(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108884134 A
(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201680078929.3

(22)申请日 2016.12.09

(30)优先权数据
62/265,525 2015.12.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2016/051449 2016.12.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/096486 EN 2017.06.15

(71)申请人 加拿大全国研究委员会
地址 加拿大安大略
申请人 财团法人卫生研究院

(72)发明人 冷志祥 陈汪雪 崇佩莱

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
C07K 14/315(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
A61K 39/09(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
C07K 16/12(2006.01)
C07K 7/08(2006.01)
C12N 15/31(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)

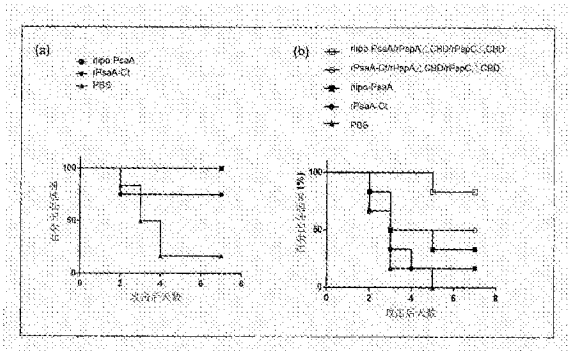
权利要求书4页 说明书19页
序列表9页 附图11页

(54)发明名称

脂化肺炎链球菌抗原组合物、制备方法和用途

(57)摘要

本发明提供了用于预防或治疗肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae,SP)相关疾病的组合物和方法。更具体地,提供了包含肺炎球菌表面抗原A(PsaA)的重组脂化融合蛋白,所述重组脂化融合蛋白从N端至C端包含PsaA的N端天然脂质信号肽和PsaA的C端结构基因。还描述了诱导针对SP的广谱黏膜免疫的方法,其包括施用包含重组脂化融合蛋白的疫苗。



CN 108884134 A

1.包含肺炎球菌表面抗原A(PsaA)的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白从N端至C端包含PsaA的N端天然脂质信号肽和PsaA的C端结构基因。

2.权利要求1所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白在C端还包含标签或可检测标记。

3.权利要求2所述的重组脂化融合蛋白,其中所述标签为包含6个组氨酸残基的氨基酸标签。

4.权利要求1至3中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述融合蛋白是分离的或纯化的。

5.权利要求1至4中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述天然脂质信号肽具有氨基酸序列MKKLGTLLVLFLSAIILVAC(SEQ ID NO:5)。

6.权利要求1至5中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白包含SEQ ID NO:1或7中所示的氨基酸序列,或其同源物、片段、类似物或变体。

7.权利要求1至6中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少约80至95%同一性的氨基酸序列。

8.权利要求1至7中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述融合蛋白在大肠杆菌(E.coli)中产生。

9.权利要求8所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白通过表达包含具有SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列之DNA的载体来产生。

10.权利要求1至9中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白包含均质脂质结构。

11.权利要求10所述的重组脂化融合蛋白,其中所述均质脂质结构包含如由质谱法分析的单一主峰或具有图6D中所示的质谱谱图。

12.权利要求11所述的重组脂化融合蛋白,其中所述单一主峰具有约1266的m/z。

13.权利要求1至12中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白能够在对象中诱导针对肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)相关疾病的黏膜免疫应答。

14.权利要求13所述的重组脂化融合蛋白,其中在所述对象中诱导Th1应答和/或分泌性IgA的产生。

15.权利要求14所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白能够在没有佐剂的情况下施用时诱导黏膜免疫应答。

16.权利要求13至15中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白还能够导致诱导针对同时施用的一种或更多种非脂化肺炎链球菌(SP)抗原的黏膜免疫应答。

17.权利要求16所述的重组脂化融合蛋白,其中所述一种或更多种非脂化SP抗原选自肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌表面蛋白C(PspC)、肺炎球菌β-半乳糖苷酶(BgaA)、肺炎球菌磷酸胆碱(ChoP)、肺炎球菌烯醇酶(Eno)、肺炎球菌透明质酸裂合酶(Hyl)、肺炎球菌自溶素A(LytA)、肺炎球菌神经氨酸酶(Nan)、肺炎球菌黏附和毒力因子A(PavA)、肺炎球菌铁获取因子(PiaA)和肺炎球菌表面缔合Pht蛋白(PhtA、PhtB、PhtD和PhtE)。

18.权利要求13至17中任一项所述的重组脂化融合蛋白,其中所述黏膜免疫应答不是血清型特异性的。

19.权利要求13至18中任一项所述的重组脂化融合蛋白，其中所述肺炎链球菌相关疾病为肺炎、脑膜炎、耳感染、窦感染或菌血症。

20.产生根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：

(1)提供用表达载体转化的宿主大肠杆菌细胞，所述表达载体包含编码PsaA的N端天然脂质信号肽的第一核苷酸序列和编码PsaA的C端结构基因的第二核苷酸序列；以及

(2)培养大肠杆菌转化体，以允许表达包含所述PsaA的N端天然脂质信号肽和PsaA的C端结构基因的融合蛋白。

21.权利要求20所述的方法，其中所述宿主大肠杆菌细胞来自提供高水平蛋白质表达的菌株。

22.权利要求21所述的方法，其中所述菌株选自C43(DE3)，(ECCC B96070445)、C41(DE3)(ECCC B96070444)、C0214(DE3)、DK8(DE3)S(NCIMB 40885)和C2014(DE3)(NCIMB 40884)。

23.权利要求20至22中任一项所述的方法，其中在M9培养基中培养所述大肠杆菌转化体。

24.权利要求20至23中任一项所述的方法，其中所述方法还包括在其表达后从所述大肠杆菌中分离所述重组脂化融合蛋白。

25.权利要求20至24中任一项所述的方法，其中所述表达载体包含SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列。

26.组合物，其包含根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白或根据权利要求20至25中任一项限定的方法产生的重组脂化融合蛋白，以及可药用稀释剂、载体或赋形剂。

27.权利要求26所述的组合物，其中所述组合物还包含一种或更多种非脂化SP抗原。

28.权利要求27所述的组合物，其中所述一种或更多种非脂化SP抗原选自肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌表面蛋白C(PspC)、肺炎球菌β-半乳糖苷酶(BgaA)、肺炎球菌磷酸胆碱(ChoP)、肺炎球菌烯醇酶(Eno)、肺炎球菌透明质酸裂合酶(Hyl)、肺炎球菌自溶素A(LytA)、肺炎球菌神经氨酸酶(Nan)、肺炎球菌黏附和毒力因子A(PavA)、肺炎球菌铁获取因子(PiaA)和肺炎球菌表面缔合Pht蛋白(PhtA、PhtB、PhtD和PhtE)。

29.用于预防或治疗SP相关疾病的疫苗，其包含根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白或根据权利要求20至25中任一项限定的方法产生的重组脂化融合蛋白，以及佐剂。

30.权利要求29所述的疫苗，其中所述疫苗还包含一种或更多种非脂化SP抗原。

31.权利要求30所述的疫苗，其中所述一种或更多种非脂化SP抗原选自肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌表面蛋白C(PspC)、肺炎球菌β-半乳糖苷酶(BgaA)、肺炎球菌磷酸胆碱(Chop)、肺炎球菌烯醇酶(Eno)、肺炎球菌透明质酸裂合酶(Hyl)、肺炎球菌自溶素A(LytA)、肺炎球菌神经氨酸酶(Nan)、肺炎球菌黏附和毒力因子A(PavA)、肺炎球菌铁获取因子(PiaA)和肺炎球菌表面缔合Pht蛋白(PhtA、PhtB、PhtD和PhtE)。

32.分离的抗体或其片段，其对于根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白或根据权利要求20至25中任一项限定的方法产生的重组脂化融合蛋白具有特异性。

33.权利要求32所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段是多克隆抗体。

34.权利要求32所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段是单克隆抗体。

35.权利要求32所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段是人源化的、人的或嵌合的。

36.权利要求32至35中任一项所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段包含完整免疫球蛋白分子；单链抗体；单链可变片段(scFv)；单结构域抗体；Fab片段；F(ab′)2片段；或二硫键连接的Fv(di-scFv)。

37.权利要求32至36中任一项所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段包含选自人IgM、人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4、和人IgA1/2的重链免疫球蛋白恒定结构域。

38.权利要求32至37中任一项所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段包含选自人Igκ和人Igλ的轻链免疫球蛋白恒定结构域。

39.权利要求32至38中任一项所述的分离的抗体或片段，其中所述抗体或片段以至少约10^{7}至10^{10}M的亲和常数与抗原结合。

40.组合物，其包含权利要求32至39中任一项所述的分离的抗体或片段，以及可药用稀释剂、载体或赋形剂。

41.权利要求40所述的组合物，其还包含用于预防或治疗SP相关疾病的第二药剂。

42.权利要求41所述的组合物，其中所述第二药剂包含以下一种或更多种：与PspA结合的抗体；与PspC结合的抗体；和抗生素。

43.预防或治疗SP相关疾病的方法，其包括向对象施用根据权利要求26至28以及40至42中任一项所述的组合物；根据权利要求29至31中任一项所述的疫苗；或根据权利要求32至39中任一项所述的抗体或片段；以便在所述对象中预防或治疗所述SP相关疾病。

44.预防或治疗SP相关疾病的方法，其包括向对象施用根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白或根据权利要求20至25中任一项限定的方法产生的重组脂化融合蛋白，以便在所述对象中预防或治疗所述SP相关疾病。

45.权利要求43或44所述的方法，其中在所述对象中诱导针对SP的黏膜免疫。

46.权利要求45所述的方法，其中在所述对象中诱导Th1应答和/或分泌性IgA的产生。

47.权利要求45或46所述的方法，其中所述黏膜免疫不是血清型特异性的。

48.权利要求43至47中任一项所述的方法，其中诱导针对该一种或更多种非脂化SP抗原的黏膜免疫。

49.在对象中诱导针对SP感染的免疫的方法，其包括向所述对象施用根据权利要求26至28以及40至42中任一项所述的组合物；根据权利要求29至31中任一项所述的疫苗；或根据权利要求32至39中任一项所述的抗体或片段；以便在所述对象中预防或治疗SP感染。

50.在对象中诱导针对SP感染的免疫的方法，其包括向所述对象施用根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白或根据权利要求20至25中任一项限定的方法产生的重组脂化融合蛋白，以便在所述对象中预防或治疗SP感染。

51.权利要求43至50中任一项所述的方法，其中所述组合物、疫苗、抗体或片段、或重组脂化融合蛋白为静脉内、皮下、肌内、经黏膜或经口施用。

52.权利要求43至51中任一项所述的方法，其中所述组合物、疫苗、抗体或片段、或重组脂化融合蛋白与用于预防或治疗SP感染或SP相关疾病的第二药剂组合施用。

53.权利要求52所述的方法，其中所述组合物、疫苗、抗体或片段、或重组脂化融合蛋白与所述第二药剂同时或依次施用。

54.根据权利要求1至19中任一项所述的重组脂化融合蛋白或根据权利要求20至25中任一项限定的方法产生的重组脂化融合蛋白在制造用于预防或治疗SP感染的疫苗中的用途。

55.用于预防或治疗SP感染的疫苗，其包含根据权利要求26至28中任一项所述的组合物。

脂化肺炎链球菌抗原组合物、制备方法和用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年12月10日提交的美国临时申请No.62/265,525的优先权，其全部内容在此通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开提供了用于预防或治疗肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)感染的组合物和方法。更具体地，本公开涉及脂化肺炎链球菌抗原、其制备方法及其作为针对肺炎链球菌相关疾病的疫苗的用途。

背景技术

[0004] 肺炎链球菌(SP)是在儿童引起肺炎、脑膜炎及脓毒症的主要细菌性病原体。全世界每年约一百万儿童由于SP感染死亡(O'Brien,K.L,等,Lancet 374:893-902,2009)。

[0005] 目前批准的肺炎球菌疫苗仅靶向SP的荚膜多糖(CPS)，并且这些疫苗严格地提供血清型特异性保护。尽管已经通过肺炎球菌CPS-蛋白质缀合物疫苗(PCV)克服了CPS抗原的不良免疫原性，但保护仍为血清型特异性的，并且PCV的高成本降低了疫苗接种覆盖范围。此外，对于SP的鼻咽定殖的研究已显示，空出的生态位被潜在地能够导致疾病的非疫苗肺炎球菌血清型迅速占据。因此，从长远来看，广泛引入CPS和PCV可能仅仅改变侵入性肺炎球菌疾病的血清型分布，而没有降低整体SP疾病负荷(综述参见Kadioglu,A.等,Nature Reviews Microbiology 6:)288-301,2008)。

[0006] 迄今为止最有前景的方法是开发基于有助于毒力且对所有血清型共同的肺炎球菌抗原的疫苗。天然蛋白质抗原(例如PsaA)或其免疫原性片段在施用给宿主时可刺激免疫应答，但此类抗原具有不良的免疫原性并且是差的黏膜免疫原。因为SP必须首先经由黏膜表面进入宿主以产生感染，所以除抗原特异性IgG反应外期望诱导黏膜免疫(例如黏膜分泌性IgA抗体)。实际上已经证实在不诱导Th1应答的情况下，$CD4^+$T细胞缺陷小鼠不能清除鼻咽定殖。

[0007] 需要诱导黏膜免疫的广谱肺炎球菌疫苗。

[0008] 一般而言，经修饰的蛋白质(例如脂化蛋白质)比未经修饰的蛋白质更具有免疫原性。已经使用重组技术通过在大肠杆菌(E.coli)中表达制备了某些疫苗产品中的蛋白质，然而，一般认为大肠杆菌不适于产生经修饰的蛋白质，尤其脂化蛋白质，因为大肠杆菌细胞不良地脂化天然脂化蛋白质，并且不产生脂化形式的非天然脂化蛋白质。

[0009] 美国专利No.7,833,776公开了含有来源于Ag473的脂化序列和靶多肽的脂化融合蛋白在大肠杆菌中的产生。公开了含有Ag473的至少N端40个残基(D1)的脂化序列，以促进大肠杆菌中融合蛋白的脂化。也描述了产生脂化形式的融合蛋白的方法。

[0010] 美国专利No.7,960,535描述了重组脂化PsaA蛋白及可表达此类脂化PsaA蛋白的重组构建体。描述了脂化PsaA蛋白，其中通过使用来源于伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)的ospA基因的异源前导序列实现脂化，该前导序列在翻译阅读框中与PsaA结

构基因结合。该发明还提供制备脂化PsaA蛋白的方法和此类蛋白质在免疫组合物中的用途。还提供了包含免疫原性脂化PsaA蛋白的疫苗及在预防和治疗肺炎链球菌感染中使用此类疫苗的方法。

[0011] 美国专利No.6,538,118描述了在表达系统(例如大肠杆菌)中重组形成的异源脂化蛋白质。异源脂化蛋白质具有不与脂化蛋白质的蛋白质部分天然存在的前导序列。脂化蛋白质可具有疏螺旋体属OspA前导序列。蛋白质部分可以是OspC、PspA、UreA、UreB或其片段。还公开并要求保护了用于形成及使用该蛋白质的方法和组合物。

[0012] 美国专利No.8,771,990描述了在大肠杆菌中产生重组脂化多肽的方法。该方法包括提供适于表达重组脂化多肽的大肠杆菌宿主细胞;以及在在允许表达脂化形式的多肽的条件下在基本培养基中培养大肠杆菌宿主细胞。

发明内容

[0013] 本发明的目的是改善现有技术中存在的至少一些缺陷。已基于发明人的以下理解开发了本发明技术的实施方案:需要用于预防和/或治疗肺炎链球菌(SP)感染和SP相关疾病的改善的组合物和方法。

[0014] 本发明至少地部分基于发明人的发现:可使用其天然脂质信号肽在大肠杆菌中产生重组脂化SP抗原。具体地,与依赖于异源脂质信号肽在大肠杆菌中产生重组脂化SP抗原的已知疫苗相比,本发明人已使用天然PsaA脂质信号肽在大肠杆菌中产生重组脂化PsaA融合蛋白(在本文中被称作“rlipo-PsaA”)。此外,rlipo-PsaA在小鼠模型中针对SP相关疾病诱导黏膜免疫应答并且提供保护。出人意料地,rlipo-PsaA显示出均质脂质结构,即仅表达单一形式的脂质修饰。在小鼠模型中引发的免疫应答不是血清型特异性的,例如,其针对超过一种血清型的SP具有保护性。此外,rlipo-PsaA引发针对共同施用的非脂化SP抗原的黏膜免疫,所述抗原本身是非免疫原性的,表明rlipo-PsaA的强黏膜佐剂效应。

[0015] 因此,在第一方面,提供了包含肺炎球菌表面抗原A(PsaA)的重组脂化融合蛋白,其中所述重组脂化融合蛋白从N端至C端包含PsaA的N端天然脂质信号肽和PsaA的C端结构基因。

[0016] 重组脂化融合蛋白在N端或C端还可包含标签或可检测标记。在一个实施方案中,重组脂化融合蛋白在C端包含具有6个组氨酸残基的氨基酸标签。

[0017] 在一些实施方案中,重组脂化融合蛋白包含具有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列(MKKLGTLLVLFLSAIILVAC)的天然PsaA脂质信号肽。在一些实施方案中,重组脂化融合蛋白包含脂质信号肽,所述脂质信号肽与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列具有至少约80至99%同一性,例如,与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性。在一些实施方案中,重组脂化融合蛋白包含含有PsaA的N端部分的脂质信号肽。在一些实施方案中,重组脂化融合蛋白包含最大长度为约15至40个氨基酸的脂质信号肽。

[0018] 在一些实施方案中,重组脂化融合蛋白包含SEQ ID NO:1或7(rlipo-PsaA)中所示的氨基酸序列或其同源物、片段、类似物或变体。在一些实施方案中,重组脂化融合蛋白包含与SEQ ID NO:1或7中所示的氨基酸序列具有至少约80至99%同一性的氨基酸序列。重组脂化融合蛋白可包含与SEQ ID NO:1或7中所示的氨基酸序列具有至少约80%、至少约

85％、至少约90％、至少约95％或至少约99％同一性的氨基酸序列。应当理解，重组脂化融合蛋白可包含全长PsaA蛋白或其免疫原性部分。还涵盖其功能等同或生物活性同源物、片段、类似物和/或变体。

[0019] 在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白是分离或纯化形式，例如从产生其的表达系统中分离。

[0020] 重组脂化融合蛋白是使用重组技术产生的，并且其可使用任何合适的表达系统产生。在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白在大肠杆菌中表达，例如在提供高水平蛋白质表达的菌株如(但不限于)C43(DE3)、(ECCC B96070445)、C41(DE3)(ECCC B96070444)、C0214(DE3)、DK8(DE3)S(NCIMB 40885)或C2014(DE3)(NCIMB 40884))中表达，且任选地从其中分离或纯化。在一个实施方案中，重组脂化融合蛋白通过包含具有SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列的DNA的载体的表达产生。

[0021] 在一些实施方案中，本文中提供的重组脂化融合蛋白包含均质脂质结构，例如由质谱法分析观察到的单一主峰。在一个实施方案中，重组脂化融合蛋白具有在图6D中所示的质谱谱图。

[0022] 在一些实施方案中，本文中提供的重组脂化融合蛋白能够在对象中诱导针对SP感染和SP相关疾病的免疫应答，包括黏膜免疫应答。黏膜免疫应答可包括对象中的Th1应答和/或分泌性IgA的产生。在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白能够在没有佐剂的情况下施用时诱导黏膜免疫应答。

[0023] 在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白还能够诱导针对同时施用的一种或更多种非脂化肺炎链球菌(SP)抗原(例如肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌表面蛋白C(PspC)等)的黏膜免疫应答。

[0024] 所诱导的免疫应答可针对宽范围的SP相关疾病具有保护性，所述疾病包括急性和慢性疾病两者，例如但不限于肺炎、脑膜炎、脓毒症、耳感染、窦感染和菌血症。在一些实施方案中，所诱导的免疫应答不是血清型特异性的。

[0025] 在另一方面，提供了产生本文所述的重组脂化融合蛋白的方法。该方法包括以下步骤：(1)提供用表达载体转化的宿主大肠杆菌细胞，所述表达载体包含编码PsaA的N端天然脂质信号肽的第一核苷酸序列和编码PsaA的C端结构基因的第二核苷酸序列；以及(2)培养大肠杆菌转化体，以允许表达包含PsaA的N端天然脂质信号肽和PsaA的C端结构基因的融合蛋白。宿主大肠杆菌细胞可来自于提供高水平蛋白质表达的菌株，例如但不限于C43(DE3)(ECCC B96070445)、C41(DE3)(ECCC B96070444)、C0214(DE3)、DK8(DE3)S(NCIMB 40885)、和C2014(DE3)(NCIMB 40884)。在一些实施方案中，在M9培养基中培养大肠杆菌转化体。在一些实施方案中，表达载体包含SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，该方法还包括在其表达后从所述大肠杆菌中分离或纯化重组脂化融合蛋白。

[0026] 在一些实施方案中，提供了根据本文中提供的方法制备的重组脂化融合蛋白。

[0027] 在另一方面，提供了包含本文中所述的一种或更多种重组脂化融合蛋白和可药用稀释剂、载体或赋形剂的组合物。在一些实施方案中，组合物还包含一种或更多种非脂化SP抗原例如PspA和/或PspC。

[0028] 在另一方面，提供了用于预防或治疗SP相关疾病的疫苗，其包含本文中所述的一种或更多种重组脂化融合蛋白，以及佐剂。在一些实施方案中，疫苗还包含一种或更多种非

脂化SP抗原例如PspA和/或PspC。

[0029] 在又一方面，提供了对本文中所述的重组脂化融合蛋白具有特异性的分离的抗体或其片段。在一些实施方案中，抗体或其片段是多克隆抗体。在可替代的实施方案中，抗体或其片段是单克隆抗体。抗体或其片段可以是人源化的、人的或嵌合的。在一些实施方案中，抗体或其片段包含完整免疫球蛋白分子；单链抗体；单链可变片段(scFv)；单结构域抗体；Fab片段；$F(ab')_2$片段；或二硫键连接的Fv(di-scFv)。抗体或其片段可包含选自人IgM、人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4、和人IgA1/2的重链免疫球蛋白恒定结构域。此外，抗体或其片段可包含选自人Ig κ和人Igλ的轻链免疫球蛋白恒定结构域。在一些实施方案中，抗体或片段以10^7M至10^{10}M的高亲和常数与抗原结合。

[0030] 还提供了包含分离的抗体或其片段以及可药用稀释剂、载体或赋形剂的组合物。

[0031] 在一些实施方案中，本文中提供的组合物还包含用于预防或治疗SP感染或SP相关疾病的第二药剂。在一些实施方案中，第二药剂包括但不限于以下一种或更多种：与PspA的抗体和与PspC结合的抗体。在另一个实施方案中，第二药剂包含抗生素，例如但不限于甲硝唑(metronidazole)或万古霉素。

[0032] 在另一方面，提供了用于预防或治疗SP感染和/或SP相关疾病的方法，其包括向对象施用本文中所述的重组脂化融合蛋白、组合物、疫苗或抗体或其片段，以便在对象中预防或治疗SP感染和/或SP相关疾病。还提供了在对象中诱导针对SP感染的免疫以在对象中预防或治疗SP感染的方法。在一些实施方案中，提供了在对象中诱导针对SP感染的黏膜免疫，以便在对象中预防或治疗SP感染的方法。在一些实施方案中，黏膜免疫可包括Th1应答和分泌性IgA的产生中的一种或更多种。在一些实施方案中，提供了在对象中诱导针对SP感染的非血清型特异性免疫以在对象中预防或治疗超过一种血清型的SP感染的方法。

[0033] 重组脂化融合蛋白、组合物、疫苗、抗体或其片段可静脉内、皮下、肌内、经黏膜或经口施用。在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白、组合物、疫苗、抗体或其片段与第二药剂组合施用以用于预防和治疗SP感染。第二药剂可与重组脂化融合蛋白、组合物、疫苗、抗体或其片段同时施用，或其可依序施用，即一种在另一种之前。

[0034] 还提供了重组脂化PsaA融合蛋白在制造用于预防或治疗SP感染的疫苗中的用途。

[0035] 在又一方面，提供了用于预防或治疗SP感染或SP相关疾病的药盒(kit)，其包含本文中所述的一种或更多种重组脂化融合蛋白、抗体、组合物和/或疫苗。也可在药盒中提供用于使用或实施本文中所述的方法的说明书。药盒还可包含实施本文中所述的方法所需要的另外的试剂、溶剂、缓冲剂、佐剂等。

[0036] 附图简述

[0037] 专利或申请文件含有至少一个彩色附图。在请求且支付必要的费用后，将由官方提供具有彩色附图的该专利或专利申请公开的副本。

[0038] 为了更好地理解本发明且更清楚地展示其可如何实施，现将以实例的方式对附图进行参考，附图说明了根据本发明的优选实施方案的方面和特征，其中：

[0039] 图1示出了：(A)全长PsaA蛋白的氨基酸序列；(B)无信号肽的PsaA的氨基酸序列；(C)胆碱结合结构域(choline binding domain，CBD)缺失的肺炎球菌表面蛋白A(PspAΔCBD)的氨基酸序列；以及(D)CBD缺失的PspC(PspCΔCBD)的氨基酸序列。

[0040] 图2示出了所选择的免疫原(包括rlipo-PsaA、rPsaA-Ct、rPspAΔCBD和rPspCΔ

CBD)的纯化。A:在还原条件下并使用考马斯蓝染色,通过15%SDS-PAGE监测rlipo-PsaA的纯化过程。泳道1,IPTG诱导之后的细胞裂解物;泳道2,IPTG诱导之前的细胞裂解物;泳道3,经诱导细胞的可溶级分;泳道4,经纯化的rlipo-PsaA。泳道5至8为使用抗(His)6抗体对rlipo-PsaA纯化过程进行免疫印迹监测的结果。B:在还原条件和考马斯蓝染色下,通过15%SDS-PAGE监测rPsaA-Ct的纯化过程。泳道1,IPTG诱导之后的细胞裂解物;泳道2,IPTG诱导之前的细胞裂解物;泳道3,经诱导细胞的可溶级分;泳道4,经纯化的rPsaA-Ct。泳道5至8为使用抗(His)6抗体对rPsaA-Ct纯化过程进行免疫印迹监测的结果。C:在还原条件和考马斯蓝染色下,通过15%SDS-PAGE监测rPspAΔCBD的纯化过程。泳道1,IPTG诱导之后的细胞裂解物;泳道2,IPTG诱导之前的细胞裂解物;泳道3,经诱导细胞的可溶级分;泳道4,经纯化的rPspAΔCBD。泳道5至8为使用抗(His)6抗体对rPspAΔCBD纯化过程进行免疫印迹监测的结果。D:在还原条件和考马斯蓝染色下,通过15%SDS-PAGE监测rPspCΔCBD的纯化过程。泳道1,IPTG诱导之后的细胞裂解物;泳道2,IPTG诱导之前的细胞裂解物;泳道3,经诱导细胞的可溶级分;泳道4,经纯化的rPspCΔCBD。泳道5至8为使用抗(His)6抗体对rPspCΔCBD纯化过程进行免疫印迹监测的结果。

[0041] 图3示出了rlipo-PsaA的N端片段的识别以及rlipo-PsaA激活骨髓来源的树突状细胞(BMDC)。A:通过Bruker AutoFlex™ III质谱仪分析经10分钟消化的样品。MALDI-TOF MS谱还证明在m/z 1266处的主峰为来自rlipo-PsaA的N端的脂肽片段。B:在用rlipo-PsaA刺激后CD40分子能够上调,而rPsaA-Ct的刺激作用不明显。C:TNF-α的分泌由rlipo-PasA以剂量依赖方式诱导,而不由rPsaA-Ct组诱导。D:IL-12p40由rlipo-PasA以剂量依赖方式诱导,而不由rPsaA-Ct组诱导。

[0042] 图4示出了在施用rlipo-PsaA之后抗PsaA IgG和IgA抗体滴度的增强以及Th1偏倚的免疫应答的诱导。A:通过以两周的间隔皮下注射PBS中的30μg rlipo-PsaA或PBS中的30μg rPsaA-Ct对小鼠进行免疫两次。在第2周、第4周和第5周,由rlipo-PsaA引发的IgG滴度比由rPsaA-Ct引发的那些高1000倍。B:在第2周、第4周和第5周,在用rlipo-PsaA免疫之后引发的IgA滴度比由rPsaA-Ct引发的那些高10000倍。C:随后,为了在第5周时分析rlipo-PsaA和rPsaA-Ct免疫之后所引发的抗体同种型,测量IgG1和IgG2b的诱导水平。在rlipo-PsaA免疫的小鼠和rPsaA-Ct免疫的小鼠两者中,IgG1水平相当。用rlipo-PsaA免疫的小鼠中的IgG2b水平比用rPsaA-Ct免疫的小鼠中的那些更高。D:通过比较这些小鼠中的IgG2b/IgG1比率,可清楚地观察到Th1偏倚的现象。

[0043] 图5示出了在动物模型中用rlipo-PsaA和其他疫苗候选物进行免疫保护小鼠抵抗SP。(A)示出了第一研究,其中用rlipo-PsaA和rPsaA-Ct对小鼠进行疫苗接种,然后使用10×LD剂量的SP进行攻击。用2×10^5D39菌株(高毒力株)攻击的小鼠在用rlipo-PsaA免疫后100%被保护,在用rPsaA免疫后约75%被保护。(B)示出了第二研究,其中用rlipo-PsaA/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD、rPsaA-Ct/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD、rlipo-PsaA、rPsaA-Ct和PBS对小鼠进行疫苗接种,随后用100×LD剂量的SP进行攻击。用3.9×10^6D39菌株攻击的小鼠通过免疫分别得到83.3%、50%、33.3%、16.7%和0%的保护。(C)示出了另外的研究,其中如所指示,用rlipo-PsaA/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD(T1+T2+T3)、rPsaA-Ct/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD(T1+T2+T4)、rlipo-PsaA(T3)、具有或不具有佐剂(CT)的rPsaA-Ct(T4)及PBS对小鼠进行疫苗接种,随后用不同血清型的肺炎链球菌菌株进行攻击。经疫苗接种的小鼠显

示了显著降低的肺炎链球菌血清型35B、14及19F的鼻咽定殖或在血清型3的致死性攻击下存活。

[0044] 图6示出了使用质谱法对重组脂化融合蛋白上发现的脂质结构进行分析。(A)显示来自脑膜炎球菌蛋白质Ag473的脂质信号肽产生至少三个峰，如通过质谱法分析的。(B)和(C)显示分别与Ag473的脂质信号肽融合的抗原D1E3及E7m也含有至少三个峰。(D)显示相比之下，使用其自身的天然脂质信号肽表达的rlipo-PsaA表达为一个主峰(分子量)。

[0045] 详细描述

[0046] 本公开提供了包含PsaA蛋白及其部分的重组脂化融合蛋白，该融合蛋白包含PsaA的天然脂质信号肽，在此之前这是不可能的。

[0047] 特别地，本文中报告了天然脂蛋白肺炎球菌表面抗原A(PsaA)可使用其自身的脂质信号肽从含有编码PsaA的合成DNA片段的大肠杆菌构建体产生重组脂化蛋白质。在小鼠模型中，用重组脂化PsaA融合蛋白的免疫增强了PsaA特异性IgG和IgA抗体滴度并诱导Th1偏倚的免疫应答，以及保护小鼠抵抗不同肺炎球菌菌株的攻击。此外，具有其他截短抗原胆碱结合结构域(CBD)缺失的肺炎球菌表面蛋白A(PspAΔCBD)和CBD缺失的肺炎球菌表面蛋白C(PspCΔCBD)的重组脂化PsaA融合蛋白能够诱导针对共同施用的抗原的免疫应答且保护小鼠免受高剂量攻击，而具有PspA和PspC的非脂化PsaA不能提供保护。因此，本文中所述的重组脂化融合蛋白及其组合物可用作抗广谱SP感染和SP相关疾病的疫苗。

[0048] 在一些实施方案中，除全身性免疫应答外，本文中提供的重组脂化融合蛋白诱导针对肺炎链球菌(SP)的广谱黏膜免疫应答。此外，重组脂化融合蛋白可对其他共同施用的SP抗原具有佐剂效应，也诱发针对它们的免疫应答。在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白可具有如使用质谱法测定的均质脂质修饰。本文中还提供了制备重组脂化融合蛋白的方法及其作为针对SP相关疾病的疫苗的用途。

[0049] 在一些实施方案中，重组脂化融合蛋白、组合物及其使用方法可提供以下优点中的一个或更多个：诱导针对SP的保护性免疫应答(包括黏膜免疫应答)的能力；诱导针对SP的非血清型特异性的保护性免疫应答的能力；和/或，诱导针对与重组脂化PsaA融合蛋白一起配制和/或共同施用的一种或更多种非脂化SP抗原的黏膜免疫应答的能力(换言之，具有黏膜佐剂效应)。在一些实施方案中，包含PsaA的天然脂质信号肽的重组脂化PsaA融合蛋白的提供了具有均质脂质结构的脂化蛋白质，例如仅具有单一形式的脂质修饰，如使用质谱法所测定的，其中观察到单一峰。通过使制造更容易和/或降低制造成本，通过提供更简单的融合蛋白产物以及改善的批次间的一致性，均质脂质结构在一些情况下可能是有利的。在一些实施方案中，本文中提供的重组脂化融合蛋白可有利地提高诱导的免疫应答的特异性和/或降低其交叉反应性，尤其与使用异源脂质修饰的已知抗原(例如脑膜炎球菌脂肪抗原(rAg473)、融合抗原(rlipo-D1E3和rlipo-E7m))相比。使用本文中所述的重组脂化融合蛋白、组合物和使用方法可获得其他技术效果。应当理解，不需要在本发明技术的各个和每个实施方案中采用本文中所提及的所有技术效果和优点。

[0050] 重组脂化融合蛋白

[0051] 本文中提供了包含肺炎球菌表面抗原A(PsaA)的重组脂化融合蛋白，其中重组脂化融合蛋白从N端至C端包含PsaA的N端天然脂质信号肽和PsaA的C端结构基因，任选地在N端或C端具有标签或可检测标记。

[0052] 应当理解，重组脂化融合蛋白的任何免疫原性同源物、类似物、变体或片段或部分也涵盖在本发明内，且可以在本文中提供的组合物和方法中使用。应注意，SP的许多不同的菌株和血清型是已知的，并且由不同的菌株和血清型表达的抗原可能在其氨基酸序列中略微地变化。然而，本文中提供的重组脂化融合蛋白不意味局限于由任何特定菌株或血清型表达的PsaA蛋白。明确意图是本技术涵盖同源物、变体、片段和类似物。

[0053] 术语“重组脂化融合蛋白”和“重组脂化PsaA融合蛋白”在本文中可互换地使用，意指包含本文中提供的天然PsaA脂质信号肽和/或根据本文中提供的重组方法产生的PsaA融合蛋白。

[0054] 术语“脂化”在本文中用以意指通过结合脂质基团而共价修饰的蛋白质。蛋白质可用多种脂质(包括脂肪酸、类异戊二烯和胆固醇)共价修饰。脂化可影响蛋白质的活性和/或其亚细胞定位，以及提高肽抗原的免疫原性。脂化蛋白质对于许多细菌感染过程是重要的。

[0055] 术语“重组”在本文中用于意指在体外或使用重组表达系统产生的蛋白质，即在宿主细胞(例如细菌或动物细胞)中由编码蛋白质的重组构建体(例如如表达载体)表达，并且任选地从宿主细胞分离和/或纯化，或在来自表达系统的提取物中使用。重组蛋白质通常可以以高产量和纯度产生，并且操作以使期望活性最大化和不期望的活性最小化。

[0056] 一般而言，如下产生重组蛋白质：构建编码目的PsaA融合蛋白的合成或半合成DNA；以适合于表达脂化PsaA融合蛋白的方式将DNA整合到表达载体中；用表达载体转化合适原核或真核宿主细胞；培养经转化或经转染的宿主细胞以表达脂化PsaA融合蛋白；以及任选地分离或纯化重组产生的脂化PsaA融合蛋白。

[0057] 对于重组表达，编码脂化PsaA融合蛋白的DNA序列可以是完全合成的、半合成的或者是修饰天然PsaA基因的结果。表达载体可包含另外的序列，以用于检测或纯化融合蛋白(例如氨基酸标签等)或用于操控DNA序列(例如限制性核酸内切酶切割位点、接头等)。本领域技术人员应当理解，融合蛋白的不同部分通常彼此相邻放置且以翻译开放阅读框关系偶联。

[0058] 在一些实施方案中，将编码本文中所描述的重组脂化PsaA融合蛋白的DNA片段插入到表达载体如包含强启动子(例如T7、T5、T3或SP6启动子)的载体中以构建表达质粒。强启动子可例如由异丙基β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导。然后可将表达质粒引入到大肠杆菌宿主菌株中并且在合适条件下培养阳性转化体以用于蛋白质表达。在一些实施方案中，大肠杆菌宿主菌株可对可由外源蛋白质的过表达诱导的毒性效应具有抗性。例如，可通过在美国专利No.6,361,966中描述的方法鉴定和产生此类大肠杆菌菌株。此类大肠杆菌菌株的实例包括但不限于C43(DE3)(ECCC B96070445)、C41(DE3)(ECCC B96070444)、C0214(DE3)、DK8(DE3)S(NCIMB 40885)和C2014(DE3)(NCIMB 40884)。可从大肠杆菌宿主细胞分离或纯化由此表达的重组脂化融合蛋白。可使用本领域中已知方法(例如用抗脂蛋白抗体的免疫印迹或质谱法)确认蛋白质的脂化状态。

[0059] 在表1中给出了示例性重组脂化融合蛋白和其他SP抗原的蛋白质/肽部分及其编码DNA的序列。

[0060] 表1.示例性重组脂化融合蛋白、其编码DNA及其他SP肽抗原的氨基酸和核苷酸序列[1]。

[0061]

SEQ ID NO.	氨基酸序列	名称
1	MKKLGTLLVLFLSAIILVACASGKKDTTSGQKLKVVATNSIIADITKNI AGDKIDLHSIVPIGQDPHEYEPLPEDVKKTSEADLIFYNGINLETGGNA WFTKLVENAKKTENKDYFAVSDGVDVIYLEGQNEKGKEDPHAWLNL ENGIIFAKNIAKQLSAKDPNNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDKESKDKFN KIPAEKKLIVTSEGAFKYFSKAYGVPSAYIWEINTEEEGTPEQIKTLVEK LRQTKVPSLFVESSVDDRPMKTVSQDTNIPIYAQIFTDSIAEQGKEGDS YYSMMKYNLDKIAEGLAK	全长重组脂化PsaA融合蛋白（rlipo-PsaA）
2	MASGKKDTTSGQKLKVVATNSIIADITKNIAGDKIDLHSIVPIGQDPHE YEPLPEDVKKTSEADLIFYNGINLETGGNAWFTKLVENAKKTENKDY FAVSDGVDVIYLEGQNEKGKEDPHAWLNLENGIIFAKNIAKQLSAKDP NNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDKESKDKFNKIPAEKKLIVTSEGAFKYF SKAYGVPSAYIWEINTEEEGTPEQIKTLVEKLRQTKVPSLFVESSVDDR PMKTVSQDTNIPIYAQIFTDSIAEQGKEGDSYYSMMKYNLDKIAEGLA K	无脂质信号肽的PsaA (rPsaA-Ct)
3	MEESPVASQSKAEKDYDAAKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQK KYDEDQKKTEEKAALEKAASEEMDKAVAAVQQAYLAYQQATDKAA KDAADKMIDEAKKREEEAKTKFNTVRAMVVPEPEQLAETKKKSEEA KQKAPELTKKLEEAKAKLEEAEKKATEAKQKVDAEEVAPQAKIAELE NQVHRLEQELKEIDESESEDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAKLSKLEELS DKIDELDAEIAKLEDQLKAAEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKT EADLKKAVNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQPAPAPKPEKPA EQPKPEKTDDQQAEEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPAPAPKLEH HHHHH	CBD-缺失的PspA (PspA△CBD)
4	MFASKSERKVHYSIRKFSIGVASVAVASLVMGSVVHATENEGSTQAA TSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLS AIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAE LELVKEEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAEATRLENIKTDRKKAEEEA KRKADAKLKEANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSS DSSVGEETLPSSSLKSGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPT	CBD-缺失的PspC (PspC△CBD)

[0062]

	NTYKTLDLEIAESDVKVKEAELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESK KAEATRLENIKTDRKKAEEEAKRKAAEEDKVKEKPAEQPQPAPATQP EKPAPKPEKPAEQPKAEKTDDQQAEEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKT EKPAQPSTPKLEHHHHHH	
5	MKKLGTLLVLFLSAIILVAC	PsaA天然脂质信号肽
6	ATGAAAAAACTGGGCACCCTGCTGGTGCTGTTTCTGAGCGCGATTATTCTGG TGGCGTGCGCGAGCGGCAAAAAAGATACCACCAGCGGCCAGAAACTGAAAGT GGTGGCGACCAACAGCATTATTGCGGATATTACCAAAAACATTGCGGGCGAT AAAATTGATCTGCATAGCATTGTGCCGATTGGCCAGGATCCGCATGAATATG AACCGCTGCCGGAAGATGTGAAAAAAACCAGCGAAGCGGATCTGATTTTTTA TAACGGCATTAACCTGGAAACCGGCGGCAACGCGTGGTTTACCAAACTGGTG GAAAACGCGAAAAAAACCGAAAACAAAGATTATTTGCGGTGAGCGATGGCG TGGATGTGATTIATCTGGAAGGCCAGAACGAAAAAGGCAAAGAAGATCCGCA TGCGTGGCTGAACCTGGAAAACGGCATTATTTTGCGAAAAACATTGCGAAA CAGCTGAGCGCGAAAGATCCGAACAACAAAGAATTTTATGAAAAAAACCTGA AAGAATATACCGATAAACTGGATAAACTGGATAAAGAAAGCAAAGATAAATT TAACAAAATTCCGGCGGAAAAAAAACTGATTGTGACCAGCGAAGGCGCGTTT AAATATTTTAGCAAAGCGTATGGCGTGCCGAGCGCGTATATTTGGGAAATTA ACACCGAAGAACAAGGCACCCCGGAACAGATTAAAACCCTGGTGGAAAAACT GCGTCAGACCAAAGTGCCGAGCCTGTTTGTGGAAAGCAGCGTGGATGATCGT CCGATGAAAACCGTGAGCCAGGATACCAACATTCCGATTTATGCGCAGATTT TTACCGATAGCATTGCGGAACAGGGCAAAGAAGGCGATAGCIATTATAGCAT GATGAAATATAACCTGGATAAAATTGCGGAAGGCCTGGCGAAACTCGAGCAC CACCACCACCACCACTGA	编码rlipo-PsaA蛋白的DNA
7	MKKLGTLLVLFLSAIILVACASGKKDTTSGQKLKVVATNSIIADITKNI AGDKIDLHSIVPIGQDPHEYEPLPEDVKKTSEADLIFYNGINLETGGNA WFTKLVENAKKTENKDYFAVSDGVDVIYLEGQNEKGKEDPHAWLNL ENGIIFAKNIAKQLSAKDPNNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDKESKDKFN KIPAEKKLIVTSEGAFKYFSKAYGVPSAYIWEINTEEEGTPEQIKTLVEK LRQTKVPSLFVESSVDDRPMKTVSQDTNIPIYAQIFTDSIAEQGKEGDS YYSMMKYNLDKIAEGLAKHHHHHH	具有C端His标签的rlipo-PsaA
8	MASGKKDTTSGQKLKVVATNSIIADITKNIAGDKIDLHSIVPIGQDPHE YEPLPEDVKKTSEADLIFYNGINLETGGNAWFTKLVENAKKTENKDY FAVSDGVDVIYLEGQNEKGKEDPHAWLNLENGIIFAKNIAKQLSAKDP NNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDKESKDKFNKIPAEKKLIVTSEGAFKYF SKAYGVPSAYIWEINTEEEGTPEQIKTLVEKLRQTKVPSLFVESSVDDR PMKTVSQDTNIPIYAQIFTDSIAEQGKEGDSYYSMMKYNLDKIAEGLA KHHHHHH	具有C端His标签的rPsaA-Ct

[0063] [1]氨基酸序列从N端至C端示出，核苷酸序列从5’至3’方向示出。

[0064] 还涵盖了重组脂化PsaA融合蛋白的变体、类似物和片段。如本文所使用，“变体”指天然存在的蛋白质或肽的氨基酸序列，其中少量氨基酸被替换、插入或缺失，并且其保持起始蛋白质的相关生物活性或功能。例如，在用于疫苗的抗原的情况下，变体可保持起始蛋白质的免疫原性特征，足够其在诱导免疫中的预期使用。在抗体的情况下，变体可保持起始蛋白质的抗原结合特性，足够其在与抗原特异性结合中的预期使用。

[0065] 在一些实施方案中，变体包含一个或更多个保守性氨基酸替换、一个或更多个非保守性氨基酸替换、一个或更多个缺失和/或一个或更多个插入。保守性替换是氨基酸残基被另一个具有类似特征(例如电荷或疏水性)的氨基酸残基替换的替换。一般而言，保守性氨基酸替换将不会实质改变蛋白质的功能特性。具有类似化学特性之侧链的氨基酸组的实例包括：1)脂肪族侧链：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；2)脂肪族-羟基侧链：丝氨酸和苏氨酸；3)含酰氨侧链：天冬酰胺和谷氨酰胺；4)芳族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；5)碱性侧链：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；6)酸性侧链：天冬氨酸和谷氨酸；以及7)含硫侧链：半胱氨酸和甲硫氨酸。示例性保守性氨基酸替换组为：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸，苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

其他保守性氨基酸替换在本领域中是已知的且包括在本文中。非保守性替换，例如用疏水性氨基酸替换碱性氨基酸，也是本领域中所公知的。

[0066] 如本文所使用“类似物”指天然存在的蛋白质的氨基酸序列，其中一个或更多个氨基酸被氨基酸类似物替换。氨基酸类似物的非限制性实例包括非天然存在的氨基酸、合成氨基酸、仅在无关生物系统中天然存在的氨基酸、来自哺乳动物系统的经修饰氨基酸、具有经取代键以及本领域已知的其他修饰的多肽(天然存在和非天然存在)。在一些实施方案中，类似物包括提高糖蛋白或糖肽稳定性的修饰。在一个实施方案中，类似物包括β氨基酸、γ氨基酸或D-氨基酸。

[0067] “片段”指保持起始分子的相关生物活性或功能(例如抗原性、抗原结合、免疫原性)的起始分子的部分。

[0068] “生物活性”或“功能等同”片段、变体或类似物通常保持起始分子的生物活性或功能，足以在本发明组合物和方法中使用。因此，“生物活性”或“功能等同”片段、变体或类似物可保持起始分子的结合特异性、抗原性或免疫原性。在一些实施方案中，片段、变体或类似物与起始分子(例如蛋白质)具有至少约70％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约98％或至少约99％序列同一性。当提及抗体时，“功能等同”一般指保持用于本发明的组合物和方法的足够的抗原结合亲和力、特异性和/或选择性的抗体的片段、衍生物、变体、类似物或融合蛋白。功能等同抗体或片段的抗原结合特性不必与参考抗体的相同，只要其足以用于本发明组合物和方法以预防或治疗肺炎链球菌相关疾病即可。

[0069] 变体、片段或类似物也可在N末端和/或C末端进行修饰以允许多肽或片段在构形上受限和/或以允许偶联至免疫原性载体。

[0070] 还提供了包含缀合至载体分子的重组脂化PsaA融合蛋白的缀合脂化PsaA抗原。载体分子可以是任何合适的分子，例如但不限于肽、蛋白质、膜蛋白、碳水化合物部分、或载有任何前述类型的载体分子或载有脂化PsaA抗原本身的一种或更多种脂质体。许多这样的载体分子是本领域中已知的且可用于本文中提供经缀合的脂化PsaA抗原中。此外，可使用本领域中任何合适的方法，例如通过共价键或离子相互作用，直接地或使用接头将载体分子与脂化PsaA抗原连接。

[0071] 在另一个实施方案中，脂化PsaA抗原作为融合蛋白或缀合物产生，所述融合蛋白或缀合物含有不是天然SP PsaA序列的部分的其他不同氨基酸序列，例如氨基酸接头或免疫原性载体，以及用于蛋白质纯化的配体，例如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签和葡萄球菌蛋白A。异源多肽可融合至例如重组脂化PsaA融合蛋白的N端或C端。

[0072] 如本文中所使用，术语“分离的”是指这样的分子，从其起源或来源来讲，(1)不与在其天然状态下与其相伴随的天然缔合组分缔合，(2)不含来自同一物种的其他大分子(例如蛋白质、聚糖)，(3)由来自不同物种的细胞表达或(4)在自然界中不存在的分子。因此，化学合成或在不同于其天然来源之细胞的细胞系统中合成的脂化蛋白质将与其天然缔合组分“分离”。也可使用本领域中公知的纯化或分离技术来分离使脂化蛋白质基本上不含天然缔合组分。本文所述的组合物及方法中使用的重组脂化PsaA融合蛋白通常以纯的或实质上纯的形式提供，即，基本上不含尤其是来自其他SP的其他蛋白质和多肽，或宿主细胞蛋白质或多肽。在一些实施方案中，重组脂化PsaA融合蛋白为至少约50％纯、至少约60％纯、至少约70％纯、至少约80％纯、至少约90％纯、或至少约95％纯(按重量计)。

[0073] 可通过多种方法(例如重组表达、从细胞培养物纯化、化学合成等)制备重组脂化PsaA融合蛋白。在一些实施方案中,在异源细胞中表达后纯化重组脂化PsaA融合蛋白。例如,如上文概述,可使用本领域中公知的技术将编码重组脂化PsaA融合蛋白的多核苷酸引入到可在合适表达系统中表达的表达载体中,接着分离或纯化表达的融合蛋白。通常,重组脂化PsaA融合蛋白在异源细菌细胞(例如大肠杆菌)中表达。在本领域中可获得多种细菌表达系统并可使用任何此类合适的表达系统。

[0074] 本文中所描述的技术的许多变化在本领域中是已知的且可用于制备重组脂化PsaA融合蛋白。

[0075] 药物组合物和方法

[0076] 本文提供了用于预防或治疗对象中SP感染和/或SP相关疾病的组合物和方法,其包括重组脂化PsaA融合蛋白。还提供了用于诱导对SP的免疫应答的组合物和方法。本文中提供的方法包括以有效诱导针对SP的免疫应答的量向对象施用重组脂化PsaA融合蛋白,从而降低、消除、预防或治疗SP相关疾病。还提供用于产生用于针对SP相关疾病的被动免疫接种的抗体的组合物和方法。

[0077] 肺炎链球菌(SP)是引起许多类型的肺炎球菌感染的致病性细菌。存在超过九十种已知的荚膜SP血清型,其中二十三种导致约85至90%的肺炎球菌疾病。除了最常见的感染、肺炎及脑膜炎之外,SP也造成肺炎球菌疾病,例如但不限于脓毒症、支气管炎、鼻炎、急性窦炎、中耳炎、结膜炎、菌血症、脓毒症、骨髓炎、脓毒性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心包炎、蜂窝组织炎和脑脓肿。SP相关疾病可以是急性感染或慢性感染的结果。在一些实施方案中,SP相关疾病选自肺炎、脑膜炎、耳感染、窦感染和菌血症。

[0078] 术语“对象”和“患者”在本文中可互换使用,意指需要预防或治疗SP相关疾病或与SP相关的感染的对象。对象可以是脊椎动物,例如哺乳动物,例如人、非人灵长类、兔、大鼠、小鼠、牛、马、山羊或其他动物。动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如小鼠、绵羊、狗、牛、鸟类、鸭、鹅、猪、鸡、两栖动物和爬行动物。在一个实施方案中,对象是人

[0079] “治疗”是指(i)防止感染或再感染,例如预防,或(ii)降低或消除目标疾病的症状,例如治疗。“治疗”可指施用包含本文中所述的重组脂化PsaA融合蛋白的组合物或指施用针对这些融合蛋白产生的抗体。用组合物治疗对象可防止或降低感染风险和/或诱导对SP的免疫应答。

[0080] 治疗可以是预防性的(例如预防或延缓疾病发作、预防其临床或亚临床的表现、或预防疾病的复发)或治疗性的(例如在疾病表现之后抑制或缓解症状)。“预防”意指向未被感染或无症状和/或处于感染风险下的对象重组脂化PsaA融合蛋白或其组合物进行预防性施用或疫苗接种。

[0081] 如本文所使用,术语“免疫应答”意指免疫系统细胞对外部或内部刺激(例如抗原、细胞表面受体、细胞因子、趋化因子和其他细胞)的应答,其在免疫细胞中产生生物化学变化从而引起免疫细胞迁移、杀死靶细胞、吞噬作用、产生抗体、产生免疫应答的可溶性效应子等。“免疫原性”分子是施用之后能够在对象中产生免疫应答的分子。术语“黏膜免疫”和“黏膜免疫应答”可互换使用,意指在黏膜表面的免疫应答,通常涉及诱导常见的黏膜免疫系统。黏膜免疫应答通常包括分泌性IgA的产生和/或Th1应答的激活。

[0082] “主动免疫接种(Active immunization)”意指向对象施用抗原(例如免疫原性分

子，例如本文中所描述的重组脂化PsaA融合蛋白)以诱导免疫应答的过程。相比之下，“被动免疫接种(passive immunization)”意指通常以预制抗体的形式向对象施用活性体液免疫。被动免疫接种为短期免疫的形式，可通过施用抗体或其抗原结合片段实现。可以以多种可能的形式施用抗体，例如作为人或动物血浆或血清、作为合并的动物或人免疫球蛋白、作为来自经免疫对象或来自从疾病恢复的供体的高滴度动物或人抗体、作为多克隆抗体，或作为单克隆抗体。通常，来源于被动免疫接种的免疫提供即时保护或治疗但可能仅持续较短时间。

[0083] 在一些实施方案中，提供了用于针对SP感染和/或SP相关疾病的主动免疫接种的组合物和方法。提供用于在对象中诱导对SP细菌的免疫应答的组合物和方法，包括任选地在佐剂的存在下，以在对象中有效诱导免疫应答的量向对象施用重组脂化PsaA融合蛋白。在一个实施方案中，提供了包含有效免疫量的本文中提供的重组脂化融合蛋白和佐剂的组合物，其中组合物在有需要对象中有效地预防或治疗SP相关疾病。在一个实施方案中，不需要佐剂，即，提供了用于在对象中诱导对SP细菌的免疫应答的组合物和方法，包括以在对象中有效诱导免疫应答的量向对象施用本文中提供的重组脂化融合蛋白和可药用载体、赋形剂或稀释剂。

[0084] 在一些实施方案中，提供用于在对象中诱导对SP的黏膜免疫应答的组合物和方法，例如诱导包括Th1应答和/或分泌性IgA的产生的免疫应答。在一些实施方案中，诱导全身性免疫应答，例如产生如IgG的抗体同种型。在一些实施方案中，诱导黏膜免疫应答全身性免疫应答两者。

[0085] 在一些实施方案中，所诱导的免疫应答不是血清型特异性的。如本文所使用，“不是血清型特异性”意指预防超过一种SP血清型的免疫应答。换言之，在用特定重组脂化PsaA融合蛋白进行免疫的对象中，所诱导的免疫应答不仅针对得到融合蛋白的血清型是保护性的，而且针对一种或更多种另外的SP血清型是保护性的。在一些实施方案中，本文所描述的组合物和方法因此可提供针对SP的广谱免疫，包括黏膜免疫。

[0086] 在一些实施方案中，组合物和方法还可包括与一种或更多种另外的SP抗原组合施用重组脂化PsaA融合蛋白。另外的SP抗原可包括例如荚膜多糖抗原、膜结合毒力因子或对于SP感染可以是保护性的表面抗原。在一些实施方案中，另外的SP抗原为PspA或PspC。另外的SP抗原的非限制性实例包括肺炎球菌β-半乳糖苷酶(BgaA)、肺炎球菌磷酸胆碱(Chop)、肺炎球菌烯醇酶(Eno)、肺炎球菌透明质酸裂合酶(Hyl)、肺炎球菌自溶素A(LytA)、肺炎球菌神经氨酸酶(Nan)、肺炎球菌黏附和毒力因子A(PavA)、肺炎球菌铁获取因子(PiaA)和肺炎球菌表面缔合Pht蛋白(PhtA、PhtB、PhtD和PhtE)。

[0087] 在一些实施方案中，与一种或更多种另外的SP抗原的组合的重组脂化PsaA融合蛋白的施用诱导针对所述一种或更多种另外的抗原的黏膜免疫应答(除了针对PsaA的黏膜免疫应答之外)，即使所述一种或更多种另外的抗原不是脂化的和/或本身不是免疫原性的(即，在不存在重组脂化PsaA融合蛋白的情况下施用时)。以此方式，重组脂化PsaA融合蛋白可具有黏膜佐剂作用，诱导针对与其共同配制和/或共同施用的非脂化抗原的特异性黏膜免疫。

[0088] 这样的非脂化抗原的非限制性实例包括PspA、PspC、肺炎球菌β-半乳糖苷酶(BgaA)、肺炎球菌磷酸胆碱(ChoP)、肺炎球菌烯醇酶(Eno)、肺炎球菌透明质酸裂合酶

(Hyl)、肺炎球菌自溶素A(LytA)、肺炎球菌神经氨酸酶(Nan)、肺炎球菌黏附和毒力因子A(PavA)、肺炎球菌铁获取因子(PiaA)和肺炎球菌表面缔合Pht蛋白(PhtA、PhtB、PhtD和PhtE)。

[0089] 佐剂通常提高免疫应答的特异性和/或水平。因佐剂可降低诱导免疫应答所必需的抗原的量,和/或产生有益于对象的足够的免疫应答所必需的注射频率。任何用于提高对抗原的免疫应答且适合用于对象(例如可药用)的一种或多种化合物可在本发明的组合物、疫苗和方法中用作佐剂。在一些实施方案中,佐剂可以是缀合或重组抗原中的载体分子(例如但不限于霍乱毒素B亚单位、脂质体等)。在可替代实施方案中,佐剂可以是已知提高免疫系统的应答的无关分子(例如但不限于减毒细菌或病毒载体、AMVAD等)。在一个实施方案中,佐剂可以是产生强黏膜免疫应答的佐剂,例如减毒病毒或细菌,或铝盐。

[0090] 佐剂的实例包括但不限于霍乱毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素、脂质体、免疫刺激复合物(ISCOM)、免疫刺激序列寡脱氧核苷酸和氢氧化铝。组合物还可包含促进体内递送的聚合物(参见例如Audran R.等,Vaccine21:1250-5,2003;和Denis-Mize等,Cell Immunol.,225:12-20,2003)。其他合适的佐剂对本领域技术人员是公知的。或者,在一些实施方案中,本文中所描述的重组脂化融合蛋白可在无另外佐剂存在的情况下用于针对SP相关疾病的疫苗中。

[0091] 可使用本领域技术人员公知的技术(包括但不限于混合、超声处理和微流化)通过均匀且紧密地使抗原与佐剂缔合来制备包含本文中所述的一种或更多种PsaA抗原的组合物、制剂和疫苗。佐剂将通常占组合物的约5至约10%(v/v)或约10至约50%(v/v)。

[0092] 在另一些实施方案中,提供了用于被动免疫接种的组合物和方法,其包含对SP具有特异性的抗体或其抗原结合片段。如本文所使用,术语"抗体"意指任何免疫球蛋白或与特异性抗原或表位结合的完整分子及其片段。这样的抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、人源化、单链、Fab、Fab′、$F(ab')_2$、F(ab)′片段和/或完整抗体的F(v)部分,及其变体。此术语涵盖所有同种型,包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。

[0093] 如本文中所使用,术语"抗体片段"意指抗体的功能等同片段或部分,即,保持亲本抗体的抗原结合能力(例如特异性、亲和力和/或选择性)的抗体的全部序列的不完整的或分离的部分。抗原结合部分的非限制性实例包括:(i)Fab片段,其为由V_L、V_H、C_L和CH1结构域组成的单价片段;(ii)$F(ab')_2$片段,其为包含通过铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单个臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段,其由VH结构域组成;(vi)分离的互补决定区(CDR);以及(vii)单链Fv(scFv),其由Fv片段的两个域(V_L和V_H)组成。抗体片段的其他非限制性实例为Fab′片段;双抗体、线性抗体、单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0094] 完整"抗体"包含经二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包含重链可变区(V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含CH_1、CH_2和CH_3三个结构域。每条轻链包含轻链可变区(V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个C_L结构域。V_H和V_L区可进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的超变区,其中散布有称为框架区(FR)的更保守的区域。V_H和V_L各自由三个CDR和四个FR构成,其从氨基端到羧基端依次排列为:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子,包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)及经典补体

系统的第一组分(Clq)。

[0095] 如本文所使用,术语“单克隆抗体”或“mAb”意指单分子组合物的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一结合特异性和亲和性。“人单克隆抗体”意指具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在的话)的显示单一结合特异性的抗体。在一个方面,人单克隆抗体由杂交瘤产生,该杂交瘤包含与永生化细胞融合的B细胞,所述B细胞获自转基因非人动物(例如转基因小鼠),具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。“人源化抗体”意指其中非抗原结合区和/或抗原结合区的氨基酸序列已改变而使得抗体更接近地类似人抗体且仍保持其原始结合特性的至少一个抗体分子。人源化抗体通常是具有一个或更多个来自非人物种的CDR和来自人免疫球蛋白分子的框架区的来自非人物种的抗体分子。术语“嵌合抗体”意指其中不同部分来源于不同动物物种的抗体,例如具有来源于鼠mAb的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。

[0096] 如本文所使用,术语“抗原”意指促使抗体产生且可引起免疫应答的物质。术语“抗原”和“免疫原”在本文中可互换地使用,尽管在严格意义上,免疫原为引起免疫系统的应答的物质,而抗原定义与特异性抗体结合的物质。抗原或其片段可以是与特异性抗体接触的分子(例如表位)。当用重组脂化融合蛋白或其片段对宿主动物进行免疫接种时,脂化融合蛋白的大量区域可诱导抗体的产生(即,引起免疫应答),所述抗体特异性地与抗原(例如脂化融合蛋白上的给定区域或三维结构)结合。

[0097] 术语“对…具有特异性”或“特异性结合”可互换地使用以意指抗体与其相应抗原之间的相互作用。相互作用依赖于由结合分子(即,抗原或表位)识别的蛋白质的特定结构的存在。为使结合具有特异性,其应涉及目的表位而非背景抗原的抗体结合,即不超过与其他抗原(例如其他蛋白质或脂质结构、宿主细胞蛋白质等)的少量交叉反应。本公开的抗体或抗原结合片段、其变体或衍生物也可就其与抗原的结合亲和力进行描述或说明。可使用本领域中已知的方法以试验方式测定抗体对抗原的亲和力。对于抗体,术语“高亲和力”通常意指平衡缔合常数(K_{aff})为至少约1×10^{7}升/摩尔、或至少约1×10^{8}升/摩尔、或至少约1×10^{9}升/摩尔、或至少约1×10^{10}升/摩尔、或至少约1×10^{11}升/摩尔、或至少约1×10^{12}升/摩尔、或至少约1×10^{13}升/摩尔、或至少约1×10^{14}升/摩尔或更大。平衡解离常数K_D也可用于描述抗体亲和力,且为K_{aff}的倒数。

[0098] 本文所述的重组脂化融合蛋白通常与可药用载体或赋形剂组合以形成药物组合物。可药用载体可包括如此起作用的生理学上可接受的化合物:例如稳定或提高或降低药物组合物的吸收率或清除率。通常,可药用载体必须与组合物的活性成分相容,任选地能够稳定活性成分,且对待治疗的对象无害。生理学上可接受的化合物可包括例如磷酸盐缓冲盐水、碳酸氢盐溶液、碳水化合物(例如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖)、抗氧化剂(例如抗坏血酸或谷胱甘肽)、螯合剂、低分子量蛋白质、降低糖肽类清除或水解的组合物或赋形剂或其他稳定剂和/或缓冲剂。其他生理学上可接受的化合物包括润湿剂、乳化剂、分散剂或特别可用于防止微生物生长或活动的防腐剂。多种防腐剂是公知的且包括例如酚和抗坏血酸。洗涤剂也可用于稳定或提高或降低药物组合物(包括脂质载体)的吸收。可药用载体和制剂对本领域技术人员是公知的且详细地描述于科学及专利文献中,参见例如最新版本的Remington's Pharmaceutical Science,Mack Publishing Company,Easton,Pa.("Remington's")。本领域技术人员应当理解,对包含生理学上可接受的化合物的可药用载体

的选择取决于例如本发明的脂化融合蛋白、组合物、抗原或抗体的施用模式和途径，及其特定物理化学特征。

[0099] 本发明的组合物及疫苗可通过任何合适的方法施用，例如经口，例如以丸剂、片剂、胶囊、颗粒剂或散剂的形式；舌下；经颊；肠胃外，例如通过皮下、静脉内、肌内、腹膜内或皮内注射或使用输注技术(例如作为无菌可注射水性或非水性溶液剂或混悬剂)；经鼻，例如通过吸入喷剂、气雾剂、轻雾或通过喷雾器)；表面，例如以乳膏、药膏、油膏、散剂或凝胶的形式；经皮，例如以贴片形式；经黏膜；或经直肠，例如以栓剂形式。本发明组合物也可以适用于立即释放或延长释放的形式施用。可通过使用合适的药物组合物实现立即释放或延长释放，或者特别地在延长释放的情况下，通过使用例如皮下植入物或渗透泵的装置实现。

[0100] 在一些实施方案中，本文中所述的药物组合物可肠胃外施用，例如通过皮下注射或肌内注射，或使用其他施用模式，例如栓剂和经口制剂。对于栓剂，黏合剂和载体可包括例如聚亚烷二醇或甘油三酯。经口制剂可包括通常采用的辅料，例如药品级的糖精、纤维素、碳酸镁等。这些组合物可以是溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或散剂的形式。组合物可制备为用于注射的最终产品，例如液体溶液剂或乳剂(参见例如美国专利No.4,601,903;4,599,231;4,599,230;和4,596,792)。

[0101] 为了易于施用和剂量均匀性，以剂量单位形式配制经口或肠胃外组合物通常是有利的。剂量单位形式意指适合作为单一剂量用于待治疗对象的物理上离散的单位；每个单位含有与所需药物载体缔合的经计算产生期望治疗或免疫原性效应的预定量的活性化合物。使用本领域已知的方法，可保护脂化融合蛋白、抗原或抗体的组合物在经口施用时免于消化(参见例如Fix,Pharm Res.13:1760-1764,1996;Samanen,J.Pharm.Pharmacol.48:119-135.1996)。

[0102] 在一个实施方案中，将组合物或疫苗制备为可注射剂，其作为液体溶液剂或混悬剂，或作为适用于在注射之前溶解或悬浮于液体介质中的固体形式。在另一个实施方案中，将组合物或疫苗制备为固体形式，乳化或封装在脂质体载剂或其他颗粒载体中用于持续递送。例如，疫苗可以是油乳剂、油包水乳剂、水包油包水乳剂、位点特异性乳剂、长滞留乳剂、黏性乳剂、微乳剂、纳米乳剂、脂质体、微粒、微球、纳米球或纳米粒的形式。疫苗可包含允许疫苗持续释放的可膨胀聚合物如水凝胶、可再吸收聚合物如胶原蛋白，或某些聚酸或聚酯，例如用以制备可再吸收缝合线的那些。

[0103] 在一些实施方案中，本文中提供的组合物包含用于SP相关疾病的一种或更多种另外的治疗剂或预防剂。例如，组合物可包含用于预防或治疗SP感染的第二药剂。这样的第二药剂的实例包括但不限于抗生素(例如甲硝唑和万古霉素)和抗体(例如与另外的SP抗原(例如但不限于PspA及PspC)结合的抗体)。

[0104] 在可替代的一些实施方案中，本发明的组合物可单独使用，或与适合预防或治疗SP相关疾病的其他合适药剂组合使用。在一些实施方案中，本发明的组合物与包含用于SP相关疾病的第二治疗剂或预防剂的第二组合物同时施用。

[0105] 如本文所使用，“治疗有效量”或“有效量”意指重组脂化融合蛋白、组合物、疫苗、抗原或抗体的量，所述量足以预防或治疗SP相关疾病，减轻(例如缓解、减少、降低)与SP相关疾病相关联的至少一种症状，和/或诱导针对SP的免疫应答，从而为对象提供益处。组合物、疫苗、抗原或抗体的有效量可由本领域普通技术人员确定。用于成人的示例性抗原剂量

包括但不限于每天约0.1mg/kg至500mg/kg体重的抗原或抗体，其可以单次剂量或以单独的分开剂量的形式(例如每天或每周或每两周1至5次)施用。

[0106] 在一些实施方案中，包含重组脂化融合蛋白的组合物的有效量含有约0.05至约1500μg蛋白质、约10至1000μg蛋白质、约30至约500μg或约40至约300pg蛋白质，或这些值之间的任何整数。例如，可以约0.1μg至约200mg，例如约0.1μg至约5μg、约5μg至约10μg、约10μg至约25μg、约25μg至约50μg、约50μg至约100μg、约100μg至约500μg、约500μg至约1mg、或约1mg至约2mg的剂量向对象施用蛋白质，且在例如1周、2周、3周、4周、两个月、三个月、6个月和/或一年后给予任选加强剂量。

[0107] 在一些实施方案中，用于被动免疫接种的抗体组合物的有效量为约0.001至约30mg/kg体重，例如约0.01至约25mg/kg体重、约0.1至约20mg/kg体重、约1至约10mg/kg、或约10mg/kg至约20mg/kg。

[0108] 也可每月一次、每月两次、每月三次、每隔一周(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、每隔一天(qod)、每天(qd)、一天两次(qid)或一天三次(tid)施用脂化融合蛋白、组合物、疫苗、抗原或抗体。典型疫苗中，为预防目的，各剂量中的脂化融合蛋白的量经选择为诱导免疫保护应答而无明显不良副作用的量。在初次疫苗接种之后，对象可接受充分间隔开的一次或若干次加强免疫。

[0109] 应理解，用于任何特定对象的特定剂量水平和给药频率可变化且将取决于多种因素，包括所采用的特定化合物的活性、该化合物的代谢稳定性及作用长度、对象的物种、年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用模式及时间、排除和清除速率、药物组合、以及特定病症的严重程度。

[0110] 药盒

[0111] 提供了用于预防或治疗SP感染和/或SP相关疾病的药盒，其包含本文中所述的一种或更多种重组脂化PsaA融合蛋白、抗原、抗体、组合物和/或疫苗。也可在药盒中提供使用或实施本文中所述的方法的说明书。药盒还可包含实施本文中所述的方法所需要的另外的试剂、溶剂、缓冲剂、佐剂等。

[0112] 如本文所使用，除非上下文清楚地另有表明，否则本文所用的没有数量词修饰的名词包括一个/种或更多个/种。

[0113] 如本文所使用，术语“约”意指在实验测量或测定的误差限定范围内的值。例如，在校正标准误差之后，彼此相差约5％、约10％、约15％或约20％的两个值可被认为是“约相同”或“相似”。在一些实施方案中，将如本领域技术人员所理解，“约”意指如适合于执行所公开的方法或描述所公开的组合物和方法的指定值的±20％、±10％或±5％的偏差。

[0114] 本文中所述的技术不意味着局限于特定方法、试剂、化合物、组合物或生物系统，其当然可变化。也应当理解，本文中使用的术语学仅用于描述特定方面的目的，且不意为限制性的。

实施例

[0115] 参考以下实施例将更容易理解本发明，提供该实施例以说明本发明，而不应理解为以任何方式限制其范围。

[0116] 除非另有规定或上下文另有明确说明，否则在本文中所使用的所有技术和科学术

语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。应当理解，可在实践或测试本发明技术中使用类似或等效于本文所描述的那些方法和材料。

[0117] 实施例1.脂化融合蛋白rlipo-PsaA的表达。

[0118] 表达并表征了具有在图1A中描述的序列(SEQ ID NO:1,7;rlipo-PsaA)的包含天然PsaA脂质信号肽序列的重组脂化融合蛋白(rlipo-PsaA)。我们在下文中报告了该重组脂化融合蛋白能够诱导黏膜免疫并且使免疫应答朝向Th1偏斜，并且能够保护小鼠抵抗肺炎链球菌(SP)相关疾病。还制备了非脂化PsaA-Ct(无脂质信号肽的PsaA;rPsaA-Ct)(图1b)，以用于与rlipo-PsaA的效力进行比较。另外，制备了截短的肺炎球菌表面蛋白A(PspAΔCBD;图1c)和肺炎球菌表面蛋白C(PspCΔCBD;图1d)并且发现其提高疫苗效力。

[0119] 为了表达和表征rlipo-PsaA，从公开可获得的数据库获得PsaA的氨基酸序列，PsaA的登录号为NP_359087。为提高产率，我们使用大肠杆菌(E.coli)的密码子来优化用于PsaA表达的DNA序列。由生物技术公司完整地合成PsaA基因并使用Nde I和Xho I位点克隆到表达载体pET-22b(+)(Novagen,Madison,WI,USA)中以产生pPsaA质粒。因此，重组蛋白质的C端含有另外的六组氨酸(His6)标签(图1A)。为获得无信号肽的PsaA，本发明通过类似的方法构建pPsaA-Ct质粒。

[0120] 将表达质粒pPsaA-Ct转化到大肠杆菌菌株BL21(DE3)(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)中以用于蛋白质表达。将经转化细胞在37℃下过夜培养且随后用1mM IPTG诱导3小时(h)。为获得表达脂化免疫原的质粒，将pPsaA转化进大肠杆菌菌株C43(DE3)(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)以用于脂质蛋白质表达。将经转化细胞在37℃下过夜培养且随后在12℃下用1mM IPTG诱导3天。

[0121] 在将pPsaA转化到大肠杆菌菌株C43(DE3)中后，将经转化细胞在37℃下在5ml的Luria-Bertani(LB)液体培养基中扩增过夜。随后将过夜培养物转移至1000ml M9培养基(9mM NaCl、22mM KH_2PO_4、47.8mM Na_2HPO_4、19mM NH_4Cl、2mM $MgSO_4$、0.1mM $CaCl_2$和0.4％葡萄糖)中且在37℃下培养。在细菌达到对数期后期(OD 600nm约为0.7)后，在20℃下通过添加的1mM异丙硫基-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达20小时。

[0122] 实施例2.rlipo-PsaA的产生和表征。

[0123] 如下，通过固定化金属亲和色谱(immobilized metal affinity chromatography,IMAC)从BL21(DE3)和C43(DE3)细胞中分离由pPsaA-Ct表达的非脂化形式的抗原rPsaA-Ct和由pPsaA表达的rlipo-PsaA。通过离心(8000×g下20分钟)从4升培养物中收获大肠杆菌细胞，使由此收集的沉淀重悬于含有50mM Tris的100ml均质化缓冲液(pH 8.0)中。然后在洗涤剂存在下使用弗氏压碎器(French Press)(Constant Systems,Daventry,UK)以27Kpsi破坏大肠杆菌细胞且将由此获得的细胞裂解物以80,000×g离心60分钟。收集沉淀且使用提取缓冲液(1％Triton X-100/50mM Tris(PH8.9))溶解。在以80,000×g离心40分钟后，将上清液与5mL Ni-NTA树脂(Qiagen,San Diego,CA,USA)在冷室中一起孵育过夜。将经孵育样品和树脂浆液装载到柱(1.6cm i.d.×2.7cm)中。首先用50mL提取缓冲液洗涤柱。用洗脱缓冲液(1％Triton X-100;50mM Tris(PH8.9))洗脱重组蛋白质并通过SDS-PAGE和免疫印迹两者表征。由此获得的结果(在图2A中显示)表明以高纯度分离了重组lipo-E7m。使用与铜离子耦合的IMAC实现脂多糖(LPS)的移除，且用1000mL的洗脱缓冲液和300mL的洗涤缓冲液(100mM咪唑;1％Triton X-100;50mM Tris(pH 8.9))充分洗涤。制

剂中的LPS残留物少于30EU/mg。

[0124] 使用类似的方法获得rPsaA-Ct(图2B)、rPspAΔCBD(图2B)和rPspCΔCBD(图2B)。

[0125] 如下文所述对rlipo-PsaA进行质谱(MS)分析。为识别rlipo-PsaA的N端片段,首先用pH 8.5的5mM碳酸氢铵对rlipo-PsaA进行透析,随后在室温下在25mM碳酸氢铵(pH 8.5)中用rlipo-PsaA:胰蛋白酶的比率为50:1(wt/wt)的胰蛋白酶(Promega Co.,Madison,WI,USA)处理5分钟。通过添加甲酸(最终浓度1.2%)终止酶反应。使用Ziptip™(EMD Millipore,Darmstadt,Germany)进一步制备反应混合物。将1μl经胰蛋白酶消化的蛋白质与1μl在乙腈/0.1%三氟乙酸(1:3,vol/vol)中的α-氰基-4-羟基肉桂酸(Sigma,St.Louis,MI,USA)的饱和溶液混合。将一微升混合物放置在基质辅助激光脱附离子化飞行时间(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight,MALDI-TOF)质谱(Bruker,Madison,WI,USA)的靶板上以供分析。从如上文所描述的MALDI-TOF分析中获得的结果表明部分胰蛋白酶消化产物对应于rlipo-PsaA的N端片段,并且这些肽是脂化的(图3A)。

[0126] 实施例3.rlipo-PsaA的免疫原性研究。

[0127] 使用BM-DC作为模型研究rlipo-PsaA的免疫刺激特性。rlipo-PsaA上调表面标志物CD80的表达,而rPsaA-Ct没有作用(图3B)。在细胞因子分泌研究中获得类似的结果。TNF-α(图3C)和IL-12p40(图3D)的分泌由rlipo-PasA诱导,而不由rPsaA-Ct组诱导(图3C和3C)诱导。这些结果表明rlipo-PsaA的免疫刺激活性与其脂质部分有关。

[0128] 实施例4.使用rlipo-PsaA的免疫增强了抗原特异性IgG及IgA,并且产生Th1偏倚的应答

[0129] 为了在体内评估rlipo-PsaA的固有佐剂特性,我们分析了用rlipo-PsaA或rPsaA-Ct免疫的小鼠中的抗原特异性抗体应答的程度(图4A)。通过以两周的间隔皮下注射PBS中的30μg rlipo-PsaA或PBS中的30μg rPsaA-Ct对小鼠进行免疫两次。在第2周、第4周和第5周,由rlipo-PsaA引发的IgG滴度比由rPsaA-Ct引发的那些高1000倍(图4A)。在第2周、第4周和第5周,在用rlipo-PsaA免疫之后引发的IgA滴度比由rPsaA-Ct引发的那些高10000倍(图4B)。随后,为了在第5周时分析rlipo-PsaA和rPsaA-Ct免疫之后所引发的抗体同种型,测量IgG1和IgG2b的诱导水平。在rlipo-PsaA免疫的小鼠和rPsaA-Ct免疫的小鼠两者中,IgG1水平相当。用rlipo-PsaA免疫的小鼠中的IgG2b水平比用rPsaA-Ct免疫的小鼠中的那些更高(图4C)。通过比较这些小鼠中的IgG2b/IgG1比率,可清楚地观察到Th1偏倚的现象(图4D)。

[0130] 实施例5.体内保护实验。

[0131] 我们在本文中报告了使用小鼠模型的研究,其中用免疫原对小鼠进行疫苗接种,随后用肺炎链球菌(SP)的不同菌株进行攻击。

[0132] 对于体内保护实验,用30μg的rlipo-PsaA或rPsaA-Ct对ICR小鼠(每组六只小鼠)进行免疫。在第一研究中,用rlipo-PsaA和rPsaA-Ct对小鼠进行疫苗接种,然后使用10×LD剂量的SP进行攻击。用2×10^5D39菌株(高毒力株)攻击的小鼠显示出在用rlipo-PsaA免疫后的100%保护,并且对于用rPsaA免疫的那些发现约75%的保护(图5A)。用rlipo-PsaA/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD、rPsaA-Ct/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD、rlipo-PsaA、rPsaA-Ct和PBS对小鼠进行疫苗接种,随后用100×LD剂量的SP进行攻击。用3.9×10^6D39菌株攻击的小鼠

分别显示出83.3%、50%、33.3%、16.7%和0%的保护(图5B)。

[0133] 这些结果证实用30μg的rlipo-PsaA免疫的小鼠针对2×10^5cfu/mL的D39菌株(高毒力菌株)的攻击被100%保护。对于用单独rPsaA免疫的那些小鼠,发现保护率为约75%(图5a)。这些数据表明与rPsaA相比,rlipo-PsaA可诱导显著更强的保护性免疫,并且更重要的是,经疫苗接种的动物被保护抵抗来自SP的不同菌株的攻击。

[0134] 我们测试了rlipo-PsaA是否可赋予针对更高攻击剂量($100\times LD_{50}$,3.9×10^6cfu/mL的D39菌株)、rlipo-PsaA和包括截短的rPspAΔCBD和rPspCΔCBD的其他抗原的保护。在动物攻击研究中对这些进行了评估,其结果令人印象深刻,在用rlipo-PsaA/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD疫苗接种的组中发现>80%的保护,而在用rPsaA-Ct/rPspAΔCBD/rPspCΔCBD或rlipo-PsaA、rPsaA-Ct或PBS疫苗接种的组中发现保护率分别为50%、33%、16%和0%(图5b)。这些结果表明本文所描述的重组脂化融合蛋白可用于研发基于蛋白质的肺炎球菌疫苗。

[0135] 为测定重组脂化融合蛋白针对不同血清型的肺炎链球菌的潜在保护,也用另外4种不同的血清型(类型3、14、19F和35B)的细菌菌株攻击经疫苗接种的小鼠。如图5中所示,除了针对血清型2的保护(图5a和图5b)外,疫苗还显著降低肺炎链球菌血清型14、19F和35B的鼻咽定殖或预防血清型3的致死侵入性感染。这些数据表明本文所述的重组脂化融合蛋白可提供针对由肺炎链球菌的多种血清型引起的感染的广泛的保护。

[0136] 实施例6.rlipo-PsaA的脂质结构的表征。

[0137] 使用质谱法表征rlipo-PsaA的脂质结构并且与使用异源脂质信号肽在大肠杆菌中产生的其他脂化SP抗原的脂质结构进行比较。来自在大肠杆菌系统中表达的脑膜炎球菌蛋白质Ag473(具有脂质信号肽序列:MKKLLIAAMMAAALAAC)的脂质信号肽产生至少三个峰,如通过质谱法分析的(图6A)。与Ag473的脂质信号肽融合的抗原D1E3和E7m也含有至少三个峰(图6B、6C)。相比之下,使用其自身天然脂质信号肽(SEQ ID NO:6)表达的rlipo-PsaA在大肠杆菌系统中表达为一个主峰(分子量)(图6D)。关于脂质部分的分子结构的更多信息,参见Proteomics,201111(13):2620-7。这些结果表明,出人意料地,在rlipo-PsaA上仅表达单一形式的脂质修饰。

[0138] 尽管参考其优选实施方案详细描述了本发明,但提供这些实施方案是为了说明而非限制本发明。可以采用本发明的原理产生其他实施方案,并且其落入由所附权利要求书限定的本发明的精神和范围内。

[0139] 在本说明书中公开的所有特征可以任意组合来组合。本说明书中公开的每个特征可用具有相同、等效或类似目的的替代特征替换。因此,除非另有明确说明,否则所公开的各特征仅为等效或类似特征的通用系列的实例。

[0140] 本文中所引用的所有文档和参考文献的内容据此通过引用以其整体并入。

序列表

<110> National Research Council Of Canada
National Health Research Institutes
<120> 脂化肺炎链球菌抗原组合物、制备方法和用途
<130> 39727-013
<140> 62/265,525
<141> 2015-12-10
<160> 8
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 309
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 1

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

Lys Ile Pro Ala Glu Lys Lys Leu Ile Val Thr Ser Glu Gly Ala Phe
195 200 205
Lys Tyr Phe Ser Lys Ala Tyr Gly Val Pro Ser Ala Tyr Ile Trp Glu
210 215 220
Ile Asn Thr Glu Glu Glu Gly Thr Pro Glu Gln Ile Lys Thr Leu Val
225 230 235 240
Glu Lys Leu Arg Gln Thr Lys Val Pro Ser Leu Phe Val Glu Ser Ser
245 250 255
Val Asp Asp Arg Pro Met Lys Thr Val Ser Gln Asp Thr Asn Ile Pro
260 265 270
Ile Tyr Ala Gln Ile Phe Thr Asp Ser Ile Ala Glu Gln Gly Lys Glu
275 280 285
Gly Asp Ser Tyr Tyr Ser Met Met Lys Tyr Asn Leu Asp Lys Ile Ala
290 295 300
Glu Gly Leu Ala Lys
305

<210> 2
<211> 290
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 2

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

Asn Asn Lys Glu Phe Tyr Glu Lys Asn Leu Lys Glu Tyr Thr Asp Lys
145 150 155 160
Leu Asp Lys Leu Asp Lys Glu Ser Lys Asp Lys Phe Asn Lys Ile Pro
165 170 175
Ala Glu Lys Lys Leu Ile Val Thr Ser Glu Gly Ala Phe Lys Tyr Phe
180 185 190
Ser Lys Ala Tyr Gly Val Pro Ser Ala Tyr Ile Trp Glu Ile Asn Thr
195 200 205
Glu Glu Glu Gly Thr Pro Glu Gln Ile Lys Thr Leu Val Glu Lys Leu
210 215 220
Arg Gln Thr Lys Val Pro Ser Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Asp
225 230 235 240
Arg Pro Met Lys Thr Val Ser Gln Asp Thr Asn Ile Pro Ile Tyr Ala
245 250 255
Gln Ile Phe Thr Asp Ser Ile Ala Glu Gln Gly Lys Glu Gly Asp Ser
260 265 270
Tyr Tyr Ser Met Met Lys Tyr Asn Leu Asp Lys Ile Ala Glu Gly Leu
275 280 285
Ala Lys
290

<210> 3
<211> 379
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 3

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

Asn Thr Val Arg Ala Met Val Val Pro Glu Pro Glu Gln Leu Ala Glu
115 120 125
Thr Lys Lys Lys Ser Glu Glu Ala Lys Gln Lys Ala Pro Glu Leu Thr
130 135 140
Lys Lys Leu Glu Glu Ala Lys Ala Lys Leu Glu Glu Ala Glu Lys Lys
145 150 155 160
Ala Thr Glu Ala Lys Gln Lys Val Asp Ala Glu Glu Val Ala Pro Gln
165 170 175
Ala Lys Ile Ala Glu Leu Glu Asn Gln Val His Arg Leu Glu Gln Glu
180 185 190
Leu Lys Glu Ile Asp Glu Ser Glu Ser Glu Asp Tyr Ala Lys Glu Gly
195 200 205
Phe Arg Ala Pro Leu Gln Ser Lys Leu Asp Ala Lys Lys Ala Lys Leu
210 215 220
Ser Lys Leu Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile Asp Glu Leu Asp Ala Glu
225 230 235 240
Ile Ala Lys Leu Glu Asp Gln Leu Lys Ala Ala Glu Glu Asn Asn Asn
245 250 255
Val Glu Asp Tyr Phe Lys Glu Gly Leu Glu Lys Thr Ile Ala Ala Lys
260 265 270
Lys Ala Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp Leu Lys Lys Ala Val Asn
275 280 285
Glu Pro Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Glu Thr Pro Ala Pro Glu Ala
290 295 300
Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala
305 310 315 320
Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Glu Lys Thr Asp
325 330 335
Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr
340 345 350
Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Pro
355 360 365
Ala Pro Lys Leu Glu His His His His His His
370 375

<210> 4
<211> 490
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 4

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

305 310 315 320
Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu
325 330 335
Asp Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu
340 345 350
Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile
355 360 365
Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg
370 375 380
Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys
385 390 395 400
Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln
405 410 415
Pro Gln Pro Ala Pro Ala Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro
420 425 430
Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln
435 440 445
Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu
450 455 460
Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr
465 470 475 480
Pro Lys Leu Glu His His His His His His
485 490

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 5
Met Lys Lys Leu Gly Thr Leu Leu Val Leu Phe Leu Ser Ala Ile Ile
1 5 10 15
Leu Val Ala Cys
20

<210> 6
<211> 954
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌
<400> 6
atgaaaaaac tgggcaccct gctggtgctg tttctgagcg cgattattct ggtggcgtgc 60
gcgagcggca aaaaagatac caccagcggc cagaaactga aagtggtggc gaccaacagc 120

attattgcgg atattaccaa aaacattgcg ggcgataaaa ttgatctgca tagcattgtg 180
ccgattggcc aggatccgca tgaatatgaa ccgctgccgg aagatgtgaa aaaaaccagc 240
gaagcggatc tgatttttta taacggcatt aacctggaaa ccggcggcaa cgcgtggttt 300
accaaactgg tggaaaacgc gaaaaaaacc gaaaacaaag attattttgc ggtgagcgat 360
ggcgtggatg tgatttatct ggaaggccag aacgaaaaag gcaaagaaga tccgcatgcg 420
tggctgaacc tggaaaacgg cattattttt gcgaaaaaca ttgcgaaaca gctgagcgcg 480
aaagatccga acaacaaaga attttatgaa aaaaacctga aagaatatac cgataaactg 540
gataaactgg ataaagaaag caaagataaa tttaacaaaa ttccggcgga aaaaaaactg 600
attgtgacca gcgaaggcgc gtttaaatat tttagcaaag cgtatggcgt gccgagcgcg 660
tatatttggg aaattaacac cgaagaagaa ggcaccccgg aacagattaa aaccctggtg 720
gaaaaactgc gtcagaccaa agtgccgagc ctgtttgtgg aaagcagcgt ggatgatcgt 780
ccgatgaaaa ccgtgagcca ggataccaac attccgattt atgcgcagat ttttaccgat 840
agcattgcgg aacagggcaa agaaggcgat agctattata gcatgatgaa atataacctg 900
gataaaattg cggaaggcct ggcgaaactc gagcaccacc accaccacca ctga 954

<210> 7
<211> 315
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 7

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

Lys Asp Pro Asn Asn Lys Glu Phe Tyr Glu Lys Asn Leu Lys Glu Tyr
165 170 175
Thr Asp Lys Leu Asp Lys Leu Asp Lys Glu Ser Lys Asp Lys Phe Asn
180 185 190
Lys Ile Pro Ala Glu Lys Lys Leu Ile Val Thr Ser Glu Gly Ala Phe
195 200 205
Lys Tyr Phe Ser Lys Ala Tyr Gly Val Pro Ser Ala Tyr Ile Trp Glu
210 215 220
Ile Asn Thr Glu Glu Glu Gly Thr Pro Glu Gln Ile Lys Thr Leu Val
225 230 235 240
Glu Lys Leu Arg Gln Thr Lys Val Pro Ser Leu Phe Val Glu Ser Ser
245 250 255
Val Asp Asp Arg Pro Met Lys Thr Val Ser Gln Asp Thr Asn Ile Pro
260 265 270
Ile Tyr Ala Gln Ile Phe Thr Asp Ser Ile Ala Glu Gln Gly Lys Glu
275 280 285
Gly Asp Ser Tyr Tyr Ser Met Met Lys Tyr Asn Leu Asp Lys Ile Ala
290 295 300
Glu Gly Leu Ala Lys His His His His His His
305 310 315

<210> 8
<211> 296
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 8

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

Glu Lys Gly Lys Glu Asp Pro His Ala Trp Leu Asn Leu Glu Asn Gly
115 120 125
Ile Ile Phe Ala Lys Asn Ile Ala Lys Gln Leu Ser Ala Lys Asp Pro
130 135 140
Asn Asn Lys Glu Phe Tyr Glu Lys Asn Leu Lys Glu Tyr Thr Asp Lys
145 150 155 160
Leu Asp Lys Leu Asp Lys Glu Ser Lys Asp Lys Phe Asn Lys Ile Pro
165 170 175
Ala Glu Lys Lys Leu Ile Val Thr Ser Glu Gly Ala Phe Lys Tyr Phe
180 185 190
Ser Lys Ala Tyr Gly Val Pro Ser Ala Tyr Ile Trp Glu Ile Asn Thr
195 200 205
Glu Glu Glu Gly Thr Pro Glu Gln Ile Lys Thr Leu Val Glu Lys Leu
210 215 220
Arg Gln Thr Lys Val Pro Ser Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Asp
225 230 235 240
Arg Pro Met Lys Thr Val Ser Gln Asp Thr Asn Ile Pro Ile Tyr Ala
245 250 255
Gln Ile Phe Thr Asp Ser Ile Ala Glu Gln Gly Lys Glu Gly Asp Ser
260 265 270
Tyr Tyr Ser Met Met Lys Tyr Asn Leu Asp Lys Ile Ala Glu Gly Leu
275 280 285
Ala Lys His His His His His His
290 295

图1

(a)
MetLysLysLeuGlyThrLeuLeuValLeuPheLeuSerAlaIleI
leLeuValAlaCysAlaSerGlyLysLysAspThrThrSerGly
GlnLysLeuLysValValAlaThrAsnSerIleIleAlaAspIleThr
LysAsnIleAlaGlyAspLysIleAspLeuHisSerIleValProIle
GlyGlnAspProHisGluTyrGluProLeuProGluAspValLys
LysThrSerGluAlaAspLeuIlePheTyrAsnGlyIleAsnLeuG
luThrGlyGlyAsnAlaTrpPheThrLysLeuValGluAsnAlaLy
sLysThrGluAsnLysAspTyrPheAlaValSerAspGlyValAs
pValIleTyrLeuGluGlyGlnAsnGluLysGlyLysGluAspPro
HisAlaTrpLeuAsnLeuGluAsnGlyIleIlePheAlaLys
AsnIleAlaLysGlnLeuSerAlaLysAspProAsnAsnLysGlu
PheTyrGluLysAsnLeuLysGluTyrThrAspLysLeuAsp
LysLeuAspLysGluSerLysAspLysPheAsnLysIleProAla
GluLysLysLeuIleValThrSerGluGlyAlaPheLysTyrPhe
SerLysAlaTyrGlyValProSerAlaTyrIleTrpGluIleAsnThr
GluGluGluGlyThrProGluGlnIleLysThrLeuValGluLys
LeuArgGlnThrLysValProSerLeuPheValGluSerSerVal
AspAspArgProMetLysThrValSerGlnAspThrAsnIleProI
leTyrAlaGlnIlePheThrAspSerIleAlaGluGlnGlyLysGlu
GlyAspSerTyrTyrSerMetMetLysTyrAsnLeuAspLysIle
AlaGluGly LeuAlaLysLeuGluHisHisHisHisHisHis***

(b)
MetAlaSerGlyLysLysAspThrThrSerGlyGlnLysLeuLys
ValValAlaThrAsnSerIleIleAlaAspIleThrLysAsnIleAla
GlyAspLysIleAspLeuHisSerIleValProIleGlyGlnAspPro
HisGluTyrGluProLeuProGluAspValLysLysThrSerGlu
AlaAspLeuIlePheTyrAsnGlyIleAsnLeuGluThrGlyGly
AsnAlaTrpPheThrLysLeuValGluAsnAlaLysLysThrGlu
AsnLysAspTyrPheAlaValSerAspGlyValAspValIleTyr
LeuGluGlyGlnAsnGluLysGlyLysGluAspProHisAlaTrp
LeuAsnLeuGluAsnGlyIleIlePheAlaLysAsnIleAlaLys
GlnLeuSerAlaLysAspProAsnAsnLysGluPheTyrGlu
LysAsnLeuLysGluTyrThrAspLysLeuAspLysLeuAsp
LysGluSerLysAspLysPheAsnLysIleProAlaGluLysLys
LeuIleValThrSerGluGlyAlaPheLysTyrPheSerLysAla
TyrGlyValProSerAlaTyrIleTrpGluIleAsnThrGluGluGlu
GlyThrProGluGlnIleLysThrLeuValGluLysLeuArgGln
ThrLysValProSerLeuPheValGluSerSerValAspAspArg
ProMetLysThrValSerGlnAspThrAsnIleProIleTyrAla
GlnIlePheThrAspSerIleAlaGluGlnGlyLysGluGlyAsp
SerTyrTyrSerMetMetLysTyrAsnLeuAspLysIleAlaGlu
GlyLeuAlaLysLeuGluHisHisHisHisHisHis***

(c)
MetGluGluSerProValAlaSerGlnSerLysAlaGluLysAsp
TyrAspAlaAlaLysLysAspAlaLysAsnAlaLysLysAlaVal
GluAspAlaGlnLysAlaLeuAspAspAlaLysAlaAlaGlnLys
LysTyrAspGluAspGlnLysLysThrGluGluLysAlaAlaLeu
GluLysAlaAlaSerGluGluMetAspLysAlaValAlaAlaVal
GlnGlnAlaTyrLeuAlaTyrGlnGlnAlaThrAspLysAlaAla
LysAspAlaAlaAspLysMetIleAspGluAlaLysLysArgGlu
GluGluAlaLysThrLysPheAsnThrValArgAlaMetValVal
ProGluProGluGlnLeuAlaGluThrLysLysLysSerGluGlu
AlaLysGlnLysAlaProGluLeuThrLysLysLeuGluGluAlaL
ysAlaLysLeuGluGluAlaGluLysLysAlaThrGluAlaLysGl
nLysValAspAlaGluGluValAlaProGlnAlaLysIleAla
GluLeuGluAsnGlnValHisArgLeuGluGlnGluLeuLysGlu
IleAspGluSerGluSerGluAspTyrAlaLysGluGlyPheArgA
laProLeuGlnSerLysLeuAspAlaLysLysAlaLysLeuSerL
ysLeuGluGluLeuSerAspLysIleAspGluLeuAspAlaGluIl
eAlaLysLeuGluAspGlnLeuLysAlaAlaGluGluAsnAsn
AsnValGluAspTyrPheLysGluGlyLeuGluLysThrIleAlaA
laLysLysAlaGluLeuGluLysThrGluAlaAspLeuLysLysAl
aValAsnGluProGluLysProAlaProAlaProGluThrPro
AlaProGluAlaProAlaGluGlnProLysProAlaProAlaPro
GlnProAlaProAlaProLysProGluLysProAlaGluGlnPro
LysProGluLysThrAspAspGlnGlnAlaGluGluAspTyrAla
ArgArgSerGluGluGluTyrAsnArgLeuThrGlnGlnGlnPro
ProLysAlaGluLysProAlaProAlaProLysLeuGluHisHis
HisHisHisHis***

(d)
MetValValHisAlaThrGluAsnGluGlySerThrGlnAlaAla
ThrSerSerAsnMetAlaLysThrGluHisArgLysAlaAlaLys
GlnValValAspGluTyrIleGluLysMetLeuArgGluIleGln
LeuAspArgArgLysHisThrGlnAsnValAlaLeuAsnIleLysL
euSerAlaIleLysThrLysTyrLeuArgGluLeuAsnValLeuGl
uGluLysSerLysAspGluLeuProSerGluIleLysAlaLys
LeuAspAlaAlaPheGluLysPheLysLysAspThrLeuLys
ProGlyGluLysValAlaGluAlaLysLysLysValGluGluAla
LysLysLysAlaGluAspGlnLysGluGluAspArgArgAsnTyr
ProThrAsnThrTyrLysThrLeuGluLeuGluIleAlaGluPheA
spValLysValLysGluAlaGluLeuGluLeuValLysGluGluAl
aLysGluSerArgAsnGluGlyThrIleLysGlnAlaLysGlu
LysValGluSerLysLysAlaGluAlaThrArgLeuGluAsnIle
LysThrAspArgLysLysAlaGluGluGluAlaLysArgLysAlaA
spAlaLysLeuLysGluAlaAsnValAlaThrSerAspGlnGlyLy
sProLysGlyArgAlaLysArgGlyValProGlyGluLeuAla
ThrProAspLysLysGluAsnAspAlaLysSerSerAspSer
SerValGlyGluGluThrLeuProSerSerSerLeuLysSerGly
LysLysValAlaGluAlaGluLysLysValGluGluAlaGluLys
LysAlaLysAspGlnLysGluGluAspArgArgAsnTyrProThr
AsnThrTyrLysThrLeuAspLeuGluIleAlaGluSerAspVall
ysValLysGluAlaGluLeuGluLeuValLysGluGluAlaLys
GluProArgAspGluGluLysIleLysGlnAlaLysAlaLysVal
GluSerLysLysAlaGluAlaThrArgLeuGluAsnIleLysThr
AspArgLysLysAlaGluGluGluAlaLysArgLysAlaAlaGlu
GluAspLysValLysGluLysProAlaGluGlnProGlnProAla
ProAlaThrGlnProGluLysProAlaProLysProGluLysProA
laGluGlnProLysAlaGluLysThrAspAspGlnGlnAlaGluGl
uAspTyrAlaArgArgSerGluGluGluTyrAsnArgLeuThrGl
nGlnGlnProProLysThrGluLysProAlaGlnProSerThrPro
LysLeuGluHisHisHisHisHisHis

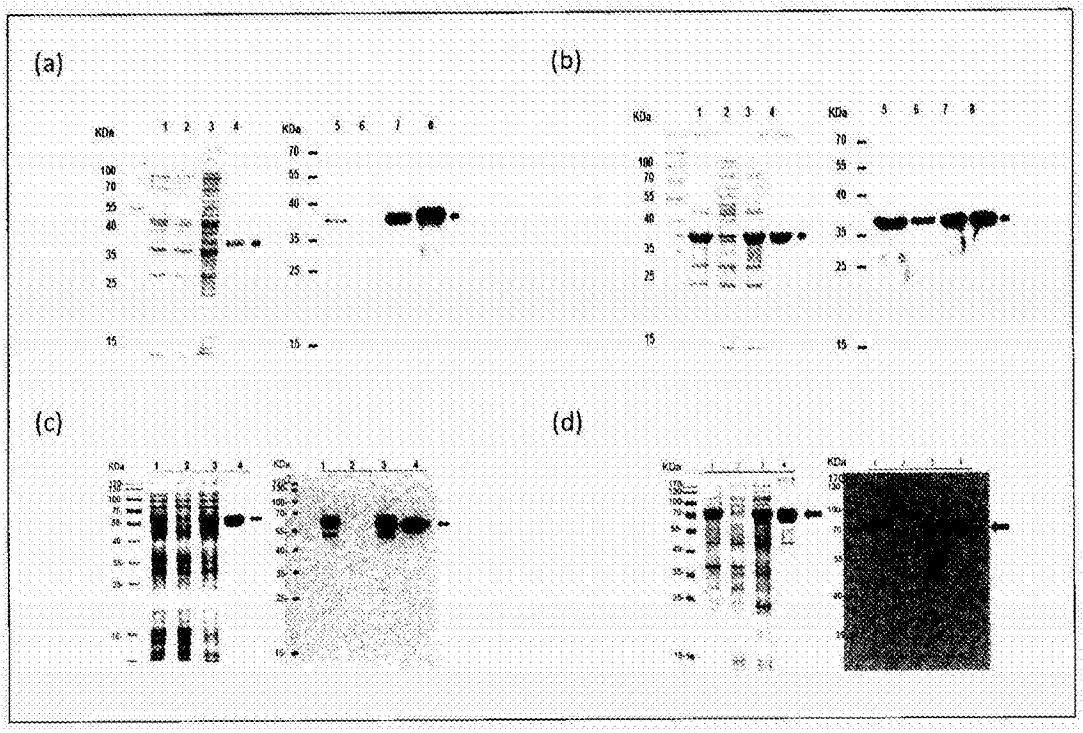

(a)
(b)
(c)
(d)
KDa

图2

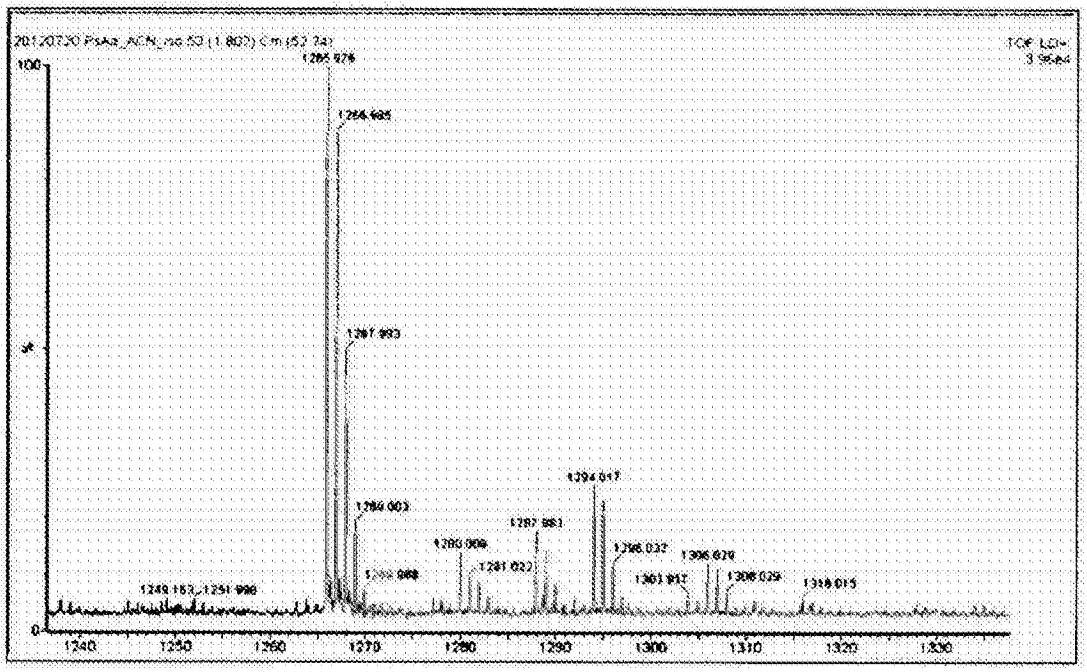

100
%
0
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330

图3(a)

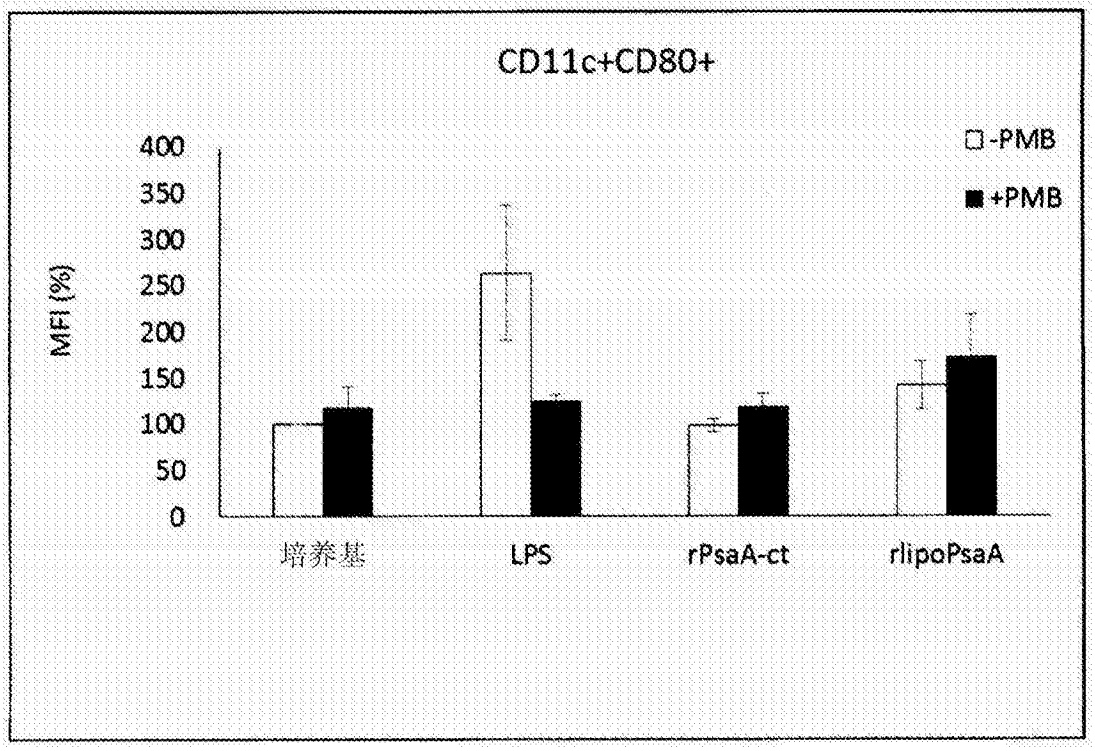

CD11c+CD80+
-PMB
+PMB
MFI (%)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
培养基
LPS
rPsaA-ct
rlipoPsaA

图3 (b)

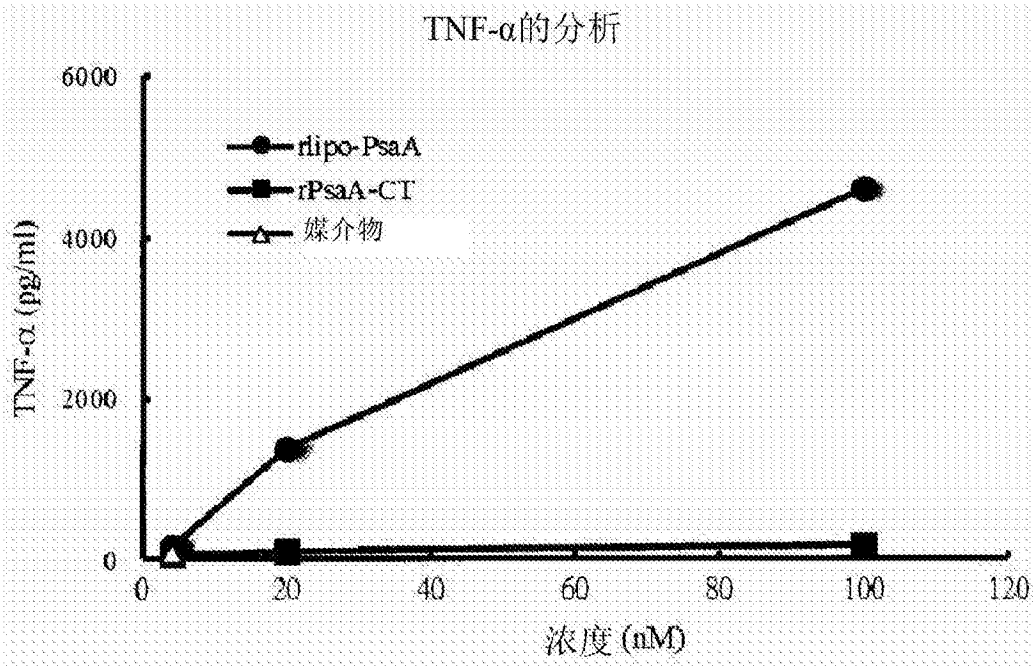

TNF-α的分析
6000
4000
2000
0
TNF-α (pg/ml)
rlipo-PsaA
rPsaA-CT
媒介物
0
20
40
60
80
100
120
浓度 (nM)

图3 (c)

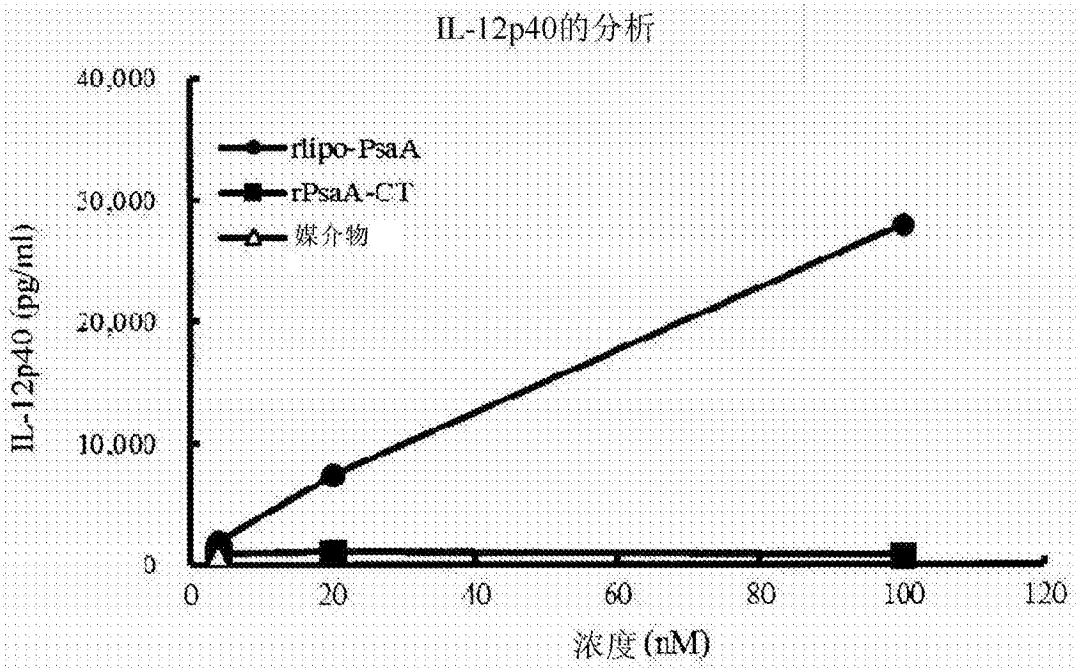

IL-12p40的分析
40,000
30,000
20,000
10,000
0
IL-12p40 (pg/ml)
rlipo-PsaA
rPsaA-CT
媒介物
0
20
40
60
80
100
120
浓度 (nM)

图3 (d)

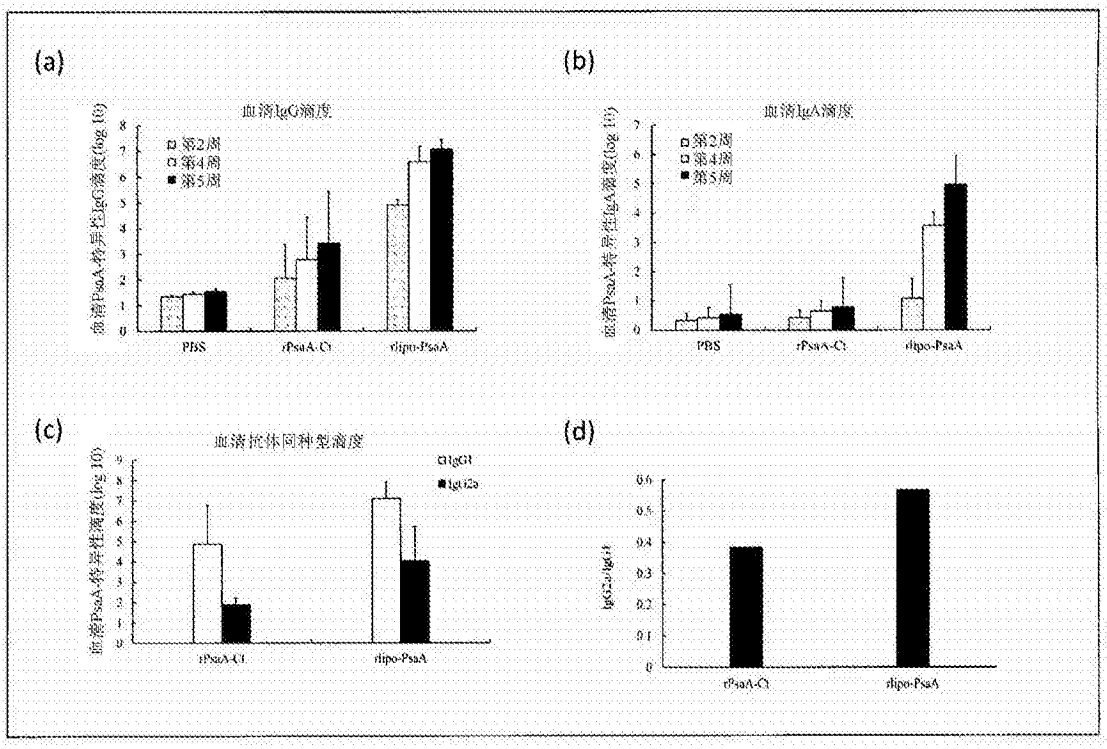

(a)
血清IgG滴度
第2周
第4周
第5周
PBS
rPsaA-Ct
rlipo-PsaA
(b)
血清IgA滴度
第2周
第4周
第5周
PBS
rPsaA-Ct
rlipo-PsaA
(c)
血清抗体同种型滴度
rIgG1
rIgG2a
rPsaA-Ct
rlipo-PsaA
(d)
rPsaA-Ct
rlipo-PsaA

图4

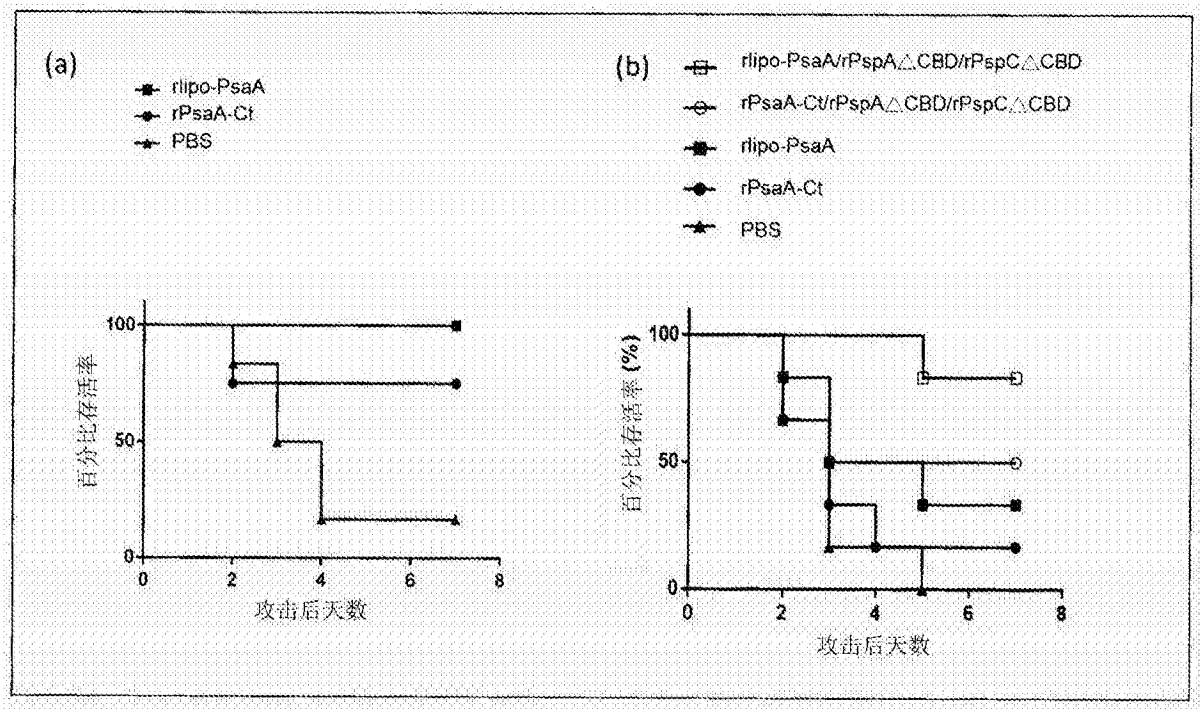

(a)
rlipo-PsaA
rPsaA-Ct
PBS
百分比存活率
100
50
0
0
2
4
6
8
攻击后天数
(b)
rlipo-PsaA/rPspA△CBD/rPspC△CBD
rPsaA-Ct/rPspA△CBD/rPspC△CBD
rlipo-PsaA
rPsaA-Ct
PBS
(%)存活率分百
100
50
0
0
2
4
6
8
攻击后天数

图5

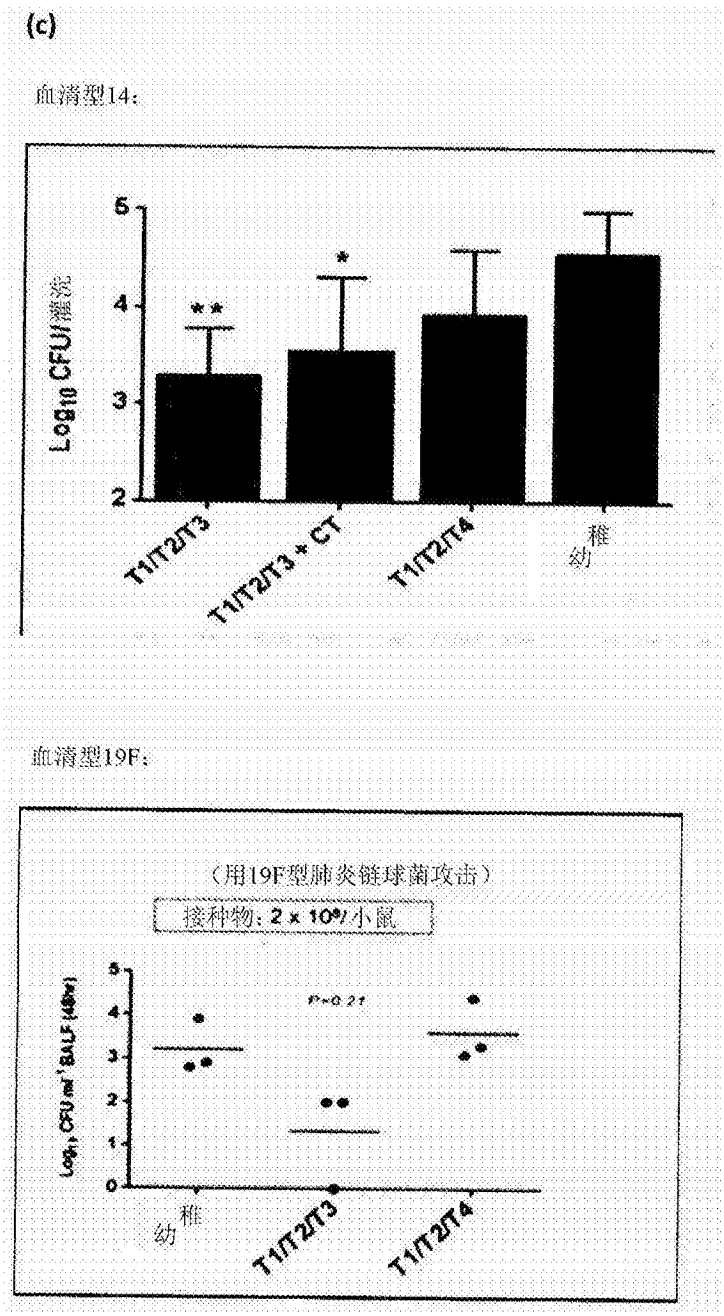

(c)
血清型14:
Log10 CFU/灌洗
5
4
3
2
**
*
T1/T2/T3
T1/T2/T3 + CT
T1/T2/T4
稚幼
血清型19F:
(用19F型肺炎链球菌攻击)
接种物: 2 x 10⁶/小鼠
P=0.21
稚幼
T1/T2/T3
T1/T2/T4

图5(续)

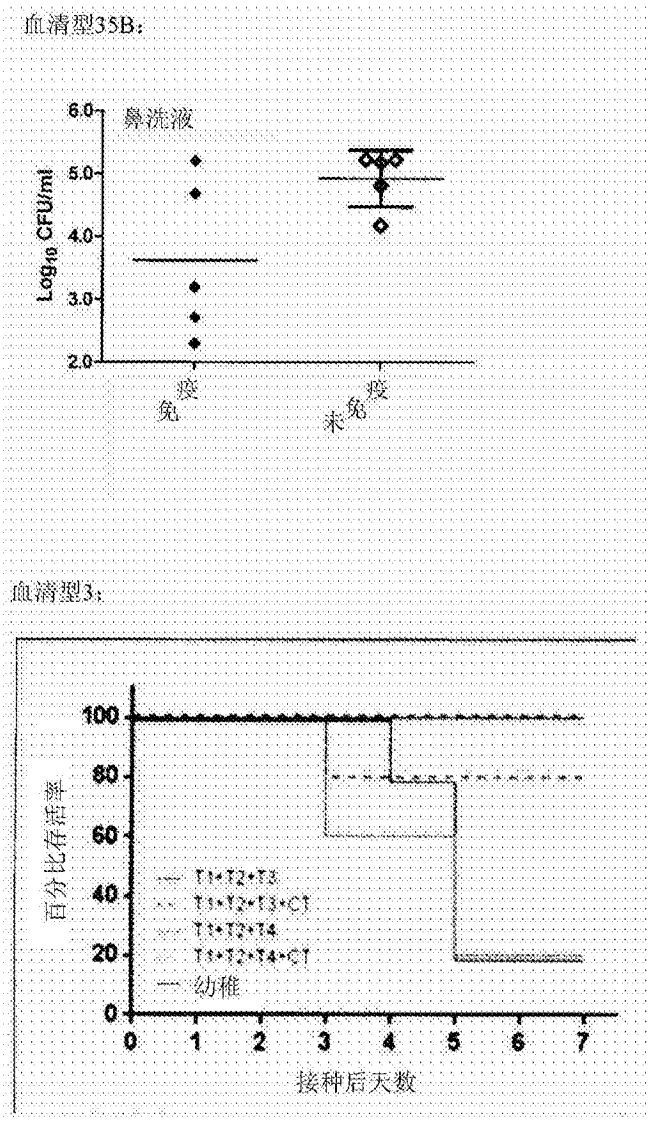

血清型35B：
鼻洗液
Log_{10} CFU/ml
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
免疫
未免疫
血清型3：
百分比存活率
100
80
60
40
20
0
T1+T2+T3
T1+T2+T3+CT
T1+T2+T4
T1+T2+T4+CT
幼稚
0 1 2 3 4 5 6 7
接种后天数

图5(续)

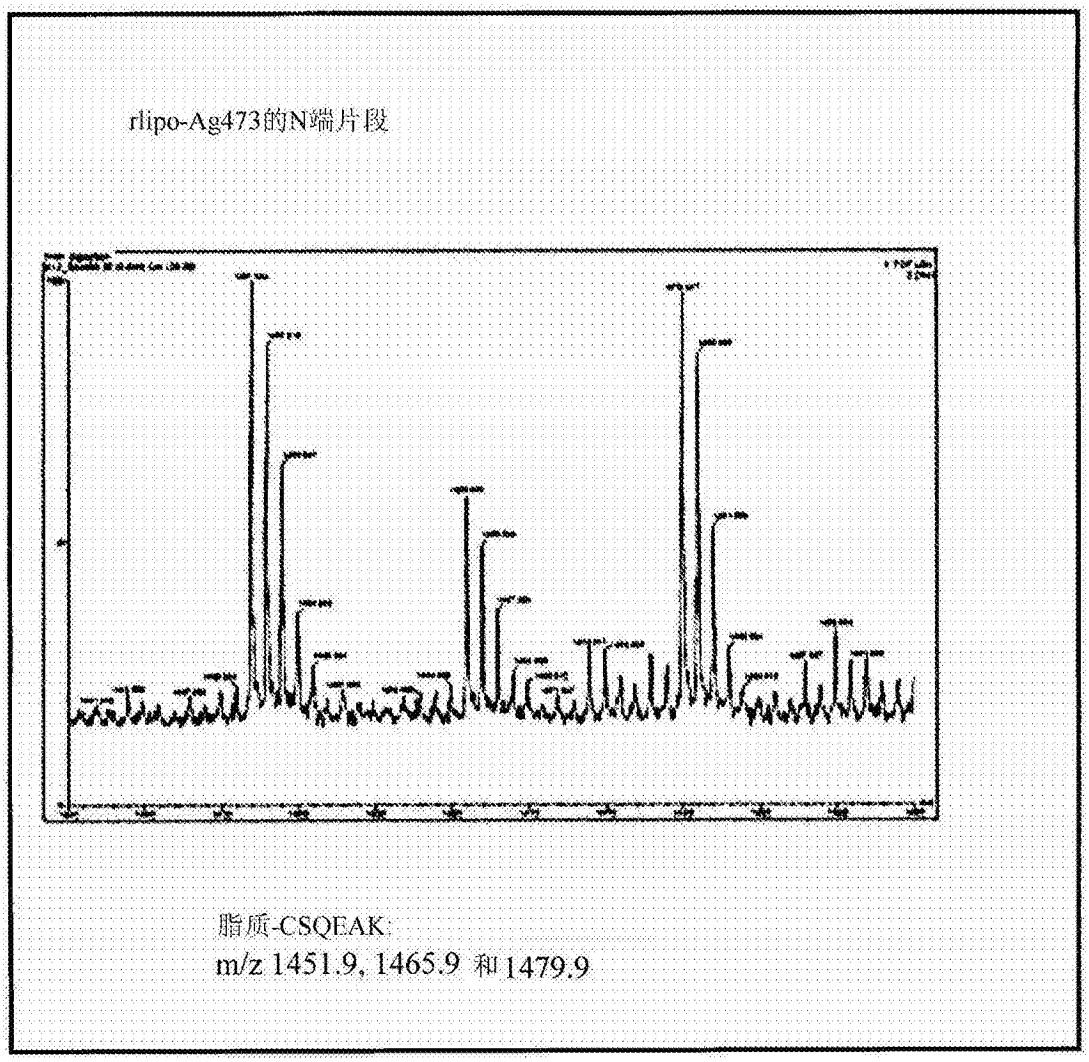


图6 (A)

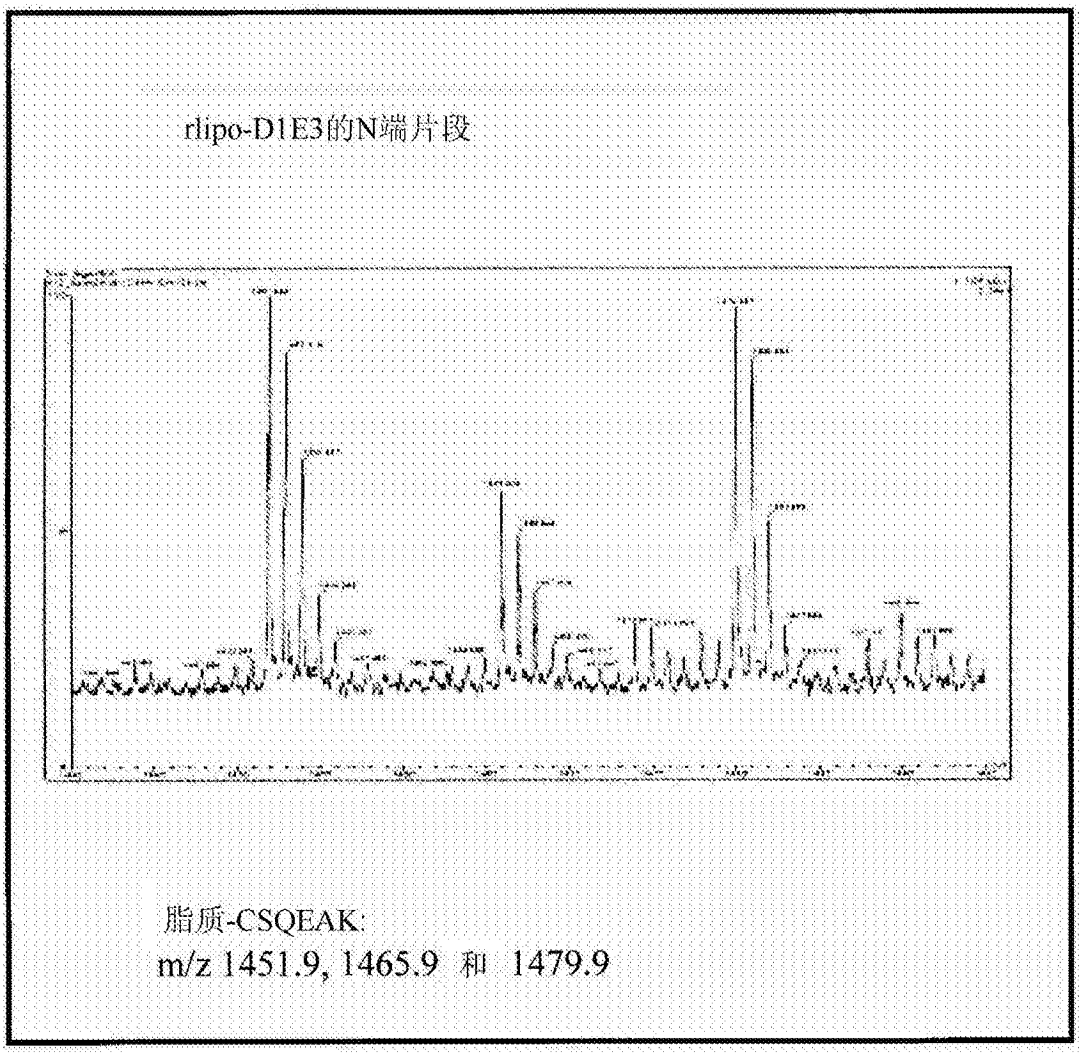


图6 (B)

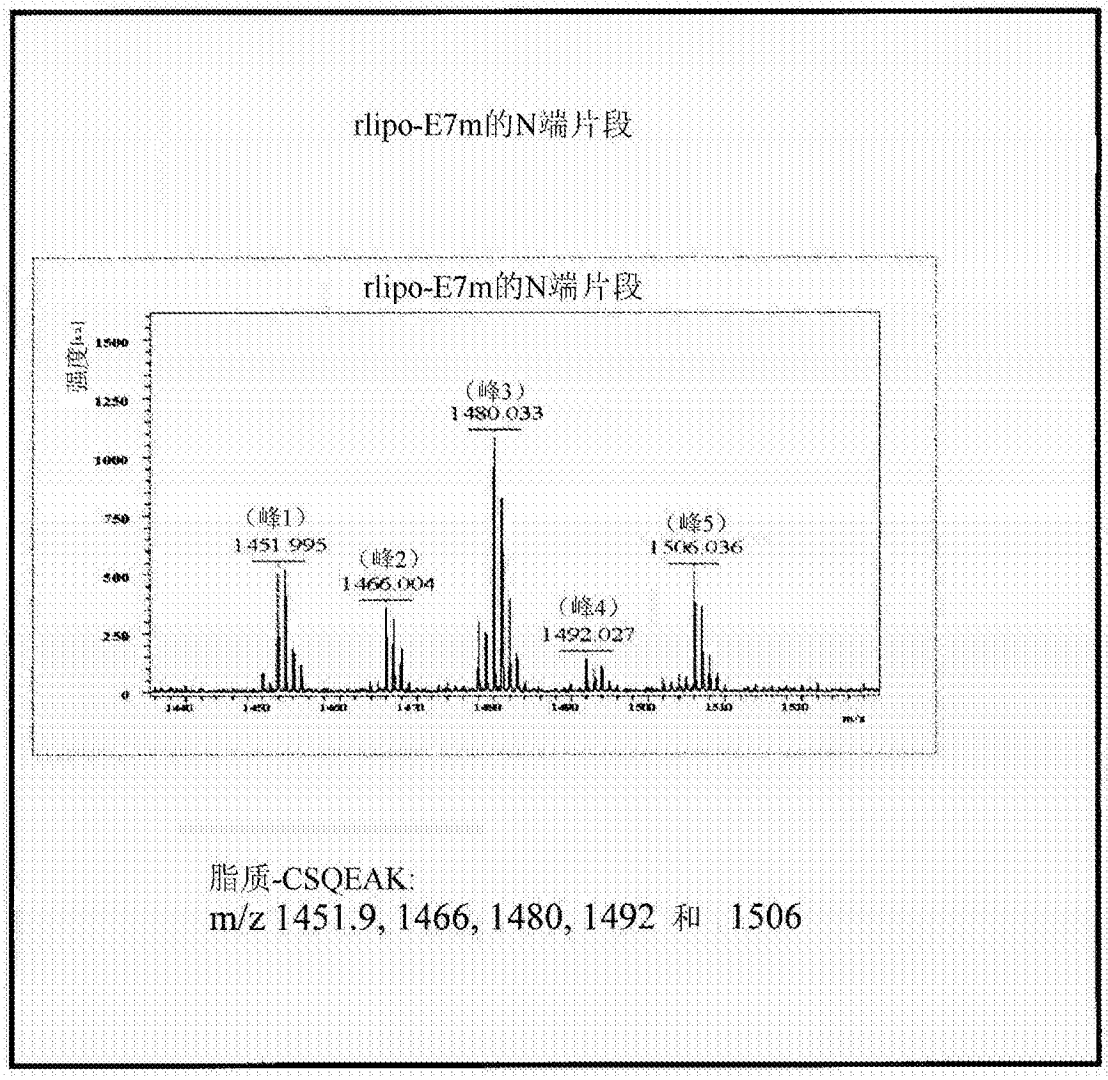

rlipo-E7m的N端片段
rlipo-E7m的N端片段
强度[cps]
1500
1250
1000
750
500
250
0
(峰1)
1451.995
(峰2)
1466.004
(峰3)
1480.033
(峰4)
1492.027
(峰5)
1506.036
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
m/z
脂质-CSQEAK:
m/z 1451.9, 1466, 1480, 1492 和 1506

图6 (C)

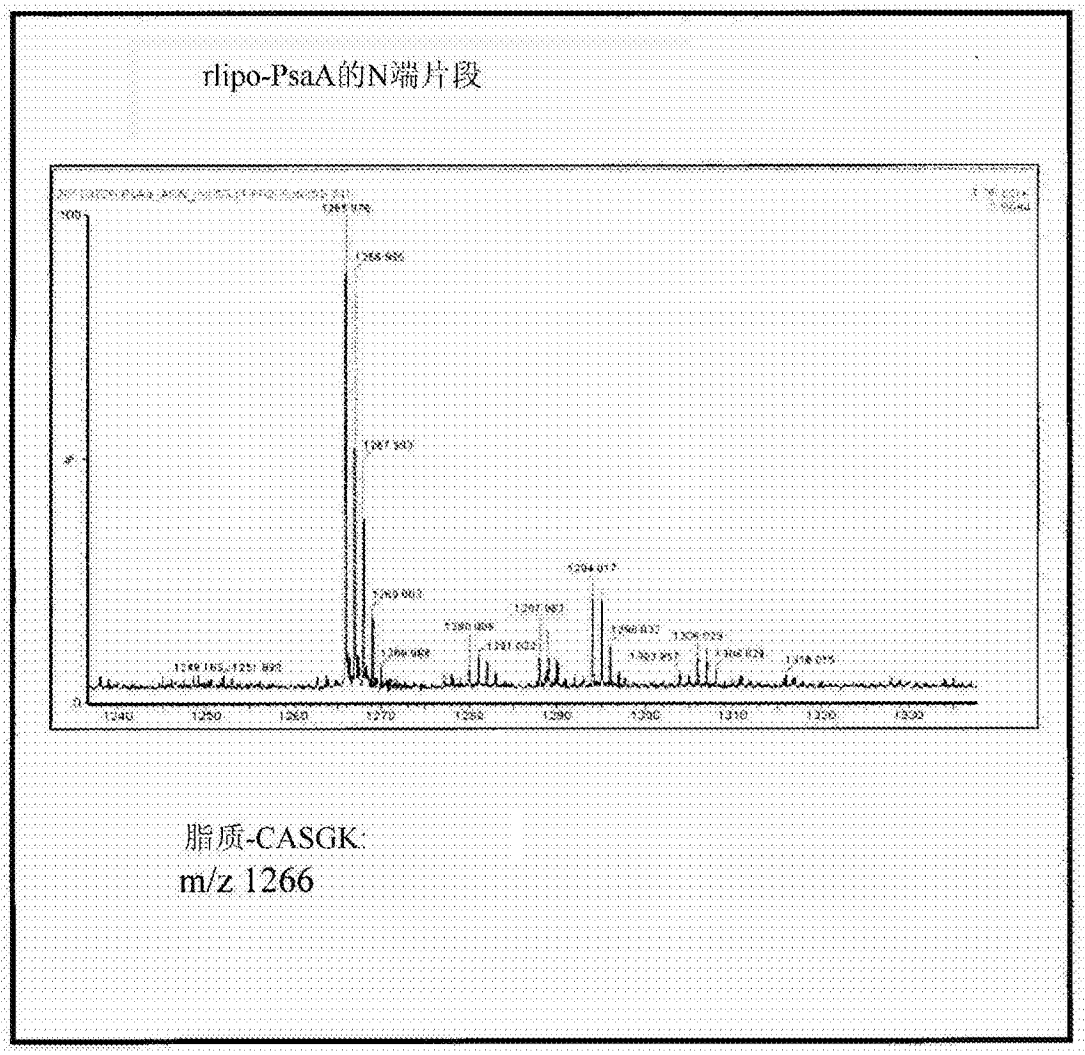


图6(D)