



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101432017 B

(45) 授权公告日 2011.12.21

(21) 申请号 200680002556.8

C12Q 1/68(2006.01)

(22) 申请日 2006.01.17

C12N 15/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(30) 优先权数据

60/645,811 2005.01.21 US

(56) 对比文件

AU 2003254555 A1, 2004.02.23,

WO 02094868 A2, 2002.11.28,

VYTVYTSKA 0. Identification of vaccine candidate antigens of staphylococcus aureus by serological proteome analysis.. 《Proteomics》. 2002, 第 2 卷 (第 5 期),

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007.07.18

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2006/001665 2006.01.17

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/078680 EN 2006.07.27

审查员 吴希哲

(73) 专利权人 默沙东公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 R·凯利 L·D·舒尔茨

M·A·米勒 M·D·耶格

T·麦克尼利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 程淼 黄可峻

(51) Int. Cl.

A61K 39/09(2006.01)

C07H 21/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 15 页

序列表 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于诱导针对金黄色葡萄球菌的保护性免疫应答的多肽

(57) 摘要

本发明涉及包含与 SEQ ID NO:1 结构上相关的氨基酸序列的多肽或其片段、S. aureus AhpC-AhpF 组合物,以及此类多肽和组合物的用途。SEQ ID NO:1 具有全长 S. aureus AhpC 序列。含有氨基 His-tag 和三个额外羧基氨基酸的 SEQ ID NO:1 的衍生物被发现产生针对 S. aureus 的保护性免疫应答。

MOHHHHHHHHSSGHIEGRHMSLNKSLPPTAQAFDPKIDQFZEVVQEDLKGNSVVCVFPADFSFVCPTELE  
DLQIQVBSLQKLGNNVPSVSTZHFVVKAWHDSDAISKITTTMIGDPSCVTTTNNVLDKATGLAQRGTFLDP  
DGVVQASSEINADGIGRDASTLAKIKAAQVVEKVPGEVCPAKNBSGARTLQPLDLVQKLAEQ

1. 一种多肽免疫原, 其由 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列组成。
2. 权利要求 1 的多肽, 其中所述多肽是基本上纯化的。
3. 一种免疫原, 其由 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列和在羧基末端或氨基末端与所述氨基酸序列共价连接的一个或多个其它区域或部分组成, 其中每个区域或部分独立地选自以下区域或部分: 氨基末端保护基团、羧基末端保护基团、聚乙二醇和亲合性标签。
4. 一种能在患者中诱导保护性免疫应答的组合物, 其包含免疫有效量的权利要求 1-3 的任一项的免疫原和药学上可接受的载体。
5. 权利要求 4 的组合物, 其中所述组合物进一步包含佐剂。
6. 一种核酸, 其包含编码权利要求 1 或 2 的多肽的核苷酸序列。
7. 权利要求 6 的核酸, 其中所述核酸是表达载体。
8. 一种重组细胞, 所述细胞包含权利要求 7 的核酸。
9. 一种产生提供保护性免疫的 *S. aureus* 多肽的方法, 包括步骤:
  - (a) 在其中所述多肽被表达的条件下培养权利要求 8 的重组细胞; 以及
  - (b) 纯化所述多肽。
10. 一种分离的结合蛋白, 包含与权利要求 1 的免疫原结合的可变区。
11. 权利要求 10 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白由包括以下步骤的方法产生:
  - (a) (1) 使用所述免疫原来选择所述结合蛋白; 或 (a) (2) 使用所述免疫原来诱导所述结合蛋白的产生; 以及
  - (b) 基本上纯化所述抗原结合蛋白。
12. 权利要求 11 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白是抗体。
13. 以下物质在制备用于针对 *S. aureus* 感染治疗患者的药物中的用途:
  - (a) 由 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列组成的免疫原, 其中所述多肽提供了针对 *S. aureus* 的保护性免疫;
  - (b) 权利要求 1-3 的任一项的免疫原; 或
  - (c) 权利要求 10 的结合蛋白。
14. 权利要求 13 的用途, 其中所述药物用于针对 *S. aureus* 感染进行预防性治疗。

## 用于诱导针对金黄色葡萄球菌的保护性免疫应答的多肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2005 年 1 月 21 日提交的美国临时专利申请 No. 60/645,811 的优先权,通过引用将它合并于本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 在本申请全文中引用的对比文件不被认为是所要求保护的发明的现有技术。

[0005] *Staphylococcus aureus* (金黄色葡萄球菌) 是作用于多种疾病和状况 (condition) 的病原体。由 *S. aureus* 引起的疾病和状况的例子包括菌血症、感染性心内膜炎、毛囊炎、疖、痈、脓疱病、大疱性脓疱病、蜂窝组织炎、*botryomycosis*、毒性休克综合症、烫伤样皮肤综合中枢神经系统感染、传染性和炎症性的眼病、骨髓炎和其它关节及骨骼的感染和呼吸道感染。(The *Staphylococci* in Human Disease, Crossley and Archer (eds.), Churchill Livingstone Inc. 1997.)

[0006] 可以采用基于免疫学的策略来控制 *S. aureus* 感染和 *S. aureus* 的传播。基于免疫学的策略包括被动和主动的免疫。被动免疫采用靶向 *S. aureus* 的免疫球蛋白。主动免疫诱导针对 *S. aureus* 的免疫反应。

[0007] 潜在的 *S. aureus* 疫苗靶向 *S. aureus* 多糖和多肽。靶向可以通过使用适合的 *S. aureus* 多糖或多肽作为疫苗成分来实现。可以被用作为潜在的疫苗成分的多糖的例子包括 *S. aureus* 5 型和 8 型荚膜多糖。(Shinefield et al., N. Eng. J. Med. 346 :491-496, 2002.) 可以用作为可能的疫苗成分的多肽的例子包括胶原粘附素、纤维蛋白原结合蛋白和聚集因子。(Mamo et al., FEMS Immunology and Medical Microbiology 10 :47-54, 1994, Nilsson et al., J. Clin. Invest. 101 :2640-2649, 1998, Josefsson et al., The Journal of Infectious Diseases 184 :1572-1580, 2001.)

[0008] 关于 *S. aureus* 多肽序列的信息可以通过对 *S. aureus* 基因组测序来获得。(Kuroda et al., Lancet 357 :1225-1240, 2001, Baba et al., Lancet 359 :1819-1827, 2000, Kunsch et al., 欧洲专利公开 EP 0 786 519, 1997 年 7 月 30 日公开)。使用生物信息学的努力在一定程度上表征了从基因组测序获得的多肽序列。(Kunsch et al., 欧洲专利公开 EP 0 786519, 1997 年 7 月 30 日公开)

[0009] 一些技术,例如涉及展示 (display) 技术和来自受感染患者的血清的技术,已经用于努力帮助鉴定编码潜在抗原的基因。(Foster et al., 国际公开号 WO 01/98499, 2001 年 12 月 27 日公开, Meinke et al., 国际公开号 WO 02/059148, 2002 年 8 月 1 日公开, Etz et al., PNAS 99 :6573-6578, 2002.)

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及包含与 SEQ ID NO :1 结构上相关的氨基酸序列的多肽或其片段、*S. aureus* AhpC-AhpF 组合物,以及此类多肽和组合物的用途。SEQ ID NO :1 具有全长 *S. aureus* AhpC 序列。含有氨基 His-tag 和三个额外羧基氨基酸的 SEQ ID NO :1 的衍生物被发现产生针对 *S. aureus* 的保护性免疫应答。

[0012] 提到“保护性”免疫或免疫应答表明针对 *S. aureus* 感染的可检测水平的保护。可

以使用动物模型,例如在本文中描述的那些来评定保护的水平。

[0013] 因而,本发明的第一个方面描述了多肽免疫原,其包含与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :1 的片段至少 85% 相同的氨基酸序列,其中所述多肽提供了针对 *S. aureus* 的保护性免疫,并且所述多肽免疫原不是 SEQ ID NO :1 的多肽。提到免疫原表明提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的能力。

[0014] 提到包含与 SEQ ID NO :1 至少 85% 相同的氨基酸序列表明:存在 SEQ ID NO :1 的相关区域,并且可以存在其它的多肽区域。与参考序列的同一性百分比(也称为百分比相同于)是通过将多肽序列与参考序列进行比对并确定相应区域中相同氨基酸的数目来测定的。这个数目除以参考序列(例如,SEQ ID NO :1)中的氨基酸总数,然后乘以 100 并四舍五入到最接近的整数。

[0015] 本发明的另一个方面描述了免疫原,其包含提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的多肽,以及在羧基末端或氨基末端与所述多肽共价连接的一个或多个其它区域或部分(moiety),其中每个区域或部分独立地选自具有至少一种以下性质的区域或部分:增强免疫应答,有利于纯化或有利于多肽稳定性。

[0016] 提到“其它区域或部分”表明不同于 *S. aureus* AhpC 区域的区域或部分。其它区域或部分可以是,例如,其它的多肽区域或非肽区域。

[0017] 本发明的另一个方面描述了由 AhpC-AhpF 组合物组成的纯化的免疫原。AhpC 组分包含至少 85% 相同于 SEQ ID NO :1 的多肽。AhpC 组分包含至少 85% 相同于 SEQ ID NO :3 的多肽。提到纯化的表明所述组合物存在于缺少一种或多种下述其它多肽的环境中,所述其它多肽是 AhpC 和 AhpF 与之天然地相关的或代表了存在的总蛋白中的至少约 10%。

[0018] 优选地,所述组合物是基本上纯化的。“基本上纯化的”AhpC 和 AhpF 组合物存在于缺少所有的或大多数下述其它多肽的环境中,所述其他多肽是 AhpC 和 AhpF 多肽与之天然地相关的。

[0019] 提到“纯化的”或“基本上纯化的”不需要多肽经历任何纯化,可以包括,例如,没有被纯化的化学上合成的多肽。

[0020] 本发明的另一个方面描述了能在患者中诱导针对 *S. aureus* 的保护性免疫的组合物。所述组合物包含药学上可接受的载体和免疫有效量的提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的免疫原。

[0021] 免疫有效量是足以提供针对 *S. aureus* 感染的保护性免疫的数量。该数量应当足以显著地防止 *S. aureus* 感染的可能性或严重度。

[0022] 本发明的另一个方面描述了包含重组基因的核酸,所述重组基因编码提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的多肽。重组基因含有编码多肽的重组核酸以及用于适当的转录和加工的调节元件(其可以包括翻译和翻译后元件)。重组基因可以独立于宿主基因组存在,或可以是宿主基因组的一部分。

[0023] 重组核酸是其序列和/或形式在自然中不存在的核酸。重组核酸的例子包括纯化的核酸、组合在一起提供了不同于自然中发现的核酸的两个或多个核酸区域,以及相互之间天然相关的一种或多种核酸区域(例如,上游或下游区域)的缺少。

[0024] 本发明的另一个方面描述了重组细胞。所述细胞包含重组基因,所述重组基因编码提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的多肽。

[0025] 本发明的另一个方面描述了产生提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的多肽的方法。所述方法包括培养含有编码所述多肽的重组核酸的重组细胞,并纯化所述多肽。

[0026] 本发明的另一个方面描述了提供针对 *S. aureus* 的保护性免疫的多肽,所述多肽由下述过程生产,所述过程包括在宿主中培养含有编码所述多肽的重组核酸的重组细胞,并纯化所述多肽。可以采用不同的宿主细胞。

[0027] 本发明的另一个方面描述了分离的 AhpC-AhpF 结合蛋白。所述结合蛋白包含与 AhpC-AhpF 复合物结合的抗体可变区。

[0028] 提到“分离的”表明与天然发现的形式不同的形式。所述不同形式可以是,例如,与天然发现有所不同的纯度和 / 或天然没有发现的结构。天然没有发现的结构包括下述重组结构,其中不同的区域被组合在一起,例如,人源化抗体,其中一个或多个鼠的互补决定区 (CDR) 被插入到人类框架支架 (framework scaffold) 上;杂交抗体,其中来自抗体结合蛋白的一个或多个 CDR 被插入到不同的框架支架上;以及来自天然人类序列的抗体,其中编码轻和重可变区的基因被随机组合到一起。

[0029] 优选地,分离的蛋白基本上没有血清蛋白。基本上没有血清蛋白的蛋白质存在于缺乏大多数或所有血清蛋白的环境中。

[0030] 本发明的另一个方面描述了针对 *S. aureus* 感染对患者加以治疗的方法。所述方法包括向所述患者施用一种或多种以下物质的步骤:

[0031] (a) 免疫有效量的免疫原,其包含与 SEQ ID NO :1 或 SEQ IDNO :1 的片段至少 85% 相同的氨基酸序列,其中所述多肽提供了针对 *S. aureus* 的保护性免疫:

[0032] (b) 免疫原性组合物,其包含与 SEQ ID NO :1 至少 85% 相同的多肽和与 SEQ ID NO :3 至少 85% 相同的多肽;或

[0033] (c) 有效量的 AhpC-AhpF 结合蛋白。

[0034] 除非特定的术语互相排斥,提到“或”表明可能性之一或两者都有。有时,例如“和 / 或”等用语被用于突出之一或两者的可能性。

[0035] 引述开放性的术语例如“包含”允许添加元素或步骤。有时用语例如“一个或多个”与或不与开放式术语一同使用来强调添加元素或步骤的可能性。

[0036] 除非明确地声明,提到术语例如“a”或“an”不局限于一个。例如,“细胞 (a cell)”不排除“多个细胞 (cells)”。有时例如“一个或多个”等用语被用于强调多个的存在的可能性。

[0037] 根据在此提供的包括不同实施例的其它描述,本发明的其它特征和益处是明显的。提供的实施例例举了在实践中本发明中有用的不同成分和方法。实施例不限制要求保护的发明。根据当前的公开,熟练的技术人员可以鉴定和采用对于实践本发明有用的其它成分和方法。

[0038] 附图的简要说明

[0039] 附图 1 阐述了 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。完整的序列是 SEQ ID NO :2。粗体显示的部分是 SEQ ID NO :1。下划线的区域是氨基 His-tag 区域和在羧基端的其它氨基酸。

[0040] 附图 2 阐述了对来自 *S. aureus* (SEQ ID NO :1) 和 *S. epidermidis* (SEQ ID NO :6, GenBank Accession No. AE016752) 的 AhpC 序列之间的序列比较。氨基酸差异以粗体显示。

[0041] 附图 3 阐述了编码 SEQ ID NO :2 的核酸序列 (SEQ ID NO :5)。额外的 His-tag 和羧基氨基酸编码区以粗体显示。

[0042] 附图 4 阐述了编码 SEQ ID NO :3 的 DNA 序列 (SEQ ID NO :4)。

[0043] 附图 5A 和 5B 阐述了对来自 *S. aureus* :SEQ ID NO :3 (GenBank 登记 No. U92441)、9 (GenBank 登记 No. AP004823) 和 10 (GenBank 登记 No. BX57183) 和 *S. epidermidis*, SEQ ID NO :8 (GenBank 登记 No. AE016752) 的不同 AhpF 序列之间的序列比较。氨基酸差异以粗体显示。

[0044] 附图 6A 和 6B 阐述了使用处于氢氧化磷酸铝佐剂中的 SEQ ID NO :2 多肽 (圆圈) 或单独的佐剂 (三角形) 进行实验的结果。

[0045] 发明的详细说明

[0046] 在下文提供的使用 SEQ ID NO :2 的实施例中阐释了 SEQ ID NO :1 相关多肽提供保护性免疫的能力。SEQ ID NO :2 是 SEQ ID NO :1 的衍生物,其含有氨基 His-tag 和三个额外的羧基氨基酸。His-tag 有利于多肽纯化和鉴定。

[0047] 与 SEQ ID NO :1 结构上相关的多肽包括含有不同 *S. aureus* 菌株中存在的相应区域和天然发生区域的衍生物的多肽。SEQ ID NO :1 的氨基酸序列由附图 1 中的粗体区域阐释。附图 1 还阐释了 SEQ ID NO :2 中存在的氨基 His-tag 和额外的羧基氨基酸。

[0048] I. AhpC 序列

[0049] *S. aureus* AhpC 最初被鉴定为与 *E. coli* 羟基过氧化氢物还原酶具有广泛相似性的由渗透上调休克 (osmotic up shock) 诱导的蛋白质 (AhpC)。(Amstrong-Buisseret et al., Microbiology 141 :1655-1661,1995.) 不同相似性的 AhpC 同源物存在于哺乳动物脑中和不同的生物体,包括许多细菌物种中。(Chae et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA91 :7017-7021,1994, Yan et al., Helicobacter 6 :274-282,2001.)

[0050] *S. aureus* AhpC 相关序列已经在不同的参考文献中被给出了不同的名称。在 TIGR(SA0452);Baba et al., Lancet 359 :1819-1827,2002(MW0357);Kuroda et al., Lancet 357 :1225-1240,2001(SAV0381); 和 Ohta et al., DNA Research 1:51, 2004(SAV0381 and SAV0773) 中提供了不同名称的例子。。

[0051] 附图 2 提供了对 *S. aureus* (SEQ ID NO :1) 和 *S. epidermidis* (SEQ ID NO :6) 中存在的 *S. aureus* AhpC 相关序列之间的序列比较。可以从其它 AhpC 序列进行另外的比较。

[0052] 可以根据与已知 AhpC 序列相比高度的序列相似性或连续氨基酸的存在,来鉴定天然存在的其它 AhpC 序列。连续的氨基酸提供了特征性标签。在不同的实施方式中,天然存在的 AhpC 序列是在 *Staphylococcus* 中、优选的 *S. aureus* 中发现的序列,具有如 SEQ ID NO :1 中至少 20 个、至少 30 个或至少 50 个连续氨基酸;和 / 或具有与 SEQ ID NO :1 的至少 85% 序列相似性或同一性。

[0053] 可以通过不同的算法和本领域公知的技术来确定序列相似性。一般地,可以通过比对两个序列来获得最大氨基酸同一性,容许序列之一中的缺口、添加和替换的技术来确定序列相似性。

[0054] 例如,使用利用程序 lalign(由 Huang 和 Miller 开发, Adv. Appl. Math. 12 : 337-357,1991,《sim》程序)的局部比对工具,可以确定序列相似性。选项和环境变量是:第一个残基缺口的 -f#\_ 罚分 (默认 -14);-g#\_ 缺口中每个其它残基的罚分 (默认 -4),-s

str(SMATRIX) 可选择的计分矩阵文件的文件名。对于蛋白质序列,通过默认 `-w#_` (LINLEN) 序列比对输出线长度 (60) 来使用 PAM250。

**[0055]** II. SEQ ID NO :1 相关多肽

**[0056]** SEQ ID NO :1 相关多肽含有与 SEQ ID NO :1 至少 85% 相同的氨基酸序列。提到“多肽”时不提供最小或最大大小限制。

**[0057]** 至少 85% 相同于 SEQ ID NO :1 的多肽含有 SEQ ID NO :1 的多至约 28 个氨基酸改变。每个氨基酸改变独立地是氨基酸替换、删除或添加。在不同的实施方式中,SEQ ID NO :1 相关多肽至少 90%、至少 94% 或至少 99% 相同于 SEQ ID NO :1 ; 与 SEQ ID NO :1 不同 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸改变 ; 或基本上由 SEQ ID NO :1 组成。

**[0058]** 本发明的一种实施方式涉及多肽免疫原,其包含或基本上由至少 85%、至少 95% 或 100% 相同于 SEQ ID NO :1 的氨基酸 178-189 的序列组成。在另一些实施方式中,包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 178-189 的多肽由总共不超过 13、15、20、25、50、100 或 150 个氨基酸组成 ; 和 / 或整个多肽至少 85%、至少 90% 或相同于 SEQ ID NO :1 区域并包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 178-189。可能存在的其它氨基酸包括其它的 SEQ ID NO :1 氨基酸或其它氨基酸区域。优选的其它氨基酸是氨基末端甲硫氨酸。

**[0059]** 提到“基本上由”指明的氨基酸“组成”表明存在所指的氨基酸并且可能存在其它氨基酸。其它氨基酸可以是在羧基或氨基末端。在不同的实施方式中,存在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个其它氨基酸。

**[0060]** 可以对 SEQ ID NO :1 多肽或其片段进行改变,来获得诱导针对 *S. aureus* 的保护性免疫的衍生物。例如,可以进行改变来获得保持了诱导针对 *S. aureus* 的保护性免疫能力的衍生物,或来获得除了提供保护性免疫之外还具有可以实现特定目的的区域衍生物。

**[0061]** 附图 2 中提供的序列比较和与其它 *S. aureus* AhpC 序列的比较,可以用于指导设计潜在的改变。此外,可以考虑氨基酸的已知性质进行改变。

**[0062]** 一般地,在取代不同氨基酸以保持活性的过程中,交换具有相似性质的氨基酸是优选的。对于氨基酸替换而言,可以考虑的因素包括氨基酸大小、电荷、极性和疏水性。不同的氨基酸 R 基团对氨基酸性质的影响是本领域公知的。(参见,例如 Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley, 1987-2002, Appendix 1C.)

**[0063]** 在交换氨基酸以维持活性的过程中,置换氨基酸应具有一种或多种相似的性质,例如大约相同的电荷和 / 或大小和 / 或极性和 / 或疏水性。例如,缬氨酸对亮氨酸、精氨酸对赖氨酸、和天冬酰胺对谷氨酰胺的替换是不引起多肽功能变化的良好候选。

**[0064]** 实现特定目的的改变包括被设计以有利于多肽的生产或效力的那些 ; 或编码核酸的克隆的那些。通过使用适合于重组表达的起始密码子 (例如,编码甲硫氨酸) 可以便于多肽生产。甲硫氨酸稍后可以在细胞加工期间被除去。例如,通过引入可伴随有氨基酸添加或改变的限制性位点,可以协助克隆。

**[0065]** 可以通过表位强化来增强多肽诱导免疫反应的效力。可以使用不同的技术进行表位强化,所述技术例如,涉及改变锚定残基来改善肽对 MHC 分子的亲和性的那些,以及提高肽-MHC 复合物对 T 细胞受体的亲和性的那些。(Berzofsky et al., *Nature Review* 1 : 209-219, 2001.)

[0066] 优选地,所述多肽是纯化的多肽。“纯化的多肽”存在于缺乏一种或多种下述其它多肽的环境中,所述其它多肽天然地与之相关和/或以存在的总蛋白中的至少约 10% 存在。在不同的实施方式中,纯化的多肽在样品或制品中代表总蛋白的至少约 50%、至少约 75% 或至少约 95%。

[0067] 在一种实施方式中,多肽是“基本上纯化的”。基本上纯化的多肽存在于缺少与天然相关的所有或大多数其它多肽的环境中。例如,基本上纯化的 *S. aureus* 多肽存在于缺少所有或大多数其它 *S. aureus* 多肽的环境中。环境可以是,例如,样品或制品。

[0068] 提到“纯化的”或“基本上纯化的”不需要多肽经历任何纯化,可以包括,例如,没有被纯化的化学上合成的多肽。

[0069] 可以通过修饰多肽羧基或氨基末端来增强多肽稳定性。可能的修饰的例子包括氨基末端保护基团,例如,乙酰基、丙基、丁二酰基、苯甲基、苄氧基羰基或 *t*-丁氧羰基;和羧基末端保护基团,例如酰胺、甲酰胺和乙酰胺。

[0070] 在本发明的一种实施方式中,多肽免疫原是下述免疫原的部分,所述免疫原含有在羧基末端或氨基末端与所述多肽共价连接的一个或多个其它区域或部分,其中每个区域或部分独立地选自具有至少一种以下性质的区域或部分:增强免疫应答,有利于纯化或有利于多肽稳定性。例如,使用可以存在于氨基或羧基末端的基团如聚乙二醇,可以增强多肽稳定性。

[0071] 可以通过向羧基或氨基末端添加基团以有利于纯化来增强多肽纯化。可用来有利于纯化的基团的例子包括提供亲合性标签的多肽。亲合性标签的例子包括六组氨酸标签、trpE、谷胱甘肽和麦芽糖结合蛋白。

[0072] 可以使用通常能增强免疫应答的基团来增强多肽产生免疫应答的能力。可以与多肽连接来增强针对所述多肽的免疫应答的基团的例子包括细胞因子,例如 IL-2。(Buchan et al., 2000. *Molecular Immunology* 37:545-552.)

[0073] III. AhpC-AhpF 免疫原

[0074] AhpC-AhpF 免疫原是含有 AhpC 和 AhpF 组件的组合物。AhpC 组件由 SEQ ID NO:1 相关多肽组成。AhpF 组件由 SEQ ID NO:3 相关多肽组成。

[0075] SEQ ID NO:1 相关多肽含有与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的氨基酸序列。SEQ ID NO:1 相关多肽的不同的实施方式在上文 II 节中有所描述。

[0076] SEQ ID NO:3 相关多肽含有与 SEQ ID NO:3 至少 85% 相同的氨基酸序列。每个氨基酸改变独立地是氨基酸替换、删除或添加。在不同的实施方式中,SEQ ID NO:3 相关多肽至少 90%、至少 94%、至少 99% 或相同于 SEQ ID NO:3; 与 SEQ ID NO:3 不同 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸改变;或基本上由 SEQ ID NO:3 组成。

[0077] 对 SEQ ID NO:3 相关多肽进行改变来获得与 SEQ ID NO:1 相关多肽组件一同使用的衍生物。例如,可以进行改变,来获得保持了诱导针对 *S. aureus* 的保护性免疫能力的完整组合物,或来获得除了提供保护性免疫之外还具有可以实现特定目的的区域完整组合物。

[0078] 可用于帮助设计 AhpF 组件的不同的 AhpF 序列的例子在附图 5A 和 5B 中提供。产生对多肽的改变的其他指导在以上的 II 节中提供了。

[0079] 在不同的参考文献中对 *S. aureus* AhpF 相关序列给出了不同的名称。在 TIGR(SA0451);Baba et al., Lancet 359:1819-1827,2002(MW0356);Kuroda et al., Lancet 357:1225-1240,2001(SAV0380and SA0365); 和 Enright et al., PNAS 99:9786-9791,2002(SAS0357and SAR0398). 中提供了不同名称的例子。

[0080] 优选地,使用表达两个组件的构建体重组产生 AhpC 和 AhpF 组合物。例如,*E. coli* 菌株可以被工程化来共表达 ahpC 和 ahpF,可以分离 AhpC 和 AhpF 复合物。关于多肽生产的其它指导和例子在下文的 IV 节中提供。

#### [0081] IV. 多肽生产

[0082] 多肽可以使用标准技术来生产,包括涉及化学合成的那些和涉及从产生所述多肽的细胞提纯的那些。对多肽进行化学合成的技术是本领域公知的。(参见,例如 Vincent, Peptide and Protein Drug Delivery, New York, N. Y., Decker,1990.) 用于重组多肽生产和纯化的技术也是本领域公知的。(参见,例如, Ausubel, Current Protocols in MolecularBiology, John Wiley,1987-2002.)

[0083] 使用重组核酸技术来产生多肽有利于从细胞获得多肽。用于产生多肽的重组核酸技术包括:在细胞中导入或产生编码所述多肽的重组基因并表达所述多肽。

[0084] 重组基因含有编码多肽的核酸以及用于多肽表达的调节元件。重组基因可以存在于细胞基因组中,或是表达载体的部分。

[0085] 可以作为重组基因的部分存在的调节元件包括天然与所述多肽编码序列相关的那些,以及天然不与所述多肽编码序列相关的外源的调节元件。外源调节元件(例如外源启动子)对于在特定宿主中表达重组基因或提高表达的水平是有用的。一般地,重组基因中存在的调节元件包括转录启动子、核糖体结合位点、终止子以及任选地,存在的操纵子(present operator)。用于真核细胞中加工的优选元件是多腺苷酸化信号。

[0086] 通过使用表达载体,有利于重组基因在细胞中的表达。优选地,除重组基因之外,表达载体还含有用于在宿主细胞中自主复制的复制起点、选择性标记、有限数量的有用的限制性内切酶位点以及高拷贝数的可能性。表达载体的例子是克隆载体、经修饰的克隆载体、专门设计的质粒和病毒。

[0087] 由于遗传密码的简并性,大量的不同编码核酸序列可以用于编码特定的多肽。由于几乎所有的氨基酸由不同的核苷酸三联体组合或“密码子”编码,从而产生了遗传密码简并性。由密码子编码的氨基酸如下:

[0088] A = Ala = 丙氨酸 :密码子 GCA, GCC, GCG, GCU

[0089] C = Cys = 半胱氨酸 :密码子 UGC, UGU

[0090] D = Asp = 天冬氨酸 :密码子 GAC, GAU

[0091] E = Glu = 谷氨酸 :密码子 GAA, GAG

[0092] F = Phe = 苯丙氨酸 :密码子 UUC, UUU

[0093] G = Gly = 甘氨酸 :密码子 GGA, GGC, GGG, GGU

[0094] H = His = 组氨酸 :密码子 CAC, CAU

[0095] I = Ile = 异亮氨酸 :密码子 AUA, AUC, AUU

[0096] K = Lys = 赖氨酸 :密码子 AAA, AAG

[0097] L = Leu = 亮氨酸 :密码子 UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU

[0098] M = Met = 甲硫氨酸 :codon AUG

[0099] N = Asn = 天冬酰胺 :密码子 AAC, AAU

[0100] P = Pro = 脯氨酸 :密码子 CCA, CCC, CCG, CCU

[0101] Q = Gln = 谷氨酰胺 :密码子 CAA, CAG

[0102] R = Arg = 精氨酸 :密码子 AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU

[0103] S = Ser = 丝氨酸 :密码子 AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU

[0104] T = Thr = 苏氨酸 :密码子 ACA, ACC, ACG, ACU

[0105] V = Val = 缬氨酸 :密码子 GUA, GUC, GUG, GUU

[0106] W = Trp = 色氨酸 :codon UGG

[0107] Y = Tyr = 酪氨酸 :密码子 UAC, UAU

[0108] 适合用于 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 相关多肽的重组核酸表达的细胞是原核生物和真核生物。原核细胞的例子包括 *E. coli* ;*Staphylococcus* 属的成员,例如 *S. aureus* ;*Lactobacillus* 属的成员,例如 *L. plantarum* ;*Lactococcus* 属的成员,例如 *L. lactis* ;*Bacillus* 属的成员,例如 *B. subtilis*。真核细胞的实例包括哺乳动物细胞 ;昆虫细胞 ;酵母细胞,例如 *Saccharomyces* 属的成员 (例如, *S. cerevisiae*)、*Pichia* 属的成员 (例如, *P. pastoris*)、*Hansenula* 属的成员 (例如, *H. polymorpha*)、*Kluyveromyces* 属的成员 (例如, *K. lactis* 或 *K. fragilis*) 和 *Schizosaccharomyces* 属的成员 (例如, *S. pombe*)。

[0109] 重组基因产生、导入细胞和重组基因表达的技术是本领域公知的。在参考文件中提供了这些技术的例子,例如 Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley, 1987-2002 和 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。

[0110] 如果需要的话,可以通过密码子优化来增强特定宿主中的表达。密码子优化包括使用更优选的密码子。在不同宿主中的密码子优化技术是本领域公知的。

[0111] 多肽可以含有翻译后修饰,例如, N-连接的糖基化, O-连接的糖基化,或乙酰化。提到多肽的“多肽”或“氨基酸”序列包括多肽,其含有来自宿主细胞 (例如酵母宿主) 的、一个或多个具有翻译后修饰的结构氨基酸。

[0112] 翻译后修饰可以化学地产生或通过使用适合的宿主产生。例如,在 *S. cerevisiae* 中,倒数第二个氨基酸的性质看起来决定了 N-末端甲硫氨酸是否被除去。此外,倒数第二个氨基酸的性质还决定了 N-末端氨基酸是否是 N<sup>α</sup>-乙酰化的 (Huang et al., *Biochemistry* 26 :8242-8246, 1987)。其它例子包括由于分泌前导区 (例如信号肽) 的存在靶向分泌的多肽,其中蛋白质被 N-连接的或 O-连接的糖基化修饰。(Kukuruzinska et al., *Ann. Rev. Biochem.* 56 :915-944, 1987.)

[0113] V. 佐剂

[0114] 佐剂是可以在产生免疫反应中协助免疫原的物质。佐剂可以通过不同的机制起作用,例如以下机制的一种或多种 :提高抗原的生物学或免疫学半衰期 ;改善抗原对抗原呈递细胞的递送 ;改善抗原呈递细胞的抗原加工和呈递 ;以及诱导免疫调节细胞因子的产生。(Vogel, *Clinical Infectious Diseases* 30 (suppl. 3) :S266-270, 2000.)

[0115] 可以采用各种不同种类的佐剂来协助产生免疫反应。特定佐剂的例子包括氢氧化铝、磷酸铝或铝的其它盐,磷酸钙、DNA CpG 基序、单磷酰基脂质 A、霍乱毒素、

E. coli 不耐热肠毒素、白喉毒素、胞壁酰二肽、Freund's 不完全佐剂、MF59、SAF、免疫刺激复合物、脂质体、生物可降解的微球体、皂角苷、非离子块共聚物、胞壁酰肽类似物、聚磷腈 (polyphosphazene)、合成的多核苷酸、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12 和 ISCOMS。(Vogel Clinical Infectious Diseases 30(suppl 3):S266-270,2000, Klein et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 89:311-321,2000, Rimmelzwaan et al., Vaccine 19:1180-1187,2001, Kersten Vaccine 21:915-920,2003, O'Hagen Curr. Drug Target Infect. Disord., 1:273-286,2001.)

#### [0116] VI. 患者

[0117] “患者”是指能用 *S. aureus* 感染的哺乳动物。患者可以被预防性地或治疗性地处理。预防性处理提供了足够的保护性免疫来降低 *S. aureus* 感染的可能性或严重度。治疗性处理可以被进行来降低 *S. aureus* 感染的严重度。

[0118] 预防性治疗可以使用含有本文中描述的免疫原的疫苗来进行。这种处理优选在人类上进行。疫苗可以被施用给普通群体,或处于提高的 *S. aureus* 感染风险下的那些人。

[0119] 具有提高的 *S. aureus* 感染风险的人包括护理人员;医院患者;具有减弱的免疫系统的患者;经历手术的患者;接受异物植入物的患者,例如导管或脉管设备;面对导致减弱的免疫性的治疗的患者;和在具有高风险的灼伤或创伤的职业中的人。(The Staphylococci in Human Disease, Crossley and Archer(ed.), Churchill Livingstone Inc. 1997.)

[0120] 可能被 *S. aureus* 感染的非人类患者包括牛、猪、绵羊、山羊、兔、马、狗、猫、猴、大鼠和小鼠。对非人类患者的处理可用于保护宠物和家畜,以及评估特定处理的效力。

#### [0121] VII. 组合疫苗

[0122] 本文中描述的免疫原可以单独使用,或与其它免疫原组合使用,来诱导免疫反应。可以存在的其它免疫原包括:一种或多种其它的 *S. aureus* 免疫原,例如在上文的发明背景中引用的那些;靶向一种或多种其它 *Staphylococcus* 生物体(例如 *S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. warneri* 或 *S. lugunensis*)的一种或多种免疫原;和靶向其它感染生物体的一种或多种免疫原。

#### [0123] VIII. 动物模型系统

[0124] 动物模型系统被用于评估免疫原产生针对 *S. aureus* 的保护性免疫应答的效力。动物模型是缓慢的动力学死亡率模型,包括从稳定期的细胞制备的 *S. aureus*,适当地滴定,并且静脉内施用。这种死亡的缓慢动力学提供了足够的时间用于特定免疫防御来排斥细菌性感染(例如,10 天而不是 24 小时)。

[0125] 稳定期的 *S. aureus* 细胞可以从培养于固体培养基上的细胞获得。它们也可以从液体获得,然而固体培养基上培养的结果更有重现性。细胞可以在固体培养基上被方便地培养过夜。例如,*S. aureus* 可以在倍增时间为约 20-30 分钟条件下被培养约 18 到约 24 小时。

[0126] *S. aureus* 可以使用标准技术分离自固体或液体培养基,以维持 *S. aureus* 效力。例如,分离的 *S. aureus* 可以保存于  $-70^{\circ}\text{C}$ ,作为在含甘油的磷酸盐缓冲盐水中的经洗涤高密度悬浮液( $> 10^9$  集落形成单位(CFU)/mL)被保存。

[0127] *S. aureus* 攻击(challenge)应当在自第一天或第二天开始的约 7 到 10 天期间在

动物模型中提供约 80%到 90%死亡的效力。可以使用动物模型进行滴定实验来监视保存的 *S. aureus* 接种物的效力。滴定实验可以在接种试验前约一到两周进行。

#### [0128] IX. 抗体

[0129] 含有 SEQ ID NO :1 相关多肽和 AhpC-AhpF 组合物的免疫原可以用于产生结合免疫原或 *S. aureus* 的结合蛋白。这种结合蛋白具有不同的用途,包括在多肽纯化、*S. aureus* 鉴定或在针对 *S. aureus* 感染的预防或治疗处理中使用。优选地,所述结合蛋白基本上没有血清蛋白。

[0130] 结合蛋白包含第一可变区和第二可变区。所述可变区具有来自重链或轻链的抗体可变区结构。抗体重链和轻链可变区含有间插到框架上的三个互补决定区。互补决定区对于识别特定表位负有主要责任。抗体结合蛋白的例子包括单链抗体、完整抗体、抗体片段和其衍生物。

[0131] 优选的抗原结合蛋白是单克隆抗体。提到“单克隆抗体”表示具有相同的、或基本上相同的互补决定区和结合特异性的一组抗体。单克隆抗体中的变异是这样的变异:如果抗体从相同的构建体产生其将会发生。

[0132] 例如,可以从特定的杂交瘤,以及从含有编码抗体的一种或多种重组基因的重组细胞来产生单克隆抗体。抗体可以由超过一个重组基因编码,其中,例如,一个基因编码重链,一个基因编码轻链。

[0133] 含有抗体可变区的抗体片段包括 Fv、Fab 和 Fab2 区域。每个 Fab 区域含有由可变区和恒定区组成的轻链以及含有可变区和恒定区的重链区域。轻链通过恒定区由二硫键连接到重链。Fab 区域的轻链和重链可变区提供了参与抗原结合的 Fv 区域。

[0134] 抗体可变区也可以是含有可变区的蛋白质,例如单链抗体和微型抗体 (minibody) 的一部分。单链抗体含有通过接头连接在一起的轻链和重链可变区。接头可以是,例如,约 5 到 16 个氨基酸。微型抗体是单链 -CH3 融合蛋白,其自身组装成约 80kDa 的二价二聚体。

[0135] 可变区的特异性由三个高变区(也称为互补决定区)决定,它们插入更保守的侧翼区域(也称为框架区)之间。可以如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1991 所述,对与框架区和互补决定区相连的氨基酸进行编号和比对。

[0136] 产生抗原结合蛋白(例如单链抗体、抗体或抗体片段)的技术是本领域公知的。这些技术的例子包括噬菌体展示技术的使用、对啮齿动物抗体的鉴定和人源化,以及使用 XenoMouse 或 Trans-Chromo 小鼠产生人类抗体。(E. g., Azzazy et al., Clinical Biochemistry 35 :425-445, 2002, Berger et al., Am. J. Med. Sci. 324(1) :14-40, 2002.)

[0137] 鼠抗体可以被源化,可以使用本领域公知的技术将 CDRs 移植到人类抗体框架上。通过将鼠可变区移植到人类抗体框架上,如果需要的话,进行进一步的修饰来源化鼠抗体,在这些方面对这些技术进行了一般性描述。(例如 O'Brien et al., Humanization of Monoclonal Antibodies by CDR Grafting, p 81-100, From Methods in Molecular Biology Vol 207 :Recombinant antibodies for Cancer Therapy :Methods and Protocols (Eds. Welschhof and Krauss) Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003.)

[0138] 优选使用重组核酸技术或通过使用杂交瘤来产生抗原结合蛋白。重组核酸技术包括构建用于蛋白质合成的核酸模板。杂交瘤是产生抗原结合蛋白的永生化细胞系。

[0139] 编码抗原结合蛋白的重组核酸可以在宿主细胞中表达,所述宿主细胞实际上充当了编码的蛋白质的工厂。重组核酸可以提供编码抗原结合蛋白的重组基因,其自主存在于宿主细胞基因组之外,或者是宿主细胞基因组的部分。

[0140] 重组基因含有编码蛋白质的核酸以及用于蛋白质表达的调节元件。一般而言,重组基因中存在的调节元件包括转录启动子、核糖体结合位点、终止子以及任选地存在的操纵子。用于在真核细胞中加工的优选元件是多腺苷酸化信号。还可以存在抗体相关的内含子。用于抗体或抗体片段生产的表达盒的例子是本领域公知的。(例如,Persic et al., Gene 187 :9-18,1997, Boel et al., J. Immunol. Methods 239 :153-166,2000, Liang et al., J. Immunol. Methods 247 :119-130,2001.)

[0141] 使用表达载体有利于重组基因在细胞中的表达。优选地,除重组基因之外,表达载体还含有用于在宿主细胞中自主复制的复制起点、选择性标记、有限数量的有用的限制性内切酶位点和高拷贝数的可能性。用于抗体和抗体片段生产的表达载体的例子是本领域公知的。(E.g., Persic et al., Gene 187 :9-18,1997, Boel et al., J. Immunol. Methods 239 :153-166,2000, Liang et al., J. Immunol. Methods 247 :119-130,2001.)

[0142] 如果需要的话,可以使用本领域公知的技术将编码抗体的核酸整合进宿主染色体中。(参见,Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley,1987-1998, Mark et al., U. S. Patent No. 6, 743, 622.)

[0143] 可以使用各种不同的细胞系用于重组抗原结合蛋白表达,包括来自原核生物的(例如,E. coli、Bacilli 和 Streptomyces)以及来自真核生物(例如,酵母、Baculovirus 和哺乳动物)的那些。(Breitling et al., Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag,1999.)

[0144] 用于重组抗原结合蛋白表达的优选宿主是能产生具有适当的翻译后修饰的抗原结合蛋白的哺乳动物细胞。翻译后修饰包括二硫键形成和糖基化。另一种类型的翻译后修饰是信号肽裂解。

[0145] 适当的糖基化对于抗体功能可能是重要的。(Yoo et al., Journal of Immunological Methods 261 :1-20,2002.)天然存在的抗体含有附着于重链的至少一个N-连接的碳水化合物。(Id.)其它N-连接的碳水化合物和O-连接的碳水化合物可能存在,并且对于抗体功能可能是重要的。(Id.)

[0146] 不同类型的哺乳动物宿主细胞可以用于提供有效的翻译后修饰。这种宿主细胞的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、C6、PC12 和骨髓瘤细胞。(Yoo et al., Journal of Immunological Methods 261 :1-20,2002, Persic et al., Gene 187 :9-18,1997.)

[0147] 可以使用例如在 Ausubel Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley,1987-1998, Harlow et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,1988 和 Kohler et al., Nature 256,495-497,1975 中描述的技术来产生杂交瘤。

#### [0148] X. 施用

[0149] 使用本文提供的指导以及本领域公知的技术,可以配制免疫原和结合蛋白并施用给患者。一般的药物施用原则在例如 Vaccines Eds. Plotkin and Orenstein, W. B. Sanders Company,1999 ; Remington's Pharmaceutical Sciences 20<sup>th</sup> Edition, Ed. Gennaro, Mack

Publishing,2000; 和 Modern Pharmaceutics 2<sup>nd</sup> Edition, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990 中提供, 通过引用将每一份并入本文。

[0150] 药学上可接受的载体有利于免疫原的保存和向患者的施用。药学上可接受的载体可以含有不同的组分, 例如缓冲液、灭菌注射水、生理盐水或磷酸盐缓冲盐水、蔗糖、组氨酸、盐和聚山梨酸酯。

[0151] 免疫原和结合蛋白可以通过不同的途径, 例如皮下的、肌肉内的或粘膜的途径来施用。皮下的和肌肉内的施用可以使用例如针头或喷射注射器来进行。

[0152] 考虑本领域公知的因素, 包括患者的年龄、体重、性别和医学状况; 给药途径; 期望的效果; 和采用的特定化合物, 优选地确定合适的给药方式。免疫原或结合蛋白可以以多剂量形式使用。预期的是, 剂量将由 1.0 μg 到 1.0mg 总多肽的范围组成, 在本发明不同的实施方式中, 所述范围是 0.01mg 到 1.0mg 和 0.1mg 到 1.0mg。

[0153] 给药的时机取决于本领域公知的因素。在初次施用之后, 可以随后施用一次或多次强化剂量来维持或强化抗体滴度。给药方式的例子将是: 第 1 天、第 1 个月、在第 4、6 或 12 个月的第三次给药, 以及以所需的时间间隔进行的其它强化。

#### [0154] 实施例

[0155] 下面提供实施例, 以进一步阐述本发明的不同特征。这些实施例还阐述了实践本发明的有用的方法。这些实施例不对要求保护的发明加以限制。

#### [0156] 实施例 1: 保护性免疫

[0157] 这个实施例阐述了 SEQ ID NO :1 相关多肽在动物模型中提供保护性免疫的能力。SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :1 的 His 标记的衍生物, 被用于提供保护性免疫。

#### [0158] SEQ ID NO :2 克隆和表达

[0159] 由 COL SA0452 编码的蛋白质被设计为从 pET16b 载体 (EMDBiosciences, Madison, WI) 表达, 该载体具有 N- 末端组氨酸残基和由载体编码的终止密码子。还由该载体编码的是组氨酸 tag 后的九个另外的氨基酸, 和在羧基末端的三个另外的氨基酸。设计 PCR 引物来扩增 COL SA0452, 从第一个丝氨酸密码子开始, 在末端异亮氨酸残基处的终止密码子之前结束。正向和反向引物分别是:

[0160] 5' GGAATTCCATATGTCATTAATTAACAAAGAAATCTTACC3' (SEQ ID NO :7) 和 5' GGGCTCAGCGATTTTACCTACTAAATCTAAACCAG3' (SEQ IDNO :11), 含有其它的限制性位点 (下划线的), 即 NdeI (正向引物) 和 Bpu1102II (反向引物) 和 GC 夹 (clamp) 以有利于向表达载体中克隆。

[0161] 从 S. aureus COL 菌株 MB5393 纯化基因组 DNA 并将其用作为 PCR 的模板。在 Difco Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson, Sparks, MD) 中在 37°C 对 50mL 培养物培养过夜, 通过离心收集细胞。在 5mL10mM Tris pH 7.5、25% 蔗糖中洗涤细胞一次, 重悬浮于含 50 μg/mL 溶葡萄菌素 (Sigma, St. Louis, MO) 的相同溶液中。在 37°C 孵育混合物 1 小时, 随后添加 2.5mL 0.25M EDTA pH8.0。在冰上孵育 15 分钟之后, 添加 7.5mL 2% sarkosyl, 轻轻地涡旋 (swirl) 混合物, 并令其在冰上再保持 30 分钟。添加 0.1M 醋酸钠中 5mg/mL 的 150 μ LRNase, 混合物在 37°C 孵育一小时。然后, 添加 25mg/mL 的 0.6mL 蛋白酶 K, 继续孵育 2 小时, 继之以在 4°C 孵育过夜。通过在室温下轻轻旋转 30 分钟, 用 15mL 水饱和的苯酚来提取溶胞产物。

[0162] 为了分相,在室温下在 4,000rpm 对混合物离心 10 分钟。收集水相,苯酚提取重复两次或更多次。然后,用等体积的氯仿提取水相 10 次。在最后的提取之后,收集水相,测量体积,添加一半体积的 7.5M 乙酸铵。

[0163] 通过添加两倍体积的 100%乙醇来沉淀 DNA,通过用玻璃棒卷绕来收集。将 DNA 溶于含有 4  $\mu$ L 焦碳酸二乙酯的 5.0mL TE 中,在 4°C 过夜。乙醇沉淀重复两次或更多次。

[0164] 在一式两份制备的 50  $\mu$ L 体积反应物中通过 PCR 扩增 *ahpC* 基因。每体系含有 250ng 基因组 DNA、125ng 每种正向和反向引物、1 微升 10mM dNTPs、2.5 单位天然 Pfu 聚合酶和 1X Pfu 缓冲液 (Stratagene, La Jolla CA)。热循环条件如下:94°C 5 分钟的一个循环;94°C 45 秒、56°C 45 秒、72°C 1 分钟的 30 个循环;72°C 10 分钟的一个循环。用合适的限制性内切酶消化扩增的 DNA 序列 (584bp),按厂商说明书使用 Gene Clean II® (QBIogene, Carlsbad, CA) 进行凝胶纯化。使用已经工程化到 PCR 引物中的 NdeI/Bpu1102I 位点将 DNA 连接进 pET16b 载体,并导入 *E. coli* NovaBlue 感受态细胞 (EMDBiosciences)。

[0165] 转化混合物在 37°C 在低盐 Lennox L Broth 琼脂平板上被培养过夜,所述琼脂平板含有各 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal,根据厂家的说明书使用 imMedia™ Amp Agar (Invitrogen, Carlsbad, CA) 制备。选择克隆,在具有 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 Luria Broth (LB) 中对其进行培养,产生 DNA 微制备物 (miniprep) (Promega),通过限制性内切酶消化来确定合适的插入物。对来自两份微制备物的质粒 DNA 进行测序,选择不含有对期望序列的 DNA 改变的克隆,并命名为 pAhpC5。

[0166] 用 pAhpC5 转化 *E. coli* BLR (DE3) 感受态细胞 (EMDBiosciences),并在含有氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上生长。为了测试 *ahpC* 的表达,将分离的菌落接种到 5mL 液体 LB (氨苄青霉素) 中,在 37°C、220rpm 孵育 6 小时。培养物在 4°C 保持过夜,次日接种到 20.0mL LB 肉汤 (氨苄青霉素) 中,使得起始 OD600 等于 0.02。培养物在 37°C、220rpm 孵育四小时到 OD600 = 0.8。在三种不同温度下比较表达的诱导。将 45 微升 100mM IPTG 添加到三个 4.5mL 培养物体积中 (IPTG 终浓度 1mM),并在 37°C 孵育 3 小时,25°C 或 18°C 24 小时,所有的都在 220rpm 摇动。对于溶胞产物制备,通过离心收集来自未诱导的和诱导的培养物的分别的 1.5mL 和 1.0mL 培养物体积,并重悬浮于 300mL BugBuster HT (EMD Sciences) 和 3mL Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma, St. Louis, MO) 中。混合物在冰上保持 5 分钟,随后超声三次 10 秒,中间每次进行冷却。为了获得“可溶的”和“不可溶的”部分,混合物在 4°C 在 14,000rpm 离心五分钟。上清液被称为“可溶的”,将团粒重悬浮在 300mL BugBuster HT 和 3mL Proteinase Inhibitor Cocktail 中,并称为“不可溶的”。通过 BIO-RAD Protein Assay Dye Reagent 系统 (BIO-RAD, Hercules, CA),根据厂家的说明书测定蛋白质浓度。

[0167] 为了通过 SDS-PAGE 凝胶的 Coomassie 染色分析 *ahpC* (由 SEQ IDNO :3 编码) 的表达,在还原和变性条件下,在 1×Tris 甘氨酸 SDS 缓冲液 (BIO-RAD) 中,在 4–15% 梯度 Tris-HCl Criterion 凝胶剂 (BIO-RAD) 上,对样品进行电泳。为了估计蛋白质大小,将 15 和 250kDa 之间的标准物 (BIO-RAD) 与溶胞产物平行地运行 (run)。根据厂家的方案用 Bio-Safe Coomassie——Coomassie G250 染料 (BIO-RAD) 来对凝胶染色。

[0168] 在从所有三种温度诱导的样品制备的溶胞产物中都特异性地检测到了 24kDa 蛋白质。在所有三种温度下获得了良好的表达,*ahpC* 定位到可溶和不可溶的级分中。25°C 的诱导是产生可溶 *ahpC* 的最适温度。

[0169] SEQ ID NO :2 纯化

[0170] 实现了下述目的:将上述小规模步骤直接扩大到 20 升工作体积的搅拌罐发酵器(30 升规模)。在含有 50mL Luria-Bertani(LB)培养基(加氨苄青霉素)的 250mL 烧瓶中培养接种物,用 1mL 冷冻的种子培养物接种,并培养 6 小时。1mL 这种种子被用于接种含有 500mL LB 培养基(加氨苄青霉素)的 2 升烧瓶,并孵育 16 小时。用 20 升 LB 培养基(加氨苄青霉素)培养大规模发酵器(30 升规模)。发酵器的发酵参数是:压力 -5psig,搅动速度 = 300rpms、气流 = 7.5 升 / 分钟和温度 = 37°C。将细胞孵育到 600nm 波长处 1.3 光密度单位的光密度(OD),用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)以 1mM 的浓度诱导。IPTG 诱导时间是两小时。通过将温度降低到 15°C 来收获细胞,通过穿过 500KMWC0 空心纤维盒来浓缩,以 8,000 倍重力在 4°C 离心 20 分钟来离心。轻轻倒出上清液,将重组 E. coli 湿细胞团粒在 -70°C 冷冻。

[0171] 将冷冻的重组 E. coli 细胞糊(24 克)解冻,并重悬浮于两体积的裂解缓冲液(50mM 磷酸钠、pH 8.0、0.15M NaCl、2mM 氯化镁、10mM 咪唑、20mM 2-巯基乙醇、0.1% Tween-80 和蛋白酶抑制物混合物(Complete™,无 EDTA, Roche#\_1873580—每 50mL 裂解缓冲液一片)中。Benzonase(EM#\_1.01697.0002)以 125 单位/mL 添加到细胞悬液中)。用微流化剂制备溶胞产物。在 4°C 对溶胞产物搅拌三小时,通过在 4°C 在 10,000xg 离心 10 分钟来澄清。上清液滤经玻璃-纤维预过滤微孔,从 5M 贮备溶液将 NaCl 添加到 0.5M 的终浓度。过滤的上清液被上样到 Ni-NTA 琼脂糖层析树脂(Qiagen#\_30250),浆液在 4°C 混合过夜。将层析树脂的浆液注入层析柱,通过重力从柱出口收集未结合的级分。用 10 倍柱体积的洗涤缓冲液(50mM 磷酸钠、pH8.0、0.5M NaCl、2mM 氯化镁、10mM 咪唑、20mM 2-巯基乙醇、0.1% Tween-80 和蛋白酶抑制物混合物(Complete™,无 EDTA, Roche#\_1873580—每 50mL 洗涤缓冲液一片)对柱进行洗涤。用洗脱缓冲液(50mM 磷酸钠(pH 7.4)、0.3M 咪唑、2mM 氯化镁、0.1% Tween-80 和 20mM 2-巯基乙醇)对柱进行洗脱。通过在用 Ponceau-S 染色的硝化纤维膜上点滴印迹来鉴定含有蛋白质的级分,将含有最高蛋白质浓度的级分合并来产生 Ni-IMAC 产物。Ni-IMAC 产物通过 SEC 分馏。通过 Coomassie 染色的 SDS/PAGE 来鉴定含有产物蛋白质的 SEC 级分。合并含有产物的 SEC 级分来产生 SEC 产物。将 SEC 产物无菌过滤,以 0.2mg/mL 的终浓度吸附在氢氧化磷酸铝佐剂上。

[0172] S. aureus 攻击的制备

[0173] S. aureus 在 37°C 在 TSA 平板上培养过夜。通过添加 5mL PBS 到平板上来从 TSA 平板洗下细菌,用无菌的涂布器(spreaders)轻轻地重悬浮细菌。使用 Sorvall RC-5B 离心机(DuPont Instruments)将细菌悬浮液在 6000rpm 旋转 20 分钟。团粒在 16% 甘油中重悬浮,分为小份在 -70°C 冷冻保存。

[0174] 使用之前,将接种物解冻,适当地稀释并用于感染。每个原种滴定至少 3 次来确定在天然小鼠中诱导缓慢的死亡动力学的合适的剂量。时常地监视细菌接种物的效力(80 到 90% 死亡率)来确保模型的重现性。每个攻击实验前十天,一组 10 只对照动物(用单独的佐剂免疫的)被攻击和监视。

[0175] 对 SEQ ID NO :2 多肽的保护研究

[0176] 在两项独立实验中,二十只 BALB/c 小鼠中每只用氢氧化磷酸铝佐剂(450 μg 每次注射))上的 SEQ ID NO :2 多肽(20 μg 每次注射)三次剂量来免疫,20 只小鼠每只用氢氧化

磷酸铝佐剂 (450  $\mu$ g 每次注射) 免疫。氢氧化磷酸铝佐剂 (AHP) 由 Klein et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 89:311-321, 2000 描述。在第 0、7 和 21 天以两处 50  $\mu$ L 肌肉注射来施用材料。在第 28 天使小鼠出血, 通过 ELISA 筛选它们的血清对 SEQ ID NO:2 的反应性。

[0177] 在每项实验的第 35 天, 通过 *S. aureus* 的静脉内注射 (剂量  $7 \times 10^8$  CFU/mL) 来攻击小鼠。在 11 天中监视小鼠的存活率。在第一项实验结束时, 在 SEQ ID NO:2 多肽免疫的组中 12 只小鼠存活, 相比之下, AHP 对照组中 5 只存活。结果在附图 6A 中阐释。在第二个实验结束时, 在 SEQ ID NO:2 多肽免疫的组中 11 只小鼠存活, 相比之下, AHP 对照组中 7 只存活。结果在附图 6B 中阐释。

[0178] 其它实施方式也在以下的权利要求之内。尽管已经展示和描述了几个实施例, 但是可以对此进行各种修改和替换而不背离本发明的精神和范围。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; Merck &amp; Co., Inc.

&lt;120&gt; 用于诱导针对金黄色葡萄球菌的保护性免疫应答的多肽

&lt;130&gt; 21722 PCT

&lt;150&gt; 60/645,811

&lt;151&gt; 2005-01-21

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

<213> *S. aureus*

&lt;400&gt; 1

```

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

```

[0002]

Lys Thr Leu Gln Pro Gly Leu Asp Leu Val Gly Lys Ile  
 180 185

<210> 2  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 1 的组氨酸标记的衍生物

<400> 2  
 Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His  
 1 5 10 15  
 Ile Glu Gly Arg His Met Ser Leu Ile Asn Lys Glu Ile Leu Pro Phe  
 20 25 30  
 Thr Ala Gln Ala Phe Asp Pro Lys Lys Asp Gln Phe Lys Glu Val Thr  
 35 40 45  
 Gln Glu Asp Leu Lys Gly Ser Trp Ser Val Val Cys Phe Tyr Pro Ala  
 50 55 60  
 Asp Phe Ser Phe Val Cys Pro Thr Glu Leu Glu Asp Leu Gln Asn Gln  
 65 70 75 80  
 Tyr Glu Glu Leu Gln Lys Leu Gly Val Asn Val Phe Ser Val Ser Thr  
 85 90 95  
 Asp Thr His Phe Val His Lys Ala Trp His Asp His Ser Asp Ala Ile  
 100 105 110  
 Ser Lys Ile Thr Tyr Thr Met Ile Gly Asp Pro Ser Gln Thr Ile Thr  
 115 120 125  
 Arg Asn Phe Asp Val Leu Asp Glu Ala Thr Gly Leu Ala Gln Arg Gly  
 130 135 140  
 Thr Phe Ile Ile Asp Pro Asp Gly Val Val Gln Ala Ser Glu Ile Asn  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Gly Ile Gly Arg Asp Ala Ser Thr Leu Ala His Lys Ile Lys  
 165 170 175  
 Ala Ala Gln Tyr Val Arg Lys Asn Pro Gly Glu Val Cys Pro Ala Lys  
 180 185 190  
 Trp Glu Glu Gly Ala Lys Thr Leu Gln Pro Gly Leu Asp Leu Val Gly  
 195 200 205  
 Lys Ile Ala Glu Gln  
 210

<210> 3

[0003]

<211> 507  
 <212> PRT  
 <213> S. aureus  
  
 <400> 3  
 Met Leu Asn Ala Asp Leu Lys Gln Gln Leu Lys Gln Leu Leu Glu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Met Glu Gly Asn Val Glu Phe Val Ala Ser Leu Gly Ser Asp Asp Lys  
                   20                   25                   30  
 Ser Lys Glu Leu Lys Asp Leu Leu Thr Glu Ile Thr Asp Met Ser Pro  
           35                   40                   45  
 Arg Leu Ser Leu Ser Glu Lys Ser Leu Lys Arg Thr Pro Ser Phe Ser  
       50                   55                   60  
 Val Asn Arg Pro Gly Glu Glu Thr Gly Val Thr Phe Ala Gly Ile Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gly His Glu Phe Asn Ser Leu Val Leu Ala Ile Leu Gln Val Ser  
                   85                   90                   95  
 Gly Arg Ala Pro Lys Glu Lys Gln Ser Ile Ile Asp Gln Ile Lys Lys  
                  100                   105                   110  
 Leu Glu Gly Ser Phe His Phe Glu Thr Phe Ile Ser Leu Thr Cys Gln  
           115                   120                   125  
 Lys Cys Pro Asp Val Val Gln Ala Leu Asn Leu Met Ser Val Ile Asn  
       130                   135                   140  
 Pro Asn Ile Thr His Ser Met Ile Asp Gly Ala Val Phe Arg Glu Glu  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Glu Asn Ile Met Ala Val Pro Ala Val Phe Leu Asn Gly Glu Glu  
           165                   170                   175  
 Phe Gly Asn Gly Arg Met Thr Ile Gln Asp Ile Leu Ser Lys Leu Gly  
           180                   185                   190  
 Ser Thr Ala Asp Ala Ser Glu Phe Glu Asn Lys Glu Pro Tyr Asp Val  
       195                   200                   205  
 Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Ile Tyr Thr  
       210                   215                   220  
 Ala Arg Lys Gly Leu Arg Thr Gly Ile Val Ala Asp Arg Ile Gly Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Gln Val Asn Asp Thr Ala Gly Ile Glu Asn Phe Ile Thr Val Lys Glu  
           245                   250                   255  
 Thr Thr Gly Ser Glu Phe Ser Ser Asn Leu Ala Ala His Ile Asp Gln  
           260                   265                   270  
 Tyr Asp Ile Asp Ala Met Thr Gly Ile Arg Ala Thr Asp Ile Glu Lys  
           275                   280                   285  
 Thr Asp Glu Ala Ile Lys Val Thr Leu Glu Asn Gly Ala Val Leu Glu  
       290                   295                   300  
 Ser Lys Thr Val Ile Ile Ala Thr Gly Ala Gly Trp Arg Lys Leu Asn

[0004]



```

tctgaaaaca tcatggcagt ccctgctgtc tttttaaatg gcgaagaatt tggcaatggt 540
cgtatgacaa tccaagatat tctttogaaa ctaggcagta cggcagatgc atctgagttt 600
gaaaataaag aaccttatga tgtettaatc gttgggtggg gtctctgctag tggtagtgea 660
gcgatttaca cagcacgtaa aggtttacgt actggtatag ttgctgatcg tatcgggtgc 720
caagttaatg atactgctgg tattgagaac ttcattactg ttaaagaaac aactggttct 780
gaatthttct ctaacttagc agcgcacatt gatcaatatg acattgatgc aatgacaggt 840
atacgtgcta cagatatcga aaagactgac gaagcaatta aagttacgtt agaaaacggt 900
gctgtcttag aaagtaaac agtcattatt gctactggg caggttggcg taagctaac 960
attccagggtg aagagcaatt gattaataaa ggtgttgcac tctgccctca ctgtgacgga 1020
cctctatttg aaaataaaga cgtagcagtt atcgggtggcg gtaactctgg ggttgaagca 1080
gcaattgacc ttgctgggtat cgttaatcat gttacattat tcgaattcgc tagcgaatta 1140
aaagcagaca acgtgttaca agatcgttta cgttctttat caaatgttga tatcaaaaca 1200
aatgccaaaa ctactgaagt tgcggagaa gaccatgta caggatatac ttacgaagac 1260
atgaacaccg gcgaagaaca tctacttaac ttagatggta totttgttca aattggttta 1320
cttccaaaca catcatgggt aaacgatgct gttgaattaa acgaacgtgg tgaattgtg 1380
attgatcgta acaataatac gaatgttctt ggaatatttg ctgctggcga tgtcacagat 1440
cagaagaaca aacaattat catttcaatg ggcgctggg caaatgcagc attaatgcc 1500
ttgactata ttatcagaaa c 1521

```

<210> 5

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO: 2 的核酸序列

<400> 5

```

atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gggccatat cgaaggtcgt 60
catatgtcat taattaacaa agaaatetta ccatttacag cgaagcttt cgatccaaaa 120
aaagatcaat ttaaagaagt tacacaagaa gatttaaaag gttcttggag cgtagtatgc 180
ttctatcctg ctgacttctc attcgtttgt ccaactgaat tagaagactt acaaaaccaa 240
tatgaagaat tacaaaaatt aggcgtaaat gtattctcag tatcaactga tactcacttc 300
gtacacaaag catggcatga ccattcagat gcaattagca aaatcaetta cactatgatt 360
ggtgacccat cacaaacaat cactcgtaat tttgatgtat tagatgaagc tactggttta 420
gctcaacgtg gtacattcat tatcagccca gacggtgtg tacaagcatc tgaattaac 480
gctgacggaa ttggcgtga cgetagtaca ttagctcaca aaatcaaagc agtcaatat 540
gttcgtaaaa accctggcga agtatccca gctaaatggg aagaaggcgc taaaacattg 600
caacctggtt tagatthtagt agttaaate gctgagcaat aa 642

```

<210> 6

<211> 189

<212> PRT

<213> S. epidermidis

[0006]



```

<400> 8
Met Leu Asn Ala Asp Leu Lys Gln Gln Leu Gln Gln Leu Leu Glu Leu
1           5           10          15
Met Glu Gly Asp Val Glu Phe Val Ala Ser Leu Gly Ser Asp Asp Lys
          20           25           30
Ser Asn Glu Leu Lys Glu Leu Leu Asn Glu Ile Ala Glu Met Ser Ala
          35           40           45
His Ile Thr Ile Thr Glu Lys Ser Leu Lys Arg Thr Pro Ser Phe Ser
          50           55           60
Val Asn Arg Pro Gly Glu Glu Thr Gly Ile Thr Phe Ala Gly Ile Pro
65           70           75           80
Leu Gly His Glu Phe Asn Ser Leu Val Leu Ala Ile Leu Gln Val Ser
          85           90           95
Gly Arg Ala Pro Lys Glu Lys Gln Ser Ile Ile Asp Gln Ile Lys Gly
          100          105          110
Leu Glu Gly Pro Phe His Phe Glu Thr Phe Val Ser Leu Thr Cys Gln
          115          120          125
Lys Cys Pro Asp Val Val Gln Ala Leu Asn Leu Met Ser Val Ile Asn
          130          135          140
Pro Asn Ile Thr His Thr Met Ile Asp Gly Ala Val Phe Arg Glu Glu
145          150          155          160
Ser Glu Asn Ile Met Ala Val Pro Ala Val Phe Leu Asp Gly Gln Glu
          165          170          175
Phe Gly Asn Gly Arg Met Thr Val Gln Asp Ile Leu Thr Lys Leu Gly
          180          185          190
Ser Thr Gln Asp Ala Ser Glu Phe Asn Asp Lys Asp Pro Tyr Asp Val
          195          200          205
Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Ile Tyr Thr
          210          215          220
Ala Arg Lys Gly Leu Arg Thr Gly Ile Val Ala Asp Arg Ile Gly Gly
225          230          235          240
Gln Val Asn Asp Thr Ala Gly Ile Glu Asn Phe Ile Thr Val Lys Glu
          245          250          255
Thr Thr Gly Ser Glu Phe Ser Ser Asn Leu Ala Glu His Ile Ala Gln
          260          265          270
Tyr Asp Ile Asp Thr Met Thr Gly Ile Arg Ala Thr Asn Ile Glu Lys
          275          280          285
Thr Asp Ser Ala Ile Arg Val Thr Leu Glu Asn Asp Ala Val Leu Glu
          290          295          300
Ser Lys Thr Val Ile Ile Ser Thr Gly Ala Ser Trp Arg Lys Leu Asn
305          310          315          320
Ile Pro Gly Glu Asp Arg Leu Ile Asn Lys Gly Val Ala Phe Cys Pro
          325          330          335
His Cys Asp Gly Pro Leu Phe Glu Asn Lys Asp Val Ala Val Ile Gly

```

[0008]

```

          340          345          350
Gly Gly Asn Ser Gly Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Gly Ile Val
          355          360          365
Lys His Val Thr Leu Phe Glu Tyr Ala Ser Glu Leu Lys Ala Asp Ser
          370          375          380
Val Leu Gln Glu Arg Leu Arg Ser Leu Pro Asn Val Asp Ile Lys Thr
385          390          395          400
Ser Ala Lys Thr Thr Glu Val Ile Gly Asp Asp Tyr Val Thr Gly Ile
          405          410          415
Ser Tyr Glu Asp Met Thr Thr Gly Glu Ser Gln Val Val Asn Leu Asp
          420          425          430
Gly Ile Phe Val Gln Ile Gly Leu Val Pro Asn Thr Ser Trp Leu Gln
          435          440          445
Asn Ala Val Glu Leu Asn Glu Arg Gly Glu Val Met Ile Asn Arg Asp
          450          455          460
Asn Ala Thr Asn Val Pro Gly Ile Phe Ala Ala Gly Asp Val Thr Asp
465          470          475          480
Gln Lys Asn Lys Gln Ile Ile Ile Ser Met Gly Ala Gly Ala Asn Ala
          485          490          495
Ala Leu Asn Ala Phe Asp Tyr Ile Ile Arg Asn
          500          505

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 507

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; S. aureus

&lt;400&gt; 9

```

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

```

[0009]





	245	250	255
Thr Thr Gly Ser Glu Phe Ser Ser Asn Leu Ala Ala His Ile Asp Gln			
	260	265	270
Tyr Asp Ile Asp Ala Met Thr Gly Ile Arg Ala Thr Asp Ile Glu Lys			
	275	280	285
Thr Asp Glu Ala Ile Lys Val Thr Leu Glu Asn Gly Ala Val Leu Glu			
	290	295	300
Ser Lys Thr Val Ile Ile Ala Thr Gly Ala Gly Trp Arg Lys Leu Asn			
	305	310	315
Ile Pro Gly Glu Glu Gln Leu Ile Asn Lys Gly Val Ala Phe Cys Pro			
	325	330	335
His Cys Asp Gly Pro Leu Phe Glu Asn Lys Asp Val Ala Val Ile Gly			
	340	345	350
Gly Gly Asn Ser Gly Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Gly Ile Val			
	355	360	365
Asn His Val Thr Leu Phe Glu Phe Ala Ser Glu Leu Lys Ala Asp Asn			
	370	375	380
Val Leu Gln Asp Arg Leu Arg Ser Leu Ser Asn Val Asp Ile Lys Thr			
	385	390	395
Asn Ala Lys Thr Thr Glu Val Val Gly Glu Asp His Val Thr Gly Ile			
	405	410	415
Arg Tyr Glu Asp Met Ser Thr Gly Glu Glu His Leu Leu Asn Leu Asp			
	420	425	430
Gly Ile Phe Val Gln Ile Gly Leu Leu Pro Asn Thr Ser Trp Leu Lys			
	435	440	445
Asp Ala Val Glu Leu Asn Glu Arg Gly Glu Ile Val Ile Asp Cys Asn			
	450	455	460
Asn Asn Thr Asn Val Pro Gly Ile Phe Ala Ala Gly Asp Val Thr Asp			
	465	470	475
Gln Lys Asn Lys Gln Ile Ile Ile Ser Met Gly Ala Gly Ala Asn Ala			
	485	490	495
Ala Leu Asn Ala Phe Asp Tyr Ile Ile Arg Asn			
	500	505	

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR 引物

&lt;400&gt; 11

[0012]

gggctcagcg attttaccta ctaaactctaa accag

35

**MGHHHHHHHHHSSGHIEGRHMSLINKELPFTAQAFDPKQDQFKEVTQEDLKGSWSVVCFYFADFSFVCPTELE  
DLQNQYEELQKLGVNVFSVSTDTHFVHKAWEDHSDAISKITTYTMIGDPSQITITRNFVDLDEATGLAQRGTFIIDP  
DGVVQASEINADGIGRDASTLAHKIKAAQYVRKNPGEVCPAKWEEGAKTLQPGLDLVGKIAEQ**

图 1

SEQ ID NO: 1 MSLINKEILPFTAQAFDPKQDQFKEVTQEDLKGSWSVVCFYFADFSFVCPTELEDLQNQY  
SEQ ID NO: 6 MSLINKEILPFTAQAYDPKQDEFKEVTQEDFKGSWNVVCFYFADFSFVCPTELEDLQNQY

SEQ ID NO: 1 EELQKLGVNVFSVSTDTHFVHKAWHDHSDAISKITTYTMIGDPSQITITRNFVDLDEATGLA  
SEQ ID NO: 6 AKLQELGVNVYSVSTDTHFVHKAWHDHSDAISKLEYSMIGDPSQITITRNFVDLDEETGLA

SEQ ID NO: 1 QRGTFIIDPDGVVQASEINADGIGRDASTLAHKIKAAQYVRKNPGEVCPAKWEEGAKTLQ  
SEQ ID NO: 6 QRGTFIIDPDGVVQAAEINADGIGRDASTLVNKIKAAQYVRQHPGEVCPAKWEEGSESLO

SEQ ID NO: 1 PGLDLVGKI  
SEQ ID NO: 6 PGLDLVGKI

图 2

**ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTCATATGTCATTAATT  
AACAAAGAAATCTTACCATTTACAGCGCAAGCTTTCGATCCAAAAAAGATCAATTTAAAGAAGTTACACAAGAA  
GATTTAAAAGGTTCTTGGAGCGTAGTATGCTTCTATCCTGCTGACTTCTCATTGTTGTCCAACTGAATTAGAA  
GACTTACAAAACCAATATGAAGAATTACAAAAATTAGGCGTAAATGTATTCTCAGTATCAACTGATACTCACTTC  
GTACACAAAGCATGGCATGACCATTGAGATGCAATTAGCAAAATCACTTACACTATGATTGGTGACCCATCACAA  
ACAATCACTCGTAATTTTGATGTATTAGATGAAGCTACTGGTTTAGCTCAACGTGGTACATTCATTATCGACCCA  
GACGGTGTGTACAAGCATCTGAAATTAACGCTGACGGAATTGGCCGTGACGCTAGTACATTAGCTCACAAAATC  
AAAGCAGCTCAATATGTTTCGTAAAAACCCTGGCGAAGTATGCCAGCTAAATGGGAAGAAGGCCGCTAAAAATTG  
CAACCTGGTTTAGATTTAGTAGGTAAAAATCGCTGAGCAATAA**

图 3

ATGCTTAATGCTGATTTAAACAACAACCTTAAACAACCTATTAGAACTAATGGAGGGCAACGTTGAATTCGTTGCC  
 AGCCTTGGTTCCAGATGATAAATCCAAAGAACTTAAAGATTTGTTGACAGAAATTAAGTATGTCACCTAGACTA  
 TCTCTTTCTGAAAAATCTTTAAAACGTACACCAAGTTTCTCAGTCAATCGTCTGGCGAAGAAACAGGTGTAACA  
 TTTGCAGGTATTCCATTAGGTCACGAGTTTAACTCACTTGTTTTAGCAATTTACAGGTTAGTGGTCGTGCACCT  
 AAAGAAAAACAGTCAATCATTGACCAATTAAAAAATAGAAGGTTTCATTCCATTTTGAACATTTCATTAGTTTA  
 ACGTGTCAAAAATGTCCTGATGTCGTTCAAGCACCTTAACTTAATGAGTGTGATCAACCCTAACATCAGCATTCT  
 ATGATTGATGGTGCAGTGTTCGGTGAAGAATCTGAAAACATCATGGCAGTCCCTGCTGTCTTTTTTAAATGGCGAA  
 GAATTTGGCAATGGTTCGTATGACAATCCAAGATAATCTTTCGAAACTAGGCAGTACGGCAGATGCATCTGAGTTT  
 GAAAATAAAGAACCTTATGATGTCCTTAATCGTTGGTGGTCCGCTAGTGGTAGTCAGCGATTACACAGCA  
 CGTAAAGGTTTACGTACTGGTATAGTTGCTGATCGTATCGGTGGCCAAGTTAATGATACTGCTGGTATGAGAAC  
 TTCATTACTGTTAAAGAAACAACCTGGTCTGAATTTTCTTCTAACTTAGCAGCGCACATTGATCAATATGACATT  
 GATGCAATGACAGGTATACGTGCTACAGATATCGAAAAGACTGACGAAGCAATTAAGTTACGTTAGAAAACGGT  
 GCTGTCTTAGAAAAGTAAAACAGTCAATATTGCTACTGGTGCAGGTTGGCGTAAGCTAAAACATTCCAGGTGAAGAG  
 CAATTGATTAATAAAGGTGTTGCATTCTGCCCTCACTGTGACGGACCTCTATTTGAAAATAAAGACGTTAGCAGTT  
 ATCGTGGCGGTAACCTCTGGGGTTGAAGCAGCAATTGACCTTGTGGTATCGTTAATCATGTTACATTATTTCGAA  
 TTCGCTAGCGAATTAAGAAGCAGACAACGTGTTACAAGATCGTTTACGTTCTTTATCAAATGTTGATATCAAACA  
 AATGCCAAAACACTACTGAAGTTGTCGGAGAAGACCATGTTACAGGTATACGTTACGAAGACATGAACACCGGCGAA  
 GAACATCTACTTAACTTAGATGGTATCTTTGTTCAAATTGGTTTACTTCCAAACACATCATGTTAAACGATGCT  
 GTTGAATTAACGAACGTGGTGAATTTGTGATTGATCGTAACAATAATACGAATGTTCTGGAATATTTGCTGCT  
 GCGATGTCACAGATCAGAAGAACAAACAATTAATCAATTTCAATGGGCGCTGGTCAAATGCAGCATTAATGCC  
 TTTGACTATATTATCAGAAAC

图 4

	1	50
SEQ ID NO: 8	MLNADLKQQLQQLLELMEGDVEFVASLGSDDKSNELKELLNEIAEMSAHI	
SEQ ID NO: 3	MLNADLKQQLKQLLELMEGNVEFVASLGSDDKSKELKDLLTEITDMSPLR	
SEQ ID NO: 9	MLNADLKQQLKQLLELMEGNVEFVASLGSDEKSKELKELLTEISDMSPLR	
SEQ ID NO: 10	MLNADLKQQLKQLLELMEGNVEFVASLGSDEKSKELKELLTEISDMSPLR	
	51	100
SEQ ID NO: 8	TITEKSLKRTPSFSVNRPGREETGITFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
SEQ ID NO: 3	SLSEKSLKRTPSFSVNRPGREETGVTFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
SEQ ID NO: 9	SLSEKSLKRTPSFSVNRPGREETGVTFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
SEQ ID NO: 10	SLSEKSLKRTPSFSVNRPGREETGVTFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
	101	150
SEQ ID NO: 8	KEKQSIIDQIKGLEGPFHFETFVSLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
SEQ ID NO: 3	KEKQSIIDQIKKLEGSFHFETFISLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
SEQ ID NO: 9	KEKQSIIDQIKNLEGSFHFETFISLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
SEQ ID NO: 10	KEKQSIIDQIKNLEGSFHFETFISLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
	151	200
SEQ ID NO: 8	MIDGAVFREESINIMAVPAVFLDGQEFNGRMTVQDILTKLGSTADASEF	
SEQ ID NO: 3	MIDGAVFREESINIMAVPAVFLNGEFGNGRMTIQDILSKLGSTADASEF	
SEQ ID NO: 9	MIDGAVFREESINIMAVPAVFLNGEFGNGRMTIQDILSKLGSTADASEF	
SEQ ID NO: 10	MIDGAVFREESINIMAVPAVFLNGEFGNGRMTIQDILSKLGSTADASEF	

图 5A

```

                201                                250
SEQ ID NO: 8  NDKDPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN
SEQ ID NO: 3  ENKEPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN
SEQ ID NO: 9  ENKEPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN
SEQ ID NO: 10 ENKEPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN

                251                                300
SEQ ID NO: 8  FITVKETTGFSSNLAEHIAQYDIDMTGIRATNIEKTDSAIRVTLEND
SEQ ID NO: 3  FITVKETTGFSSNLAAHIDQYDIDAMTGIRATDIEKTDEAIKVTLENG
SEQ ID NO: 9  FITVKETTGFSSNLAAHIDQYDIDAMTGIRATDIEKTDEAIKVTLENG
SEQ ID NO: 10 FITVKETTGFSSNLAAHIDQYDIDAMTGIRATDIEKTDEAIKVTLENG

                301                                350
SEQ ID NO: 8  AVLESKTVIISTGASWRKLNIPGEDRLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV
SEQ ID NO: 3  AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEEQLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV
SEQ ID NO: 9  AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEEQLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV
SEQ ID NO: 10 AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEEQLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV

                351                                400
SEQ ID NO: 8  IGGNSGVEAAIDLAGIVKHVTLFEYASELKADSVLQERLRSLPNVDIKT
SEQ ID NO: 3  IGGNSGVEAAIDLAGIVNHVTLFEFASELKADNVLQDRLRSLSNVDIKT
SEQ ID NO: 9  IGGNSGVEAAIDLAGIVNHVTLFEFASELKADNVLQDRLRSLSNVDIKT
SEQ ID NO: 10 IGGNSGVEAAIDLAGIVNHVTLFEFASELKADNVLQDRLRSLSNVDIKT

                401                                450
SEQ ID NO: 8  SAKTTEVIGDDYVTGISYEDMTTGESQVVNLDGIFVQIGLVPNTSWLQNA
SEQ ID NO: 3  NAKTTEVVGEDHVTGIRYEDMNTGEEHLLNLDGIFVQIGLLPNTSWLNDA
SEQ ID NO: 9  NAKTTEVVGEDHVTGIRYEDMSTGEEHLLNLDGIFVQIGLLPNTSWLKDA
SEQ ID NO: 10 NAKTTEVVGEDHVTGIRYEDMSTGEEHLLNLDGIFVQIGLLPNTSWLKDA

                451                                500
SEQ ID NO: 8  VELNERGEVMINRDNATNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA
SEQ ID NO: 3  VELNERGEIVIDRNNNTNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA
SEQ ID NO: 9  VELNERGEIVIDRNNNTNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA
SEQ ID NO: 10 VELNERGEIVIDCNNNTNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA

                501
SEQ ID NO: 8  FDYIIRN
SEQ ID NO: 3  FDYIIRN
SEQ ID NO: 9  FDYIIRN
SEQ ID NO: 10 FDYIIRN

```

图 5B

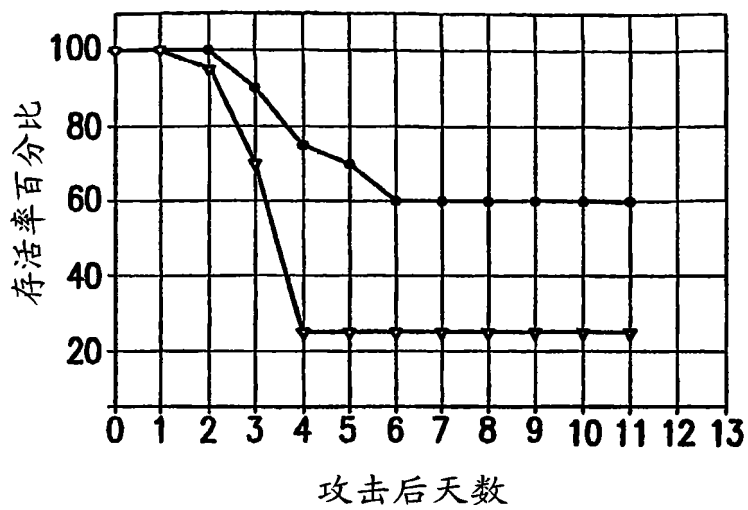


图 6A

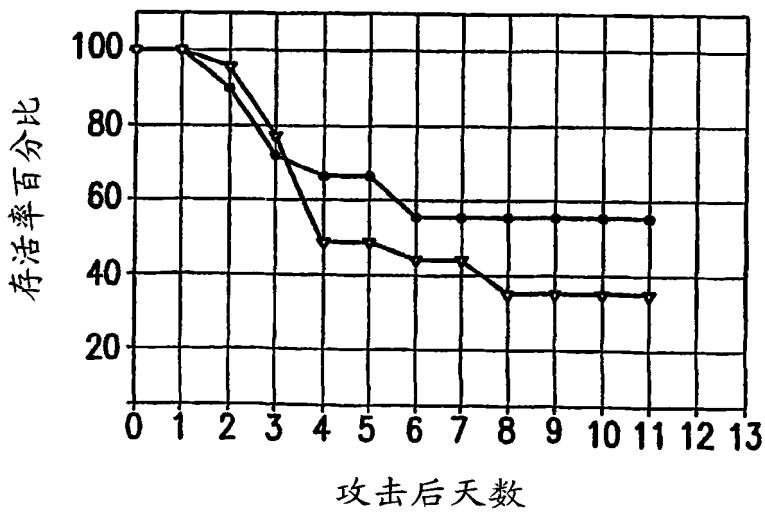


图 6B