



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104321338 B

(45)授权公告日 2018.10.19

(21)申请号 201380011223.1

(22)申请日 2013.02.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104321338 A

(43)申请公布日 2015.01.28

(30)优先权数据

61/603693 2012.02.27 US

61/603661 2012.02.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.08.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/027340 2013.02.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/130351 EN 2013.09.06

(83)生物保藏信息

ATCC 55676 1995.06.02

(73)专利权人 奥洁克公司

地址 美国佛罗里达州

专利权人 得克萨斯农业及机械体系综合大学

(72)发明人 J.D.希尔曼 J.L.史密斯

S.R.威尔逊-斯坦福德

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 黄登高 孟慧岚

(51)Int.Cl.

C07K 14/315(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009135945 A1, 2009.11.12,

US 2006198793 A1, 2006.09.07,

CN 1639318 A, 2005.07.13,

审查员 李煦颖

权利要求书1页 说明书19页

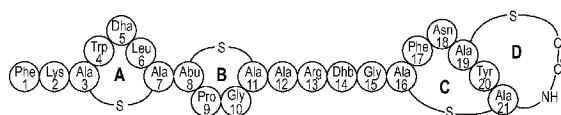
序列表10页 附图5页

(54)发明名称

用于龋齿的替代疗法

(57)摘要

本发明提供可用于改善口腔健康的重组变形链球菌菌株。本发明的一个实施方案提供在易患龋齿的宿主中降低龋齿的发生率或严重性的方法,该方法包括口服给予宿主有效量的本发明分离的重组变形链球菌菌株,用于替代宿主口腔中的引起龋齿的变形链球菌宿主菌株。分离的重组变形链球菌菌株10可被包含在漱口剂、牙膏、口香糖、牙线、咀嚼片、食品或饮料中。



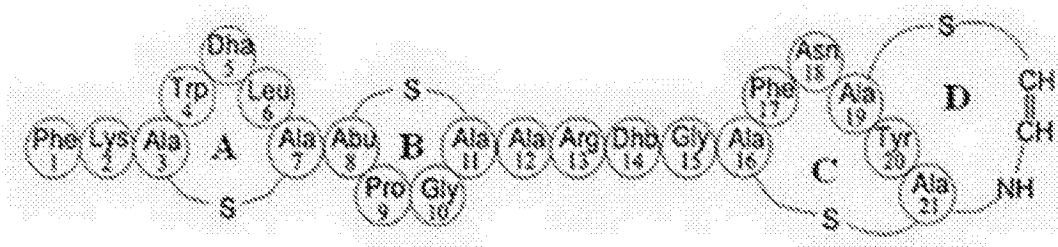
野生型(天然) MU1140

1. 一种分离的重组变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 菌株, 其包含:

(a) 涉及乳酸脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸磷酸转移酶系统、糖原合成酶或果糖基转移酶合成的多核苷酸的突变, 以使乳酸的表达在与野生型变形链球菌菌株比较时减少80%或更多;

(b) 重组醇脱氢酶多核苷酸;

(c) 编码包含式I的羊毛硫抗生素的重组多核苷酸:



式I,

其中存在以下突变: Phe1Ile突变; Trp4Ala突变; Dha5Ala突变或Arg13Asp突变。

2. 权利要求1的分离的重组变形链球菌菌株, 其还包含在涉及ComE、ComC或ComE和ComC二者合成的多核苷酸中的突变, 以使ComE、ComC, 或ComE和ComC二者的表达在与变形链球菌菌株比较时减少80%或更多。

3. 权利要求1的分离的重组变形链球菌菌株, 其还包含在涉及D-氨基酸合成的多核苷酸中的突变, 以使D-氨基酸的表达在与野生型变形链球菌菌株比较时减少80%或更多。

4. 权利要求3的分离的重组变形链球菌菌株, 其中多核苷酸为 dal 或用于 dal 的启动子。

5. 权利要求1的分离的重组变形链球菌菌株, 其中重组醇脱氢酶多核苷酸是运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 醇脱氢酶多核苷酸或变形链球菌醇脱氢酶多核苷酸。

6. 权利要求1的分离的重组变形链球菌菌株在制备用于在易患龋齿的宿主中降低龋齿的发生率或严重性的药物中的用途, 所述分离的重组变形链球菌菌株的量有效用于替代宿主口腔中引起龋齿的变形链球菌宿主菌株。

7. 权利要求6的用途, 其中分离的重组变形链球菌菌株包含在漱口剂、牙膏、口香糖、牙线或咀嚼片中。

8. 权利要求6的用途, 其中分离的重组变形链球菌菌株包含在漱口剂、牙膏、牙线或食品中。

9. 权利要求6的用途, 其中分离的重组变形链球菌菌株包含在漱口剂、牙膏、牙线或饮料中。

10. 一种用于降低龋齿的发生率或严重性的药物组合物, 其包含权利要求1的分离的重组变形链球菌菌株和药学上可接受的载体。

用于龋齿的替代疗法

[0001] 优先权

[0002] 该申请要求2012年2月27日提交的美国临时申请61/603,661和2012年2月27日提交的美国临时申请61/603,693的权益,此二者通过引用以其全部内容结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 龋齿是世界上最流行的慢性感染性疾病之一。超过一半的5-9岁美国儿童具有至少一个牙洞或牙填料;到17岁,几乎80%的美国年轻人已有牙洞。美国卫生和公众服务部. 美国的口腔健康:一种外科医生的总执行概要(Oral Health in America: A Report of the Surgeon General--Executive Summary). Rockville, MD:美国卫生和公众服务部,国立牙科和颅面研究,国立卫生研究院, 2000。

[0005] 根据牙科,口腔和颅面数据资源中心,在美国有关治疗龋齿的年度支出估算为每年400亿美元(\$)。龋齿的特征在于牙釉质和牙本质的脱矿质化,最终导致牙齿的破坏。膳食糖经常被误解为龋齿的原因;然而,龋齿的直接原因是由在牙齿表面上代谢糖的微生物产生的乳酸。研究提示在大约700种口腔微生物中,变形链球菌(*Streptococcus mutans*),一种几乎在所有人中发现的细菌,是发生龋齿的主要病原体。变形链球菌定居于牙齿表面上的牙菌斑中,当其将膳食糖转化为乳酸时,从碳水化合物代谢获得能量,而乳酸又继而促进牙釉质和牙本质的脱矿质化,最终导致牙洞。矿物质丢失的速率取决于几个因素,包括变形链球菌细胞存在的数目和其消耗糖的频率和量。

[0006] 利用细菌干扰(bacterial interference),用非致病的、效应菌株替代致病菌株例如变形链球菌的治疗方案被称为替代疗法。成功的替代疗法需要这样的效应菌株,其:1) 是非致病的,2) 改变微环境以防止病原生物的定居或生长,和3) 持续地定居于处于风险的宿主以防止由目标病原生物引起的再感染,和在其中病原为宿主的天然菌群的一部分的情况下,从处于风险的组织强有力地置换病原生物。

[0007] 替代疗法原理的应用需要分离变形链球菌的非致龋效应菌株,例如缺乏乳酸合成的变形链球菌菌株,其可比宿主口腔中的天然变形链球菌更具竞争优势(outcompete)。本领域需要稳定的、乳酸-缺乏的、变形链球菌的非致龋株,其可持续地定居于宿主口腔并比其中的天然变形链球菌强有力地更具竞争优势,且其适合用于预防和/或治疗龋齿的替代疗法。

[0008] 效应菌株抢先定居人的口腔且强有力地置换本土野生株的能力最初被认为是依赖于大量的表型特性的复杂现象。然而,已发现单一表型特性可提供必要的选择性优势。从人受试者分离出一种天然存在的变形链球菌菌株,其产生称为MU1140的羊毛硫抗生素,其在针对其进行的试验中能够杀死几乎所有其它的变形链球菌菌株。参见例如,Hillman等人, *Infect. Immun.* 44:141 (1984)。已分离出不产生可检测的MU1140或产生大约3倍升高量的突变体。将突变体用于大鼠模型以使羊毛硫抗生素产生与定居潜力相关。已发现这些菌株抢先定居于宿主且强有力地置换变形链球菌的本土株的能力随着MU1140产生的量增加而显著地增加。

[0009] 在人受试者中观察到MU1140产生和定居潜力之间的相同关系,其中需要反复暴露

于野生亲株以获得持久的定居 (Hillman等人 J. Dent. Res. 66:1092 (1985)), 然而单次暴露于产生3倍升高量的MU1140的菌株是足够的 (Hillman等人 J. Dent. Res. 66:1092 (1987))。后一菌株完全替代人受试者口腔中的变形链球菌的本土株需要经过一年。在此期间, 推测它们对龋齿的易感性持续至本土变形链球菌的水平降至阈值水平之下。

[0010] 为了进一步增加效应菌株的定居潜力用于龋齿的替代疗法, 期望获得一或多株变形链球菌, 其产生升高量的MU1140或产生具有增加的特异性活性的这种分子的变体。这样的菌株将减少效应菌株除去本土的、产乳酸菌株所需的时间并由此获得充分的有效性。这样的菌株也更可能克服任何对定居的固有抗性, 虽然目前尚不知道, 其可存在于所治疗群体的某些个体中。参见例如, Hillman, *Antonie van Leeuwenhoek* 82:361-366, 2002。

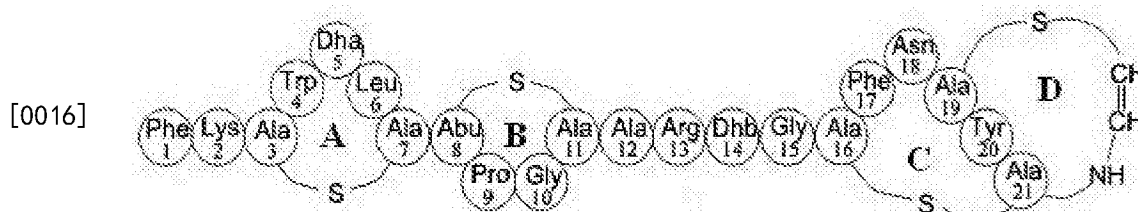
[0011] 发明概述

[0012] 在一个实施方案中, 本发明提供分离的重组变形链球菌菌株, 其包含:

[0013] (a) 涉及乳酸合成的多核苷酸的突变, 以使乳酸的表达在与野生型变形链球菌菌株比较时减少约80%或更多;

[0014] (b) 重组醇脱氢酶多核苷酸;

[0015] (c) 编码包含式I的羊毛硫抗生素的重组多核苷酸:



[0017] (SEQ ID NO:1), 其中存在以下突变: Phe1Ile突变或Phe1Gly突变; Trp4Ala突变; Dha5Ala突变; Arg13Asp突变; 或这些突变的两种或多种的组合。所述菌株还可包含 Trp4insAla突变或 Δ Trp4突变。以下氨基酸取代也可存在: Abu8Ala或Dhb14Ala, 或Abu8Ala和Dhb14Ala二者。所述菌株还可包含涉及ComE、ComC, 或ComE和ComC二者合成的多核苷酸的突变, 以使ComE、ComC, 或ComE和ComC二者的表达在与野生型变形链球菌菌株比较时减少约80%或更多。所述菌株可进一步包含涉及D-氨基酸合成的多核苷酸的突变, 以使D-氨基酸的表达在与野生型变形链球菌菌株比较时减少约80%或更多。涉及D-氨基酸合成的多核苷酸可以是 dal 或用于 dal 的启动子。重组醇脱氢酶多核苷酸可以是运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 醇脱氢酶多核苷酸或变形链球菌醇脱氢酶多核苷酸。

[0018] 本发明的另一个实施方案提供一种在易患龋齿的宿主中降低龋齿的发生率或严重性的方法, 其包括口服给予宿主本发明的分离的重组变形链球菌菌株, 其量有效用于替代在宿主口腔中的引起龋齿的变形链球菌宿主株。分离的重组变形链球菌菌株可包含在漱口剂、牙膏、口香糖、牙线、咀嚼片、食品或饮料中。

[0019] 本发明的另一个实施方案提供一种用于降低龋齿的发生率或严重性的药物组合物, 其包含本发明的分离的重组变形链球菌菌株和药学上可接受的载体。

[0020] 因此, 本发明提供稳定的、乳酸-缺乏的和非致龋的变形链球菌菌株, 其可比天然变形链球菌强有力地更具竞争优势, 尤其是因为其表达了与野生型MU1140羊毛硫抗生素比较时, 生物学活性改善的变体MU1140羊毛硫抗生素。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A显示野生型MU1140结构 (SEQ ID NO:1)。图1B显示MU1140 (SEQ ID NO:2) 的突变位点。

[0023] 图2示出了突出显示变体MU1140 *lanA*多核苷酸序列突变的染色体DNA序列与野生型MU1140 *lanA*多核苷酸序列。

[0024] 图3显示用于MU1140结构基因*lanA*诱变的引物。

[0025] 图4A-B显示抑菌圈平板测定的结果。

[0026] 图5显示产生MU1140变体的菌株与产生野生型MU1140的菌株比较的生物活性均值和标准差。

[0027] 图6显示产生MU1140变体 (Phe1Ile和Phe1Gly) 的菌株与产生野生型MU1140的菌株比较的生物活性。

[0028] 发明详述

[0029] 如本文所用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数对象,除非上下文另外明确指明。

[0030] 变形链球菌可以经重组处理以不产生乳酸或产生显著减少量的乳酸。Hillman等人 J. Appl. Microbiol. 102:1209 (2007)。可存活的、乳酸-缺乏的变形链球菌菌株可通过用编码重组醇脱氢酶 (ADH) 的核酸转化菌株而生成,以表达重组醇脱氢酶,并在乳酸合成途径中引入突变以使产生重组ADH的菌株乳酸缺乏。重组ADH防止细菌中代谢物的积累,因此避免乳酸缺乏的任何致死性。此外,可对变形链球菌菌株进行重组工程改造以表达具有比野生型MU1140羊毛硫抗生素更高生物学活性的变体MU1140羊毛硫抗生素。这些菌株可比宿主口腔中引起龋齿的野生型、天然变形链球菌菌株更具竞争优势并将其替代。

[0031] 变形链球菌亲株

[0032] 任何变形链球菌菌株可用于构建本发明的重组变形链球菌菌株。本发明的重组变形链球菌菌株相对于通常定居于口腔的野生型变形链球菌菌株具有选择性优势。选择性优势可以通过多种特征的任何一种赋予(例如,抗菌化合物的产生,减少的或有利的相对代谢需求,更高的相对生长率,代谢物清除剂的产生),其促进所述菌株的口腔定居并替代定居口腔的定居菌株。在本发明的一个实施方案中,本发明的重组变形链球菌菌株的定居将不会显著破坏其它非变形链球菌菌株(例如,与龋齿发生无关的正常菌群)。例如,用变形链球菌的重组菌株(其产生具有提高的羊毛硫抗生素活性的变体MU1140羊毛硫抗生素)感染可导致替代定居的、致龋变形链球菌菌株,而不对口腔的其它定居微生物种类产生影响。

[0033] 重组变形链球菌菌株

[0034] 重组变形链球菌菌株是非天然存在的变形链球菌菌株,其已使用多种重组核酸技术(即,涉及DNA或RNA处理的技术)的任何一种生成。一般来说,本发明的重组变形链球菌菌株具有乳酸产生的缺乏;表达重组醇脱氢酶 (ADH) 多肽;和表达足以产生变体MU1140羊毛硫抗生素的重组多肽,所述变体MU1140羊毛硫抗生素具有比野生型MU1140更大的生物学活性。变形链球菌的重组菌株可任选地缺乏ComE、ComC或ComE和ComC二者的表达和/或对通常不存在于口腔或特定宿主的饮食(例如,D-氨基酸)中的有机物质而言可任选地为营养缺陷型的。

[0035] 变体MU1140

[0036] MU1140具有在环B和C之间的“铰链区”扭结的整体马蹄样形状。Smith等人 (2003)

Biochem. 42:10372-10384。这种形状是铰链区中的转角样基序(turn-like motif)的结果,其将氨基-末端AB环(脂质II结合域)朝向羧基-末端重叠的环CD折叠。认为铰链区的柔性在促进MU1140的侧向组装,使其外展并隔离(abduct and sequester)脂质II方面是重要的。在环A中的Trp4的 Ψ 角和Dha5的 Φ 角有助于促进其柔性。而且,已确定sAla7(一种不受硫醚环限制的残基)的 Ψ 键旋转 360° ,使得环A相对于环B自由地自旋。这种柔性被认为在脂质II结合期间对于环A和B的取向是重要的。铰链区还在残基13上含有潜在的易受酶促影响的精氨酸。产生MU1140的结构基因(*lanA*)中的突变以确定以下氨基酸改变的作用:Phe1Ile、Phe1Gly、Trp4Ala、Trp4insAla、 Δ Trp4、Dha5Ala、Ala_s7insAla和Arg13Asp。图1B。

[0037] 已发现,在延迟拮抗测定中,使用藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)菌株ATCC 272作为目标菌株,具有Trp4缺失或在Trp4之后插入Ala的MU1140变体显示出大致等同于野生型的生物活性。Wilson-Sanford等人,(2009) Appl. Environ. Microbiol. 75:1381。在这种测定中,通过计算抑菌圈的面积确定活性。这些结果表明缩短或延长环A对MU1140活性没有有益或有害作用,表明在环A结构中的意想不到的随意性(permissiveness)。如在图5中所示的,当与野生型比较时,Trp4Ala取代导致生物活性在统计学上显著($p < .05$)增加。由于两个氨基酸是不带电荷的和疏水的,可以推测生物活性的差异是由于这两个氨基酸之间的大小差异所致。用Ala替代Dha5也导致生物活性在统计学上显著($p < .05$)增加。在7位的sAla之后插入丙氨酸导致生物活性的显著性($p < .05$)减少。虽然不希望受限于任何特定理论,但由于已经确定sAla7自由地旋转 360° ,使得环A相对于环B自由地自旋,可以推断Ala_s7insAla突变改变了环在脂质II结合期间的取向,有可能影响分子对其底物脂质II的亲和力。当与野生型比较时,Arg13Asp取代显示出生物活性的非常显著($p < .05$)的增加。虽然不希望受限于任何特定理论,但观察到的效果可以是增加的溶解性的结果。如在图6中所示,当与野生型比较时,Phe1Ile和Phe1Gly二者的取代导致生物活性在统计学上显著($p < .05$)增加。值得注意的是,用Asp (GAT/GAC)取代Arg (AGA/AGG/CGT/CGC/CGA/CGG)或用Ala (GCT/GCT/GCA/GCG)取代Trp (TGG)或用Ala (GCT/GCT/GCA/GCG)取代Ser (AGT/AGC)或用Ile (ATT/ATG)或Gly (GGT/GGC/CCA/GGG)取代Phe (TTT/TTC)都是极不可能天然存在的,因为它们涉及多点突变,其可包括在受影响的密码子中的一个或多个颠换。虽然不希望受限于任何特定理论,但该增加的基础可能是由于对脂质II靶标的结合亲和力增加或由于前导序列的切割效率改善。产生具有一个或多个这些定向位点的改变(Phe1Ile、Phe1Gly、Trp4Ala、Dha5Ala和Arg13Asp)的变体MU1140的效应菌株具有通过改进其定居于口腔和强有力地置换致病的变形链球菌本土株的能力,而优于产生野生型MU1140的效应菌株的潜力。

[0038] 本发明的羊毛硫抗生素MU1140的变体为包含翻译后修饰的多肽。翻译后修饰是多肽在其被翻译后的化学修饰。多肽是两个或更多个氨基酸经酰胺键共价连接的聚合物。纯化的多肽是基本上没有细胞材料、其它类型的多肽、化学前体、用于合成多肽的化学品或其组合的多肽制剂。基本上没有细胞材料、培养基、化学前体、用于合成多肽的化学品等的多肽制剂,具有少于约30%、20%、10%、5%、1%或更少的其它多肽、培养基、化学前体和/或用于合成的其它化学品。因此,纯化的多肽具有约70%、80%、90%、95%、99%或更高的纯度。纯化的多肽不包括未纯化的或半-纯化的细胞提取物或少于70%纯度的多肽的混合物。

[0039] 野生型MU1140示于图1A中。MU1140具有标记为A、B、C和D的4个环。这些环中的两个

由羊毛硫氨酸 (Ala-S-Ala) 残基形成,包括环A中的一个残基 (Ala₃-S-Ala₇) 和环C中的一个残基 (Ala₁₆-S-Ala₂₁);存在甲基-羊毛硫氨酸残基 (Abu-S-Ala),其形成包含在8位的 α -氨基丁酸残基和在11位的Ala (Abu₈-S-Ala₁₁) 的环B;以及第四个环D,其包含通过硫醚键 (Ala₁₉-S-CH=CH-NH-) 连接于氨基乙烯基的19位的Ala。

[0040] 本发明的一个实施方案提供羊毛硫抗生素变异菌素MU1140的一个或多个以下变体,示于图1B (SEQ ID NO:2) 中。即,本发明包括具有一个或多个以下突变的野生型羊毛硫抗生素MU1140 (SEQ ID NO:1) 的变体:

[0041] 1. Phe1Ile或Phe1Gly;即,将1位的苯丙氨酸改变为异亮氨酸或甘氨酸。

[0042] 2. Trp4Ala;即,将4位的色氨酸改变为丙氨酸。

[0043] 3. Dha5Ala;即,将5位的2,3-二脱氢丙氨酸改变为丙氨酸;

[0044] 4. Arg13Asp;即,将13位的精氨酸改变为天冬氨酸。

[0045] 在本发明的一个实施方案中,羊毛硫抗生素MU1140的变体包含Phe1Ile或Phe1Gly氨基酸取代;Trp4Ala氨基酸取代;Dha5Ala氨基酸取代;Arg13Asp氨基酸取代;或其组合。本发明的MU1140变体也可包含,例如Trp4insAla,其中丙氨酸在第四个色氨酸残基之后插入;或其中4位的色氨酸缺失的 Δ Trp4;或在一级氨基酸序列中的这两种改变。

[0046] MU1140羊毛硫抗生素多肽的生物学活性等价物可具有一个或多个保守的氨基酸变体或其它次要的修饰并保留生物学活性。生物学活性等价物当与相应的羊毛硫抗生素MU1140比较时,具有基本上等同的功能。在本发明的一个实施方案中,羊毛硫抗生素变异菌素具有约1、2、3、4或5或更少的保守氨基酸取代。保守取代是其中氨基酸被另一种具有类似特性的氨基酸取代的取代,使得肽化学领域的技术人员将期望多肽的二级结构和一般特性基本上没有改变。一般来说,以下各组氨基酸代表保守的变化:(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、dha、abu、dha、ser、thr;(2) cys、ser、tyr、thr;(3) val、ile、leu、met、ala、gly、dha、abu、dha、phe;(4) lys、arg、his;和(5) phe、tyr、trp、his。生物学活性等价物羊毛硫抗生素变异菌素或其它羊毛硫抗生素多肽一般可通过如下鉴定:修饰本发明的变体羊毛硫抗生素变异菌素序列之一,并评价修饰的羊毛硫抗生素变异菌素的特性,以确定其是否是生物学等价物。如果羊毛硫抗生素在测定(例如抑菌圈测定)中的反应基本上与本发明的羊毛硫抗生素变异菌素相同,例如,具有原始羊毛硫抗生素变异菌素的90-110%的活性,它就是生物学等价物。

[0047] 本发明的重组变形链球菌菌株包含表达功能性变体MU1140的多核苷酸。变体MU1140的生物学活性可使用例如抑菌圈测定(参见实施例2)测定。重组变形链球菌菌株产生足够的变体MU1140,以比野生型致龋变形链球菌更具竞争优势和基本上从宿主口腔消除野生型致龋变形链球菌(例如,减少野生变形链球菌的数量约5、10、25、50、75、90、95、99或100%(或在约5%和约100%之间的任何范围))。

[0048] 本发明的羊毛硫抗生素可以共价地或非共价地连接于通常羊毛硫抗生素天然不与之关联的氨基酸序列,即异源性氨基酸序列。异源性氨基酸序列可来自非变形链球菌生物体,合成序列,或通常不位于本发明的羊毛硫抗生素的羧基或氨基末端的变形链球菌序列。此外,本发明的羊毛硫抗生素可以共价地或非共价地连接于非氨基酸的化合物或分子例如指示试剂。本发明的羊毛硫抗生素可以共价地或非共价地连接于氨基酸间隔基、氨基酸连接基、信号序列、终止转移序列、TMR终止转移序列、跨膜域、蛋白纯化配体或其组合。多

肽也可连接于促进纯化(例如,亲和力标签例如6-组氨酸标签、trpE、谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白、葡萄球菌蛋白A或com)的部分(即,可以是多肽或其它化合物的官能团),或促进多肽稳定性的部分(例如,聚乙二醇;氨基末端保护基团例如乙酰基、丙酰基、琥珀酰基、苄基、苄氧基羰基或叔丁氧基羰基;羧基末端保护基团例如酰胺、甲酰胺和乙酰胺)。在本发明的一个实施方案中,蛋白纯化配体可以是一个或多个在例如本发明多肽的氨基末端或羧基末端的氨基酸残基。氨基酸间隔基是天然不与本发明的多肽关联的氨基酸序列。氨基酸间隔基可包含约1、5、10、20、100或1,000个氨基酸。

[0049] 如果需要,本发明的羊毛硫抗生素可以是融合蛋白的一部分,其可含有异源性氨基酸序列。异源性氨基酸序列可存在于本发明的羊毛硫抗生素的C或N末端以形成融合蛋白。多于一个的本发明的羊毛硫抗生素可存在于融合蛋白中。本发明的羊毛硫抗生素的片段可存在与本发明的融合蛋白中。本发明的融合蛋白可包含一个或多个本发明的羊毛硫抗生素、其片段或其组合。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重组变形链球菌菌株是ATCC 55676(根据国际承认用于专利程序目的的微生物保藏的布达佩斯条约条款及其规章(布达佩斯条约)而保藏),其已如本文所述经基因工程改造以表达变体MU1140。

[0051] 因此,与野生型MU1140羊毛硫抗生素比较而具有提高的生物学活性的突变体MU1140羊毛硫抗生素的产生可给变形链球菌提供相对于存在于宿主口腔中的不产生MU1140的变形链球菌菌株的选择性优势。变体MU1140,当通过本发明的重组变形链球菌菌株表达时,消除定居的、MU1140-易感变形链球菌菌株,因此干扰MU1140-易感菌株的定居并促进重组变形链球菌定居于口腔。由于野生型天然变形链球菌从口腔中被置换,因而龋齿的发生率和/或严重性降低。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,效应菌株可另外地表达lanB、lanC、lanE、lanF、lanG、lanK、lanM、lanP、lanR、lanT或这些变形链球菌多肽的两个或更多的组合。

[0053] 乳酸表达缺乏

[0054] “乳酸缺乏”或“乳酸产生缺乏”意指相对于野生型变形链球菌,重组变形链球菌菌株产生显著降低量的乳酸。乳酸的显著降低量为比野生型变形链球菌菌株(例如变形链球菌菌株UA159(ATCC 700610))或其它属于变形链球菌群的种类产生的乳酸少约40、50、60、70、80、90、95或100%(或约40%-约100%之间的任何范围),所述变形链球菌群包括表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)(例如表兄链球菌菌株SL1(ATCC 33478))、鼠链球菌(*Streptococcus rattus*)(例如,鼠链球菌菌株FA1(ATCC 19645))、大鼠链球菌(*Streptococcus cricetus*)(大鼠链球菌菌株HS6(ATCC 19642))和野生链球菌(*Streptococcus ferus*)(野生链球菌菌株8S1))。在本发明的一个实施方案中,乳酸-缺乏的变形链球菌效应菌株产生不可检测的乳酸。乳酸表达可如在例如Hillman等人, *Infect. Immun.* 62:60(1994);Hillman等人, *Infect. Immun.* 64:4319(1996);Hillman等人, 1990, *Infect. Immun.*, 58:1290-1295中所述进行检测。

[0055] 作为在乳酸合成途径中的非功能性的、失活的、部分功能性的,或部分失活的调控区、翻译信号、转录信号或结构序列的结果,本发明的重组变形链球菌菌株可以是乳酸缺乏的。调控区、翻译信号和转录信号包括,例如启动子、增强子、核糖体结合位点、CAAT框、CCAAT框、普里布诺框(Pribnow box)、TATA框等。非功能性的或失活的意指已知的多核苷

酸、基因、多肽或蛋白的野生型功能或活性已经消除或与野生型多核苷酸、基因、多肽或蛋白比较大减少,减少约80、90、95或100% (或约80%-约100%之间的任何范围)。部分功能性的或部分失活的意指已知的多核苷酸、基因、多肽或蛋白的野生型功能或活性与野生型多核苷酸、基因、多肽或蛋白比较已经部分地减少约20、30、40、50、60、70、79% (或约20%-约79%之间的任何范围)。

[0056] 失活或部分失活(其使得多核苷酸、基因、多肽或蛋白为非功能性的或部分功能性的)可通过方法例如在涉及乳酸合成途径的多核苷酸中掺入突变(例如,点突变、移码突变、取代、缺失(部分或完整信号、区域或结构多核苷酸)、中断和/或插入)来实现。涉及乳酸合成的多核苷酸的突变可影响乳酸的表达,以使乳酸表达的量在与野生型变形链球菌菌株比较时减少约20、30、40、50、60、70、80、90、95%或更大。

[0057] 例如,乳酸表达的失活或部分失活可通过缺失部分或完整*ldh*结构多核苷酸或部分或完整*ldh*启动子使例如乳酸脱氢酶(*ldh*)基因失活或部分失活来实现。此外,乳酸表达的失活或部分失活可通过失活或部分失活编码涉及糖转运的酶的基因,例如磷酸烯醇丙酮酸磷酸转移酶系统(*pts*)基因,通过缺失部分或完整*pts*结构多核苷酸或部分或完整*pts*启动子来实现。参见例如,Cvitkovitch等人, J. Bacteriol. 177:5704 (1995)。乳酸表达的失活或部分失活可通过失活或部分失活编码涉及细胞内和细胞外多糖储存的酶的基因,例如糖原合成酶(*glgA*)基因(参见例如,Spatafora等人, Infect. Immun. 63:2556 (1995))和果糖基转移酶(*ftf*)基因(参见例如,Schroeder等人, Infect. Immun. 57:3560 (1989)),通过缺失部分或完整*glgA*或*ftf*结构多核苷酸或部分或完整*glgA*或*ftf*启动子来实现。

[0058] 乳酸合成途径中的一个或多个缺陷可通过诱变(即,使变形链球菌暴露于诱变剂)、自发突变体的选择,或使用重组技术的基因操纵引入。这些技术是本领域熟知的(参见,如,Sambrook等人, 1989, 分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。在本发明的一个实施方案中,乳酸合成途径缺陷使用重组技术引入,例如,将缺陷的*ldh*结构基因引入细菌和随后进行位点-特异性重组,以用缺陷的*ldh*替代野生型*ldh*。已克隆变形链球菌*ldh*基因并测定其核苷酸序列(GenBank检索号M72545),并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达重组*ldh*基因(Hillman等人, 1990, Infect. Immun., 58: 1290-1295; Duncan等人, 1991, Infect. Immun., 59:3930-3934)。Hillman等人使变形链球菌菌株的*ldh*的完整开放阅读框基本缺失(J. Appl. Microbiol. 102:1209 (2007))。

[0059] 醇脱氢酶产生

[0060] 由于乳酸合成的缺陷对于变形链球菌是致死的,重组的、乳酸-缺乏的变形链球菌菌株的缺陷必须通过重组醇脱氢酶(ADH)的产生来补充。参见例如,Hillman等人, Infect. Immun. 64:4319 (1996)。重组ADH的产生防止代谢物例如丙酮酸的积累,否则丙酮酸引起乳酸-缺乏的变形链球菌死亡。

[0061] 可对变形链球菌菌株进行基因工程改造以表达重组醇脱氢酶例如,醇脱氢酶B、醇脱氢酶II,或来自运动发酵单胞菌的含铁醇脱氢酶(参见例如,GenBank检索号M15394; Conway等人, 1987, J. Bacteriol., 169:2591-2597),来自鼠链球菌的醇脱氢酶,来自小肠共生菌(*Commensalibacter intestine*)的含铁醇脱氢酶,来自棕色固氮菌(*Azotobacter*

vinelandii)的含铁醇脱氢酶,来自肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)细菌的含铁醇脱氢酶、来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的醇脱氢酶,来自水稻基腐细菌(*Dickeya zeae*)的含铁醇脱氢酶,来自奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)的醇脱氢酶,来自铁还原红育菌(*Rhodoferrax ferrireducens*)的含铁醇脱氢酶,来自深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)的含铁醇脱氢酶,来自油菜假单胞菌(*Pseudomonas brassicacearum*)的醇脱氢酶,来自丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的醇脱氢酶II,来自*Dickeya dadantii*的醇脱氢酶,来自鼠柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodenitium*)的醇脱氢酶,来自腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)的含铁醇脱氢酶,来自黑美人弧菌(*Vibrio nigripulchritudo*)的醇脱氢酶,来自产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的醇脱氢酶,来自萨氏假单胞菌(*Pseudomonas savastanoi*)的醇脱氢酶,来自肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)的醇脱氢酶,来自鳃发光杆菌(*Photobacterium leiognathi*)的含铁醇脱氢酶,来自美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的醇脱氢酶,来自嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*)的醇脱氢酶,来自伯氏致病杆菌(*Xenorhabdus bovienii*)的醇脱氢酶,来自虫媒假单胞菌(*Pseudomonas entomophila*)的醇脱氢酶II,来自藤黄希瓦氏菌(*Shewanella vilacea*)的醇脱氢酶II,来自锡那罗州弧菌(*Vibrio sinaloensis*)的醇脱氢酶,来自*Shewanella pealeana*的醇脱氢酶,来自短尾蛛弧菌(*Vibrio angustum*)的醇脱氢酶,来自迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的醇脱氢酶,来自邦戈尔沙门氏菌(*Salmonella bongori*)的醇脱氢酶,来自阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)的含铁醇脱氢酶,来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的醇脱氢酶,来自副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的醇脱氢酶4,来自灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)的醇脱氢酶。在本发明的一个实施方案中,编码细菌醇脱氢酶或含铁醇脱氢酶的多核苷酸具有与运动发酵单胞菌醇脱氢酶B至少约60、65、75、80、90、95、98、99或100% (或约65%-100%之间的任何范围)的同源性。

[0062] 此外,ADH-编码多核苷酸可来源于变形链球菌,使得ADH-编码多核苷酸与天然变形链球菌 adh 基因的组合引入提供变形链球菌基因组中的ADH-编码多核苷酸的多个拷贝。或者,重组ADH多核苷酸可通过将突变引入变形链球菌 adh 基因的调节机制中,以上调ADH(例如,启动子中的突变以提供增加的 adh 基因转录)的产生而生成。

[0063] adh 多核苷酸可使用熟知的重组技术引入本发明的变形链球菌菌株中,例如,用编码ADH多肽的多核苷酸转化变形链球菌菌株。转化或转化作用意指变形链球菌具有整合到其基因组中的非天然核酸序列或作为通过多次传代而维持的质粒。 adh 多核苷酸表达功能性ADH多肽,以使本发明的变形链球菌菌株尽管乳酸表达失活,但仍为可存活的。

[0064] 用于多核苷酸(例如编码ADH的多核苷酸)的鉴定、克隆、稳定转化和表达的方法是本领域常规的和熟知的。参见,例如Sambrook等人,1989,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。例如,编码ADH的多核苷酸的分离可通过分子自基因组DNA或自先前存在的基因克隆的PCR扩增来进行。重组ADH的表达可通过将 adh 结构多核苷酸与促进在变形链球菌中的表达的启动子(例如, $spaP$ 或天然 ldh 启动子)有效连接来实现。

[0065] 功能性ADH的产生可通过例如使用本领域熟知的常规ADH活性测定(例如,对乙醇

的NAD-依赖性氧化的测定)来测定(Neal等人, 1986, Eur. J. Biochem., 154:119-124)。Hillman等人构建了表达功能性重组ADH的变形链球菌菌株。参见例如,Hillman等人, Infect. Immun. 68:543 (2000)。

[0066] 营养缺陷型

[0067] 本发明的重组变形链球菌菌株可任选地经基因工程改造为对通常不存在于口腔或宿主饮食中的有机物质而言是营养缺陷型的,使得可控制重组变形链球菌菌株的口腔定居。即,重组变形链球菌菌株可任选地经基因工程改造,以使它们不能合成生长所需的特定有机化合物。例如,本发明的菌株对于D-氨基酸,例如D-丙氨酸而言可以是营养缺陷型。营养缺陷型菌株的定居则可通过调节口腔中的有机物质的量来控制。例如,通过周期性地向口腔提供有机化合物可促进定居并通过阻止给予口腔该有机物质而终止定居。

[0068] 例如,哺乳动物口腔或饮食中通常不产生D-丙氨酸或不以超过痕量存在。因此,如果本发明的重组变形链球菌对于D-丙氨酸是营养缺陷型的,则需要周期性地将D-丙氨酸递送至哺乳动物的口腔,以维持本发明的重组变形链球菌在口腔中定居。在没有D-丙氨酸递送至至口腔时,本发明的重组变形链球菌菌株将最终消失。

[0069] 在本发明的一个实施方案中,重组变形链球菌是丙氨酸消旋酶缺乏的。丙氨酸消旋酶对于D-丙氨酸代谢是必需的。“丙氨酸消旋酶缺乏”或“丙氨酸消旋酶产生的缺乏”意指相对于野生型变形链球菌,重组变形链球菌菌株产生显著降低量的丙氨酸消旋酶。显著降低量的丙氨酸消旋酶是比由野生型变形链球菌菌株产生的丙氨酸消旋酶少约40、50、60、70、80、90、95或100% (或约40%-约100%之间的任何范围)。在本发明的一个实施方案中,丙氨酸消旋酶缺乏的重组变形链球菌菌株产生不可检测的丙氨酸消旋酶。丙氨酸消旋酶可如在例如,Wantanabe等人, J. Biochem. 126:781 (1999)中所述测定。

[0070] 失活或部分失活(其使多核苷酸、基因、多肽或蛋白为非功能性的或部分功能性的)可通过方法例如在涉及丙氨酸消旋酶合成的基因中掺入突变(例如,点突变、移码突变、取代、缺失(部分或完整信号、区域或结构多核苷酸)、间断和/或插入而实现。涉及丙氨酸消旋酶合成的多核苷酸的突变可影响丙氨酸消旋酶的表达,以使丙氨酸消旋酶的表达量在与野生型变形链球菌比较时减少约20、30、40、50、60、70、80、90、95%或更多。

[0071] 例如,丙氨酸消旋酶表达的失活或部分失活可例如通过缺失部分或所有的*dal*结构多核苷酸或部分或完整的*dal*启动子使*dal*基因失活或部分失活来实现。

[0072] 细菌营养缺陷型可使用多种本领域熟知的技术,例如化学诱变、自发突变体的选择,和/或重组体技术(例如转座子诱变、通过用缺陷的或非功能性的基因重组替代)生成。例如,D-丙氨酸营养缺陷型的变形链球菌菌株可通过将缺陷引入编码丙氨酸消旋酶(*dal*) (该酶将L-丙氨酸转化为D-丙氨酸)的基因而生成。已生成这样的菌株。参见,例如Hillman等人, J. Appl. Microbiol. 102:1209-1219 (2007)。

[0073] ComE缺乏

[0074] 任选地,本发明的重组变形链球菌菌株可包含失活的或非功能性*comE*基因。具有失活的或非功能性*comE*基因的菌株将不太易于转化,因为ComE在环境DNA的摄取中是重要的。此外,*comE*不能被补充。

[0075] “ComE缺乏”或“ComE产生的缺乏”意指相对于野生型变形链球菌,重组变形链球菌菌株产生显著降低量的ComE蛋白。ComE的显著降低量是比由野生型变形链球菌菌株产生的

ComE蛋白少约40、50、60、70、80、90、95或100%（或约40%-约100%之间的任何范围）。在本发明的一个实施方案中，缺乏ComE的重组变形链球菌菌株产生不可检测的ComE蛋白。ComE表达可如例如在Chen & Gotschlich, J. Bact. 183:3160 (2001)中所述测定。

[0076] 作为ComE合成中非功能性的、失活的、部分功能性的或部分失活的调控区、翻译信号、转录信号或结构序列的结果，本发明的重组变形链球菌菌株可以是ComE缺乏的。

[0077] 失活或部分失活（其使得多核苷酸、基因、多肽或蛋白为非功能性的或部分功能性的）包括方法例如在涉及ComE合成的多核苷酸中掺入突变（例如，点突变、移码突变、取代、缺失（部分或完整信号、区域或结构多核苷酸）、间断和/或插入）。涉及ComE合成的多核苷酸的突变可影响ComE的表达，以使ComE的表达量在与野生型变形链球菌菌株比较时减少约20、30、40、50、60、70、80、90、95%或更多。

[0078] 例如，ComE表达的失活或部分失活可例如通过缺失部分或完整*comE*结构基因或部分或完整*comE*启动子，使*comE*基因失活或部分失活而实现。或者，涉及DNA摄取的其它基因例如*comA*、*comB*、*comC*和*comD*也可以是失活的或部分失活的。

[0079] ComE合成的缺陷可通过诱变（即，使细菌暴露于诱变剂）、自发突变体的选择、或使用重组体技术的基因操纵来引入。已构建具有突变的*comE*基因的变形链球菌菌株。参见，例如Hillman等人，J. Appl. Microbiol. 102:1209-1219 (2007)。

[0080] 多核苷酸

[0081] 本发明的多核苷酸含有少于整个的微生物基因组并且可以是单链或双链核酸。多核苷酸可以是RNA、DNA、cDNA、基因组DNA、化学合成的RNA或DNA，或其组合。多核苷酸可以是纯化的，没有其它成分，例如蛋白、脂质和其它多核苷酸。例如，多核苷酸可以是50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯化的。在例如cDNA或基因组文库，或含有基因组DNA限制酶消化片段的凝胶切片中的数百至数百万其它核酸分子中存在的核酸分子不认为是分离的多核苷酸。

[0082] 本发明的多核苷酸编码上述的本发明多肽（例如，MU1140多肽、ADH多肽、ComE多肽、D-氨基酸合成多肽和乳酸合成多肽）。在本发明的一个实施方案中，多核苷酸编码示于SEQ ID NOs:20-27中的变体变异菌素1140多肽、其组合或其片段。在本发明的一个实施方案中，效应菌株可另外表达*lanB*、*lanC*、*lanE*、*lanF*、*lanG*、*lanK*、*lanM*、*lanP*、*lanR*、*lanT*或这些变形链球菌多核苷酸的两个或更多个的组合。

[0083] 本发明的多核苷酸可由少于约600、500、400、300、200、100、66、60、50、45、30、15个（或约600-15之间的任何范围）相邻多核苷酸组成。纯化的多核苷酸可包含另外的异源性核苷酸和/或另外的同源性多核苷酸。本发明的多核苷酸可包含其它核苷酸序列，例如编码以下的序列：连接基、信号序列、TMR终止转移序列、跨膜域，或用于蛋白纯化的配体例如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签和葡萄球菌蛋白A。本发明的一个实施方案提供包含编码SEQ ID NOs:20-27的至少约6、10、15、20、25、30、40、45、50、60、66或更多个相邻核苷酸的纯化多核苷酸。

[0084] 可分离本发明的多核苷酸。分离的多核苷酸是天然存在的多核苷酸，其与天然关联的5' 和3' 侧翼基因组序列之一或二者并不是紧邻的。分离的多核苷酸可以是，例如任何长度的重组DNA分子。分离的多核苷酸也包括非天然存在的核酸分子。本发明的多核苷酸可编码全长多肽、多肽片段和变体或融合多肽。

[0085] 本发明的编码多肽的简并核苷酸序列以及与本发明的多核苷酸序列至少约80,或约90、95、96、97、98或99%相同的同源性核苷酸序列及其互补序列也是本发明的多核苷酸。简并核苷酸序列是编码本发明的多肽或其片段的多核苷酸,但由于遗传密码的简并性,核酸序列不同于给定的多核苷酸序列。

[0086] 序列同一性百分比具有本领域公认的含义并且有许多测量两个多肽或多核苷酸序列之间的同一性的方法。参见,例如Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., 序列数据的计算机分析 (*Computer Analysis Of Sequence Data*), 部分 I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, 分子生物学的序列分析 (*Sequence Analysis In Molecular Biology*), Academic Press, (1987); 和 Gribskov & Devereux, Eds., 序列分析引物 (*Sequence Analysis Primer*), M Stockton Press, New York, (1991)。用于对比多核苷酸或多肽的方法已被编程为计算机程序,包括GCG程序包 (Devereux等人 (1984) *Nuc. Acids Res.* 12:387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul等人 (1990) *J. Molec. Biol.* 215:403), 和 Bestfit 程序 (Wisconsin 序列分析包, 用于 Unix 的版本 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711), 其使用 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 ((1981) *Adv. App. Math.*, 2:482-489)。例如,可使用采用 FASTA 算法的计算机程序 ALIGN, 对于仿射空位搜索 (affine gap search) 使用为 -12 的空位开放罚分 (gap open penalty) 和为 -2 的空位延伸罚分 (gap extension penalty)。

[0087] 当使用任何序列对比程序以确定特定序列,例如,是否与参照序列具有约95%同一性时,设定参数以便在参照多核苷酸的全长内计算同一性百分比并允许参照多核苷酸的核苷酸总数的至多5%的同一性空位。

[0088] 本发明的多核苷酸可从存在于例如细菌样品中的核酸序列中分离。多核苷酸也可在实验室中,例如,使用自动合成仪合成。扩增方法例如PCR可用于从基因组DNA或者编码多肽的cDNA扩增多核苷酸。

[0089] 本发明的多核苷酸可包含天然存在的多肽的编码序列或可编码非天然存在的改变的序列。如果需要,可将多核苷酸克隆到包含表达控制元件(包括例如,复制起点、启动子、增强子或在宿主细胞中驱动本发明的多核苷酸表达的其它调控元件)的表达载体中。表达载体可以是例如质粒。也可使用微染色体 (Minichromosomes) 例如 MC 和 MC1、噬菌体、噬菌粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体、病毒颗粒、病毒-样颗粒、粘粒 (已插入噬菌粒 λ cos 位点的质粒) 和复制子 (能够在其自身控制下在细胞中复制的遗传元件)。

[0090] 制备有效连接于表达控制序列的多核苷酸和在宿主细胞中表达它们的方法为本领域熟知的。参见,例如美国专利号 4,366,246。当本发明的多核苷酸位于邻接或接近于一个或多个指导多核苷酸的转录和/或翻译的表达控制元件时,所述多核苷酸是有效连接的。

[0091] 包含本发明的重组变形链球菌的组合物

[0092] 本发明的重组变形链球菌菌株的特征可在于:1) 乳酸缺乏,和2) 重组ADH的产生,3) 变体MU1140产生,4) 任选地,对于特定有机物质(例如,D-氨基酸例如D-丙氨酸)为缺陷营养型,5) 任选地,ComE表达的缺乏,或其组合。

[0093] 本发明的组合物可包含一或多株如本文所述的重组变形链球菌菌株和药学上可接受的或营养学上可接受的载体。载体是与其给予的受试者的区域在生理学上相容的。载体可包含用于配制成片剂、胶囊、锭剂,或粉末形式的固体-基的干燥材料。载体也可包含用于配制成液体、凝胶和口香糖形式的液体或凝胶基材料。载体的组成可以是变化的,只要它不显著干扰本发明的细菌菌株的治疗活性。

[0094] 可将组合物配制为适合以各种方式经口给予,例如以固体、半-固体、液体(包括,例如粘性液体、糊剂、凝胶或溶液剂)、干燥团块(mass)、洁齿剂、漱口剂、口腔清洗剂、液体混悬剂、饮料、局部施用剂、粉末状食品补充剂、糊剂、凝胶、固体食品、口腔清洗剂、包装食品、薄片(wafer)、锭剂、口香糖等。其它制剂对本领域技术人员而言将是显然的。本发明的组合物可包含营养补充成分并可包含如所熟知的多种营养剂的任何一种,包括维生素、矿物质、必需和非必需氨基酸、碳水化合物、脂质、食品、膳食补充剂等。

[0095] 本发明的组合物也可包括天然或合成的调味剂和食品级着色剂,所有这些均与维持本发明细菌菌株的生存力相容

[0096] 本发明的组合物可包含一或多种胶凝剂,其可用作粘合剂,以使组合物粘附至牙齿或口腔。胶凝剂的浓度可大于约2、4、6、8、10、15、20、30、40、50、60、70、80或少于约80、70、60、50、40、30或20%重量的组合物。

[0097] 用于本发明的合适胶凝剂和粘合剂包括,例如,硅酮、聚环氧乙烷、聚乙烯醇、聚烷基乙烯基醚-马来酸共聚物(PVM/MA共聚物)例如Gantrez AN 119、AN 139和S-97、聚乙烯醇、聚丙烯酸、泊洛沙姆407 (Pluronic)、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸酯共聚物(PVP/VA共聚物),例如Luviskol VA和Plasdone S PVP/VA、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP,例如K-15至K-120)、聚季胺(Polyquaterium)-11 (Gafquat 755N)、聚季胺-39 (Merquat plus 3330)、卡波姆或聚羧乙烯(Carbopol)、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、玉米淀粉、羧甲基纤维素、明胶和藻酸盐例如藻酸钠、天然树胶例如刺梧桐胶、黄原胶、瓜尔胶、阿拉伯胶、黄蓍胶及其混合物。

[0098] 湿润剂或增塑剂可存在于本发明的组合物中。湿润剂或增塑剂包括,例如,甘油、丙三醇、山梨醇、聚乙二醇、聚丙二醇和其它可食用多元醇。湿润剂或增塑剂可以组合物的约1%-约99%、约10%-约95%或以约50%-约80%之间(或1%-99%之间的任何范围)重量存在。

[0099] 本发明的细菌可在例如发酵罐中制备。可从发酵罐中收获细菌并可例如浓缩。本发明的细菌可通过例如脱水、空气干燥、冷冻干燥、冷冻和喷雾干燥制备以便使用。细菌也可通过微囊化(参见例如,美国专利号6,251,478)或通过使用保护性物质例如脂质材料例如三酰基甘油、蜡、有机酯、豆油、棉籽油、棕榈仁油和长链脂肪酸与醇的酯包被来制备以便使用。在本发明的一个实施方案中,本发明的包被或包封的细菌在宿主口腔中释放。

[0100] 牙洞的治疗和预防方法

[0101] 本发明的重组变形链球菌可以治疗有效量存在于本发明的组合物中。治疗有效的意指有效预防或减少牙洞的数目或发生率(例如,比未接受组合物的对照少5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%的牙洞)和/或降低严重性(例如,比未接受组合物的对照少5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%的严重牙洞)。

[0102] 治疗有效量或剂量是足以预防龋齿和/或减少龋齿数目和/或龋齿严重性的高水平,但低至足以避免严重副作用(以合理的利益/风险比),在合理的医学/牙科判断范围内

的本发明组合物的量或剂量。本发明组合物的治疗有效量或剂量可随着待治疗的特定病症,待治疗患者的年龄和身体条件,病症的严重性,治疗持续时间,联合治疗的性质,所用来源的具体形式和组合物所用的具体溶媒而变化。

[0103] 本发明的组合物可以治疗有效量施用于宿主的口腔,用于治疗 and/或预防牙洞。本发明的组合物可被吞咽或可在整个口腔中清洗,然后吐出,以使其基本上不递送至胃肠道。即,少于约10、5、4、3、2或1、0.5或0.1% (或约10-0.1%之间的任何范围或值) 的递送细菌被递送至胃肠道。治疗意指引起牙洞的数量或强度(或其组合)的减少。

[0104] 预防意指在宿主永久地(只要本发明的细菌以足够数目保留在受试者的口腔中)或暂时地(例如,约1、2、3、4、5、6或更多个月)暴露于一个或多个本发明的重组变形链球菌菌株后,基本上没有龋齿发生。本发明的细菌菌株可构成口腔的至少部分暂时或本土菌群并呈现有益的预防和/或治疗效果。

[0105] 治疗意指减少野生型变形链球菌在宿主口腔的量,以使小龋损害的再矿化可以发生并终止或减缓对大龋损害的进一步损害。口腔中的野生型变形链球菌的量可减少约20、30、40、50、60、70、80、90或100% (或约10-100%之间的任何范围)。

[0106] 在本发明的一个实施方案中,预防意指在受试者群体中的预防。即在给定的受试者群体中,与未接受治疗的对照群体比较,治疗可预防约5、10、20、30、40、50、60、70、80、90%或更多受试者的龋齿。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,组合物可包含一个或多个本发明的分离的重组菌株以及一个或多个分离的口腔链球菌(*Streptococcus oralis*) 菌株和/或一个或多个分离的乳房链球菌(*Streptococcus uberis*) 菌株。

[0108] 口腔链球菌(以前称为血链球菌(*Streptococcus sanguis*) II型)和乳房链球菌在维持构成牙周菌群的微生物的正常、健康平衡方面是重要组分。参见, Socransky等人, *Oral Microbiol. Immunol.* 3:1-7 (1988); Hillman和Shivers, *Arch. Oral. Biol.*, 33:395-401 (1988); Hillman等人, *Arch. Oral. Biol.*, 30:791-795 (1985)。口腔链球菌产生过氧化氢,其可抑制牙周病原体例如伴放线菌放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (Aa)、福赛斯拟杆菌(*Bacteroides forsythus*)和中间普氏菌(*P. intermedia*)。因此,口腔链球菌和乳房链球菌可用于维持口腔健康。本发明的组合物可包含一个或多个分离的口腔链球菌菌株,例如ATCC 35037、ATCC 55229、ATCC 700233、ATCC 700234和ATCC 9811。其它口腔链球菌菌株包括KJ3和KJ3sm。KJ3sm是天然存在的抵抗链霉素的KJ3遗传变体。链霉素抗性是有利的,因为其提供容易分离细菌的标记物。此外,链霉素抗性株是稍微减毒且不如野生株在口腔中存活那么长。当目标是用细菌非持久地定居于动物的口腔时,这种特性是有用的。

[0109] 已发现牙菌斑中的乳房链球菌与牙周健康有关,特别是通过干扰牙周病原体例如牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、直肠弯曲菌(*Campylobacter recta*)和嗜蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)的定居。本发明的组合物可包含一个或多个分离的乳房链球菌菌株,例如ATCC 13386、ATCC 13387、ATCC 19435、ATCC 27958、ATCC 35648、ATCC 700407、ATCC 9927、KJ2株或KJ2sm株。KJ2sm是KJ2天然存在的遗传变体。其是链霉素抵抗的并提供与口腔链球菌的链霉素-抗性株相同的优点。一个或多个分离的口腔链球菌菌株或一个或多个分离的乳房链球菌菌株,或者二者可用于本发明的组合物和方法。本发明的这

些组合物的另外口腔护理益处包括,例如,治疗和/或预防受试者的牙周炎、口腔细菌感染和疾病、口腔创伤、假丝酵母(*Candida*)或真菌过度生长、口臭或口腔干燥-引起的龋齿和相关的牙周疾病,促进伤口愈合、牙齿美白或其组合。

[0110] 本发明的一个实施方案提供用于治疗龋齿的方法,其包括向有需要的受试者的口腔给予包含一个或多个本发明的重组变形链球菌菌株的组合物。即,受试者具有一个或多个龋齿。

[0111] 本发明的一个实施方案提供对正常、健康的受试者中龋齿的预防。本发明的另一个实施方案提供对患有增加的龋齿易感性的受试者(与对正常、健康的受试者比较)中龋齿的治疗和/或预防。在这两个实施方案中,该方法由以下组成:向受试者的口腔给予包含一个或多个重组变形链球菌菌株的组合物。

[0112] 当受试者比正常、健康的宿主更可能发生龋齿时,他们具有增加的对龋齿的易感性。这样的宿主可例如具有降低的唾液产生(例如,在头或颈部经历放射疗法的患者、患有干燥综合征(Sjögren's syndrome)、糖尿病、胃-食管反流疾病、尿崩症,或类肉瘤病的患者、服用抗组胺剂和抗抑郁剂或引起“口干”的其它药物的患者)、吸烟者、无烟烟草使用者(smokeless tobacco users)、具有遗传倾向的患者(Shuler, J. Dent. Ed. 65:1038 (2001)),或为婴儿(0-2岁龄或6月至2岁龄)、儿童(3岁至18岁龄)或老年人(大于65岁)。

[0113] 本发明也提供在受试者中减少可引起龋齿的细菌量的方法。该方法包括向具有可引起龋齿的细菌的一个或多个菌株或种类的受试者的口腔给予包含一个或多个本发明的重组变形链球菌菌株的组合物。可仅给予组合物一次或定期给予。减少了受试者中可引起龋齿的细菌的一个或多个菌株或种类的数目。所述减少可以是数目的约5、10、25、50、75、90、95、99或100% (或约5%-约100%之间的任何范围)的减少。

[0114] 任选地,在给予本发明的组合物之前,可使用本领域已知的任何检测/定量方法检测可引起龋齿的一或多种细菌和/或对其定量。本领域技术人员知道检测可引起龋齿的细菌的方法。任选地,在给予本发明的组合物之前,可使用本领域已知的任何方法,在受试者中诊断一个或多个龋齿。

[0115] 本发明的另一个实施方案提供预防受试者的龋齿的方法。该方法包括获得关于在特定类型的受试者中预防龋齿的治疗有效的剂量范围和确定用于特定类型的受试者的重组变形链球菌的有效剂量范围的数据。特定类型的受试者可以是例如,具有降低唾液产生的受试者(例如,在头或颈部经历放射疗法的患者、患有干燥综合征、糖尿病、胃-食管反流疾病、尿崩症,或类肉瘤病的患者、服用抗组胺剂和抗抑郁剂或引起“口干”的其它药物的患者)、吸烟者、无烟烟草使用者、具有遗传倾向的患者),或为婴儿(0-2岁龄或6月至2岁龄)、儿童(3岁至18岁龄)或老年人(大于65岁)。对于特定类型的受试者,将确定的治疗有效的剂量范围的一个或多个本发明的重组变形链球菌菌株给予特定类型的受试者的口腔。

[0116] 可将组合物给予宿主或受试者例如动物的口腔,所述动物包括哺乳动物,例如人、非人灵长类动物、狗、猫、马、牛、山羊或兔。

[0117] 本发明的组合物可以例如食品、水、洁齿剂、凝胶、糊剂、乳剂、气溶胶喷雾剂、口香糖、锭剂、片剂、胶囊或液体混悬剂经口给予。细菌可以已经被配制到食品、水、凝胶或其它载体中或者可以由用户在消费之前加入到载体(例如,食品、水、洁齿剂、凝胶、糊剂、乳剂、气溶胶喷雾剂或液体混悬剂)中的组合物(例如,粉末剂、片剂或胶囊)。

[0118] 本发明的一个实施方案提供用治疗有效的细菌非永久地定居受试者的口腔的方法,其包括给予受试者的口腔本发明的组合物。在本发明的一个实施方案中,给予的细菌菌株并非永久地定居于口腔,而是在给予细菌后,所述菌株在口腔中存在约1天、约1周、约2周、约3周、约1个月、约3个月或约12个月。

[0119] 在本发明的另一个实施方案中,变形链球菌的重组菌株永久地定居于宿主的口腔达一段长的时期,例如2周、1个月、3个月、6个月、1年、5年或更长或宿主终生。

[0120] 本发明的组合物可以约 1×10^3 、 1×10^5 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 或 1×10^{11} CFU (或约 1×10^3 -约 1×10^{11} 之间的任何范围或值)活菌的剂量给予。本发明组合物的剂量可以一天4次、一天3次、一天2次、一天1次、每隔一天1次、一周两次、每周1次、每两周1次、每月1次或每年1次给予。本发明的组合物的1个、2个或更多个剂量可每天给予,持续约1天、约1周、约2周、约1个月、约2个月、约3个月、约一年或更长。在本发明的一个实施方案中,本发明的组合物给予1次并在一段长的时期内有效。

[0121] 本发明的组合物可包含组合物重量的约0.01%-约50%之间的浓度,或约0.1%-约25%,或约1.0%-约10%或0.01%-50%之间的任何范围或值的细菌菌株。

[0122] 本发明的药盒可含有单一剂量、1周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月,或12个月供应量的本发明的组合物。可包装本发明的组合物,并且多个包装的组合物可继而在贮藏容器或外包装或纸板箱中提供。当一个或多个变形链球菌菌株为营养缺陷型时,药盒可包括细菌营养缺陷型-维持量的有机物质,例如包含D-氨基酸例如D-丙氨酸的组合物。

[0123] 当本发明的组合物包含对有机物质为营养缺陷型的一个或多个变形链球菌菌株时,可将细菌营养缺陷型-维持量的有机物质给予宿主,以维持口腔中的重组变形链球菌。“细菌营养缺陷型-维持量”是足以维持口腔中的重组变形链球菌营养缺陷型的生存力的有机物质的量。例如,当重组变形链球菌对D-丙氨酸为营养缺陷型时,D-丙氨酸细菌营养缺陷型-维持量是足以使D-丙氨酸营养缺陷型菌株在宿主口腔中存活的D-丙氨酸的量。一般来说,D-丙氨酸的D-丙氨酸细菌营养缺陷型-维持量的单一剂量含有约1、5、10、20、25、50、75或100 mg (或约1-约100 mg之间的任何范围)。在以溶液形式的组合物中,D-丙氨酸浓度为约0.01、1、10、25、50、75、100或167 mg/ml (后者是在25℃时D-丙氨酸在水中的饱和溶液)(或约0.01-约167 mg/ml之间的任何范围)。组合物中D-丙氨酸浓度可根据所用的载体和D-丙氨酸在该特定载体中的饱和点而变化。

[0124] 维持口腔中的营养缺陷型的、重组变形链球菌所需的有机物质,例如D-丙氨酸可被配制为漱口剂、口香糖、牙线、牙膏、咀嚼片、食品、饮料或任何其它适合于经口给予宿主口腔的制剂。除了有机物质(例如,D-丙氨酸),组合物还可任选含有调味剂、着色剂、香料或其它增加组合物的适口性和/或提高患者的依从性而不削弱组合物中包含的有机物质的有效性的化合物。

[0125] 本文中任何地方提及的所有专利、专利申请和其它科学或技术文本,均通过引用以其整体结合到本文中。在本文中说明性阐述的本发明,适当地可在本文中未具体公开的任何一个或多个要素、限制不存在的情况下实施。因此,例如,在本文的各实例中,术语“包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”的任何一个,可用另两个术语中的任一个替换,同时保留其通常含义。已采用的术语和表述是用作描述而非限制的术语,并且不意图在使用这类术语和表述时将所示和所述特征的任何等价物或其部分排除在外,但认识到的是,

在要求保护的本发明的范围内的多种修改是可能的。因此,应理解的是,尽管已通过实施方案具体公开本发明,但是本领域技术人员仍可采用本文所公开的构思的可选特征、修改和变动,并且认为所述修改和变动在通过说明书和随附权利要求所界定的本发明的范围之内。

[0126] 此外,当以马库什 (Markush) 群组或其它可选群组的方式阐述本发明的特征或方面时,本领域技术人员将认识到的是,本发明亦因此以马库什群组或其它群组的任何单个成员或成员亚群的形式来阐述。

[0127] 提供以下仅用于举例说明目的,而非意图限制在上文中以广义术语描述的本发明的范围。

实施例

[0128] 实施例1:MU1140的诱变

[0129] 将变形链球菌基因组数据库和*lan*基因簇 (GenBank/EMBL检索号 (AF051560)) 用于设计诱变和测序工作的引物。将天然MU1140结构基因 (*lanA*) 的开放阅读框 (ORF) 加上5' 和3' 侧翼DNA的500个碱基对 (bp) 克隆到pVA891质粒以构建p190。克隆到p190中的插入片段,通过使用引物序列SRWlanA_1和SRWlanA_2 (见图3) 对变形链球菌菌株JH1140 (ATCC 55676) 的染色体DNA进行PCR扩增来得到。试剂和培养基购自Fisher Scientific,而酶购自New England BioLabs (Ipswich, MA)。

[0130] 聚合酶链式反应 (PCR)

[0131] 将突变 (参见图1B) 引入*lanA* (MU1140的结构基因) 的前肽区,以构建MU1140的变体。参见图2。将p190质粒 (J.D. Hillman, 未公布) 用作模板并使用两步PCR引入定点突变。在第一步中,使上游和下游外引物 (SRWlanA_1和SRWlanA_2) 与适当的内引物配对 (例如SRWlanA_1/Trp4Ala_2和SRWlanA_2/Trp4Ala_1) (图3),所述内引物之一合成为相对于野生型序列含有改变的碱基序列。此步骤的结果为产生两个片段,一个片段包含5' 侧翼DNA和*lanA*的一部分,其包含定点碱基改变。第二个片段包含*lanA*的剩余部分加上3' 侧翼DNA。用于产生MU1140变体的引物见图3。然后等量混合所述两个片段,并使其经历采用两个外引物SRWlanA_1和SRWlanA_2的第二轮PCR,得到最终的扩增子。

[0132] 使用Taq聚合酶以50 μ L的终体积进行PCR反应,其包含0.4 μ mol各引物、50 ng模板DNA、0.016 mM dNTP以及含1个单位DNA聚合酶的1X聚合酶缓冲液。用于各片段的扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C预热1 min,接着27个循环的变性 (95 $^{\circ}$ C) 孵育30秒,退火 (56 $^{\circ}$ C) 30秒并延伸 (72 $^{\circ}$ C) 2 min,接着最终延伸 (72 $^{\circ}$ C) 10 min。将两个片段以50:50合并,并使用两个外引物SRWlanA_1和SRWlanA_2在如上所提及的相同扩增条件下进行扩增。

[0133] 按照试剂盒说明书将最终PCR产物连接到TOPO-TA载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA),使用标准方法转化到DH5 α -T1 $^{\circ}$ 细胞 (Invitrogen),并涂布至含50 μ g/mL氨苄西林和40 μ L X-gal (40mg/mL) 的LB平板上。采用蓝白筛选来鉴定含插入片段的菌落。根据制造商说明书使用PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI) 纯化来自各菌落的质粒DNA。使纯化的质粒经历使用*EcoRI*的限制酶消化,并通过琼脂糖凝胶电泳检测以鉴定具有适当大小 (约1100 bp) 的克隆插入片段的质粒。使用M13正向 (-20) 引物5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 28) 对含有适当大小插入片段的质粒测序,以确认核

苷酸碱基的适当插入、缺失或置换。

[0134] 重组

[0135] 对来自含有确认突变的菌落的纯化质粒进行限制酶消化。通过电泳将所述插入片段从TOP0质粒中分离,从凝胶中切下并使用Qiagen Gel Extraction试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)纯化。然后使用T4 DNA连接酶以3:1的插入片段:载体比率将纯化的插入片段于16℃过夜连接至变形链球菌自杀载体pVA891。然后使用标准方法将所得质粒转化至DH5 α 细胞并涂布至含300 μ g/mL红霉素的LB平板上。对培养之后出现的菌落进行分析,以验证如上所述的适当的插入片段大小及序列。

[0136] 如下将含有确认插入片段的纯化pVA891 DNA转化至变形链球菌菌株JH1140(ATCC 55676):使变形链球菌生长过夜并随后以1:15稀释到新鲜THyex肉汤(30 g/L THB、3 g/L酵母提取物)中,将200 μ L稀释的细胞加至96孔板并于37℃培养2小时。加入2微升感受态刺激肽(CSP,0.1 μ g/mL;参见例如Li等, J. Bacteriol. 183:897 (2001)),并使平板再培养6小时。参见Li等,(2002) J. Bacteriol. 184:2699。然后将50微升细胞涂布至含300 μ g/mL红霉素的预热THyex琼脂平板(30 g/L THB、3g/L酵母提取物和15g/L营养琼脂)并于37℃培养48小时。利用标准氯仿/酚提取法从出现的克隆中提取基因组DNA,并将所述DNA用作使用SRWlanA_1和SRWlanA_2的PCR的模板,以鉴定异双倍体克隆,推测所述异双倍体克隆含有通过载体DNA分离的lanA基因的一个野生型拷贝和一个突变拷贝,如先前由Hillman等,(2000) Infect. Immun. 68:543-549所述。

[0137] 确认突变构建体的遗传同一性

[0138] 如下通过自发拆分异双倍体状态来获得含有所需lanA突变的克隆:使数个确认的异双倍体在不含红霉素的20 mL THyex肉汤中生长过夜。将培养物传代培养(1:20稀释到新鲜培养基中)并再次生长过夜至饱和。然后将培养物稀释100,000倍,涂布至大型THyex琼脂平板上并于37℃培养48小时。将所得菌落复制接种至含和不含红霉素的培养基上以鉴定其中发生pVA891质粒(表达红霉素抗性基因)以及野生型或突变lanA基因缺失的自发重组。用含和不含红霉素的培养基重新检验由复制平板技术鉴定的红霉素敏感菌落。通过如上所述的PCR扩增红霉素敏感克隆的lanA区。对所产生扩增子测序以鉴定仅具有修饰的lanA基因的克隆。使用BLAST序列分析将lanA的野生型序列与lanA的疑似突变体序列进行比较(图2)。产生的突变体为Trp4Ala、Trp4insAla、 Δ Trp4、Dha5Ala、Ala57insAla和Arg13Asp。

[0139] 实施例2:突变体的生物活性

[0140] 使亲代变形链球菌菌株JH1140(ATCC 55676)及突变体生长至OD₆₀₀ 0.8并稀释成OD₆₀₀ 0.2。将培养物的样品(2 μ L)一式三份印迹到预热的THyex琼脂平板(150 X 15mm)上并允许风干。以此方式进行该测定,以帮助确认各样品具有相同的菌落大小以用于比较抑菌圈。将平板于37℃培养24小时,并随后置于55℃烘箱中达30分钟以杀死细菌,然后以熔化的顶层琼脂形式覆盖藤黄微球菌(*M. luteus*) ATCC 272指示菌株。热杀灭细菌防止任何进一步的抗微生物化合物产生。使藤黄微球菌ATCC 272生长至OD_{600nm}介于0.4-0.8之间并稀释成OD_{600nm} 0.2。然后将400 μ L这些细胞加至10 mL熔化的顶层琼脂(42℃)(30g/L Todd Hewitt肉汤和7.5g/L营养琼脂)。向含有约50 mL THyex琼脂的各平板中加入全部10 mL的含标准化悬浮液的顶层琼脂。使平板凝固,然后倒置并于37℃培养过夜。从菌落的一个边缘至抑菌圈的最远部分以mm测量各抑菌圈半径。对各抑菌圈计算抑菌圈的面积并与野生型(n

=10)的平均抑菌圈面积进行比较。

[0141] 图4阐述了产生MU1140变体的菌株与产生野生型MU1140的菌株比较的生物活性。结果概述于图5,其显示产生Trp4insAla和 Δ Trp4的菌株与野生型相比具有的抑菌圈无显著差异(斯氏t检验, $p>.05$)。产生Arg13Asp的菌株具有最大的抑菌圈面积,相对于野生型总计有2.57倍增加($p<.001$)。产生Trp4Ala和Dha5Ala的菌株,相对于野生型分别产生显著的($p<.001$) 2.12倍和1.87倍增加。产生Alas7insAla的菌株具有最小的抑菌圈面积,与野生型相比,其在抑菌圈面积上总计有显著的($p<.001$) 2倍减少。图6显示产生其它MU1140变体(Phe1Ile和Phe1Gly)的菌株与野生型MU1140进行比较的生物活性。产生Phe1Ile和Phe1Gly的菌株,相对于野生型分别显示显著的($p<.001$) 1.82倍和1.57倍增加。

[0142] 有许多研究使用乳酸链球菌肽(nisin)和某些其它羊毛硫抗生素(由Chatterjee等人(2005) Chem. Rev. 105:633综述)的结构基因的位点定向诱变,以分析特定氨基酸在这些分子的活性中的重要性。这些突变很少导致增加的生物活性。

[0143] 对于Arg13Asp突变体,获得最引人关注的结果。当与野生型比较时,这种突变导致生物活性的意想不到的、高度显著性的增加。在此,在较链区中用荷负电的残基替代荷正电的残基。这种结果违背常规信念,即羊毛硫抗生素的负电荷将减少生物活性,因为正电荷被认为有助于抗生素与存在于靶细胞膜中的带负电荷的脂质的相互作用。这种突变也从化合物除去胰蛋白酶可切割位点,从而使其对酶促水解更稳定。此外Trp4Ala、Dha5Ala和Arg13Asp为很可能不会天然发生的颠换突变。

[0144] 因此,考虑到现有技术,本文描述的对MU1140的突变是意想不到的和不可预测的,并导致与野生型MU1140相比已极大改善生物学和结构特征的变体MU1140分子。从改进变形链球菌效应菌株的定居潜力的观点而言,增加活性的突变是重要的。先前已表明变形链球菌菌株定居啮齿动物和人的口腔的能力与产生的MU1140的量和/或活性有关。此外,先前已表明变形链球菌菌株强有力地替代啮齿动物和人口腔中的变形链球菌本土株的能力与产生的MU1140的量和/或活性有关。参见例如,Hillman等人、Infect. Immun. 44:141 (1984); Hillman等人、J. Dent. Res. 66:1092 (1987)。因此,与不表达本发明的变体MU1140的变形链球菌效应菌株比较,表达如本文所述的变体MU1140的本发明变形链球菌效应菌株具有意想不到的和改善的特征。即,相对于不表达如本文所述的变体MU1140的变形链球菌效应菌株,表达变体MU1140的变形链球菌效应菌株具有改进的定居和比宿主口腔中天然变形链球菌强有力地更具竞争优势并将其替代的能力。

[0145] 实施例3:最小抑制浓度

[0146] 将野生型变异菌素1140、具有F11突变的变异菌素1140、具有W4A突变的变异菌素1140和具有R13D突变的变异菌素1140纯化至约90%纯度(经由HPLC测定)。针对数种细菌确定MU1140和MU1140变体的最小抑制浓度(MIC)。MIC为在24小时培养之后抑制可见的微生物生长的MU1140的最低浓度。越低的MIC表明越大的抑制活性。用于最小抑制浓度(MIC)的抗微生物剂和细菌接种物的制备,通过遵循具有某些小改动的Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M07-8A中所述的方法进行。在振荡培养箱中过夜测试变形链球菌UA159以维持细菌的均匀分布。在厌氧培养室中于37℃测试艰难梭菌UK1。使用的培养基为THyex。结果在表1中显示。

[0147] 表1

[0148]

MU1140 变体	变形链球菌 UA159	肺炎链球菌 FA1	金黄色葡萄 球菌 FA1	藤黄微球菌 ATCC10240	艰难梭菌 UK1
Mu114 野生型	2	0.5	16	0.0625	16
Mu1140 FH	2	0.25	8	0.0156	8
Mu1140W4A	2	0.125	16	0.0312	8
Mu1140R13D	2	4	>16	0.125	16

[0149] 虽然对于各突变体而言,各生物体的MIC未必更低,但各突变体相对于野生型MU1140仍具有优势,因为除了其它有利特性之外,其还可例如更易于生产、更易于运输、具有更好的贮存稳定性、具有更好的血清稳定性或者具有更好的蛋白水解稳定性。

CPCH1462224P

序 列 表

<110> Oragenics, Inc.
Hillman, Jeffrey D.
Smith, James Leif

<120> 用于龋齿的替代疗法

<130> 11-1150-PCT

<140> PCT/US13/27340

<141> 2013-02-22

<150> 61/603,661

<151> 2012-02-27

<150> 61/603,693

<151> 2012-02-27

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

[0001]

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 二硫化物

<222> (3)..(7)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X是Dha氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Abu

<220>

<221> 二硫化物

<222> (8)..(11)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> X 是 Dhb 氨基酸

<220>
<221> 二硫化物
<222> (16).. (21)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19).. (21)
<223> 羊毛硫氨酸桥

<400> 1

Phe Lys Ala Trp Xaa Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Ala Arg Xaa Gly Ala
1 5 10 15

Phe Asn Ala Tyr Ala
20

[0002]

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> X 是 Ile 或 Gly

<220>
<221> 二硫化物
<222> (3).. (8)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (4)
<223> X 是 Trp、Ala 或不存在

<220>
<221> 二硫化物
<222> (10).. (13)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X 是 Abu 氨基酸或 Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> X 是 Dhb 氨基酸或 Ala

<220>
 <221> 二硫化物
 <222> (18)..(23)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(23)
 <223> 羊毛硫氨酸桥
 <400> 2

Xaa Lys Ala Xaa Ala Ala Leu Ala Ala Xaa Pro Gly Ala Ala Asp Xaa
 1 5 10 15

[0003] Gly Ala Phe Asn Ala Tyr Ala
 20

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 3
 geaagccttt gtacgcctgg ttg 23

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 4
 acaaaggett gcacttttga aacg 24

	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 5	
	gcaagcccttt gtacgcctgg ttg	23
	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 6	
	caaagccttg cccaactttt gaaacg	26
[0004]	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 7	
	agcctttgta egcctggttg	20
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 8	
	cgtacaaagg ctacttttga aacg	24
	<210> 9	
	<211> 23	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 9	
	gcactttgta cgcctggttg tgc	23
	<210> 10	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 10	
	ggcgtacaaa gtgcccaact tttgaa	26
[0005]	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Synthetic	
	<400> 11	
	gcaacgcctg gttgtgcaag gac	23
	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 12	
	accaggcggt gcacaaaggc tcc	23
	<210> 13	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	13	
		gacacaggta gtttcaatag ttac	24
	<210>	14	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	14	
		gaaactacct gtgtctgcac aaccag	26
	<210>	15	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0006]	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	15	
		gatccagata ctcgtggcaa aagttggagc ctttgtacg	39
	<210>	16	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	16	
		caacttttgc cacgagtatc tggatcgtcg ttgc	34
	<210>	17	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	

	<400> 17 gatccagata ctcgtatcaa aagttggagc ctttgtacg	39
	<210> 18 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	
	<400> 18 caacttttga tacgagtatc tggatcgtcg ttgc	34
	<210> 19 <211> 66 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	
[0007]	<400> 19 ttcaaaagtt ggagcctttg tacgcctggg ttgtgcaagga caggtagttt caatagttac	60
	tgttgc	66
	<210> 20 <211> 66 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	
	<400> 20 ggcaaaagtt ggagcctttg tacgcctggg ttgtgcaagga caggtagttt caatagttac	60
	tgttgc	66
	<210> 21 <211> 66 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	

	<400> 21	
	atcaaaagtt ggagcctttg tacgcctggt tgtgcaagga caggtagttt caatagttac	60
	tgttgc	66
	<210> 22	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 22	
	ttcaaaagtg caagcctttg tacgcctggt tgtgcaagga caggtagttt caatagttac	60
	tgttgc	66
	<210> 23	
	<211> 69	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 23	
	ttcaaaagtt gggcaagcct ttgtacgcct ggttgigcaa ggacaggtag tttcaatagt	60
	tactgttgc	69
	<210> 24	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 24	
	ttcaaaagta gcctttgtac gcctggttgt gcaaggacag gtagtttcaa tagttactgt	60
	tgc	63
	<210> 25	
	<211> 66	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	25	
ttcaaaagtt	gggcactttg tacgcctggt tgtgcaagga caggtagttt caatagttac	60
tggttgc		66
<210>	26	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	26	
ttcaaaagtt	ggagcctttg tgcaacgcct ggttgtgcaa ggacaggtag ttccaatagt	60
tactgttgc		69
[0009]		
<210>	27	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	27	
ttcaaaagtt	ggagcctttg tacgcctggt tgtgcagaca caggtagttt caatagttac	60
tggttgc		66
<210>	28	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	28	
gtaaaacgac	ggccag	16

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 29
agaattcagg atgctatcgc tgcctttttt gtg

33

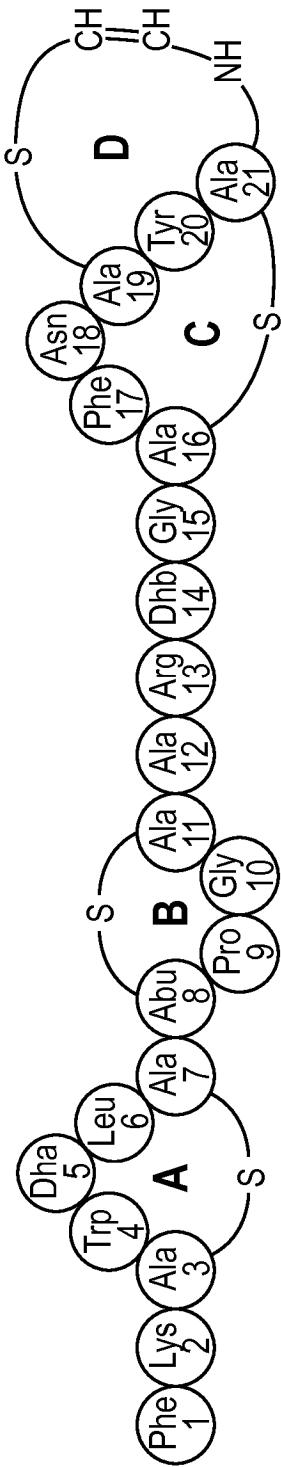
[0010]

<210> 30
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

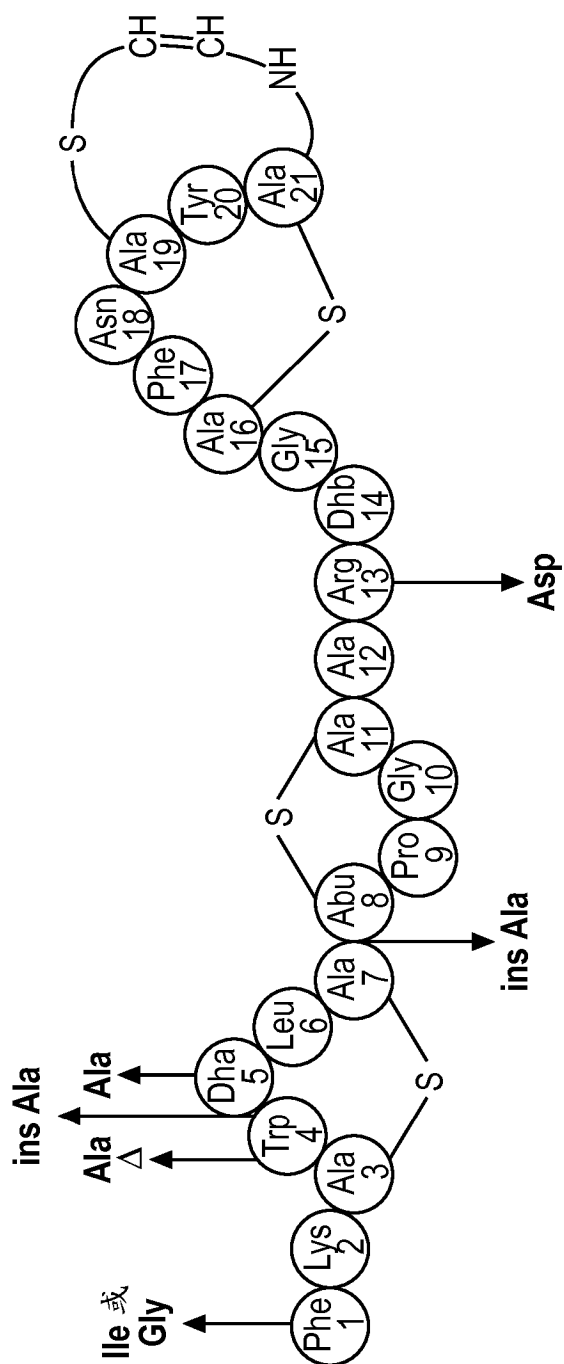
<400> 30
agaattcagg aaagttgcca tatggttttg tg

32



野生型(天然) MU1140

图 1A



对 MU1140 改变的示意图

缩写和符号: ins=插入和 Δ =缺失

图 1B

突变体与野生型序列的比对

野生型	TTCAAAAGTTGG---AGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Phe1Gly	GGCAAAAGTTGG---AGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Phe1Ile	ATCAAAAGTTGG---AGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Trp4Ala	TTCAAAAGTGCA---AGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Trp4insAla	TTCAAAAGTTGGGCAAGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
ΔTrp4	TTCAAAAGT-----AGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Ser5Ala	TTCAAAAGTTGG---GCACTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Cys7insAla	TTCAAAAGTTGG---AGCCTTTGTGCAACGCCTGGTTGTGCAAGGACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC
Arg13Asp	TTCAAAAGTTGG---AGCCTTTGT---ACGCCTGGTTGTGCAGACACAGGTAGTTTCAATAGTTACTGTTGC

野生型	SEQ ID NO:19
Phe1Gly	SEQ ID NO:20
Phe1Ile	SEQ ID NO:21
Trp4Ala	SEQ ID NO:22
Trp4insAla	SEQ ID NO:23
ΔTrp4	SEQ ID NO:24
Ser5Ala	SEQ ID NO:25
Cys7insAla	SEQ ID NO:26
Arg13Asp	SEQ ID NO:27

图 2

用于 MU1140 诱变的引物

寡核苷酸	序列 (5' - 3')
SRWlanA_1	<u>AGAATTC</u> AGGATGCTATCGCTGCTTTTTTTGTG (SEQ ID NO:1)
SRWlanA_2	<u>AGAATTC</u> AGGAAAGTTGCCATATGGTTTTGTG (SEQ ID NO:2)
Phe1Gly_1	GATCCAGATACTCGTGGCAAAAGTTGGAGCCTTTGTACG (SEQ ID NO:15)
Phe1Gly_2	CAACTTTTGCCACGAGTATCTGGATCGTCGTTGC (SEQ ID NO:16)
Phe1Ile_1	GATCCAGATACTCGTATCAAAAGTTGGAGCCTTTGTACG (SEQ ID NO:17)
Phe1Ile_2	CAACTTTTGATACGAGTATCTGGATCGTCGTTGC (SEQ ID NO:18)
Trp4Ala_1	GCAAGCCTTTGTACGCCTGGTTG (SEQ ID NO:3)
Trp4Ala_2	ACAAAGGCTTGCACTTTTGAAACG (SEQ ID NO:4)
Trp4insAla_1	GCAAGCCTTTGTACGCCTGGTTG (SEQ ID NO:5)
Trp4insAla_2	CAAAGGCTTGCCCACTTTTGAAACG (SEQ ID NO:6)
ΔTrp4_1	---AGCCTTTGTACGCCTGGTTG (SEQ ID NO:7)
ΔTrp4_2	CGTACAAAGGCTACTTTTGAAACG (SEQ ID NO:8)
Dha5Ala_1	GCACTTTGTACGCCTGGTTGTGC (SEQ ID NO:9)
Dha5Ala_2	GGCGTACAAAGTGCCCACTTTTGAA (SEQ ID NO:10)
Alas7insAla_1	GCAACGCCTGGTTGTGCAAGGAC (SEQ ID NO:11)
Alas7insAla_2	ACCAGGCGTTGCACAAAGGCTCC (SEQ ID NO:12)
Arg13Asp_1	GACACAGGTAGTTTCAATAGTTAC (SEQ ID NO:13)
Arg13Asp_2	GAAACTACCTGTGTCTGCACAACCAG (SEQ ID NO:14)
外引物是 SRWlanA_1 和 SRWlanA_2 并且与 5' 和 3' 侧翼 DNA 是同源的。 下划线部分表示工程改造 EcoR1 位点。突变为粗体或加虚线。 编号指明正向引物(1)和反向引物(2)。	

图 3

图 4B

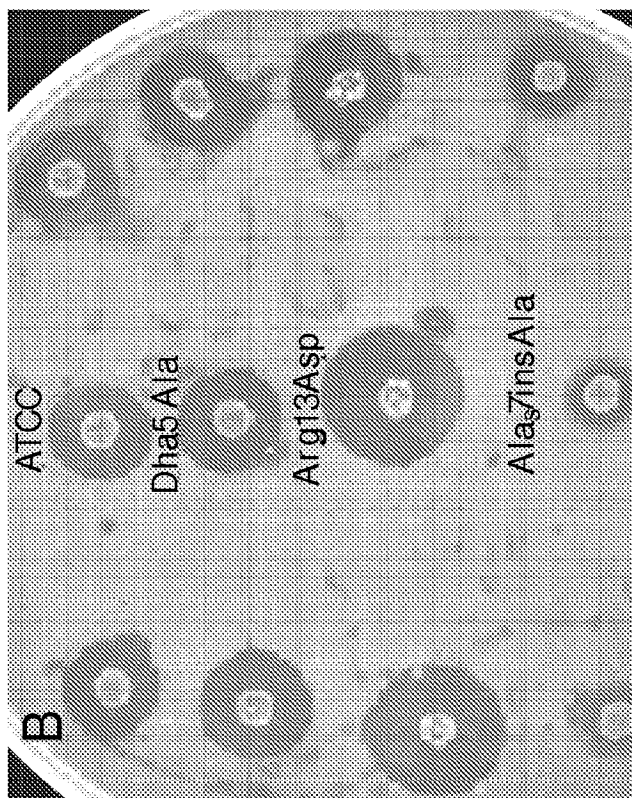


图 4A

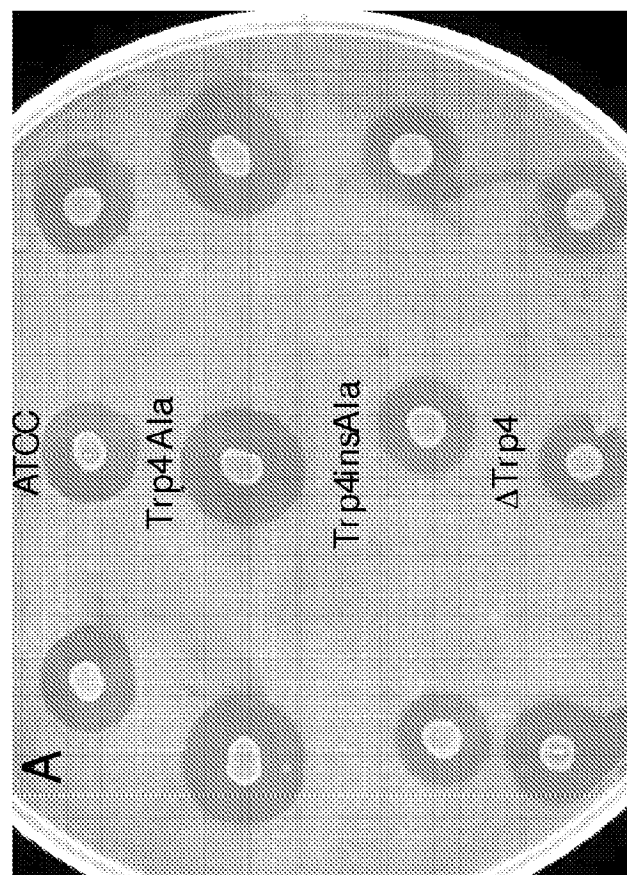


图 4A-B: 抑菌圈平板测定

产生 MU1140 变体的菌株与产生野生型 MU1140 的菌株比较的生物活性

产生的变体	平均面积 [*] (mm ²)	均值的标准 误(SEM)	变体对野生 型的活性 比率	统计学 显著性 (p 值) [#]
MU1140 (野生型)	204.44	8.90	-	-
Phe1Gly	321.85	46.52	1.57	<.001
Phe1Ile	372.78	75.90	1.82	<.001
Trp4Ala	434.80	46.10	2.12	<.001
Trp4insAla	212.37	24.70	1.04	>.05
ΔTrp4	217.56	35.37	1.06	>.05
Dha5Ala	382.25	31.40	1.87	<.001
Ala ₅ 7insAla	109.41	9.74	0.54	<.001
Arg13Asp	526.06	55.09	2.57	<.001

^{*} 基于 10 个独立样品。[#] 斯氏 t 检验

图 5

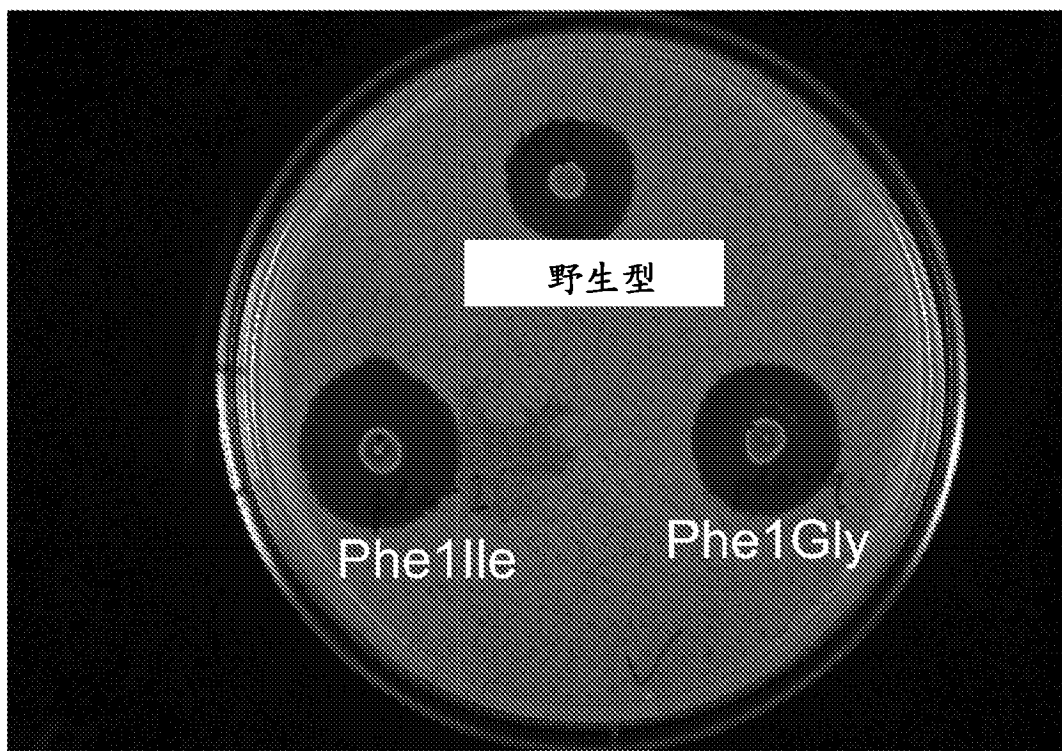


图 6