

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380102758.6

[51] Int. Cl.

*A61K 39/00 (2006.01)*

*A61K 39/02 (2006.01)*

*A61K 39/085 (2006.01)*

*A61K 39/09 (2006.01)*

*A61K 39/38 (2006.01)*

*A61K 39/385 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100443116C

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 31/00 (2006.01)*

*C07K 1/00 (2006.01)*

*C07K 16/00 (2006.01)*

*C12N 15/00 (2006.01)*

[22] 申请日 2003.11.6

[21] 申请号 200380102758.6

[30] 优先权

[32] 2002.11.7 [33] US [31] 60/424,497

[86] 国际申请 PCT/US2003/035529 2003.11.6

[87] 国际公布 WO2004/043376 英 2004.5.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.8

[73] 专利权人 新纳几美国公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 麦可·C·陈 邱创究 李忠明

陈东圣

[56] 参考文献

WO9006951 A 1990.6.28

WO9903884A2 1999.1.28

US6342224 B1 2002.1.29

immunization with plasmid expressing pneumococcal surface protein A (PspA) can elicit protection against fatal infection with streptococcus pneumoniae. MCDANIEL et al. gene therapy, Vol. 4 No. 4. 1997

审查员 邹凯

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 3 页 说明书 51 页 附图 13 页

[54] 发明名称

治疗或预防肺炎球菌感染的组合物及其用途

[57] 摘要

本发明提供用以治疗或预防肺炎球菌感染的多肽、多糖-多肽衍生物、以及表达载体。该组合物在给予哺乳动物时会引起抗肺炎球菌的免疫反应。该组合物可预防性作为接种个体的疫苗和/或治疗性在感染的个体内引起治疗性的免疫反应。

1. 含有与肺炎链球菌荚膜多糖结合的多肽的组合物，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-464 组成，所述多肽缺乏溶血活性，以及所述组合物在给予哺乳动物时引起抗肺炎链球菌的免疫反应。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-465 所组成。

3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-466 所组成。

4. 含有与肺炎链球菌荚膜多糖结合的多肽的组合物，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-469 组成，所述多肽缺乏溶血活性，以及所述组合物在给予哺乳动物时引起抗肺炎链球菌的免疫反应。

5. 含有与肺炎链球菌荚膜多糖结合的多肽的组合物，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-470 组成，所述多肽缺乏溶血活性，以及所述组合物在给予哺乳动物时引起抗肺炎链球菌的免疫反应。

6. 哺乳动物表达载体，其包含可操作性连接于核酸序列的启动子，所述核酸序列编码由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-464 所组成的连续氨基酸片段多肽，所述多肽缺乏溶血活性，以及当所述表达载体在给予哺乳动物时，所述多肽引起抗肺炎链球菌的免疫反应。

7. 如权利要求 6 所述的哺乳动物表达载体，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-465 所组成。

8. 如权利要求 6 所述的哺乳动物表达载体，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-466 所组成。

9. 哺乳动物表达载体，其包含可操作性连接于核酸序列的启动子，所述核酸序列由编码 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-469 的多肽的核酸组成，所述多肽缺乏溶血活性，以及当所述表达载体在给予哺乳动物时，所述多肽引起抗肺炎链球菌的免疫反应。

10. 如权利要求 9 所述的哺乳动物表达载体，其中所述多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 1-470 所组成。

11. 权利要求 1-5 任一权利要求所述组合物在制备引起哺乳动物体内免疫反应的药物中的用途，所述免疫反应是抗肺炎链球菌的免疫反应。

12. 如权利要求 11 所述的用途，其中所述免疫反应为预防性免疫反应。

13. 如权利要求 11 所述的用途，其中所述免疫反应为治疗性免疫反应。

14. 如权利要求 11 所述的用途，其中所述免疫反应为抗至少一种肺炎链球菌血清型的交叉反应性反应，所述肺炎链球菌血清型与所述组合物中的荚膜多糖不同。

15. 如权利要求 14 所述的用途，其中所述荚膜多糖为血清型 7 型。

16. 如权利要求 14 所述的用途，其中所述荚膜多糖为血清型 6B 型。

17. 如权利要求 14 所述的用途，其中所述荚膜多糖为血清型 18C 型。

18. 如权利要求 14 所述的用途,其中所述荚膜多糖为血清型 23F 型。

19. 如权利要求 11 所述的用途,其中所述免疫反应为抗至少一种链球菌属的非肺炎链球菌的交叉反应性反应。

20. 权利要求 6-10 任一权利要求所述的表达载体在制备引起哺乳动物体内免疫反应的药物中的用途,所述免疫反应是抗肺炎链球菌的。

21. 如权利要求 20 所述的用途,其中所述免疫反应为抗至少一种链球菌属的非肺炎链球菌的交叉反应性反应。

22. 如权利要求 20 所述的用途,其中所述药物还包含纯化的肺炎链球菌溶血素多肽或其抗原片段,所述免疫反应是抗肺炎链球菌溶血素的免疫反应。

## 治疗或预防肺炎球菌感染的组合物及其用途

### 相关的美国申请

本申请要求于 2002 年 11 月 7 日提交的第 60/424,497 号的美国临时专利申请的优先权。所述在前申请的全部内容在此引用作为参考。

### 技术领域

本发明涉及多肽、肺炎球菌多糖-多肽轭合物、编码肺炎球菌多肽的表达载体、引起抗肺炎球菌免疫反应的方法、及肺炎球菌感染的治疗与预防方法。

### 背景技术

肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)是通常可引起儿童、老人及免疫缺乏个体细菌性肺炎、脑膜炎、中耳炎及菌血症。肺炎链球菌可根据该菌体的荚膜多糖进一步分为约 90 种血清型。然而,通常由约 30 种的肺炎链球菌致病。世界卫生组织估计每年一百万的儿童因肺炎球菌脑膜炎及败血症而死亡,其中 98%的死亡发生在发展中国家。具有抗药性的肺炎球菌株的出现使除抗微生物以外的治疗及预防肺炎球菌感染的方法更为需要。

### 发明概述

本发明的一个方面以组合物为特征,其含有与肺炎链球菌荚膜多糖轭合的多肽,其中所述多肽含有肺炎链球菌溶血素(pneumolysin)蛋白质的至少 400 连续氨基酸的片段,其中所述多肽缺乏氨基酸序列 KVEND(SEQ ID NO:22)(例如在羧基末端),其中所述多肽缺乏溶血活性,及所述组合物在给予哺乳动物时会引起抗肺炎链球菌的免疫反应(如体液免疫反应和/或细胞免疫反应)。此免疫反应为预防性和/或治疗性免疫反应。

肺炎链球菌溶血素蛋白质可含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。某些实施方案中,所述多肽含有 SEQ ID NO:1 的 1-460 氨基酸。在其它实施方案中,所述多肽含有 SEQ ID NO:1 的 1-464 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-465 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-466 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-469 氨基酸、或 SEQ ID NO:1 的 1-470 氨基酸。

所述多肽可选择性缺乏氨基酸序列 EDKVEND(SEQ ID NO:23) 或氨基酸序列 YPQVEDKVEND(SEQ ID NO:24)。

某些实施方案中,所述多肽由以下所构成:SEQ ID NO:1 的 1-460 氨基酸残基,SEQ ID NO:1 的 1-464 氨基酸残基,SEQ ID NO:1 的 1-465 氨基酸残基,SEQ ID NO:1 的 1-466 氨基酸残基,SEQ ID NO:1 的 1-469 氨基酸残基,或 SEQ ID NO:1 的 1-470 氨基酸残基。

某些实施方案中,所述荚膜多糖选自血清型 4 型、6B 型、9V 型、14 型、18C 型、19F 型、及 23F 型。在一实施方案中,所述荚膜多糖为血清型 14 型。在另一实施方案中,所述荚膜多糖为血清型 18C 型。所述组合物可选择性含有多种不同的选自血清型 4 型、6B 型、9V 型、14 型、18C 型、19F 型、及 23F 型的荚膜多糖。

由所述组合物可引起直接抗肺炎链球菌荚膜多糖、抗肺炎链球菌溶血素蛋白质、或抗肺炎链球菌荚膜多糖与抗肺炎链球菌溶血素蛋白质的免疫反应。

另一方面,本发明的特征为一种哺乳动物表达载体,其包含可操作地连接于核酸序列的启动子,所述核酸序列含有编码含肺炎链球菌溶血素蛋白质至少 400 连续氨基酸片段多肽的核酸,其中所述多肽缺乏氨基酸序列 KVVEND(SEQ ID NO:22)(例如在羧基端),所述多肽缺乏溶血活性,及在给予哺乳动物表达载体时,所述多肽会引起抗肺炎链球菌的免疫反应(如体液免疫反应和/或细胞免疫反应)。此免疫反应可为预防性和/或治疗性免疫反应。

所述肺炎链球菌溶血素蛋白质可含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。某些实施方案中,所述编码的多肽含有 SEQ ID NO:1 的 1-460 氨基酸。其它实施方案中,所述编码的多肽含有 SEQ ID NO:1 的 1-464 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-465 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-466 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-469 氨基酸、或 SEQ ID NO:1 的 1-470 氨基酸。

所述编码的多肽可选择性缺乏氨基酸序列 EDKVEND(SEQ ID NO:23)或氨基酸序列 YPQVEDKVEND(SEQ ID NO:24)。

某些实施方案中,所述多肽由以下构成,SEQ ID NO:1 的 1-460 氨基酸残基、SEQ ID NO:1 的 1-464 氨基酸残基、SEQ ID NO:1 的 1-465 氨基酸残基、SEQ ID NO:1 的 1-466 氨基酸残基、SEQ ID NO:1 的 1-469 氨基酸残基、或 SEQ ID NO:1 的 1-470 氨基酸残基。

由所述编码的多肽引起的免疫反应能够直接对抗肺炎链球菌溶血素蛋白质。

另一方面,本发明特征为哺乳动物表达载体,其含有可操作地连接于核酸序列的启动子,所述核酸序列含有编码肺炎链球菌自溶素多肽的核酸,其中在给予哺乳动物所述表达载体时,所述多肽会引起抗肺炎链球菌的免疫反应(如体液免疫反应和/或细胞免疫反应)。此免疫反应可为预防性和/或治疗性免疫反应。

某些实施方案中,所述编码的多肽含有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列。其它实施方案中,所述编码的多肽由 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列所构成。

另一方面,本发明特征为一哺乳动物表达载体,其含有可操作性连接于核酸的启动子,所述核酸含有编码肺炎球菌表面蛋白 A 多肽的核酸,其中在给予哺乳动物所述表达载体时,所述多肽会引起抗肺炎链球菌的免疫反应(如体液免疫反应和/或细胞免疫反应)。此免疫反应可为预防性和/或治疗性免疫反应。

某些实施方案中,所述编码的多肽含有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。其它实施方案中,所述编码的多肽由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列所构成。

另一方面,本发明特征为含有选自 SEQ ID NO:1 的 1-460 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-464 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-465 氨基酸、SEQ ID NO:1 的 1-466 氨基酸、及 SEQ ID NO:1 的 1-469 氨基酸的氨基酸序列的多肽。

另一方面,本发明特征为引起哺乳动物免疫反应的方法,其通过给予哺乳动物一定量的有效引起所述哺乳动物抗肺炎链球菌的免疫反应本发明所述组合物而进行。此免疫反应可为预防性和/或治疗

性免疫反应。

某些实施方案中，所述免疫反应为抗至少一型肺炎链球菌血清型的交叉反应性反应，其不同于所述组合物中存在的所述荚膜多糖血清型(如血清型 7 型、6B 型、18C 型、或 23F 型)。某些实施方案中，所述免疫反应为对抗至少一种链球菌属中的非肺炎链球菌种的交叉反应性反应。

另一方面，本发明特征为引起哺乳动物免疫反应的方法，其通过给予哺乳动物一定量的有效引起所述哺乳动物抗肺炎链球菌的免疫反应的本发明所述表达载体(例如，溶血素、假溶血素、自溶素、或肺炎球菌表面蛋白 A 表达载体)。此免疫反应可为预防性和/或治疗性免疫反应。某些实施方案中，所述免疫反应为对抗至少一种链球菌属中的非肺炎链球菌种交叉反应性反应。

另一方面，本发明特征为引起哺乳动物免疫反应的方法：给予哺乳动物一种哺乳动物表达载体，所述表达载体含有可操作地连接于含编码肺炎链球菌溶血素多肽或其抗原片段的核酸的启动子，并给予所述哺乳动物所述纯化的肺炎链球菌溶血素多肽或其抗原片段，其中结合给药引起哺乳动物抗肺炎链球菌溶血素的免疫反应。

某些实施方案中，所述哺乳动物给予至少 2、3 或更多独立剂量的所述表达载体。所述剂量能以至少 1、2、3、4、5、6、7 或更多天数分别进行。

某些实施方案中，肺炎链球菌溶血素多肽或其抗原片段的给药为所述表达载体给药后的至少 1、2、3、4、5、6、7 或更多天数。

另一方面，本发明特征为组合物，其含与非肺炎链球菌细菌多糖结合的多肽，其中所述多肽含有肺炎链球菌溶血素蛋白质的至少 400 连续氨基酸片段，其中所述多肽缺乏氨基酸序列 KVEND(SEQ ID NO:22)，所述多肽缺乏溶血活性，及所述组合物在给予哺乳动物时，会引起抗非肺炎链球菌的免疫反应。某些实施方案中，非肺炎链球菌选自肺炎球菌；流感嗜血杆菌 b 型；脑膜炎球菌 A、B、或 C 群；及 B 群链球菌 Ia、Ib、II、III、V、或 VIII 型。此组合物能引起哺乳动物体内免疫反应，通过给予所述哺乳动物一定量的有效引起所述哺乳动物体内抗非肺炎链球菌的免疫反应所述组合物而实现。



另一方面，本发明特征为纯化抗体，其辄合于(例如选择性辄合于)本发明的组合物或多肽。例如，抗体可特异性辄合于组合物，所述组合物含有与肺炎链球菌荚膜多糖辄合的多肽，其中所述多肽含有肺炎链球菌溶血素蛋白质的至少 400 连续氨基酸片段，其中所述多肽缺乏氨基酸序列 KVEND(SEQ ID NO:22)(例如在羧基端)，所述多肽缺乏溶血活性，及在给予哺乳动物表达载体时，所述组合物会引起抗肺炎链球菌的免疫反应(如体液免疫反应和/或细胞免疫反应)。此抗体可为如单克隆或多克隆抗体。如杂合瘤的细胞株能用来制备分泌本发明的抗体。此抗体可用于治疗或预防肺炎链球菌感染，其通过给予所述哺乳动物治疗或预防性有效量的所述纯化抗体来实现。

本发明的一优点为某些实施方案中，第一血清型肺炎链球菌多糖-多肽辄合物可意外地提供交叉保护，对抗肺炎链球菌第二血清型的感染。所述交叉保护可增加所给辄合物在治疗或预防由多于一种肺炎链球菌血清型感染的有效性。由上所述，在无须提供每一种特定血清型的辄合物下，本发明可提供对抗肺炎链球菌多种血清型的保护。

本发明的另一优点为某些实施方案中，所述假溶血素多肽缺乏溶血活性。因此，所述假溶血素辄合物及表达载体与含有具溶血活性的天然溶血素或具部份溶血活性的类毒素溶血素的组合物相比，减少或缺乏毒性。

本发明的另一优点为某些实施方案中，编码溶血素截短物的表达载体，相反于编码溶血素点突变物的核酸，不可能回复而因此编码具溶血活性的毒性蛋白质。由于所述溶血素截短物缺乏导致溶血活性的部分溶血素在所述表达载体核酸序列的任何突变应不能再产生所述毒性。

除非另有定义，本发明所述的所有技术性术语具有本发明所属的技术领域的技术人员通常理解的含义。虽然与本发明所述的相似或相同的方法及材料可用于本发明的实践或实验，但以下对失活的方法与材料进行描述。所有本发明所述的公开文章、专利申请文献、专利、及其它参考书目均在此全部引用作为参考。假使术语上有争议，本说明书将加以限制。而且所述材料及方法仅为说明的目的，并不是对本发明的限制。

本发明其它特征及优点将从下列详细说明及所附权利要求书中显而易见。

#### 附图的简要说明

图 1 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 2 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 3 为小鼠在血清型 18C 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 4 为小鼠在血清型 18C 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 5 为小鼠在血清型 19F 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 6 为小鼠在血清型 19F 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 7 为小鼠在血清型 23F 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 8 为小鼠在血清型 23F 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 9 为小鼠在血清型 4 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 10 为小鼠在血清型 4 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 11 为小鼠在血清型 6B 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 12 为小鼠在血清型 6B 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 13 为小鼠在血清型 9V 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后所引起的抗溶血素 IgG 抗体产生。

图 14 为小鼠在血清型 9V 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免

疫后所引起的抗多糖 IgG 抗体产生。

图 15 为肺炎链球菌血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物第 3 次注射后，对肺炎链球菌血清型 14 型多糖的抗体反应。

图 16 以假肺炎链球菌溶血素 DNA 疫苗的初级强化(prime-boost)策略，产生的兔抗溶血素的抗体反应。

图 17 为注射编码肺炎球菌表面蛋白 A 的 DNA 疫苗的表达载体后的抗体反应。

图 18 为注射编码自溶素 DNA 疫苗的表达载体后的抗体反应。

图 19 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 14 型后的细菌清除率。

图 20 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 7 型后的细菌清除率。

图 21 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 6B 型后的细菌清除率。

图 22 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 18C 型后的细菌清除率。

图 23 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 23F 型后 1 小时的细菌清除率。

图 24 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 23F 型后 3 小时的细菌清除率。

图 25 为小鼠在血清型 14 型多糖假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫后，感染肺炎链球菌血清型 23F 型后 5 小时的细菌清除率。

### 发明的详细描述

本发明提供治疗或预防肺炎球菌的感染的组合物及方法。本发明所述的多肽、多糖-多肽轭合物、及表达载体在给予哺乳动物时，会引起所述哺乳动物的抗肺炎球菌免疫反应。这些组合物能用于对个体的预防性疫苗接种和/或治疗性引起感染个体的治疗免疫反应。

### 多糖-蛋白质轭合物

多肽可与肺炎链球菌荚膜多糖以共价或非共价方式轭合。一般

而言,所述轭合物的多肽成分包含肺炎链球菌溶血素蛋白质部分或突变的肺炎链球菌溶血素蛋白质; 缺乏氨基酸序列 KVEND(SEQ ID NO:22); 及缺乏溶血活性。所述多糖-多肽在给予哺乳动物时引起抗肺炎链球菌的免疫反应。所述免疫反应能直接抗所述多肽、所述多糖、或所述多肽与所述多糖的组合物。

所述轭合物的多肽成分能够利用重组 DNA 技术、天然物中纯化、或化学合成而制备。一般而言,所述多肽成分的氨基酸序列与天然生成的肺炎链球菌溶血素蛋白质不同。肺炎链球菌 19A 型溶血素多肽的序列如 SEQ ID NO:1(如实施例 1)所述。示例性的轭合物的多肽成分包含但不限于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-460、1-461、1-462、1-463、1-464、1-465、1-466、1-469、及 1-470。

编码肺炎链球菌溶血素蛋白质的截短型和/或突变型的核酸可经如聚合链反应(PCR)制备。编码此等蛋白质的核酸可选择含有对特定表达系统偏好或不偏好的密码子。例如,所述核酸可为至少 1 个密码子改变,优选为至少 10%或 20%的密码子改变,因而使所述序列适合在于大肠杆菌、酵母菌、人、昆虫或 CHO 细胞中表达。

编码肺炎链球菌溶血素蛋白质的截短型和/或突变型的核酸可融合于编码下列物质的核酸序列:(1)其它肺炎球菌蛋白质,如自溶素、表面蛋白 A、神经氨酸酶、透明质酸溶解产物、胆碱结合蛋白 A,或(2)来自有机体的非肺炎球菌蛋白质,如流感嗜血杆菌 b 型、脑膜炎球菌 A、B、或 C 群,或链球菌 B 群。编码此融合蛋白质的核酸在表达系统中表达。

因宿主可能缺乏抗载体多糖的事先存在抗体,因此溶血素的截短物可用于多糖载体。溶血素在肺炎球菌感染中为剧毒因子,在不同亚型的肺炎球菌中所述溶血素几乎无抗原差异。

所述多糖-蛋白质轭合物在给予如人的哺乳动物时,所引起的免疫反应的强度、形式和/或时间超过仅给予多糖成分所引起的免疫反应。因此,所述多肽成分必须有足以引起所述增强免疫反应的一段长度。自然产生的肺炎链球菌溶血素蛋白质片段,其所述片段至少为 8、10、25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、425、450、460、465、460、465 或更多的氨基酸长度。关于多肽,

序列不同于天然产生的肺炎链球菌蛋白质,所述多肽至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更多相同于天然产生的肺炎链球菌蛋白质,如 SEQ ID NO:1。

所述多肽成分优选缺乏天然肺炎链球菌溶血素蛋白质的溶血活性。一般而言,所述多肽成分显现出低于天然肺炎链球菌溶血素蛋白质的溶血活性的 30%、20%、10%、5%、1%或更低。溶血活性分析可参见实施例 3。通常,多肽的溶血活性可通过将所述多肽与如羊红血细胞的红细胞一起孵育,分析由所述多肽引起的溶血反应,予以确定(参见如 Owen et al. (1994) FEMS Microbiology Letters 121:217-222, 为示例性溶血分析的说明)。

所述轆合物的多糖成分可为任何肺炎链球菌的荚膜多糖,包括但不限于亚型 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 19A, 20, 22F, 23A, 23F, 24F, 27, 33F, 或 34 中的任何亚型。某些实施方案中,所述荚膜多糖选自亚型 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 或 23F。某些实施方案中,所述多糖为血清型 14。其它实施方案中,所述多糖为血清型 18C。一种或多种不同荚膜多糖可与单一多肽或多种多肽轆合。例如,多价轆合物可包含至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10 种不同荚膜多糖。多糖可通过如单键连接(仅所述多糖的一端与所述多肽连接)、或通过环状键(单一多肽连接在环状多糖)或通过交联(多种多糖连接至多种多肽)与多肽轆合。

纯化多肽的方法,如实施例中所述假溶血素多肽,及实施例 4 所述多糖与多肽的轆合。关于多肽或多糖纯化及轆合过程的其它详细说明如美国专利第 4,242,501; 4,686,102; 5,623,057; 及 5,565,204 号所述。

本发明所述轆合物或多肽可给予哺乳动物,引起所述哺乳动物对肺炎链球菌的免疫反应(预防和/或治疗免疫反应)。含有轆合物或多肽的药物组合物可以在适合作为疫苗的药物可接受的载体、缓冲液、或防腐剂中给药,其包括但不限于生理食盐水或其它可注射液体。疫苗内也可惯例存在添加物,例如如乳糖或山梨糖醇的稳定剂;及促进免疫原性反应的辅剂,如磷酸铝、氢氧化铝、或硫酸铝及硬脂酪氨酸。所制备的疫苗亦可作为多价疫苗的组分,所述多价疫苗为对多种感染

源引起的免疫反应。

所述组合物可以任何本领域已知的方法给予，如口服、肌肉内、静脉内、动脉内、椎管内、皮内、腹膜内、鼻内、肺内、眼内、阴道内、直肠内、或皮下给予。其可介入肠胃道或呼吸道中，例如经吸入含所述轭合物的溶液或粉末。某些实施方案中，所述组合物可经皮肤贴片给药。

药物组合物(如疫苗)以足以引起抗体产生的一定量给予，其成为免疫原性反应的一部分。由许多因素决定任何给定患者的给药剂量，包含患者体积、一般健康状况、性别、体表面积、年龄、给予的特定化合物、给药时间及路径、及同时给予的其它药物。具有常规技术的药剂师容易确定理想的剂量。

组合物引起宿主哺乳动物免疫反应的能力可通过本领域所属技术人员公知的免疫反应测量方法分析。例如，细胞毒性 T 细胞的产生可由  $^{51}\text{Cr}$  释放分析方法确认，或通过测量细胞内细胞因子表达或分泌，或使用主要组织相容性复合体(MHC)四合体得知。标准分析，如酶连免疫吸收分析(ELISA)或酶连免疫斑(ELISPOT)，可用于测量因 T 细胞活化的细胞因子谱。T 细胞增殖可以  $^3\text{H}$ -胸苷摄取分析及其它公知分析测量。B 细胞反应可使用本领域公知的如 ELISA 测量的分析。亦可使用其它的方法学评估所述轭合物对致病原相关损害或其它致病原水平的作用(如经所述轭合物处理的感染小鼠中肺炎球菌的清除率)。

本发明所述组合物可使用于药物的制造，以预防或治疗肺炎链球菌的感染或此感染相关的状态。

## 抗体

抗多糖、溶血素或其组合物的抗体可用于预防或治疗的应用，以使第一个体到第二个体产生免疫能力(如放大第二个体对肺炎链球菌的免疫反应或当第二个体为免疫兼容患者时提供反应)。可在免疫兼容宿主体中产生抗多糖、溶血素或其组合物的抗体(如经由给予所述免疫兼容患者本发明所述轭合物)，从所述宿主中收获该抗体，并灌输至需要治疗或预防的受者，因此给予所述受者抗所述溶血素毒

素及肺炎链球菌以及其它轭合由所述轭合物(如所述轭合物的所述多糖成分)引起的抗体的任何可能的细菌抵抗力。

由本发明所述组合物引起的抗体可制备成药物组合物,并用于赋予个体预防或治疗性的免疫反应。药物组合物的适和组分及给药方法如本发明所述。关于引起的被动免疫,所述药物组合物可含有多克隆抗体或单克隆抗体或其片段的衍生物。如标准临床技术所确定的,药物组合物含有预防性或治疗性有效剂量的抗体、片段或衍生物。

### 编码肺炎球菌多肽的核酸

编码肺炎球菌多肽或其片段或变异体的核酸可给药至哺乳动物(如人),以在所述的哺乳动物中产生预防和/或治疗的免疫反应。所述免疫反应可为抗肺炎球菌体液和/或细胞免疫反应。

由所述核酸编码的多肽包含本发明所述轭合物的多肽、实施例所述假溶血素多肽、以及自溶素及肺炎球菌表面蛋白 A 及其片段和变异体。而且,核酸可编码二或以上的多肽、片段或变异体的组合物。此外,核酸可编码这些多肽、片段或变体的两种或更多种的组合。

核酸表达构建体可经由标准重组 DNA 方法制备。在构建体中可包含调控元件以促进编码所述多肽的核酸的表达。这些元件包含在人或其它哺乳动物中增进表达的序列,如启动子、在编码序列的 5' 和/或 3' 的 RNA 稳定序列,内含子(可位于所述编码序列内或附近的任何位置上)、聚(A)添加位点、以及复制起点和一个或多个编码选择性比标记的基因,所述标记使所述构建体在原核和/或真核宿主中复制并被选择出。T7 聚合酶启动子或其它形式启动子(如组织特异性启动子或细胞特异性启动子如肌肉特异性启动子)选择性存在于所述编码序列的 5' 端,编码 FLAG 或其它 mAb 决定子的序列选择性存在于所述编码序列的 3' 端。所述构建体亦可包含其它转录及翻译信号,如 Kozak 序列。

所述构建体可另外包含编码目标信号的序列,所述目标信号将该编码多肽导向所欲的细胞内腔室,所述目标信号连接于所述多肽。目标信号可使所述编码多肽导向内质网(ER)、高尔基氏体、核、溶酶体、II 级肽负载腔室、或内涵体,并包含信号肽、ER 保留肽、及溶酶体

目标肽。

所述核酸可用于任何可在哺乳动物细胞内表的的载体(vector)中。所述载体可为非病毒载体如质粒或细菌载体、整合病毒载体、或非整合病毒载体。适合载体例如其 PCR 产物可直接快速克隆的 pcDNA 哺乳动物表达载体家族(Invitrogen)。

各种传递系统可用于传递编码多肽的核酸至适当细胞中。编码所述多肽的核酸可在药物可接受载体中传递,如生理盐水,或有稀释剂或无稀释剂的胶状悬浮液或粉末。核酸可裸露或与传递载体连接,并利用本领域公知的传递系统传递,如脂质、脂质体、微球体、微颗粒、或微胶囊、金颗粒、ISCOMS、纳米颗粒、聚合物、浓缩剂、多糖、聚氨基酸、树突体、植物皂素、QS21、吸收增强材料、佐剂、或脂肪酸。核酸亦可传递至细胞中,如使用电穿孔法在体或体外传递至骨骼肌肉细胞中。

所述核酸可使用标准方法给药,如 Donnelly 等人, J. Immunol. Methods 176:145, 1994, 及 Vitiello 等人, J. Clin. Invest. 95:341, 1995 中所述,可以任何本领域公知的方式传递至个体中,如口服、肌肉内、静脉内、动脉内、椎管内、皮内、腹膜内、鼻内、肺内、眼内、阴道内、直肠内、或皮下给予。其可介入肠胃道或呼吸道中,例如经吸入含所述轭合物的溶液或粉末。给药可为局部或全身性。

预期约 100-2000 $\mu$ g 核酸的剂量给予一个体。当患者为成人时,疫苗治疗方法如以微颗粒传递时,可肌肉内、皮内、吸入或皮下给药 10-1000 $\mu$ g 质粒 DNA; 或肌肉内或皮内给予裸露质粒 DNA 约 10-2500 $\mu$ g, 如 100-2000 $\mu$ g, 或 500-1000 $\mu$ g, 重复 3-6 次。如医学领域所公知的,任何患者的剂量给予依据许多因素,包含患者体积、一般健康状况、性别、体表面积、年龄、给予的特定化合物、给药时间及路径、及同时给予的其它药物。理想剂量是具有常规技术的药剂师容易确定的。

也可使用其它标准传递方法,如生物弹射击转移(biolistic transfer)或体外活体治疗(ex vivo)。体外活体治疗(ex vivo)中,抗原提呈细胞(APCs)如树突细胞、外围血液单核细胞或骨髓细胞可从患者或适当捐赠者中获得,且用所述核酸体外活体(ex vivo)活化,然后植入



或再灌入患者中。

所述核酸可单独给药或与本领域公知的其它治疗组合给药，如抗微生物剂。而且，所述核酸可与其它设计增进免疫反应的治疗组合给药，如与本领域公知的佐剂、细胞因子(或编码细胞因子的核酸)、或 CpG 寡核苷酸共同给药。

核酸引起宿主哺乳动物免疫反应的能力可通过本领域公知的检测免疫反应的方法分析。例如，细胞毒 T 细胞的产生可在标准  $^{51}\text{Cr}$  释放分析测定，或通过检测细胞内细胞因子表达或分泌得知，或使用 MHC 四合体测定。标准分析，如 ELISA 或 ELISPOT，可用于检测因 T 细胞活化的细胞因子谱。T 细胞增殖可以  $^3\text{H}$ -胸苷摄取分析及其它公知分析来检测。B 细胞反应可使用公知的如 ELISA 分析来检测。亦可使用其它方法来评估所述轭合物对致病原相关损害或其它致病原水平上的作用(如经所述轭合物处理的感染小鼠中肺炎球菌的清除率)。

本发明所述核酸可用于药物的制造以预防或治疗肺炎链球菌的感染或所述感染的相关状态。

本发明将在下列实施例进一步说明，以下实施例并非用以限定权利要求定义的本发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1: 假溶血素表达载体的构建

表达溶血素多肽截短型的载体描述于实施例 1A-1E。所述编码的截短多肽称为“假溶血素”多肽，可与溶血素多糖轭合，制备所述轭合物疫苗。而且，编码溶血素多肽的核酸可给予个体，以产生抗所述编码的多肽的免疫反应。

以肺炎链球菌 19A 型染色体 DNA 为模板进行 PCR，扩增所述溶血素基因的不同片段。用于 PCR 反应的有义引物退火于翻译起始密码子的上游的溶血素基因的编码序列，并连接有特定的限制性内切酶位点。所述有义引物为 LYSN-1(5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ;

SEQ ID NO:2), 与溶血素基因 5'端的 1-24 核苷酸互补。其反义引物为

LYSN-3(5'-CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3');

SEQ ID NO:3), 与溶血素基因 3'端的 1396-1413 溶血素核苷酸互补。

所述引物扩增编码溶血素蛋白质全长 471 个氨基酸的 1413bp 的 DNA。以下是肺炎链球菌 19A 型溶血素蛋白质的氨基酸序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVV  
IERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVDETLLENNPTLLA  
VDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQ  
DYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDF  
NSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQ  
RGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDEVEAAFEALIKGVK  
VAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMVEDLIQ  
EGSRFTADHPGLPISYTTSFRLDNVVATFQNSTDYVETKVTAYRN  
GDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRNGQD  
LTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWRVYEKTDLPLV  
RKRTISIWGTTLYPQVEDKVEND (SEQ ID NO:1)。

PCR 一般进行如下: 94℃、4 分钟, 1 个循环; 随后为 94℃、1 分钟, 55℃、1 分钟, 72℃、1.5 分钟, 30 个循环; 及最后 72℃、10 分钟 1 个循环。以 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶消化所述 PCR 合成的 DNA 片段, 并将其连接至 pET11b 表达载体(形成 pSA-14)。将此重组 DNA 转化至大肠杆菌 DE3 细胞中。筛选抗氨苄青霉素 (Ampicillin) 的转化子。由 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶消化来确认所述 DNA 片段是否插入。

与野生型基因组序列比较, 所述扩增的 DNA 片段 3' 端缺乏核苷酸。由此种修饰核酸所编码的假溶血素多肽为非溶血性及非细胞毒性, 但仍保留免疫原性能力。

#### A. pSA-1 表达载体的构建

所述的 pSA-1 表达载体编码由溶血素蛋白质 SEQ ID NO:1 的 1-460 氨基酸所构成的多肽。以肺炎链球菌 19A 型染色体 DNA 进行

PCR , 使 用  
 LSYN-1(5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATG  
 AC-3' ; SEQ ID NO:2) 及  
 LSYN-4(5'-GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCCAAATAG-  
 3'; SEQ ID NO:5)引物扩增 1380bp DNA。

所述 PCR 合成的 DNA 片段以 NdeI 及 BamHI 限制内切酶消化, 连接至 pET11b 表达载体的 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶位点, 形成 pSA-1。将此重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DE3 细胞中。筛选抗氨苄青霉素(Ampicillin)的转化子。由 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶确认所述 DNA 片段是否插入, 并进一步由 DNA 序列分析确定。

所述编码的 460 氨基酸多肽缺少野生型溶血素蛋白质羧基端的 11 个氨基酸, 其具有下列序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFV  
 VIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLL  
 AVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWH  
 QDYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDID  
 FNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNPGDVFQDTVTVEDLK  
 QRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGV  
 KVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMVEDLI  
 QEGSRFTADHPGLPISYTTSLRDNVVATFQNSTDYVETKVTAYR  
 NGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRNGQ  
 DLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWWWRTVYEKTDLPL  
 VRKRTISIWGTTL(SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-460)。

#### B. pSA-49 表达载体的构建

所述的 pSA-49 表达载体编码由溶血素蛋白质 SEQ ID NO:1 的 1-464 氨基酸所构成的多肽。以肺炎链球菌 19A 型染色体 DNA 进行 PCR , 使 用  
 LSYN-1(5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATG  
 AC-3' ; SEQ ID NO:2) 及  
 LSYN-54(5'-CTGAGGATCCTTACTATACTGAGGATAGAGAGTT

GTTC-3' ; SEQ ID NO:25)引物扩增 1392bp DNA。

所述 PCR 合成的 DNA 片段以 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶消化, 连接至 pET11b 表达载体的 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶位点, 形成 pSA-49。将此重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DE3 细胞中。筛选氨苄青霉素(Ampicillin)的转化子。由 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶确认所述 DNA 片段是否插入, 并进一步由 DNA 序列分析确定。

所述编码的 464 氨基酸多肽缺少野生型溶血素蛋白质羧基端的 7 个氨基酸, 其具有下列序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVV  
IERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVDETLLENNPTLLA  
VDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQ  
DYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDF  
NSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQ  
RGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVK  
VAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQ  
EGSRFTADHPGLPISYTTSLFRDNVAVTFQNSTDYVETKVTAYRN  
GDLLEDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGEVLTPKAWDRNGQD  
LTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWRVYEKTDLPLV  
RKRTISIWGTTLYPQV(SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-464)。

### C. pSA-11 表达载体的构建

所述 pSA-11 表达载体编码由溶血素蛋白质 SEQ ID NO:1 的 1-466 氨基酸所构成的多肽。以肺炎链球菌 19A 型染色体 DNA 进行 PCR , 使 用  
LSYN-1(5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATG  
AC -3' ; SEQ ID NO:2) 及  
LSYN-17(5'-GACTGGATCCTTACTAATCTTCTACCTGAGGATAG-  
3'; SEQ ID NO:6)引物扩增 1398bp DNA。

所述 PCR 合成的 DNA 片段以 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶消化, 连接至 pET11b 表达载体的 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶位点, 形成 pSA-11。将此重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DE3 细胞中。

筛选氨苄青霉素(Ampicillin)的转化子。由 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶确认所述 DNA 片段是否插入，并进一步由 DNA 序列分析确定。

所述编码的 466 氨基酸多肽缺少野生型溶血素蛋白质羧基端的 5 个氨基酸，其具有下列序列：

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVV  
IERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLA  
VDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQ  
DYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDF  
NSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQ  
RGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVK  
VAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQ  
EGSRFTADHPGLPISYTTSLFRDNVAVATFQNSTDYVETKVTAYRN  
GDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRNGQD  
LTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWRVYEKTDLPLV  
RKRTISIWGTTLYPQVED(SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-466)。

#### D. pSA-32 表达载体的构建

所述 pSA-32 表达载体编码由溶血素蛋白质 SEQ ID NO:1 的 1-469 氨基酸所构成的多肽。以肺炎链球菌 19A 型染色体 DNA 进行 PCR，使用 (5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEQ ID NO:2) 及 LSYN-37(5'-GACTGGATCCTTACTATTCTACCTTATCTTCTACCT GAG-3'; SEQ ID NO:7)引物扩增 1407bp DNA。

所述 PCR 合成的 DNA 片段以 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶消化，连接至 pET11b 表达载体的 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶位点，形成 pSA-32。将此重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DE3 细胞中。筛选氨苄青霉素(Ampicillin)的转化子。由 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶确认所述 DNA 片段是否插入，并进一步由 DNA 序列分析确定。

所述编码的 469 氨基酸多肽缺少野生型溶血素蛋白质羧基端的 2 个氨基酸，其具有下列序列：

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVV  
 IERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLA  
 VDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQ  
 DYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDF  
 NSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQ  
 RGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDEVEAAFEALIKGVK  
 VAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQ  
 EGSRFTADHPGLPISYTTSLRDNVVATFQNSTDYVETKVTAYRN  
 GDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRNGQD  
 LTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWWWRTVYEKTDLPLV  
 RKRTISIWGTTLYPQVEDKVE(SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-469)。

#### E. pSA-31 表达载体的构建

所述 pSA-31 表达载体编码由溶血素蛋白质 SEQ ID NO:1 的 1-470 氨基酸所构成的多肽。以肺炎链球菌 19A 型染色体 DNA 进行 PCR，使 用  
 LSYN-1(5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATG  
 AC-3' ; SEQ ID NO:2) 及  
 LSYN-38(5'-GACTGGATCCTTACTAATTTTCTACCTTATCTTCTA  
 CCTGAG-3'; SEQ ID NO:8)引物扩增 1410bp DNA。

所述 PCR 合成的 DNA 片段以 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶消化，连接至 pET11b 表达载体的 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶位点，形成 pSA-31。将此重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DE3 细胞中。筛选氨苄青霉素(Ampicillin)的转化子。由 NdeI 及 BamHI 限制性内切酶确认所述 DNA 片段是否插入，并进一步由 DNA 序列分析确定。

所述编码的 470 氨基酸多肽缺少野生型溶血素蛋白质羧基端的 1 个氨基酸，其具有下列序列：  
 MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVV  
 IERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLA  
 VDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQ  
 DYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDF

NSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNP GDVVFQDTVTVEDLKQ  
RGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVK  
VAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD MVEDLIQ  
EGSRFTADHPGLPISYTT SFLRDNVVATFQNSTDYVETKVTAYRN  
GDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRNGQD  
LTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAW EWWRTVYEKTDLPLV  
RKRTISIWGTTLYPQVEDKVEN(SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-470)。

### 实施例 2: 重组假肺炎链球菌溶血素多肽的表达、纯化及特性

将 PCR 产物克隆入 pET 表达载体如实施例 1 所述。重组 DNA 转形至大肠杆菌, 该转化子在含有抗生素的培养盘中筛选。插入的 DNA 序列以 DNA 序列分析确认。重组的大肠杆菌于 37°C 过夜生长, 加入异丙基硫-β-D-半乳糖苷(IPTG)作为引起剂, 该细胞继续生长 3 小时。该表达的重组多肽以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)评估, 经考马斯蓝(Coomassie blue)染色。使用亲和色谱法纯化重组多肽, 其溶血活性经羊或人红细胞的溶血分析测试(详见实施例 3)。

### 实施例 3: 假肺炎链球菌溶血素多肽的溶血活性测定

该编码多肽的溶血活性如下步骤测定。

1)准备人或羊的红细胞 2%悬浮液。将 0.2mL 新鲜红细胞加入 10mL PBS(pH7.2)。旋转该悬浮液 3000rpm、30 秒, 于 10mL PBSz 中重悬浮其沉淀颗粒物三次。

2)加入 1 μg 多肽于 0.5mL PBS(pH7.2)中, 与 0.5mL 清洗过的 2% RBC 悬浮液混合。

3)37°C 培养该混合物 1 小时, 然后在小管(Eppendorf)微离心机中离心 10,000rpm、2 分钟。

4)在 541nm 下测量光密度(OD)。溶血活性测量为与全长的肺炎链球菌溶血素多肽相比, OD 光密度吸收百分比。

如表 1 所示, 肺炎链球菌溶血素截短物缺乏碳端的 7、6、2、或 1 个氨基酸, 而缺乏溶血活性。缺乏碳端 5 个氨基酸的截短物被证实

其溶血活性部份丧失。

表 1: 全长肺炎链球菌溶血素及假肺炎链球菌溶血素的溶血活性

构建体	肺炎链球菌溶血素部分(a)	%溶血活性(b)
pSA-14	1-471(全长假肺炎链球菌溶血素)	100
pSA-49	1-464(-7 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	0
pSA-48	1-465(-6 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	0.2
pSA-11	1-466(-5 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	17
pSA-34	1-467(-4 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	100
pSA-33	1-468(-3 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	100
pSA-32	1-469(-2 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	0
pSA-31	1-470(-1 氨基酸假肺炎链球菌溶血素)	1.8

(a)数字表示原始肺炎链球菌溶血素多肽所有的氨基酸(aa), 但不存在于碳端截短物中。

(b)碳端截短物的溶血活性以全长构建体 pSA-14 的百分比表示。

#### 实施例 4: 多醣-蛋白质轭合物的制备

##### A. 多醣的氧化

肺炎球菌外包膜多醣, 如 4, 6B, 9V, 14, 18, 19F, 及 23F 型, 系购自美国型式培养公司(American Type Culture Collection; Manassas, VA)。将 10mg 多醣溶于 1mL 蒸馏水中, 4℃ 过夜。第二天加入 1mL 的 0.2M PBS (pH 7.2)。多醣通过与 2mM 的过碘酸钠(MW: 213.9, Sigma)室温下黑暗中反应 10 分钟而被氧化。多余的过碘酸钠与终浓度为 25mM 的乙二醇(MW: 62.07)反应, 予以清除。该含有多醣的反应混合物以 1000mL 的 0.1M PBS(pH 7.2)大量透析 3 倍。



## B.免疫-亲和性柱的制备

### (i)全长 His-标记的肺炎链球菌溶血素的纯化

使大肠杆菌(pET24b 含 C-His-标记的肺炎链球菌溶血素)生长于含 40  $\mu$ L 的 20%蔗糖及 4  $\mu$ L 的 50mg/mL 卡那霉素的 4mL LB 培养基,并于 37 $^{\circ}$ C 持续 160rpm 晃动下培养过夜。将 3mL 的过夜培养物转移至含 1mL 的 20%蔗糖及 100  $\mu$ L 的 50mg/mL 卡那霉素的 100mL LB 培养基,并于持续 160rpm 晃动下培养于 37 $^{\circ}$ C,直到 OD<sub>600</sub> 值到达 0.4-0.5。在 100mL 培养物中加入 400  $\mu$ L 的 1M IPTG,使终浓度为 4mM IPTG。引起基因表达后的 3 小时,以 4000rpm 离心 5 分钟收集细胞。根据实验手册(ProBond Purification System; Invitrogen; Carlsbad, CA)纯化全长的 His-标记肺炎链球菌溶血素。

### (ii)抗 His-标记肺炎链球菌溶血素的多克隆抗体的制备

对新西兰白兔在 4 处不同部位注射 4 剂每剂 25  $\mu$ g 的乳化 His-标记肺炎链球菌溶血素及 TiterMax 辅药(400  $\mu$ L 的 1mg/mL His-标记的肺炎链球菌溶血素及 400  $\mu$ L TiterMax 辅药),一处在一大腿肌肉(i.m.)上,一处背部纵肌上脊椎两侧的皮下(s.c.)。14 天后,收集该兔耳静脉血液 5mL。

如果血清中抗体效价达到 1: 3000 稀释程度,该动物会完全放血。如果抗体效价低于 1: 3000,注射第二剂抗体,一星期后测试该动物(第二剂后 7 天)。重复此步骤,直到达到适当效价为止。

### (iii)使用亲和性胶蛋白 A 琼脂糖纯化兔 IgG

将受 His-标记肺炎链球菌溶血素免疫的兔血清加入亲和性胶蛋白 A 柱,以 10mM 磷酸钠及 150mM NaCl(pH 8.2)平衡。以 10 倍体积清洗后,免疫球蛋白以 2-5 倍体积的 100mM 柠檬酸钠(pH 3.0)洗提。收集该 IgG,并于 280 处测量其 OD 值。再向 10DG 柱中加入 3ml 纯化的 IgG,丢弃第一个流出的 3ml 洗提液。在该柱中加入 3.5ml 的组合的缓冲液(150mM NaCl 及 100mM 醋酸钠 pH 5.5)或 0.1M 3-(N-吗啉)丙烷磺酸(MOPS)缓冲液。收集 3.5ml IgG 洗提液,进一步与亲和性

胶 Hz 或亲和性胶 10 偶合。

(iv)使用 IgG 与亲和性胶 10 自由偶合制备免疫亲和性柱

亲和性胶 10 为衍生的交叉偶合琼脂糖胶颗粒支持体的 N-羟基琥珀酰亚胺酯，其通过一级胺与所有配位体偶合。为了与 IgG 偶合，将亲和性胶 10 移至 15ml 管中，并以冷 DDH<sub>2</sub>O 清洗 3 次及冷 0.1M MOPS 缓冲液(pH 7.0)清洗两次。将纯化的 IgG 加入含事先清洗的亲和性胶 10 的 15ml 管中，4℃ 下端对端旋转 4 小时。剩余的亲和性胶 10 的活性酯通过加入 100mM Tris HCl pH 8.0 在 4℃ 下经 0.5 小时终止反应。将该胶移至 1.5 x 9.0cm 柱中。收集该柱的洗提液并测量其 OD280 值。以 2 倍体积的 0.5M NaCl 及 25mM Tris HCl(pH 8.0)清洗亲和性胶 10 免疫亲和性柱。再收集该柱洗提液并测量其 OD280 值。根据所有 IgG 的浓度与未偶合的 IgG 的浓度，计算偶合率。

(v)免疫亲和性柱的检验

为了测试免疫亲和性柱，将 DEAE-琼脂糖(Sepharose)层析法中假肺炎链球菌溶血素部分加入 25mM Tris HCl(pH 8.0)、0.5M NaCl 及 0.5% Triton X-100 中。将样本加入 6.5ml 亲和性胶 10 柱(1.5 x 12cm)，以 0.5M NaCl 及 25mM Tris HCl(pH 8.0)在流速 1mL/2 分钟下平衡。收集经分层的流液。以 15mL 的 0.5M NaCl 及 25mM Tris HCl(pH 8.0)清洗该柱 2-3 次。再以 5mL 的 4M 尿素清洗该柱。该粘着的假肺炎链球菌溶血素蛋白质以 7mL 的 4M 尿素洗提 2 次。第一次 7mL 的 4M 尿素分层的蛋白质样本以 9% SDS-PAGE 分析，并以考马斯蓝(Coomassie)R-20 染色，使可目视。

### C.重组假肺炎链球菌溶血素蛋白质的制备

经表达载体 pSA-49(编码碳端缺乏 7 个氨基酸肺炎链球菌溶血素的多肽)转形的细菌生长于含 30mL LB 培养基及 100 μg/ml 安比西林的 50mL 管中，37℃ 过夜。次日早上，将 13ml 的该过夜培养物与含 100 μg/mL 安比西林及 0.2%蔗糖的 400mL LB 培养基于 37℃ 摇晃下培养于 1L 烧瓶中。细胞密度相对 A600 为 0.5，通过加入 2 mM 或 4mM

IPTG 3 小时来引起假肺炎链球菌溶血素蛋白质的表达。

在 500mL 离心管中以 6,500rpm 离心细菌 10 分钟。将该细菌沉淀颗粒重悬浮于含 100  $\mu$ g/mL 溶菌酶的 40mL Tris HCl 缓冲液(pH 8.0)中，在冰上培养 15 分钟，及在冰上 10 秒激发超声 3 次。将该溶菌产物冷冻于 -80 $^{\circ}$ C 10 分钟，在 37 $^{\circ}$ C 解冻 5 分钟。此细胞溶菌产物经超音波-冷冻-解冻处理 2 次以上。不能溶解的细胞碎片经 6,000rpm 离心 20 分钟而移除。将上层溶菌产物经过 0.8  $\mu$ M 过滤器。流经蛋白质的液体由 9% SDS PAGE 分析，并以考马斯蓝(Coomassie)R-250 染色，使可目视。溶菌粗产物再进一步由 DEAE-琼脂糖(Sepharose)层析法纯化。

将 20ml 细菌溶菌粗产物加入含有以 25mM Tris-HCl(pH 8.0)平衡的 DEAE-琼脂糖(Sepharose)的柱(5 x 12cm)中。收集第一次流出的液体后，将 10ml 的 25mM Tris-HCl 加入该柱中。收集 10ml 的流出液，与第一次流出液加在一起分层(分层 1)。然后，加入 35mL 的 25mM Tris-HCl(pH 8.0)，收集流出液(分层 2)。加入另一 35mL 的 25mM Tris-HCl(pH 8.0)，收集流出液(分层 3)。以 4M NaCl 及 25mM Tris HCl 洗提该粘着的细菌蛋白质(分层 4)。以 280nm 的 OD 测量每一分层的蛋白质浓度。蛋白质样本由 9% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析，并以考马斯蓝(Coomassie)R-20 染色，使可目视。含有假肺炎链球菌溶血素的流出液(分层 1 及 2)再进一步由免疫亲和色谱法纯化。

DEAE-琼脂糖(Sepharose)层析法后，将含有假肺炎链球菌溶血素的分层加入 25mM Tris HCl(pH 8.0)、0.5M NaCl 及 0.5% Triton X-100 中。该样本以流速 1mL/2 分钟加入与兔抗肺炎链球菌溶血素 IgG 偶合的 6.5mL 亲和性胶 10 柱(1.5 x 12cm)，其以 0.5M NaCl 及 25mM Tris HCl(pH8.0)平衡。收集流出液。以 15mL 的 0.5M NaCl 及 25mM Tris HCl(pH 8.0)清洗该柱 3 次。再以 5mL 的 4M 尿素清洗该柱。以 7mL 的 4M 尿素洗提该粘着的假肺炎链球菌溶血素蛋白质 2 次。以 SDS-PAGE 分析未粘着于及粘着于分层的蛋白质样本，并以考马斯蓝(Coomassie)R-20 染色，使可目视。

免疫亲和色谱法后，由 4M 尿素洗提的含假肺炎链球菌溶血素分

层再以 10DG 层析法纯化，去除尿素。在 10DG 柱(1.5 x 12cm)中加入 3.0ml 样本，该 10DG 柱经 1 x PBS 缓冲液平衡。丢弃第一次流出的 3ml 流出液。该柱中加入 3.9mL 的 1 x PBS 缓冲液。测量从柱中收集的该 3.9ml 分层的 OD280 值，并收集该蛋白质分层。蛋白质的纯度以 9% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

#### D.多糖-蛋白质复合物的制备

使用还原胺化作用分析，将 2mg 的肺炎链球菌多糖 18C 与假肺炎链球菌溶血素蛋白质(详述见上述 C 部分)直接复合。在所述氧化的多糖反应混合物中加入溶于 0.1M PBS 的 10mg 假肺炎链球菌溶血素，室温下轻微搅拌培养 30 分钟。加入氰基硼氢化钠使终浓度为 20mM(如 750  $\mu$ L 的 100mM 氰基硼氢化物加入 3ml 的氧化多糖及假肺炎链球菌溶血素混合物中)。将该混合物于室温下轻微搅拌培养 5 天。将该复合物于 9,000rpm 沉淀 10 分钟，然后溶于 1-2mL 0.1M PBS, pH7.2。将该混合物于经 1 x PBS, pH7.2 平衡的琼脂糖 (Sephacrose)CL-4B 柱(1.5 x 100cm)中层析。将含有蛋白质及多糖的分层倒在一起，以 Amicon Centricon-30 浓缩(分离点为分子量 30,000)，然后分析蛋白质及多糖含量。

#### 实施例 5: 小鼠体中对多糖-蛋白质复合物的抗体反应

如实施例 4 所制备的肺炎链球菌 14, 18C, 19F, 23F, 4, 6B 及 9V 型多糖-假肺炎链球菌溶血素蛋白质复合物，测试其提高小鼠体内抗多糖及肺炎链球菌溶血素的抗体的能力。将所述复合物，每剂 0.3、1、3  $\mu$ g 的多糖与氢氧化铝辅药(每剂 0.1mg)混合物结合，腹膜内注射于雌 NIH 瑞士小鼠群。在某些实验中，第二群小鼠接受 1  $\mu$ g 多糖，及/或第三群小鼠接受 1  $\mu$ g 假肺炎链球菌溶血素。小鼠两次注射间以 2 星期为间隔。最后一次注射后的 7 天，测量抗多糖的抗体血清浓度及抗肺炎链球菌溶血素的抗体血清浓度。表 2 总结了给药的特定复合物及第 1-14 图中所示实验所测量的免疫反应。

表 2: 小鼠免疫实验中给药的轭合物与检测的抗体的总表

图示编号	轭合物中肺炎链球菌多糖血清型成分	测量的抗体反应
1	14	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
2	14	抗 14 型多糖 IgG 抗体
3	18C	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
4	18C	抗 18C 型多糖 IgG 抗体
5	19F	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
6	19F	抗 19F 型多糖 IgG 抗体
7	23F	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
8	23F	抗 23F 型多糖 IgG 抗体
9	4	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
10	4	抗 4 型多糖 IgG 抗体
11	6B	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
12	6B	抗 6B 型多糖 IgG 抗体
13	9V	抗肺炎链球菌溶血素 IgG 抗体
14	9V	抗 9V 型多糖 IgG 抗体

以下缩写为使用于第 1-14 图中：磷酸缓冲液生理盐水(PBS)、轭合物(C)、氢氧化铝辅药(A)、及假肺炎链球菌溶血素(PPN)。

受该多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫的小鼠显示出抗体的引起，该抗体经 ELISA 与 His-标记野生型肺炎链球菌溶血素反应。对于所有接受该轭合物及辅药的小鼠群，其抗肺炎链球菌溶血素与抗多糖的抗体水平显著高于仅加入 PBS 及辅药的对照组( $p < 0.001$ , t-test)。与仅给予 PBS 的小鼠群相比，给予该轭合物的小鼠血清中显示无法预期的高滴定度的抗肺炎链球菌溶血素抗体及抗多糖抗体，其血清稀释因子各为 76800 及 9600。小鼠中观察到最高的抗肺炎链球

菌溶血素抗体及抗多醣抗体浓度是接受 3.0  $\mu\text{g}$  的多醣-假肺炎链球菌溶血素轆合物(图 1-14)。相较于接受假肺炎链球菌溶血素与辅药(图 3)、或仅接受假肺炎链球菌溶血素而无辅药者(图 6), 接受多醣-假肺炎链球菌溶血素的轆合物与辅药的小鼠群有较高的抗肺炎链球菌溶血素抗体浓度。

表 3 及表 4 显示接受 3.0  $\mu\text{g}$  轆合物的小鼠为具有最高百分比的反应者。此结果指出肺炎球菌疫苗的有效性可通过多醣与假肺炎链球菌溶血素蛋白质的轆合物予以改善。除该抗体反应外, 还对给予该轆合物疫苗的小鼠(实施例 8)进行交叉保护性免疫及细菌清除率检测。

表 3: 具有抗 18C 型多醣阳性反应的小鼠比例

小鼠群	阳性反应者比例
氢氧化铝辅药	0%
1 $\mu\text{g}$ 假肺炎链球菌溶血素(PPN)	0%
1 $\mu\text{g}$ 18C 型多醣(PS) + 辅药	0%
0.3 $\mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 轆合物 + 辅药	60%
1.0 $\mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 轆合物 + 辅药	75%
3.0 $\mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 轆合物 + 辅药	100%
1.0 $\mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 轆合物, 但无辅药	20%

注: 阳性反应者是自所有小鼠的 1:100 稀释血清样本所确认。当其 A405nm 光学读数高于 0.05 则显示为阳性反应。

表 4: 具有抗 14 型多醣阳性反应的小鼠比例

小鼠群	阳性反应者比例
氢氧化铝辅药	0%
1 $\mu\text{g}$ 假肺炎链球菌溶血素(PPN)	0%
1 $\mu\text{g}$ 14 型多醣(PS) + 辅药	0%
0.3 $\mu\text{g}$ 14 (PS)-PPN 轆合物 + 辅药	100%
1.0 $\mu\text{g}$ 14 (PS)-PPN 轆合物 + 辅药	100%
3.0 $\mu\text{g}$ 14 (PS)-PPN 轆合物 + 辅药	100%
1.0 $\mu\text{g}$ 14 (PS)-PPN 轆合物, 但无辅药	20%

注: 阳性反应者是自所有小鼠的 1:300 稀释血清样本所确认。当其 A405nm 光学读数高于 0.12 则显示为阳性反应。

图 15 显示小鼠在第 3 次注射 14 型多醣-假肺炎链球菌溶血素轆

合物后 7 天, 对 14 型多糖的抗体反应。图 15 中, G1、G2、及 G3 各为每只注射 0.3  $\mu\text{g}$ 、1.0  $\mu\text{g}$ 、及 3.0  $\mu\text{g}$  所述轭合物疫苗的小鼠群。G4 为仅注射 1.0  $\mu\text{g}$  的 14 型多糖的小鼠群。G5 及 G6 各为仅注射 1.0 及 3.0  $\mu\text{g}$  假肺炎链球菌溶血素的小鼠群。G7 为注射 1.0  $\mu\text{g}$  的 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物疫苗而无辅药的小鼠群。G4、G5、G6 小鼠群中观察到很少或几乎没有对抗多糖的抗体反应。

### 实施例 6: 假肺炎链球菌溶血素、肺炎球菌自溶素及肺炎球菌表面蛋白质 DNA 疫苗的表达式体的构建

#### A. DNA 疫苗构建的 pVAX1 载体

pVAX1 载体(Invitrogen)为特定设计为 DNA 疫苗发展的载体。其构成符合美国食品药品监督管理局文件“评价质粒 DNA 疫苗的重点, 作为预防传染疾病的指示”, 出版于 1996 年 12 月 22 日。

#### B. 假肺炎链球菌溶血素的克隆及表达

以含有肺炎球菌 19A 型染色体 DNA 的引物及模板的即可使用 PCR 珠(Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ)进行 PCR 反应。PCR 以第一周期为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、4 分钟; 随后 30 周期为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分钟; 55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分钟; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 分钟; 最后一周期为 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分钟进行。

该放大的 PCR 产物以限制性内切酶消化, 连接至 pVAX1 载体的该位点, 形成 pSA-8, pSA-45, pSA-12, pSA-42, 及 pSA-41。将该重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞, 再以限制性内切酶消化检查。该插入的基因以 DNA 序列分析予以分析。体外的转录及翻译使用 TnT 试剂盒依照操作手册(Promega, Madison, WI)进行以确认该插入基因的表达。

所述 pSA-8 表达载体编码由肺炎链球菌溶血素蛋白质序列识别号:1 的 1-460 氨基酸组成的多肽。所述插入部分的形成如上文所述, 是 使 用 LSYN-15 引 物 (5' -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号 :4) 及 LSYN-4 引 物 (5' -GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3' ; 序列

识别号:5), 放大 1380 碱基对 DNA。此 1380 碱基对的 PCR 产物随后经 *NheI* 及 *BamHI* 限制性切割, 连接至 pVAX1 载体的 *NheI* 及 *BamHI* 位, 形成 pSA-8。

所述 pSA-45 表达载体编码由肺炎链球菌溶血素蛋白质序列识别号:1 的 1-464 氨基酸组成的多肽。该插入部分的形成是使用 LSYN-15(5', -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号 :4) 及 LSYN-105(GACTGGATCCCTATACCTGAGGATAGAGAGTTG; 序列识别号:27), 放大 1392 碱基对 DNA, 随后经 *NheI* 及 *BamHI* 限制性切割, 连接至 pVAX1 载体的 *NheI* 及 *BamHI* 位, 形成 pSA-45。

pSA-12 表达载体编码由肺炎链球菌溶血素蛋白质序列识别号:1 的 1-466 氨基酸组成的多肽。所述插入部分的形成是使用 LSYN-15 引物 (5', -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号 :4) 及 LSYN-17 引物 (5', -GACTGGATCCTTACTAATCTTCTACCTGAGGATAG-3' ; 序列识别号:6), 放大 1398 碱基对 DNA。此 1398 碱基对的 PCR 产物随后经 *NheI* 及 *BamHI* 限制性切割, 连接至 pVAX1 载体的 *NheI* 及 *BamHI* 位, 形成 pSA-12。

所述 pSA-42 表达载体编码由肺炎链球菌溶血素蛋白质序列识别号:1 的 1-469 氨基酸组成的多肽。所述插入部分的形成如上所述是使用 LSYN-15 引物 (5', -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号 :4) 及 LSYN-37 引物 (5', -GACTGGATCCTTACTATTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3' ; 序列识别号:7), 放大 1407 碱基对 DNA。此 1407 碱基对的 PCR 产物随后经 *NheI* 及 *BamHI* 限制性切割, 连接至 pVAX1 载体的 *NheI* 及 *BamHI* 位, 形成 pSA-42。

所述 pSA-41 表达载体编码由肺炎链球菌溶血素蛋白质序列识别号:1 的 1-470 氨基酸组成的多肽。所述插入部分的形成如上所述, 是



使 用 LSYN-15 引 物 (5' -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序 列 识 别 号 :4) 及 LSYN-38 引 物 (5' -GACTGGATCCTTACTAATTTTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3' ; 序 列 识 别 号 :8), 放 大 1410 碱 基 对 DNA。 此 1410 碱 基 对 的 PCR 产 物 随 后 经 NheI 及 BamHI 限 制 性 切 割, 连 接 至 pVAX1 载 体 的 NheI 及 BamHI 位, 形 成 pSA-41。

含有特定序列或基序的未甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤(“CpG”)双核苷酸的核酸可能为体外多种免疫细胞的刺激物。含 CpG 基序的合成寡核苷酸可直接活化先天免疫系统, 其通过刺激 B 细胞以增殖及分泌免疫球蛋白、IL-6 及 IL-10、NK 细胞而产生 IFN- $\gamma$ 、及单核球及树突细胞而产生 IL-6, IL-12, IL-18 TNF- $\alpha$  及 IFN- $\alpha$ 。由未甲基化 CpG 双核苷酸构成的 DNA 基序, 其由两个 5' 嘌呤及两个 3' 嘧啶侧面绕过, 所述 DNA 基序刺激 B 细胞产生 IL-6 及 IL-12, 以及刺激 CD4+T 细胞产生 IL-6 及 IFN- $\gamma$ 。

肺炎链球菌溶血素的结构-功能分析证实, 该多肽碳端的一个区域(位于氨基酸 427-437)含有半胱氨酸残基, 为细胞毒性的关键区。此半胱氨酸基序在其它硫活化的溶细胞素族中高度保留。在此区中的多种单一氨基酸取代物显著降低肺炎链球菌溶血素的细胞毒性。以下核酸构建体通过引起 GAGCGTT 进入肺炎链球菌溶血素核苷酸 1272-1274 位(通过导向突变位置), 使 CpG 基序取代半胱氨酸基序。含有 GAGCGTT 免疫刺激序列的突变核酸如下:

ATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACTTTATACTAGCTATGAATT  
 ACGATAAAAAGAACTCTTGACCCATCAGGGAGAAAGTATTGA  
 AAATCGTTTCATCAAAGAGGGTAATCAGCTACCCGATGAGTTT  
 GTTGTTATCGAAAGAAAGAAGCGGAGCTTGTCGACAAATACAA  
 GTGATATTTCTGTAACAGCTACCAACGACAGTCGCCTCTATCCT  
 GGAGCACTTCTCGTAGTGGATGAGACCTTGTTAGAGAATAATC  
 CCACTCTTCTTGCGGTCGATCGTGCTCCGATGACTTATAGTATT  
 GATTTGCCTGGTTTGGCAAGTAGCGATAGCTTTCTCCAAGTGGA  
 AGACCCAGCAATTCAAGTGTTGCGGAGCGGTAAACGATTTG

TTGGCTAAGTGGCATCAAGATTATGGTCAGGTCAATAATGTCC  
 CAGCTAGAATGCAGTATGAAAAAATCACGGCTCACAGCATGGA  
 ACAACTCAAGGTCAAGTTTGGTTCTGACTTTGAAAAGACAGGG  
 AATTCTCTTGATATTGATTTTAACTCTGTCCATTCAGGGCGAAAA  
 GCAGATTCAGATTGTTAATTTTAAGCAGATTTATTATACAGTCA  
 GCGTAGATGCTGTTAAAAATCCAGGAGATGTGTTTCAAGATAC  
 TGTAACGGTAGAGGATTTAAACAGAGAGGAATTTCTGCAGAG  
 CGTCCTTTGGTCTATATTTTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCAAGT  
 CTATCTCAAGTTGGAAACCACGAGTAAGAGTGATGAAGTAGAG  
 GCTGCTTTTGAAGCTTTGATAAAAGGAGTCAAGGTAGCTCCTC  
 AGACAGAGTGGAAACAGATTTTGGACAATACAGAAGTGAAGG  
 CGGTTATTTTAGGGGGCGACCCAAGTTCGGGTGCCCGAGTTGT  
 AACAGGCAAGGTGGATATGGTAGAGGACTTGATTCAAGAAGG  
 CAGTCGCTTTACAGCAGATCATCCAGGCTTGCCGATTTCTATA  
 CAACTTCTTTTTTACGTGACAATGTAGTTGCGACCTTTCAAAT  
 AGTACAGACTATGTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACG  
 GAGATTTACTGCTGGATCATAGTGGTGCCTATGTTGCCCAATAT  
 TATATTACTTGGAATGAATTATCCTATGATCATCAAGGTAAGGA  
 AGTCTTGACTCCTAAGGCTTGGGACAGAAATGGGCAGGATTTA  
 ACGGCTCACTTTACCACTAGTATTCCTTTAAAAGGGAATGTTCG  
 TAATCTCTCTGTCAAATTAGAGAGCGTTCCGGGCTTGCCCTGGG  
 AATGGTGGCGTACGGTTTATGAAAAAACCGATTTGCCACTAGT  
 GCGTAAGCGGACGATTTCTATTTGGGGAACAACCTCTCTATCCTC  
 AGGTAGAAGATAAGGTAGAAAATGAC(序列识别号:9)。

另一实施例中，该免疫刺激 DNA 序列 GAGCGTT 插入(通过导向突变位置)碳端有 33 个核苷酸缺失的假肺炎链球菌溶血素的核苷酸位置 1272-1274。含有所述免疫刺激序列的该假肺炎链球菌溶血素 DNA 如下：

ATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACTTTATACTAGCTATGAATT  
 ACGATAAAAAGAACTCTTGACCCATCAGGGAGAAAGTATTGA  
 AAATCGTTTCATCAAAGAGGGTAATCAGCTACCCGATGAGTTT

GTTGTTATCGAAAGAAAGAAGCGGAGCTTGTCGACAAATACAA  
GTGATATTTCTGTAACAGCTACCAACGACAGTCGCCTCTATCCT  
GGAGCACTTCTCGTAGTGGATGAGACCTTGTTAGAGAATAATC  
CCACTCTTCTTGCGGTCGATCGTGCTCCGATGACTTATAGTATT  
GATTTGCCTGGTTTGGCAAGTAGCGATAGCTTTCTCCAAGTGGA  
AGACCCAGCAATTCAAGTGTTTCGCGGAGCGGTAAACGATTTG  
TTGGCTAAGTGGCATCAAGATTATGGTCAGGTCAATAATGTCC  
CAGCTAGAATGCAGTATGAAAAAATCACGGCTCACAGCATGGA  
ACAACCAAGGTCAAGTTTGGTTCTGACTTTGAAAAGACAGGG  
AATTCTCTTGATATTGATTTTAACTCTGTCCATTCAGGCGAAAA  
GCAGATTCAGATTGTTAATTTTAAAGCAGATTTATTATACAGTCA  
GCGTAGATGCTGTAAAAAATCCAGGAGATGTGTTTCAAGATAC  
TGTAACGGTAGAGGATTTAAACAGAGAGGAATTTCTGCAGAG  
CGTCCTTTGGTCTATATTTTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCAAGT  
CTATCTCAAGTTGGAAACCACGAGTAAGAGTGATGAAGTAGAG  
GCTGCTTTTGAAGCTTTGATAAAAGGAGTCAAGGTAGCTCCTC  
AGACAGAGTGGAAACAGATTTTGGACAATACAGAAGTGAAGG  
CGGTTATTTTAGGGGGCGACCCAAGTTCGGGTGCCCGAGTTGT  
AACAGGCAAGGTGGATATGGTAGAGGACTTGATTCAAGAAGG  
CAGTCGCTTTACAGCAGATCATCCAGGCTTGCCGATTTCTATA  
CAACTTCTTTTTTACGTGACAATGTAGTTGCGACCTTTCAAAT  
AGTACAGACTATGTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACG  
GAGATTTACTGCTGGATCATAGTGGTGCCTATGTTGCCCAATAT  
TATATTAAGTTGGAATGAATTATCCTATGATCATCAAGGTAAGGA  
AGTCTTGACTCCTAAGGCTTGGGACAGAAATGGGCAGGATTTA  
ACGGCTCACTTTACCACTAGTATTCCTTTAAAAGGGAATGTTTCG  
TAATCTCTCTGTCAAATTAGAGAGCGTTCCGGGCTTGCCCTGGG  
AATGGTGGCGTACGGTTTATGAAAAAACCAGATTTGCCACTAGT  
GCGTAAGCGGACGATTTCTATTTGGGGAACAACCTCTC(序列识别  
号:10)。

#### D.肺炎球菌自溶素基因的克隆及表达

所述 pSA-59 表达载体编码 316 个氨基酸自溶素(Aly)多肽。使用含有肺炎球菌 19A 染色体 DNA 的引物核模板的即可使用 PCR 珠，将 19A 型 Aly 基因系由 PCR 反应放大。PCR 以第一周期为 94℃、4 分钟；随后 30 周期为 94℃、1 分钟；50℃、1 分钟；72℃、1 分钟 15 秒；最后一周期为 72℃、10 分钟进行。该插入部分的形成是使用 LSYN-74 引物 (5' -GACTAAGCTTGCCACCATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAG-3' ; 序列识别号 :11) 及 LSYN-89 引物 (5' -CTGACTCGAGTTATTTTACTGTAATCAAGCCATC-3' ; 序列识别号:12)，放大 948 碱基对 DNA。

此 PCR 合成的 DNA 随后经 HindIII 及 XhoI 消化，并连接至 pVAX1 载体的 HindIII 及 XhoI 位，形成 pSA-59(Aly)。将该重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞，再以限制性内切酶、HindIII 及 XhoI 消化检查。该 Aly 插入基因以 DNA 序列分析确认。体外的转录及翻译使用 TnT 试剂盒(Promega, Madison, WI)依照操作手册进行以确认 pSA-59 的表达。

所述 pSA-59 Aly 插入部分的核酸序列如下：  
 ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAG  
 TTGGCGTGCAACCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGG  
 GAATCCGCATTCAACCGTACAGAATGAAGCGGATTATCATTGG  
 CGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTTCTCGCACATTGTTGGGA  
 ACGGATGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTAATAATGGTGCCTG  
 GGACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTT  
 GAACTGATTGAAAGCCATTCAACTAAAGAAGAGTTCATGACGG  
 ACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGCAATCTAGCAGATGAA  
 GCAGGTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTTAGCTGGAA  
 TAAAACGCACGAGTATTGCACGAATAACCAACCAACAACCA  
 CTCAGACCATGTGGATCCATACCCTTACTTGGCAAATGGGGC  
 ATTAGCCGTGAGCAGTTTAAGCATGATATTGAGAACGGCTTGA  
 CGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTGGCTACTGGTA  
 CGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAA

ATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCT  
 TGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAATTGGTACTAC  
 TTTGACCAATCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCG  
 CTGAGAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGAC  
 AGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCT  
 AAAGAAGGCGCAATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGG  
 ACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGGAACACTGGC  
 AGACAAGCCAGAATTCACAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACA  
 GTAAAA(序列识别号:13)。

pSA-59 Aly 插入部分编码的氨基酸序列如下：  
 MEINVSKLRTDLPQVGVQPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWR  
 KDPELGFFSHIVGNGCIMQVGPVNNGAWDVGGGWNAETYAAVE  
 LIESHSTKEEFMTDYRLYIELLRNLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTH  
 EYCTNNQPNNHSDHVDPPYLAKEWGISREQFKHDIENGLTIETGW  
 QKNDTGYWYVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWR  
 KHTDGNWYYFDQSGEMATGWKKIAEKWYYFNEEGAMKTGWV  
 KYKDTWYYLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWYYLKPDLADKP  
 EFTVEPDGLITVK(序列识别号:14)。

### E. 氨端肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)基因的克隆及表达

所述 pSA-60 表达载体编码 459 个氨基酸 PspA 多肽。使用含有肺炎球菌 19A 染色体 DNA 引物核模板的即可使用 PCR 珠，19A 型 PspA 基因由 PCR 反应放大。PCR 以第一周期为 94℃、4 分钟；随后 30 周期为 94℃、1 分钟；50℃、1 分钟；72℃、1 分钟 15 秒；最后一周期为 72℃、10 分钟进行。该插入部分的形成使用 LSYN-90(5' -GACTAAGCTTGCCACCATGGAAGAAGCTCCCGTAGCTAGTCAG -3'；序列识别号:15) 与 LSYN-78 引物 (5' -GACTCTCGAGCTATCCATCAGGGCCTAACTCATTAAG-3'；序列识别号:16)，放大 1377 碱基对 DNA。此 PCR 合成产物随后经 HindIII 及 XhoI 消化，并连接至 pVAX1 载体的 HindIII 及 XhoI 位，形成 pSA-60(PspA)。将该重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DH5α 细胞，

再以限制性内切酶、HindIII及XhoI消化检查。该PspA插入基因以DNA序列分析确定。体外的转录及翻译使用TnT试剂盒(Promega, Madison, WI)依据操作手册进行以确认pSA-60的表达。

所述 pSA-60 PspA 插入部分的核酸序列如下：  
ATGGAAGAAGCTCCCGTAGCTAGTCAGTCTAAAGCTGAGAAAG  
ACTATGATGCAGCAGTGAAAAAATCTGAAGCTGCTAAGAAGGC  
TTACGAAGAAGCTAAAAAGAAAGCAGAAGACGCTCAGAAAAA  
ATATGATGAGGATCAGAAGAAAAGCTGAGGCAAAGCGGATAA  
GGAAGCAAAGCATCTGCGGAAATAGATAAAGCCACGTTTGCT  
GTACAAAGTGCGTATGTAAAATTTTTAAATGTCCAATCTAATCG  
TCAAATTCGGAGAATGAACGAAAAACAATTAGCAGAAAT  
AGATAAAGAGATAGAGAATGCTAAACAAAATTTACAGAATAA  
ACAGGAAGAATTTAATAAGGTTAGAGCAGAAGTAATTCCTGAA  
GCAAAGGGGTTAGCTGTTACTAAACAAAAGCGGAAGAAGCT  
AAAAAAGAAGCAGAAGTAGCTAAGAGAAAATATGATTATGCA  
ACTCTAAAGGTAGCACTAGCGAAGAAAGAAGTAGAGGCTAAG  
GAACTTGAAATTGAAAACTTCAATATGAAATTTCTACTTTGGA  
ACAAGAAGTTGCTATTGCTCAACATCAAGTAGATAATTTGAAA  
AACTTCTTGCTGGTGCGGATCCTGATGATGGCACAAAAGTTA  
TAGAAGCTAAATTAACAAAGGAGAAGCTGAGCTAAACGCTA  
ACAAGCTGAGTTAGCAAAAAACAAACAGAACTTGAAAAAC  
TTCTTGACAGCCTTGATCCTGAAGGTAAGACTCAGGATGAATT  
AGATAAAGAAGCTGCTGAAGCTGAGTTGGATAAAAAAGCTGAT  
GAACTTCAAATAAAGTTGCTGATTTAGAAAAAGGAATTGCTC  
CTTATCAAATCAAAGTCGCTGAATTAATAAAGAAATTGCTAG  
ACTTCAAAGCGATTTAAAAGATGCTGAAGAAAATAATGTAGAA  
GACTATATTAAGAAGGTTTAGAGCAAGCTATCGCTGATAAAA  
AAGCTGAATTAGCTACAACCAACAAAACATAGATAAAACTCA  
AAAAGATTTAGAGGATGCTGAATTAGAACTTGAAAAAGTATTA  
GCTACATTAGACCCTGAAGGTA AAACTCAAGATGAATTAGATA  
AAGAAGCTGCAGAAGATGCTAATATTGAAGCTCTTCAAACAA

AGTTGCTGATCTAGAAAACAAGGTTGCTGAATTAGATAAAGAA  
GTTACTAGACTTCAAAGCGATTTAAAAGATGCTGAAGAAAACA  
ATGTAGAAGACTACGTTAAAGAAGGCTTAGATAAAGCTCTTAC  
TGATAAAAAAGTTGAATTAAATAATACTCAAAAAGCATTAGAT  
ACTGCTCAAAAAGCATTAGATACTGCTCTTAATGAGTTAGGCC  
CTGATGGA(序列识别号:17)。

pSA-60 PspA 插入部分编码的氨基酸序列如下：  
MEEAPVASQSKAEKDYDAAVKKSEAAKKAAYEEAKKKAEDAQKK  
YDEDQKKTEAKADKEAKASAEIDKATFAVQSAYVKFLNVQSNRQ  
ISENERKKQLAEIDKEIENAKQNLQNKQEEFNKVRAEVIPEAKGLA  
VTKQKAEEAKKEAEVAKRKYDYATLKVALAKKEVEAKELEIEKL  
QYEISTLEQEVAVIAQHQVDNLKKLLAGADPDDGTKVIEAKLNKGE  
AELNAKQAEALAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDELDKEAAEAELD  
KKADELQNKVADLEKGIAPYQIKVAELNKEIARLQSDLKDAEENN  
VEDYIKEGLEQAIADKKAELATTQQNIDKTQKDLEDAELELEKVL  
ATLDPEGKTQDELDKEAAEDANIEALQNKVADLENKVAELDKEV  
TRLQSDLKDAEENNVEDYVKEGLDKALTDKKVELNNTQKALDT  
AQKALDTALNELGPDG(序列识别号:18)。

### 实施例 7: DNA 疫苗的免疫原性

质粒载体 pSA-7 编码全长的肺炎链球菌溶血素蛋白质。使用含有肺炎球菌 19A 染色体 DNA 的引物和模板的即可使用 PCR 珠, 19A 型 Ply 基因由 PCR 反应放大。PCR 以第一周期为 94℃、4 分钟; 随后 30 周期为 94℃、1 分钟; 55℃、1 分钟; 72℃、1.5 分钟; 最后一周期为 72℃、10 分钟。使用 LSYN-15 引物 (5' -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号:4)互补于 Ply 的 5' 端核苷酸 1-24, 以及 LSYN-3 引物(5' -CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3' ; 序列识别号:3)互补于 Ply 的 3' 端核苷酸 1396-1413, 放大 1413 碱基对 DNA, 编码全长 471 氨基酸的野生型 Ply 蛋白质。此 PCR 合成的 DNA 片段随后经 *NheI* 及 *BamHI* 限制性切割, 并连接至 pVAX1 表达载体的 *NheI* 及 *BamHI* 位, 形成 pSA-7。将该重组 DNA 通过转化引入大肠

杆菌 DH5  $\alpha$  细胞,再以限制性内切酶、NheI 及 BamHI 消化检查。该插入 19A 型野生型 Ply 基因以 DNA 序列分析确定。

质粒载体 pSA-10 编码碳端截断的肺炎链球菌溶血素蛋白质(Ply 碳端上缺乏 114 个氨基酸)。使用含有肺炎球菌 19A 染色体 DNA 的引物和模板的即可使用 PCR 珠,19A 型 Ply 基因由 PCR 反应放大。PCR 以第一周期为 94 $^{\circ}$ C、4 分钟;随后 30 周期为 94 $^{\circ}$ C、1 分钟;55 $^{\circ}$ C、1 分钟;72 $^{\circ}$ C、1.5 分钟;最后一周期为 72 $^{\circ}$ C、10 分钟进行。使用 LSYN-15 引物 (5' -GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号:4)互补于 Ply 的 5' 端核苷酸 1-24,以及 LSYN-6 引物(5' -CTGAGGATCCTTACTAAGCTGTAACCTTAGTCTC-3' ; 序列识别号:19)互补于 Ply 的 3' 端核苷酸 1054-1071,来放大 1071 碱基对 DNA,编码全长 357 氨基酸多肽。此 PCR 合成的 DNA 片段随后经 NheI 及 BamHI 限制性切割,并连接至 pVAX1 表达载体的 NheI 及 BamHI 位,形成 pSA-10。将该重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞,再以 NheI 及 BamHI 限制性内切酶消化检查。该插入 19A 型假肺炎链球菌溶血素基因以 DNA 序列分析确定。

质粒载体 pSA-26 编码具有 CpG 基序的全长肺炎链球菌溶血素。含有两个在 3' 端具有 CpG 基序的互补寡核苷酸的 PCR 引物 LSYN-34 及 LSYN-33 用于 PCR1 及 PCR2 的引物。第二引物 LSYN-15 及 LSYN-3 分别互补于肺炎链球菌溶血素氮端及碳端序列。在分别放大反应中,第一 PCR 产物为 PCR1(1.2kb)及 PCR2(150bp),其由引物 LSYN-15 和-34(PCR1)以及 LSYN-33 和-3(PCR2),及含全长肺炎链球菌溶血素基因的模板 pSA7 所构成的即可使用 PCR 珠所生成。将第一 PCR 产物混合、变性,作为第二 PCR 产物的模板,并由第二组的引物 LSYN-15 及-3 引导。该第二 PCR 产物用 NheI 及 BamHI 切割,并克隆至 pVAX1 载体的 NheI 及 BamHI 位,形成 pSA-26。PCR 以第一周期为 94 $^{\circ}$ C、4 分钟;随后 30 周期为 94 $^{\circ}$ C、1 分钟;55 $^{\circ}$ C、1 分钟;72 $^{\circ}$ C、1.5 分钟;最后一周期为 72 $^{\circ}$ C、8 分钟进行。

引物 LSYN-3、LSYN-15、LSYN-33 及 LSYN-34 序列如下:

LSYN-3 引物 (5' -CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3' ; 序列识别



号:3);

LSYN-15 引物 (5' ,  
-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ;

序列识别号:4);

LSYN-33 引物 (5' ,  
-CAA AATTAGAGAACGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGG-3' ; 序  
列识别号:20);

LSYN-34 引物 (5' ,  
-GCCC GGAACGTTCTCTAATTTTGACAGAGATTACG-3' ; 序  
列识别号:21)。

将该重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞,再以限制性内切酶、NheI 及 BamHI 消化检查。该含有 CpG 基序的插入 19A 型野生型 Ply 基因以 DNA 序列分析确定。

质粒载体 pSA-27 具有 CpG 基序并编码肺炎链球菌溶血素碳端截短物(11 个氨基酸缺失)。含有两个在 3' 端具有 CpG 基序的互补寡核苷酸的引物 LSYN-34 及 LSYN-33 用作 PCR1 及 PCR2 的引物。第二引物 LSYN-15 及 LSYN-3 分别互补于肺炎链球菌溶血素氮端及碳端序列。在分别放大反应中,第一 PCR 产物为 PCR1(1.2kb)及 PCR2(150bp),其由引物 LSYN-15 与 -34(PCR1)以及 LSYN-33 与 -3(PCR2)、含全长肺炎链球菌溶血素基因的模板 pSA7 所构成的即可使用 PCR 珠所生成。

将第一 PCR 产物混合、变性,作为第二 PCR 产物的模板,该第二 PCR 产物的引物由第二组的引物 LSYN-15 及 -4 引发。该第二 PCR 产物经 NheI 及 BamHI 切割,并克隆于 pVAX1 载体的 NheI 及 BamHI 位,以形成 pSA-27。PCR 以第一周期为 94 $^{\circ}$ C、4 分钟;随后 30 周期为 94 $^{\circ}$ C、1 分钟;55 $^{\circ}$ C、1 分钟;72 $^{\circ}$ C、1 分钟;最后一周期为 72 $^{\circ}$ C、8 分钟进行。该引物 LSYN-3、LSYN-4、LSYN-15、LSYN-33 及 LSYN-34 的寡核苷酸序列如下: LSYN-3 引物 (5' ,  
-CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3' ; 序列识别号 :3) ; LSYN-4 引物 (5' ,  
-GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3' ; 序列识别号 :5) ; LSYN-15 引物 (5' ,

-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列识别号 :4) ; LSYN-33 引物 (5' -CAA AATTAGAGAACGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGG-3' ; 序列识别号 :20) ; LSYN-34 引物 (5' -GCCCGGAACGTTCTCTAATTTTGACAGAGAGATTACG-3' ; 序列识别号:21)。将该重组 DNA 通过转化引入大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞,再以限制性内切酶、NheI 及 BamHI 消化检查。该含有 CpG 基序的插入 19A 型假肺炎链球菌溶血素基因以 DNA 序列分析确定。

疫苗过程必须有 DNA 载体引发及大量产生蛋白质,导致高浓度专一性免疫的产生,以及在某些情况下,对于目前疫苗发展有极大问题的感染源提供保护作用。在这些实验中,兔通过 3 次肺炎链球菌溶血素 DNA 载体引发,并在无辅药下大量生成肺炎链球菌溶血素蛋白质。

图 16 显示使用上述假肺炎链球菌溶血素 DNA 疫苗的引起-大量产生策略的兔体内抗肺炎链球菌溶血素的抗体反应。第 1、2、3 柱条为第一(1)、第二(2)、第三(3)肌肉内注射假肺炎链球菌溶血素 DNA 疫苗后 7 天的免疫反应。第 4 柱条为蛋白质大量生成(200  $\mu$ g 肺炎链球菌溶血素)后 10 天的免疫反应。第 5 柱条为注射 200  $\mu$ g 肺炎链球菌溶血素蛋白质与 TiterMax 辅药后 10 天的抗体反应。此结果证明 DNA 的 3 次注射与蛋白质的大量生成,相较于使用辅药的传统蛋白质免疫方法,导致较高的抗体反应。

将均为 100  $\mu$ g 的 DNA 疫苗 pSA-59、及 pSA-60、及一个载体控制的质粒 DNA 溶于总体积为 0.1ml 的 1 $\times$ PBS 中,肌肉内注射于 Balb/C 小鼠的四头肌或后肢。对小鼠注射 4 剂 100  $\mu$ g DNA 疫苗,每次注射间隔 2 星期。最后一次注射后的第 7 天,以 ELISA 测量 IgG 抗体的血清浓度。接受 4 剂 DNA 疫苗注射的小鼠较对照组产生多于 9600 倍的 IgG 抗体。此结果显示质粒 DNA 可于体内表达自溶素或肺炎球菌表面蛋白 A 抗原,并刺激小鼠免疫系统以产生高浓度的专一性 IgG 抗体。

图 17 为注射第 4 剂 PspA DNA 疫苗后 7 天的对肺炎球菌表面蛋白 A 的抗体反应。图 18 为注射第 4 剂自溶素 DNA 疫苗后 7 天的对肺炎球菌自溶素的抗体反应。

### 实施例 8: 对致命肺炎球菌的异质型的保护性免疫及交叉保护作用

对小鼠腹腔内注射 3 剂  $2.5 \mu\text{g}$  的 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素(-7 氨基酸)轭合物, 注射间隔为 2 星期。对照组以 PBS 代替该轭合物。第三次注射后 8 天, 该免疫小鼠腹腔内注射每 0.1 毫升  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^6$  CFU(菌丛形成单位)肺炎球菌。注射的每毫升确实 CFU 数由羊血琼脂糖盘上的菌斑计算得知。在感染后 1、3、5 小时, 取每只小鼠的  $5 \mu\text{l}$  及  $20 \mu\text{l}$  血液样本涂布于羊血琼脂糖盘,  $37^\circ\text{C}$  培养过夜。接受轭合物免疫鼠的血液样本的细菌清除率与对照组的比较, 有显著差异。

图 19 显示在 14 型肺炎球菌感染时, 用 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫的鼠血液的细菌清除率。在感染后 1、3、5 小时用该轭合物处理组与 PBS 处理组有显著的 CFU 差异( $P < 0.01$ )。

图 20 显示在 7 型肺炎球菌感染时, 用 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫的鼠血液的细菌清除率。在感染后 1、3、5 小时用该轭合物处理组与 PBS 处理组有显著的 CFU 差异( $P < 0.01$ )。此数据也显示经该轭合物免疫的小鼠具有对异质型肺炎球菌感染的交叉保护作用。

图 21 显示在 6B 型肺炎球菌感染时, 用 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫的鼠血液的细菌清除率。在感染后 1、3、5 小时用该轭合物处理组与 PBS 处理组有显著的 CFU 差异( $P < 0.05$ )。此数据也显示经该轭合物免疫的小鼠具有对异质型肺炎球菌感染的交叉保护作用。

图 22 显示在 18C 型肺炎球菌感染时, 用 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫的鼠血液的细菌清除率。在感染后 1、3、5 小时用该轭合物处理组与 PBS 处理组有显著的 CFU 差异( $P < 0.01$ )。此数据也显示经该轭合物免疫的小鼠具有对异质型肺炎球菌感染的交叉保护作用。

图 23-25 显示在 23F 型肺炎球菌感染时, 用 14 型多糖-假肺炎链球菌溶血素轭合物免疫的鼠血液的细菌清除率。在感染后 1 小时(图 23)、3 小时(图 24)、5 小时(图 25)用该轭合物处理组与 PBS 处理组有

显著的 CFU 差异( $P < 0.01$ )。此数据也显示经该鞭合物免疫的小鼠具有对异质型肺炎球菌感染的交叉保护作用。

### 实施例 9: 调理吞噬分析

#### A. 调理吞噬分析

抗血清型 14 型肺炎球菌多糖的抗体功能活性是使用人多形核白细胞(PMNL)的调理吞噬分析予以测量。系列性稀释(两倍)抗血清,使每一 20  $\mu$ l 血清样本与 20  $\mu$ l 细菌悬浮液混合,于 37 $^{\circ}$ C 培养 15 分钟,该细菌悬浮液含有约 200CFU 于脑心泡制的培养基。培养完后,加入 10  $\mu$ l 婴儿兔补体及 40  $\mu$ l 的 PMNL( $4 \times 10^5$  细胞)。将此混合物培养于 37 $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  气氛 60 分钟。为获得可目视的细胞计数,将每样本中的 20  $\mu$ l 等分试样接种于三倍血琼脂培养基中,维持 37 $^{\circ}$ C 过夜。补体控制包含所有测试试剂,除对抗肺炎球菌的抗体。调理吞噬效价计数为相较于补体中所生长者, >50% 杀菌的最高血清稀释量的倒数。

#### B. 吞噬细胞

通过使用葡聚糖沉降及菲柯尔(ficoll; ICN Biomedical Company, #16-922-54 Lymphocyte Separation Medium)分离单核细胞与 PMNL,来将新鲜 PMNL 从健康成人志愿者的周边血液中分离。以 ACK 溶胞缓冲液(BioFluids, Catalog number p304-100)溶解红细胞。调整在 BME(Life Technologies GIBCO BRL, Basal Medium Eagle)中细胞的终浓度为  $1 \times 10^7$  细胞/mL。每样本中使用 40  $\mu$ l 的 PMNL  $2-4 \times 10^5$  细胞。

#### C. 小鼠血清与细菌

将抗 14 型多糖的小鼠抗血清系列地稀释于脑心泡制的培养基(两倍, 1:2 至 1:256)中,将每 20  $\mu$ l 血清样本与 20  $\mu$ l 细菌悬浮液(200CFU 的肺炎链球菌 14 型)37 $^{\circ}$ C 混合 15 分钟。

肺炎链球菌 14 型培养于 37 $^{\circ}$ C 脑心泡制培养基 10 小时。系列稀释 10 倍以确认本实验使用的细菌数。将 100  $\mu$ l 样本加入盘中。10CFU

为使用  $1:10^7$  稀释样本, 91CFU 为使用  $1:10^6$  稀释样本。因此本试验使用的细菌浓度确认为约  $1 \times 10^9$  CFU/mL。将 14 型肺炎链球菌  $1 \times 10^9$  CFU/MI 稀释至  $1 \times 10^4$  CFU/mL。200 CFU/20  $\mu$ L 用于每样本。

#### D. 补体与 PMNL

培养后, 加入 10  $\mu$ L 婴儿兔补体(新鲜收集的年轻兔血清的等分试样, 使用前储存于  $-80^\circ\text{C}$ )及 40  $\mu$ L 的 PMNL  $2.8 \times 10^5$  细胞。将该混合物培养于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  气氛 60 分钟。

#### E. CFU 计数

为获得可目视的细胞计数, 将两稀释液的 20  $\mu$ L 等分试样(每样本 1:10 及 1:100)接种于三倍血琼脂培养基中, 维持  $37^\circ\text{C}$  过夜。补体对照组包含除对抗肺炎球菌的抗体外的所有试剂。

#### F. 调理吞噬活性

调理吞噬效价计数为相较于补体中所生长者,  $>50\%$  杀菌的最高血清稀释量的倒数。

表 5: 对抗 14 型多糖的小鼠抗体调理素作用活性

小鼠编号#	血清稀释								
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	对照组
疫苗									
1, CFU		12	20	22	25	28	32	45	81
杀菌%		85%	76%	73%	69%	65%	60%	44%	
2, CFU		17	18	17	17	32	50	51	81
杀菌%		79%	78%	79%	79%	60%	38%	37%	
3, CFU		19	27	31	31	32	44	56	81
杀菌%		77%	67%	62%	62%	60%	46%	31%	
4, CFU		15	22	23	19	33	36	40	81
杀菌%		81%	73%	72%	77%	59%	56%	51%	
5, CFU		22	26	34	27	33	43	51	81
杀菌%		73%	68%	58%	67%	59%	47%	37%	
6, CFU		22	17	19	28	43	51	57	81
杀菌%		73%	79%	77%	65%	47%	37%	30%	
7, CFU		22	29	29	26	28	29	57	81
杀菌%		73%	64%	64%	68%	65%	64%	30%	
8, CFU		31	23	31	35	48	63	63	81
杀菌%		62%	72%	62%	57%	41%	22%	22%	

小鼠血清滴定以测量调理素作用活性

#1, 128 #2, 64 #3, 64 #4, 256 #5, 128 #6, 32 #7, 128 #8, 32.

表 6: 对抗血清型 14 型多醣(PS)及假肺炎链球菌溶血素(PPN)的抗体(Ab)反应

小鼠#	抗 PS 抗体		抗 PPN 抗体	
	效价	OD <sub>405</sub> (1:300)	效价	OD <sub>405</sub> (1:300)
1	76800	0.735	9600	0.454
2	76800	0.520	9600	0.360
3	76800	0.738	9600	0.285
4	19200	0.677	9600	0.266
5	19200	0.684	9600	0.381
6	4800	0.518	4800	0.261
7	76800	0.815	9600	0.348
8	4800	0.585	1200	0.125

如表 5 及表 6 所示, 具较高抗 14 型多醣与假肺炎链球菌溶血素的抗体反应的小鼠(小鼠编号 1, 2, 3, 4, 5, 及 7)显现较高的调理素作用活性, 其中具较低抗 14 型多醣与假肺炎链球菌溶血素的抗体反应的小鼠(小鼠编号 6 与 8)显现较低的调理素作用活性。发现 PBS 处理的小鼠无调理素作用活性。

#### 其它实施例

可以理解, 尽管本发明已以上述实施方法详细说明, 但以上描述仅用于说明本发明, 并非用于限制本发明的范围。本发明的其它方面、优点及修饰皆包含于权利要求的范围内。

## 序列表

<110> Synergy America, Inc

<120> 治疗或预防肺炎球菌感染的组合物与方法

<130> 12844-002W01

<140> PCT/US2003/035529

<141> 2003-11-06

<150> US 60/424,497

<151> 2002/11/07

<160> 26

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 471

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

```

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

```

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

<210> 2  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 2  
 gactagatct ccatatggca aataaagcag taaatgac

38

<210> 3  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 3  
 cagtggatcc ttactagtca ttttctacct tatc

34

<210> 4  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 4  
 gactgctagc caccatggca aataaagcag taaatgac

38



<210> 5  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 5  
 gactggatcc ttactagaga gttggtcccc aatag 36  
  
 <210> 6  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 6  
 gactggatcc ttactaatct tctacctgag gatag 35  
  
 <210> 7  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 7  
 gactggatcc ttactattct accttatctt ctacctgag 39  
  
 <210> 8  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 8  
 gactggatcc ttactaatct tctaccttat cttctacctg ag 42  
  
 <210> 9  
 <211> 1413  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Synthetically generated construct  
  
 <400> 9  
 atggcaaata aagcagtaaa tgactttata ctagctatga attacgataa aaagaaactc 60  
 ttgacccatc agggagaaag tattgaaaat cgtttcatca aagagggtaa tcagctaccc 120  
 gatgagtttg ttgttatcga aagaaagaag cggagcttgt cgacaaatac aagtgatatt 180  
 tctgtaacag ctaccaacga cagtcgctc tatcctggag cacttctcgt agtggatgag 240  
 acctgttag agaataatcc cactcttctt gcggctgatc gtgetccgat gacttatagt 300  
 attgatttgc ctggtttggc aagtagcgat agctttctcc aagtggaaga ccccagcaat 360

tcaagtgttc	gcgagcggt	aaacgatttg	ttggctaagt	ggcatcaaga	ttatggtcag	420
gtcaataatg	tcccagctag	aatgcagtat	gaaaaaatca	cggctcacag	catggaacaa	480
ctcaagggtca	agtttggttc	tgactttgaa	aagacagggga	attctcttga	tattgatttt	540
aactctgtcc	attcaggcga	aaagcagatt	cagattgtta	attttaagca	gatttattat	600
acagtcagcg	tagatgctgt	taaaaatcca	ggagatgtgt	ttcaagatac	tgtaacggta	660
gaggatttaa	aacagagagg	aatttctgca	gagcgtcctt	tggtctatat	ttcgagtgtt	720
gcttatgggc	gccaagtcta	tctcaagttg	gaaaccacga	gtaagagtga	tgaagtagag	780
gctgcttttg	aagctttgat	aaaaggagtc	aaggtagctc	ctcagacaga	gtggaacag	840
atthttggaca	atacagaagt	gaaggcggtt	atthttagggg	gcgacccaag	ttcgggtgcc	900
cgagttgtaa	caggcaaggt	ggatatggta	gaggacttga	ttcaagaagg	cagtcgcttt	960
acagcagatc	atccaggctt	gccgatttcc	tatacaactt	ctthttttacg	tgacaatgta	1020
gttgcgacct	ttcaaaatag	tacagactat	gttgagacta	aggttacagc	ttacagaaac	1080
ggagattttac	tgctggatca	tagtggtgcc	tatgttgccc	aatattatat	tacttggaat	1140
gaattatcct	atgatcatca	aggtaaggaa	gtcttgactc	ctaaggcttg	ggacagaaat	1200
gggcaggatt	taacggctca	ctttaccact	agtattcctt	taaaagggaa	tgttcgtaat	1260
ctctctgtca	aaattagaga	gcgttccggg	cttgccctggg	aatggtggcg	tacggtttat	1320
gaaaaaacccg	atthtgcact	agtgcgtaag	cggacgattt	ctatthtgggg	aacaactctc	1380
tatcctcagg	tagaagataa	ggtagaaaat	gac			1413

<210> 10

<211> 1380

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated construct

<400> 10

atggcaaata	aagcagtaaa	tgactttata	ctagctatga	attacgataa	aaagaaactc	60
ttgacccatc	agggagaaaag	tattgaaaat	cgthttcatca	aagagggtaa	tcagctaccc	120
gatgagtttg	ttgttatcga	aagaaagaag	cggagcttgt	cgacaaatac	aagtgatatt	180
tctgtaacag	ctaccaacga	cagtcgcctc	tatcctggag	cacttctcgt	agtggatgag	240
accttgttag	agaataatcc	cactcttctt	gcggtcgcac	gtgctccgat	gacttatagt	300
atthgatttg	ctggtttggc	aagtagcgat	agctthtctc	aagtgggaaga	ccccagcaat	360
tcaagtgttc	gcgagcggt	aaacgatttg	ttggctaagt	ggcatcaaga	ttatggtcag	420
gtcaataatg	tcccagctag	aatgcagtat	gaaaaaatca	cggctcacag	catggaacaa	480
ctcaagggtca	agtttggttc	tgactttgaa	aagacagggga	attctcttga	tattgatttt	540
aactctgtcc	attcaggcga	aaagcagatt	cagattgtta	attttaagca	gatttattat	600
acagtcagcg	tagatgctgt	taaaaatcca	ggagatgtgt	ttcaagatac	tgtaacggta	660
gaggatttaa	aacagagagg	aatttctgca	gagcgtcctt	tggtctatat	ttcgagtgtt	720
gcttatgggc	gccaagtcta	tctcaagttg	gaaaccacga	gtaagagtga	tgaagtagag	780
gctgcttttg	aagctttgat	aaaaggagtc	aaggtagctc	ctcagacaga	gtggaacag	840
atthttggaca	atacagaagt	gaaggcggtt	atthttagggg	gcgacccaag	ttcgggtgcc	900
cgagttgtaa	caggcaaggt	ggatatggta	gaggacttga	ttcaagaagg	cagtcgcttt	960
acagcagatc	atccaggctt	gccgatttcc	tatacaactt	ctthttttacg	tgacaatgta	1020
gttgcgacct	ttcaaaatag	tacagactat	gttgagacta	aggttacagc	ttacagaaac	1080
ggagattttac	tgctggatca	tagtggtgcc	tatgttgccc	aatattatat	tacttggaat	1140
gaattatcct	atgatcatca	aggtaaggaa	gtcttgactc	ctaaggcttg	ggacagaaat	1200
gggcaggatt	taacggctca	ctttaccact	agtattcctt	taaaagggaa	tgttcgtaat	1260
ctctctgtca	aaattagaga	gcgttccggg	cttgccctggg	aatggtggcg	tacggtttat	1320
gaaaaaacccg	atthtgcact	agtgcgtaag	cggacgattt	ctatthtgggg	aacaactctc	1380

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11  
gactaagctt gccaccatgg aaattaatgt gagtaaatta ag 42

<210> 12  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 12  
ctgactcgag ttatcttact gtaatcaagc catc 34

<210> 13  
<211> 954  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> pSA-59 Aly insert

<400> 13  
atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgccctc aagttggcgt gcaaccatat 60  
aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat 120  
tatcattggc ggaaagacct agaattaggt tttttctcgc acattgttgg gaacggatgc 180  
atcatgcagg taggacctgt taataatggt gcttgggacg ttgggggccc ttggaatgct 240  
gagacctatg cagcggttga actgattgaa agccattcaa ctaaagaaga gttcatgacg 300  
gactaccgcc tttatatcga actcttacgc aatctagcag atgaagcagg tttgccgaaa 360  
acgcttgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa 420  
ccaacaacc actcagacca tgtggatcca tacccttact tggcaaaatg gggcattagc 480  
cgtgagcagt ttaagcatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag 540  
aatgacactg gctactggta cgtacattca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 600  
aaaatcaatg gcacttggta ctactttgac agttcaggct atatgcttgc agaccgctgg 660  
aggaagcaca cagacggcaa ttggtactac tttgaccaat cagggcgaat ggctacaggg 720  
tggagaaaaa tcgctgagaa gtggtactat ttcaacgaag aaggtgccat gaagacaggg 780  
tgggtcaagt acaaggacac ttggtactac tttagcgcga aagaaggcgc aatggtatca 840  
aatgccttta tccagtcagc ggacggaaca ggctggtact acctcaaacc agacggaaca 900  
ctggcagaca agccagaatt cacagtagag ccagatggct tgattacagt aaaa 954

<210> 14  
<211> 318  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> polypeptide of pSA-59 Aly insert sequence

<400> 14  
Met Glu Ile Asn Val Ser Lys Leu Arg Thr Asp Leu Pro Gln Val Gly  
1 5 10 15  
Val Gln Pro Tyr Arg Gln Val His Ala His Ser Thr Gly Asn Pro His  
20 25 30  
Ser Thr Val Gln Asn Glu Ala Asp Tyr His Trp Arg Lys Asp Pro Glu  
35 40 45  
Leu Gly Phe Phe Ser His Ile Val Gly Asn Gly Cys Ile Met Gln Val  
50 55 60  
Gly Pro Val Asn Asn Gly Ala Trp Asp Val Gly Gly Trp Asn Ala  
65 70 75 80  
Glu Thr Tyr Ala Ala Val Glu Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Lys Glu

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

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

gactaagctt gccaccatgg aagaagctcc cgtagctagt cag

43

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

gactctcgag ctatccatca gggcctaact cattaag

37

<210> 17

<211> 1377

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pSA-59 Aly insert

```

<400> 17
atggaagaag ctcccgtagc tagtcagtct aaagctgaga aagactatga tgcagcagtg      60
aaaaaatctg aagctgctaa gaaggcttac gaagaagcta aaaagaaagc agaagacgct      120
cagaaaaaat atgatgagga tcagaagaaa actgaggcaa aagcggataa ggaagcaaaa      180
gcatctgctg aatagataa agccacgttt gctgtacaaa gtgcgtatgt aaaattttta      240
aatgtccaat ctaatcgtca aatttcggag aatgaacgaa aaaacaatt agcagaaata      300
gataaagaga tagagaatgc taaacaaaat ttacagaata aacaggaaga atttaataag      360
gttagagcag aagtaattcc tgaagcaaa gggttagctg ttactaaaca aaaagcggaa      420
gaagctaaaa aagaagcaga agtagctaag agaaaatatg attatgcaac tctaaaggta      480
gcactagcga agaaagaagt agaggctaag gaacttgaaa ttgaaaaact tcaatatgaa      540
atttctactt tggacaaga agttgctatt gctcaacatc aagtagataa tttgaaaaaa      600
cttcttgctg gtgcggatcc tgatgatggc acaaagtta tagaagctaa attaaacaaa      660
ggagaagctg agctaaacgc taaacaagct gagttagcaa aaaacaaac agaacttgaa      720
aaacttcttg acagccttga tctgaagggt aagactcagg atgaattaga taaagaagct      780
gctgaagctg agttggataa aaaagctgat gaacttcaaa ataaagttgc tgatttagaa      840
aaaggaattg ctcttatca aatcaaagtc gctgaattaa ataaagaaat tgctagactt      900
caaagcgatt taaaagatgc tgaagaaaat aatgtagaag actatattaa agaaggttta      960
gagcaagcta tcgctgataa aaaagctgaa ttagctacaa ctcaacaaaa catagataaa     1020
actcaaaaag atttagagga tgctgaatta gaacttgaaa aagtattagc tacattagac     1080
cctgaaggta aaactcaaga tgaattagat aaagaagctg cagaagatgc taatattgaa     1140
gctcttcaaa acaaagttgc tgatctagaa acaaggttg ctgaattaga taaagaagtt     1200
actagacttc aaagcgattt aaaagatgct gaagaaaaca atgtagaaga ctacgttaa     1260
gaaggcttag ataaagctct tactgataaa aaagttgaat taaataatac tcaaaaagca     1320
ttagatactg ctcaaaaagc attagatact gctcttaatg agttaggcc tgatgga      1377

```

<210> 18

<211> 459

<212> PRT

<220>

<223> polypeptide of pSA-60 PspA insert sequence

<400> 18

```

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

```

210	215	220
Leu Asn Ala Lys Gln Ala Glu Leu Ala Lys Lys Gln Thr Glu Leu Glu		
225	230	235
Lys Leu Leu Asp Ser Leu Asp Pro Glu Gly Lys Thr Gln Asp Glu Leu		
	245	250
Asp Lys Glu Ala Ala Glu Ala Glu Leu Asp Lys Lys Ala Asp Glu Leu		
	260	265
Gln Asn Lys Val Ala Asp Leu Glu Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Gln Ile		
	275	280
Lys Val Ala Glu Leu Asn Lys Glu Ile Ala Arg Leu Gln Ser Asp Leu		
	290	295
Lys Asp Ala Glu Glu Asn Asn Val Glu Asp Tyr Ile Lys Glu Gly Leu		
305	310	315
Glu Gln Ala Ile Ala Asp Lys Lys Ala Glu Leu Ala Thr Thr Gln Gln		
	325	330
Asn Ile Asp Lys Thr Gln Lys Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Glu Leu		
	340	345
Glu Lys Val Leu Ala Thr Leu Asp Pro Glu Gly Lys Thr Gln Asp Glu		
	355	360
Leu Asp Lys Glu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Ile Glu Ala Leu Gln Asn		
	370	375
Lys Val Ala Asp Leu Glu Asn Lys Val Ala Glu Leu Asp Lys Glu Val		
385	390	395
Thr Arg Leu Gln Ser Asp Leu Lys Asp Ala Glu Glu Asn Asn Val Glu		
	405	410
Asp Tyr Val Lys Glu Gly Leu Asp Lys Ala Leu Thr Asp Lys Lys Val		
	420	425
Glu Leu Asn Asn Thr Gln Lys Ala Leu Asp Thr Ala Gln Lys Ala Leu		
	435	440
Asp Thr Ala Leu Asn Glu Leu Gly Pro Asp Gly		445
450	455	

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 19

ctgaggatcc ttactaagct gtaaccttag tctc

34

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 20

caaaattaga gaacgttccg ggcttgccctg ggaatgg

37

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Primer

<400> 21

gcccggaacg ttctctaatt ttgacagaga gattacg

37

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 22

Lys Val Glu Asn Asp

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 23

Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 24

Tyr Pro Gln Val Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp

1 5 10

<210> 25

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

ctgaggatcc ttactataacc tgaggataga gagttgttc

39

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promer

<400> 26

gactggatcc ctatacctga ggatagagag ttg

33

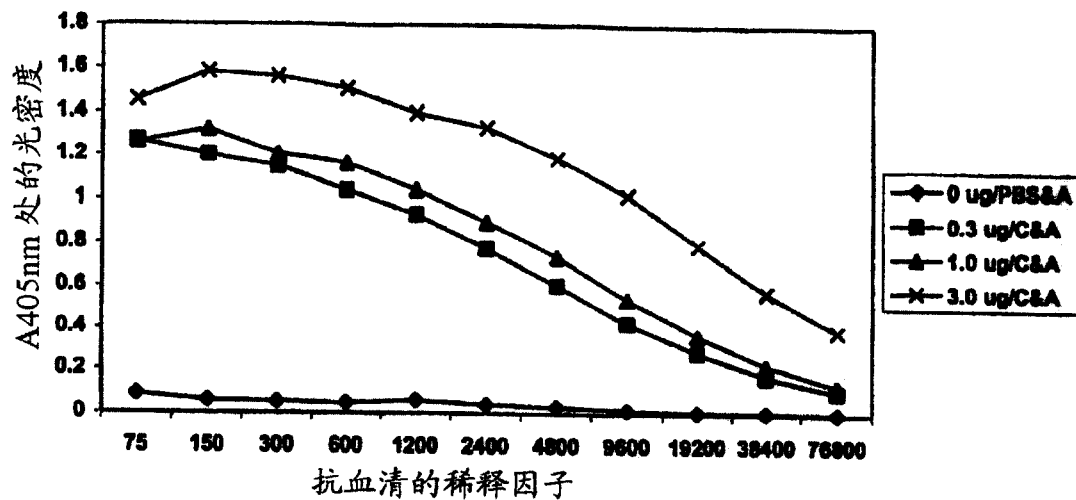


图 1

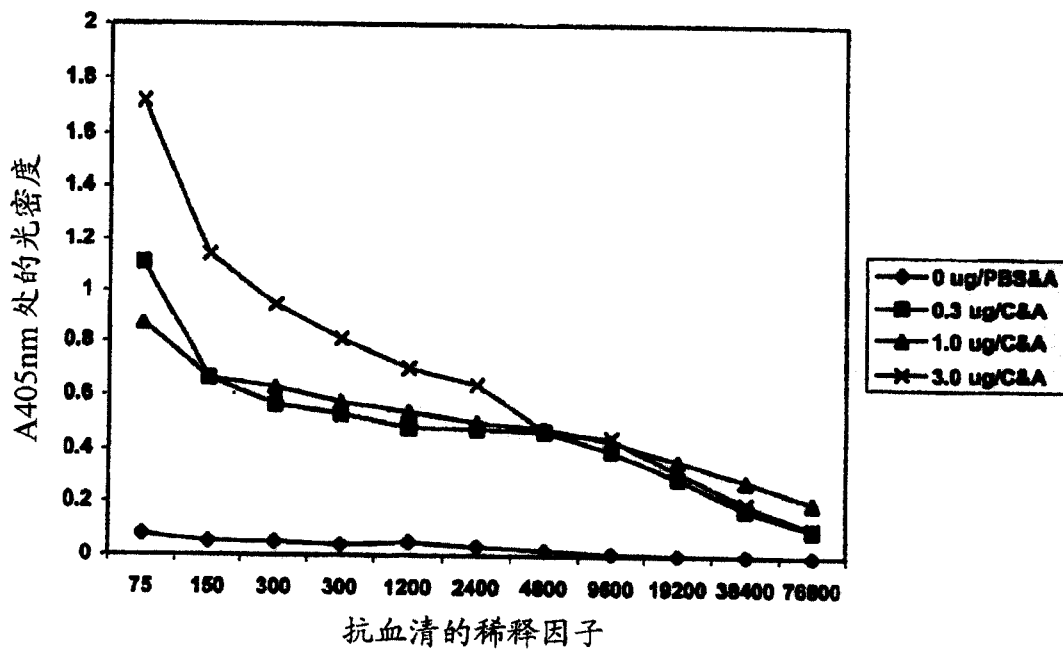


图 2



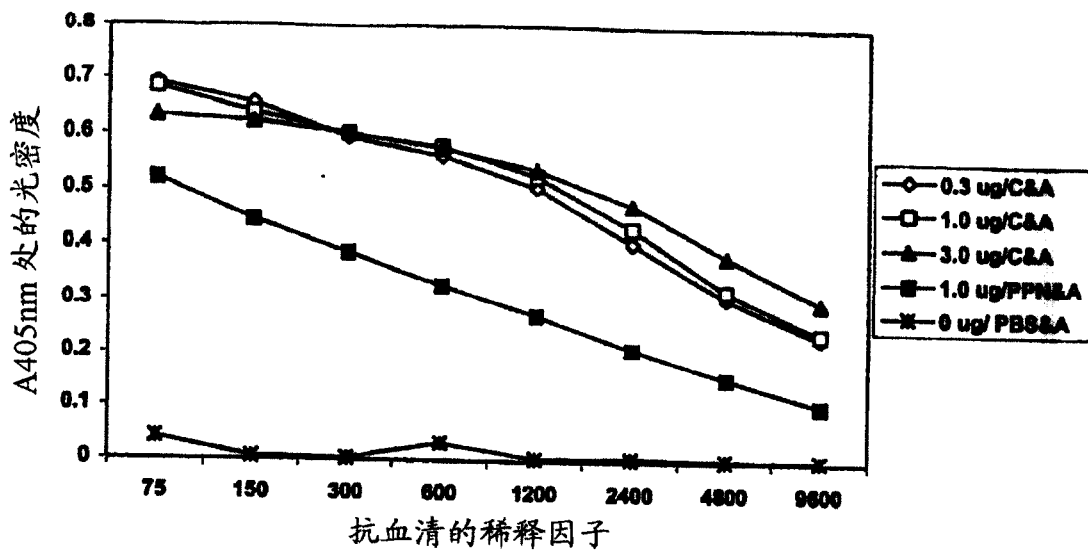


图 3

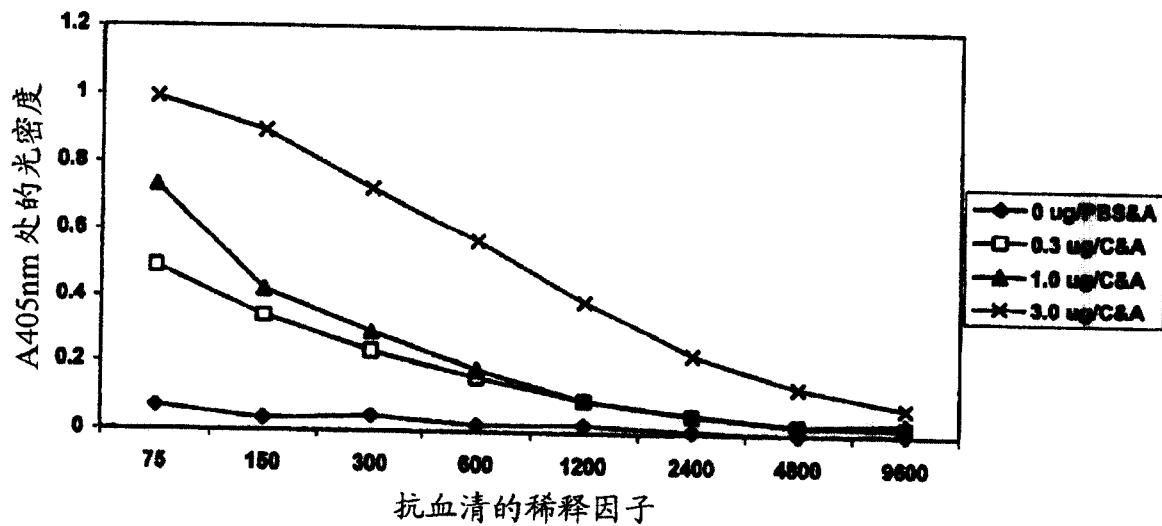


图 4

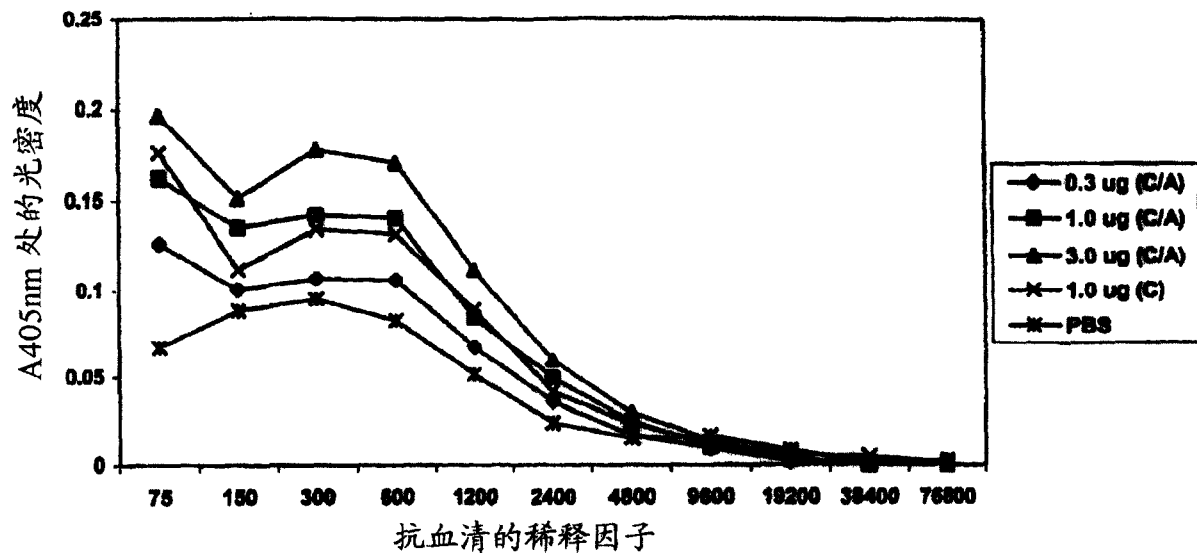


图 5

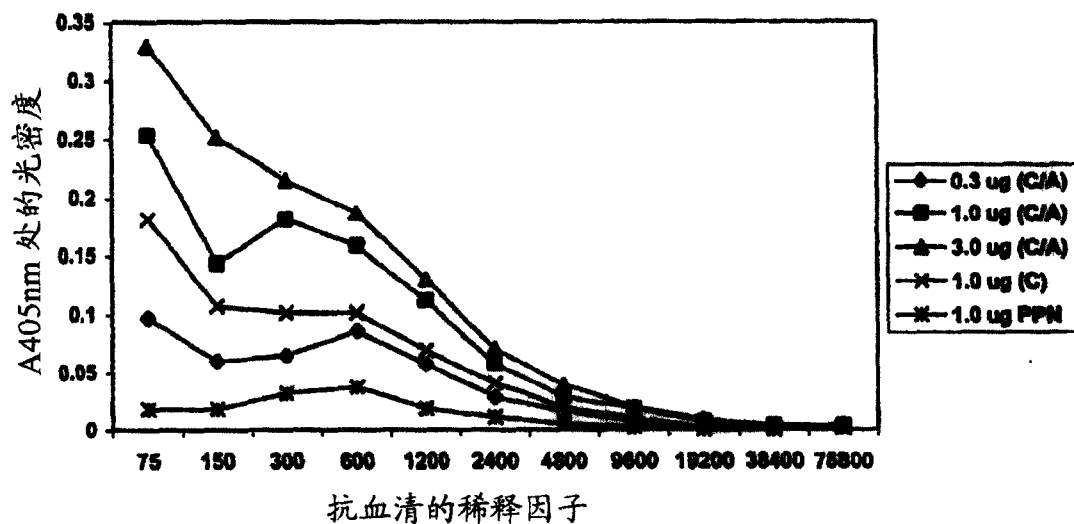


图 6

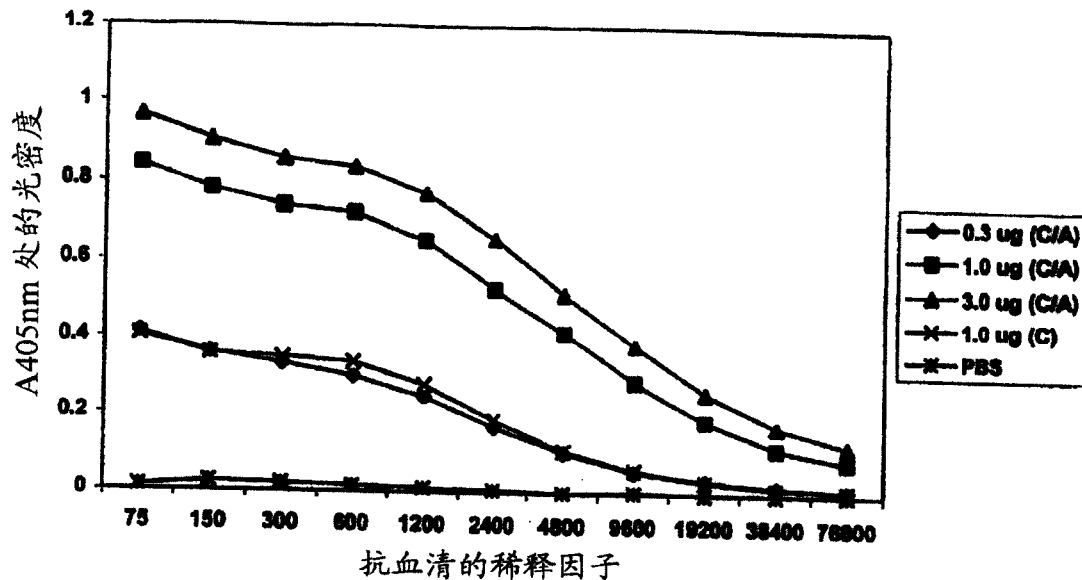


图 7

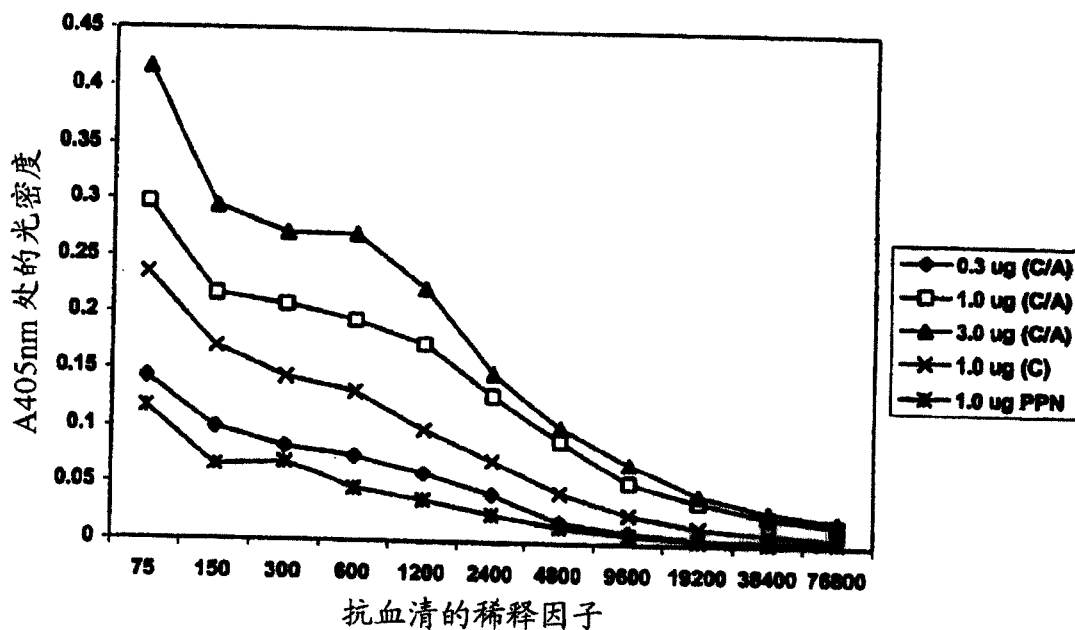


图 8

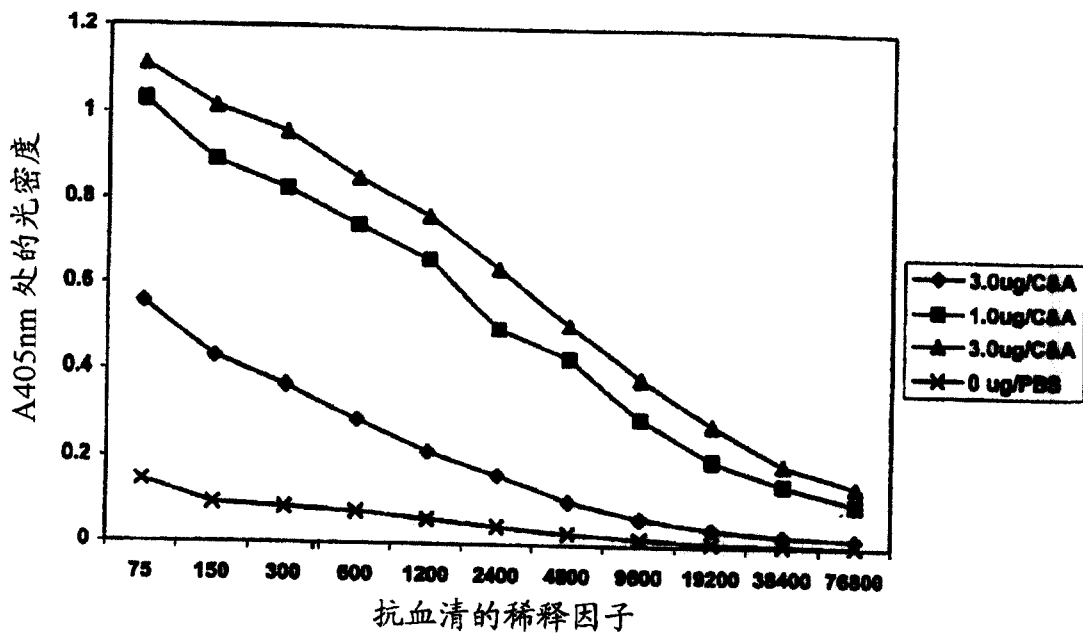


图 9

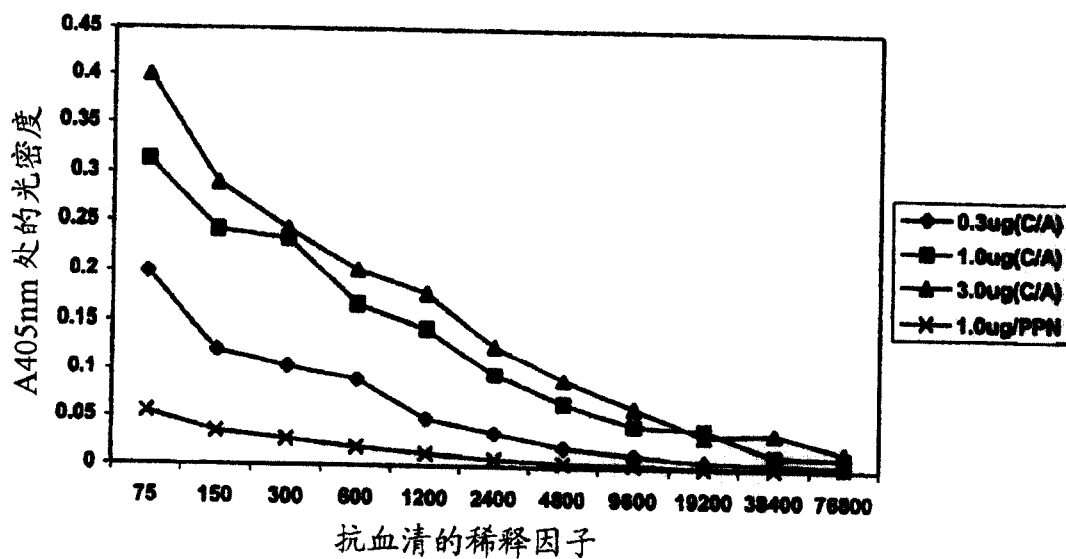


图 10

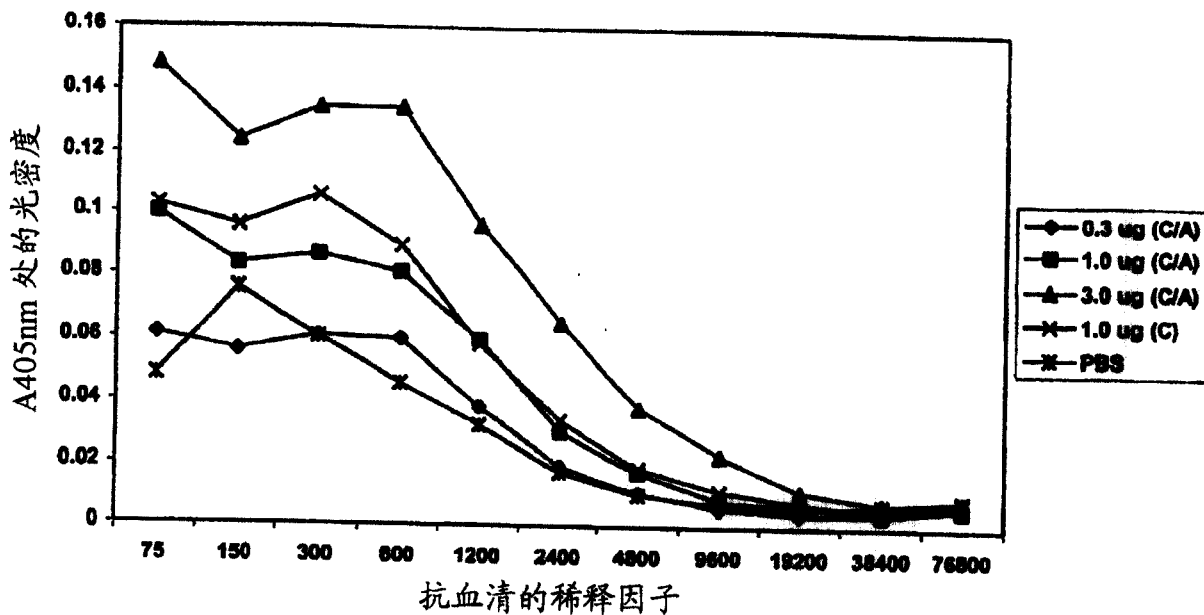


图 11

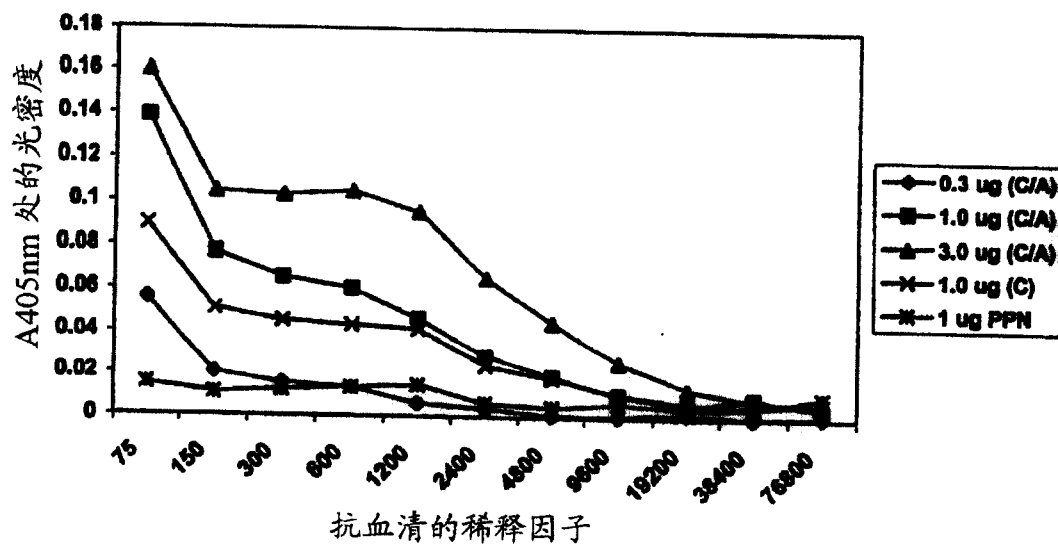


图 12

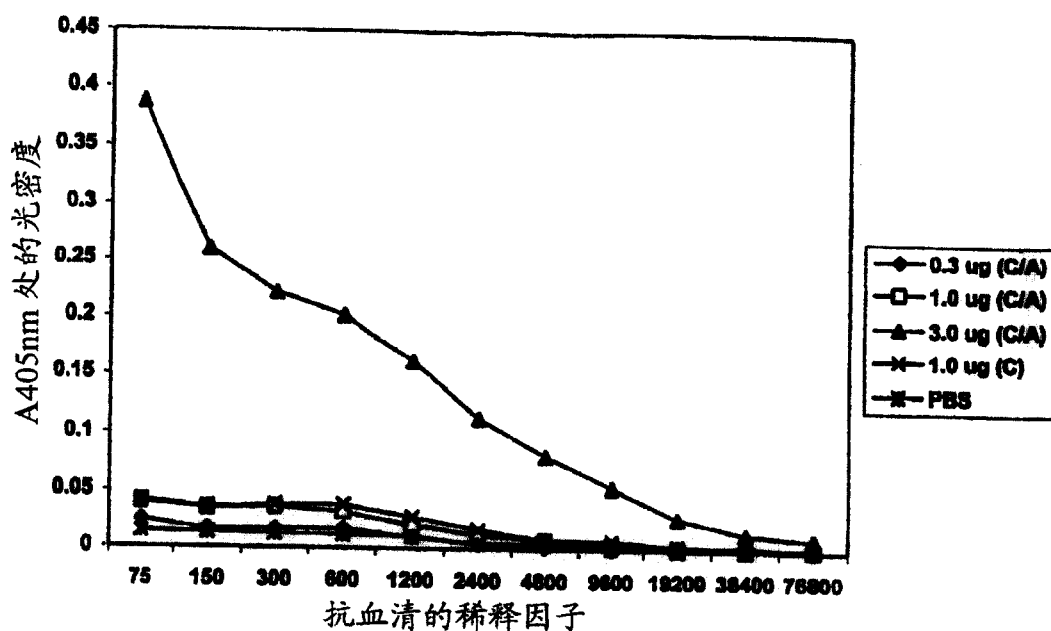


图 13

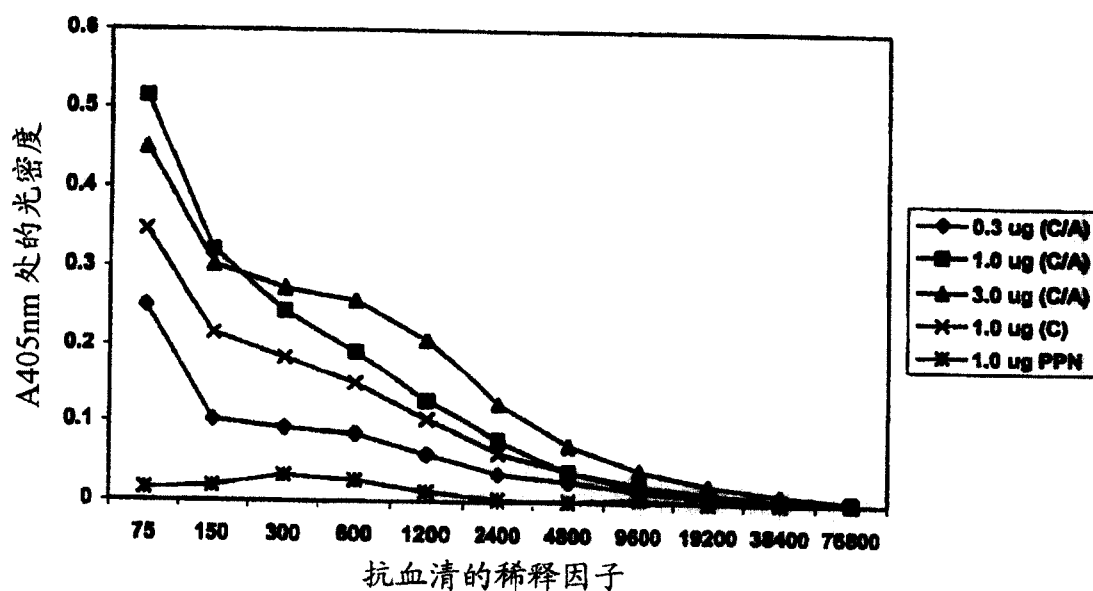


图 14

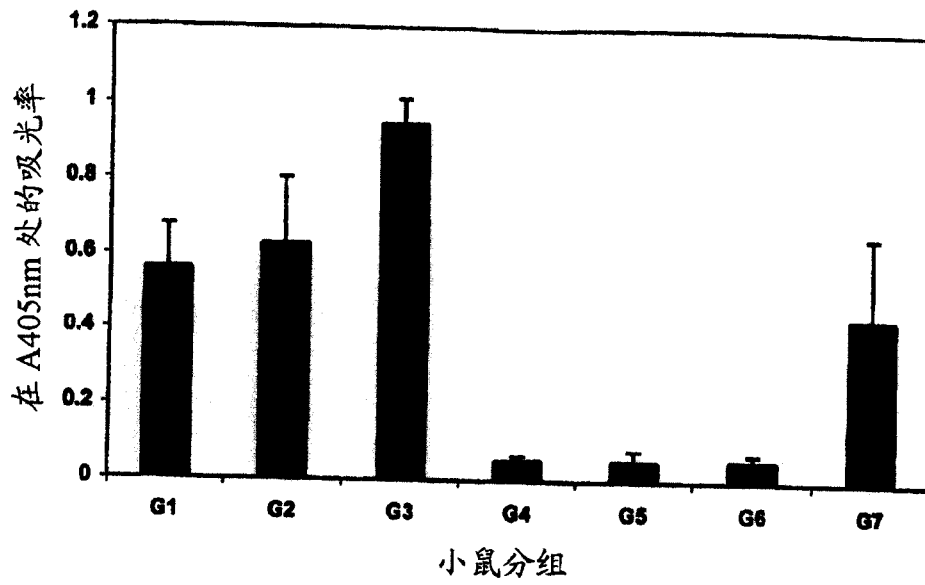


图 15

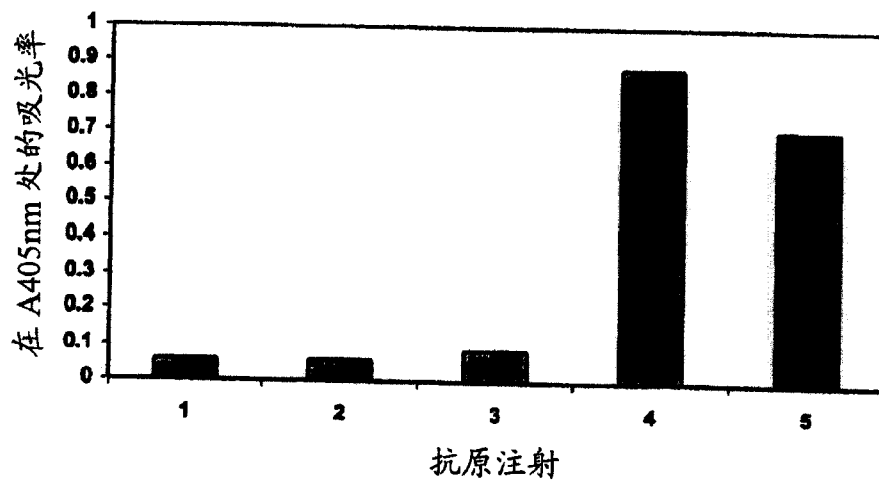


图 16

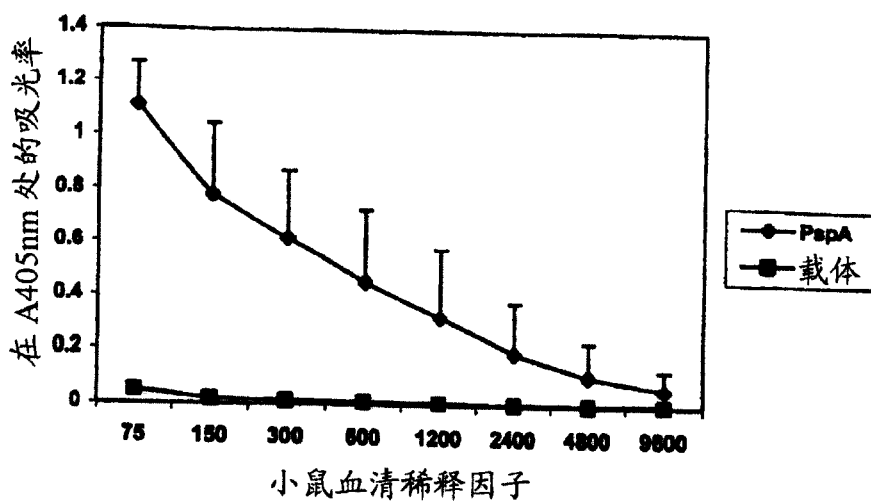


图 17

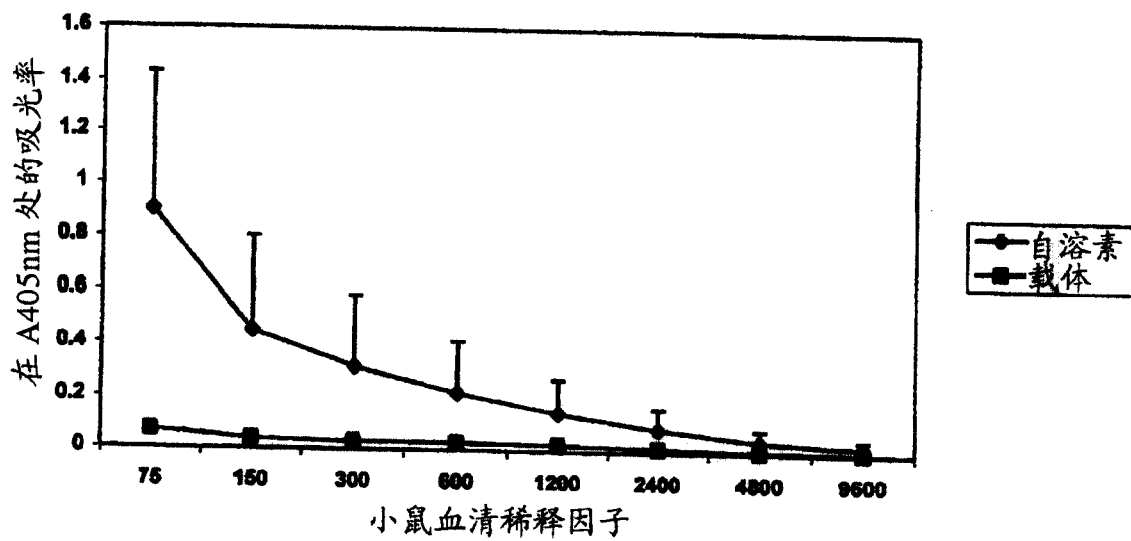


图 18



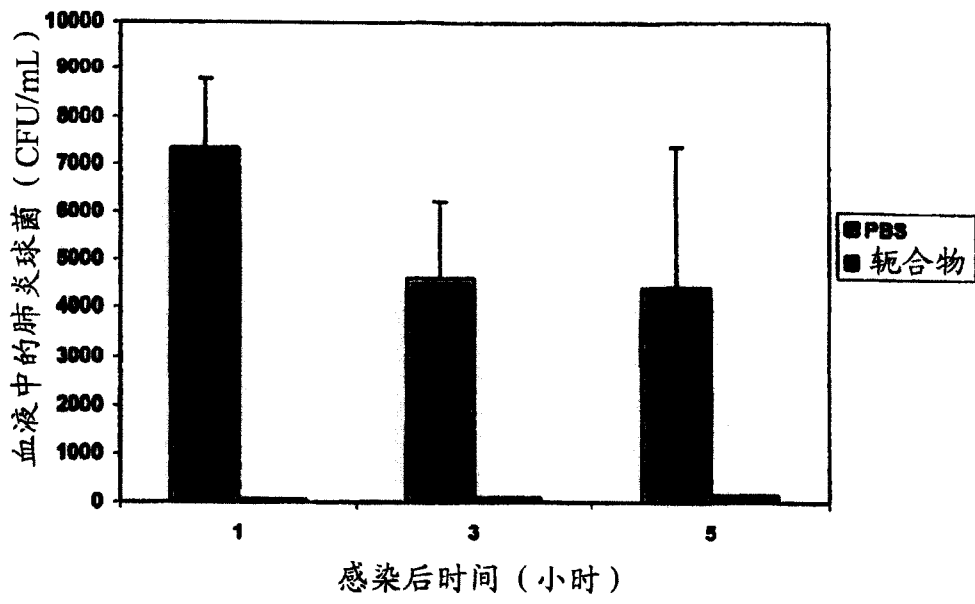


图 19

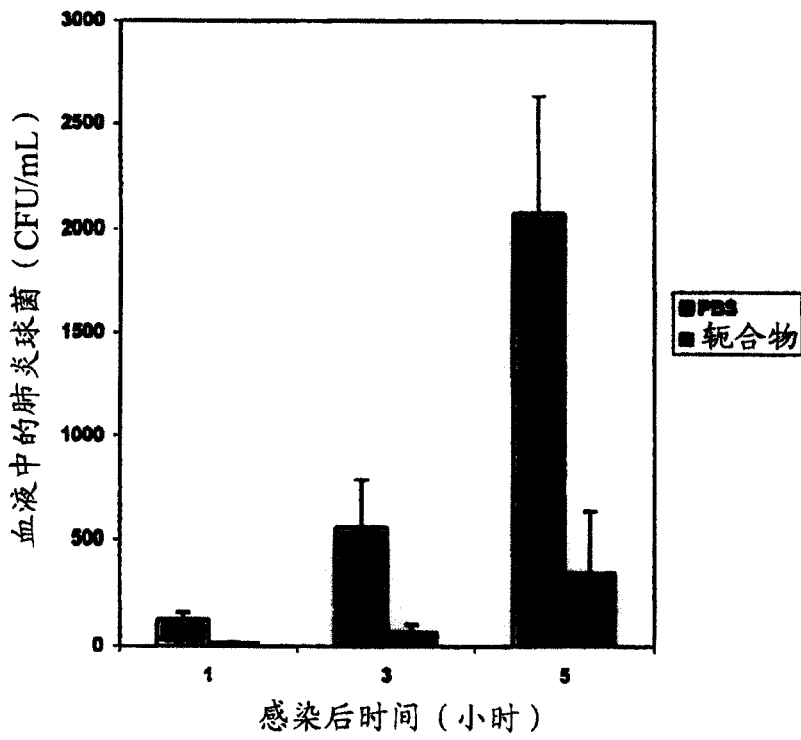


图 20

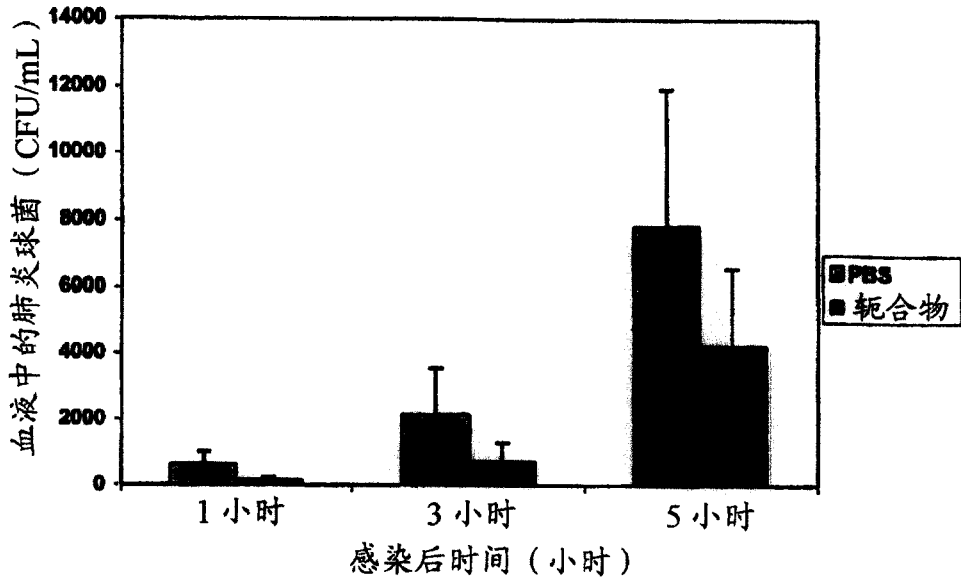


图 21

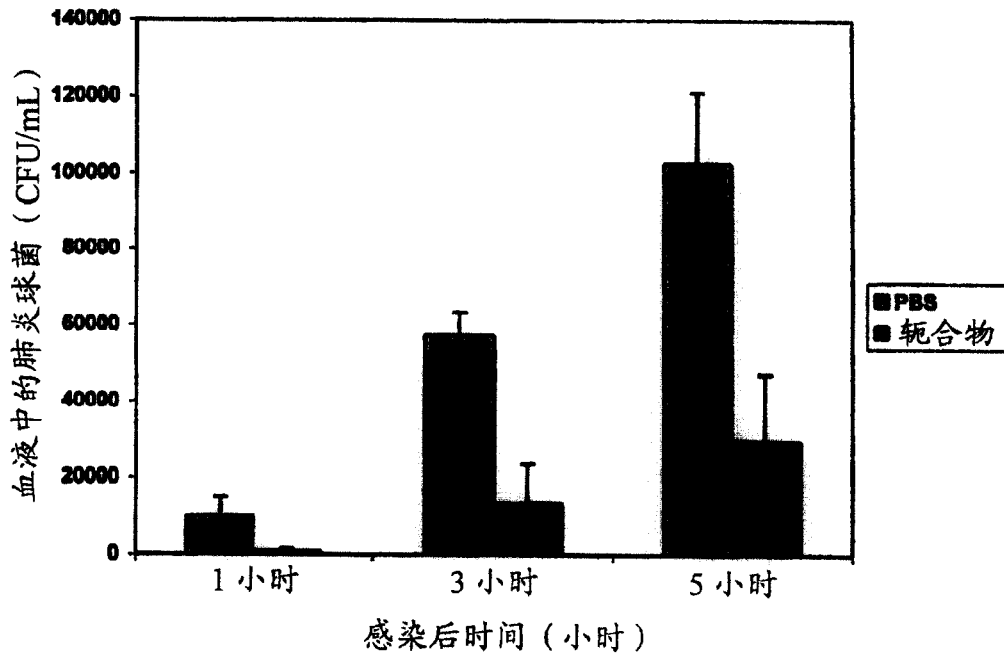


图 22

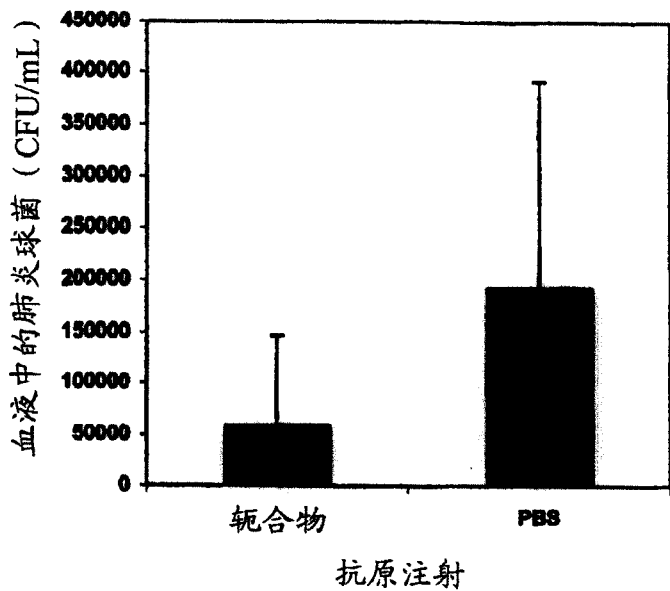


图 23

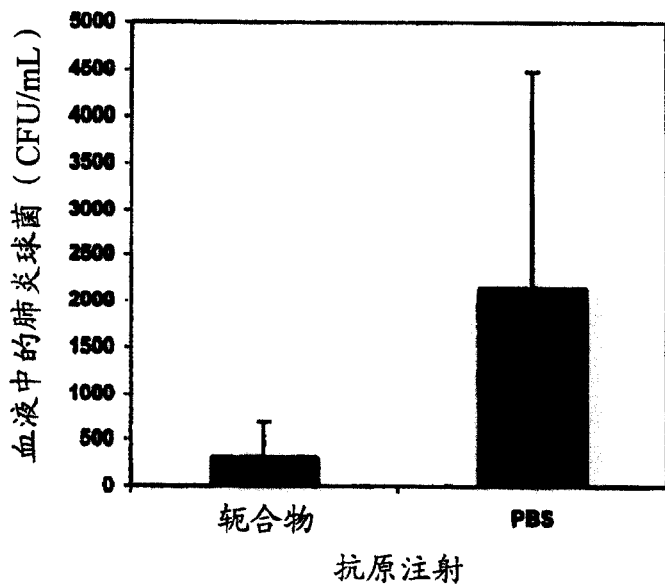


图 24

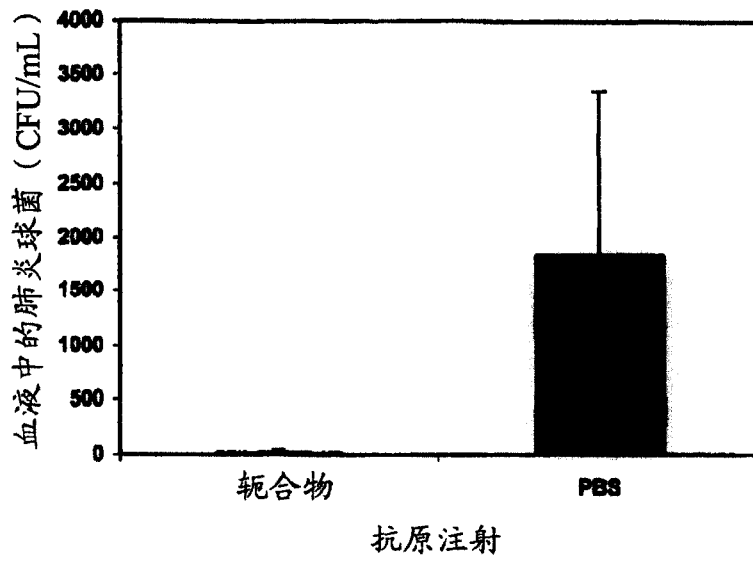


图 25