性休克(140)。静脉注射纯化的SpA(0.3 $\mu$ g/kg至0.45 $\mu$ g/kg)与严重的不良反应有关,例如头痛、恶心、肌痛、胸痛、发热、急性淋巴细胞减少和白细胞减少(143)。因此,纯化的SpA代表一种细菌毒素,被认为对人不安全(143,144)。SpA的毒性活性与其对人IgG和IgE的VH3交联活性有关,后者与嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的同源受体结合,从而引发组胺和细胞因子释放、血管舒张、血管渗漏和休克(140,142,144,145)(图21)。

[0136] E. SpA<sub>KKAA</sub>

[0137] 当以氢氧化铝或弗氏佐剂为佐剂并注射到小鼠或豚鼠体内时,纯化的SpA不会在动物中引发针对其五种IgBD的抗体反应(76,43)。同样,金黄色葡萄球菌定植或入侵性疾病与小鼠、豚鼠或人SpA IgBD特异性抗体的发展无关(75,102,48,43)。早期的研究通过首先分析SpA的D免疫球蛋白结合结构域来开发重组SpA变体。Kim和同事用赖氨酸(K或Lys)代替谷氨酰胺(Q或Gln)9和10,用丙氨酸(A或Ala)代替天冬氨酸(D或Asp)36和37,以破坏SpA-D与免疫球蛋白的结合(43)。将重组多组氨酸标记的SpA-D中引入Q9K、Q10K、D36A和D37A以生成SpA-D<sub>KKAA</sub>。最终通过ELISA分析已纯化并保留在镍-次氨基三乙酸-琼脂糖(Ni-NTA)上的SpA-D或SpA-D<sub>KKAA</sub>与人IgG或IgM结合并随后与人IgG或IgM共洗脱的能力。正如考虑的那样,SpA-D在Ni-NTA上保留了人IgG和人IgM。与SpA-D相比,SpA-D<sub>KKAA</sub>捕获了5.6(±0.6)% (P<0.0001)的人IgG和75.6(±4.6)% (P=0.008)的人IgM(括号中的数字代表平均值的标准误差;使用非配对的t检验计算出统计学上的显著差异)(43)。将Q9K、Q10K、D36A和D37A引入重组、多组氨酸标记的SpA(缺乏全长SpA前驱体的信号肽、Xr、LysM和LPXTG分选信号)的五种IgBD中的每一种,生成SpA<sub>KKAA</sub>(图19)(42)。当与多组氨酸标记的重组SpA进行比较分析时,SpA<sub>KKAA</sub>在Ni-NTA柱捕获了2.3(±0.1)%的人IgG(P=0.0001)、2.2(±0.1)%的人IgG的Fcγ片段(Fcγ结合活性,P<0.0001)、4.4(±1.0)%的人IgG F(ab)片段(VH3结合活性,P<0.0001)和4.2(±0.1)%的人IgM(VH3结合活性,P<0.0001)(43)。因此,SpA<sub>KKAA</sub>表现出SpA与人免疫球蛋白的两种结合活性的缺陷,即它与IgG的Fcγ结构域(IgG1、IgG2和IgG4)和VH3独特型免疫球蛋白的变体重链的结合。

[0138] F. SpA<sub>KKAA</sub>作为疫苗抗原

[0139] 多组氨酸标记的重组SpA和SpA<sub>KKAA</sub>通过固定金属亲和层析(IMAC)在Ni-NTA上纯化(43)。用PBS透析洗脱液,提取Triton X-114以去除内毒素,透析,通过考马斯染色的SDS-PAGE和HPLC确定蛋白质浓度(BCA测定)和纯度(>90%)(43)。SpA和SpA<sub>KKAA</sub>可以被吸附到氢氧化铝上[SpA<sub>KKAA</sub> Al(OH)<sub>3</sub>]或用弗氏佐剂乳化,完整的[SpA<sub>KKAA</sub> CFA]或不完整的[SpA<sub>KKAA</sub> IFA](43)。用50μg SpA<sub>KKAA</sub> CFA/IFA对C57BL/6和BALB/c小鼠进行初次加强(11天间隔)免疫接种可引发针对SpA<sub>KKAA</sub>抗原的高滴度血清IgG抗体[9.2μg/mL(±1.1);1:6000ELISA半最大滴度](43)。用50μg SpA<sub>KKAA</sub> Al(OH)<sub>3</sub>对C57BL/6和BALB/c小鼠进行初步加强免疫,产生低滴度抗体[1:500,半数最大滴度];在用SpA<sub>KKAA</sub> Al(OH)<sub>3</sub>免疫的CD1小鼠中观察到更高滴度的IgG[1:4000半最大滴度](76)。使用2次初步强化方案(间隔14天)和100μg SpA<sub>KKAA</sub> Al(OH)<sub>3</sub>对豚鼠进行免疫接种会产生针对SpA<sub>KKAA</sub>的高滴度血清IgG[1:50000半数最大滴度](76)。SpA<sub>KKAA</sub>特异性小鼠和豚鼠IgG与SpA的五种IgBD中的每一种结合,并通过Fcγ或VH3独特型重链中和其结合小鼠、豚鼠或人IgG的能力(76)。此外,SpA<sub>KKAA</sub>特异性小鼠和豚鼠IgG中和与细菌表面免疫球蛋白结合的SpA,并促进抗凝小鼠、豚鼠和人血液中的金黄色葡萄球菌Newman和MRSA USA300 LAC OPK(48,76,43)。使用SpA<sub>KKAA</sub>对小鼠和豚鼠进行免疫接种可保护动物免受金黄色葡萄球菌血流感染(76,43)。保护是基于SpA中和抗体,因为腹膜内或静脉内注射针对SpAIgBDs的纯化多克隆或单克隆抗体(小鼠单克隆抗体3F6)足以防止金黄色葡萄球菌血流感染(增加存活率,减少器官组织中的细菌负荷并减少脓肿形成)(76,84,146,147)。此外,通过中和SpA的BCSA(VH3交联活性),SpA-IgBD特异性抗体在金黄色葡萄球菌血流感染期间增强小鼠和豚鼠对分泌抗原的IgG反应,使SpA<sub>KKAA</sub>免疫的动物能够清除细菌逃避者

并建立保护性免疫对抗复发性疾病(48,76,43,147)。相比之下,未实验稚嫩的或SpA免疫的动物无法建立针对金黄色葡萄球菌的保护性免疫(48,43)。

#### [0140] G. SpA在金黄色葡萄球菌定植过程中的作用

[0141] 检测细菌对人脱屑鼻上皮细胞和在小鼠体内定植的粘附,早期的工作试图确定有助于定植的金黄色葡萄球菌因子(17,18,20)。这些包括结合鼻上皮细胞F型清除受体(SREC-I)的壁磷壁酸(WTA)的D-Ala和GlcNAc修饰(18,27,28)。此外,凝集因子B(C1fB)可促进葡萄球菌在鼻上皮细胞中对兜甲蛋白和细胞角蛋白-10的粘附(21)。与野生型金黄色葡萄球菌相比,同基因c1fB突变体表现出对人志愿者鼻上皮细胞的粘附减弱(7)。铁调节的表面决定簇A(IsdA)有助于从宿主血红蛋白中清除铁并结合乳铁蛋白,抑制鼻分泌物中乳铁蛋白的抗葡萄球菌活性(23,24)。金黄色葡萄球菌表面蛋白G(SasG)在鼻组织生物膜形成期间介导细菌细胞之间依赖锌的粘附(25,26)。因此,葡萄球菌对鼻咽组织的粘附、生物膜形成和定植需要几个因素(78)。重要的是,具有人临床分离株的小鼠鼻腔定植需要预先对动物进行抗生素治疗,以消除常驻微生物群并为耐抗生素的金黄色葡萄球菌提供选择(19)。因此,小鼠不会被人临床金黄色葡萄球菌分离株持续定植(20)。金黄色葡萄球菌鼻腔定植过程中葡萄球菌蛋白A(SpA)的作用一直是神秘的(29)。当对牛津郡(英国)的6110个人进行分析时,所有定植的金黄色葡萄球菌菌株都表达spa(32,31)。尽管spa基因的串联重复结构促进了高频重组,但人定植选择了spa等位基因,其产物保持5个IgBD,从而赋予葡萄球菌有效的BCSA(33,32)。当对通过莫匹罗星治疗清除鼻腔携带的人志愿者进行分析时,金黄色葡萄球菌spa表达不需要细菌粘附到人鼻组织(34)。

[0142] 金黄色葡萄球菌WU1是多位点序列类型ST88进化枝的成员,它是从雄性C57BL/6小鼠包皮腺脓肿爆发中分离出来的(102)。与人临床分离株不同,金黄色葡萄球菌WU1在没有选择抗生素的情况下持续定植于C57BL/6和BALB/c小鼠的鼻咽部,并从母系传递到其后代持续定植(102)。与野生型金黄色葡萄球菌WU1相比,不能将任何表面蛋白锚定到细菌包膜的 $\Delta$  srtA突变体无法在C57BL/6小鼠的鼻咽部定植(102)(未公开的观察)。相比之下, $\Delta$  spa突变体在小鼠的初始定植中没有表现出缺陷(102)。尽管如此, $\Delta$  spa突变体不能持续存在,并且在初始定植后三周开始从小鼠的鼻咽部清除(102)。去定植与针对C1fB、IsdA、SasG以及其他葡萄球菌表面蛋白的血清IgG的增加有关(102)。使用纯化的SpA<sub>KKAA</sub>对小鼠进行免疫接种会产生SpA中和抗体,从而增加病原体特异性IgG(包括抗C1fB、-IsdA、-SasG、-FnbA、-FnbB、-Coa),从而促进金黄色葡萄球菌WU1的去定植(102)。类似地,腹膜内施用SpA-IgBD中和小鼠单克隆抗体3F6可促进病原体特异性IgG和分泌性IgA的增加,以及从鼻咽和胃肠道清除金黄色葡萄球菌(146)。这些数据共同表明,金黄色葡萄球菌定植与SpA释放到宿主组织中以及B细胞反应的转移有关,从而使病原体能够在粘膜表面上持续存在(102)。SpA<sub>KKAA</sub>疫苗诱导的抗SpA抗体通过促进针对许多不同分泌的葡萄球菌抗原的IgG反应来阻止这种机制,这些抗原共同减少了金黄色葡萄球菌的定植(102)。

#### [0143] H. 将SpA用于免疫球蛋白和单克隆抗体(MAb)亲和层析

[0144] 重组SpA、全长或单个结构域(E、D、A、B、C)已被广泛用作单克隆抗体(MAb)亲和层析纯化的配体(147,148)。许多为临床使用而开发的人MAb属于V<sub>H</sub>3独特型IgG1。重组SpA可以通过V<sub>H</sub>3变体框架和Fc $\gamma$ 结合此类抗体(图18和19),因此需要较低的pH(pH 3.1)值从SpA亲和树脂中洗脱MAb(例如包含所有五种IgBD E、D、A、B、C的MabSelect™)。使用较低的pH值

进行MAb洗脱与抗体展开和聚集有关(149)。此外,重组野生型SpA对Asn-Gly残基处的碱裂解敏感,这限制了SpA亲和柱在使用碱( $\geq 0.1\text{M NaOH}$ )进行原位清洗的过程中的用途,其中碱( $0.1\text{M NaOH}$ )可去除污染蛋白质和脂质并杀死污染微生物(147,149)。Z结构域是一个合成的、工程化的(源自SpA的所有五个IgBD的理想化序列)B结构域,它带有两个氨基酸置换,Ala<sup>1</sup>Val和Gly<sup>29</sup>Ala(148,150,151)。后一个氨基酸置换去除了碱敏感的Asn<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>肽键(151,152)。两个(ZZ)、五个(ZV)和十个(ZX)Z结构域的串联重复已显示以结合抗体并用于纯化MAb(130,150)。Gly<sup>29</sup>Ala置换还降低了Z、ZZ和ZZZZ(MabSelectSure™)与IgG1抗体V<sub>H</sub>3框架的结合,从而降低了IgG1洗脱所需的pH(pH 3.7)(148,151,152)。对碱敏感的Asn<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>键在天生具有耐碱性IgBD-C结构域(Thr<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>)中不存在(151)。推测折叠的、天然与未折叠的IgBD-C变体(在Ser33或Asp36位置有八个氨基酸置换其中的一个)的自由能变化( $\Delta G$ )的计算分析与热稳定性的变化相关,但是这个猜想没有经过实验验证(149)。还假设在计算机上还原 $\Delta G$ 以鉴定与VH3变体重链的结合降低;这个猜想也没有经过实验验证(149)。此外,在硅预测中,可以识别结合最弱和最稳定的氨基酸置换的假设也无法验证(149)。尽管如此,通过对五个IgBD-C结构域进行串联重复,每个结构域含有一个氨基酸替代Gly29Ala、Ser<sup>33</sup>Glu和Asp<sup>36</sup>Arg,分别选择了一个 $\Delta G$ 中间变化的突变体Ser<sup>33</sup>Glu和Asp<sup>36</sup>Arg进行实验研究,从而产生C-G29A.5d、C-S33A.5d和C-D36A.5d(149)。所有三种蛋白质,C-G29A.5d、C-S33E.5d和C-D36A.5d都与人IgG结合,结合常数 $K_a$ 为 $3 \times 10^8\text{M}^{-1}$ 至 $5 \times 10^8\text{M}^{-1}$ (149)。野生型蛋白A对人IgG的结合常数是 $K_a 1.4 \times 10^8\text{M}^{-1}$ (153)。为了检测与VH3独特型IgG的结合,Yoshida等人使用木瓜蛋白酶处理从曲妥珠单抗生成Fab片段,曲妥珠单抗是在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生的VH3独特型IgG1 MAb,可与某些乳腺癌细胞上的Her2结合(149)。检测出C-G29A.5d对曲妥珠单抗Fab的亲合力为 $K_a 4.4 \times 10^5\text{M}^{-1}$ ;C-S33E.5d和C-D36A.5d的亲合力降低了近100倍( $K_a 5 \times 10^3\text{M}^{-1}$ ),这些值与非特异性结合一致(149)。

[0145] 在此,发明人寻求提高SpA<sub>KKAA</sub>疫苗的安全性以用于未来的临床测试,特别是通过消除其VH3交联活性。SpA IgBD残基Gly29、Ser33和Asp36位于螺旋2的边缘,该边缘与人免疫球蛋白重链上的VH3框架残基接触并建立关键的键,从而交联VH3独特型B细胞受体(138,154)。早期的工作已经在开发SpA<sub>KKAA</sub>疫苗抗原时检查了Asp<sup>36,37</sup>Ala氨基酸置换(43,154)。因此,本发明人专注于对SpA的五个IgBD中每一个的Gly<sup>29</sup>和Ser<sup>33</sup>位点的氨基酸进行系统分析,并研究了它们在Gln<sup>9</sup>Lys和Gln<sup>10</sup>Lys的背景下对结合人免疫球蛋白的贡献,已知氨基酸置换会减弱SpA与Fc $\gamma$ 的结合(48,43)。探索了此类SpA疫苗构建体引发SpA特异性抗体并产生针对金黄色葡萄球菌定植和入侵性疾病的保护的能力。为了评估安全性,发明人在体外和体内临床前模型中分析了SpA候选疫苗在人V<sub>H</sub>3独特型IgG存在下引发过敏反应的效力。

#### [0146] I. 葡萄球菌凝固酶

[0147] 凝固酶是由葡萄球菌产生的酶,可将纤维蛋白原转化为纤维蛋白。Coa和vW<sub>H</sub>在没有蛋白水解的情况下激活凝血酶原(Friedrich等人,2003)。凝固酶凝血酶原复合物将纤维蛋白原识别为特定底物,将其直接转化为纤维蛋白。活性复合物的晶体结构显示D1和D2结构域与凝血酶原结合,并将其Ile1-Val<sup>2</sup>N端插入Ile<sup>16</sup>口袋,通过构象变化在酶原中诱导功能性活性位点(Friedrich等人,2003年)。 $\alpha$ -凝血酶的外位点I、纤维蛋白原识别位点和凝血酶原的外位点I被Coa的D2阻断(Friedrich等人,2003)。然而,四聚体(Coa·凝血酶原)<sub>2</sub>复合物的结合以高亲和力在新位点结合纤维蛋白原(Panizzi等人,2006)。该模型解释了凝固

酶的凝固特性和凝血酶的有效纤维蛋白原转化 (Panizzi 等人, 2006)。

[0148] 纤维蛋白原是一种大糖蛋白 (Mr 约 340000), 由三对  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 链共价连接形成“三聚体的二聚体”, 其中 A 和 B 表示由凝血酶裂解释放的纤维蛋白肽 (Panizzi 等人, 2006)。拉长的分子折叠成三个独立的结构域, 一个中央片段 E 包含所有 6 条链的 N 端, 两个侧翼片段 D 主要由  $\beta$  和  $\gamma$  链的 C 端形成。这些球状结构域由长的三螺旋结构连接。凝固酶-凝血酶原复合物将人纤维蛋白原转化为自聚合纤维蛋白, 不会被循环凝血酶抑制剂靶向 (Panizzi 等人, 2006)。因此, 葡萄球菌凝固酶绕过生理血液凝固途径。

[0149] 所有金黄色葡萄球菌菌株都会分泌凝固酶和 vWbp (Bjerketorp 等人, 2004; Field 和 Smith, 1945)。尽管早期工作报告了凝固酶对葡萄球菌感染发病机制的重要贡献 (Ekstedt 和 Yotis, 1960; Smith 等人, 1947), 最近使用分子遗传学工具进行的研究通过观察小鼠心内膜炎、皮肤脓肿和乳腺炎模型没有毒力表型来挑战这一观点 (Moreillon 等人, 1995; Phonimdaeng 等人, 1990)。产生金黄色葡萄球菌 Newman 的同基因变体, 一种完全毒力的临床分离物 (Duthie 等人, 1952), 本文描述了 *coa* 突变体确实小鼠的致死菌血症和肾脏脓肿模型中表现出毒力缺陷。根据发明人的经验, 金黄色葡萄球菌 8325-4 不是完全毒力的, 并且推测该菌株中的突变损伤可能无法揭示体内毒力缺陷。此外, 提出的抗 Coa 或 vWbp 抗体在一定程度上扰乱了金黄色葡萄球菌 Newman 感染的发病机制, 反映了基因缺失的影响。Coa 和 vWbp 有助于葡萄球菌脓肿的形成和致死性菌血症, 也可能在亚单位疫苗中起到保护性抗原的作用。

[0150] 生化研究证明了抗 Coa 或 vWbp 抗体的生物学价值。通过与抗原结合并阻断其与凝血因子的结合, 抗体阻止了 Coa 凝血酶原和 vWbp · 凝血酶原复合物的形成。被动转移研究揭示了 Coa 和 vWbp 抗体对实验动物抵抗葡萄球菌脓肿形成和致命激发的保护作用。激发因此, Coa 或 vWbp 中和抗体产生针对葡萄球菌疾病的免疫保护。

[0151] 早期的研究揭示了需要凝固酶来抵抗血液中的吞噬作用 (Smith 等人, 1947), 并且发明人在来匹卢定处理的小鼠血液中观察到  $\Delta$  *coa* 突变体的相似表型 (参见下面的实施例 3)。由于 vWbp 对人凝血酶原的亲和力高于小鼠对应物, 因此怀疑人血液中的  $\Delta$  vWbp 变体也可以如此。此外, Coa 或 vWbp 在脓肿病变中的表达以及它们在嗜酸性假包膜周围 (葡萄球菌脓肿群落 (SAC) 或外周纤维蛋白壁) 中的显著分布表明, 分泌的凝固酶有助于这些病变的形成。这个假设得到了检验, 事实上,  $\Delta$  *coa* 突变体在脓肿的建立方面是有缺陷的。相应的测试 (用特异性抗体阻断 Coa 功能) 产生了相同的效果。因此, 有人提出纤维蛋白的凝固是建立葡萄球菌脓肿的关键事件, 可作为开发保护性疫苗的目标。由于它们在人凝血酶原上的重叠功能, Coa 和 vWbp 都被认为是疫苗开发的绝佳候选者。

[0152] J. 其他葡萄球菌抗原

[0153] 过去几十年的研究将金黄色葡萄球菌外毒素、表面蛋白和调节分子确定为重要的毒力因子 (Foster, 2005; Mazmanian 等人, 2001; Novick, 2003)。在这些基因的调控方面已经取得了很大进展。例如, 葡萄球菌通过在阈值浓度分泌与同源受体结合的自诱导肽进行细菌调查, 从而激活磷酸中继反应和许多外毒素基因的转录激活 (Novick, 2003)。葡萄球菌感染的发病机制依赖于这些毒力因子 (分泌的外毒素、外多糖和表面黏合剂)。葡萄球菌疫苗的发展受到葡萄球菌入侵机制的多方面性质的阻碍。众所周知, 减毒活微生物是非常有效的疫苗; 与非复制性免疫原产生的免疫应答相比, 此类疫苗引发的免疫应答通常更大, 持续

时间更长。对此的一种解释可能是减毒活菌株在宿主中建立有限的感染并模拟自然感染的早期阶段。本发明的实施方案是针对包括变体SpA多肽和肽以及革兰氏阳性细菌的其他免疫原性细胞外蛋白、多肽和肽(包括分泌的蛋白或肽和细胞表面的蛋白或肽)的组合物和方法,用于减轻感染或对感染进行免疫。在特定的实施方案中,细菌是葡萄球菌。细胞外蛋白、多肽或肽包括但不限于目标细菌的分泌蛋白和细胞表面蛋白。

[0154] 人病原体金黄色葡萄球菌分泌两种ESAT-6样蛋白质EsxA和EsxB,穿过细菌包膜(Burts等人,2005,其通过引用并入本文)。葡萄球菌esxA和esxB与其他六个基因按转录顺序聚类:esxA esaA essA essB essC esaC esxB。首字母缩写词esa、ess和esx分别代表ESAT-6分泌附件、系统和细胞外,这取决于编码的蛋白质是对分泌起到辅助(esa)或直接(ess)作用,还是被分泌(esx)在细胞外环境。八个基因是整个簇在本文中指的是Ess簇。EsxA、esxB、essA、essB和essC都是EsxA和EsxB合成或分泌所必需的。无法产生EsxA、EsxB和EssC的突变体在金黄色葡萄球菌鼠脓肿的发病机制中表现出缺陷,这表明这种特殊的分泌系统可以是人细菌发病机制的一般策略。已经报道了通过ESX-1途径分泌非WXG100底物的几种抗原,包括EspA、EspB、Rv3483c和Rv3615c(Fortune等人,2005;MacGurn等人,2005;McLaughlin等人,2007;Xu等人,2007)。在致病性分枝杆菌中显示出另一种ESX-5途径同时分泌WXG100和非WXG100蛋白(Abdallah等人,2007;Abdallah等人,2006)。

[0155] 金黄色葡萄球菌Ess途径可以被视为一个分泌模块,配备有专门的转运成分(Ess)、辅助因子(Esa)和同源分泌底物(Esx)。EssA、EssB和EssC是EsxA和EsxB分泌所必需的。因为预测EssA、EssB和EssC是跨膜蛋白,所以认为考虑这些蛋白形成分泌组织。ess基因簇中的一些蛋白质可以主动转运分泌的底物(充当马达),而其他蛋白质可能会调节运输(调节剂)。可以实现调节,但不限于分泌多肽的转录或翻译后机制、将特定底物分选到确定位置(例如,细胞外培养基或宿主细胞)或感染期间分泌事件的时间。在这一点上,尚不清楚是否所有分泌的Esx蛋白是否作为毒素的作用或间接促成了发病机制。

[0156] 葡萄球菌依靠表面蛋白介导的对宿主细胞的粘附或对组织的入侵来逃避免疫防御。此外,金黄色葡萄球菌在感染期间利用表面蛋白从宿主中螯合铁。大多数参与葡萄球菌发病机制的表面蛋白携带C端分选信号,即它们通过分选酶共价连接到细胞壁外膜。此外,缺乏表面蛋白锚定所需基因的葡萄球菌菌株,即分选酶A和B,在几种不同的疾病小鼠模型中表现出显著的毒力缺陷。因此,表面蛋白抗原代表了一种经过验证的疫苗靶标,因为相应的基因对于葡萄球菌病的发展是必不可少的,并且可以在本发明的各种实施方案中加以利用。分选酶超家族是革兰氏阳性转肽酶,负责将表面蛋白毒力因子锚定到肽聚糖细胞壁层。已在金黄色葡萄球菌中鉴定出SrtA和SrtB两种分选酶同种型,即。已证明这些酶可以识别底物蛋白中的LPXTG基序。SrtB同种型似乎对血红素铁的获取和铁稳态很重要,而SrtA亚型通过粘附素和其他蛋白质与细胞壁肽聚糖的共价锚定来调节细菌粘附到宿主组织的能力,从而在革兰氏阳性菌的发病机制中起关键作用。在某些实施方案中,本文所述的SpA变体可以与其他葡萄球菌蛋白组合使用,例如Coa、Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsaB、EsxA、EsxB、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、IsdC、SasF、vWbp和/或vWh蛋白。

[0157] 本发明的某些方面包括涉及蛋白质组合物的方法和组合物,包括多肽、肽或编码SpA变体的核酸和其他葡萄球菌抗原,例如通过Ess途径转运的其他蛋白质或分选酶底物。这些蛋白质可以通过删除、插入和/或置换进行修饰。

[0158] Esx多肽包括来自葡萄球菌属细菌的Esx蛋白的氨基酸序列。Esx序列可以来自特定的葡萄球菌属物种,例如金黄色葡萄球菌,并且可以来自特定的菌株,例如Newman。在某些实施方案中,EsxA序列是来自菌株Mu50的SAV0282(其与Newman的氨基酸序列相同)并且可以使用Genbank登录号Q99WU4(gi|68565539)访问,其在此通过引用并入。在其他实施方案中,EsxB序列是来自菌株Mu50的SAV0290(其与Newman的氨基酸序列相同)并且可以使用Genbank登录号Q99WT7(gi|68565532)访问,其在此通过引用并入。在另外的实施方案中,可以使用通过Ess途径转运的其他多肽,其序列可以由本领域技术人员使用数据库和互联网可访问资源来鉴定。

[0159] 分选酶底物多肽包括但不限于来自葡萄球菌属细菌的SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、IsdC或SasF蛋白的氨基酸序列。分选酶底物多肽序列可以来自特定的葡萄球菌属物种,例如金黄色葡萄球菌,并且可以来自特定的菌株,例如Newman。在某些实施方案中,SdrD序列来自菌株N315并且可以使用Genbank登录号NP\_373773.1(gi|15926240)访问,其通过引用并入。在其他实施方案中,SdrE序列来自菌株N315并且可以使用Genbank登录号NP\_373774.1(gi|15926241)访问,其通过引用并入。在其他实施方案中,IsdA序列来自菌株Mu50的SAV1130(其与Newman的氨基酸序列相同)并且可以使用Genbank登录号NP\_371654.1(gi|15924120)访问,其通过引用并入。在其他实施方案中,IsdB序列来自菌株Mu50的SAV1129(其与Newman的氨基酸序列相同)并且可以使用Genbank登录号NP\_371653.1(gi|15924119)访问,该登录号以引用方式并入。在另外的实施方案中,可以使用由Ess途径转运或由分选酶加工的其他多肽,其序列可由本领域技术人员使用数据库和互联网可访问资源来鉴定。

[0160] 可以在本发明的上下文中使用的各种蛋白质的实施例可以通过分析细菌基因组的数据库提交来鉴别,包括但不限于登录号NC\_002951(GI:57650036和GenBank CP000046)、NC\_002758(GI:57634611和GenBank BA000017)、NC\_002745(GI:29165615和GenBank BA000018)、NC\_003923(GI:21281729和GenBank BA000033)、NC\_002952(GI:49482253和GenBank BX571856)、NC\_002953(GI:49484912和GenBank BX571857)、NC\_007793(GI:87125858和GenBank CP000255)、NC\_007795(GI:87201381和GenBank CP000253),每一个都通过引用并入。

[0161] 如本文所用,“蛋白质”或“多肽”指的是包含至少十个氨基酸残基的分子。在某些实施方案中,使用蛋白质或多肽的野生型形式,然而,在本发明的许多实施方案中,使用修饰的蛋白质或多肽来产生免疫应答。上述术语可以互换使用。“修饰的蛋白质”或“修饰的多肽”或“变体”是指化学结构,特别是其氨基酸序列相对于野生型蛋白质或多肽发生改变的蛋白质或多肽。在某些实施方案中,修饰的/变体的蛋白质或多肽具有至少一种修饰的活性或功能(认识到蛋白质或多肽可具有多种活性或功能)。特别考虑修饰的/变体的蛋白质或多肽可以在一种活性或功能方面改变,而在其他方面如免疫原性保留野生型活性或功能。

[0162] 在某些实施方案中,蛋白质或多肽(野生型或修饰型)的大小可以包括但不限于5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66

个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、210个、220个、230个、240个、250个、275个、300个、325个、350个、375个、400个、425个、450个、475个、500个、525个、550个、575个、600个、625个、650个、675个、700个、725个、750个、775个、800个、825个、850个、875个、900个、925个、950个、975个、1000个、1100个、1200个、1300个、1400个、1500个、1750个、2000个、2250个、2500个氨基分子或大于2500个氨基分子,和其可推出的任何范围,或本文所述或参考的相应氨基序列的衍生物。考虑到考虑多肽可以通过截断来突变,使它们比其相应的野生型形式更短,但也可以通过融合或缀合具有特定功能(例如,用于靶向或定位、用于增强免疫原性、用于纯化目的等)异体蛋白序列而改变。

[0163] 如本文所用,“氨基分子”是指本领域已知的任何氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物。在某些实施方案中,蛋白质分子的残基是连续的,没有任何非氨基分子打断氨基分子残基的序列。在其他实施方案中,该序列可包含一个或多个非氨基分子部分。在特定实施方案中,蛋白质分子的残基序列可以被一个或多个非氨基分子部分中断。

[0164] 因此,术语“蛋白质组合物”包括氨基分子序列,该氨基分子序列包含至少一种20种常见氨基酸或至少一种修饰或不常见的氨基酸的天然合成蛋白质。

[0165] 蛋白质组合物可以通过本领域技术人员已知的任何技术制备,包括(i)通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,(ii)从天然来源分离蛋白质化合物,或(iii)蛋白质材料的化学合成。目前已经公开了核苷酸以及蛋白质、多肽和不同基因的肽序列,并且可以在公认的计算机数据库中找到。一个这样的数据库是国家生物技术信息中心的Genbank和GenPept数据库(在万维网上的ncbi.nlm.nih.gov/)。可以使用本文公开的或本领域普通技术人员已知的技术扩增和/或表达这些基因的编码区。

[0166] 本发明的SpA、凝固酶和其他多肽的氨基酸序列变体可以是置换型变体、插入型变体或缺失型变体。与野生型相比,本发明多肽的变体可影响1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或多于50个多肽的非连续或连续氨基酸。变体可包含与本文提供或引用的任何序列相同至少50%、60%、70%、80%或90%的氨基酸序列,例如,SEQ ID NO:2-8或SEQ ID NO:11-30,(包括其间的所有值和范围),变体可包括2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或多于20个置换氨基酸。考虑用本文所述的组合物和方法由Ess途径加工或分泌的多肽或其他表面蛋白(见表1)或来自任何葡萄球菌属物种和菌株的分选酶底物。

[0167] 缺失变体通常缺少一个或多个天然或野生型蛋白质残基。可以删除单个残基或删除许多连续的氨基酸。可以将终止密码子引入(通过置换或插入)编码核酸序列中以产生截短的蛋白质。插入突变体通常涉及在多肽的非末端添加物质。这可以包括插入一个或多个残基。也可以产生称为融合蛋白的末端添加物。这些融合蛋白包括本文描述或提及的一种或多个肽或多肽的多聚体或多联体。

[0168] 置换变体通常包含在蛋白质内的一个或多个位点处一种氨基酸与另一种氨基酸的交换,并且可以被设计成调节多肽的一种或多种特性,其他功能或特性保留或损失。置换可以是保守的,即一个氨基酸被具有相似形状和电荷的氨基酸置换。保守置换是本领域众所周知的,包括例如以下变化:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸到谷氨酸;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酰胺到天冬酰胺;谷氨酸到天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;蛋氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;和缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者置换可以是非保守的,从而影响多肽的功能或活性。非保守性改变通常涉及用化学上性质不同的残基置换残基,例如用极性或带电氨基酸代替非极性或不带电氨基酸,反之亦然。

[0169] 表10 金黄色葡萄球菌菌株的示例性表面蛋白。

[0170]

SAV#	SA#	表面蛋白	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0111	SA0107	Spa	492	450	450	520	516	492
SAV2503	SA2291	FnBPA	1015	1038	1038	741	-	1015
SAV2502	SA2290	FnBPB	943	961	961	677	965	957
SAV0811	SA0742	ClfA	946	935	989	933	1029	928
SAV2630	SA2423	ClfB	907	877	877	913	873	905
Np	Np	Cna	1183	-	-	-	1183	1183
SAV0561	SA0519	SdrC	955	953	953	947	906	957
SAV0562	SA0520	SdrD	1347	1385	1385	1315	-	1365
SAV0563	SA0521	SdrE	1141	1141	1141	1166	1137	1141
Np	Np	Pls	-	-	-	-	-	-
SAV2654	SA2447	SasA	2275	2271	2271	2271	1351	2275
SAV2160	SA1964	SasB	686	2481	2481	2481	2222	685
	SA1577	SasC	2186	213	2186	2186	2189	2186
SAV0134	SA0129	SasD	241	241	241	241	221	241
SAV1130	SA0977	SasE/IsdA	350	350	350	350	354	350
SAV2646	SA2439	SasF	635	635	635	635	627	635
SAV2496		SasG	1371	525	927	-	-	1371
SAV0023	SA0022	SasH	772	-	772	772	786	786
SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	-	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

[0171] 本发明的蛋白质可以是重组的或体外合成的。或者,可以从细菌中分离非重组或重组蛋白质。还考虑可以在本发明的组合物和方法中实施含有这种变体的细菌。因此,不需要分离蛋白质。

[0172] 在本所使用的术语“功能等效密码子”涉及编码相同氨基酸的密码子,例如精氨酸或丝氨酸的六个密码子,并且还指编码生物学等效氨基酸的密码子(参见下表11)。

[0173] 表11 密码子表

氨基酸	密码子
丙氨酸	Ala A GCA GCC GCG GCU
半胱氨酸	Cys C UGC UGU
天冬氨酸	Asp D GAC GAU
谷氨酸	Glu E GAA GAG
苯丙氨酸	Phe F UUC UUU
甘氨酸	Gly G GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His H CAC CAU
异亮氨酸	Ile I AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys K AAA AAG
亮氨酸	Leu L UUA UUG CUA CUC CUG CUU
蛋氨酸	Met M AUG
天冬酰胺	Asn N AAC AAU
脯氨酸	Pro P CCA CCC CCG CCU
谷氨酰胺	Gln Q CAA CAG
精氨酸	Arg R AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser S AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr T ACA ACC ACG ACU
缬氨酸	Val V GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp W UGG
酪氨酸	Tyr Y UAC UAU

[0174] 还应理解,氨基酸和核酸序列可包括其他的残基,例如其他的N端或C端氨基酸,或分别为5'或3'序列,但仍基本上如以下之一所列这里所公开的序列,只要该序列满足上述标准,包括蛋白质表达所涉及的生物蛋白质活性(例如,免疫原性)的维持。末端序列的添加特别适用于核酸序列,例如,其可以包括位于编码区5'或3'两侧的各种非编码序列。

[0175] 以下是基于改变蛋白质的氨基酸以产生变体多肽或肽的讨论。例如,某些氨基酸可以置换蛋白质结构中的其他氨基酸,无论是否明显丧失与结构的相互结合能力,例如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了该蛋白质的功能活性,因此可以在蛋白质序列及其潜在的DNA编码序列中进行某些氨基酸置换,但仍会产生具有所需特性的蛋白质。因此,本发明人考虑可以在基因的DNA序列中进行各种改变。

[0176] 考虑在本发明的组合物中,每m升有约0.001mg至约10mg的总多肽、肽和/或蛋白质。组合物中蛋白质的浓度可以约为、至少约为或至多约为0.001mg/mL、0.010mg/mL、0.050mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3.0mg/mL、3.5mg/mL、4.0mg/mL、4.5mg/mL、5.0mg/mL、5.5mg/mL、6.0mg/mL、6.5mg/mL、7.0mg/mL、7.5mg/mL、8.0mg/mL、8.5mg/mL、9.0mg/mL、9.5mg/mL、10.0mg/mL或多于10.0mg/mL(或其可推导出的任何范围)。其中,约为、至少约为或至多约为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%可以是SpA变体或凝固酶,并且可以与其他肽或多肽(例如其他细菌肽和/或抗原)组合使用。

[0178] 本发明考虑施用变体SpA多肽或肽以实现针对与葡萄球菌病原体感染相关的疾病或病症的发展的预防疗法或治疗效果。

[0179] 在某些方面,葡萄球菌抗原的组合用于生产有效治疗或预防葡萄球菌感染的免疫原性组合物。葡萄球菌感染经历了几个不同的阶段。例如,葡萄球菌生命周期涉及共生定植、通过接触近邻组织或血流和/或血液中的厌氧繁殖引发感染。金黄色葡萄球菌毒力决定因素与宿主防御机制之间的相互作用可诱发心内膜炎、转移性脓肿形成和败血症综合征等并发症。细菌表面的不同分子参与感染周期的不同步骤。某些抗原的组合可以引发免疫应答,从而防止葡萄球菌感染的多个阶段。免疫应答的有效性可以在动物模型试验中和/或使用调理吞噬试验来检测。

[0180] K. 多肽和多肽的制备

[0181] 本发明描述了用于本发明的各种实施方案中的多肽、肽和蛋白质及其免疫原性片段。例如,特定多肽被测定或用于引发免疫应答。在特定的实施方案中,本发明的全部或部分蛋白质也可以根据常规技术在溶液中或在固体载体上合成。各种自动合成器是可商购的并且可以根据已知方法使用。例如,参见Stewart和Young(1984);Tam等人,(1983);Merrifield(1986);和Barany和Merrifield(1979),每个都通过引用并入本文。

[0182] 或者,可以使用重组DNA技术,其中将编码本发明肽的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中并在适合表达的条件下培养。

[0183] 本发明的一个实施方案包括将基因转移至细胞,包括微生物,以产生和/或呈递多肽或肽。可以将感兴趣的多肽或肽的基因转移到合适的宿主细胞中,然后在合适的条件下培养细胞。重组表达载体的制备以及其中包含的元件是本领域公知的并且在此简要讨论。或者,待制备的蛋白质可以是通常由分离和纯化的细胞合成的内源蛋白质。

[0184] 本发明的另一个实施方案使用自体B淋巴细胞细胞系,该细胞系被表达免疫原产品的病毒载体转染更特定地,表达具有免疫原活性的蛋白质。哺乳动物宿主细胞系的其他实例包括但不限于Vero和HeLa细胞、其他B和T细胞系,例如CEM、721.221、H9、Jurkat、Raji以及中国仓鼠卵巢细胞系、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、3T3、RIN和MDCK细胞。此外,可选择调节插入序列表达或以所需方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可以是重要的。不同的宿主细胞对于蛋白质的翻译后加工和修饰具有特征性和特异性的机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保表达的外源蛋白质的正确修饰和加工。

[0185] 可以使用多种选择系统,包括但不限于分别在tk-、hgprt-或aprt-细胞中的HSV胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因。此外,抗代谢物抗性可作为选择的基础:对于dhfr,它赋予对甲氧苄氨嘧啶和甲氨蝶呤的抗性;gpt,赋予对霉酚酸的抗性;neo,赋予对氨基糖苷G418的抗性;和hygro,它赋予对潮霉素的抗性。

[0186] 动物细胞可以通过两种方式在体外繁殖:作为在整个培养物中悬浮生长的非依赖性锚定细胞,或作为需要附着在固体基质上进行繁殖的依赖性锚定细胞(即单层细胞生长类型)。

[0187] 来自连续建立的细胞系的非锚定依赖性或非悬浮培养是大规模生产细胞和细胞产

品的最广泛使用的手段。然而,悬浮培养的细胞有其局限性,例如潜在的致瘤性和比贴壁细胞低的蛋白质产量。

[0188] 在本文特定提及蛋白质的情况下,优选提及天然或重组蛋白质或任选地其中任何信号序列已被除去的蛋白质。蛋白质可直接从葡萄球菌菌株中分离或通过重组DNA技术产生。蛋白质的免疫原性片段可以掺入本发明的免疫原性组合物中。这些是从蛋白质的氨基酸序列连续获取的包含至少10个氨基酸、20个氨基酸、30个氨基酸、40个氨基酸、50个氨基酸或100个氨基酸(包括其间的所有值和范围)的片段。此外,此类免疫原性片段与针对葡萄球菌蛋白产生的抗体或与由葡萄球菌感染哺乳动物宿主产生的抗体具有免疫应答性。免疫原性片段还包括当以有效剂量(单独存在或作为与载体结合的半抗原)施用,引发针对葡萄球菌感染的保护性或治疗性免疫应答,在某些方面,它能够预防金黄色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌感染。这种免疫原性片段可以包括,例如,缺乏N末端前导序列和/或跨膜结构域和/或C末端锚定结构域的蛋白质。在优选的方面,根据本发明的免疫原性片段基本上包含与本文描述或引用的多肽的序列选择片段具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或至少97%至99%同一性(包括它们之间的所有值和范围)的蛋白质的所有胞外结构域。

[0189] 本发明的免疫原性组合物中还包括由一种或多种葡萄球菌蛋白或葡萄球菌蛋白的免疫原性片段组成的融合蛋白。此类融合蛋白可以重组制备并且可以包含至少1种、2种、3种、4种、5种或6种葡萄球菌蛋白或片段的一部分。或者,融合蛋白可包含至少1种、2种、3种、4种或5种葡萄球菌蛋白的多个部分。这些可以结合不同的葡萄球菌蛋白质和/或相同蛋白质或蛋白质片段的多个,或相同蛋白质中的免疫原性片段(形成多聚体或多联体)。或者,本发明还包括葡萄球菌蛋白或其免疫原性片段的个体融合蛋白,作为具有异源序列的融合蛋白,例如T细胞表位或纯化标签的提供者,例如: $\beta$ -半乳糖苷酶、谷胱甘肽-S-转移酶、绿色荧光蛋白(GFP)、表位标签如FLAG、myc标签、多组氨酸,或病毒表面蛋白如流感病毒血凝素,或细菌蛋白如破伤风类毒素、白喉类毒素,或CRM197。

#### [0190] II. 核酸

[0191] 在某些实施方案中,本发明涉及编码本发明的蛋白质、多肽、肽的重组多核苷酸。包括SpA、凝固酶和其他细菌蛋白质的核酸序列,所有这些都通过引用并入本文,并可用于制备肽或多肽。

[0192] 如在本申请中使用的,术语“多核苷酸”是指重组的或已经分离出不含总基因组核酸的核酸分子。术语“多核苷酸”包括寡核苷酸(长度小于或等于100个残基的核酸)、重组载体(,包括例如质粒、粘粒、噬菌体、病毒等)。在某些方面,多核苷酸包括与其天然存在的基因或蛋白质编码序列基本上分离的调节序列。多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链,并且可以是RNA、DNA(基因组、cDNA或合成的)、其类似物或其组合。其他的编码或非编码序列可以但不一定在于多核苷酸中。

[0193] 在这方面,术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用于指编码蛋白质、多肽或肽(包括正确转录、翻译后修饰、或局域化)的核酸。如本领域技术人员将理解的,该术语包括基因组序列、表达组件、cDNA序列和表达或可能适于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体的较小的工程化核酸片段。编码全部或部分多肽的核酸可包含以下连续核酸序列:编码本文描述或提及的一种或多种氨基酸序列的多核苷酸的10种、20种、30种、40种、50

种、60种、70种、80种、90种、100种、110种、120种、130种、140种、150种、160种、170种、180种、190种、200种、210种、220种、230种、240种、250种、260种、270种、280种、290种、300种、310种、320种、330种、340种、350种、360种、370种、380种、390种、400种、410种、420种、430种、440种、441种、450种、460种、470种、480种、490种、500种、510种、520种、530种、540种、550种、560种、570种、580种、590种、600种、610种、620种、630种、640种、650种、660种、670种、680种、690种、700种、710种、720种、730种、740种、750种、760种、770种、780种、790种、800种、810种、820种、830种、840种、850种、860种、870种、880种、890种、900种、910种、920种、930种、940种、950种、960种、970种、980种、990种、1000种、1010种、1020种、1030种、1040种、1050种、1060种、1070种、1080种、1090种、1095种、1100种、1500种、2000种、2500种、3000种、3500种、4000种、4500种、5000种、5500种、6000种、6500种、7000种、7500种、8000种、9000种、10000种或多于10000种核苷酸、核苷或碱基对,包括其间的所有值和范围。还考虑特定多肽可以由含有变体的核酸进行编码,所述变体具有略微不同的核酸序列,但仍然编码相同或基本相似的蛋白质(见上表11)

[0194] 在特定实施方案中,本发明涉及分离的核酸片段和掺入编码变体SpA或凝固酶的核酸序列的重组载体。术语“重组”可以与多核苷酸或多肽结合使用,并且通常是指体外产生和/或操作的多肽或多核苷酸,或者是这种分子的复制产物。

[0195] 在其他实施方案中,本发明涉及分离的核酸片段和包含编码变体SpA或凝固酶多肽或肽以在受试者中产生免疫应答的核酸序列的重组载体。在各种实施方案中,本发明的核酸可用于基因疫苗。

[0196] 本发明中使用的核酸片段可以与其他核酸序列组合,例如启动子、聚腺苷酸化信号、附加的限制性酶切位点、多克隆位点、其他编码片段等,这样它们的总长度可以有很大的不同。因此考虑可以使用几乎任何长度的核酸片段,总长度优选地受在考虑的重组核酸方案中制备和使用的容易程度的限制。在某些情况下,核酸序列可以编码具有附加异源编码序列的多肽序列,例如从而允许多肽的纯化、转运、分泌、翻译后修饰,或用于治疗益处(例如靶向性或有效性)。如上所述,可以向修饰的多肽编码序列添加标签或其他异源多肽,其中“异源”是指与修饰的多肽不同的多肽。

[0197] 在某些其他实施方案中,本发明涉及分离的核酸片段和重组载体,其在其序列中包括来自SEQ ID NO:2(SpA结构域D)或SEQ ID NO:4(SpA)或编码凝固酶或其他分泌的毒力因子和/或表面蛋白的任何其它的核苷酸序列,包括由Ess途径转运的蛋白质、由分选酶加工的蛋白质,或通过引用并入本文的蛋白质。

[0198] 在某些实施方案中,本发明提供与本文公开的序列具有基本同一性的多核苷酸变体;与使用本文所述方法的本发明的多核苷酸序列相比(例如,使用标准参数的BLAST分析),包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的序列,包括它们之间的所有值和范围。

[0199] 本发明还考虑使用与所有上述多核苷酸互补的多核苷酸。

[0200] A. 载体

[0201] 本发明的多肽可由包含在载体中的核酸分子编码。术语“载体”用于指载体核酸分子,它可以将异源核酸序列插入到细胞中进行复制和表达。核酸序列可以是“异源的”,这意味着它在引入载体的细胞或掺入其中的核酸的环境中是外来的,其中包括与细胞中的序列

同源的序列或核酸,而是在宿主细胞或核酸内的一个通常不被发现的位置。载体包括DNA、RNA、质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC)。本领域技术人员将具备通过标准重组技术构建载体的能力(例如Sambrook等人,2001;Ausubel等人,1996,均通过引用并入本文)。除了编码变体SpA多肽之外,载体还可以编码其他多肽序列,例如一种或多于一种其他细菌肽、标签或免疫原性增强肽。编码此类融合蛋白的有用载体包括pIN载体(Inouye等人,1985)、编码一系列组氨酸的载体以及pGEX载体,用于产生谷胱甘肽S-转移酶(GST)可溶性融合蛋白,用于后期纯化和分离或切割。

[0202] 术语“表达载体”是指含有可对至少部分能够转录的基因产物进行编码的核酸序列的载体。在某些情况下,RNA分子随后被翻译成蛋白质、多肽或肽。表达载体可包含多种“控制序列”,其指特定宿主生物中可操作连接的编码序列的转录和可能的翻译所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列之外,载体和表达载体还可以包含具有其他功能并在本文中描述的核酸序列。

[0203] 1. 启动子和增强子

[0204] “启动子”是一个控制序列。启动子通常是核酸序列中控制起始转录和转录速率的区域。它可以包含调节蛋白和分子可以结合的遗传元件,例如RNA聚合酶和其他转录因子。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“在控制下”和“在转录控制下”是指启动子相对于核酸序列处于正确的功能位置和/或方向以控制该序列的转录起始和表达。启动子可以与“增强子”一起使用,也可以不与“增强子”一起使用,“增强子”是指参与核酸序列转录激活的顺式作用调控序列。

[0205] 当然,使用有效指导DNA片段在选择表达的细胞类型或生物体中表达的启动子和/或增强子可以是重要的。分子生物学领域的技术人员通常知道启动子、增强子和细胞类型组合用于蛋白质表达的用途(参见Sambrook等人,2001,通过引用并入本文)。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的或诱导型的,并且在某些实施方案中可以指导引入的DNA片段在特定条件下的高水平表达,例如重组蛋白或肽的大规模生产。

[0206] 在本发明的上下文中可以使用各种元件/启动子来调节基因的表达。此类诱导元件的实例是可响应特定刺激而被激活的核酸序列区域,包括但不限于免疫球蛋白重链(Banerji等人,1983;Gilles等人,1983;Grosschedl等人,1985;Atchinson等人,1986,1987;ImLer等人,1987;Weinberger等人,1984;Kiledjian等人,1988;Porton等人,1990),免疫球蛋白轻链(Queen等人,1983;Picard等人,1984),T细胞受体(Luria等人,1987;Winoto等人,1989;Redondo等人,1990),HLA-DQ $\alpha$ 和/或DQ $\beta$ (Sullivan等人,1987), $\beta$ 干扰素(Goodbourn等人,1986;Fujita等人,1987;Goodbourn等人,1988),白细胞介素-2(Greene等人,1989),白细胞介素-2受体(Greene等人,1989;Lin等人,1990),MHC II类5(Koch等人,1989),MHC II类HLA-DR $\alpha$ (Sherman等人,1989), $\beta$ -肌动蛋白(Kawamoto等人,1988;Ng等人,1989),肌肉肌酸激酶(MCK)(Jaynes等人,1988;Horlick等人,1989;Johnson等人,1989),前白蛋白(甲状腺素运载蛋白)(Costa等人,1988),弹性蛋白酶I(Ornitz等人,1987),金属硫蛋白(MTII)(Karin等人,1987;Culotta等人,1989),胶原酶(Pinkert等人,1987;Angel等人,1987),白蛋白(Pinkert等人,1987;Tronche等人,1989,1990), $\alpha$ -胎蛋白(Godbout等人,1988;Campere等人,1989), $\gamma$ -珠蛋白(Bodine等人,1987;Perez-Stable等人,1990), $\beta$ -珠蛋白(Trudel等人,1987),原癌基因(Cohen等人,1987),癌基因(Triesman,1986;Deschamps等

人,1985),胰岛素(Edlund等人,1985),神经细胞粘附分子(NCAM)(Hirsh等人,1990), $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶(Latimer等人,1990),H2B (TH2B) 组蛋白(Hwang等人,1990),小鼠和/或I型胶原蛋白(Ripe等人,1989),葡萄糖调节蛋白(GRP94和GRP78)(Chang等人,1989),大鼠生长激素(Larsen等人,1986),人血清淀粉样蛋白A(SAA)(Edbrooke等人,1989),肌钙蛋白I(TN I)(Yutzey等人,1989),血小板源生长因子(PDGF)(Pech等人,1989),杜氏肌营养不良症(Klamut等人,1990),猿猴空泡病毒40(Banerji等人,1981;Moreau等人,1981;Sleigh等人,1985;Firak等人,1986;Herr等人,1986;Imbra等人,1986;Kadesch等人,1986);Wang等人,1986;Ondek等人,1987;Kuhl等人,1987;Schaffner等人,1988),多瘤病毒(Swartzendruber等人,1975;Vasseur等人,1980;Katinka等人,1980,1981;Tyndell等人,1981;Dandolo等人,1983;de Villiers等人,1984;Hen等人,1986;Satake等人,1988;Campbell等人,1988),逆转录酶病毒(Kriegler等人,1982,1983;Levinson等人,1982;Kriegler等人,1983,1984a,b,1988;Bosze等人,1986;Miksicek等人,1986;Celander等人,1987;Thiesen等人,1988;Celander等人,1988;Choi等人,1988;Reisman等人,1989),乳头瘤病毒(Campo等人,1983;Lusky等人,1983;Spandidos和Wilkie,1983;Spalholz等人,1985;Lusky等人,1986;Cripe等人,1987;Gloss等人,1987);Hirochika等人,1987;Stephens等人,1987);乙型肝炎病毒(Bulla等人,1986;Jameel等人,1986;Shaul等人,1987;Spandau等人,1988;Vannice等人,1988);人免疫缺陷病毒(Muesing等人,1987;Hauber等人,1988;Jakobovits等人,1988;Feng等人,1988;Takebe等人,1988;Rosen等人,1988;Berkhout 1989;Laspia等人,1989;Sharp等人,1989;Braddock等人,1989);巨细胞病毒(CMV) IE(Weber等人,1984;Boshart等人,1985;Foecking等人,1986);长臂猿白血病病毒(Holbrook等人,1987;Quinn等人,1989)。

[0207] 诱导因子包括但不限于MT II-佛波酯(TFA)/重金属(Palmiter等人,1982;Haslinger等人,1985;Searle等人,1985;Stuart等人,1985;Imagawa等人,1987,Karin等人,1987;Angel等人,1987b;McNeall等人,1989);MMTV(小鼠乳腺肿瘤病毒)-糖皮质激素(Huang等人,1981;Lee等人,1981;Majors等人,1983;Chandler等人,1983;Lee等人,1984;Ponta等人,1985;Sakai等人,1988); $\beta$ --干扰素-聚(rI)x/聚(rc)(Tavernier等人,1983);腺病毒5E2-E1A(Imperiale等人,1984);胶原酶-佛波尔酯(TPA)(Angel等人,1987a);丝裂素佛波酯(TPA)(Angel等人,1987b);猿猴空泡病毒40-佛波酯(TPA)(Angel等人,1987b);小鼠MX基因-干扰素,新城疫病毒(Hug等人,1988);GRP78基因-A23187(Resendez等人,1988) $\alpha$ --2-巨球蛋白-IL-6(Kunz等人,1989);波形蛋白-血清(Rittling等人,1989);MHC I类基因H-2 b-干扰素(Blanar等人,1989);HSP70-E1A/SV40大T抗原(Taylor等人,1989、1990a、1990b);增殖素-佛波酯/TPA(Mordacq等人,1989);肿瘤坏死因子-PMA(Hensel等人,1989);和促甲状腺激素 $\alpha$ 基因-甲状腺激素(Chatterjee等人,1989)。

[0208] 认为用于控制编码本发明的肽或蛋白质的多核苷酸的表达的特定启动子不是关键的,它能够在目标细胞中表达多核苷酸,优选细菌细胞中表达多核苷酸。当靶向人细胞时,优选将多核苷酸编码区置于能够在人细胞中表达的启动子附近并受其控制。通常来说,此类启动子可以包括细菌、人或病毒启动子。

[0209] 在向对象施用载体以表达蛋白质的实施方案中,考虑与载体一起使用的理想启动子是不被细胞因子下调的启动子或即使被下调但足够强的启动子,它会产生有效量的变体

SpA以引发免疫应答。这些非限制性实施例是CMV IE和RSV LTR。可以使用组织特异性启动子,特别是当表达是在需要抗原表达的细胞中时,例如树突细胞或巨噬细胞。哺乳动物MHC I和MHC II启动子是此类组织特异性启动子的实施例。

[0210] 2. 起始信号和内部核糖体结合位点 (IRES)

[0211] 编码序列的有效翻译也可以需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可以需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域的普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。

[0212] 在本发明的某些实施方案中,使用内部核糖体进入位点 (IRES) 元件来产生多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5' 甲基化Cap依赖翻译的核糖体扫描模型,并在内部位点开始翻译 (Pelletier和Sonenberg, 1988; Macejak和Sarnow, 1991)。IRES元件可以连接到异源的开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录,每个阅读框由一个IRES分隔,创建多顺反子信息。使用单个启动子/增强子转录单个信息可以有效表达多个基因 (参见美国专利5925565和5935819,通过引用并入本文)。

[0213] 3. 可选择和可筛选的标记

[0214] 在本发明的某些实施方案中,可以通过在表达载体中编码筛选的或可选择的标记在体外或体内鉴定含有本发明核酸构建体的细胞。当转录和翻译时,标记赋予细胞可识别的变化,允许轻松识别含有表达载体的细胞。通常,可选择的标记是赋予允许选择的特性的标记。正选择标记是其中标记的存在允许其选择的标记,而负选择标记是其中其存在阻止其选择的标记。阳性选择标记的一个实施例是抗药性标记。

[0215] B. 宿主细胞

[0216] 如本文所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语还包括它们的后代,即任何和所有后代。可以理解的是,由于有意或无意的突变,所有后代可能不相同。在表达异源核酸序列的上下文中,“宿主细胞”是指原核或真核细胞,包括任何能够复制载体或表达被载体编码的异源基因的可转化生物。宿主细胞可以并且已经被用作载体或病毒的受体。宿主细胞可以被“转染”或“转化”,这是指外源核酸,(例如重组蛋白编码序列,)被转移或引入宿主细胞的过程。转化细胞包括原代对象细胞及其后代。

[0217] 宿主细胞可以源自原核生物或真核生物,包括细菌、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞,用于载体的复制或部分或全部核酸序列的表达。许多细胞系和培养物可用作宿主细胞,它们可以通过美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得,该组织作为活培养物和遗传材料的档案馆 ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))。

[0218] C. 表达系统

[0219] 存在多种包含至少部分或全部上述组合物的表达系统。可以使用基于原核生物和/或基于真核生物的系统与本发明一起使用以产生核酸序列,或者它们的同源多肽、蛋白质和肽。在商业上广泛使用许多这样的系统。

[0220] 昆虫细胞/杆状病毒系统可以产生高水平的异源核酸片段的蛋白质表达,例如在美国专利5871986、4879236中描述的,两者均通过引用并入本文,并且可从INVITROGEN®和BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM FROM CLONTECH®以MAXBAC®2.0的名称购买。

[0221] 除了本发明公开的表达系统之外,表达系统的其他实施例包括STRATAGENE®

的COMPLETE CONTROL诱导型哺乳动物表达系统,它涉及合成的蜕皮激素诱导型受体,或其pET表达系统,即一种大肠杆菌表达系统。诱导型表达系统的另一个实施例可从INVITROGEN®获得,它携带T-REXTM(四环素调节表达)系统,这是一种使用全长CMV启动子的诱导型哺乳动物表达系统。INVITROGEN®还提供了一种称为甲醇毕赤酵母表达系统的酵母表达系统,该系统专为在甲基营养型酵母毕赤酵母中高水平生产重组蛋白而设计。其中一个本领域技术人员应该知道的如何表达载体,例如表达构建体,以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0222] III. 多糖

[0223] 本发明的免疫原性组合物还可以包含荚膜多糖,包括一种或多于一种PIA(也称为PNAG)和/或金黄色葡萄球菌V型和/或VIII型荚膜多糖和/或表皮葡萄球菌I型和/或II型和/或III型荚膜多糖中。

[0224] A. PIA (PNAG)

[0225] 现在很清楚,被鉴定为PS/A、PIA和SAA的各种形式的葡萄球菌表面多糖是相同的化学实体-PNAG(Maira-Litran等人,2004)。因此,术语PIA或PNAG包括所有这些多糖或由它们衍生的寡糖。

[0226] PIA是一种多糖细胞间粘附素,由N-乙酰基和O-琥珀酰成分取代的 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-连接的葡萄糖胺聚合物组成。这种多糖存在于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中,可以从任一来源中分离出来(Joyce等人,2003;Maira-Litran等人,2002)。例如,PNAG可以从金黄色葡萄球菌菌株MN8m(WO04/43407)中分离出来。从表皮葡萄球菌中分离的PIA是生物膜的组成部分。它负责介导细胞间粘附,并且还可以起到保护生长集落免受宿主免疫应答的作用。以前称为聚-N-琥珀酰- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖胺(PNSG)的多糖最近被证明不具有预期的结构,因为N-琥珀酰化的鉴定是不正确的(Maira-Litran等人,2002)。因此,正式名称为PNSG且现在发现为PNAG的多糖也包含在术语PIA中。

[0227] PIA(或PNAG)的大小可以不同,从大于400kDa到75kDa至400kDa之间,到10kDa至75kDa之间到由多达30个重复单元组成的低聚糖( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)连接的氨基葡萄糖被N-乙酰基和O-琥珀酰成分置换)。任何大小的PIA多糖或寡糖均可以用于本发明的免疫原性组合物中,一方面,多糖大于40kDa。可通过本领域已知的任何方法调整大小,例如通过微流化、超声辐射或通过化学裂解(WO 03/53462、EP497524、EP497525)。在某些方面,PIA(PNAG)为最少或最多40kDa至400kDa、40kDa至300kDa、50kDa至350kDa、60kDa至300kDa、50kDa至250kDa和60kDa至200kDa。

[0228] PIA(PNAG)由于氨基被乙酸酯取代,而发生不同程度的乙酰化。体外产生的PIA几乎完全被氨基取代(95%至100%)。或者,可以使用乙酰化小于60%、50%、40%、30%、20%、10%的脱乙酰化PIA(PNAG)。优选地使用脱乙酰化的PIA(PNAG),因为PNAG的非乙酰化表位在介导对革兰氏阳性菌、优选金黄色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌的调理性杀伤方面是有效的。在某些方面,PIA(PNAG)的大小在40kDa和300kDa之间,并且被脱乙酰化使得少于60%、50%、40%、30%或20%的氨基被乙酰化。

[0229] 术语脱乙酰化的PNAG(dPNAG)是指氨基被乙酰化程度少于60%、50%、40%、30%、20%或10%的PNAG多糖或寡糖。在某些方面,通过化学处理天然多糖,PNAG被脱乙酰化以形成dPNAG。例如,天然PNAG用碱性溶液处理,使pH值升至10以上。例如PNAG用0.1M至5M、0.2M

至4M、0.3M至3M、0.5M至2M、0.75M至1.5M或1M的NaOH、KOH或NH<sub>4</sub>OH处理。在20℃至100℃、25℃至80℃、30℃至60℃或30℃至50℃或35℃至45℃的温度下处理至少10分钟至30分钟、或1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、10小时、15小时或20小时。可按照WO 04/43405中的说明制备dPNAG。

[0230] 多糖可以偶联载体蛋白或未偶联载体蛋白。

[0231] B. 来自金黄色葡萄球菌的5型和8型多糖

[0232] 大多数引起人感染的金黄色葡萄球菌菌株含有5型或8型多糖。大约60%的人菌株是8型,大约30%是5型。Moreau等人(1990)和Fournier等人(1984)描述了5型和8型荚膜多糖抗原的结构。两者都在其重复单元中具有FucNAc以及可用于引入巯基的ManNAcA。这些结构是:

[0233] 类型5

[0234]  $\rightarrow 4) -\beta\text{-D-ManNAcA}(30\text{Ac}) - (1\rightarrow 4) -\alpha\text{-L-FucNAc}(1\rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc} - (1\rightarrow$

[0235] 类型8

[0236]  $\rightarrow 3) -\beta\text{-D-ManNAcA}(40\text{Ac}) - (1\rightarrow 3) -\alpha\text{-L-FucNAc}(1\rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc} - (1\rightarrow$

[0237] 最近(Jones, 2005)NMR光谱将结构修改为:

[0238] 类型5

[0239]  $\rightarrow 4) -\beta\text{-D-ManNAcA} - (1\rightarrow 4) -\alpha\text{-L-FucNAc}(30\text{Ac}) - (1\rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc} - (1\rightarrow$

[0240] 类型8

[0241]  $\rightarrow 3) -\beta\text{-D-ManNAcA}(40\text{Ac}) - (1\rightarrow 3) -\alpha\text{-L-FucNAc}(1\rightarrow 3) -\alpha\text{-D-FucNAc}(1\rightarrow$

[0242] 可以使用本领域技术人员熟知的方法从适当的金黄色葡萄球菌菌株中提取多糖,参见美国专利6294177。例如,ATCC 12902是5型金黄色葡萄球菌菌株,而ATCC 12605是8型金黄色葡萄球菌菌株。

[0243] 多糖具有天然大小,或者可以例如通过微流化、超声辐射或通过化学处理进行大小调整。本发明还涵盖源自金黄色葡萄球菌的5型和8型多糖的寡糖。本发明的免疫原性组合物中包含的5型和8型多糖优选与如下所述的载体蛋白缀合,或者未缀合。本发明的免疫原性组合物或者含有5型或8型多糖。

[0244] C. 金黄色葡萄球菌336抗原

[0245] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含美国专利6294177中描述的金黄色葡萄球菌336抗原。336抗原包含 $\beta$ -连接的己糖胺,不含O-乙酰基,特异性结合到金黄色葡萄球菌336型抗体沉积在ATCC 55804。在一个实施方案中,336抗原是一种多糖,其具有天然大小,或者可以例如通过微流化、超声辐射或化学处理来调整大小。本发明还包括来自336抗原的寡糖。336抗原可以不与载体蛋白偶联或可以与载体蛋白偶联。

[0246] D. 来自表皮葡萄球菌的I、II和III型多糖

[0247] 在疫苗接种中使用多糖相关的问题之一是多糖本身是较差的免疫原。优选地,本发明中使用的多糖与蛋白质载体连接,该蛋白质载体对旁观者T细胞提供帮助以提高免疫原性。可与多糖免疫原偶联的此类载体的实施例包括白喉和破伤风类毒素(分别为DT、DT CRM197和TT)、钥孔血蓝蛋白(KLH)和结核菌素的纯化蛋白衍生物(PPD)、铜绿假单胞菌外蛋白A(rEPA)、来自流感嗜血杆菌的蛋白D、肺炎球菌溶血素或任何上述物质的片段。适用的片段包括包含T辅助细胞表位的片段。特别地,来自流感嗜血杆菌的蛋白质D片段将优选地包

含蛋白质的N-末端1/3。蛋白D是一种来自流感嗜血杆菌(EP 0 594 610 B1)的IgD结合蛋白,并且是一种潜在的免疫原。此外,葡萄球菌蛋白可以作为本发明多糖缀合物中的载体蛋白。

[0248] 葡萄球菌 $\alpha$ 类毒素是一种在葡萄球菌疫苗中使用特别有利的载体蛋白。由于偶联过程降低了毒性,天然形式可以与多糖缀合。优选地,因为残留毒性较低,遗传解毒的 $\alpha$ 毒素例如His35Leu或His35Arg变体可用作载体。或者, $\alpha$ 毒素通过用交联剂、甲醛或戊二醛处理而化学解毒。遗传解毒的 $\alpha$ 毒素任选地被化学解毒,优选通过用交联剂、甲醛或戊二醛处理以进一步降低毒性。

[0249] 多糖可以通过任何已知方法(例如美国专利4372945、4474757和4356170中描述的那些方法)与载体蛋白连接。优选地,进行CDAP偶联化学(参见W095/08348)。在CDAP中,氰基化试剂1-氰基-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)优选地用于多糖-蛋白质偶联物的合成。氰化反应可以在相对温和的条件下进行,避免了碱敏感性多糖的水解。这种合成允许与载体蛋白直接偶联。

[0250] 缀合优选地包括在载体蛋白和多糖之间产生直接连接。任选地,可以在载体蛋白和多糖之间引入间隔物(例如己二酸二氢(ADH))。

[0251] IV. 免疫应答和检测

[0252] 如上所述,本发明涉及在对象中激发或诱导针对变体SpA或凝固酶肽的免疫应答。在一个实施方案中,免疫应答可以保护或治疗患有、怀疑患有或有感染相关疾病的风险的对象,特别是与葡萄球菌相关的疾病。本发明的免疫原性组合物的一种用途是通过在医院或感染风险增加的其他环境中进行手术之前接种对象来预防医院感染。

[0253] A. 免疫测定

[0254] 本发明包括实施血清学测定以评估本发明的组合物是否以及在何种程度上诱导或诱发免疫应答。可以实施多种类型的免疫测定。本发明包括的免疫测定包括但不限于美国专利4367110(双单克隆抗体夹心测定)和美国专利4452901(蛋白质印迹)中描述的方法。其他检测包括体外和体内标记配体的免疫沉淀和免疫细胞化学。

[0255] 免疫测定通常是结合测定。某些优选的免疫测定是本领域已知的各种类型的酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。使用组织切片的免疫组织化学检测也特别有用。在一个实施例中,抗体或抗原被固定在选定的表面上,例如聚苯乙烯微量滴定孔板中的孔、试纸条或立柱架。然后,将怀疑含有所需抗原或抗体的测试组合物,例如临床样品,加入孔中。结合和洗涤以除去非特异性结合的免疫复合物之后,可以检测结合的抗原或抗体。检测通常通过添加另一种抗体来实现,该抗体对所需抗原或抗体具有特异性,所述抗体与可检测标签相连。这种类型的ELISA被称为“三明治酶联免疫吸附试验”。检测也可以通过添加对所需抗原特异的第二抗体,然后添加对第二抗体具有结合亲和力的第三抗体来实现,所述第三抗体与可检测标签连接。

[0256] 竞争ELISA也是可以的实施方式,其中测试样品与已知量的标记抗原或抗体竞争结合。未知样品中活性物质的数量是通过在与包被孔孵育之前或期间将样品与已知标记物质混合来确定的。样品中活性物质的存在会减少可用于与孔结合的标记物质的数量,从而降低最终信号。无论采用何种形式,ELISA都具有某些共同特征,例如包被、孵育或结合、洗涤以除去非特异性结合的物质、以及检测结合的免疫复合物。

[0257] 抗原或抗体也可以连接到载体上,例如以孔板、珠、试纸、膜或柱基质的形式,并且将要分析的样品施加到固定的抗原或抗体上。在用抗原或抗体涂在孔板上时,通常将孔板的孔与抗原或抗体的溶液一起温育过夜或特定时间。然后清洗孔板孔,以去除未完全吸附的材料。然后,孔的任何剩余可用表面都用非特异性蛋白质“包被”,该蛋白质对于测试抗血清是抗原中性的。这些包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白和奶粉溶液。该涂层可以封闭固定表面上的非特异性吸附位点,从而减少了由抗血清非特异性结合到表面上引起的背景。

#### [0258] B. 细菌感染的诊断

[0259] 除了使用蛋白质、多肽和/或肽以及结合这些多肽、蛋白质和/或肽的抗体来治疗或预防如上所述的感染之外,本发明还考虑使用这些多肽、蛋白质、肽和/或抗体以多种方式,包括检测葡萄球菌的存在以诊断感染,无论是在病人身上还是在医疗设备上,这些设备也可能被感染。根据本发明,优选的检测感染的方法包括获取疑似被一种或多种葡萄球菌感染的样本的步骤:例如取自个体的样品,例如,取自一个人的血液、唾液、组织、骨骼、肌肉、软骨或皮肤。在分离样品后,可以进行利用本发明的多肽、蛋白质、肽和/或抗体的诊断测定以检测葡萄球菌的存在,并且用于确定样品中这种存在的这种测定技术是本领域技术人员所熟知的,包括诸如放射免疫测定、蛋白质印迹分析和ELISA测定的方法。通常,根据本发明,考虑了一种诊断感染的方法,其中怀疑被葡萄球菌感染的样品已经添加了根据本发明的多肽、蛋白质、肽、抗体或单克隆抗体,并且葡萄球菌通过抗体与样品中的多肽、蛋白质和/或肽结合,或者多肽、蛋白质和/或肽与抗体结合来实现。

[0260] 因此,根据本发明的抗体可用于预防葡萄球菌感染(即被动免疫),用于治疗持续感染,或用作研究工具。本文所使用的术语“抗体”包括单克隆、多克隆、嵌合、单链、双特异性、猿化和人源化或灵长类化抗体以及Fab片段,例如保持抗体结合特异性的片段,包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物。因此,本发明考虑使用单链,例如抗体的可变重链和轻链。任何这些类型的抗体或抗体片段的产生是本领域技术人员所熟知的。产生针对细菌蛋白质的抗体的特定实施例可以在美国专利申请公开No. 20030153022中找到,其通过引用整体并入本文。

[0261] 任何上述多肽、蛋白质、肽和/或抗体都可以用可检测的标记直接标记,用于葡萄球菌的鉴定和定量。免疫分析中使用的标签通常为技术人员所熟知的,包括酶、放射性同位素和荧光、发光和显色物质,包括有色颗粒,例如胶体金或乳胶珠。合适的免疫测定包括酶联免疫吸附测定(ELISA)。

#### [0262] C. 保护性免疫

[0263] 在本发明的某些实施方案中,蛋白质组合物赋予对象保护性免疫。保护性免疫是指身体发起特定免疫应答的能力,以保护对象免于发生涉及对其产生免疫应答的病原体的特定疾病或病症。免疫原性有效量能够赋予对象保护性免疫。如本文在说明书和随后的权利要求部分中所述,术语多肽或肽是指通过肽键在它们之间共价连接的一段氨基酸。根据本发明,不同的多肽具有不同的功能。根据一个方面,多肽源自设计用于在受体中诱导主动免疫应答的免疫原,但根据本发明的另一方面,多肽来源于抗体,该抗体在例如动物体内激发主动免疫反应产生,并且可用于在受体体内诱导被动免疫应答。然而,在这两种情况下,多肽是由一个多核苷酸根据任何可以的密码子用法编码的。如本文所用,短语“免疫应答”或其等效的“免疫学反应”是指在受体患者中针对本发明的蛋白质、肽、碳水化合物或多

肽产生的体液(抗体介导)、细胞(由抗原特异性T细胞或其分泌产物介导)或体液和细胞反应。这种反应可以是由施用免疫原诱导的主动反应或由施用抗体、含有抗体的材料或引发的T细胞所诱导的被动反应。通过与I类或II类MHC分子相关的多肽表位的呈递引发细胞免疫应答,以激活抗原特异性CD4(+) T辅助细胞和/或CD8(+) 细胞毒性T细胞。该反应还可以涉及单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、嗜酸性粒细胞或先天免疫的其他成分的激活。如本文所用,“主动免疫”是指通过施用抗原赋予对象的任何免疫。

[0264] 如本文所用,“被动免疫”是指在没有向对象施用抗原的情况下赋予对象的任何免疫。因此,“被动免疫”包括但不限于施用激活的免疫效应物,包括免疫应答的细胞介质或蛋白质介质(例如,单克隆抗体和/或多克隆抗体)。单克隆抗体或多克隆抗体组合物可用于被动免疫以预防或治疗携带被抗体识别的抗原的生物体的感染。抗体组合物可以包括结合多种抗原的抗体,这些抗原又可以与多种生物体相关。抗体成分可以是多克隆抗血清。在某些方面,一种或多种抗体是从已经用一种或多种抗原激发的动物或第二个对象中亲和纯化的。或者,可以使用抗体混合物,其是针对存在于相同、相关或不同微生物或生物体中的抗原的单克隆和/或多克隆抗体的混合物,例如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌,包括但不限于葡萄球菌。

[0265] 被动免疫可以通过向患者施用免疫球蛋白(Ig)和/或从具有已知免疫应答性的供体或其他非患者来源获得的其他免疫因子。在其他方面,可以将本发明的抗原组合物可以向对象施用,该对象随后充当球蛋白的来源或供体,响应于抗原组合物(“超免疫球蛋白”)的挑战而产生,其包含针对葡萄球菌的抗体或其他有机体。接受这种治疗的对象将捐献血浆,然后通过常规血浆分离方法从中获得超免疫球蛋白,然后给另一对象注射以产生对葡萄球菌感染的抵抗力或治疗葡萄球菌感染。根据本发明的超免疫球蛋白特别适用于免疫受损的个人、接收侵入性程序的个体或时间不允许个人产生自身抗体以应接种的情况。参见美国专利6936258、6770278、6756361、5548066、5512282、4338298和4748018,这些专利中的每一项均通过引用并入本文作为被动免疫相关的典型的方法和组合。

[0266] 出于本说明书和所附权利要求的目的,术语“表位”和“抗原决定簇”可交替使用指的是抗原上B细胞和/或T细胞应答或识别的一个部位。B细胞表位可由连续氨基酸或通过蛋白质三级折叠并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括具有独特空间构象的至少3个,更常见的是至少5个或8个至10个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括例如X射线晶体学和二维核磁共振。参见,例如,Epitope Mapping Protocols(1996)。识别相同表位的抗体可以在简单的免疫测定中鉴定,显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力。T细胞识别CD8细胞的约9个氨基酸或CD4细胞的约13个至15个氨基酸的连续表位。识别抗原表位的T细胞可通过检测抗原依赖性增殖的体外分析来识别,如通过启动T细胞对抗原表位的反应(Burke等人,1994)、抗原依赖性杀伤(细胞毒性T淋巴细胞试验,Tigges等人,1996)或细胞因子分泌的<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入来确定。

[0267] 细胞介导的免疫应答的存在可以通过增殖测定(CD4(+) T细胞)或CTL(细胞毒性T淋巴细胞)测定来确定。体液和细胞反应对免疫原的保护或治疗效果的相对贡献可以通过从免疫的同源动物中分别分离IgG和T细胞并检测第二个对象的保护或治疗效果来区分。

[0268] 如本文和权利要求中所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”可互换使用,是指作为动物或接受者免疫应答的一部分而起作用的几类结构相关蛋白质中的任何一种,这些蛋白质包括IgG、IgD、IgE、IgA、IgM和相关蛋白。

[0269] 在正常生理条件下,抗体存在于血浆和其他体液以及某些细胞的膜中,由B细胞类型的淋巴细胞或其功能等效物产生。IgG类抗体由通过二硫键连接在一起的四个多肽链组成。完整IgG分子的四条链是两条相同的重链,称为H链,两条相同的轻链称为L链。

[0270] 为了产生多克隆抗体,用抗原或抗原片段对宿主,例如兔或山羊免疫,通常用佐剂免疫,必要时与载体偶联。随后从宿主的血清中收集针对抗原的抗体。多克隆抗体可以针对抗原进行亲和纯化,使其具有单特异性。

[0271] 单克隆抗体可以通过用抗原对合适的供体进行超免疫或通过使用脾细胞或源自脾的细胞系的体外产生 (Anavi, 1998; Huston等人, 1991; Johnson等人, 1991; Mernaugh等人, 1995)。

[0272] 如本文和权利要求中所使用,短语“抗体的免疫学部分”包括抗体的Fab片段、抗体的Fv片段、抗体的重链、抗体的轻链、由抗体的重链和轻链组成的异二聚体、抗体的轻链的可变片段,抗体重链的可变片段和抗体的单链变体,也称为scFv。此外,该术语包括嵌合免疫球蛋白,它是来自不同物种的融合基因的表达产物,其中一个物种可以是人,在这种情况下,嵌合免疫球蛋白被称为人源化的。通常,抗体的免疫部分与从中衍生的完整抗体竞争,以与抗原特异性结合。

[0273] 任选地,抗体或优选抗体的免疫部分可以化学偶联至或表达为与其他蛋白质的融合蛋白质。出于本说明书和所附权利要求的目的,所有此类融合蛋白均包括在抗体或抗体的免疫部分的定义中。

[0274] 如本文所用,术语“免疫原性试剂”或“免疫原”或“抗原”可交替使用,以描述能够在向接受者施用诱导针对其自身的免疫应答的分子,无论是单独的、与佐剂联合的,还是存在于展示载体上。

#### [0275] D. 治疗方法

[0276] 本发明的方法包括治疗由葡萄球菌病原体引起的疾病或病症。本发明的免疫原性多肽可以用于在感染葡萄球菌或怀疑已暴露于葡萄球菌的人中诱导免疫应答。可以对经检测暴露于葡萄球菌呈阳性的个体或根据可以的暴露被认为有感染风险的个体采用方法。特别地,本发明包括治疗葡萄球菌感染,特别是医院获得性医院感染的方法。本发明的免疫原性组合物和疫苗特别有利于在选择性手术的情况下使用。这样的病人会提前知道手术日期,可以提前接种。本发明的免疫原性组合物和疫苗也有利于用于接种卫生保健工作者。

[0277] 在某些实施方案中,在佐剂或载体或其他葡萄球菌抗原的存在下施用治疗。此外,在某些实例中,治疗包括使用其他常用药物来对抗细菌感染,例如一种或多于一种抗生素。

[0278] 在疫苗接种中使用多肽可以需要(但不是必须)将多肽与免疫载体蛋白结合,例如乙型肝炎表面抗原、钥孔血蓝蛋白或牛血清白蛋白。进行这种缀合的方法是本领域公知的。

#### [0279] V. 疫苗和其他药物组合物和施用

##### [0280] A. 疫苗

[0281] 本发明包括预防或改善葡萄球菌感染,特别是医院获得性医院感染的方法。因此,本发明考虑在主动和被动免疫实施方案中使用的疫苗。被提议适合用作疫苗的免疫原性组

合物可以由免疫原性SpA多肽(例如SpA结构域D变体)或免疫原性凝固酶制备。在其他实施方案中,SpA或凝固酶可以与其他分泌的毒力蛋白、表面蛋白或其免疫原性片段组合使用。在某些方面,抗原材料被广泛透析以除去不需要的小分子量分子和/或冻干以便更容易地配制成所需的载体。

[0282] 基于蛋白质/肽的疫苗的其他选择包括引入编码抗原的核酸作为DNA疫苗。在这方面,最近的报告描述了重组痘苗病毒的构建,该病毒表达10个连续的最小CTL表位(Thomson,1996)或B细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和来自几种微生物的T辅助(Th)表位的组合(An,1997),并成功使用此类构建体对小鼠进行免疫以引发保护性免疫应答。因此,文献中有充分的证据表明成功利用肽、肽脉冲抗原呈递细胞(APC)和肽编码构建体在体内有效启动保护性免疫应答。在美国专利5958895和5620896中举例说明了使用核酸序列作为疫苗。

[0283] 含有多肽或肽序列作为活性成分的疫苗的制备在本领域通常是众所周知的,例如美国专利4608251;4601903;4599231;4599230;4596792和4578770,所有这些都通过引用并入本文。通常,此类疫苗配制为液体溶液或悬浮液的注射剂,也可以制备适于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。该制剂也可以被乳化。活性免疫原性成分通常与药学上可接受且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。此外,如果需要,疫苗可以含有一定量的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂或增强疫苗效力的佐剂。在特定的实施方案中,如美国专利6793923和6733754中所述,疫苗与物质的组合一起配制,这些专利通过引用并入本文。

[0284] 疫苗可以常规的注射方式,例如,皮下注射或肌肉注射。适用于其他施用方式的其他制剂包括栓剂,在某些情况下,还包括口服制剂。对于栓剂,传统的粘合剂和载体可包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯:此类栓剂可由含有约0.5%至约10%、优选约1%至约2%的活性成分的混合物形成。口服制剂包括通常使用的赋形剂,例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉剂的形式,并含有约10%至约95%的活性成分,优选约25%至约70%。

[0285] 多肽和多肽编码DNA构建体可以配制成中性或盐形式疫苗。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与肽的游离氨基形成)和与(例如盐酸或磷酸的无机酸)或(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸)。

[0286] 通常,接种疫苗的方式应与剂量制剂相适应,剂量应具有治疗效果和免疫原性。施用量取决于接受治疗的对象,包括个体免疫系统合成抗体的能力和所需的保护程度。需要施用的活性成分的精确量取决于从业者的判断。然而,合适的剂量范围是每次接种几百微克的活性成分。初始施用和加强注射的合适方案也是不同的,但以初始施用然后随后接种或其他施用为代表。

[0287] 应用的方式可以广泛地变化。适用于施用疫苗的任何常规方法。这些被认为包括口服施用在固体生理学可接受的基质中或经肠胃外、通过注射等施用于生理学可接受的分散体中。疫苗的剂量取决于施用途径,并根据对象的体型和健康状况而变化。

[0288] 在某些情况下,需要多次施用疫苗,例如,2次、3次、4次、5次、6次或多于6次施用。疫苗接种可以在1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周至5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周间隔进行,包括其间的所有范围很值。需要每隔1年至5年定期加强免疫以维持抗体的

保护水平。如美国专利3791932、4174384和3949064中所述,免疫过程之后可以进行针对抗原的抗体的测定。

#### [0289] 1. 载体

[0290] 给定的组合物的免疫原性可以不同。因此,通常需要增强宿主免疫系统,这可以通过将肽或多肽与载体偶联来实现。典型的和优选的载体是匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白如卵清蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可用作载体。将多肽缀合到载体蛋白的方法是本领域众所周知的,包括戊二醛、间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和双-重氮化联苯胺。

#### [0291] 2. 佐剂

[0292] 多肽或肽组合物的免疫原性可以通过使用免疫应答的非特异性刺激剂(称为佐剂)来增强。合适的佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物,例如细胞因子、毒素或合成组合物。许多佐剂可用于增强针对变体SpA多肽或凝固酶或本文考虑的任何其他细菌蛋白质或组合的抗体反应。佐剂可以(1)在体内捕获抗原,使其缓慢释放;(2)将参与免疫应答的细胞吸引到施用部位;(3)诱导免疫系统细胞增殖或激活;或(4)改善抗原在对象全身的扩散。

[0293] 佐剂包括但不限于水包油乳液、油包水乳液、矿物盐、多核苷酸和天然物质。可以使用的特定佐剂包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 $\gamma$ -干扰素、GMCSP、BCG、铝盐(例如氢氧化铝或其他铝化合物),MDP化合物(例如thur-MDP和Nor-MDP、CGP(MTP-PE)、脂质A和单磷酸脂质A(MPL))。在2%角鲨烯/吐温80乳剂中,RIBI含有从细菌中提取的三种成分:MPL、海藻糖二羧酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)甚至可以使用MHC抗原。其他佐剂或方法在美国专利6814971、5084269、6656462中举例说明,这些专利均通过引用并入本文。

[0294] 在某些实施方案中,佐剂包括免疫刺激剂。此类免疫刺激剂可包括但不限于模式识别受体的刺激剂:例如Toll样受体、RIG-1和NOD样受体(NLR);矿物盐,例如明矾、与肠杆菌(例如大肠杆菌、明尼苏达沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌或弗氏志贺氏菌)的单磷酸脂质(MPL)A结合的明矾、或特别是与这些细菌(例如大肠杆菌、明尼苏达沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌或弗氏志贺氏菌)的MPL.RTM.(AS04)或MPLA结合的明矾;皂甙如QS-21、Quil-A、ISCOMs、ISCOMATRIX;乳剂如MF59、Montanide、ISA 51和ISA 720、AS02(QS21+角鲨烯+MPL.);脂质体和脂质体制剂,例如AS01;合成或专门制备的微粒和微载体,例如淋病衣原体沙眼衣原体等细菌来源的外膜囊泡(OMV),或壳聚糖颗粒;储库形成剂,例如Pluronic嵌段共聚物;特别地修饰的或制备的肽,例如胞壁酰二肽;氨基烷基氨基葡萄糖4-磷酸盐,例如RC529;或蛋白质,例如细菌类毒素或毒素片段。

[0295] 实现疫苗佐剂作用的各种方法包括使用诸如氢氧化铝或磷酸盐(明矾)等的试剂,通常用作磷酸盐缓冲盐水中约0.05%至约0.1%的溶液,与糖的合成聚合物(**Carbopol®**)的混合物用作大约0.25%的溶液,通过在大约70°C至大约101°C之间的温度范围内分别进行30秒至2分钟的热处理,使疫苗中的蛋白质聚集。通过用胃蛋白酶处理的(Fab)白蛋白抗体重新激活来聚集;与细菌细胞(例如,*C. parvum*)、革兰氏阴性菌的内毒素或脂多糖成分的混合物;生理学上可接受的油载体中的乳液(例如甘露醇单油酸酯(Aracel A));或使用20%全氟化碳的溶液(**Fluosol-DA®**)用作嵌段替代物的乳液也可用于产生辅助作用。

[0296] 经常优选的佐剂的实施例包括完全弗氏佐剂(一种非特异性免疫应答刺激剂,含有被杀死的结核分枝杆菌)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝。

[0297] 在某些方面,优选地,选择的佐剂是Th1或Th2类型反应的优先诱导剂。高水平的Th1型细胞因子倾向于诱导对特定抗原的细胞介导免疫应答,而高水平的Th2型细胞因子倾向于诱导对抗原的体液免疫应答。

[0298] Th1和Th2型免疫应答的区别不是绝对的。实际上,个体将支持被描述为主要是Th1或主要是Th2的免疫应答。然而,根据Mosmann和Coffman (Mosmann和Coffman,1989)在鼠CD4+T细胞克隆中描述的细胞因子家族,通常很方便。传统上,Th1型反应与T淋巴细胞产生INF- $\gamma$ 和IL-2细胞因子有关。通常与诱导Th1型免疫应答直接相关的其他细胞因子不是由T细胞产生的,例如IL-12。相反,Th2型反应与IL-4、IL-5、IL-6、IL-10的分泌相关。

[0299] 除佐剂外,它可以需要共同施用生物反应调节剂(BRM)以增强免疫应答。BRM已被证明可以上调T细胞免疫或下调抑制细胞活性。此类BRM包括但不限于西咪替丁(CIM;1200mg/d)(Smith/Kline,PA);或低剂量环磷酰胺(CYP;300mg/m<sup>2</sup>)(Johnson/Mead,NJ)和细胞因子(例如 $\gamma$ -干扰素、IL-2或IL-12)或编码参与免疫辅助功能的蛋白质的基因,例如B-7。

[0300] B. 脂质成分和脂质部分

[0301] 在某些实施方案中,本发明涉及包含一种或多种与核酸或多肽/肽相关的脂质的组合物。脂质是不溶于水并且可用有机溶剂提取的物质。除本文所述的化合物外,本领域的技术人员将其他化合物理解为脂质,并且包括在本发明的组合物和方法中。脂质成分和非脂质可以共价或非共价地彼此连接。

[0302] 脂质可以是天然存在的脂质或合成脂质。然而,脂质通常是生物物质。生物脂质是本领域众所周知的,并且包括例如中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、类固醇、萜烯、溶血脂、糖鞘脂、糖脂、硫脂、具有醚和酯连接的脂肪酸的脂质和可聚合脂质,以及它们的组合。

[0303] 与脂质偶联的核酸分子或多肽/肽可以分散在含有脂质的溶液中、用脂质溶解、用脂质乳化、与脂质混合、与脂质结合、与脂质共价键合、以悬浮液形式包含在脂质中或以其他方式与脂质结合。本发明的脂质或脂质-痘病毒相关组合物不限于任何特定结构。例如,它们也可以简单地散布在溶液中,可以形成大小或形状不均匀的聚集体。在另一个实施例中,它们可以以双层结构、胶束或“折叠”结构存在。在另一个非限制性实施例中,还考虑了脂质体(Gibco BRL)-痘病毒或Superfect(Qiagen)-痘病毒复合物。

[0304] 在某些实施方案中,组合物可包含约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%、约55%、约56%、约57%、约58%、约59%、约60%、约61%、约62%、约63%、约64%、约65%、约66%、约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、ab约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或其间的任何范围的特定脂质、脂质类型或非脂质成分,例如佐剂、抗原、肽、多肽、糖、核酸或本文公开的或本领域技术人员已知的其他材料。在非限制性实施例中,组合物可包含约10%至约20%的中性脂质、约33%至约34%的脑苷脂和约1%的胆固醇。在另一个非限制性实施例中,脂质体可包含约4%至约12%的萜烯,其

中约1%的胶束特定是番茄红素,剩下的约3%至约11%的脂质体包含其他萜烯;约10%至约35%的磷脂酰胆碱和约1%的非脂质成分。因此,考虑本发明的组合物可包含任何组合或百分比范围的任何脂质、脂质类型或其他组分。

#### [0305] C. 联合治疗

[0306] 本发明的组合物和相关方法,特别是向患者/对象施用分泌的毒力因子或表面蛋白,包括变体SpA多肽或肽,和/或其他细菌肽或蛋白质,也可以与传统疗法的施用相联合。这些包括但不限于抗生素的施用,例如链霉素、环丙沙星、多西环素、庆大霉素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺甲恶唑、氨苄青霉素、四环素或各种抗生素的组合。

[0307] 在一方面,考虑将多肽疫苗和/或疗法与抗菌治疗结合使用。或者,治疗可以在其他药剂治疗之前或之后间隔数分钟至数周。在其他药剂和/或蛋白质或多核苷酸单独施用的实施方案中,通常会确保在每次递送之间没有很长的时间段,从而试剂和抗原组合物仍然能够对对象发挥有利的组合作用。在这样的情况下,考虑可以在彼此相隔约12至24小时内或彼此相隔约6至12小时内施用两种方式。在某些情况下,可能需要显著延长施用时间,其中在各次施用之间间隔数天(2、3、4、5、6或7)至数周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0308] 可以采用各种联合,例如抗生素治疗是“A”,作为免疫治疗方案的一部分给予的免疫原性分子,例如抗原,是“B”:

[0309] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0310] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0311] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0312] 将本发明的免疫原性组合物施用于患者/对象将遵循此类化合物的施用的一般方案,并考虑SpA组合物或本文所述的其他组合物的毒性(如果有的话)。预计治疗周期将根据需要重复。还考虑各种标准疗法,例如水合作用,可以与所描述的疗法联合应用。

#### [0313] D. 一般药物组合物

[0314] 在某些实施方案中,向对象施用药物组合物。本发明的不同方面涉及向对象施用有效量的组合物。在本发明的某些实施方案中,可以向患者施用葡萄球菌抗原、Ess途径的成员,包括Esa或Esx类的多肽或肽,和/或分选酶底物的成员,以防止被一种或多于一种葡萄球菌病原体感染。或者,可将编码一种或多于一种此类多肽或肽的表达载体给予患者作为预防性治疗。此外,此类化合物可以与抗生素或抗菌剂联合施用。这种组合物通常溶解或分散在药学上可接受的载体或水性介质中。

[0315] 除了配制用于肠胃外施用的化合物,例如用于静脉内或肌肉注射的化合物,其他药学上可接受的形式包括例如用于口服施用的片剂或其他固体;缓释胶囊;以及目前使用的任何其他形式,包括乳膏、乳液、漱口水、吸入剂等。

[0316] 本发明的活性化合物可以配制用于肠胃外施用,例如配制用于通过静脉内、肌肉、皮下或甚至腹膜内途径的注射。根据本公开,包含增加MHC I类分子表达的一种或多于一种化合物的水性组合物的制备将是本领域技术人员已知的。通常,此类组合物可制备成液态溶液或悬浮液;也可以制备成固态形式,该固态形式用于制备注射前加入液体的溶液或悬浮液;也可以将制剂乳化。

[0317] 可以在适当与表面活性剂(如羟丙基纤维素)混合的水中制备作为游离基或药理上可接受的盐的活性化合物溶液。还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备分

散体。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0318] 适用于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液;包括芝麻油、花生油或含水丙二醇的制剂;用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉剂。在所有情况下,该形式必须是无菌的,并且必须是易于注射的流体。它在制造和储存条件下也应该是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。

[0319] 蛋白质组合物可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐,包括酸添加盐(由蛋白质的游离氨基形成)以及与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸)形成的盐等。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0320] 载体也可以是含有水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适当混合物和植物油的溶剂或分散介质。可以通过例如使用卵磷脂等涂层、在分散的情况下保持所需的粒径、以及通过使用表面活性剂这样的方式来保持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选地包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射组合物的吸收。

[0321] 可通过将所需量的活性化合物与上面列举的各种其他成分按要求一起掺入适当的溶剂中再经过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将各种已灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备分散体,该无菌载体包括基本分散介质和所需的上述列举的其他成分。关于无菌注射液的无菌粉末的制备,其优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,该方法会产生活性成分粉末和之前无菌过滤溶液所需的任何其他成分。

[0322] 通常将通过任何常见的途径进行施用根据本发明的组合物的。这包括但不限于口服、鼻腔或口腔。或者,可以通过原位、皮内、皮下、肌内、腹膜内、鼻内或静脉内注射施用。在某些实施方案中,疫苗组合物可被吸入(例如,美国专利6651655,其通过引用特别并入)。这种组合物通常作为药学可接受的组合物施用,包括生理学可接受的载体、缓冲剂或其他赋形剂。如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合与人和动物的组织接触的那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在接触时没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他与合理收益/风险比相称的问题并发症。术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包装材料,参与携带或运输化学试剂。

[0323] 例如,对于静脉注射的水溶液的施用,如果需要,溶液应适当缓冲,并且液体稀释剂首先与足够的盐水或葡萄糖等渗。这些特定的水溶液特别适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这点上,根据本公开,可以本领域技术人员来说将是已知的使用无菌水性介质。例如,一个剂量可以溶解在等渗NaCl溶液中,然后添加到皮下注射液中或注射到建议的输液部位,(例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,1990)。根据对象的情况,剂量必然会发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人将确定个体对象的适当剂量。

[0324] 基于考虑目标确定治疗或预防组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适用于对象的物理上离散的单位,每个单位包含预定量的组合物,经计算以产生上文讨论的与其施用相关的期望的反应,即适当的途径和方案。根据治疗次数和单位剂量,施用量取决于所需的保护。

[0325] 组合物的精确量还取决于从业者的判断并且因人而异。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、治疗的考虑目标(缓解症状与治愈)以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。

[0326] 配制后,溶液将以治疗或预防有效的量以及与剂量制剂相容的方式施用。该制剂易于以多种剂型施用,例如上述注射溶液的类型。

[0327] E. 体外、离体或体内施用

[0328] 如本文所用,术语体外施用是指对从对象体内取出的或体外的细胞进行的操作,包括但不限于培养中的细胞。术语离体施用是指已经在体外被操作并且随后被施用给对象的细胞。术语体内施用包括在对象体内进行的所有操作。

[0329] 在本发明的某些方面,组合物可以在体外、离体或体内施用。在某些体外实施方案中,自体B淋巴细胞细胞系与本发明的病毒载体一起温育24至48小时,或与变体SpA和/或辅酶和/或本文所述的任何其他组合物一起温育2小时。然后将转导的细胞用于体外分析,或者用于离体施用。美国专利4690915和5199942(均通过引用并入本文)公开了用于治疗应用的血液单核细胞和骨髓细胞的离体操作方法。

[0330] F. 抗体和被动免疫

[0331] 本发明的另一方面是制备用于预防或治疗葡萄球菌感染的免疫球蛋白的方法,包括用本发明的疫苗免疫接受者或供体和从接受者或供体分离免疫球蛋白的步骤。本发明的另一方面是通过该方法制备的免疫球蛋白。本发明的另一方面包含本发明的免疫球蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物,其可用于制备治疗或预防葡萄球菌病的药物。本发明的另一方面是治疗或预防葡萄球菌感染的方法,其包括向患者施用本发明的有效量的药物制剂的步骤。

[0332] 用于多克隆抗体制备的接种物通常通过将抗原组合物分散在生理上可耐受的稀释剂(例如盐水或其他适合人使用的佐剂)中来制备,从而形成水性组合物。将免疫刺激量的接种物施用于哺乳动物,然后将接种的哺乳动物维持足够的时间以使抗原组合物诱导保护性抗体。

[0333] 抗体可以通过众所周知的技术如亲和层析(Harlow and Lane, 1988)分离到所需的程度。抗体可以包括来自多种常用动物的抗血清制剂,例如山羊、灵长类动物、驴、猪、马、豚鼠、老鼠或人。

[0334] 根据本发明产生的免疫球蛋白可包括完整抗体、抗体片段或亚片段。抗体可以是任何类别的完整免疫球蛋白(例如,IgG、IgM、IgA、IgD或IgE)、对本发明的两种或多于两种抗原具有双重特异性的嵌合抗体或杂合抗体。它们也可以是包括杂合片段在内的片段(例如,F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv等)。免疫球蛋白还包括天然、合成或基因工程蛋白,它们通过与特定抗原结合形成复合物而起到抗体的作用。

[0335] 可以将本发明的疫苗注射到接受者身上,然后接受者作为免疫球蛋白的来源,免疫球蛋白是响应来自特定疫苗的激发而产生。被如此治疗的受试者将捐献血浆,通过常规血浆分级方法从中获得超免疫球蛋白。超免疫球蛋白将施用于另一对象以对其赋予抗性 or 治疗葡萄球菌感染。本发明的超免疫球蛋白特别适用于婴儿、免疫受损个体或需要治疗且个体没有时间响应疫苗接种以产生抗体的葡萄球菌病的治疗或预防。

[0336] 本发明的另一方面是药物组合物,包括大于两个的单克隆抗体(或其片段;优选人

的或人源的)对本发明的免疫原性组合物的至少两个成分具有反应性,()其可用于治疗或预防感染革兰氏阳性菌,优选葡萄球菌,更优选金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的感染。此类药物组合物包含可以是任何种类的完整免疫球蛋白的单克隆抗体、嵌合抗体或对本发明的两种或多于两种抗原具有特异性的杂合抗体。它们也可以是包括杂合片段在内的片段(例如,F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv等)。

[0337] 制备单克隆抗体的方法是本领域众所周知的,可以包括脾细胞与骨髓瘤细胞的融合(Kohler和Milstein,1975;Harlow和Lane,1988)。或者,可以通过筛选合适的噬菌体展示文库来获得单克隆Fv片段(Vaughan等,1998)。单克隆抗体可以通过已知方法人源化或部分人源化。

[0338] VI. 实施例

[0339] 给出以下实施例是为了说明本发明的各种实施方案,并不意味着以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地理解,本发明很好地适用于实现所述目的并获得所提及的目的和优点,以及本文固有的那些目的、目的和优点。本实施例以及本文描述的方法目前代表优选实施例,是典型的,并不意在限制本发明的范围。本领域技术人员将想到其中的变化和包含在由权利要求的范围限定的本发明的精神内的其他用途。

[0340] 实施例1 葡萄球菌蛋白A有助于金黄色葡萄球菌小鼠的持续定植

[0341] 金黄色葡萄球菌持续地在大约三分之一人口的鼻咽部定植,从而促进社区获得性感染和医院获得性感染。抗生素目前用于感染风险增加的个体的去定植。然而,抗生素的疗效受到重新定植和耐药菌株选择的限制。鼻腔定植会触发抗葡萄球菌表面抗原的IgG反应,但是这些抗体不能阻止随后的定植或疾病。本实施例描述了多位点序列类型的ST88分离株金黄色葡萄球菌WU1,持续在小鼠的鼻咽部定植。据报道,金黄色葡萄球菌WU1在鼻咽部的持续存在需要葡萄球菌蛋白A(SpA)。与被野生型金黄色葡萄球菌定植的动物相比,被 $\Delta$ spa变体定植的小鼠增加了针对葡萄球菌定植决定簇的IgG反应。用无毒的SpA变体对小鼠进行的免疫接种(该变体不能交联B细胞受体并转移抗体反应)引发蛋白A中和抗体,其促进针对定植金黄色葡萄球菌的IgG反应并减少病原体的持久性。

[0342] A. 结果

[0343] 1. 金黄色葡萄球菌WU1

[0344] 在动物繁殖群中观察到雄性C57BL/6小鼠的包皮腺感染的爆发。从包雄性和雌性C75BL/6J小鼠的包皮腺腺炎(PGA)和鼻咽收集样品,并通过在甘露醇盐琼脂(MSA)和Baird-Parker琼脂(BPA)上的生长进行分析。多位点序列分型和spa基因分型表明,动物已经被金黄色葡萄球菌ST88spa基因型t186定植,这也是雄性小鼠PGA的原因。曾有报道,具有spa基因型t186的金黄色葡萄球菌CC88为美国实验室小鼠的稳定定植分离株(37)。其他spa基因型包括t325、t448、t690、t755、t786、t2085、t2815、t5562、t11285和t12341(37)。新西兰JSNZ分离株带有独特的spa基因型t729(37)。尽管如此,金黄色葡萄球菌JSNZ和WU1都共享8型荚膜多糖基因,但缺乏mecA基因以及编码的T细胞超抗原的移动遗传元件(MGE)(37)。此外,表达人特异性免疫逃避簇1(IEC1)基因sak(葡萄激酶)、chp(CHIPS,金黄色葡萄球菌的趋化抑制蛋白)和scn(SCIN-A,葡萄球菌补体抑制剂A)的h1b转化噬菌体在WU1基因组中缺失从而导致完整的 $\alpha$ -溶血素编码基因(h1b)(38)。值得注意的是,WU1编码的IEC2携带scn同系物scb/scc(SCIN-B/-C)以及h1a( $\alpha$ -溶血素)和ss112-14(葡萄球菌超抗原样12-14)(39)。

与稳定定植小鼠的其他CC88分离株(37)不同,WU1的基因组含有b1aZ基因。当分析编码分选酶锚定的表面蛋白的基因时,观察到金黄色葡萄球菌WU1携带与先前鼻腔定植相关的决定因素基因,包括ClfB、IsdA、SdrC、SdrD和SasG(表1)。

[0345]

表1金黄色葡萄球菌WU1、JSNZ和Newman基因组 中选择开放阅读框的蛋白质产物的保守性		
蛋白质	氨基酸同一性(%)WU1基因产物	
	JSNZ	Newman
SpA	99	98
ClfA	100	93
ClfB	100	96
FnBPA	100	82
FnBPB	87	87
IsdA	100	100
IsdB	99	98
SdrC	100	100
SdrD	95	95
SdrE	100	98
EsxA	100	100
EsxB	100	100
SasA	100	99
SasD	100	99
SasF	100	98
SasI	99	100
SasG	100	69
SasK	100	93 <sup>a</sup>
Coa	98	98
vWbp	100	71
Hla	78	99
SCIN	100	45 <sup>b</sup>
Eap	100	99
Efb	100	99
Ebh	99	98
TarS	100	98
<b>a. 与金黄色葡萄球菌04-02981菌株相比</b>		
<b>b. 与金黄色葡萄球菌USA300菌株相比</b>		

[0346] 金黄色葡萄球菌脓肿的形成与纤维蛋白细菌凝集的决定因素有关(40,41)。凝集需要两种金黄色葡萄球菌分泌产物激活宿主凝血酶原从而将纤维蛋白原转化为纤维蛋白:凝固酶(Coa)和血管性血友病因子结合蛋白(vWbp)(40)。凝集因子A(ClfA)结合纤维蛋白原并用凝固酶产生的纤维蛋白原纤维包裹葡萄球菌,从而干扰金黄色葡萄球菌宿主吞噬细胞的摄取和杀伤(41,42)。clfA基因在金黄色葡萄球菌WU1和JSNZ中是相同的,但与来自金黄色葡萄球菌Newman的clfA(表1)显示出等位基因特异性差异,Newman是一种CC8人临床分离株,通常用于小鼠实验室挑战激发实验(43)。然而,观察到的clfA差异是分支特异性的,因为它们可以在从人或鼠宿主分离的CC88菌株中发现(数据未显示)。金黄色葡萄球菌WU1、JSNZ和Newman的coa基因产物几乎相同(表1)。相比之下,金黄色葡萄球菌WU1和JSNZ的vwb基因产物与凝血酶原结合D1和D2结构域的序列变体最大(图1A)的金黄色葡萄球菌Newman显著不同,且未被针对Newman的Wbp而产生的多克隆抗体识别(图1B)。两株CC88菌株分泌的

vWbp可被针对USA300菌株vWbp保守C端结构域培养的血清识别(图1C)。与分泌大量Coa并快速凝集人和小鼠血浆的金黄色葡萄球菌Newman相比,金黄色葡萄球菌WU1和JSNZ分泌的Coa更少并且更容易凝集小鼠血浆(图1B、图1D、图1E)。金黄色葡萄球菌Newman的凝固酶活性取决于coa和vwb的表达,因为相应的 $\Delta$ coa、 $\Delta$ vwb和 $\Delta$ coa、 $\Delta$ vwb突变体在小鼠和人血浆中显示出凝集缺陷(图1D、图1E)。综上所述,这些数据表明金黄色葡萄球菌WU1和JSNZ中vwb基因的ST88等位基因可以促进小鼠血浆中凝血酶原介导的有效凝血和纤维蛋白凝集,这可以支持PGA等入侵性疾病的发病机制。

[0347] 2. 金黄色葡萄球菌WU1持续地在小鼠的鼻咽部定植。

[0348] 为分析金黄色葡萄球菌WU1在小鼠中的定植能力,咽拭子和粪便材料涂布在BPA上对10只雌性C57BL/6小鼠进行分析(PBA)。通过将10 $\mu$ L含 $1 \times 10^8$ CFU金黄色葡萄球菌WU1的磷酸盐缓冲盐水(PBS)悬浮液吸入右侧鼻孔,对在BPA上缺乏细菌生长的未实验未实验进行麻醉和接种。通过每周间隔,即接种后7、14、21、28、35和42天擦拭口咽进行动物定植分析。将拭子涂在BPA上,培养菌落形成并计数(图2A)。即使没有事先进行抗生素治疗或选择抗生素,金黄色葡萄球菌WU1也会在42天内以每个拭子 $1.2 \log_{10}$ CFU至 $2.9 \log_{10}$ CFU的负载量定植实验动物(图2A)。为了验证金黄色葡萄球菌WU1的持续定植,对42天后获得的菌落通过MLST和spa进行基因分型分析。数据显示小鼠仍被ST88 spa t186定植,表明金黄色葡萄球菌WU1持续定植C57BL/6小鼠的鼻咽部。作为对照组,单独笼子中的C57BL/6J动物群被饲养在与金黄色葡萄球菌WU1定植的动物相同的动物设施室和相同的笼架中,其模拟PBS接种不会导致鼻咽部的葡萄球菌定植(图2A)。来自小鼠的第42天粪便样品在PBS中匀浆并铺在甘露醇盐琼脂(MSA)上用于CFU计数(图2B)。金黄色葡萄球菌WU1定植小鼠的粪便样本含有 $5.1 \log_{10}$ CFU g<sup>-1</sup>至 $7.3 \log_{10}$ CFU g<sup>-1</sup>粪便,表明金黄色葡萄球菌WU1菌株在小鼠肠胃(GI)通道定植。作为对照组,模拟(PBS)接种的小鼠的粪便样本中没有金黄色葡萄球菌(图2B)。

[0349] 金黄色葡萄球菌WU1的定植触发小鼠血清IgG反应。早期的工作产生了金黄色葡萄球菌抗原基质,它由25个保守的分泌蛋白组成。25个重组亲和标记蛋白中的每一种都被纯化并固定在膜过滤器上(44)。为了检测定植期间的宿主免疫应答,在接种后15天对未实验未实验的或被金黄色葡萄球菌WU1定植的动物采血,并通过与金黄色葡萄球菌抗原基质一起孵育来分析血清IgG反应。使用IRDye 680偶联的山羊抗小鼠IgG(LI-COR)检测IgG结合,并通过红外成像进行定量。该实验表明,金黄色葡萄球菌WU1定植导致针对分选酶锚定表面蛋白C1fA、C1fB、IsdA和IsdB以及巨大细胞外基质结合蛋白(Ebh)(金黄色葡萄球菌的细胞大小和肽聚糖合成决定因素)的血清IgG增加(45)(表2)。

表2金黄色葡萄球菌WU1或其 spa 变体定植的C57BL/6J小鼠的血清IgG反应

	抗原	WU1 (被定植的)		WU1Δspa (被定植的)		WU1Δspa (清除鼻咽)	
		倍数 变化 <sup>a</sup>	P值 <sup>c</sup> (相对 于幼鼠)	倍数 变化 <sup>a</sup>	P值 <sup>c</sup> (相对 于被WU1定 植的小鼠)	倍数 变化 <sup>a</sup>	P值 <sup>c</sup> (相对于被 WU1 spa定植的小 鼠)
细胞 壁 锚 定 表 面 蛋 白	SpA <sub>KKAA</sub>	1.3 ± 0.08	无显著差异	1.1 ± 0.06	无显著差异	1.1 ± 0.49	无显著差异
	CfIA	5.3 ± 2.77	< 0.0001	4.3 ± 0.83	无显著差异	3.5 ± 1.69	无显著差异
	CfIB	4.8 ± 0.72	0.001	3.9 ± 1.28	无显著差异	17.4 ± 4.70	< 0.0001
	Ebh	3.7 ± 0.50	0.0454	2.8 ± 0.62	无显著差异	3.9 ± 1.56	无显著差异
	FnbpA	1.9 ± 0.89	无显著差异	1.3 ± 0.79	无显著差异	2.6 ± 0.96	无显著差异
	FnbpB	2.6 ± 1.33	无显著差异	2.3 ± 0.85	无显著差异	4.3 ± 0.96	无显著差异
	IsdA	4.5 ± 0.84	0.0036	2.1 ± 0.22	无显著差异	13.0 ± 0.44	< 0.0001
	IsdB	5.2 ± 1.43	0.0002	2.7 ± 0.83	无显著差异	2.8 ± 1.18	无显著差异
	SdrC	1.1 ± 0.14	无显著差异	1.5 ± 0.45	无显著差异	1.7 ± 0.69	无显著差异
	SdrD	1.5 ± 1.08	无显著差异	1.0 ± 0.25	无显著差异	1.2 ± 0.35	无显著差异
	SdrE	1.8 ± 0.52	无显著差异	2.9 ± 0.65	无显著差异	1.4 ± 0.60	无显著差异
	SasA	3.0 ± 1.33	无显著差异	1.1 ± 0.44	无显著差异	3.3 ± 1.14	无显著差异
	SasB	5.1 ± 2.22	无显著差异	1.0 ± 0.34	无显著差异	5.7 ± 4.42	无显著差异
	SasD	2.7 ± 1.47	无显著差异	0.7 ± 0.23	无显著差异	1.3 ± 0.59	无显著差异
	SasF	1.2 ± 0.61	无显著差异	0.9 ± 0.63	无显著差异	1.2 ± 0.32	无显著差异
	SasG	2.1 ± 0.24	无显著差异	1.2 ± 0.47	无显著差异	10.3 ± 1.19	< 0.0001
SasI	1.4 ± 0.75	无显著差异	1.2 ± 0.08	无显著差异	1.4 ± 0.53	无显著差异	
SasK	2.5 ± 0.26	无显著差异	1.3 ± 0.30	无显著差异	1.7 ± 1.09	无显著差异	
分泌 蛋白	Coa	2.7 ± 0.29	无显著差异	1.2 ± 0.45	无显著差异	1.5 ± 0.45	无显著差异
	vWbp	2.0 ± 0.97	无显著差异	1.4 ± 0.59	无显著差异	1.7 ± 0.89	无显著差异
	Hla	1.8 ± 0.65	无显著差异	1.2 ± 0.46	无显著差异	1.2 ± 0.34	无显著差异
	SCIN	4.3 ± 1.23	0.0071	2.8 ± 1.80	无显著差异	1.4 ± 0.49	无显著差异
	Eap	1.3 ± 0.20	无显著差异	0.8 ± 0.97	无显著差异	1.2 ± 0.31	无显著差异
	Efb	2.9 ± 1.68	无显著差异	2.6 ± 1.63	无显著差异	1.6 ± 0.52	无显著差异
	EsxA	2.6 ± 1.73	无显著差异	1.6 ± 1.00	无显著差异	2.6 ± 0.35	无显著差异
	EsxB	2.8 ± 0.28	无显著差异	1.6 ± 0.19	无显著差异	1.9 ± 0.21	无显著差异

a. 用10<sup>8</sup> CFU的指定金黄色葡萄球菌菌株鼻内接种C57BL/6J小鼠群。接种后15天，给动物采血并分析血清样品对葡萄球菌抗原的抗体反应。  
 b. 通过将接种小鼠组的平均信号强度除以未接种小鼠组的平均信号强度来计算倍数变化。数据以平均值±标准偏差表示。  
 c. 采用双因素方差分析和Tukey多重比较试验计算p值。n.s.=不显著

[0350]

[0351] 3. 金黄色葡萄球菌WU1需要葡萄球菌蛋白A才能持续定植。

[0352] 与金黄色葡萄球菌Newman SpA相似,金黄色葡萄球菌WU1的spa基因产物由五个IgBD组成,并在278个残基结构域内携带单个氨基酸置换。免疫印迹实验表明,金黄色葡萄球菌菌株Newman和WU1产生SpA的量相当(图3A)。使用等位基因重组,发明人生成了金黄色葡萄球菌WU1的Δspa突变体。通过免疫印迹检测,Δspa突变体中SpA的产生被消除,并且通过质粒携带的野生型spa(pSpA)表达恢复了这种缺陷(图3A)。使用针对分选酶A(SrtA)的抗体进行免疫印迹作为加载对照(图3A)。当将突变体接种到小鼠的右鼻孔中并在第7天通过口咽拭子分析定植时,Δspa突变体最初以类似于野生型菌株WU1的方式在C57BL/6J动物中定植(图3B)。然而,在稍后的时间点,特别是在第35天和第42天,Δspa突变体比野生型菌株WU1定植的动物更少(图3B)。在细菌生长过程中,金黄色葡萄球菌将和肽聚糖片段相连的SpA释放到周围环境中(46)。在静脉注射金黄色葡萄球菌的小鼠模型中,释放的SpA激活B细胞增殖并增强VH3独特型IgM和IgG分子的分泌(33)。然而,扩增的VH3独特型IgG不识别葡萄球菌抗原(33)。这种B细胞超抗原活性的分子基础基于SpA介导的VH3独特型B细胞受体的交联,这以CD4T辅助细胞和RIPK2激酶依赖性方式中触发B细胞增殖(33,47)。被Δspa突变体

葡萄球菌感染的动物缺乏VH3独特型免疫球蛋白扩增,并表现出病原体特异性IgG的大量增加,从而触发对随后的金黄色葡萄球菌感染具有保护作用的免疫原反应(48)。然后人们想知道WU1的 $\Delta spa$ 突变体的定植是否与血清IgG反应的改变有关。从已定植15天的动物血清中分析IgG结合金黄色葡萄球菌抗原基质成分(表2)。该实验显示在随后去定植的动物中抗C1fB、IsdA和SasG的抗体增加,但在 $\Delta spa$ 突变体定植的动物中没有增加(表2)。综上所述,这些数据表明,带有 $\Delta spa$ 突变葡萄球菌的C57BL/6小鼠的鼻咽部定植与针对关键定植决定因素的IgG反应增加有关,这似乎促进了 $\Delta spa$ 突变体金黄色葡萄球菌从鼻咽部的去

[0353] 4. 蛋白A中和抗体影响金黄色葡萄球菌的持续定植。

[0354] 用野生型蛋白A对小鼠进行免疫接种不会引发IgG血清抗体结合与中和五个IgBD结合IgG分子的Fc $\gamma$ 结构域或VH3独特型免疫球蛋白的变体重链的能力,该抗体会予以结合并中和(44)。SpA<sub>KKAA</sub>是一种在SpA的五个IgBD中具有20个氨基酸置换的变体,SpA的五个IgBD可消除Fc $\gamma$ 结合并减少与VH3独特型免疫球蛋白的结合(44)。尽管如此,SpA<sub>KKAA</sub>保留了蛋白A的整体 $\alpha$ -螺旋含量和抗原结构。因此,用佐剂化的SpA<sub>KKAA</sub>对小鼠进行免疫会引发高滴度蛋白A中和IgG(44)。这些抗体阻断了金黄色葡萄球菌感染期间蛋白A的抗调理和B细胞超抗原活性,广泛增强抗葡萄球菌抗原的IgG反应并促进保护性免疫的发展(44)。为了测试蛋白A中和抗体是否影响金黄色葡萄球菌的定植,用佐剂化的SpA<sub>KKAA</sub>或单独的佐剂免疫C57BL/6小鼠。与模拟免疫的动物相比,SpA<sub>KKAA</sub>处理的动物引发了高滴度蛋白A中和抗体(表3)。为了检测蛋白质A中和抗体是否影响金黄色葡萄球菌定植,当接种金黄色葡萄球菌WU1时,模拟和SpA<sub>KKAA</sub>免疫的动物最初都以相似的方式定植,因为口咽拭子显示平均定植负荷在接种后第7天和第14天没有显著差异(图4)。然而,从第21天开始,SpA<sub>KKAA</sub>免疫的小鼠比模拟免疫的动物更频繁地去定植(图4)。当检查血清IgG反应并与未实验小鼠比较时,模拟治疗动物中的金黄色葡萄球菌WU1定植导致抗C1fB、IsdA、IsdB、SasD和SasF的抗体反应(表3)。在维持金黄色葡萄球菌WU1定植的动物中,SpA<sub>KKAA</sub>免疫导致针对C1fA、Coa、vWBP和H1a的抗体反应(表3)。与接种SpA<sub>KKAA</sub>的C57BL/6J小鼠相比,随后去定植的动物表现出抗C1fA、C1fB、纤连蛋白结合蛋白A(FnBPA)和B(FnBPB)、IsdB、Coa和SasG的血清IgG升高(表3)。这些数据一起表明,SpA<sub>KKAA</sub>疫苗接种在已定植金黄色葡萄球菌的小鼠中引起增强的血清IgG反应。此外,SpA<sub>KKAA</sub>疫苗可诱导抗许多不同葡萄球菌抗原的抗体,包括已知的定植因子(C1fB、IsdA和SasG)。总之,这些SpA<sub>KKAA</sub>疫苗诱导的针对定植葡萄球菌的IgG反应似乎促进了鼻咽的去定植。

表3 SpA<sub>KKAA</sub>免疫对金黄色葡萄球菌WU1定植的C57BL/6小鼠血清IgG反应的影响

	抗原	SpA <sub>KKAA</sub> 免疫 (被定植)		SpA <sub>KKAA</sub> 免疫 (清除鼻咽)		PBS 模拟免疫 (被定植)	
		倍数 变化 <sup>b</sup>	P值 <sup>d</sup> (相对于 PBS模拟)	倍数 变化 <sup>b</sup>	P值 <sup>d</sup> (相对于 SpA <sub>KKAA</sub> 免疫定植)	倍数 变化 <sup>b</sup>	P值 <sup>d</sup> (相对于 幼稚小鼠)
细胞 壁 锚定 表面 蛋白	SpA <sub>KKAA</sub>	121.3 ± 64.98	<0.0001	126.3 ± 13.35	<0.0001	0.9 ± 0.16	无显著差异
	CifA	3.8 ± 0.49	<0.0001	5.7 ± 2.28	0.0069	1.3 ± 0.65	无显著差异
	CifB	1.1 ± 0.28	无显著差异	14.8 ± 1.12	<0.0001	4.3 ± 1.49	<0.0001
	Ebh	1.0 ± 0.15	无显著差异	1.3 ± 0.57	无显著差异	1.3 ± 0.43	无显著差异
	FnbpA	1.1 ± 0.34	无显著差异	6.4 ± 1.86	<0.0001	1.1 ± 0.29	无显著差异
	FnbpB	1.5 ± 0.33	无显著差异	10.6 ± 1.0	<0.0001	1.2 ± 0.72	无显著差异
	IsdA	1.8 ± 0.46	无显著差异	2.8 ± 0.59	无显著差异	2.0 ± 0.43	无显著差异
	IsdB	1.7 ± 0.37	无显著差异	5.8 ± 2.75	<0.0001	2.1 ± 0.96	无显著差异
	SdrC	1.4 ± 0.67	无显著差异	1.5 ± 0.61	无显著差异	1.2 ± 0.45	无显著差异
	SdrD	1.1 ± 0.39	无显著差异	1.5 ± 0.36	无显著差异	1.2 ± 0.23	无显著差异
	SdrE	1.2 ± 0.36	无显著差异	1.8 ± 0.94	无显著差异	1.2 ± 0.22	无显著差异
	SasA	1.8 ± 0.36	无显著差异	1.6 ± 0.28	无显著差异	0.8 ± 0.80	无显著差异
	SasB	1.9 ± 0.90	无显著差异	1.1 ± 0.42	无显著差异	1.0 ± 0.24	无显著差异
	SasD	1.3 ± 0.46	无显著差异	1.0 ± 0.44	无显著差异	2.4 ± 0.53	0.0023
	SasF	2.4 ± 0.34	无显著差异	1.7 ± 0.55	无显著差异	2.6 ± 1.59	0.004
	分泌 蛋白	SasG	0.9 ± 0.15	无显著差异	5.5 ± 1.04	<0.0001	1.1 ± 0.32
SasI		2.1 ± 0.46	无显著差异	1.8 ± 0.02	n.s.	1.3 ± 0.22	无显著差异
SasK		2.3 ± 0.62	无显著差异	2.7 ± 0.38	n.s.	1.1 ± 0.02	无显著差异
Coa		3.0 ± 1.31	0.0049	5.8 ± 0.87	<0.0001	1.2 ± 0.43	无显著差异
vWbp		5.7 ± 1.34	<0.0001	6.6 ± 2.82	无显著差异	1.4 ± 0.65	无显著差异
Hla		2.9 ± 0.08	0.0070	3.6 ± 0.36	无显著差异	1.1 ± 0.58	无显著差异
SCIN		2.1 ± 0.77	无显著差异	1.4 ± 0.21	无显著差异	1.0 ± 0.37	无显著差异
Eap		1.7 ± 0.38	无显著差异	1.1 ± 0.22	无显著差异	0.9 ± 0.23	无显著差异
Efb		1.5 ± 0.47	无显著差异	1.49 ± 0.25	无显著差异	0.98 ± 0.27	无显著差异
EsxA	2.4 ± 0.65	无显著差异	3.22 ± 1.81	无显著差异	0.82 ± 0.26	无显著差异	
EsxB	2.5 ± 0.35	无显著差异	3.75 ± 1.08	无显著差异	1.46 ± 0.25	无显著差异	

a. 用50µg经CFA或PBS模拟乳化的重组SpA<sub>KKAA</sub>对C57BL/6J小鼠群进行免疫，并在第11天50µg经IFA或PBS模拟的IFA乳化的重组SpA<sub>KKAA</sub>进行加强。在第24天，小鼠鼻内接种10<sup>8</sup>CFU的指定金黄色葡萄球菌菌株，每周在喉咙中擦拭以计算细菌负荷。接种后15天，给动物采血并分析血清样品对葡萄球菌抗原的抗体反应。

b. 通过将SpA<sub>KKAA</sub>免疫组的平均信号强度除以PBS模拟免疫组的平均信号强度计算倍数变化。数据以平均值±标准偏差表示。

[0355]

[0356] BALB/c小鼠的金黄色葡萄球菌WU1定植。为了测试金黄色葡萄球菌WU1的定植是否仅限于C57BL/6小鼠，发明人将1 × 10<sup>8</sup>CFU金黄色葡萄球菌WU1接种到一群 (n = 20) 未实验BALB/c小鼠的右鼻孔中，并用拭子培养法检测鼻咽部的定植。与C57BL/6小鼠类似，金黄色葡萄球菌WU1在BALB/c小鼠中持续定植(图5)。用SpA<sub>KKAA</sub>对BALB/c小鼠进行免疫接种不影响金黄色葡萄球菌WU1的初始定植。然而，与模拟免疫动物相比，接种SpA<sub>KKAA</sub>促进了BALB/c小鼠的去定植(图5)。

[0357] 5. SpA<sub>KKAA</sub>疫苗影响金黄色葡萄球菌JSNZ的小鼠定植。

[0358] 然后人们想知道蛋白A中和抗体是否也影响金黄色葡萄球菌JSNZ的小鼠定植。与Newman和WU1菌株不同,金黄色葡萄球菌JSNZ的spa基因产物仅包含四种IgBD(37)。早期研究表明,与通常与人鼻咽金黄色葡萄球菌定植相关的五种IgBD相比,具有四种IgBD的SpA变体与B细胞超抗原活性减弱有关(33)。当接种到麻醉小鼠的右鼻孔中时,金黄色葡萄球菌JSNZ在BALB/c小鼠的鼻咽部有效定植42天(图6)。SpA<sub>KKAA</sub>疫苗接种不影响金黄色葡萄球菌JSNZ的初始定植。然而,与模拟免疫小鼠相比,具有血清中和蛋白A抗体的BALB/c小鼠从第21天开始更频繁地去定植金黄色葡萄球菌JSNZ(图6)。这些数据一起表明,金黄色葡萄球菌JSNZ还需要蛋白A介导的B细胞超抗原活性才能在小鼠中持续定植。

[0359] B. 材料和方法

[0360] 1. 培养基和细菌生长条件。

[0361] 用胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)或胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)中在37°C下培养金黄色葡萄球菌菌株。对于研究小鼠鼻咽部定植的实验,如图所示,将咽拭子样品在温度为37°C的Baird-Parker琼脂上培养。对于研究金黄色葡萄球菌胃肠道定植的实验,如图所示,粪便样品在37°C下在甘露醇盐琼脂上生长。大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)在Luria肉汤(LB)或琼脂中于37°C下生长。氨苄青霉素(大肠杆菌为100 $\mu$ g/mL)和氯霉素(金黄色葡萄球菌为10 $\mu$ g/mL)用于质粒选择。

[0362] 2. 金黄色葡萄球菌基因分型。

[0363] 金黄色葡萄球菌分离株WU1是从发明人的动物设施中小鼠的鼻咽和包皮腺脓肿病变中获得的。小鼠金黄色葡萄球菌菌株JSNZ由Siouxie Wiles博士(36)提供。使用Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Promega)分离葡萄球菌基因组DNA。Spa基因分型和多位点序列分型(MLST)如前所述(85)。简而言之,对于spa分型,金黄色葡萄球菌WU1菌株的基因组DNA用引物1095F(5'AGACGATCCTTCGGTGAGC3')和1517R(5'GCTTTTGCAATGTCATTTACTG3')(86)进行PCR扩增。PCR产物用Nucleospin Gel和PCR Clean-up试剂盒纯化,用引物1095F和1517R测序,Ridom软件进行分析。对于MLST分型,使用引物arc-up(5'TTGATTCACCAGCGGTATTGTC3')、arc-dn(5'AGGTATCTGCTTCAATCAGCG3')、aro-up(5'5ATCGGAAATCCTATTTACATTC3')、arc-dn(5'GGTGTGTATTAATAACGATATC3')、glp-up(5'CTAGGAACTGCAATCTTAATCC3')、glp-dn(5'TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC3')、gmk-up(5'ATCGTTTTATCGGGACCATC3')、gmk-dn(5'TCATTAAC TACAACGTAATCGTA3')、pta-up(5'GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG3')、pta-dn(5'GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA3')、tpi-up(5'TCGTTCATTCTGAACGTCGTGA3')、tpi-dn(5'TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC3')、yqi-up(5'CAGCATA CAGGACACCTATTGGC3')和yqi-dn(5'CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC3')对金黄色葡萄球菌WU1的基因组DNA进行PCR扩增。PCR产物用核旋蛋白凝胶和PCR清理试剂盒纯化,PCR扩增并测序,并用在线软件分析(参见,例如:saures.mLst.net/)。Silva Holtfreter博士提供了金黄色葡萄球菌JSNZ菌株的全基因组序列文件。利用Argonne国家实验室的环境样品制备和测序设备对金黄色葡萄球菌WU1的基因组DNA进行Truseq DNA-seq文库制备Illumina MiSeq测序。使用Geneious软件分析序列。

[0364] 3. 金黄色葡萄球菌突变体。

[0365] 使用质粒pKOR1的等位基因的重组来删除金黄色葡萄球菌WU1的spa基因(87)。为了构建 $\Delta$ spa突变体,用引物ext1F ext1F(5'GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATTTAAGA

AGATTGTTTCAGATTTATG3')、ext1R(5' ATTTGTAAAGTCATCATAATATAACGAATTATGTATTGCAACT AAAATC3')、ext2F(5' CGTCGCGAACTATAATAAAAAACAAACAATACACAACGATAGATATC 3')和ext2R(5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCAACGAACGCCTAAAGAAATTGTCTTTGC 3')从金黄色葡萄球菌WU1的染色体上扩增了spa基因上游和下游的两个1-kb DNA片段。在随后的PCR中将两个侧翼区域融合在一起,并使用BP Clonase II试剂盒(Invitrogen)将最终的PCR产物克隆到pKOR1中。将得到的质粒连续转移到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、金黄色葡萄球菌菌株RN4220和金黄色葡萄球菌菌株WU1中,温度调到40 $^{\circ}$ C,阻止质粒复制并促进它们插入染色体(87)。在30 $^{\circ}$ C下进行生长是用来促进等位基因替换。通过PCR扩增产物的DNA测序验证了spa基因的突变。

#### [0366] 4.凝集实验。

[0367] 如前所述进行凝集实验(88)。简而言之,将过夜培养的金黄色葡萄球菌菌株在新鲜TSB中按1:100稀释,并在37 $^{\circ}$ C下培养6小时。来自1mL培养物(标准化为OD<sub>600</sub> 4.0)的细菌与SYTO 9(1:500)(Invitrogen)一起孵育15分钟,用1mL PBS洗涤两次,然后悬浮在1mLPBS中。将细菌与柠檬酸盐处理的人血浆或小鼠血浆按1:1混合并在显微镜载玻片上孵育30分钟。使用20倍物镜(Olympus)在IX81活细胞全内反射荧光显微镜上观察样品并捕获图像。每个样品至少采集10张图像。使用ImageJ软件检测和定量每个图像中凝集复合物的面积。

#### [0368] 5.免疫印迹法。

[0369] 将过夜培养的金黄色葡萄球菌菌株以1:100稀释到新鲜的TSB中(在存在质粒的情况下使用氯霉素)并在37 $^{\circ}$ C下生长至OD<sub>600</sub>为0.5至1.0。将来自1mL培养物的细胞离心,悬浮在PBS中,并与20 $\mu$ g/mL溶葡萄球菌(AMBI)在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。全细胞裂解液中的蛋白质用10%三氯乙酸和10 $\mu$ g脱氧胆酸沉淀,用冰冷的丙酮洗涤,风干,悬浮在100 $\mu$ L 0.5mM Tris HCl(pH 6.8)和100 $\mu$ L SDS-PAGE样品缓冲液中[100mM Tris HCl(pH 6.8)、4% SDS、0.2%溴酚蓝、200mM二硫苏糖醇]并煮沸10分钟。蛋白质在12% SDS-PAGE上分离并电转移到PVDF膜上。PVDF膜用包含Tween-20(TBST)[20mM Tris HCl(pH 7.6)、137mM NaCl、0.1% Tween-20]的Tris缓冲盐水中的5%牛奶封闭。用小鼠抗C1fA 2A12.12单克隆抗体(1:2000稀释)和辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗小鼠IgG(细胞信号传导,1:10000稀释)检测C1fA。用兔抗Coa多克隆抗体(1:1000稀释)和HRP偶联的抗兔IgG(1:10000稀释)检测Coa。两种不同的兔抗vWbp多克隆抗体(1:1000稀释),分别识别来自金黄色葡萄球菌Newman的全长vWbp或vWbp的C端结构域,并使用HRP偶联的抗兔IgG(1:10000稀释)检测vWbp。用TBST(1:10000稀释)中的HRP偶联人IgM检测SpA。用兔抗SrtA多克隆抗体(1:10000稀释)和HRP偶联的抗兔IgG(1:10000稀释)检测SrtA。用TBST洗涤抗体染色的膜,并与SuperSignal West Pico化学发光底物(Thermo Scientific)一起孵育,并在Amersham Hyperfilm ECL高性能化学发光膜(GE Healthcare)上显影。

#### [0370] 6.重组蛋白的纯化。

[0371] 大肠杆菌BL21(DE3)含有pET15b+质粒,用于表达带有His标签的SpA<sub>KKAA</sub>,以及24种葡萄球菌抗原(C1fA、C1fB、FnBPA、FnBPB、IsdA、IsdB、SasA、SasB、SasD、SasF、SasG、SasI、SasK、SdrC、SdrD、SdrE、EsxA、EsxB、SCIN、Eap、Efb、Hla、Coa、vWbp和Ebh),过夜生长,在新鲜培养基中按1:100稀释,并在37 $^{\circ}$ C生长至大约OD<sub>600</sub>为0.5。用1mM异丙基- $\beta$ -d-硫代吡喃半乳糖苷诱导培养物并再生3小时。将细胞沉淀,重新悬浮在柱缓冲液(50mM Tris-HCl[pH 7.5],150mM NaCl)中,并被弗氏细胞压碎器在14000lb/in<sup>2</sup>的压强下破碎。裂解液通过

40000 × g超速离心清除膜和不溶成分。将澄清的裂解物进行Ni-NTA亲和层析,并在含有连续更高浓度的咪唑(100至500mM)的柱缓冲液中洗脱蛋白质。洗脱液用PBS透析,通过考马斯染色的SDS-PAGE对蛋白质纯度进行验证。通过BCA法(Thermo Scientific)测定蛋白质浓度。

[0372] 7. 小鼠鼻咽部定植。

[0373] 将金黄色葡萄球菌菌株WU1及其  $\Delta spa$  突变体的过夜培养物按1:100稀释到新鲜的TSB中,并在37°C下生长2小时。将细胞离心、洗涤并悬浮在PBS中。七周大的雌性BALB/c、C57BL/6J或B6.129S2-Ighm<sup>tm1Cgn</sup>/J小鼠(杰克逊实验室)通过腹腔注射每公斤体重100mg/mL氯胺酮和20mg/mL甲苯噻嗪进行麻醉。将 $1 \times 10^8$  CFU的金黄色葡萄球菌(体积10 $\mu$ L)移入每只小鼠的右鼻孔中。在接种后的第7、14、21、28、35和42天,对小鼠的口咽部进行擦拭,并将拭子样本涂在Baird-Parker琼脂上孵育以进行细菌计数。在接种后第15天,小鼠通过眶周静脉穿刺取血以获得用于使用葡萄球菌抗原基质进行抗体反应分析的血清。在接种后第42天,收集粪便样品并在PBS中匀浆处理。将匀浆铺在甘露醇盐琼脂上并孵育进行细菌计数。所有小鼠实验均按照芝加哥大学机构生物安全委员会(IBC)和机构动物护理和使用委员会(IACUC)的实验方案审查和批准后的机构指南进行。动物实验至少重复一次以确保数据的重现性。

[0374] 8. 主动免疫。

[0375] 4周大的小鼠通过皮下注射50 $\mu$ g在弗氏完全佐剂(CFA; Difco)中乳化的SpA<sub>KKAA</sub>进行免疫,并在初始免疫后11天用50 $\mu$ g在不完全弗氏佐剂(IFA)中乳化相同抗原加强免疫。在第21天,免疫小鼠通过眶周静脉穿刺取血以获得ELISA的血清。在第24天,小鼠鼻内接种 $1 \times 10^8$  CFU的金黄色葡萄球菌菌株WU1或JSNZ,并监测鼻咽部定植。

[0376] 9. 葡萄球菌抗原基质。

[0377] 用2 $\mu$ g亲和纯化的葡萄球菌抗原印迹硝酸纤维素膜。用5%脱粒牛奶封闭膜,与稀释的小鼠血清(1:10000稀释)和IRDye 680偶联的山羊抗小鼠IgG(LI-COR)一起孵育。使用Odyssey红外成像系统(LI-COR)定量信号强度。

[0378] 10. 统计分析。

[0379] 使用Sidak多重比较测试(GraphPad软件)进行进行双因素方差分析以分析鼻咽部定植、ELISA和抗原基质的数据学统计意义。

[0380] 实施例2 葡萄球菌蛋白A变体

[0381] 以下测定可用于评估本文所述的SpA变体在本公开内容的方法和组合物中的功效。

[0382] A. 实验

[0383] 鼠脓肿、鼠致死感染和鼠肺炎模型中的疫苗保护。建立了三种研究金黄色葡萄球菌传染病的动物模型。这些模型可用于检测通过产生蛋白A特异性抗体提供的保护性免疫水平。鼠脓肿-BALB/c小鼠(24天大的雌性,每组8只至10只小鼠,Charles River Laboratories,Wilmington,MA)可以通过将纯化的蛋白质肌肉注射到后腿进行免疫(Chang等人,2003;Schneewind等人,1992)。纯化的SpA和/或SpA变体可以在第0天(用完全弗氏佐剂以1:1乳化)和第11天(用不完全弗氏佐剂以1:1乳化)施用。可以通过第0、11和20天的眶后出血抽取血样。用ELISA检查血清的IgG滴度,以了解变体的特异性结合活性。可在第21天

通过眶后注射100 $\mu$ L金黄色葡萄球菌Newman或金黄色葡萄球菌USA300悬浮液( $1 \times 10^7$ cfu)对免疫动物进行激发。为此,金黄色葡萄球菌Newman过夜培养物可以1:100稀释到新鲜的胰蛋白酶大豆肉汤中,并在37 $^{\circ}$ C下培养3小时。可以将葡萄球菌离心、洗涤两次并在PBS中稀释,使 $A_{600}$ 为0.4(每m升 $1 \times 10^8$ cfu)。稀释度可以通过琼脂平孔板和菌落形成进行实验验证。小鼠可通过每公斤体重腹腔注射氯胺酮80mg至120mg和甲苯噻嗪3mg至6mg进行麻醉,并通过眶后注射感染。在激发后的第5天或第15天,可以通过吸入压缩CO<sub>2</sub>对小鼠实施安乐死。可以取出肾脏并在1%Triton X-100中匀浆。可将等分试样稀释并铺在琼脂培养基上,以一式三份测定cfu。对于组织学,肾组织可以在10%福尔马林中在室温下孵育24小时。组织可以包埋在石蜡中,切片,用苏木精染色,并通过显微镜检查。

[0384] 鼠致死感染-BALB/c小鼠(24天大的雌性,每组8只至10只小鼠,Charles River Laboratories,Wilmington,MA)可以通过将纯化的SpA或SpA变体肌肉注射到后腿中进行免疫。疫苗可在第0天(用完全弗氏佐剂以1:1乳化)和第11天(用不完全弗氏佐剂以1:1乳化)施用。可以通过第0、11和20天的眶后出血抽取血样。通过ELISA检查血清中具有变体特异性结合活性的IgG滴度。可在第21天通过眶后注射100 $\mu$ L金黄色葡萄球菌Newman或金黄色葡萄球菌USA300悬浮液( $15 \times 10^7$ cfu)对免疫动物进行激发。为此,金黄色葡萄球菌Newman的过夜培养物可以1:100稀释到新鲜的胰蛋白酶大豆肉汤中,并在37 $^{\circ}$ C下培养3小时。可以将葡萄球菌离心、洗涤两次、在PBS中稀释至 $A_{600}$ 为0.4(每m升 $1 \times 10^8$ cfu)并浓缩。稀释度可以通过琼脂平孔板和菌落形成进行实验验证。小鼠可通过每公斤体重腹腔注射80mg至120mg氯胺酮和3mg至6mg甲苯噻嗪进行麻醉。可以在第21天通过腹膜内注射 $2 \times 10^{10}$ cfu的金黄色葡萄球菌Newman或 $3 \times 10^9$ cfu至 $10 \times 10^9$ cfu的临床金黄色葡萄球菌分离物对免疫动物进行激发。可以监测动物14天,并可记录致死疾病。

[0385] 鼠肺炎模型-金黄色葡萄球菌菌株Newman或USA300(LAC)可以在37 $^{\circ}$ C下在胰蛋白酶大豆肉汤/琼脂中生长至OD<sub>660</sub>为0.5。可以将50-mL培养物等分试样离心,在PBS中洗涤,然后悬浮在750 $\mu$ L PBS中用于研究死亡率(每30- $\mu$ L体积 $3 \times 10^8$ CFU至 $4 \times 10^8$ CFU)或1250 $\mu$ L PBS(每30- $\mu$ L体积 $2 \times 10^8$ CFU)中用于细菌负荷和组织病理学实验。对于肺部感染,对于对7周龄C57BL/6J小鼠(杰克逊实验室)可以在将30 $\mu$ L金黄色葡萄球菌悬浮液接种到其左鼻孔之前将其麻醉。可以将动物以仰卧姿势放入笼中进行恢复,并观察14天。对于主动免疫,4周大的小鼠可以在第0天通过i.m.途径接受CFA中的20 $\mu$ g SpA变体,然后在第10天用不完全弗氏佐剂(IFA)中的20 $\mu$ g变体加强。可以在第21天用金黄色葡萄球菌对动物进行激发。可以在免疫前和第20天收集血清以评估特异性抗体的产生。对于被动免疫研究,7周大的小鼠可以在被激发前24小时通过i.p.注射100 $\mu$ L NRS(正常兔血清)或SpA变体特异性兔抗血清。为了评估肺炎的病理相关性,可以在切除双肺之前通过强制吸入CO<sub>2</sub>来杀死被感染的动物。可以将右肺均质化以计算肺细菌负荷。左肺可置于1%福尔马林石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色以及显微镜下分析。

[0386] 兔抗体-纯化的SpA变体可用作生产兔抗血清的免疫原。可以在第0天用CFA乳化蛋白质进行注射,然后在第21天和第42天用IFA乳化蛋白质加强注射。可通过ELISA测定兔抗体滴度。通过兔血清对SpA型琼脂糖的亲和层析,可获得纯化抗体。可以通过 $A_{280}$ 处的吸光度检测洗脱抗体的浓度,可以通过ELISA确定特异性抗体滴度。

[0387] 使用SpA变体的主动免疫。为了确定疫苗效力,可以用纯化的SpA变体主动免疫动

物。作为对照组,动物可以单独用佐剂免疫。可以使用SpA变体作为抗原来确定针对蛋白A制剂的抗体滴度。使用上述传染病模型,可以检测细菌负荷(鼠脓肿和肺炎)的任何减少、葡萄球菌疾病(鼠脓肿和肺炎)的组织病理学证据以及对致死性疾病(鼠致死激发和肺炎)的保护。

[0388] 使用针对SpA变体产生的亲和纯化兔多克隆抗体的被动免疫。为了确定蛋白A特异性兔抗体的保护性免疫,用纯化的SpA变体衍生兔抗体被动免疫小鼠。这两种抗体制剂均使用固定化的SpA变体通过亲和层析进行纯化。作为对照组,动物用rV10抗体(一种对葡萄球菌感染的结果没有影响的瘟疫保护性抗原)进行被动免疫。使用SpA变体作为抗原确定针对所有蛋白A制剂的抗体滴度。使用上述传染病模型,可以检测细菌负荷(鼠脓肿和肺炎)的减少、葡萄球菌疾病(鼠脓肿和肺炎)的组织病理学证据以及对致死性疾病(鼠致死激发和肺炎)的保护。

[0389] 细菌菌株和生长。金黄色葡萄球菌菌株Newman和USA300可以在37°C的胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中生长。大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)可以在含有100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)肉汤中在37°C下生长。

[0390] 兔抗体。SpA变体可以根据标准重组技术或合成方案制备,纯化的抗原可以共价连接到HiTrap NHS激活的HP柱(GE Healthcare)。抗原-基质可用于4°C下10mL至20mL兔血清的亲和层析。带电基质可以用50个柱体积的PBS洗涤,抗体用洗脱缓冲液(1M甘氨酸,pH 2.5,0.5M NaCl)洗脱,并立即用1M Tris-HCl,pH 8.5中和。纯化的抗体可以在4°C下对PBS透析过夜。

[0391] F(ab)<sub>2</sub>片段。亲和纯化的抗体可以与3mg胃蛋白酶在37°C下混合30分钟。该反应可以用1M Tris-HCl,pH 8.5淬灭,F(ab)<sub>2</sub>片段可以用特异性抗原偶联的HiTrap NHS激活的HP柱进行亲和纯化。纯化的抗体可以在4°C下对PBS透析过夜,加载到SDS-PAGE凝胶上并用考马斯蓝染色观察。

[0392] 主动和被动免疫。BALB/c小鼠(3周龄,雌性,查尔斯河实验室)可以通过肌肉注射用完全弗氏佐剂(Difco)中乳化的50 $\mu\text{g}$ 蛋白质进行免疫。对于加强免疫,蛋白质可以在不完全弗氏佐剂中乳化,并在初次免疫后11天注射。在免疫后的第20天,可以通过酶联免疫吸附试验(ELISA)对5只小鼠进行采血以获得特异性抗体滴度的血清。

[0393] 在用金黄色葡萄球菌激发前24小时,可以将PBS中亲和纯化的抗体以5mg/kg实验动物体重的浓度注射到BALB/c小鼠(6周龄,雌性,Charles River Laboratories)的腹腔中。动物血液可以通过眶周静脉穿刺收集。可以用肝素化微血细胞比容毛细管(Fisher)去除血细胞,Z-gel血清分离微管(Sarstedt)可用于通过ELISA收集和检测抗原特异性抗体滴度。

[0394] 小鼠肾脓肿。金黄色葡萄球菌Newman或USA300(LAC)的过夜培养物可以1:100稀释到新鲜的TSB中,并在37°C下培养2小时。葡萄球菌可以在OD<sub>600</sub>为0.4(约 $1 \times 10^8 \text{CFU mL}^{-1}$ )时沉淀、洗涤并悬浮在PBS中。可以通过将样品等分试样涂抹在TSA上并计数形成的菌落来定量接种物。BALB/c小鼠(6周龄,雌性,Charles River Laboratories)可以通过每公斤体重腹腔注射100mg/mL氯胺酮和20mg/mL甲苯噻嗪进行麻醉。可通过耳后注射 $1 \times 10^7 \text{CFU}$ 的金黄色葡萄球菌Newman或 $5 \times 10^6 \text{CFU}$ 的金黄色葡萄球菌USA300感染小鼠。在激发后的第4天,可以通过吸入CO<sub>2</sub>杀死小鼠。可以去除两个肾脏,并可以通过用PBS,1% Triton X-100将肾组

织匀浆来分析一个器官中的葡萄球菌负荷。将匀浆的系列稀释液涂在TSA上并孵育进行细菌计数。可以通过组织病理检查剩余的器官。简而言之,肾脏可以在10%福尔马林中在室温下固定24小时。组织可以用石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,并通过光学显微镜检查以列举脓肿病变。所有小鼠实验均可按照芝加哥大学机构生物安全委员会(IBC)和机构动物护理和使用委员会(IACUC)的实验方案审查和批准后的机构指南进行。

[0395] 蛋白A结合。对于人IgG结合,Ni-NTA亲和柱可以在柱缓冲液中预装200 $\mu\text{g}$ 纯化的蛋白质(SpA变体)。洗涤后,可将200 $\mu\text{g}$ 人IgG(Sigma)上样到色谱柱上。可以从洗涤和洗脱中收集蛋白质样品,并进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后进行考马斯蓝染色。纯化的蛋白质(SpA变体)可以在0.1M碳酸盐缓冲液(pH 9.5)中以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度在4 $^{\circ}\text{C}$ 下包被到MaxiSorp ELISA孔板(NUNC)上过夜。接下来可以用5%的全脂牛奶将封闭显影孔板,然后用一系列稀释液的人过氧化物酶偶联的人IgG、Fc或F(ab)<sub>2</sub>片段的孵育一小时。可以使用OptEIA ELISA试剂(BD)清洗和显影孔板。可以用1M磷酸淬灭反应,A<sub>450</sub>读数用于计算半数最大效价和百分比结合。

[0396] 血管性血友病因子(vWF)结合实验。可以如上所述进行包被和阻断纯化的蛋白质(SpA变体)。显影孔板可以与浓度为1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的人vWF一起孵育两小时,然后再用人IgG清洗和封闭一小时。洗涤后,可以将显影孔板与抗人vWF的过氧化物酶偶联抗体的连续稀释液一起孵育1小时。可以使用OptEIA ELISA试剂(BD)清洗和显影孔板。反应可用1M磷酸淬灭,A<sub>450</sub>读数可用于计算半数最大效价和结合百分比。对于抑制测定,在配体结合测定之前,可以将孔板与对SpA变体特异的亲和纯化的F(ab)<sub>2</sub>片段以10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的浓度孵育一小时。

[0397] 脾细胞凋亡。可以将亲和纯化的蛋白质(150 $\mu\text{g}$  SpA变体)注射到BALB/c小鼠(6周大,雌性,Charles River Laboratories)的腹腔中。注射后四小时,通过吸入CO<sub>2</sub>杀死动物。他们的脾脏可以被取出并均质化。可以使用细胞过滤器去除细胞碎片,悬浮的细胞可以转移到ACK裂解缓冲液(0.15M NH<sub>4</sub>Cl、10mM KHCO<sub>3</sub>、0.1mM EDTA)中以裂解红细胞。白细胞可以通过离心沉淀、悬浮在PBS中并用1:250稀释的R-PE偶联抗CD19单克隆抗体(Invitrogen)在冰浴和黑暗中染色一小时。细胞可用1%FBS洗涤,并用4%福尔马林在4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜。第二天,细胞可以在PBS中稀释并通过流式细胞术进行分析。剩余的器官可以进行组织病理检查。简而言之,脾脏可以在室温下在10%福尔马林中固定24小时。组织可以包埋在石蜡中、切片、用细胞凋亡检测试剂盒(Millipore)染色并通过光学显微镜检查。

[0398] 抗体定量。可以从健康的人志愿者或BALB/c小鼠中收集血清,这些小鼠已经感染了金黄色葡萄球菌Newman或USA300 30天,或者已经用上述SpA变体进行了免疫。人/小鼠IgG(杰克逊免疫学实验室)、SpA变体和CRM<sub>197</sub>可以印迹到硝酸纤维素膜上。可以用5%的全脂牛奶封闭膜,然后与人或小鼠血清孵育。IRDye 700DX偶联亲和纯化的抗人/小鼠IgG(Rockland)可用于使用Odyssey<sup>TM</sup>红外成像系统(Li-cor)定量信号强度。用人志愿者血液进行的实验涉及的方案都是在芝加哥大学机构审查委员会(IRB)的监管监督下进行审查、批准和实施的。统计分析。肾脓肿、ELISA、B细胞超抗原数据可采用双尾t检验进行统计学分析。可以通过使用这些实验对本文描述的变体(例如图12至15中所示的变体)进行测试。可以进行另外的分析,例如SPR分析,以确定与SpA、SpA/KKAA以及SpA/KKAA/F(SpA\*31)对照组相比,新SpA变体与人VH3-IgG和人VH3-IgE的结合亲和力。还可以测试可制造性(纯化的SpA\*变体/1克大肠杆菌细胞的产量)。CD光谱法可以检测与SpA和SpA/KKAA相比的 $\alpha$ -螺旋含量。还可以确定在可变温度(4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ ,1天至7天)下纯化和储存期间的蛋白质稳定

性。

[0399] 为了测试药物的安全性和有效性,可以进行罗勒组胺释放试验(图16)该测试是本领域已知的(参见,例如,Kowal,K等人,2005.Allergy and Asthma Proc.Vol.26,No.6)简而言之,人血清和/或嗜碱性粒细胞可以在37°C下孵育60分钟。可以从受刺激的(通过添加SpA变体)和未受刺激的细胞中检测组胺释放,结果可以表示为组胺释放占总组胺含量的百分比。在某些方面,组胺释放>16.5%是儿童和成人患者的阳性测试结果。

[0400] 实施例3 具有改进的安全性的SPA疫苗变体

[0401] B. 结果

[0402] 1. SpA候选疫苗的Gly<sup>29</sup>处的氨基酸置换

[0403] 本发明人试图通过实验鉴定在SpA-IgBD的Gly<sup>29</sup>位置上的氨基酸置换,其导致人IgG和SpA<sub>KK</sub>之间亲和力的最大降低,即五个IgBD(EDABC)也携带氨基酸置换Gln<sup>9,10</sup>Lys,这破坏了SpA和Fcγ之间的相互作用(48)。为了这个目标,发明人构建了十九种不同的质粒,编码N-末端多组氨酸标签的SpA<sub>Q9,10K/G29X</sub>,其中X是由遗传密码提供的19种天然氨基酸(甘氨酸除外)中的任何一种。SpA<sub>Q9,10K/G29X</sub>蛋白通过Ni-NTA树脂亲和层析纯化,洗脱,透析,通过BCA测定确定浓度,并以等浓度(250nM)与Bio-Rad ProteOn HTGchip结合。每个芯片都经过表面等离子共振实验,使用连续稀释的人IgG或PBS对照组。记录人IgG与芯片上加载的SpA候选疫苗的结合,并转换数据以推导出每种蛋白质的结合常数(表4)。作为对照组,发明人定量了野生型SpA(K<sub>A</sub> 1.081×10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>)和SpA<sub>KKAA</sub>对人IgG(K<sub>A</sub> 5.022×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)的结合常数。对于SpA<sub>Q9,10K/G29X</sub>蛋白,Gly<sup>29</sup>处的四个氨基酸置换导致结合常数显著增加:Gly<sup>29</sup>Ser(K<sub>A</sub> 9.398×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)、Gly<sup>29</sup>Lys(K<sub>a</sub> 9.738×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)、Gly<sup>29</sup>Ile(K<sub>A</sub> 10.070×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)和Gly<sup>29</sup>Ala(K<sub>A</sub> 11.310×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>),这表明这些变体与人IgG的vh3变体重链的结合比SpA<sub>KKAA</sub>更紧密(表4)。SpA<sub>Q9,10K/G29A</sub>的观察结果令我们惊讶。用于商业抗体纯化(MabSelectSure™)的ZZZZ构建体中的Gly<sup>29</sup>Ala置换减少了与V<sub>H</sub>3-IgG的结合(150),而Gly<sup>29</sup>Ala在SpA-IgBD中Gln<sup>9,10</sup>Lys的背景下可能会促进对V<sub>H</sub>3-IgG亲和力的适度增加。与SpA<sub>KKAA</sub>相比,Gly<sup>29</sup>处的10个氨基酸置换不会导致与以下结合常数的显著差异:Gly<sup>29</sup>Thr、Gly<sup>29</sup>Leu、Gly<sup>29</sup>Glu、Gly<sup>29</sup>pro、Gly<sup>29</sup>phe、Gly<sup>29</sup>Met、Gly<sup>29</sup>Val、Gly<sup>29</sup>Trp、Gly<sup>29</sup>Asp、Gly<sup>29</sup>Arg、Gly<sup>29</sup>Asn和Gly<sup>29</sup>Tyr(表4)。Gly<sup>29</sup>处的另外三个氨基酸的置换降低了结合常数:与SpA<sub>KKAA</sub>相比,Gly<sup>29</sup>His(K<sub>a</sub> 1.435×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>),Gly<sup>29</sup>Cys(K<sub>a</sub> 1.743×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)和Gly<sup>29</sup>Gln(K<sub>a</sub> 2.057×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)对人IgG的影响(表4)。因此,Gly<sup>29</sup>处的氨基酸置换不会对SpA-IgBD与人IgG的结合产生普遍影响。Gly<sup>29</sup>上的某些氨基酸置换增加了人IgG和SpA<sub>Q9,10K/G29X</sub>之间的亲和力,而其他氨基酸置换是中性的(没有显著影响)或降低亲和力。

[0404] 2. SpA候选疫苗的Ser33处的氨基酸置换

[0405] 为了鉴定导致人IgG和SpA<sub>KK</sub>之间亲和力最大降低的SpA-IgBD位置Ser<sup>33</sup>处的氨基酸置换,发明人构建了19种不同的质粒,编码N端多组氨酸标记的SpA<sub>Q9,10K/S33X</sub>,其中X是任何一个由遗传密码提供的19种天然氨基酸(丝氨酸除外)中的一种。SpA<sub>Q9,10K/S33X</sub>蛋白通过Ni-NTA树脂亲和层析纯化、洗脱、透析、通过BCA测定确定浓度,并以等浓度(250nM)与Bio-Rad ProteOn HTG芯片结合。用连续稀释的人IgG和PBS对照组对每个芯片进行表面等离子共振实验。记录人IgG与加载在芯片上的SpA候选疫苗的结合,并将数据转换为每个蛋白质的结合常数(表5)。Ser<sup>33</sup>处的两个氨基酸置换导致对人IgG的亲和力增加:Ser<sup>33</sup>Gly(K<sub>A</sub> 11.180×

$10^5\text{M}^{-1}$ )和 $\text{Ser}^{33}\text{Ala}$  ( $K_A 10.540 \times 10^5\text{M}^{-1}$ ),表明这些变体对人IgG的亲和力高于 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$  (可能是由于对 $V_H3$ 变体重链的亲和力增加) (表5)。 $\text{Ser}^{33}$ 处的14个氨基酸置换不会导致结合常数的显著差异: $\text{Ser}^{33}\text{Tyr}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Leu}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Trp}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Val}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{His}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Asn}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Met}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Arg}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Asp}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Phe}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Gln}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Pro}$ 、 $\text{Ser}^{33}\text{Cys}$ 和 $\text{Ser}^{33}\text{Lys}$  (表5)。 $\text{Ser}^{33}$ 处的三个氨基酸置换降低了对人IgG和 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33X}}$ 的亲和力: $\text{Ser}^{33}\text{Thr}$  ( $K_A 0.386 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )、 $\text{Ser}^{33}\text{Glu}$  ( $K_A 0.496 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )和 $\text{Ser}^{33}\text{Ile}$  ( $K_A 1.840 \times 10^5\text{M}^{-1}$ ) (表5)。因此, $\text{Ser}^{33}$ 处的某些氨基酸置换增加了人IgG和 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33X}}$ 之间的亲和力,而其他的则是中性的(没有显著影响)或减少与人IgG的结合。在降低人IgG之间的亲和力的那些中, $\text{Ser}^{33}\text{Glu}$ 和 $\text{Ser}^{33}\text{Thr}$ 表现出结合常数的最大降低(表5)。

[0406] 3. 在SpA候选疫苗中结合Gly29、Ser33和Asp36,37的氨基酸置换

[0407] 与 $\text{Ser}^{33}$ 处的单个氨基酸置换相比,IGBD的Gly<sup>29</sup>、 $\text{Ser}^{33}$ 或 $\text{Asp}^{36,37}$ 位的氨基酸置换组合是否引起对人IgG亲和力的进一步降低,或者多个置换发挥矛盾效应,这也可以增加两种蛋白质之间亲和力?为了解决这个问题,发明人比较了在 $\text{Ser}^{33}$ 处具有氨基酸置换的三种蛋白质的结合常数: $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33E}}$  (亲和力降低)、 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33F}}$  (亲和力不受影响)和 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33Q}}$  (亲和力不受影响) - 在Gly<sup>29</sup>和/或 $\text{Asp}^{36,37}$ 处携带附加氨基酸置换的那些(表6)。对于 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33E}}$  ( $K_A 0.496 \times 10^5\text{M}^{-1}$ ,没有观察到添加置换Gly<sup>29</sup>Ala ( $K_A 1.265 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )、Gly<sup>29</sup>phe ( $K_A 1.575 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )、 $\text{Asp}^{36,37}$ Ala ( $K_A 0.568 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )、Gly<sup>29</sup>Ala/ $\text{Asp}^{36,37}$ Ala ( $K_A 1.892 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )或Gly<sup>29</sup>Arg ( $K_A 4.840 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )的附加效果。然而,将 $\text{Asp}^{36,37}$ Ala与Gly<sup>29</sup>phe ( $K_A 14.850 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )或Gly<sup>29</sup>Arg ( $K_A 10.240 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )组合增加了 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33E}}$ 对人IgG的亲和力(表6)。当分析 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33F}}$  ( $K_A 3.902 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )时,其结合常数与 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ 的结合常数没有显著差异,发明人观察到类似的效果。除了 $\text{Asp}^{36,37}$ Ala与Gly<sup>29</sup>phe ( $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33Q/D36,37A/Gly29F}}$   $K_A 12.470 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )组合外,没有任何置换改变 $\text{SpA}_{\text{Q9,10K/S33F}}$ 对人IgG的亲和力,这再次增加了亲本疫苗对人IgG的亲和力(表6)。因此,将SpA-IGBD的Gly<sup>29</sup>、 $\text{Ser}^{33}$ 和 $\text{Asp}^{36,37}$ 处的氨基酸置换组合起来并不会降低对人IgG的亲和力。在每种情况下,重组SpA候选疫苗的亲和力都需要通过实验来确定。

[0408] SpA-KR是 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ 的变体,在IGBD的E结构域中有两个附加的氨基酸置换,其N端有六个残基延伸,氨基酸序列为ADAQQN(国际专利申请WO 2015/144653AI)。发明者-Fabio Bagnoli、Luigi Fiaschi和Maria Scarselli(Glaxo-SmithKline INC.) -推测 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ 的E结构域的六肽延伸部分中的两个谷氨酰胺(QQ)残基可能构成人IgG的额外结合位点,但没有说明这些残基可以在哪里结合免疫球蛋白,即Fc $\gamma$ 或 $V_H3$ 重链,或提供这种约束力的实验证明。当分析其对人IgG的亲和力时, $\text{SpA-KR}$  ( $K_A 5.464 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )的结合常数与 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ 的结合常数没有显著差异,表明SpA-KR也可能对 $V_H3$ -IgG表现出交联活性(表6)。 $\text{SpA}_{\text{RRVV}}$ 是一种SpA疫苗变体,在专利申请EP3101027A1(OLYMVAX INC.)中有描述。与 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ 类似, $\text{SpA}_{\text{RRVV}}$ 在SpA的五个IGBD中的每一个的Gln<sup>9,10</sup>和 $\text{Asp}^{36,37}$ 处都有氨基酸置换,尽管这些置换用精氨酸(Arg或R)代替了Gln<sup>9,10</sup>,用缬氨酸(Val或R)代替了 $\text{Asp}^{36,37}$ 。当分析其对人IgG的亲和力时, $\text{SpA}_{\text{RRVV}}$  ( $K_A 5.609 \times 10^5\text{M}^{-1}$ )的结合常数与 $\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ 的相似,表明 $\text{SpA}_{\text{RRVV}}$ 也可能表现出对 $V_H3$ -IgG的交联活性(表6)。

[0409] 4. SpA疫苗变体对人IgG的VH3-独特型和Fab片段的交联活性

[0410] SpA疫苗临床开发的一个关键安全问题是嗜碱性粒细胞和肥大细胞表面缺乏与

V<sub>H</sub>3-独特型IgE和IgG的交联活性,否则会触发组胺释放和过敏反应(140、142、145)。为了定量SpA疫苗候选的V<sub>H</sub>3交联活性,发明人使用了用木瓜蛋白酶切割的纯化人IgG(54%V<sub>H</sub>3独特型变体重链)和使用SpA<sub>KK</sub>(75)上的亲和层析纯化的V<sub>H</sub>3-克隆Fab片段(表7)。当使用表面等离子体激元共振技术(SPR)检测与SpA及其变体的亲和力时,野生型蛋白A(SpA)的IgBD表现出有效的交联活性( $K_A$   $1.44 \times 10^7 M^{-1}$ ,表7)。SpA<sub>KKAA</sub>( $K_A$   $8.27 \times 10^4 M^{-1}$ )和SpA-KR( $K_A$   $6.42 \times 10^4 M^{-1}$ )对V<sub>H</sub>3-Fab的亲和力降低,尽管与SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>( $K_A$   $41.24 M^{-1}$ )和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>( $K_A$   $43.55 M^{-1}$ )相比,这两种变体都保留了显著的交联活性(表7)。SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>表现出与PBS对照组相似的结合特性(即未添加配体时获得的值)。因此,氨基酸置换Ser<sup>33</sup>Glu和Ser<sup>33</sup>Thr分别消除了候选疫苗SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>中的V<sub>H</sub>3-IgE和V<sub>H</sub>3-IgG交联活性。

#### [0411] 5. SpA疫苗变体的Fc $\gamma$ 结合活性

[0412] Deisenhofer解析了与人Fc $\gamma$ 结合的SpA B结构域(IgBD-B)的晶体结构,并确定了两个分子之间的界面(154)。四个氢键促进SpA(B结构域编号,图20B)和Fc $\gamma$ 之间的相互作用:Gln<sup>9</sup>(IgG Ser<sup>254</sup>)、Gln<sup>10</sup>(IgG Gln<sup>311</sup>)、Asn<sup>11</sup>(IgG Asn<sup>434</sup>)和Tyr<sup>14</sup>(IgG Leu<sup>432</sup>)(54)。这些B结构域残基在所有五个IgBD中都是保守的(图20),暗示了Fc $\gamma$ 结合的通用机制(43)。早期的工作表明,在IgBD-D或SpA的所有五种IgBD中置换Gln<sup>9,10</sup>Lys会减少SpA<sub>KK</sub>(SpA<sub>Q9,10K</sub>)与人、小鼠和豚鼠IgG Fc $\gamma$ 的结合(76、43)。由于新设计的SpA疫苗变体SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>在其五个IgBD中保留了Gln<sup>9,10</sup>Lys氨基酸的置换,因此发明人推测这些变体在与Fc $\gamma$ 的结合方面也应该表现出明显的缺陷。为了验证这一猜想,发明人使用了用木瓜蛋白酶切割的纯化的人IgG,并纯化了所得的Fc $\gamma$ 片段(表8)。当使用生物层干涉仪(BLI)对SpA及其变体的亲和力检测进行检查时,野生型蛋白A的IgBD对Fc $\gamma$ ( $K_A$   $5.17 \times 10^7 M^{-1}$ )表现出高亲和力。SpA<sub>KKAA</sub>( $K_A$   $32.68 M^{-1}$ )、SpA-KR( $K_A$   $39.12 M^{-1}$ )、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>( $K_A$   $32.68 M^{-1}$ )和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>( $K_A$   $39.91 M^{-1}$ )的Fc $\gamma$ 结合活性被分别消除。因此,Ser<sup>33</sup>Glu和Ser<sup>33</sup>Thr置换不会干扰Gln<sup>9,10</sup>Lys对SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>的螺旋1中Fc $\gamma$ 结合的影响(表8)。

#### [0413] 6. SpA疫苗候选者过敏活性的小鼠模型

[0414] 临床和实验研究表明,血管通透性过高是过敏反应的标志(155、156)。激活的肥大细胞或嗜碱性粒细胞释放血管活性介质,包括组胺和血小孔板激活因子,通过引起血管舒张和内皮屏障破坏来诱导血管通透性过高的过敏反应(156)。这些事件可以在过敏性血管通透性过高的鼠模型中检测,因为静脉内施用的染料伊文思蓝在实验部位(耳组织)的外渗于24小时前通过皮内注射2 $\mu$ g人V<sub>H</sub>3-独特型IgG进行了准备(157)。随后将五只动物群中伊文思蓝到耳组织中的血管渗漏进行定量(ng染料/mg组织),计算平均值和标准偏差(SD),并分析数据的静态显著差异。野生型C57BL/6小鼠的血浆仅含有5%至10%的具有V<sub>H</sub>3-独特型变体重链的免疫球蛋白(48)。因此,与豚鼠(20%至30%的V<sub>H</sub>3-独特型变体重链)不同,小鼠对SpA诱发的过敏性休克具有抗性(140)。因此,发明人选择了 $\mu$ MT小鼠进行研究;这些动物缺乏功能性IgM B细胞受体,在前B细胞阶段阻止B细胞发育,并且不能产生血浆IgG(158)。 $\mu$ MT小鼠用作受体,将2 $\mu$ g人V<sub>H</sub>3-独特型IgG皮内注射到耳组织中。24小时后,将200 $\mu$ g SpA、SpA疫苗变体或缓冲液对照组(PBS)静脉注射到小鼠体内。SpA治疗后5分钟,将2%伊文思蓝溶液静脉注射到小鼠体内以评估耳组织中的血管通透性。30分钟后,动物被安乐死,耳组织被切除,干燥并用甲酰胺提取用于染料的分光光度法定量。与PBS对照组[34.73( $\pm$ )

8.474ng伊文思蓝/mg耳组织]相比,SpA治疗引起过敏性血管通透性过高,释放124.9ng/mg ( $\pm 26.54$ ng/mg)伊文思蓝(PBS与SpA, $P < 0.0001$ ) (图22)。在通过皮内注射人V<sub>H</sub>3-IgG预处理的动物群中,静脉注射SpA<sub>KKAA</sub>也导致血管通透性过高[70.31ng/mg ( $\pm 23.04$ ng/mg);PBS相对于SpAKKAA, $P < 0.01$ ],尽管水平低于野生型SpA (SpA相对于SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.0001$ ) (图22)。相比之下,静脉注射200 $\mu$ g SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>[38.57ng/mg ( $\pm 15.07$ ng/mg);SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>相对于PBS,不显著]或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>[41.43ng/mg ( $\pm 13.15$ ng/mg);SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>相对于PBS,不显著]在 $\mu$ MT小鼠中用V<sub>H</sub>3-独特型人IgG处理的部位没有引起血管通透性过高(图22)。作为比较,SpA-KR候选疫苗引发了与SpA<sub>KKAA</sub>相似的过敏性血管通透性过高(图22)。因此,与SpA和SpA<sub>KKAA</sub>不同,SpA和SpA<sub>KKAA</sub>通过交联与激活肥大细胞和嗜碱性粒细胞上的Fc $\epsilon$ RI结合的V<sub>H</sub>3独特型IgG或其他效应细胞上的Fc $\gamma$ R来触发血管高渗透性,但SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>不能交联V<sub>H</sub>3独特型IgG以促进 $\mu$ MT小鼠在用V<sub>H</sub>3-独特型人IgG预处理的部位发生过敏反应。

#### [0415] 7. V<sub>H</sub>3-IgE的SpA候选疫苗交联

[0416] 嗜碱性粒细胞和肥大细胞是过敏反应的两个主要效应细胞,并在抗原介导的IgE交联到其表面受体Fc $\epsilon$ RI上时分泌促炎介质。大量表达SpA或可溶性纯化SpA的金黄色葡萄球菌Cowan I菌株可以激活嗜碱性粒细胞以诱导组胺释放。这种刺激作用取决于蛋白A的Fab结合活性(145)。为了研究SpA候选疫苗与结合在嗜碱性粒细胞表面的循环IgE或IgG的潜在交联效应,将在PBS中纯化的疫苗变体添加到新鲜抽取的用EDTA抗凝的人血中30分钟。野生型SpA用作阳性对照组。PBS用作阴性对照组。细胞用抗CD123、抗CD203c、抗HLA-DR(去除树突细胞和单核细胞)和抗CD63染色。通过对SSC<sup>low</sup>CD203c<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>/HLA-DR-细胞进行阀门来鉴定嗜碱性粒细胞。CD123嗜碱性粒细胞激活表示为CD63的比例,并针对阴性和阳性对照组进行校正。与PBS对照组(4.39%激活嗜碱性粒细胞)相比,SpA或SpA<sub>KKAA</sub>处理导致CD63<sup>+</sup>激活嗜碱性粒细胞数量显著增加,分别为32.05% (PBS与SpA, $P < 0.0001$ )和10.66% (PBS与SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.01$ ) (表9)。与SpA<sub>KKAA</sub>相比,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>[5.38%;SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>相对于SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.05$ ]或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>[4.57%;SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>相对于SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.01$ ]不能激活嗜碱性粒细胞并且表现得类似于PBS对照组(表9)。在该实验中,SpA-KR[8.15%]和SpA<sub>RRVV</sub>[10.16%]候选疫苗显示出与SpA<sub>KKAA</sub>相似的嗜碱性粒细胞激活。因此,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>不能交联血液中的循环IgE,也不能通过结合高亲和力受体Fc $\epsilon$ RI来致敏嗜碱性粒细胞。与SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>不同,SpA<sub>KKAA</sub>、SpA-KR和SpA<sub>RRVV</sub>候选疫苗保留了显著的IgE交联活性,从而引发了不需要的全身性过敏反应。

[0417] 通过抗原触发的 $\beta$ -氨基己糖苷酶和组胺释放来检测肥大细胞的功能反应。本实验采用人肥大细胞株LAD2。肥大细胞( $2 \times 10^5$ 个细胞/mL)在用100ng/mL V<sub>H</sub>3 IgE孵育过夜后致敏,然后用SpA疫苗变体(10 $\mu$ g)刺激30分钟,检测 $\beta$ -氨基己糖苷酶(图23A)或组胺的释放(图23B)。与野生型SpA孵育可诱导约35%的 $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放。SpA<sub>KKAA</sub>和SpA-KR疫苗分别引起10.32%和9.87%的 $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放,没有显著差异(SpA-KR相对于SpA<sub>KKAA</sub>,不显著)。与SpA野生型相比,这些降低是显著的(SpA相对于SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.0001$ ;SpA相对于SpA-KR, $P < 0.0001$ )。然而,SpA<sub>KKAA</sub>和SpA-KR疫苗保留了高于阴性对照组水平的 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放活性(SpA<sub>KKAA</sub>相对于PBS, $P < 0.0001$ ;SpA-KR相对于PBS, $P < 0.0001$ ) (图23A)。相比之下,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>[6.46%;SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>相对于SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.01$ ]和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>[4.43%;SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>相对于SpA<sub>KKAA</sub>, $P < 0.0001$ ]导致的 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放与SpA<sub>KKAA</sub>相比显著减

少。SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>表现出与PBS对照组相似的 $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放(图23A)。

[0418] 在评估组胺释放时获得了类似的结果(图23B)。SpA刺激最高水平的组胺释放; SpA<sub>AKKAA</sub>和SpA-KR疫苗保留了高于PBS对照组水平的组胺释放活性,并且SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>都表现得像阴性对照组PBS[SpA相对于PBS或SpA<sub>AKKAA</sub>或SpA-KR或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,  $P < 0.0001$ ; SpA<sub>AKKAA</sub>相对于SpA-KR或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>, 不显著; SpA<sub>AKKAA</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>或PBS,  $P < 0.05$ ; SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>相对于SpA-KR,  $P < 0.01$ ]。

[0419] 总之, SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>已经失去了激活V<sub>H</sub>3-独特型IgE致敏的肥大细胞的能力,并代表了具有适合人临床试验安全性的候选疫苗。

[0420] 8. SpA候选疫苗在金黄色葡萄球菌定植模型中的免疫原性和功效

[0421] 与仅用佐剂免疫的C57BL/6小鼠群相比(模拟),用SpA<sub>AKKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>免疫产生了SpA中和抗体(图25A)。正如预期的那样,SpA<sub>AKKAA</sub>免疫从鼻内定植后21天开始从C57BL/6小鼠的鼻咽和胃肠道诱导金黄色葡萄球菌WU1的去定植(图24AB-C)。此外,在去定植小鼠中,SpA<sub>AKKAA</sub>免疫与增加的病原体特异性IgG(包括抗C1fB、抗IsdA、抗IsdB、抗SasG)抗体相关,这些抗体与金黄色葡萄球菌去定植相关[(102)和数据未显示]。在用SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>免疫C57BL/6小鼠后观察到类似的结果。与模拟对照组相比,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>疫苗接种与SpA<sub>AKKAA</sub>疫苗接种类似,促进了来自C57BL/6小鼠鼻咽和胃肠道的金黄色葡萄球菌WU1去定植(图24BC)。在去定植小鼠中,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>疫苗接种与病原体特异性IgG(包括抗C1fB、抗IsdA、抗IsdB、抗SasG;数据未显示)的增加有关。与SpA<sub>AKKAA</sub>免疫的动物相比,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>疫苗接种引发了相似水平的金黄色葡萄球菌去定植,表明这两种疫苗在小鼠定植模型中表现出相似的保护功效。SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>疫苗接种引发了与SpA<sub>AKKAA</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>疫苗接种相似的金黄色葡萄球菌去定植水平(数据未显示)。当在同一天用SpA<sub>AKKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>对动物群进行免疫接种时,大约50%的动物在鼻咽和胃肠道中发生了去定植,而所有仅接受佐剂的动物(模拟)保持定植(图24DE)。该数据还证明所有三种候选疫苗在金黄色葡萄球菌的定植模型中表现相似。

[0422] 9. SpA候选疫苗在金黄色葡萄球菌血流感染小鼠模型中的功效

[0423] 早期的工作表明,用SpA<sub>AKKAA</sub>对BALB/C小鼠进行免疫接种会引发SpA特异性抗体,从而保护动物免受静脉MRSA USA300 LAC血流激发和随后肾组织中脓肿病变的形成(43)。与模拟(单独佐剂)免疫的小鼠相比,用SpA<sub>AKKAA</sub>、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>免疫可显著产生针对SpA<sub>AKKAA</sub>、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>的高滴度抗体(图25A)。当通过ELISA分析SpA<sub>AKKAA</sub>时,在BALB/c小鼠中由SpA<sub>AKKAA</sub>免疫诱导的SpA-特异性抗体滴度显著高于SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>的分析结果(SpA<sub>AKKAA</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>,  $P < 0.0001$ ; SpA<sub>AKKAA</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,  $P < 0.0001$ )。以类似的方式,当通过ELISA分析SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>时, BALB/c小鼠中由SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>免疫诱导的SpA特异性抗体滴度显著高于SpA<sub>AKKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>(SpA<sub>AKKAA</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>,  $P < 0.001$ ; SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,  $P < 0.05$ )的分析结果,而通过ELISA分析SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>时,在BALB/c小鼠中由SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>免疫诱导的SpA特异性抗体滴度显著高于SpA<sub>AKKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>的分析结果(SpA<sub>AKKAA</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,  $P < 0.05$ ; SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>相对于SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,  $P < 0.05$ ) (图25A)。这些结果表明,在BALB/c小鼠中SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>疫苗接种产生的抗体的表位,与SpA<sub>AKKAA</sub>疫苗接种产生的抗体的表位不同的,只有某些而非全部,反之亦然。如早先报道的(43),与模拟免疫小鼠相比,SpA<sub>AKKAA</sub>疫苗接种减少了MRSA

USA300 LAC的细菌负荷和BALB/c小鼠中脓肿病变的数量(图25B; $P < 0.0001$ )。与SpA<sub>KKAA</sub>疫苗接种相比,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>疫苗接种对MRSA USA300 LAC血流感染产生了类似的保护。与模拟免疫的动物相比,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>免疫降低了BALB/c小鼠的细菌负荷和脓肿病变数量(图25C; $P < 0.0001$ )。因此,SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>疫苗接种在小鼠中引发了类似的针对MRSA USA300 LAC血流感染和相关脓肿形成的保护作用,如先前报道的SpA<sub>KKAA</sub>候选疫苗(43)。

[0424] 10. SpA候选疫苗与SpA中和单克隆抗体3F6的结合

[0425] 小鼠杂交瘤单克隆抗体(hMAb)3F6(IgG2a)是使用来自SpA<sub>KKAA</sub>-免疫的BALB/c小鼠的脾细胞产生的(84)。hMAb 3F6的基因被测序并克隆到表达载体中,用于从HEK293 F细胞中纯化重组rMAb 3F6(146)。hMAb3F6和rMAb 3F6都与五种SpA IgBD(E、D、A、B和C)中的每一种的三螺旋折叠结合,并中和它们结合人IgG或IgM的能力(84、146)。以5mg/kg的剂量静脉注射hMAb3F6或rMAb 3F6可保护BALB/c小鼠免受与肾脓肿形成和细菌复制(细菌负荷)相关的金黄色葡萄球菌血流感染(84、146)。此外,向C57BL/6小鼠静脉注射rMAb 3F6(5mg/kg)可诱导金黄色葡萄球菌WU1从预定植动物的鼻咽和胃肠道去定植(146)。在此,发明人询问rMAb 3F6是否将与SpA<sub>KKAA</sub>相似的亲和力结合SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,SpA<sub>KKAA</sub>是衍生单克隆抗体的同源抗原(84)。当使用固定浓度的配体和连续稀释的rMAb 3F6通过ELISA检测时,本发明人推导出SpA<sub>KKAA</sub>( $K_a 1.51 \times 10^{10} M^{-1}$ )、SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>( $K_a 1.42 \times 10^{10} M^{-1}$ )和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>( $K_a 1.34 \times 10^{10} M^{-1}$ )结合SpA候选疫苗的亲和常数(图26)。这些数据表明,氨基酸置换Ser<sup>33</sup>Glu和Ser<sup>33</sup>Thr不影响SpA中和的rMAb 3F6的结合。此外,氨基酸置换Ser<sup>33</sup>Glu和Ser<sup>33</sup>Thr不会破坏由rMAb 3F6结合所决定的保护性SpA表位。

[0426] C. 讨论

[0427] 本发明人在此表明,当使用人IgG的F(ab)<sub>2</sub>片段作为配体时,金黄色葡萄球菌候选疫苗-SpA<sub>KKAA</sub>和SpA-KR-保留了与V<sub>H</sub>3-独特型免疫球蛋白的显著结合。当用V<sub>H</sub>3-IgG包被的人肥大细胞(LAD2细胞)进行分析时,SpA<sub>KKAA</sub>和SpA-KR会触发V<sub>H</sub>3-Ig交联,这通过 $\beta$ -氨基己糖苷酶和组胺的释放来衡量(145)。在过敏性血管通透性过高的鼠模型中,这种组胺释放的生物学效应可通过伊文思蓝染料在 $\mu$ MT小鼠中V<sub>H</sub>3-IgG施用的解剖部位的外渗来衡量。这些观察结果共同引起了人们对SpA候选疫苗作为人过敏反应的潜在激活剂的安全性的担忧。

[0428] 为了解决SpA疫苗的问题,发明人设计了两种新抗原SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>,具有更高的安全性。SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>对V<sub>H</sub>3-独特型免疫球蛋白缺乏亲和力,对V<sub>H</sub>3-IgE包被的人肥大细胞释放组胺的活性降低或没有活性,并且不会促进伊文思蓝染料外渗以响应 $\mu$ MT小鼠中V<sub>H</sub>3-IgG的注射。用SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>对BALB/c小鼠进行免疫接种引发了与SpA<sub>KKAA</sub>相似的SpA-特异性IgG反应水平。当在小鼠模型中分析疫苗效力时,接种SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>可提供与SpA<sub>KKAA</sub>疫苗相似水平的防止金黄色葡萄球菌定植或侵入性血流感染的保护(43)。此外,氨基酸置换Ser<sup>33</sup>Glu和Ser<sup>33</sup>Thr不会干扰保护性IgBD表位,该保护性IgBD表位由金黄色葡萄球菌定植和入侵性疾病保护性单克隆抗体3F6决定(84、146)。基于这些观察,发明人假设金黄色葡萄球菌候选疫苗SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>可能适合开发为临床级疫苗,用于针对金黄色葡萄球菌定植和入侵性疾病的临床安全性和有效性测试。

[0429] D. 材料和方法

[0430] 细菌菌株和生长条件。金黄色葡萄球菌菌株USA300 (LAC) 和WU1在胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB) 或胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA) 中37℃下生长。大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 和BL21 (DE3) 在37℃下在含有100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素和1mM异丙基 $\beta$ -d-1-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 的溶原肉汤 (LB) 培养基中生长,用于产生重组蛋白。

[0431] SpA变体的构建。SpA变体的编码序列由Integrated DNA Technologies, Inc.合成。序列和质粒pET15b+分别由NdeI和BamHI酶切。然后,将两种酶切产物连接并转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,以产生表达N端六组氨酸 (His6) 标记重组蛋白的克隆。通过DNA测序验证候选克隆。将正确的质粒转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 中,用于生产SpA候选变体。

[0432] 蛋白质的纯化。将在添加氨苄西林和IPTG的LB中培养的大肠杆菌培养物 (2升) 离心 (10000 $\times$ g, 10分钟), 其在600nm (A600) 处的吸光度为2.0。沉淀的细胞悬浮在缓冲液A (50mM Tris-HCl [pH 7.5], 150mM NaCl) 中, 所得悬浮液在细胞破碎机中在140001b/in2 (Thermo Spectronic, Rochester, NY) 的压强下裂解。通过离心 (5000 $\times$ g 15分钟) 去除未破碎的细胞, 并对粗裂解物进行超速离心 (100000 $\times$ g, 4℃下1小时)。可溶性重组蛋白通过重力流在Ni-NTA琼脂糖 (QIAGEN) 上进行层析, 填充体积为1mL, 用缓冲液A预平衡。用20个床体积的缓冲液A洗涤柱子, 20个床体积的缓冲液A含有10mM咪唑并用6mL含有500mM咪唑的缓冲液A洗脱。将洗脱部分的等分试样与等体积的样品缓冲液混合, 并在15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶上进行分离。重组蛋白用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 透析, 并用二辛可宁酸测定法 (Pierce) 测定其浓度。对于动物免疫研究和与细胞系孵育, 重组蛋白制剂经过内毒素去除离心柱 (Pierce) 以消除污染的LPS。使用ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript) 测试样品纯度。

[0433] 抗体的纯化。为了纯化VH3IgG, 使用全人血制备的人血浆 (20mL) 在蛋白G树脂 (Genscript) 上进行亲和层析以去除人IgM、IgD和IgA。从蛋白G树脂洗脱的免疫球蛋白进行第二次亲和层析, SpA<sub>KK</sub>-偶联树脂以富集VH3 IgG [SpA<sub>KK</sub>不能结合IgG的Fc $\gamma$ 结构域 (48)]。蛋白质G树脂和SpA<sub>KK</sub>偶联树脂用20倍柱体积的PBS洗涤, 结合的蛋白质用0.1M、pH 3.0的甘氨酸洗脱, 用1M、pH 8.5的Tris-HCl中和, 并用PBS透析过夜。对于VH3IgE纯化, 人细胞系HEK 293F用于瞬时表达pVITR01-Transtuzumab-IgE- $\kappa$ 。细胞在含有10% FCS、2mM谷氨酰胺、青霉素 (5000U/mL) 和链霉素 (100 $\mu$ g/mL) 的DMEM/高葡萄糖培养基中生长。使用PE转染pVITR01-Transtuzumab-IgE- $\kappa$ 的细胞在37℃下在5% CO<sub>2</sub>气氛中孵育。为了稳定表达IgE, 将细胞在Freestyle 293培养基中培养7天, 然后以12000xg的速度收获20分钟。上清液用2mL蛋白L树脂 (Genscript) 纯化。树脂用20倍柱体积的PBS洗涤, 结合的VH3IgE用0.1M、pH 3.0的甘氨酸洗脱, 用1M、pH 8.5的Tris-HCl中和, 并用PBS透析过夜。

[0434] 表面等离子体激元共振技术 (SPR)。表4、5、6、8中显示的SPR实验是在用ProteOn HTG芯片在ProteOn™ XPR36上进行的。运行缓冲液是含有0.05%吐温-20的PBS。传感器芯片表面分别用2mM硫酸镍激活和300mMEDTA再生。以25 $\mu$ L/min的流速固定了500nM的测试样品 (SpA野生型或变体)。为了检测与野生型SpA的相互作用, 使用配体 (纯化的免疫球蛋白) 的浓度为500nM、400nM、300nM、200nM和100nM的。为了检测与SpA变体的相互作用, 使用的配体浓度为4 $\mu$ M、3 $\mu$ M、2 $\mu$ M、1 $\mu$ M和0.5 $\mu$ M。在30 $\mu$ L/min的连续流速下检测结合和解离速率, 并使用双态反应模型进行分析。结合常数由三个独立实验确定。

[0435] 生物层干涉检测 (BLI)。表8中所示的BLI实验是使用BLItz生物层干涉仪进行的。

将测试候选物 (25nM-50nM) 固定在Ni-NTA传感器上120秒。传感器用PBS平衡80秒,然后浸入含有浓度为20 $\mu$ M、15 $\mu$ M、10 $\mu$ M和0 $\mu$ M的配体的溶液中120秒(结合阶段),然后在PBS中浸入120秒(解离阶段)。使用BLI数据采集软件9.0 (FortéBIO) 采集数据并使用数据分析软件9.0.0.14(FortéBIO) 进行分析。从曲线拟合模型计算报告的结合值。

[0436] 酶联免疫吸附实验(ELISA)。微量滴定孔板(NUNC MaxiSorp) (pH 9.5) 中以1 $\mu$ g/mL (以检测测试血清中的抗体滴度) 或0.5 $\mu$ g/mL (以检测与3F6抗体的相互作用) 的纯化抗原在0.1M碳酸盐缓冲液中于4 $^{\circ}$ C下包被过夜。在与辣根过氧化物酶(HRP) 偶联的小鼠或人IgG(1 $\mu$ g/mL, Jackson ImmunoResearch) 孵育之前,将孔封闭并与测试血清或3F6抗体一起孵育。所有孔板均与小鼠HRP偶联的特异性二抗(Fisher Scientific) 一起孵育,并使用OptEIA试剂(BD Biosciences) 显色。半最大滴度用GraphPad Prism软件计算。从GraphPad Prism软件中的非线性回归(曲线拟合) 模型计算结合常数。所有实验重复三次,以计算平均值和平均值的标准误差,并重复进行以检验其可重复性。

[0437]  $\mu$ MT小鼠的过敏反应。带有 $\mu$ MT突变的小鼠购自Jackson实验室并在Chicago大学饲养。每组5只6周龄雌性小鼠群通过皮内注射VH3IgG(20 $\mu$ L PBS中2 $\mu$ Lg) 致敏,24小时后,在麻醉下静脉注射氯胺酮-甲苯噻嗪(100mg至20mg)/kg) 注入右眼的眶周静脉窦,使用PBS、SpA或其变体(200 $\mu$ g在100 $\mu$ L PBS中)。在用测试样品刺激5分钟后,将100 $\mu$ L 2%伊文思蓝静脉注射到动物左眼的眶周静脉窦。杀死动物,解剖耳朵,干燥并在甲酰胺中于65 $^{\circ}$ C下提取24小时。通过检测620nm处的吸光度来定量耳组织中的伊文思蓝外渗(血管通透性)。

[0438] 人嗜碱性粒细胞激活实验。血液(10mL) 取自健康献血者,并立即与pH 7.5、0.1M 1mL的EDTA混合。将SpA野生型或候选疫苗变体(1 $\mu$ g) 或PBS添加到1mL EDTA血液等分试样中,并将样品于37 $^{\circ}$ C下旋转孵育1小时。样品等分试样用RBC裂解缓冲液(Biolegend) 处理,离心(350xg) 并丢弃上清液。沉淀中的细胞在冷PBS中洗涤并重新悬浮在含有5%FBS的PBS中,用抗CD123-FITC、抗HLA-DA-PerCP、抗CD63-PE和抗CD203c-APC(Biolegend) 在室温下避光染色10分钟。使用BD LSRII 3-8(BD Biosciences) 分析所有染色的样品。通过从SSC<sup>low</sup>/CD203c<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>/HLA-DR-细胞门控获得总嗜碱性粒细胞计数,并从CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup>池中选择激活的嗜碱性粒细胞。实验重复三次,并使用不同的健康供体重复至少三次。

[0439] 肥大细胞脱粒。人肥大细胞(LAD2) [由NIAID的Kirshenbaum博士友情提供] 通过将2x10<sup>5</sup>个细胞与100ng VH3 IgE一起于37 $^{\circ}$ C下5%CO<sub>2</sub>气氛中孵育过夜来致敏。收获细胞并用含有0.04%牛血清白蛋白(BSA) 的HEPES缓冲液洗涤两次以去除游离的IgE。将细胞以2x10<sup>5</sup>个细胞/mL的浓度悬浮在相同的缓冲液中,并在检测 $\beta$ -氨基己糖苷酶和组胺释放之前用SpA或测试样品刺激30分钟。沉淀细胞并将用过的培养基转移到新管中,同时用0.1%Triton X-100裂解沉淀中的细胞。通过添加比色底物pNAG(从Sigma获得的对硝基苯基-N-乙酰基- $\beta$ -D-氨基葡萄糖;最终浓度3.5mg/mL, pH 4.5) 90分钟。通过添加pH 10.7的0.4M甘氨酸将反应淬灭,并记录 $\lambda = 405$ nm处的吸光度。结果表示为消耗培养基中释放的 $\beta$ -氨基己糖苷酶占总量(消耗培养基+Triton X-100裂解细胞) 的百分比。实验进行三次且每组实验重复至少三次。使用酶免疫测定法(SpiBio Bertin Pharma) 检测组胺。简而言之,微量滴定孔板的孔用小鼠抗组胺抗体包被,并与混合有实验提取物的示踪剂(与组胺相连的乙酰胆碱酯酶) 孵育24小时。将孔板洗涤,并将埃尔曼试剂(乙酰胆碱酯酶底物) 加入孔中。通过记录412nm处吸光度来检测产物的形成。412nm处的吸光度与结合在孔上的示踪剂的量成正比,与实验提

取物中存在的组胺量成反比。所有样品分两份进行。

[0440] 小鼠主动免疫。动物BALB/c或C57BL/6J(3周大,雌性小鼠,每组15只动物)用PBS或以5:2:3的抗原乳化的50 $\mu$ g纯化的无内毒素蛋白SpA<sub>KKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>进行免疫:CFA:IFA并在第一次免疫后11天用在1:1的抗原:IFA中乳化的50 $\mu$ g蛋白质加强。在第20天,将小鼠采血并收集血清以通过ELISA评估针对候选疫苗的抗体效价。在第21天,小鼠要么接种鼻咽定植,要么通过静脉注射细菌进行感染。

[0441] 小鼠鼻咽部定植。如(102)所述,将过夜培养的金黄色葡萄球菌WU1菌株在新鲜TSB中按1:100稀释,并在37 $^{\circ}$ C下培养2小时。将细胞离心、洗涤并悬浮在PBS中。每组10只免疫的雌性C57BL/6J小鼠(Jackson实验室)通过腹腔注射氯胺酮-甲苯噻嗪(100mg至20mg/kg)进行麻醉,1 $\times 10^8$ CFU的金黄色葡萄球菌(10L体积)被移入每只小鼠的右鼻孔。在接种后的每周间隔内,对小鼠的口咽进行擦拭,收集粪便样品并在PBS中匀浆。将拭子样品和粪便样品匀浆涂在甘露醇盐琼脂(MSA)上进行细菌计数。在实验结束时,小鼠通过眶周静脉穿刺取血以获得用于使用所述葡萄球菌抗原基质进行抗体反应分析的血清(43)。简而言之,用2g亲和纯化的葡萄球菌抗原印迹硝酸纤维素膜。膜用5%脱粒牛奶封闭,并与稀释的小鼠血清(1:10000稀释)和IRDye 680偶联的山羊抗小鼠IgG(Li-Cor)一起孵育。使用Odyssey红外成像系统(Li-Cor)定量信号强度。所有动物实验都进行两次。使用Sidak多重比较测试(GraphPad软件)进行双向方差分析(ANOVA),以分析鼻咽和粪便定植、ELISA和抗原基质数据的统计显著性。

[0442] 小鼠肾脓肿模型。将金黄色葡萄球菌USA300(LAC)过夜培养物以1:100稀释到新鲜的TSB中,并在37 $^{\circ}$ C下培养2小时。将葡萄球菌沉淀、洗涤并悬浮在PBS中。通过将样品等分试样涂抹在TSA上并计数孵育时形成的菌落来定量接种物。用PBS中制备的无内毒素蛋白SpA<sub>KKAA</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33E</sub>或SpA<sub>Q9,10K/S33T</sub>免疫或模拟免疫(PBS对照)的15只BALB/c小鼠组被麻醉并接种5 $\times 10^6$ CFU的金黄色葡萄球菌USA300(LAC)进入右眼眶周静脉窦。在激发后的第15天,通过吸入CO<sub>2</sub>杀死小鼠。取出两个肾脏,并通过用PBS、0.1%Triton X-100匀浆肾组织来分析一个器官中的葡萄球菌负荷。将匀浆的系列稀释液涂在TSA上并温育以形成菌落。通过组织病理检查剩余的器官。简而言之,肾脏在室温下在10%福尔马林中固定24小时。将组织包埋在石蜡中,切片,用苏木精-伊红染色,并通过光学显微镜检查以列举脓肿病变。所有动物实验均一式两份进行,并使用Graphpad Prism的t检验(和非参数检验)计算统计分析。

[0443] 道德声明。使用人志愿者的血液进行的实验是根据Chicago大学机构审查委员会(IRB)审查、批准和监督的协议进行的。所有小鼠实验均按照芝加哥大学机构生物安全委员会(IBC)和机构动物护理和使用委员会(IACUC)的实验方案审查和批准后的机构指南进行。

[0444] 统计分析。对于图22、23、25和表4至9,使用带有后检验(Bonferroni's或Dunnett's多重比较检验)的单向方差分析来推导出多个组的平均值之间的统计显著性。对于图24,使用Sidak多重比较检验(GraphPad Software)进行双向方差分析(ANOVA)以分析小鼠定植和葡萄球菌抗原矩阵数据的统计显著性。所有数据均由Prism(GraphPad Software, Inc.)分析,认为小于0.05的P值是显著的。

[0445] E. 表

[0446] 表4 野生型SpA、SpA<sub>KKAA</sub>和SpA<sub>Q9,10K/G29X</sub>候选疫苗和人IgG<sup>#</sup>的亲合力检测。

[0447]

<b>SpAQ9,10K/G29X<sup>a</sup></b>	<b><math>K_A (\times 10^5 M^{-1})^b</math></b>	<b><math>SD (\times 10^5)^c</math></b>	<b><i>P</i> value<sup>d</sup></b>
SpAQ9,10K/G29H	1.435	0.2799	*
SpAQ9,10K/G29C	1.743	0.8619	*
SpAQ9,10K/G29T	1.982	0.9146	无显著差异
SpAQ9,10K/G29Q	2.057	0.9600	*
SpAQ9,10K/G29L	3.146	1.3860	无显著差异
SpAQ9,10K/G29E	3.182	1.5300	无显著差异
SpAQ9,10K/G29P	3.396	1.4410	无显著差异
SpAQ9,10K/G29F	3.460	1.5860	无显著差异
SpAQ9,10K/G29M	3.893	0.7868	无显著差异
SpAQ9,10K/G29V	4.350	1.0830	无显著差异
SpAQ9,10K/G29W	4.508	0.7448	无显著差异
SpAQ9,10K/G29D	5.478	1.0150	无显著差异
SpAQ9,10K/G29R	6.056	0.9814	无显著差异
SpAQ9,10K/G29N	6.231	0.7696	无显著差异
SpAQ9,10K/G29Y	8.367	3.326	无显著差异
SpAQ9,10K/G29S	9.398	4.298	***
SpAQ9,10K/G29K	9.738	2.345	**
SpAQ9,10K/G29I	10.070	4.398	**
SpAQ9,10K/G29A	11.310	3.119	***
<b>SpA<sub>KKAA</sub></b>	<b>5.022</b>	<b>2.150</b>	
SpA	1081	16.34	

<sup>a</sup>将实验样品固定在Bio-Rad ProteOn HTG芯片上，通过表面等离子体激元共振技术检测人IgG浓度的增加，并流过芯片的每个通道。数据来自三个独立的实验。

<sup>b</sup>数据用于导出每个测试物品的结合常数(KA)。

<sup>c</sup>数据用于导出每个测试物品的标准偏差(SD)。

<sup>d</sup>采用单因素方差分析数据，采用邓内特多重比较检验对每个测试和SpA<sub>KKAA</sub>进行多重比较。

符号：ns，无显著差异；\*，P<0.05；\*\*，P<0.01；\*\*\*，P<0.001；\*\*\*\*，P<0.0001。

[0448]

表5 野生型SpA、SpA<sub>KKAA</sub>和SpA<sub>Q9,10K/S33X</sub>候选疫苗和人IgG<sup>#</sup>的亲合力检测。

[0449]

<b>SpA<sub>Q9,10K/S33X</sub><sup>a</sup></b>	<b><math>K_A (\times 10^5 \text{ M}^{-1})^b</math></b>	<b><math>SD (\times 10^5)^c</math></b>	<b>P value<sup>d</sup></b>
SpA <sub>Q9,10K/S33E</sub>	0.496	0.0439	**
SpA <sub>Q9,10K/S33T</sub>	0.386	0.1218	***
SpA <sub>Q9,10K/S33Y</sub>	1.571	0.7497	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33I</sub>	1.840	1.1290	*
SpA <sub>Q9,10K/S33L</sub>	2.051	0.7592	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33W</sub>	2.356	0.6373	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33V</sub>	2.471	1.2060	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33H</sub>	2.784	0.6087	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33N</sub>	3.066	1.0100	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33M</sub>	3.177	1.3750	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33R</sub>	3.463	1.7950	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33D</sub>	3.824	1.7100	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33F</sub>	3.902	1.8040	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33Q</sub>	4.068	2.8350	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33P</sub>	4.218	2.2560	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33C</sub>	4.577	0.6927	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33K</sub>	5.124	2.1810	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33A</sub>	10.540	5.0520	***
SpA <sub>Q9,10K/S33G</sub>	11.180	5.2040	***
<b>SpA<sub>KKAA</sub></b>	<b>5.022</b>	<b>0.0439</b>	
SpA	1081 <sup>-1</sup>	16.34	

\*将实验样品固定在Bio-Rad ProteOn HTG芯片上，通过表面等离子体激元共振技术检测人IgG浓度的增加，并流过芯片的每个通道。数据来自三个独立的实验。

<sup>b</sup>数据用于导出每个测试物品的结合常数 (KA)。

<sup>c</sup>数据用于导出每个测试物品的标准偏差 (SD)。

<sup>d</sup>采用单因素方差分析数据，采用邓内特多重比较检验对每个测试和SpA<sub>KKAA</sub>进行多重比较。

符号：ns，无显著差异；\*，P<0.05；\*\*，P<0.01；\*\*\*，P<0.001；\*\*\*\*，P<0.0001。

[0450] 表6 SpA变体Q9,10K/S33X或Q9,10K/G29X与其他氨基酸置换结合的人IgG结合常数#

[0451]

亲代SpA 变体 <sup>a</sup>	$K_A$ ( $\times 10^5 M^{-1}$ ) <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	P值 <sup>d</sup>	具有额外置换的 亲本SpA变体 <sup>a</sup>	$K_A$ ( $\times 10^5 M^{-1}$ ) <sup>b</sup>	SD ( $\times 10^5 M^{-1}$ ) <sup>c</sup>	P值 <sup>e</sup>
SpA <sub>Q9,10K/S33E</sub>	0.496	0.044	*	SpA <sub>Q9,10K/S33E/D36,37A</sub>	0.568	0.1185	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33E/G29A</sub>	1.265	0.6947	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33E/D36,37A/G29A</sub>	1.892	0.6793	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33E/G29F</sub>	1.575	0.4060	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33E/D36,37A/G29F</sub>	14.850	13.480	***
				SpA <sub>Q9,10K/S33E/G29R</sub>	4.840	1.1960	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33E/D36,37A/G29R</sub>	10.240	5.2600	*
SpA <sub>Q9,10K/S33Q</sub>	4.068	2.835	ns	SpA <sub>Q9,10K/S33Q/D36,37A</sub>	3.930	1.9290	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33Q/G29A</sub>	2.563	1.3670	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33Q/D36,37A/G29A</sub>	4.893	3.8360	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33Q/G29F</sub>	1.275	0.7355	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33Q/D36,37A/G29F</sub>	12.470	8.8810	*
				SpA <sub>Q9,10K/S33Q/G29R</sub>	2.333	0.4245	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33Q/D36,37A/G29R</sub>	6.378	4.6820	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33F</sub>	3.902	1.804	ns	SpA <sub>Q9,10K/S33F/D36,37A</sub>	3.634	2.6420	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33F/G29A</sub>	1.190	0.4299	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33F/D36,37A/G29A</sub>	不可溶		
				SpA <sub>Q9,10K/S33F/G29F</sub>	2.440	0.7657	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33F/D36,37A/G29F</sub>	不可溶		
				SpA <sub>Q9,10K/S33F/G29R</sub>	1.903	0.8693	无显著差异
				SpA <sub>Q9,10K/S33F/D36,37A/G29R</sub>	9.056	4.9730	*
SpA <sub>Q9,10K/S33K</sub>	5.124	2.181	ns	SpA <sub>Q9,10K/S33K/D36,37A</sub>	8.048	4.1050	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33A</sub>	10.540	5.052	***	SpA <sub>Q9,10K/S33A/D36,37A</sub>	18.830	18.320	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/G29F</sub>	3.460	1.586	ns	SpA <sub>Q9,10K/G29F/D36,37A</sub>	3.723	1.5100	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/G29R</sub>	6.056	0.981	ns	SpA <sub>Q9,10K/G29R/D36,37A</sub>	6.808	3.6840	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/G29A</sub>	11.310	3.119	**	SpA <sub>Q9,10K/G29A/D36,37A</sub>	1.78	0.5098	***
SpA-KR	5.464	0.767	ns				
SpA <sub>RRVV</sub>	5.609	2.355	ns				
SpA <sub>KKAA</sub>	5.022	2.150	-				

<sup>a</sup>将实验样品固定在Bio-Rad ProteOn HTG芯片上，通过表面等离子体激元共振技术检测人IgG浓度的增加，并流过芯片的每个通道。数据来自三个独立的实验。  
<sup>b</sup>数据用于导出每个测试物品的结合常数 (K<sub>A</sub>)。  
<sup>c</sup>数据用于导出每个测试物品的标准偏差 (SD)。  
<sup>d,e</sup>使用Dunnett多重比较检验的单向方差分析在测试样品和SpA<sub>KKAA</sub>d之间以及在测试物品(第5列)和亲代疫苗(第1列)e之间分析数据。  
 符号: ns, 无显著差异; \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001; \*\*\*\*, P<0.0001。

[0452] 表7 每个组合突变与人IgG的F(ab)2片段结合的结合常数

SpA变体 <sup>a</sup>	$K_A (M^{-1})^b$	SD <sup>c</sup>	P值 <sup>d</sup>
SpA	$1.44 \times 10^7$	$8.193 \times 10^6$	-
SpA <sub>KKAA</sub>	$8.27 \times 10^4$	$2.76 \times 10^4$	-
SpA-KR	$6.42 \times 10^4$	$3.80 \times 10^4$	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33E</sub>	41.24	5.386	***
SpA <sub>Q9,10K/S33T</sub>	43.55	5.737	***

[0453] <sup>a</sup>将实验样品固定在Bio-Rad ProteOn HTG芯片上，通过表面等离子体激元共振技术检测人IgG浓度的增加，并流过芯片的每个通道。数据来自三个独立的实验。  
<sup>b</sup>数据用于导出每个测试物品的结合常数 (KA)。  
<sup>c</sup>数据用于导出每个测试物品的标准偏差 (SD)。  
<sup>d</sup>使用Dunnett多重比较检验的单向方差分析在测试物品和SpAKKAA之间进行数据分析。符号：ns，无显著差异；\*，P<0.05；\*\*，P<0.01；\*\*\*，P<0.001；\*\*\*\*，P<0.0001。

[0454] 表8 每个组合突变与人IgG的Fc $\gamma$ 片段结合的结合常数。

SpA变体 <sup>a</sup>	$K_A (M^{-1})^b$	SD <sup>c</sup>	P值 <sup>d</sup>
SpA	$5.17 \times 10^7$	$8.995 \times 10^6$	-
SpA <sub>KKAA</sub>	32.91	16.291	-
SpA <sub>Q9,10K/S33E</sub>	32.68	16.414	无显著差异
SpA <sub>Q9,10K/S33T</sub>	39.91	17.081	无显著差异
SpA-KR	39.12	13.348	无显著差异

[0455] <sup>a</sup>将测试样品固定在Ni-NTA传感器上并经生物层干涉仪(BLI)检测人IgG的Fc片段的浓度的不断增加。数据来自三个独立的实验。  
<sup>b</sup>数据用于导出每个测试物品的结合常数(KA)。  
<sup>c</sup>数据用于导出每个测试物品的标准偏差 (SD)。  
<sup>d</sup>使用Dunnett多重比较检验的单向方差分析在测试物品和SpAKKAA之间进行数据分析。符号：ns，无显著差异；\*，P<0.05；\*\*，P<0.01；\*\*\*，P<0.001；\*\*\*\*，P<0.0001。

[0456] 表9 SpA和候选疫苗变体激活人嗜碱性粒细胞

表9 SpA和候选疫苗变体激活人类嗜碱性粒细胞							
SpA变体/ PBS <sup>a</sup>	PBS	SpA	SpA <sub>KKAA</sub>	SpA <sub>Q9,10K/S33E</sub>	SpA <sub>Q9,10K/S33T</sub>	SpA-KR	SpA <sub>RRVV</sub>
%激活嗜碱性粒细胞	4.39 $\pm 0.884$	32.05 $\pm 0.919$	10.66 $\pm 1.612$	5.38 $\pm 0.318$	4.57 $\pm 0.877$	8.15 $\pm 1.018$	10.16 $\pm 0.905$
P值相对于 PBS <sup>b</sup>	-	****	**	ns	ns	ns	**
P值相对于 SpA <sub>KKAA</sub> <sup>c</sup>		****	-	*	**	ns	ns

[0457] <sup>a</sup>测试样品与人类嗜碱性粒细胞一起孵育，数据显示为激活嗜碱性粒细胞占嗜碱性粒细胞总数(100%)的百分比。  
<sup>b,c</sup>使用Bonferroni多重比较检验的单向方差分析进行统计分析，将测试物品与PBS<sup>b</sup>或测试物品与SpA<sub>KKAA</sub><sup>c</sup>进行比较。符号：ns，无显著差异；\*，P<0.05；\*\*，P<0.01；\*\*\*，P<0.001；\*\*\*\*，P<0.0001。

[0458] 参考文献

[0459] 以下参考文献，在它们提供典型的程序或其他细节补充在此阐述的那些的范围内，通过引用特定并入本文。

- [0460] 美国专利3791932
- [0461] 美国专利3949064
- [0462] 美国专利4174384
- [0463] 美国专利4338298
- [0464] 美国专利4356170
- [0465] 美国专利4367110
- [0466] 美国专利4372945
- [0467] 美国专利4452901
- [0468] 美国专利4474757
- [0469] 美国专利4554101
- [0470] 美国专利4578770
- [0471] 美国专利4596792
- [0472] 美国专利4599230
- [0473] 美国专利4599231
- [0474] 美国专利4601903
- [0475] 美国专利4608251
- [0476] 美国专利4683195
- [0477] 美国专利4683202
- [0478] 美国专利4684611
- [0479] 美国专利4690915
- [0480] 美国专利4690915
- [0481] 美国专利4748018
- [0482] 美国专利4800159
- [0483] 美国专利4879236
- [0484] 美国专利4952500
- [0485] 美国专利5084269
- [0486] 美国专利5199942
- [0487] 美国专利5221605
- [0488] 美国专利5238808
- [0489] 美国专利5302523
- [0490] 美国专利5310687
- [0491] 美国专利5322783
- [0492] 美国专利5384253
- [0493] 美国专利5464765
- [0494] 美国专利5512282
- [0495] 美国专利5512282
- [0496] 美国专利5538877
- [0497] 美国专利5538880
- [0498] 美国专利5548066

- [0499] 美国专利5550318
- [0500] 美国专利5563055
- [0501] 美国专利5580859
- [0502] 美国专利5589466
- [0503] 美国专利5591616
- [0504] 美国专利5610042
- [0505] 美国专利5620896
- [0506] 美国专利5648240
- [0507] 美国专利5656610
- [0508] 美国专利5702932
- [0509] 美国专利5736524
- [0510] 美国专利5780448
- [0511] 美国专利5789215
- [0512] 美国专利5801234
- [0513] 美国专利5840846
- [0514] 美国专利5843650
- [0515] 美国专利5846709
- [0516] 美国专利5846783
- [0517] 美国专利5849497
- [0518] 美国专利5849546
- [0519] 美国专利5849547
- [0520] 美国专利5858652
- [0521] 美国专利5866366
- [0522] 美国专利5871986
- [0523] 美国专利5916776
- [0524] 美国专利5922574
- [0525] 美国专利5925565
- [0526] 美国专利5925565
- [0527] 美国专利5928905
- [0528] 美国专利5928906
- [0529] 美国专利5932451
- [0530] 美国专利5935819
- [0531] 美国专利5935825
- [0532] 美国专利5939291
- [0533] 美国专利5942391
- [0534] 美国专利5945100
- [0535] 美国专利5958895
- [0536] 美国专利5981274
- [0537] 美国专利5994624

- [0538] 美国专利6008341
- [0539] 美国专利6288214
- [0540] 美国专利6294177
- [0541] 美国专利6651655
- [0542] 美国专利6656462
- [0543] 美国专利6733754
- [0544] 美国专利6756361
- [0545] 美国专利6770278
- [0546] 美国专利6793923
- [0547] 美国专利6814971
- [0548] 美国专利6936258
- [0549] 美国专利申请2002/0169288
- [0550] 美国专利申请2003/0153022
- [0551] PCT申请PCT/US89/01025
- [0552] PCT申请WO 00/02523
- [0553] PCT申请WO 00/12132
- [0554] PCT申请WO 00/12689
- [0555] PCT申请WO 00/15238
- [0556] PCT申请WO 01/34809
- [0557] PCT申请WO 01/60852
- [0558] PCT申请WO 01/98499
- [0559] PCT申请WO 02/059148
- [0560] PCT申请WO 02/094868
- [0561] PCT申请WO 03/53462
- [0562] PCT申请WO 04/43407
- [0563] PCT申请WO 06/032472
- [0564] PCT申请WO 06/032475
- [0565] PCT申请WO 06/032500
- [0566] PCT申请WO 07/113222
- [0567] PCT申请WO 07/113223
- [0568] PCT申请WO 94/09699
- [0569] PCT申请WO 95/06128
- [0570] PCT申请WO 95/08348
- [0571] PCT申请WO 98/57994
- [0572] 1.Tong SY,Davis JS,Eichenberger E,Holland TL,Fowler VGJ.2015。Staphylococcus aureus infections:epidemiology,pathophysiology,clinical manifestations,and management.Clin Microbiol Rev 28:603-661.
- [0573] 2.van Belkum A,Melles DC,Nouwen J,van Leeuwen WB,van Wamel W,Vos MC,Wertheim HF,Verbrugh HA.2009.Co-evolutionary aspects of human colonisation

and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 9:32-47.

[0574] 3. Hanssen AM, Kindlund B, Stenklev NC, Furberg AS, Fismen S, Olsen RS, Johannessen M, Solid JUE. 2017. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiol* 17:89.

[0575] 4. Mertz D, Frei R, Periat N, Zimmerli M, Battegay M, Flückiger U, Widmer AF. 2009. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Arch Intern Med* 169:172-178.

[0576] 5. Boyce JM, Havill NL, Maria B. 2005. Frequency and possible infection control implications of gastrointestinal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43:5992-5995.

[0577] 6. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 344:11-16.

[0578] 7. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751-762.

[0579] 8. Buehlmann M, Frei R, Fenner L, Dangel M, Fluckiger U, Widmer AF. 2008. Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:510-516.

[0580] 9. Gilpin DF, Small S, Bakkshi S, Kearney MP, Cardwell C, Tunney MM. 2010. Efficacy of a standard methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* decolonisation protocol in routine clinical practice. *J Hosp Infect* 75:93-98.

[0581] 10. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. 2009. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:115-127.

[0582] 11. Verkaik NJ, Lebon A, de Vogel CP, Hooijkaas H, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, van Belkum A, van Wamel WJ. 2010. Induction of antibodies by *Staphylococcus aureus* nasal colonization in young children. *Clin Microbiol Infect* 16:1312-1317.

[0583] 12. Swierstra J, Debets S, de Vogel C, Lemmens-den Toom N, Verkaik N, Ramdani-Bouguessa N, Jonkman MF, van Dijl JM, Fahal A, van Belkum A, van Wamel W. 2015. IgG4 subclass-specific responses to *Staphylococcus aureus* antigens shed new light on host-pathogen interaction. *Infect Immun* 83:492-501.

[0584] 13. Holtfreter S, Jursa-Kulesza J, Masiuk H, Verkaik NJ, de Vogel C, Kolata J, Nowosiad M, Steil L, van Wamel W, van Belkum A, **Völker** U, Giedrys-Kalemba S, **Bröker** BM. 2011. Antibody responses in furunculosis patients vaccinated with autologous formalin-killed *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:707-717.

[0585] 14. Kluytmans J, van Belkum A, Verburgh H. 1997. Nasal carriage of

Staphylococcus aureus:epidemiology,underlying mechanisms,and associated risks.Clin Microbiol Rev 10:505-520.

[0586] 15.Weinstein HJ.1959.The relation between nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications.N Engl J Med260:1303-1308.

[0587] 16.Missiakas D,Schneewind O.2016.Staphylococcus aureus vaccines: deviating from the carol.J Exp Med 231:1645-1653.

[0588] 17.Corrigan RM,Miajlovic H,Foster TJ.2009.Surface proteins that promote adherence of Staphylococcus aureus to human desquamated nasal epithelial cells.BMC Microbiol 9:22.

[0589] 18.Weidenmaier C,Kokai-Kun JF,Kristian SA,Chanturiya T,Kalbacher H, Gross M,Nicholson G,Neumeister B,Mond JJ,Peschel A.2004.Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization,a major risk factor in nosocomial infections.Nat Med 10:243-245.

[0590] 19.Kiser KB,Cantey-Kiser JM,Lee JC.1999.Development and characterization of a Staphylococcus aureus nasal colonization model in mice.Infect Immun 67:5001-5006.

[0591] 20.Weidenmaier C,Goerke C,Wolz C.2012.Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization.Trends Microbiol 20:243-250.

[0592] 21.Mulcahy ME,Geoghegan JA,Monk IR,O'Keefe KM,Walsh EJ,Foster TJ, McLoughlin RM.2012.Nasal colonisation by Staphylococcus aureus depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin.PLoS Pathog 8:e1003092.

[0593] 22.Clarke SR,Wiltshire MD,Foster SJ.2004.IsdA of Staphylococcus aureus is a broad spectrum,iron-regulated adhesin.Mol Microbiol 51:1509-1519.

[0594] 23.Mazmanian SK,Skaar EP,Gaspar AH,Humayun M,Gomicki P,Jelenska J, Joachmiak A,Missiakas DM,Schneewind O.2003.Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus.Science 299:906-909.

[0595] 24.Clarke SR,Foster SJ.2008.IsdA protects Staphylococcus aureus against the bactericidal protease activity of apolactoferrin.Infect Immun 76: 1518-1526.

[0596] 25.Conrady DG,Brescia CC,Horii K,Weiss AA,Hassett DJ,Herr AB.2008.A zinc-dependent adhesion molecule is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms.Proc Nat Acad Sci USA 105:19455-19460.

[0597] 26.Roche FM,Meehan M,Foster TJ.2003.The Staphylococcus aureus surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells.Microbiology 149:2759-2767.

[0598] 27.Baur S,Rautenberg M,Faulstich M,Grau T,Severin Y,Unger C,Hoffmann WH,Rudel T,Autenrieth IB,Weidenmaier C.2014.A nasal epithelial receptor for

Staphylococcus aureus WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. *PLoS Pathog* 10:e1004089.

[0599] 28. Winstel V, Kühner P, Salomon F, Larsen J, Skov R, Hoffmann W, Peschel A, Weidenmaier C. 2015. Wall teichoic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *mBio* 6:e00632-00615.

[0600] 29. Forsgren A. 1970. Significance of protein A production by staphylococci. *Infect Immun* 2:672-673.

[0601] 30. Burian M, Wolz C, Goerke C. 2010. Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. *PLoS One* 5:e10040.

[0602] 31. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrenner P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR. 2015. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *mBio* 6:e02272-02214.

[0603] 32. Votintseva AA, Fung R, Miller RR, Knox K, Godwin H, Wyllie DH, Bowden R, Crook DW, Walker AS. 2014. Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiol* 14:63.

[0604] 33. Kim HK, Falugi F, Missiakas D, Schneewind O. 2016. Peptidoglycan-linked protein A promotes T-cell dependent antibody expansion during *Staphylococcus aureus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:5718-5723.

[0605] 34. Cole AL, Muthukrishnan G, Chong C, Beavis A, Eade CR, Wood MP, Deichen MG, Cole AM. 2016. Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Mucosal Immunol* Epub ahead of press.

[0606] 35. Hong X, Qin J, Li T, Dai Y, Wang Y, Liu Q, He L, Lu H, Gao Q, Lin Y, Li M. 2016. Staphylococcal protein A promotes colonization and immune evasion of the epidemic healthcare-associated MRSA ST239. *Front Microbiol* 7:951.

[0607] 36. Holtfreter S, Radcliff FJ, Grumann D, Read H, Johnson S, Monecke S, Ritchie S, Clow F, Goerke C, **Bröker** BM, Fraser JD, Wiles S. 2013. Characterization of a mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strain. *PLoS One* 8:e71142.

[0608] 37. Schulz D, Grumann D, Trübe P, Pritchett-Corning K, Johnson S, **Reppschläger** K, Gumz J, Sundaramoorthy N, Michalik S, Berg S, van den Brandt J, Fister R, Monecke S, Uy B, Schmidt F, **Bröker** BM, Wiles S, Holtfreter S. 2017. Laboratory mice are frequently colonized with *Staphylococcus aureus* and mount a systemic immune response-note of caution for in vivo infection experiments. *Front Cell Infect Microbiol* 7:152.

[0609] 38. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on bacteriophages. *J Bacteriol* 188:1310-1315.

[0610] 39. Jongerius I, **Köhl** J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp

JAG,Rooijackers SHM.2007.Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules.J Exp Med 204:2461-2471.

[0611] 40.Cheng AG,McAdow M,Kim HK,Bae T,Missiakas DM,Schneewind O.2010.Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity.PLoS Pathog 6:e1001036.

[0612] 41.McAdow M,Kim HK,DeDenta AC,Hendrickx APA,Schneewind O,Missiakas DM.2011.Preventing Staphylococcus aureus sepsis through the inhibition of its agglutination in blood.PLoS Pathog 7:e1002307.

[0613] 42.McDevitt D,Francois P,Vaudaux P,Foster TJ.1994.Molecular characterization of the clumping factor(fibrinogen receptor)of Staphylococcus aureus.Mol Microbiol 11:237-248.

[0614] 43.Baba T,Bae T,Schneewind O,Takeuchi F,Hiramatsu K.2007.Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes.J Bacteriol 190:300-310.

[0615] 44.Kim HK,Cheng AG,Kim H-Y,Missiakas DM,Schneewind O.2010.Non-toxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections.J Exp Med 207:1863-1870.

[0616] 45.Cheng AG,Missiakas DM,Schneewind O.2014.The giant protein Ebh is a cross wall determinant of Staphylococcus aureus cell size and complement resistance.J Bacteriol 196:971-981.

[0617] 46.Becker S,Frankel MB,Schneewind O,Missiakas DM.2014.Release of protein A from the cell wall envelope of Staphylococcus aureus.Proc Natl Acad Sci USA 111:1574-1579.

[0618] 47.Goodyear CS,Silverman GJ.2004.Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes.Proc Natl Acad Sci USA 101:11392-11397.

[0619] 48.Falugi F,Kim HK,Missiakas DM,Schneewind O.2013.The role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by Staphylococcus aureus mBio 4:e00575-00513.

[0620] 49.Hersh AL,Chambers HF,Maselli JH,Gonzales R.2008.National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections.Arch Intern Med 168:1585-1591.

[0621] 50.Pallin DJ,Egan DJ,Pelletier AJ,Espinola JA,Hooper DC,Camargo CA, Jr.2008.Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections,and changes in antibiotic choices,during the emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus.Ann Emerg Med 51:291-298.

[0622] 51.Edelsberg J,Taneja C,Zervos M,Haque N,Moore C,Reyes K,Spalding J, Jiang J,Oster G.2009.Trends in US hospital admissions for skin and soft

tissue infections. *Emerg Infect Dis* 15:1516-1518.

[0623] 52. Lipsky BA, Kollef MH, Miller LG, Sun X, Johannes RS, Tabak YP. 2010. Predicting bacteremia among patients hospitalized for skin and skin-structure infections: derivation and validation of a risk score. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31:828-837.

[0624] 53. Carratalà J, Rosón B, Fernández-Sabé N, Shaw E, del Río O, Rivera A, Gudiol F. 2003. Factors associated with complications and mortality in adult patients hospitalized for infectious cellulitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:151-157.

[0625] 54. Lucero CA, Hageman J, Zell ER, Bulens S, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Fridkin SK. 2009. Evaluating the potential public health impact of a *Staphylococcus aureus* vaccine through use of population-based surveillance for invasive methicillin-resistant *S. aureus* disease in the United States. *Vaccine* 27:5061-5068.

[0626] 55. Spellberg B, Daum RS. 2012. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Semin Immunopathol* 34:335-348.

[0627] 56. Creech CB, Al-Zubeidi DN, Fritz SA. 2015. Prevention of recurrent staphylococcal skin infections. *Infect Dis Clin North Am* 29:429-464.

[0628] 57. Fowler Jr. VG, Kong LK, Corey GR, Gottlieb GS, McClelland RS, Sexton DJ, Gesty-Palmer D, Harrell LJ. 1999. Recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia: pulsed-field gel electrophoresis findings in 29 patients. *J Infect Dis* 179:1157-1161.

[0629] 58. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364:703-705.

[0630] 59. Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, Yeoh H, Law D, Robbins JB, Schneerson R, Muenz L, Fuller S, Johnson J, Fireman B, Alcorn H, Naso R. 2002. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 346:491-496.

[0631] 60. Fowler VG, Allen KB, Moreira ED, Moustafa M, Isgro F, Boucher HW, Corey GR, Carmeli Y, Betts R, Hartzel JS, Chan IS, McNeely TB, Kartsonis NA, Guris D, Onorato MT, Smugar SS, DiNubile MJ, Sobanjo-ter Meulen A. 2013. Effect of an investigational vaccine for preventing *Staphylococcus aureus* infections after cardiothoracic surgery: a randomized trial. *JAMA* 309:1368-1378.

[0632] 61. Fattom AI, Horwith G, Fuller S, Propst M, Naso R. 2004. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine* 22:880-887.

- [0633] 62.Creech CB,Johnson BG,Alsentzer AR,Hohenboken M,Edwards KM,Talbot TR.2009.Vaccination as infection control:a pilot study to determine the impact of Staphylococcus aureus vaccination on nasal carriage.Vaccine 28:256-260.
- [0634] 63.Gotschlich EC,Goldschneider I,Artenstein MS.1969.Human immunity to the meningococcus.V.The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state.J Exp Med 129:1385-1395.
- [0635] 64.Goldschneider I,Gotschlich EC,Artenstein MS.1969.Human immunity to the meningococcus.I.The role of humoral antibodies.J Exp Med 129:1307-1326.
- [0636] 65.Goldschneider I,Gotschlich EC,Artenstein MS.1969.Human immunity to the meningococcus.II.Development of natural immunity.J Exp Med 129:1327-1348.
- [0637] 66.Kim HK,Thammavongsa V,Schneewind O,Missiakas D.2012.Recurrent infections and immune evasion strategies of Staphylococcus aureus.Curr Opin Microbiol 15:92-99.
- [0638] 67.Thammavongsa V,Kim HK,Missiakas DM,Schneewind O.2015.Staphylococcal manipulation of host immune responses.Nat Rev Microbiol 13:529-543.
- [0639] 68.DeDent AC,McAdow M,Schneewind O.2007.Distribution of protein A on the surface of Staphylococcus aureus.J Bacteriol 189:4473-4484.
- [0640] 69.Sjöquist J,Movitz J,Johansson I-B,Hjelm H.1972.Localization of protein A in the bacteria.Eur J Biochem 30:190-194.
- [0641] 70.Schneewind O,Fowler A,Faull KF.1995.Structure of the cell wall anchor of surface proteins in Staphylococcus aureus.Science 268:103-106.
- [0642] 71.Forsgren A.1968.Protein A from Staphylococcus aureus.VI.Reaction with subunits from guinea pig $\gamma$ 1-and $\gamma$ 2-globulin.J Immunol 100:927-930.
- [0643] 72.Forsgren A,Quie PG.1974.Effects of staphylococcal protein A on heat labile opsonins.J Immunol 112:1177-1180.
- [0644] 73.Goodyear CS,Silverman GJ.2003.Death by a B cell superantigen:In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a staphylococcal toxin.J Exp Med 197:1125-1139.
- [0645] 74.Silverman GJ,Goodyear CS.2006.Confounding B-cell defences:lessons from a staphylococcal superantigen.Nat Rev Immunol 6:465-475.
- [0646] 75.Pauli NT,KimHK,Falugi F,Huang M,Dulac J,Dunand CH,Zheng NY,Kaur K,Andrews S,Huang Y,Dedent A,Frank K,Charnot-Katsikas A,Schneewind O,Wilson PC.2014.Staphylococcus aureus infection induces protein A-mediated immune evasion in humans.J Exp Med 211:2331-2339.
- [0647] 76.Kim HK,Falugi F,Thomer L,Missiakas DM,Schneewind O.2015.Protein A suppresses immune responses during Staphylococcus aureus bloodstream infection in guinea pigs.mBio 6:e02369-02314.

- [0648] 77. Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O. 2000. Staphylococcus aureus mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. Proc Natl Acad Sci USA 97:5510-5515.
- [0649] 78. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC. 2006. Immunization with Staphylococcus aureus clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. Infect Immun 74:2145-2153.
- [0650] 79. Walsh EJ, O'Brien LM, Liang X, Hook M, Foster TJ. 2004. Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of Staphylococcus aureus, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. J Biol Chem 279:50691-50699.
- [0651] 80. Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus. Mol Microbiol 30:245-257.
- [0652] 81. Clarke SR, Brummell KJ, Horsburgh MJ, McDowell PW, Mohamad SA, Stapleton MR, Acevedo J, Read RC, Day NP, Peacock S J, Mond JJ, Kokai-Kun JF, Foster SJ. 2006. Identification of in vivo-expressed antigens of Staphylococcus aureus and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. J Infect Dis 193:1098-1108.
- [0653] 82. Viana D, Blanco J, Tormo-Más MA, Selva L, Guinane CM, Baselga R, Corpa JM, Lasa I, Novick RP, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2010. Adaptation of Staphylococcus aureus to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. Mol Microbiol 77:1583-1594.
- [0654] 83. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas DM. 2011. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. Trends Microbiol 19:225-232.
- [0655] 84. Kim HK, Emolo C, DeDent AC, Falugi F, Missiakas DM, Schneewind O. 2012. Protein A-specific monoclonal antibodies and the prevention of Staphylococcus aureus disease in mice. Infect Immun 80:3460-3470.
- [0656] 85. DeLeo FR, Chambers HF. 2009. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 7:629-641.
- [0657] 86. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol 41:5442-5448.
- [0658] 87. Bae T, Schneewind O. 2005. Allelic replacement in Staphylococcus aureus with inducible counter-selection. Plasmid 55:58-63.
- [0659] 88. Thomer L, Becker S, Emolo C, Quach A, Kim HK, Rauch S, Anderson M,

Leblanc JF,Schneewind O,Faull KF,Missiakas D.2014.N-acetylglucosaminylation of serine-aspartate repeat proteins promotes *Staphylococcus aureus* bloodstream infection.J Biol Chem 289:3478-3486.

[0660] 99.Prevaes SM,van Wamel WJ,de Vogel CP,Veenhoven RH,van Gils E J,van Belkum A,Sanders EA,Bogaert D.2012.Nasopharyngeal colonization elicits antibody responses to staphylococcal and pneumococcal proteins that are not associated with a reduced risk of subsequent carriage.Infect Immun 80:2186-2193.

[0661] 100.Lowy FD.1998.*Staphylococcus aureus* infections.New Engl J Med 339:520-532.

[0662] 101.Harrison KJ.1963.Clinical trial of coagulase and alpha-hemolysin toxoids in chronic furunculosis.Br Med J 2:149-152.

[0663] 102.Sun Y,Emolo CE,Holtfreter S,Wiles S,Kreiswirth B,Missiakas D,Schneewind O.2018.Staphylococcal protein A is required for persistent colonization of mice with *Staphylococcus aureus*.J Bacteriol 200:e00735-17.

[0664] 103.Mazmanian SK,Ton-That H,Schneewind O.2001.Sortase-catalyzed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*.Mol Microbiol 40:1049-1057.

[0665] 104.DeDent AC,McAdow M,Schneewind O.2007.Distribution of protein A on the surface of *Staphylococcus aureus*.J Bacteriol 189:4473-4484.

[0666] 105.Schneewind O,Model P,Fischetti VA.1992.Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall.Cell 70:267-281.

[0667] 106.Mazmanian SK,Liu G,Ton-That H,Schneewind O.1999.*Staphylococcus aureus* sortase,an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall.Science 285:760-763.

[0668] 107.Ton-That H,Liu G,Mazmanian SK,Faull KF,Schneewind O.1999.Purification and characterization of sortase,the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif.Proc Natl Acad Sci USA 96:12424-12429.

[0669] 108.Yu W,Missiakas D,Schneewind O.2018.Septal secretion of protein A in *Staphylococcus aureus* requires SecA and lipoteichoic acid synthesis.Elife 7:e34092.

[0670] 109.Perry AM,Ton-That H,Mazmanian SK,Schneewind O.2002.Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*.III.Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring.J Biol Chem 277:16241-16248.

[0671] 110.Frankel MB,Hendrickx AP,Missiakas DM,Schneewind O.2011.LytN,a murein hydrolase in the cross-wall compartment of *Staphylococcus aureus*,is involved in proper bacterial growth and envelope assembly.J Biol Chem 286:

32593-32605.

[0672] 111. Frankel MB, Schneewind O. 2012. Determinants of murein hydrolase targeting to cross-wall of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J Biol Chem* 287:10460-10471.

[0673] 112. Forsgren A, **Sjöquist** J. 1966. Protein A from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* 97:822-827.

[0674] 113. van Loghem E, Frangione B, Recht B, Franklin EC. 1982. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. *Scand J Immunol* 15:275-278.

[0675] 114. Duhamel RC, Schur PH, Brendel K, Meezan E. 1979. pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. *J Immunol Meth* 31:211.

[0676] 115. Kronvall G, Williams RC, Jr.. 1969. Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J Immunol* 103:828.

[0677] 116. Skvaril F. 1976. The question of specificity in binding human IgG subclasses to protein A-sepharose. *Immunochemistry* 13:871.

[0678] 117. Forsgren A, **Nordström** K. 1974. Protein A from *Staphylococcus aureus*: the biological significance of its interaction with IgG. *Ann N Y Acad Sci* 236:252-266.

[0679] 118. Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M. 1989. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. *J Immunol* 142:2778-2783.

[0680] 119. Brunda MJ, Minden P, Grey HM. 1979. Heterogeneity of binding human IgA subclasses to protein A. *J Immunol* 123:1457.

[0681] 120. Grov A. 1975. Antigenicity of human IgM in relation to interaction with staphylococcal protein A. *Acta path microbiol scand Sect C* 83:325.

[0682] 121. Grov A. 1976. Human colostral IgA interacting with staphylococcal protein A. *Acta path microbiol scand Sect C* 84:71.

[0683] 122. van Kamp GJ. 1979. *J. Immunol. Meth.* IgA contamination of IgG prepared on a protein A column 27:301.

[0684] 123. Lind I, Harboe M, Foiling I. 1975. Protein A reactivity of two distinct groups of human monoclonal IgM. *Scand J Immunol* 4:843.

[0685] 124. van Loghem E, Natvig JB, Matsumoto H. 1970. Genetic markers of immunoglobulins in Japanese families. Inheritance of associated markers belonging to one IgA and three IgG subclasses. *Ann Human Genet Lond* 33:351.

[0686] 125. van Loghem E, Salimonu L, Williams AIO, Osunkoya BO, Boyd AM, de Lange G, Nijenhuis LE. 1978. Immunoglobulin allotypes in African populations. Gm-Am haplotypes in a Nigerian population. *J Immunogenet* 5:143.

[0687] 126. Patrick CC, Virella G, Koistinen J, Fudenberg HH. 1977. Differential binding of IgA proteins of different subclasses and allotypes to staphylococcal protein A. *Z Immunitaetsforsch* 153:466.

[0688] 127. Hillson JL, Karr NS, Opplinger IR, Mannik M, Sasso EH. 1993. The

structural basis of germLine-encoded VH3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein A. *J Exp Med* 178:331-336.

[0689] 128. Roben PW, Salem AN, Silverman GJ. 1995. VH3 family antibodies bind domain D of staphylococcal protein A. *J Immunol* 154:6437-6445.

[0690] 129. Randen I, Potter KN, Li Y, Thompson KM, Pascual V, Førrø O, Natvig JB, Capra JD. 1993. Complementarity-determining region 2 is implicated in the binding of staphylococcal protein A to human immunoglobulin VHIII variable regions. *Eur J Immunol* 23:2682-2686.

[0691] 130. Ljungberg UK, Jansson B, Niss U, Nilsson R, Sandberg BE, Nilsson B. 1993. The interaction between different domains of staphylococcal protein A and human polyclonal IgG, IgA, IgM and F(ab')<sub>2</sub>: separation of affinity from specificity. *Mol Immunol* 30:1279-1285.

[0692] 131. Inganäs M, Johansson SG, Bennich HH. 1980. Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with protein A from *Staphylococcus aureus*: demonstration of protein-A-reactive sites located in the Fab'2 fragment of human IgG. *Scand J Immunol* 12:23-31.

[0693] 132. Inganäs M. 1981. Comparison of mechanisms of interaction between protein A from *Staphylococcus aureus* and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical FC gamma and the alternative F(ab')<sub>2</sub> epsilon protein A interactions. *Scand J Immunol* 13:343-352.

[0694] 133. Romagnani S, Giudizi M, Biagiotti R, Almerigogna F, Maggi E, Del Prete G, Ricci M. 1981. Surface immunoglobulins are involved in the interaction of protein A with human B cells and in the triggering of B cell proliferation induced by protein A-containing *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 127:1307-1313.

[0695] 134. Vidal MA, Bernabeu C, Conde FP. 1982. Binding of human immunoglobulin M to *Staphylococcus aureus* bearing protein A. *Immunol Lett* 4:311-315.

[0696] 135. Lindmark R, Thorén-Tolling K, Sjöquist J. 1983. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Meth* 62:1-13.

[0697] 136. Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. 1977. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun* 15:760-764.

[0698] 137. Laky M, Sjöquist J, Moraru I, Gheție V. 1985. Mutual inhibition of the binding of Clq and protein A to rabbit IgG immune complexes. *Mol Immunol* 22:1297-1302.

[0699] 138. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ. 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural

basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. Proc Nat Acad Sci USA 97:5399-5404.

[0700] 139. Forsgren A, Svedjelund A, Wigzell H. 1976. Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*. Eur J Immunol 6:207-213.

[0701] 140. Gutafson GT, Stålenheim G, Forsgren A, **Sjöquist** J. 1968. Protein A from *Staphylococcus aureus* IV. Production of anaphylaxis-like cutaneous and systemic reactions in non-immunized guinea pigs. J Immunol 100:530-534.

[0702] 141. Gustafson GT, **Sjöquist** J, **Stålenheim** G. 1967. Protein A from *Staphylococcus aureus*. II. Arthus-like reaction produced in rabbits by interaction of protein A and human gamma-globulin. J Immunol 98:1178-1181.

[0703] 142. Anderson AL, Sporicic R, Lambris J, Larosa D, Levinson AI. 2006. Pathogenesis of B-cell superantigen-induced immune complex-mediated inflammation. Infect Immun 74:1196-1203.

[0704] 143. Ballow C, Leh A, Slentz-Kesler K, Yan J, Haughey D, Bernton E. 2013. Safety, pharmacokinetic, immunogenicity, and pharmacodynamic responses in healthy volunteers following a single intravenous injection of purified staphylococcal protein A. J Clin Pharmacol 53:909-918.

[0705] 144. Goldwater R, Garner R, Zamfirov V, Haughey D, Bernton E. 2007. PK/PD relationships in a sequential, escalating, single-dose study of PRTX-100, a highly purified staphylococcal protein A. J Clin Pharmacol 47:1204.

[0706] 145. Marone G, Tamburini M, Giudizi MG, Biagiotti R, Almerigogna F, Romagnani S. 1987. Mechanism of activation of human basophils by *Staphylococcus aureus* Cowan 1. Infect Immun 55:803-809.

[0707] 146. Chen X, Sun Y, Missiakas D, Schneewind O. 2018. *Staphylococcus aureus* decolonization of mice with monoclonal antibody neutralizing protein A. J Infect Dis in press.

[0708] 147. Minakuchi K, Murata D, Okubo Y, Nakano Y, Yoshida S. 2013. Remarkable alkaline stability of an engineered protein A as immunoglobulin affinity ligand: C domain having only one amino acid substitution. Protein Sci 22:1230-1238.

[0709] 148. Jansson B, Uhlén M, Nygren PA. 1998. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding. FEMS Immunol Med Microbiol 20:69-78.

[0710] 149. Yoshida S, Murata D, Taira S, Iguchi K, Takano M, Nakano Y, Minakuchi K. 2012. Rational design and engineering of protein A to obtain the controlled elution profile in monoclonal antibody purification. Chem-Bio Informatics Journal 12:1-13.

[0711] 150. Nilsson B, Moks T, Jansson B, Abrahmsén L, Elmlblad A, Holmgren E, Henrichson C, Jones TA, Uhlén M. 1987. A synthetic IgG-binding domain based on

staphylococcal protein A. *Protein Eng* 1:107-113.

[0712] 151. Gulich S, Uhlen M, Hober S. 2000. Protein engineering of an IgG-binding domain allows milder elution conditions during affinity chromatography. *J Biotechnol* 76:233-244.

[0713] 152. Ghose S, Allen M, Hubbard B, Brooks CP, Cramer SM. 2005. Antibody variable region interactions with protein A: implications for the development of generic purification processes. *Biotechnol Bioengin* 92:665-673.

[0714] 153. Svensson HG, Hoogenboom HR, Sjobring U. 1998. Protein LA, a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody and Fab-binding properties. *Eur J Biochem* 258:890-896.

[0715] 154. Deisenhofer J. 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* 20:2361-2370.

[0716] 155. Fisher MM. 1986. Clinical observations on the pathophysiology and treatment of anaphylactic cardiovascular collapse. *Anaesth Intensive Care* 14: 17-21.

[0717] 156. Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schütz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S. 2009. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med* 206:411-420.

[0718] 157. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Munoz-Planillo R, Hasegawa M, McGavin M J, Otto M, Inohara N, Nunez G. 2013. *Staphylococcus*  $\delta$ -toxin promotes allergic skin disease by inducing mast cell degranulation. *Nature* 503 review: 397-401.

[0719] 158. Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350:423-426.

## 序列表

<110> 芝加哥大学  
 <120> 包含葡萄球菌蛋白A (SpA) 变体的方法和组合物  
 <130> ARCD. P0676W0  
 <150> US 62/847, 832  
 <151> 2019-05-14  
 <160> 60  
 <170> PatentIn 版本 3.5  
 <210> 1  
 <211> 512  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌  
 <400> 1

Met Leu Thr Leu Gln Ile His Thr Gly Gly Ile Asn Leu Lys Lys Lys  
 1 5 10 15

[0001] Asn Ile Tyr Ser Ile Arg Lys Leu Gly Val Gly Ile Ala Ser Val Thr  
 20 25 30

Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser Gly Gly Val Thr Pro Ala Ala Asn Ala  
 35 40 45

Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn  
 50 55 60

Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys  
 85 90 95

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe  
 100 105 110

Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn  
 115 120 125

Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp  
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu  
 145 150 155 160

Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
 165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg  
 180 185 190

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn  
 195 200 205

Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala  
 210 215 220

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 225 230 235 240

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser  
 245 250 255

[0002]

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys  
 260 265 270

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys  
 275 280 285

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
 290 295 300

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 305 310 315 320

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 325 330 335

Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn  
 340 345 350

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys  
 355 360 365

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn  
 370 375 380

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys  
 385 390 395 400

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn  
 405 410 415

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly  
 420 425 430

Asp Thr Val Asn Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys  
 435 440 445

Ile Ala Ala Asp Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly  
 450 455 460

Gln Glu Leu Val Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala  
 465 470 475 480

[0003] Asn Lys Ala Gln Ala Leu Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile  
 485 490 495

Gly Thr Thr Val Phe Gly Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu  
 500 505 510

<210> 2  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 2

Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser  
 50

<210> 3  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 3

Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met  
 1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu  
 35 40 45

Asn Asp Ser  
 50

<210> 4  
 <211> 52  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

[0004]

<400> 4

Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn  
 1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
 20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys  
 35 40 45

Leu Asn Glu Ser  
 50

<210> 5  
 <211> 52  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 5

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
35 40 45

Leu Asn Asp Ala  
50

<210> 6  
<211> 52  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 6

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
20 25 30

[0005] Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
35 40 45

Leu Asn Asp Ala  
50

<210> 7  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 7

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50

55

60

<210> 8  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 8

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Gln His Asp Glu Ala Lys Lys Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly  
 20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

[0006]

<210> 9  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 9

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Gln His Asp Glu Ala Lys Lys Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Ala  
 20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 10  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 10

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Gln His Asp Glu Ala Lys Lys Asn Ala Phe



Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 13  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 13

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55

[0008] <210> 14  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 14

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 15  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 15

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 16

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 16

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe  
1 5 10 15

[0009] Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 17

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 17

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 18  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 18

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Leu  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

[0010] <210> 19  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 19

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Pro  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 20  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 20

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 21  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 21

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

[0011] Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Glu  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 22  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 22

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 23  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 23

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Lys  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

[0012]

<210> 24  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 24

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ser  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 25  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 25

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Thr  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 26

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 26

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

[0013]

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gln  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 27

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 27

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu

35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 28  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 28

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Ala Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

[0014]

<210> 29  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 29

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 30  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 30

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 31

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 31

[0015] Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 32

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 32

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Gln Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 33  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 33

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Ala Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

[0016] Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 34  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 34

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 35  
<211> 61  
<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 35

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 36

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 36

[0017] Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Lys Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 37

<211> 61

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 37

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
20 25 30

Phe Ile Gln Gln Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 38  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 38

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly  
 20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

[0018] Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 39  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 39

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
 20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 40  
 <211> 61

<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 40

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 41  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 41

[0019] Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
20 25 30

Phe Ile Gln Gln Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 42  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 42

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 43  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 43

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
 20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

[0020] Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 44  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 44

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
 20 25 30

Phe Ile Gln Gln Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 45

<211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌  
 <400> 45

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg  
 20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 46  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌  
 <400> 46

[0021]

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg  
 20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 47  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌  
 <400> 47

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg

	20	25	30
	Phe Ile Gln Gln Leu Lys Asp Asp	Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu	
	35	40	45
	Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys		
	50	55	60
	<210> 48		
	<211> 61		
	<212> PRT		
	<213> 金黄色葡萄球菌		
	<400> 48		
	Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe		
	1	5	10 15
	Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly		
	20	25	30
[0022]	Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp	Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu	
	35	40	45
	Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys		
	50	55	60
	<210> 49		
	<211> 61		
	<212> PRT		
	<213> 金黄色葡萄球菌		
	<400> 49		
	Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe		
	1	5	10 15
	Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala		
	20	25	30
	Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu		
	35	40	45
	Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys		
	50	55	60

<210> 50  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 50

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
 20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 51  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

[0023]

<400> 51

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg  
 20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 52  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 52

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 53  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 53

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
20 25 30

[0024] Phe Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 54  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 54

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Ala  
20 25 30

Phe Ile Gln Gln Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 55  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 55

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
 20 25 30

Phe Ile Gln Phe Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 56  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

[0025]

<400> 56

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
 20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 57  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 57

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Phe  
20 25 30

Phe Ile Gln Gln Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 58  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 58

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg  
20 25 30

[0026] Phe Ile Gln Phe Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 59  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 59

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Arg  
20 25 30

Phe Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60



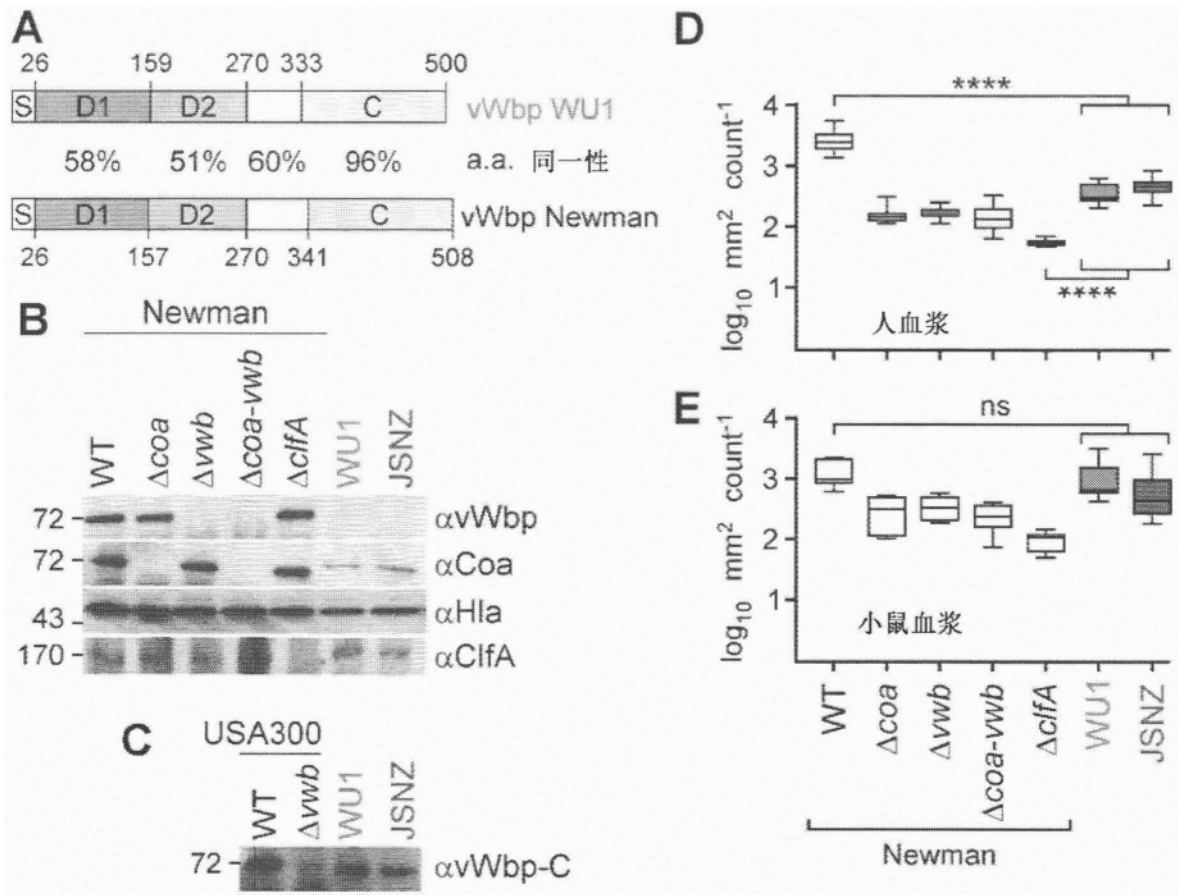


图1A-E

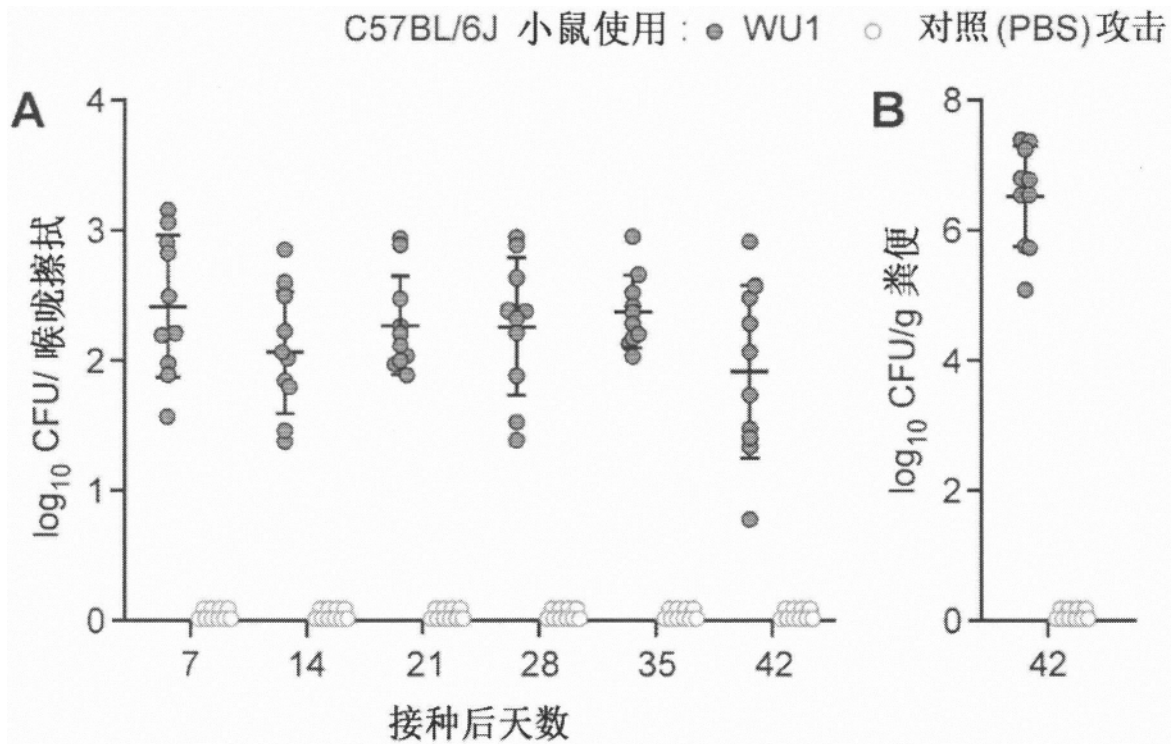


图2A-B

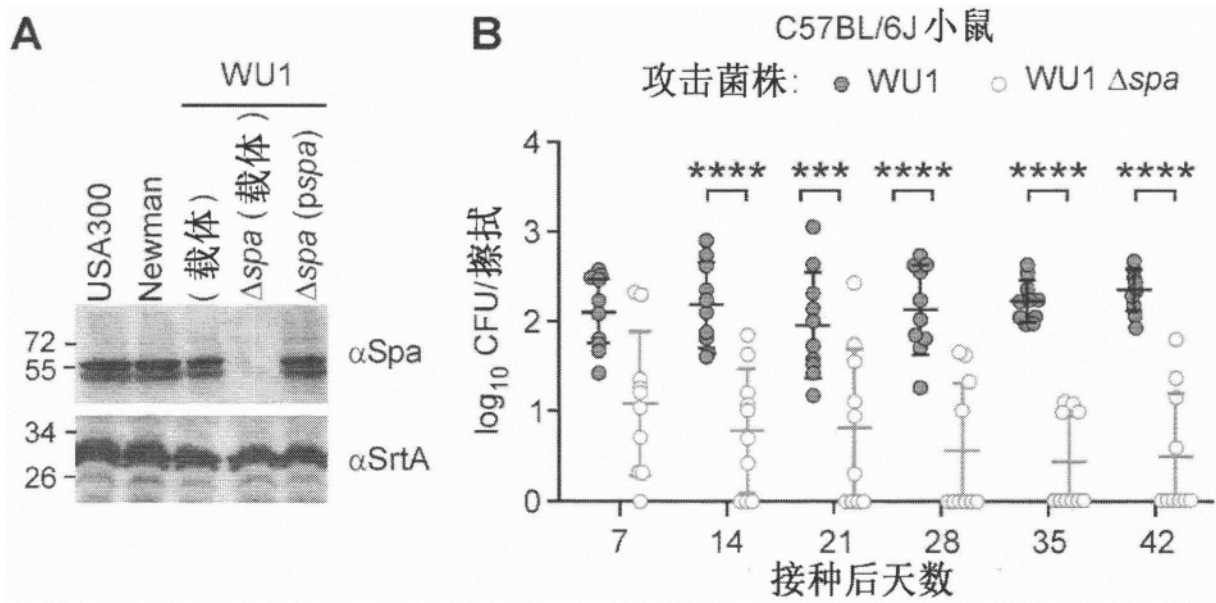


图3A-B



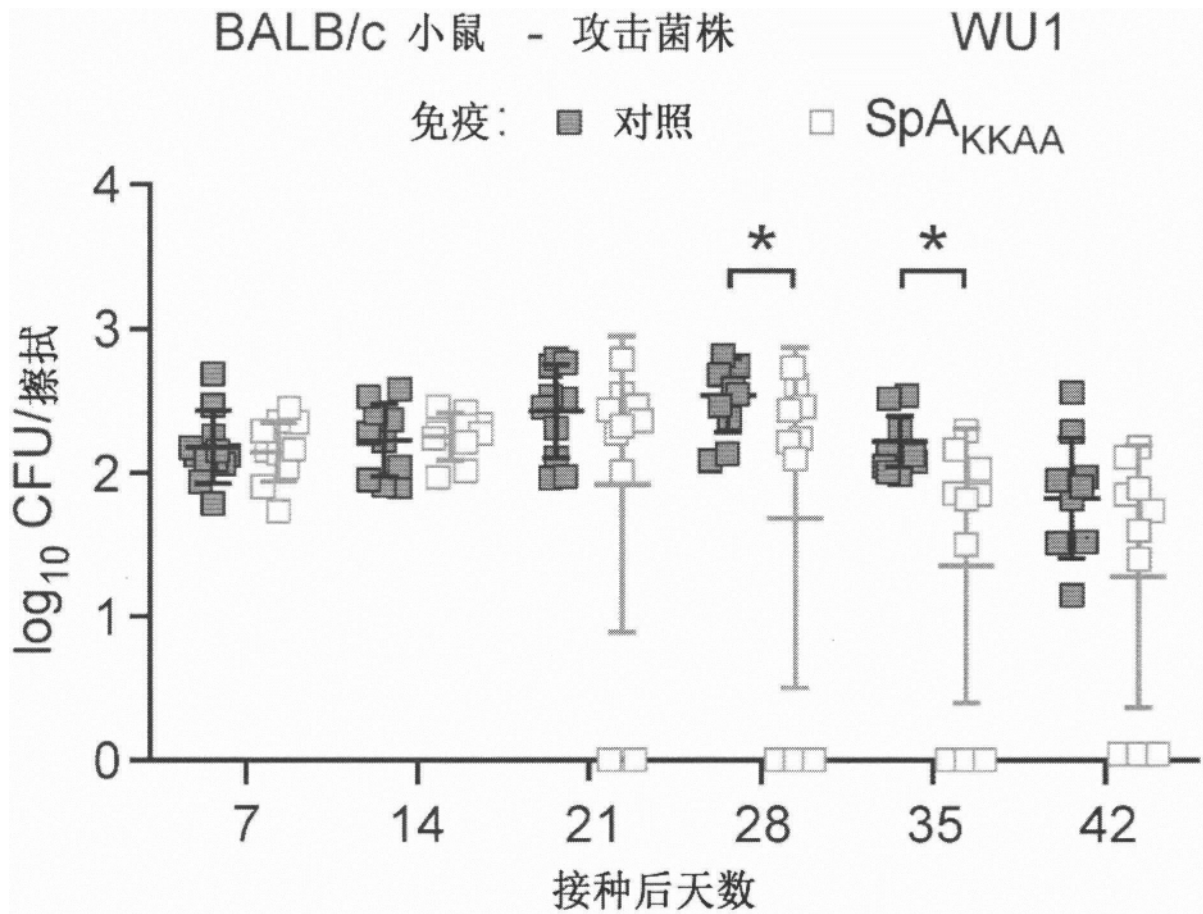


图5

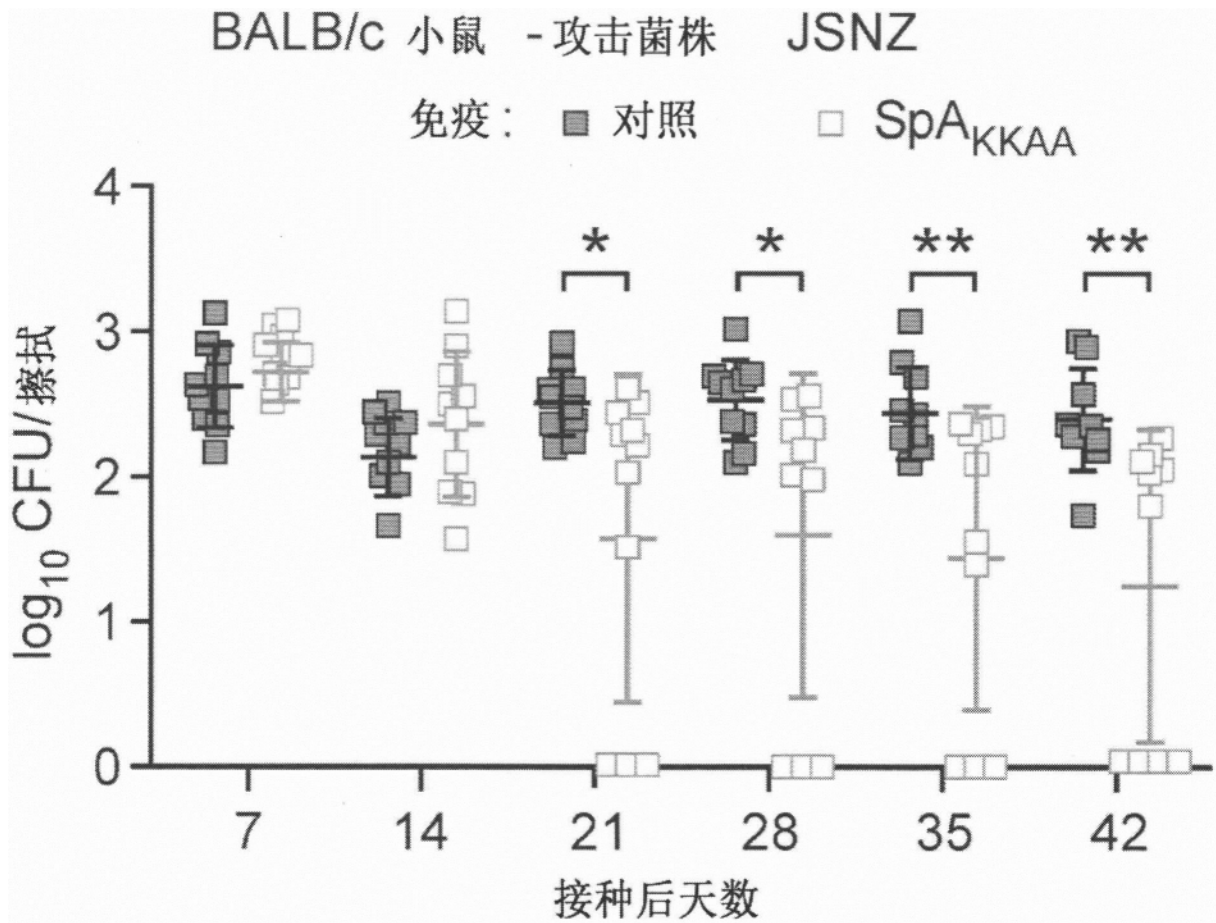


图6

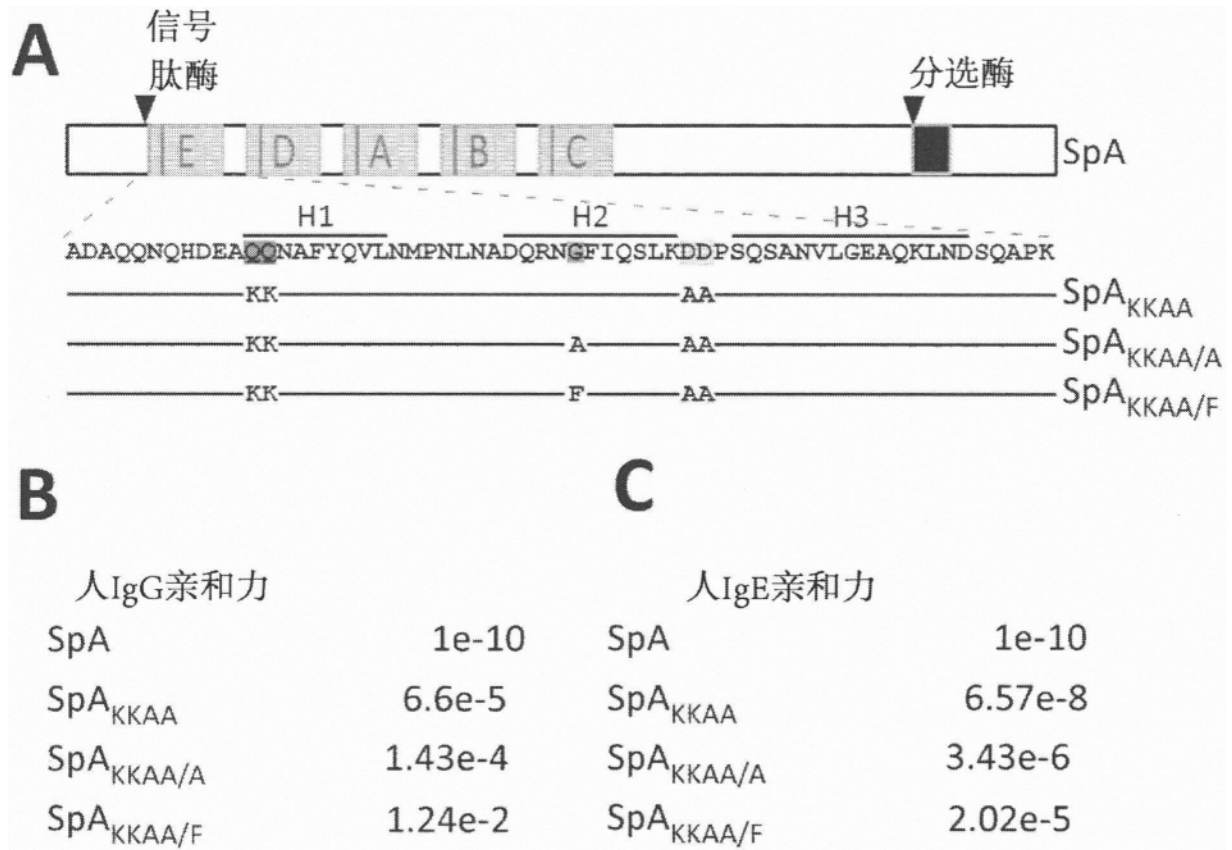


图7A-C

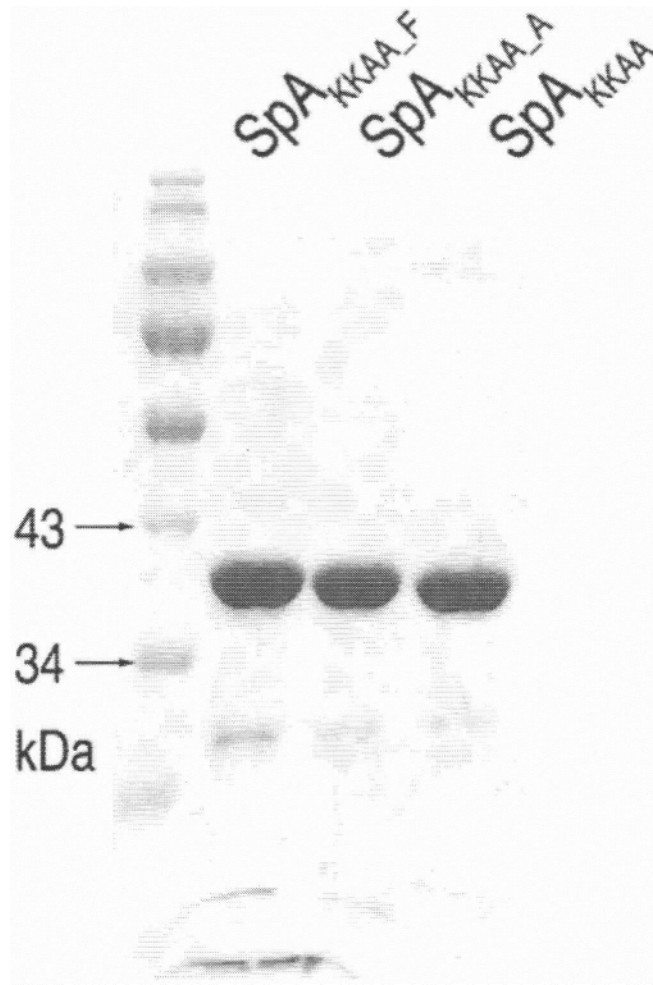


图8A

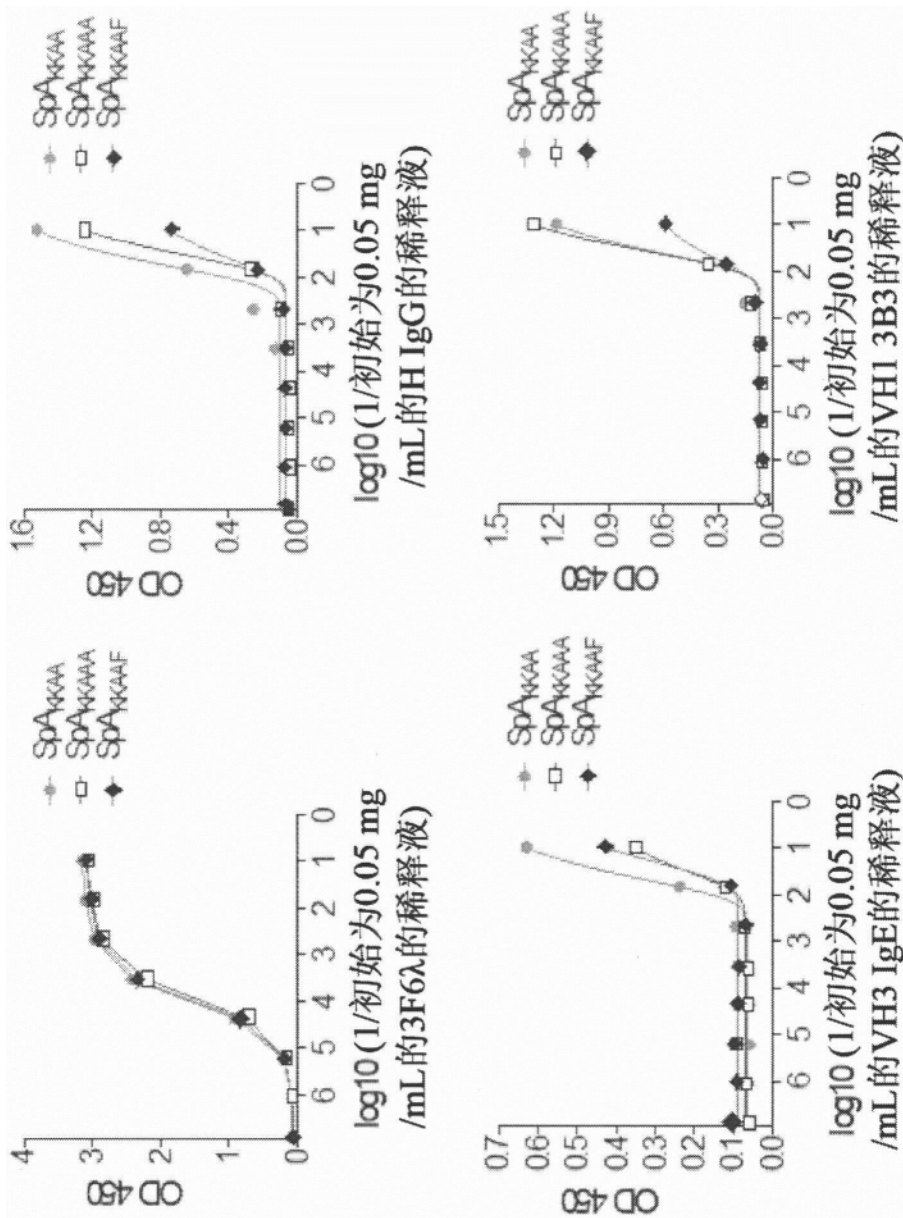


图8B

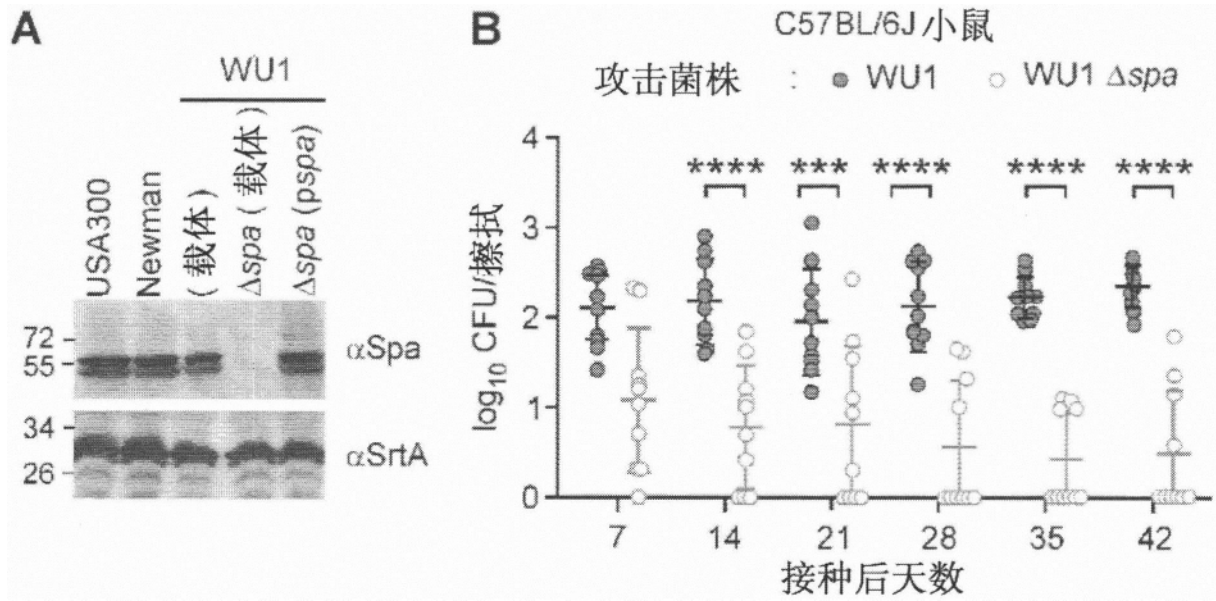


图9A-B

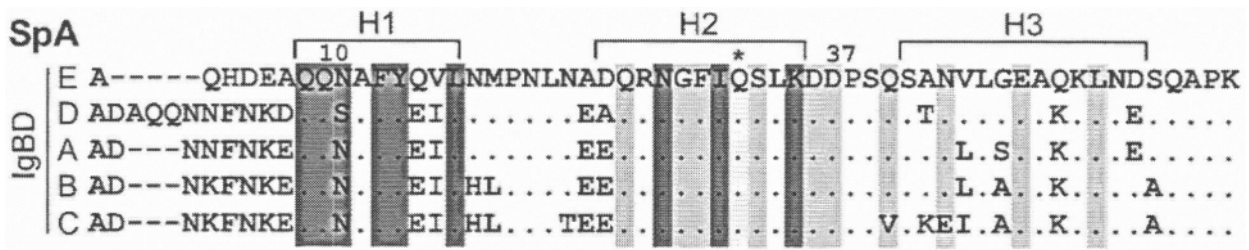


图10

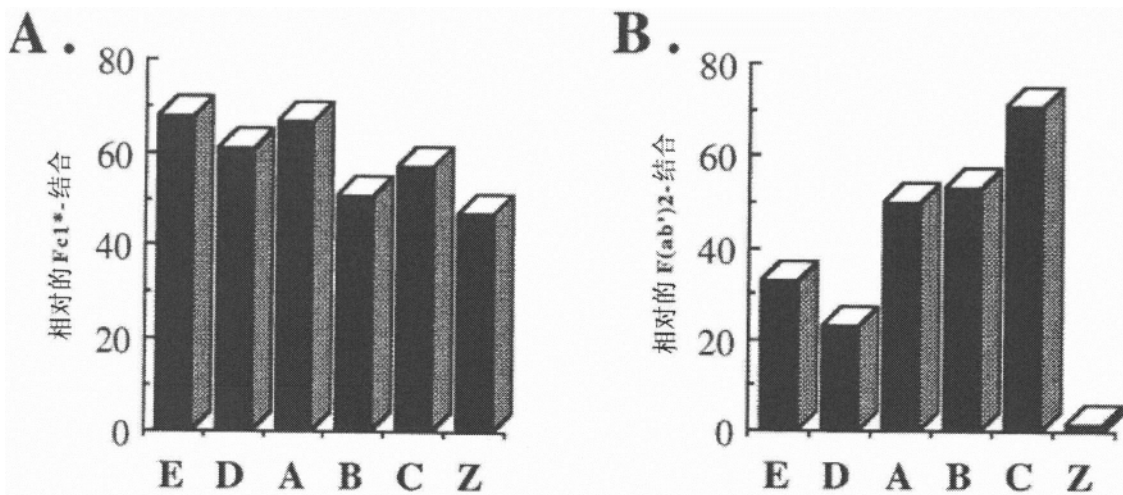


图11

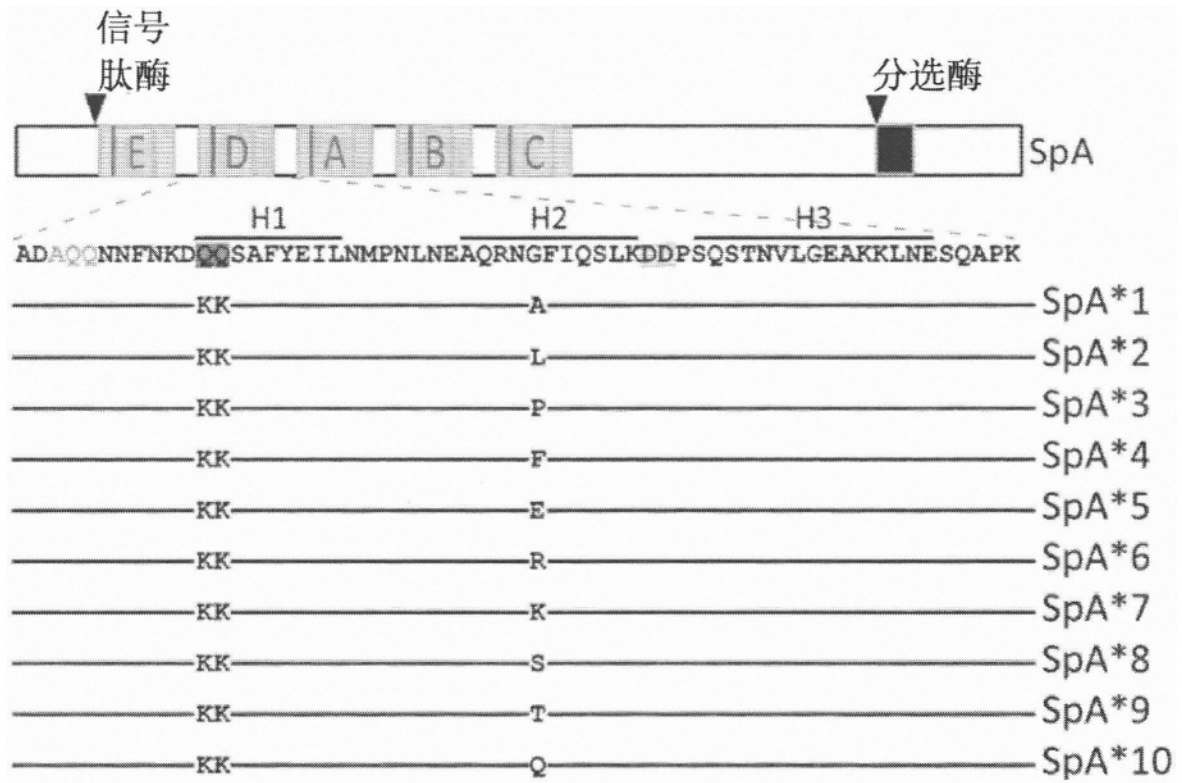


图12A

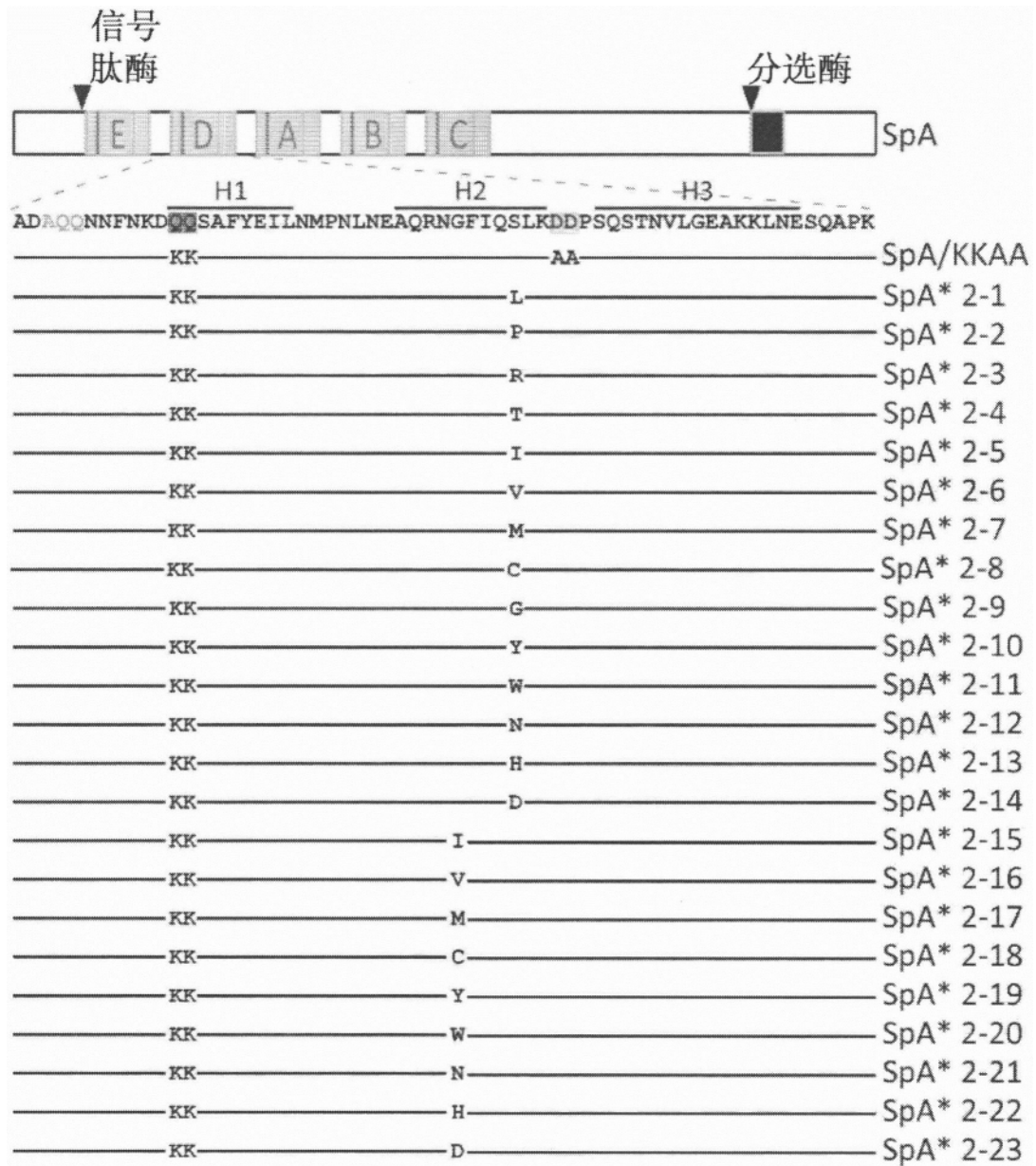


图12B

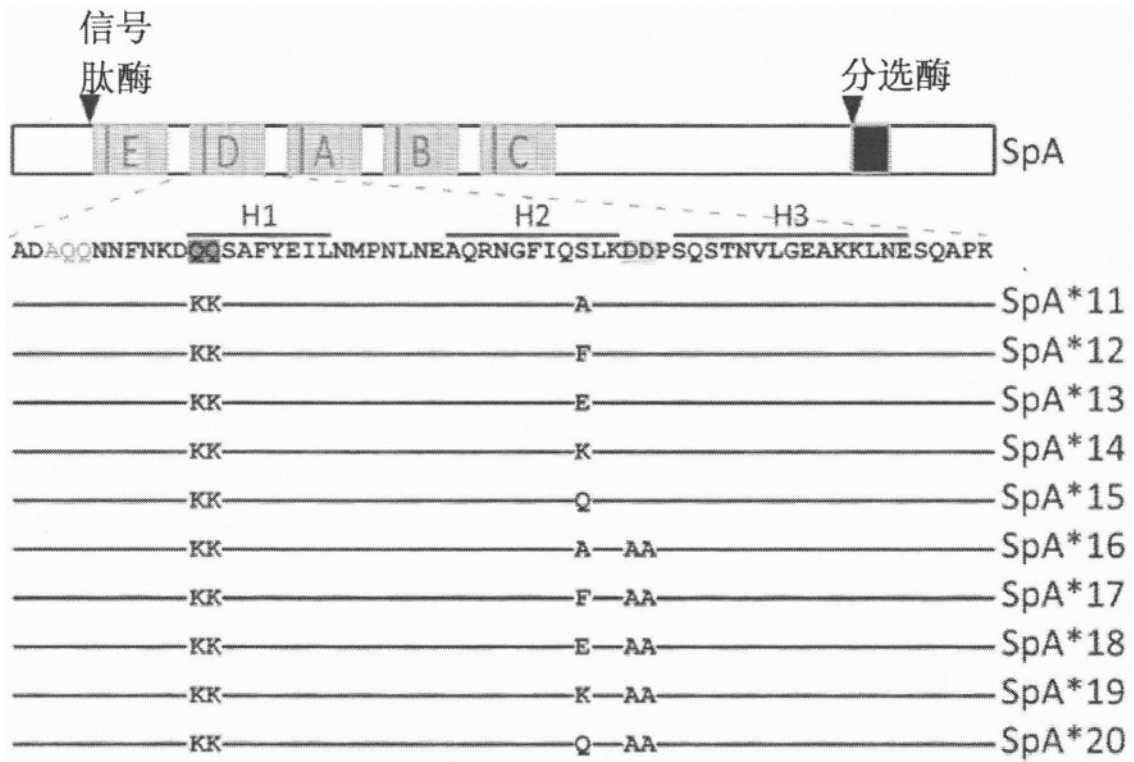


图13



图14

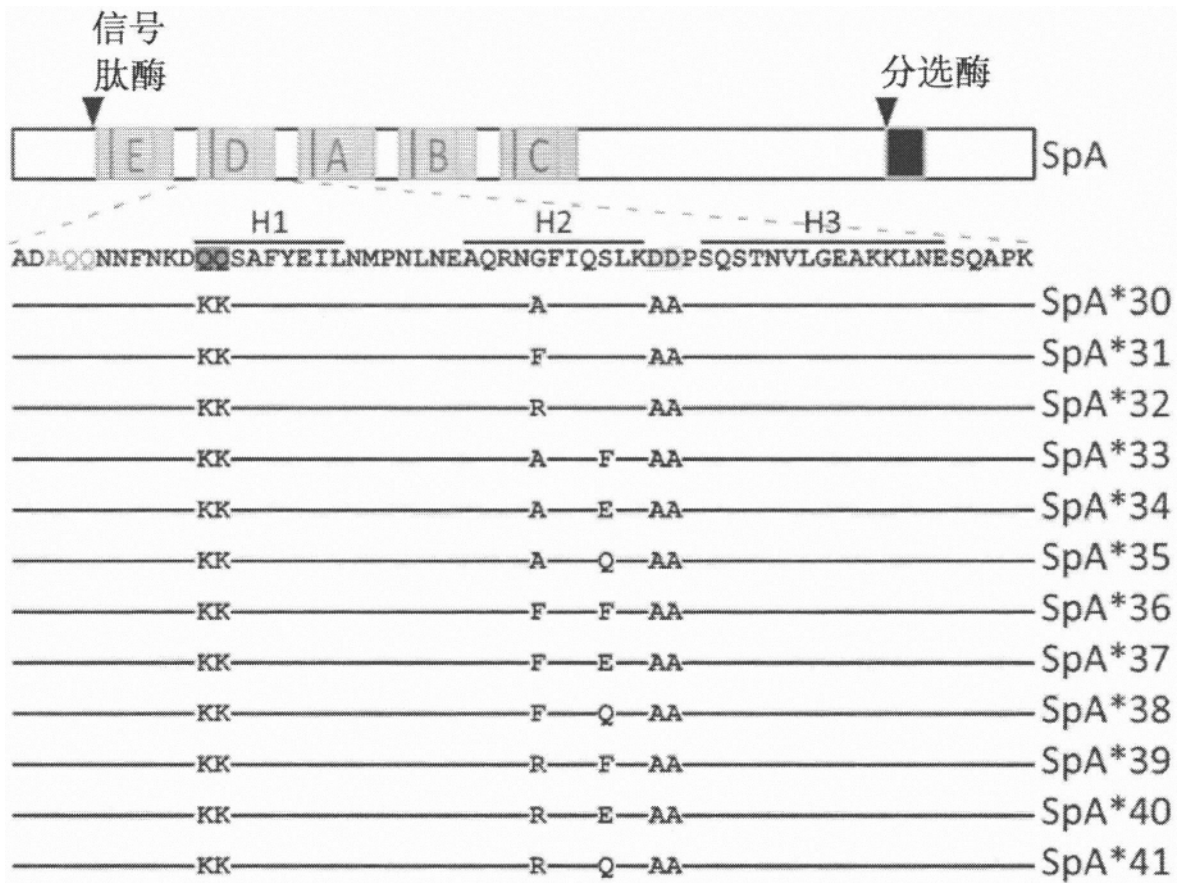


图15

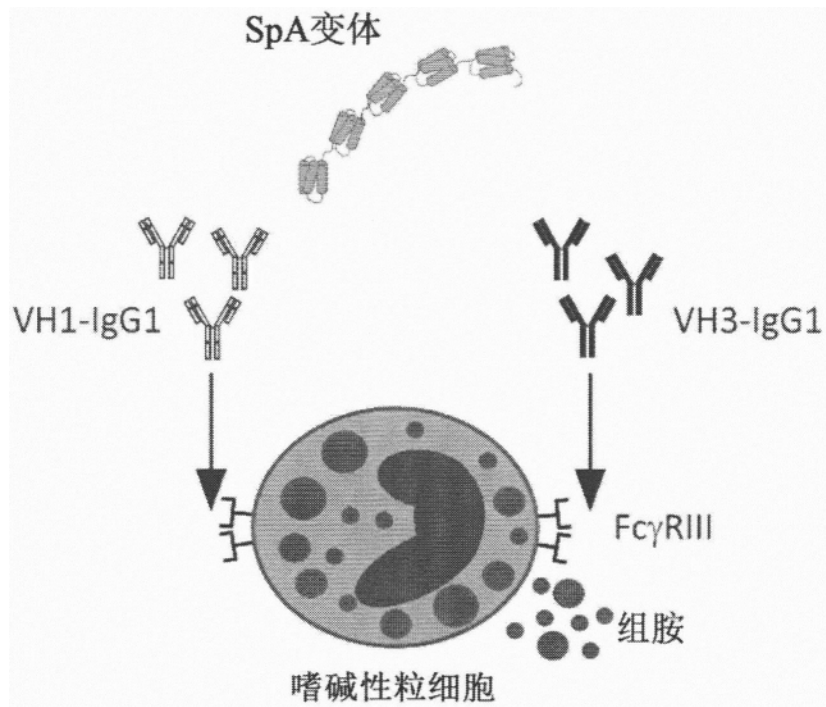


图16



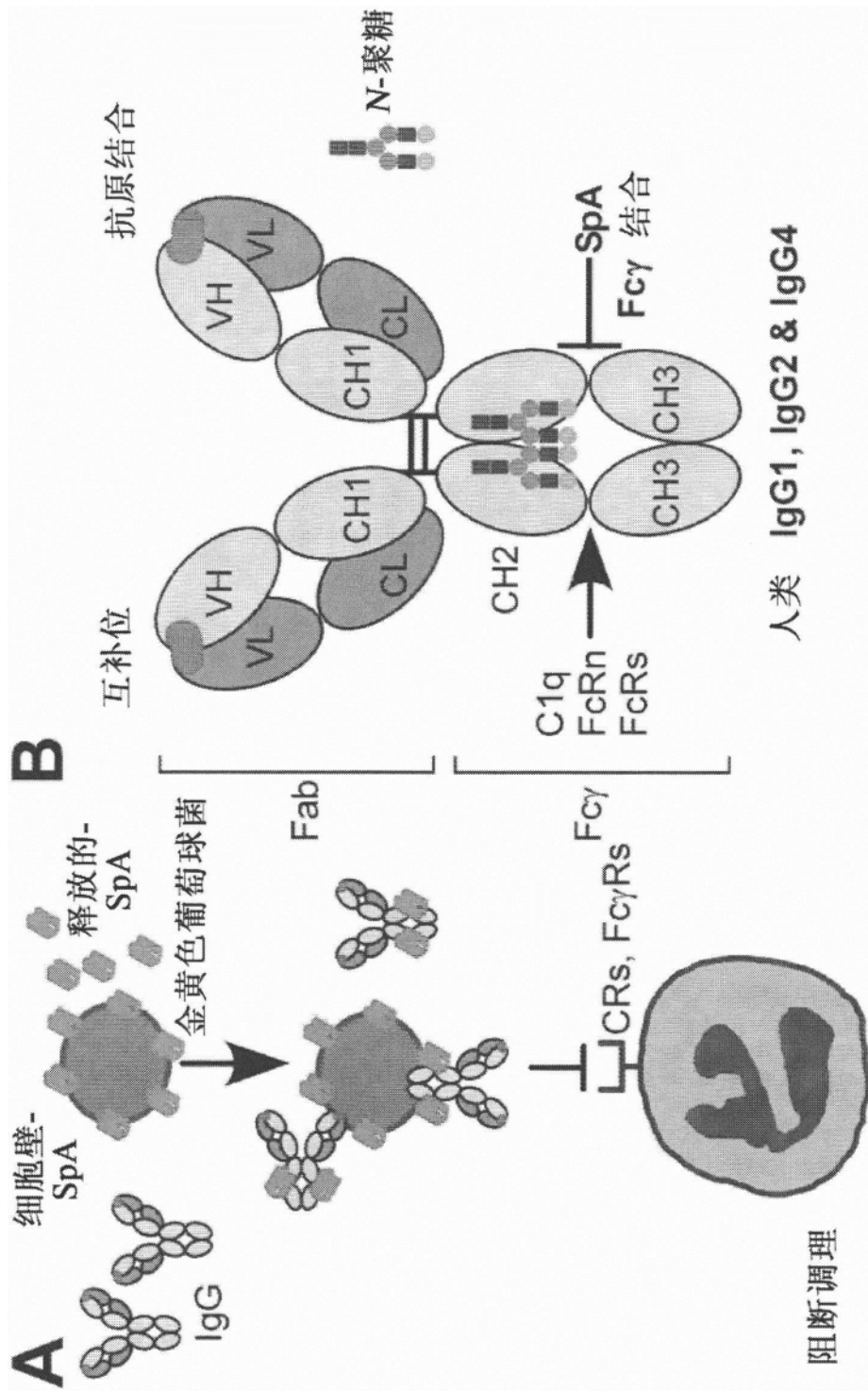


图18A-B

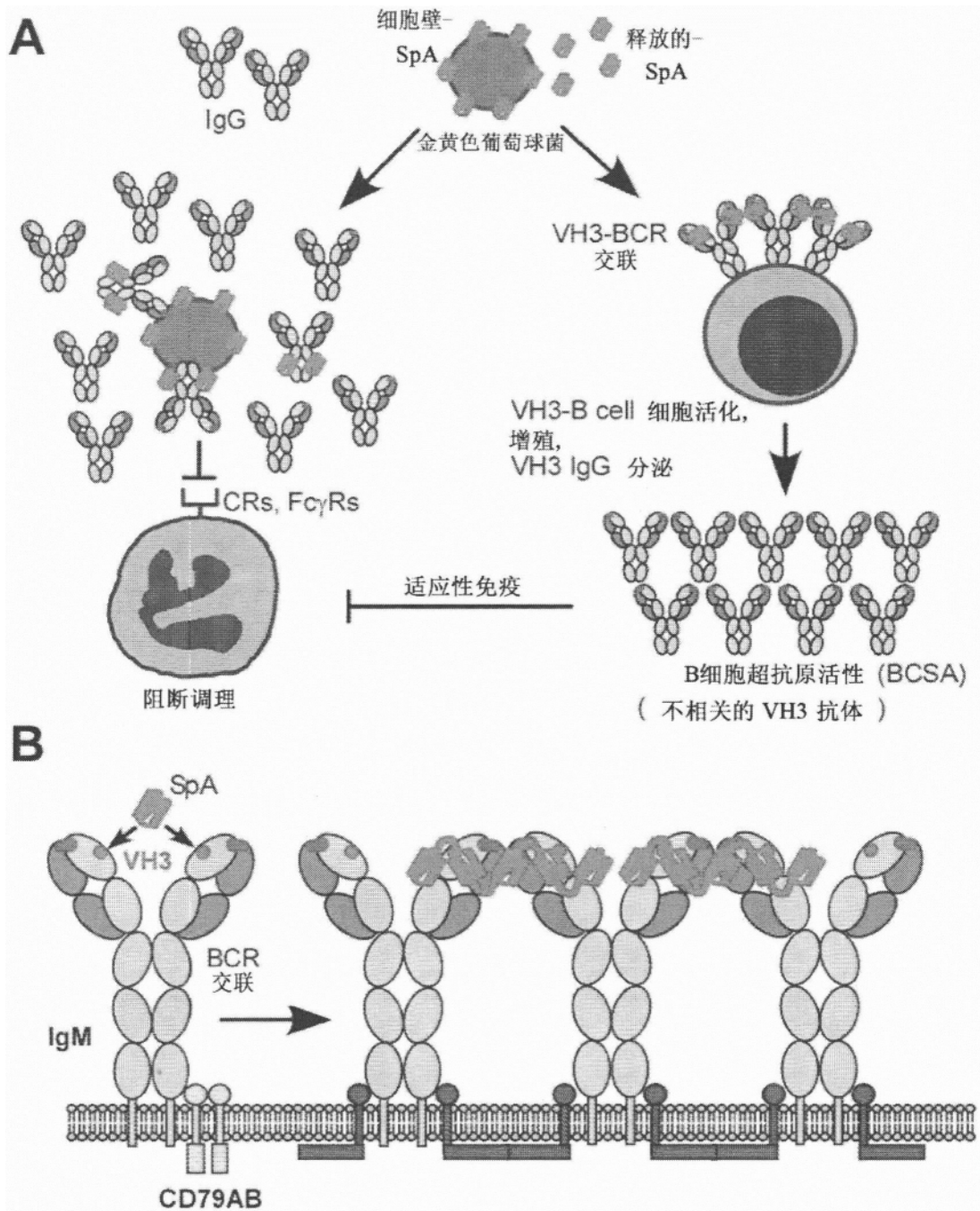


图19A-B



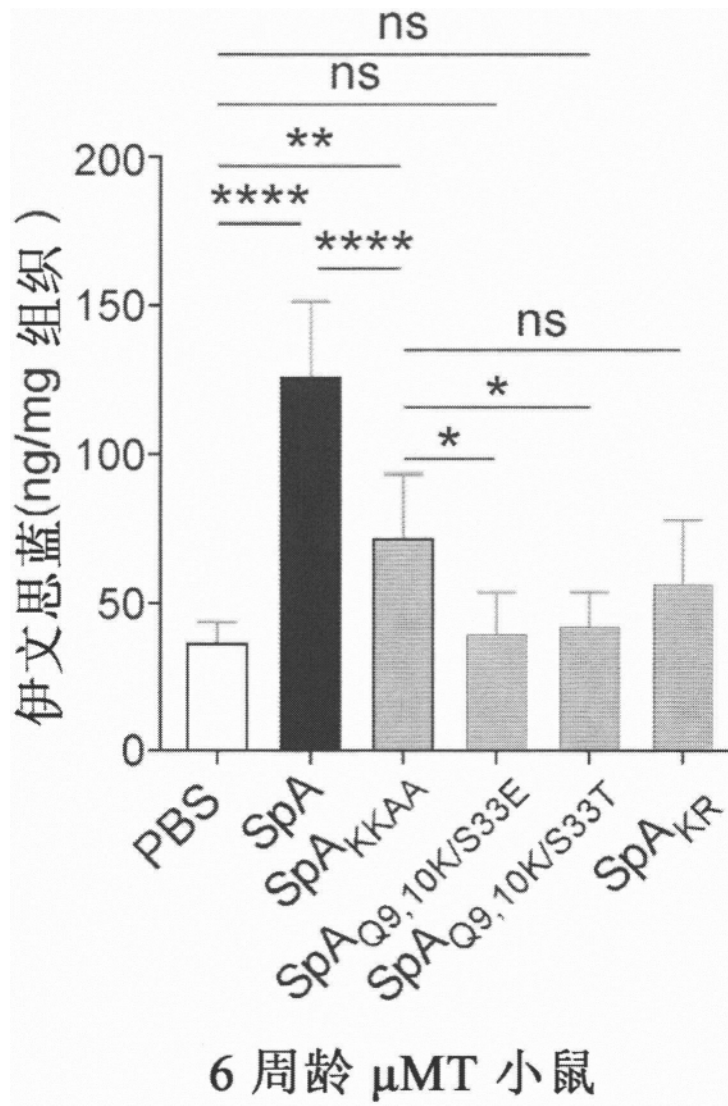


图22A-B

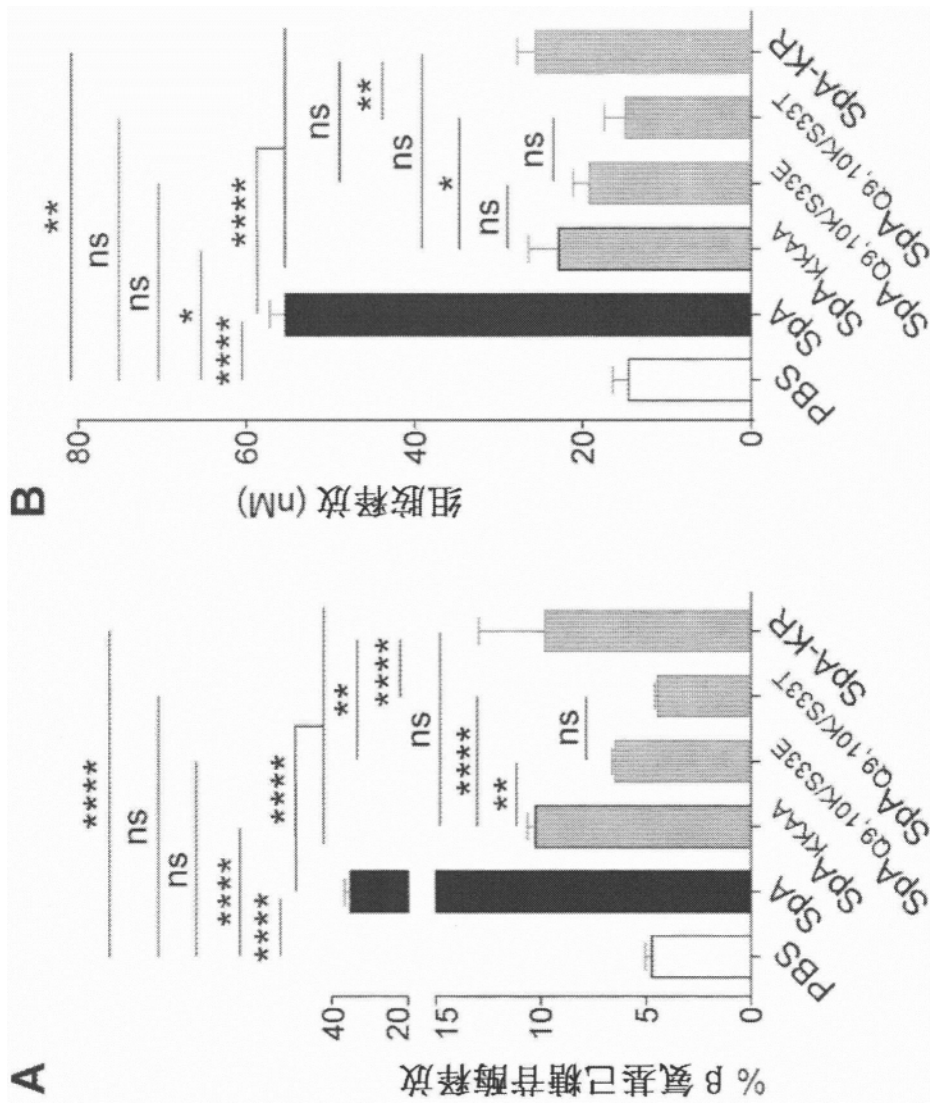


图23A-B

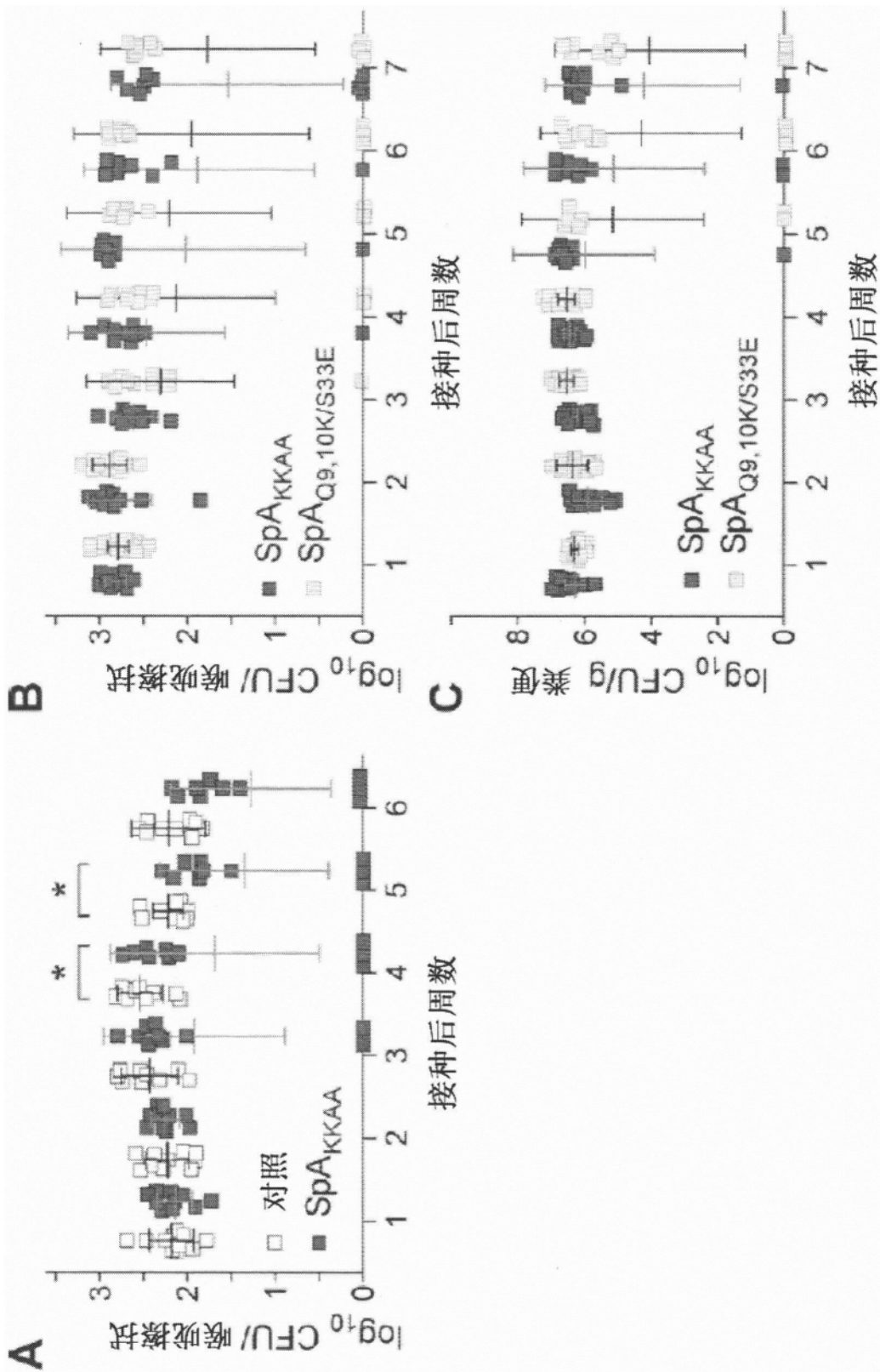


图24A-C

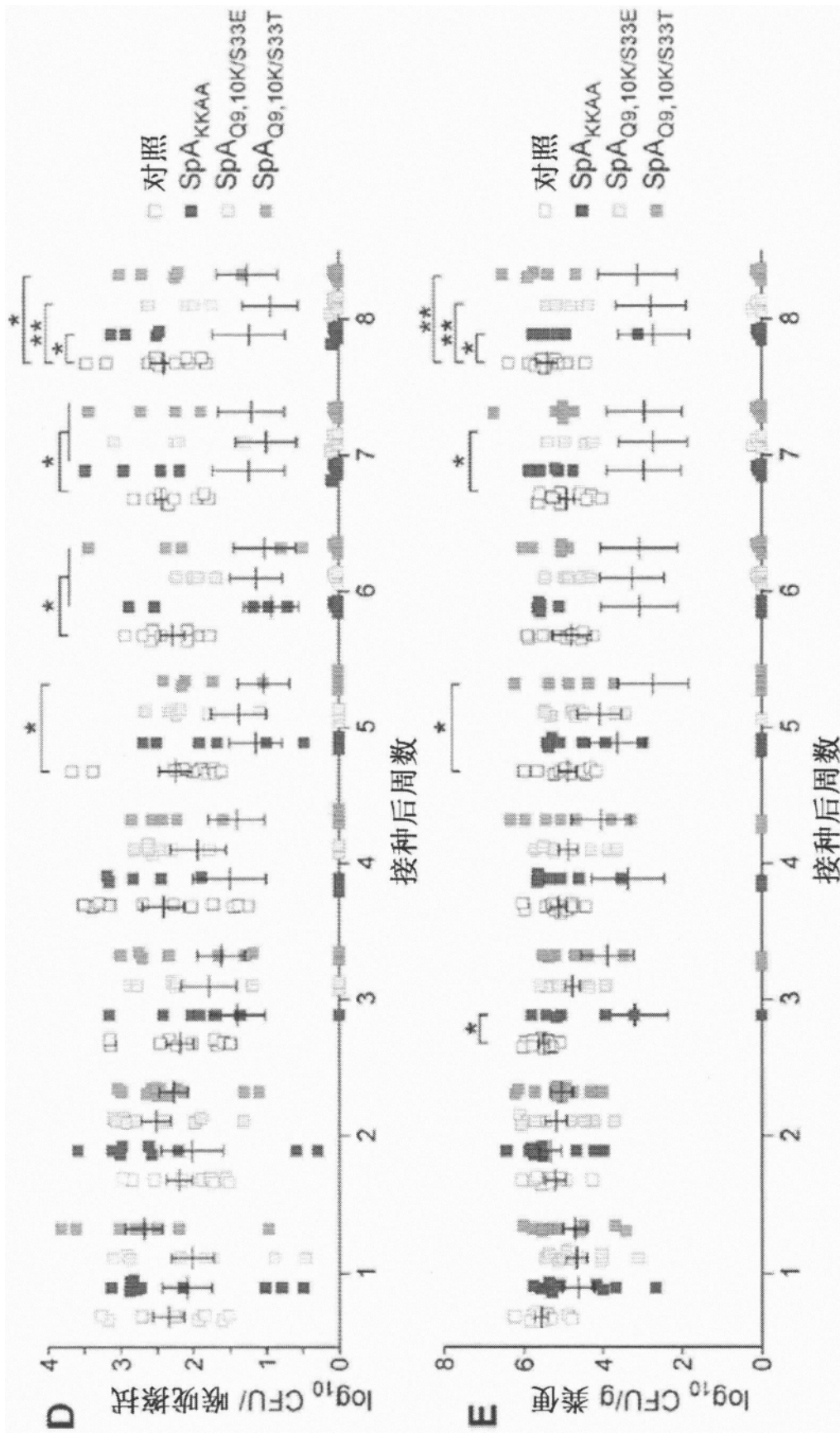


图24D

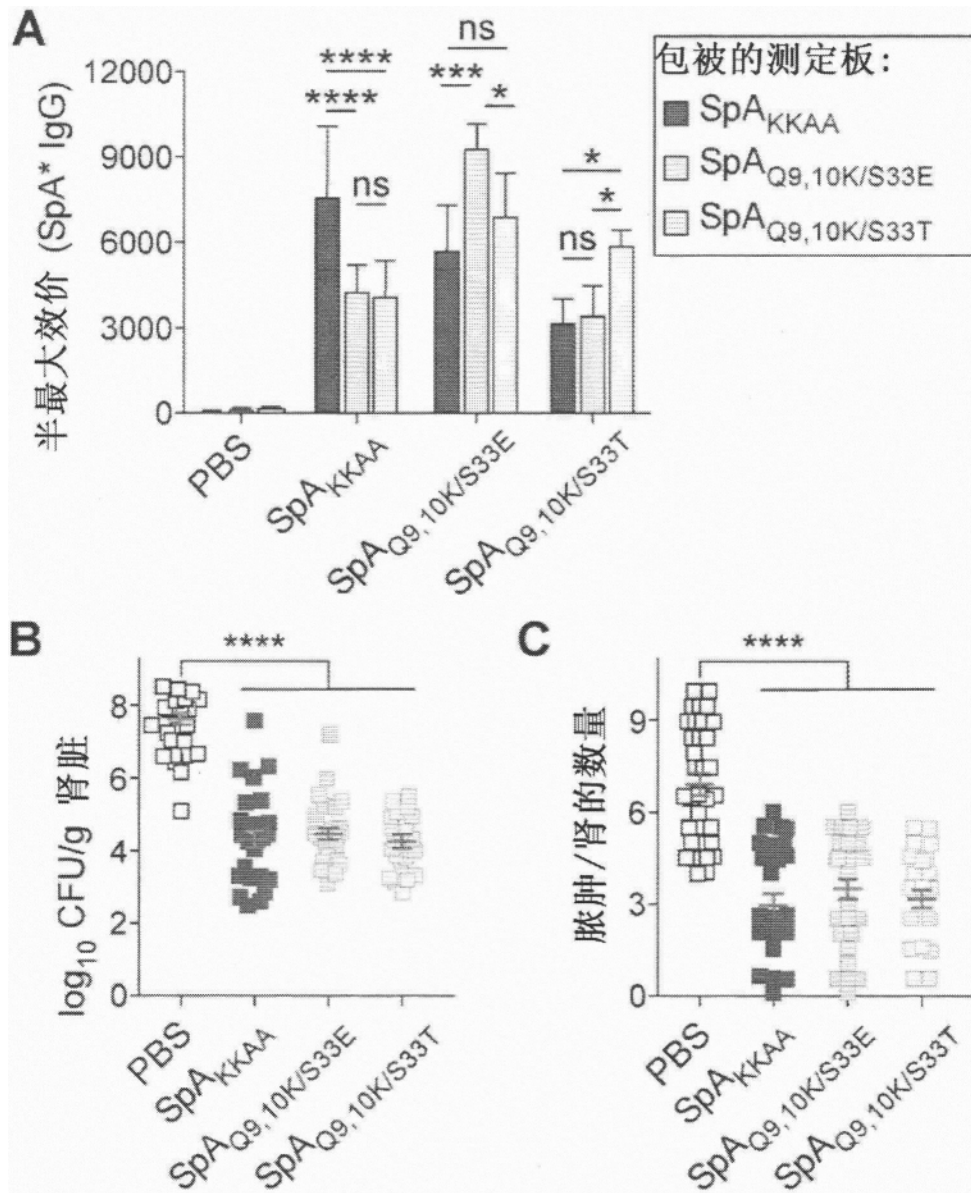


图25A-C

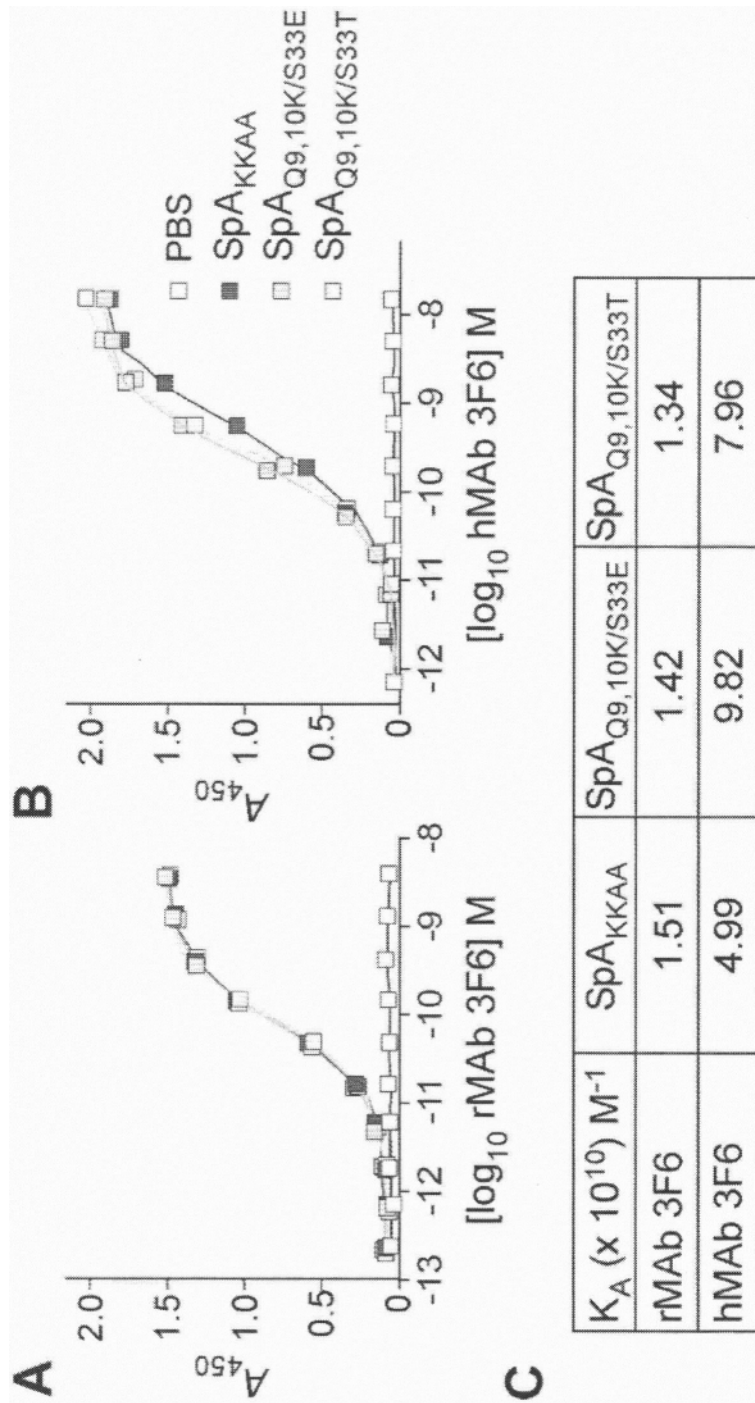


图26A-C