



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120136980 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 13

(21) 申请号	202510234095.1	C12N 9/36 (2006.01)
(22) 申请日	2020.05.07	C12N 9/50 (2006.01)
(30) 优先权数据		C12N 9/52 (2006.01)
	19173389.8 2019.05.08 EP	C12N 9/80 (2006.01)
(62) 分案原申请数据		A61K 38/46 (2006.01)
	202080033977.7 2020.05.07	A61K 38/47 (2006.01)
(71) 申请人	生物技术公司	A61P 31/04 (2006.01)
地址	德国	C12Q 1/04 (2006.01)
(72) 发明人	L·柯西尼	
(74) 专利代理机构	北京市中咨律师事务所	
	11247	
专利代理师	李康琦 黄革生	
(51) Int. Cl.		
	C07K 14/005 (2006.01)	
	C12N 15/70 (2006.01)	

权利要求书2页 说明书48页
序列表（电子公布） 附图13页

(54) 发明名称
新的加德纳菌内容素及其用途
(57) 摘要

本发明涉及新的种选择性噬菌体内溶素及其治疗细菌性阴道病 (BV) 的用途。本发明提供了重组内容素,即,结构域交换的内容素。本发明还涉及所述内容素用于治疗疾病或病症,如细菌感染,特别是BV。本发明进一步涉及编码所述内容素的多核苷酸。所述多核苷酸也可以用于治疗此类疾病或病症。本发明还提供了包含本发明的内容素的药物组合物,用于治疗此类疾病或病症。所述内容素、多核苷酸和药物组合物可以局部给药,特别是局部给药于阴道中。

1. 一种重组内容素, 包含:

(i) N-末端催化结构域, 其序列是如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;

(ii) C-末端细胞壁结合区, 其包含第一细胞壁结合结构域和第二细胞壁结合结构域, 其中所述第一细胞壁结合结构域包含与SEQ ID NO:28、30、32和19中任一项的氨基酸序列至少94%相同的氨基酸序列, 且第二细胞壁结合结构域包含与SEQ ID NO:29、31、33和20中任一项的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列, 和

(iii) N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区。

2. 如权利要求1所述的重组内容素, 其中所述第一细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:28、30、32和19中任一项的氨基酸序列, 或包含与SEQ ID NO:28、30、32和19中任一项的氨基酸序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列, 和/或所述第二细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:29、31、33和20中任一项的氨基酸序列, 或包含与SEQ ID NO:29、31、33和20中任一项的氨基酸序列至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的重组内容素, 其中所述第一细胞壁结合结构域在所述第二细胞壁结合结构域的N-端。

4. 如权利要求1-3任一项所述的重组内容素, 其中N-末端催化结构域包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列, 所述第一细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列, 并且所述第二细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

5. 一种重组内容素, 包含:

(i) N-末端催化结构域, 其序列是SEQ ID NO:7、1至5和10至12中任一项的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:7、1至5和10至12中任一项的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(ii) C-末端细胞壁结合区, 其包含至少一个细胞壁结合结构域, 其中所述细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:19、20、15至18、21至24和24至33中任一项的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:SEQ ID NO:19、20、15至18、21至24和24至33中任一项的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列, 和

(iii) N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区;

其中N-末端催化结构域来自第一天然内容素, 至少一个细胞壁结合结构域来自第二天然内容素, 且其中第一和第二天然内容素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码。

6. 如权利要求5所述的重组内容素, 其中所述C-末端细胞壁结合区包含第一细胞壁结合结构域和第二细胞壁结合结构域, 其中所述第一细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:19、15、17、21、23、26、28、30和32中任一项的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:SEQ ID NO:19、15、17、21、23、26、28、30和32中任一项的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列, 并且所述第二细胞壁结合结构域包含SEQ ID NO:20、16、18、22、24、27、29、31和33中任一项的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:SEQ ID NO:20、16、18、22、24、27、29、31和33中任一项的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

7. 权利要求5或6的重组内容素, 其具有抗加德纳菌 (*Gardnerella*) 的杀灭活性。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的重组内溶素,其中接头区由以下氨基酸序列组成:
- (i) $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$, 其中 X_1 是N或K, X_2 是A或V, X_3 是Y或C和 X_4 是K或Q;或
- (ii) $(XXX)_n$, 其中每个X独立地是G、A或S,其中n对应于序列XXX的重复数。
9. 编码权利要求1-8中任一项的重组内溶素的多核苷酸。
10. 一种药物组合物,包含权利要求1-8中任一项的重组内溶素或权利要求9的多核苷酸并进一步包含药学上可接受的载体和/或稀释剂。
11. 如权利要求1-8中任一项中限定的重组内溶素,或如权利要求9中限定的多核苷酸或如权利要求10中限定的药物组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症是细菌性阴道病。
12. 根据权利要求11的用途,其中所述细菌性阴道病是由*Gardnerella vaginalis sensu stricto*、*Gardnerella leopoldii*、*Gardnerella piovani*和/或*Gardnerella swidsinskii*引起的。
13. 根据权利要求11或12的用途,其中将所述重组内溶素、多核苷酸或药物组合物局部给药。
14. 根据权利要求11或12的用途,其中将所述重组内溶素、多核苷酸或药物组合物给药于女性受试者的阴道中和/或男性受试者的龟头、包皮或尿道入口之中或之上。
15. 根据权利要求11或12的用途,其中将所述重组内溶素、多核苷酸或药物组合物与将阴道pH调节至4.0-6.0的化合物或组合物共同给药。
16. 一种包含权利要求9的多核苷酸的质粒。
17. 一种包含权利要求16的质粒的细菌宿主细胞。
18. 权利要求17的细菌宿主细胞,其是大肠杆菌细胞。
19. 权利要求1-8中任一项的内溶素在制备诊断试剂盒中的用途,所述试剂盒用于诊断可以用根据权利要求1-8中任一项的内溶素治疗的疾病或病症的体外方法中,所述方法包括步骤:
- (i) 将获自受试者的样品接触多肽,所述多肽包含以下的或由以下的组成:根据权利要求1-8中任一项的内溶素的C-末端细胞壁结合区,和任选地根据权利要求1-8中任一项的内溶素的N-末端催化结构域,其中样品包含微生物细胞,并且其中所述内溶素的C-末端细胞壁结合区任选地是被标记的;
- (ii) 测试多肽是否结合和/或裂解样品的微生物细胞;和
- (iii) 如果多肽结合和/或裂解微生物细胞,确定疾病或病症可以用根据权利要求1-8中任一项的内溶素治疗。

新的加德纳菌内溶素及其用途

[0001] 本申请是是申请日为2020年5月7日、发明名称为“新的加德纳菌内溶素及其用途”的中国专利申请202080033977.7 (国际申请号PCT/EP2020/062645)的分案申请。

[0002] 本发明涉及新的物种选择性噬菌体内溶素及其治疗细菌性阴道病(BV)的用途。本发明提供重组内溶素,即结构域交换的内溶素。本发明还涉及所述内溶素用于治疗疾病或病症,如细菌感染,特别是BV。本发明进一步涉及编码所述内溶素的多核苷酸。所述多核苷酸也可以用于治疗此类疾病或病症。本发明还提供包含本发明的内溶素的药物组合物,用于治疗此类疾病或病症。所述内溶素、多核苷酸和药物组合物可以局部给药,特别是局部给药到阴道中。

[0003] 细菌性阴道病(BV),在文献中也被称为细菌性阴道炎、非特异性阴道病和非特异性阴道炎,是世界范围内最常见的阴道感染,并与严重的不良后果有关,所述不良后果包括早产、产后子宫内膜炎和增加的感染HIV的风险。这是阴道的生态失调,其中共生的乳杆菌(*Lactobacilli*)被多微生物生物膜取代,pH从自然的3.5-4.5增加到5.5,并形成恶臭的液体。根据所研究的人群,报告的流行率为10-40%的范围。然而,次优的诊断方法和高比例的无症状患者使得BV的真实患病率难以确定。阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*) (*G.vaginalis*)是一种与BV相关的细菌种。

[0004] BV的发病机制仍然知之甚少。它通常被定义为一种特征在于正常阴道菌群(尤其是产H₂O₂的乳杆菌(*Lactobacillus*))丧失、同时厌氧细菌(包括阴道加德纳菌、动弯杆菌属(*Mobiluncus*)和人支原体(*Mycoplasma hominis*)过度生长的病理状态。然而,最近的数据表明,阴道加德纳菌作为BV中的一种特异性和性传播病原体的主要作用(Muzny等,2016, *J.of Infect.Dis.*214Suppl.1.,SI)。

[0005] 在1950s,在患有BV的女性的生殖道中观察到大量小的多形性革兰氏不定棒状菌。这种生物体最初被称为阴道嗜血杆菌(*Haemophilus vaginalis*),随着有关其特征的更多信息的获得而被反复重命名,现在被归类为阴道加德纳菌,其直到2018年,被认为是加德纳菌属的唯一成员。然而,在2019年初,表明加德纳菌属实际上至少包含13个种,最常见的物种被重新命名为*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*和*G.swidsinskii* (Vanechoutte等,2019 *Int.J.Syst.Evol.Biol.*898661)。

[0006] 加德纳菌属细菌的特殊之处在于它们是革兰氏不定的,即它们不形成定义革兰氏阴性菌种的外膜。细胞壁通常非常薄,且肽聚糖含量仅为10%或更少,这就是为什么用于革兰氏染色的结晶紫染料并不总是产生革兰氏阳性种典型的深紫色。更确切地,加德纳菌细胞可以在革兰氏染色中同时出现革兰氏阳性和阴性。基于16S rRNA的系统发育分析将加德纳菌置于革兰氏阳性双歧杆菌(*Bifidobacteriales*)中。

[0007] 在BV期间,上皮表面被生物膜中的密集阴道加德纳菌覆盖,这种生物膜常常顽固难治。生物膜是由多糖、蛋白质和/或核酸组成的聚合物基质结合在一起的微生物粘附群落。独特的基因表达模式以及生物膜的物理结构增加了细菌对许多负面刺激的抵抗力,所述刺激包括化学消毒剂、极端pH值、宿主免疫防御和抗生素。BV治疗的标准是抗生素甲硝唑和克林霉素,但往往不能根除生物膜,因此6个月内复发率高达60%。此外,尽管留下了一些

剩余的活生物膜,但使用抗生素治疗会清除阴道微生物群,这为其他病原体(例如,真菌)开放了这个生态小生境。因此,BV治疗的常见影响是念珠菌病。还尝试使用益生菌来治疗BV,特别是使用有益的乳杆菌(Lactobacilli)来重新定植阴道。然而,几项临床试验未能显示出益处。

[0008] 因此,非常需要新的方法和组合物来治疗阴道加德纳菌感染,特别是BV,例如,通过选择性杀死加德纳菌属的细菌细胞,优选地不伤害有益的乳杆菌(Lactobacilli)而它们重新充满阴道。因此,本发明的根本技术问题是提供用于治疗BV的新手段和方法。

[0009] 该技术问题通过提供权利要求中表征的实施方案来解决。

[0010] 本发明是基于具有意想不到的特性和结构的新的重组加德纳菌原噬菌体内溶素的制备,所述特性和结构使它们特别适用于各种用途和方法,特别是用于治疗、净化或检测细菌感染和病症,特别是与加德纳菌有关的。

[0011] 本发明的第一个方面提供了内溶素,其包含以下的或由以下的组成

[0012] (i) N-末端催化结构域,或其功能性变体;

[0013] (ii) C-末端细胞壁结合区,或其功能性变体,其中C-末端细胞壁结合区包含至少一个细胞壁结合结构域或由至少一个细胞壁结合结构域组成;和

[0014] (iii) N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区,

[0015] 其中内溶素具有抗加德纳菌的杀灭活性。

[0016] 在本发明的一个方面中,N-末端催化结构域来自第一天然内溶素,接头区和C-末端细胞壁结合区来自第二天然内溶素,以及第一和第二天然内溶素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码。因此,本发明提供了包含以下的或由以下的组成的重组内溶素

[0017] (i) N-末端催化结构域,或其功能性变体;

[0018] (ii) C-末端细胞壁结合区,或其功能性变体,其中C-末端细胞壁结合区包含至少一个细胞壁结合结构域或由至少一个细胞壁结构域组成;和

[0019] (iii) N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区,

[0020] 其中N-末端催化结构域来自第一天然内溶素,接头区和C-末端细胞壁结合区来自第二天然内溶素,以及第一和第二天然内溶素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码,并且

[0021] 其中所述重组内溶素具有抗加德纳菌的杀灭活性。

[0022] 加德纳菌的特别之处在于其是革兰氏不定种:它不形成定义真正革兰氏阴性种的外膜。细胞壁通常非常薄,且肽聚糖含量仅为10%或更少。这表明肽聚糖降解酶,如内溶素蛋白,不能有效地裂解加德纳菌的细菌细胞壁。然而,在本发明的情况下,已经鉴定了新的重组内溶素,其具有有效杀灭加德纳菌种的有利特性,因此可以用作治疗BV的新疗法。

[0023] 健康的阴道主要有3个乳杆菌种在繁殖:卷曲乳杆菌(L.crispatus)、加氏乳杆菌(L.gasseri)和詹氏乳杆菌(L.jensenii)。它们通过产生乳酸维持3.5-4.5的酸性pH值,并通过产生H₂O₂维持保护性的氧化环境。从BV中恢复伴随着阴道的这些乳杆菌的群体恢复。然而,抗生素(常规地被用于治疗BV)的缺点是它们会干扰阴道的乳杆菌的群体恢复过程。相比之下,本发明的新的重组内溶素有利地具有抗加德纳菌的物种选择性杀灭活性并且不伤害乳杆菌。此外,所附实施例表明,所有测试的加德纳菌株对常规用于治疗BV的甲硝唑和克林霉素的敏感性低。这可以解释BV的高复发率。这也证明本发明的内溶素在治疗BV方面优

于抗生素。因此,用本发明的内容素治疗BV远优于目前可用的治疗,诸如用抗生素甲硝唑和克林霉素的治疗。

[0024] 本文的术语“来自第一天然内容素”表示各自的部分(即,N-末端催化结构域)与第一天然内容素相同或是第一天然内容素的功能性变体。如本文定义的,功能性变体是与第一天然内容素各自的部分(即,N-末端催化结构域)的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)并产生功能性内容素的多肽,其中所述功能包括抗加德纳菌的杀灭活性。下文中提供了几种天然内容素的氨基酸序列并概括于表7中。

[0025] 据此,术语“来自第二天然内容素”表示各自的部分(即,接头区和C-末端细胞壁结合区)与第二天然内容素相同或是第二天然内容素的功能性变体,第二天然内容素即不同于第一天然内容素的内容素。如本文定义的,功能性变体是与第二天然内容素各自的部分(即,接头区和C-末端细胞壁结合区)的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)并产生功能性内容素的多肽,其中所述功能包括抗加德纳菌的杀灭活性。

[0026] 在本文,N-末端催化结构域也称为“H-结构域”。例如,术语“H2”是指天然内容素(EL)2的H-结构域。“C-末端细胞壁结合区”是指一个或多个细胞壁结合结构域。接头和细胞壁结合结构域一起表示所谓的“B-区”。例如,B10是指天然EL10的B-区。同样,B11_N是指天然EL11的N-末端细胞壁结合结构域,B12_C是指天然EL12的C-末端细胞壁结合结构域,诸如此类。

[0027] 本发明进一步提供了包含以下的或由以下的组成的内容素

[0028] (i) 由多肽组成的N-末端催化结构域,所述多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:1至5、7或10至12任一个的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1至5、7或10至12任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性的其功能性变体;

[0029] (ii) 包含至少一个细胞壁结合结构域或由至少一个细胞壁结合结构域组成的C-末端细胞壁结合区,所述至少一个细胞壁结合结构域独立地选自包含以下的或由以下的组成的多肽:分别地,SEQ ID NO:15至24和26至33任一个的氨基酸序列,及其其分别与SEQ ID NO:15至24和26至33任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的任何功能性变体;和

[0030] (iii) N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区,

[0031] 其中所述内容素具有抗加德纳菌的杀灭活性。

[0032] 如所附权利要求中所示的,活性最大的N-末端催化结构域(也称为“H-结构域”)是H2(SEQ ID NO:2),接着是H7(SEQ ID NO:7)、H10(SEQ ID NO:10)和H5(SEQ ID NO:5)。

[0033] 因此,在本发明的优选方面中,N-末端催化结构域由多肽组成,该多肽包含以下的

或由以下的组成:SEQ ID NO:2、7、10和5任一个的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、7、10和5任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0034] 由此内容素是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌的细胞壁的能力。

[0035] 因此,在本发明的优选方面中,N-末端催化结构域由多肽组成,该多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;或更优选包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;或甚至更优选包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;或甚至更优选包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0036] 由此内容素是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌的细胞壁的能力。

[0037] 在所附实施例中还显示了B-区B10(包含SEQ ID NO:28和29的细胞壁结合结构域)是活性最大的,接着是B11(包含SEQ ID NO:30和31的细胞壁结合结构域)、B12(包含SEQ ID NO:32和33的细胞壁结构域)和B3(包含SEQ ID NO:19和20的细胞壁结构域)。

[0038] 因此,在本发明的优选方面中,细胞壁结合结构域选自多肽,所述多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:19、20和28-33任一个的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19、20和28-33任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0039] 由此内容素是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌的细胞壁的能力。

[0040] 本发明的内容素优选包含两个细胞壁结合结构域。在本发明的一个方面中,本发明的内容素的细胞壁结合结构域(B-结构域)由多肽组成,所述多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:19、20和28-33任一个的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19、20和28-33任一

个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0041] 由此内容素是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌的细胞壁的能力。

[0042] 在本发明的优选方面中,内容素包含第一细胞壁结合结构域和第二细胞壁结合结构域,其中所述第一细胞壁结合结构域选自SEQ ID NO:15、17、19、21、23、26、28、30和32,并且所述第二细胞壁结合结构域选自SEQ ID NO:16、18、20、22、24、27、29、31和33。优选,所述第一细胞壁结合结构域在所述第二细胞壁结合结构域的N-末端。

[0043] 在本发明的更优选的方面中,内容素包含天然内容素EL10(SEQ ID NO:28和29)、天然内容素EL11(SEQ ID NO:30和31)、天然内容素EL12(SEQ ID NO:32和33)或天然内容素EL3(SEQ ID NO:19和20),甚至更优选天然内容素EL10(SEQ ID NO:28和29)的两个细胞壁结合结构域(B-结构域);或其功能性变体。所述功能性变体还可以是一组两个B-结构域,其与天然内容素EL10(SEQ ID NO:28和29)、天然内容素EL11(SEQ ID NO:30和31)、天然内容素EL12(SEQ ID NO:32和33)或天然内容素EL3(SEQ ID NO:19和20),甚至更优选天然内容素EL10(SEQ ID NO:28和29)的两个细胞壁结合结构域(B-结构域)的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性);

[0044] 由此内容素是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌的细胞壁的能力。

[0045] 在本发明的一个方面中,细胞壁结合结构域(B-结构域)包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:19和/或20,或与SEQ ID NO:19和/或20的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;更优选包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:32和/或33,或与SEQ ID NO:32和/或33的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;甚至更优选包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:30和/或31,或与SEQ ID NO:30和/或31的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;或甚至更优选包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:28和/或29,或与SEQ ID NO:28和/或29的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0046] 由此内容素是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌的细胞壁的能力。

[0047] 优选序列VNELL或VNKLL,更优选VNELL,位于B-结构域的C-末端。在B-区内存在多个B-结构域的情况中,还优选序列VNELL或VNKLL,更优选VNELL,位于每个B-结构域的C-末端。

[0048] 令人惊讶地和出乎预料地,已经发现了在本发明的内容中,几个重组的内容素比天然内容素具有更强的活性,尤其是在测试的全部4个加德纳菌株(即,*Gardnerella vaginalis sensu stricto*、*Gardnerella leopoldii*、*Gardnerella piovai*和*Gardnerella swidsinskii*)中观察时。特别地,H2B10、H2B11、H2B12和H7B3各自比所有测试的天然内容素更有活性。因此,根据本发明的重组内容素令人惊讶地呈现出高于天然内容素的活性。

[0049] 因此,优选的是,与天然内容素(例如,天然内容素EL1-EL12(具有如表7中所示的氨基酸序列))的杀灭活性相比,本发明的重组内容素的“抗加德纳菌的杀灭活性”得到了增强。

[0050] 基于内容素H2B10、H2B11、H2B12和H7B3相当高的活性,这些内容素(或其功能性变体)在本发明中是优选的。因此,本发明的内容素优选:

[0051] (i) 由多肽组成的N-末端催化结构域,该多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:2或7的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0052] (ii) C-末端细胞壁结合区,包含至少一个(优选两个)细胞壁结合结构域或由至少一个(优选两个)细胞壁结合结构域组成,所述细胞壁结合结构域独立地选自包含以下的或由以下的组成的多肽:SEQ ID NO:19、20和28至33任一个的氨基酸序列,或分别与SEQ ID NO:19、20和28至33任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;和

[0053] (iii) 由多肽组成的在N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区,所述多肽包含氨基酸序列 $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$ 或由氨基酸序列 $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$ 组成,其中 X_1 是N或K,优选N, X_2 是A, X_3 是Y和 X_4 是K或Q,

[0054] 其中所述内容素具有抗加德纳菌的杀灭活性。关于接头区,如下所述,指出接头区还可以由多肽组成,所述多肽包含氨基酸序列 $(XXX)_n$ 或由氨基酸序列 $(XXX)_n$ 组成,其中每个X独立地是G、A或S,优选其中氨基酸序列 $(XXX)_n$ 是 $(GGS)_n$,其中n对应于序列XXX的重复数,优选其中n是2、3、4、5或6。

[0055] 在所附实施例中,重组内容素H2B10显示出具有最高的活性。因此,在本发明中,最优选本发明的内容素是H2B10(或其功能性变体)。因此,本发明的内容素最优选:

[0056] (i) 由多肽组成的N-末端催化结构域,所述多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,

性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;

[0057] (ii) C-末端细胞壁结合区,包含两个细胞壁结合结构域或由两个细胞壁结合结构域组成,所述细胞壁结合结构域由多肽组成,所述多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何功能性变体;和

[0058] (iii) 由多肽组成的在N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区,所述多肽包含氨基酸序列 $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$ 或由氨基酸序列 $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$ 组成,其中 X_1 是N, X_2 是A, X_3 是Y和 X_4 是K,

[0059] 其中所述内容素具有抗加德纳菌的杀灭活性。如上所述,优选与天然内容素,例如天然内容素EL1-EL12(具有表7中所示的氨基酸序列)相比,本发明的重组内容素的“抗加德纳菌的杀灭活性”是增强的。

[0060] 关于接头区,如下所述,指出接头区还可以由多肽组成,所述多肽包含氨基酸序列 $(XXX)_n$ 或由氨基酸序列 $(XXX)_n$ 组成,其中每个X独立地是G、A或S,优选其中氨基酸序列 $(XXX)_n$ 是 $(GGS)_n$,其中n对应于序列XXX的重复数,优选其中n是2、3、4、5或6。

[0061] 在本发明的重组内容素中,C-末端细胞壁结合区可以包含一个、两个或三个细胞壁结合结构域或由一个、两个或三个细胞壁结合结构域组成。所述一个、两个或三个细胞壁结合结构域可以独立地选自包含以下的或由以下的组成的多肽:分别地,SEQ ID NO:15至24和26至33的氨基酸序列,和分别地,与SEQ ID NO:15至24和26至33的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性和最优选至少99.7%同一性)的其任何变体,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括结合加德纳菌的细胞壁的能力。优选C-末端细胞壁结合区由两个细胞壁结合结构域组成。优选的C-末端细胞壁结合区如上下文定义。

[0062] 本发明的内容素优选不包含天然内容素EL6的H-结构域或B-区。天然内容素EL6的H-结构域和B-区的氨基酸序列显示于表7中。

[0063] 接头区可以由具有6至18个氨基酸长度,优选9至15个氨基酸长度,甚至更优选12个氨基酸长度的多肽组成。优选,接头区可以由多肽组成,所述多肽包含以下的氨基酸序列或由以下的氨基酸序列组成:(i) $(XXX)_n$,其中每个X可以独立地是G、A或S,优选其中氨基酸序列 $(XXX)_n$ 是 $(GGS)_n$,其中n对应于序列XXX的重复数,优选其中n是2、3、4、5或6,或(ii) $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$,其中 X_1 是N或K, X_2 是A或V, X_3 是Y或C和 X_4 是K或Q。如上所述,在本发明的内容素的一个方面中,N-末端催化结构域与第一天然内容素相同或源自第一天然内容素,接头区和C-末端细胞壁结合区与第二天然内容素相同或源自第二天然内容素,且第一和第二天然内容素由来自不同噬菌体的不同基因组编码。

[0064] 本发明的重组内容素具有抗加德纳菌的杀灭活性。例如,本发明的内容素可以具有抗*Gardnerella vaginalis sensu stricto*、*Gardnerella leopoldii*、*Gardnerella piotii*和*Gardnerella swidsinskii*的杀灭活性,优选抗全部。如上所述的本发明的内容素

抗加德纳菌的杀灭活性优选是抗加德纳菌的属选择性杀灭活性。本文“抗加德纳菌的属选择性杀灭活性”表示本发明的内容素不具有抗一般细菌的杀灭活性。优选,本发明的内容素具有抗加德纳菌的杀灭活性,但不抗乳杆菌。特别地,优选所述内容素不具有抗卷曲乳杆菌 (*Lactobacilli crispatus*)、加氏乳杆菌 (*Lactobacilli gasseri*) 和/或詹氏乳杆菌 (*Lactobacilli jensenii*) 的杀灭活性。更优选,所述内容素不具有抗所有这些乳杆菌的杀灭活性,即卷曲乳杆菌 (*Lactobacilli crispatus*)、加氏乳杆菌 (*Lactobacilli gasseri*) 和詹氏乳杆菌 (*Lactobacilli jensenii*)。

[0065] 本发明还涉及编码如上所述的内容素的多核苷酸分子。核酸分子可以是DNA,例如,cDNA或RNA。在本文,术语“多核苷酸”或“多核苷酸分子”与术语“核酸分子”等同义使用。

[0066] 本发明还涉及包含本发明所述的多核苷酸分子的载体。在一个实施方案中,载体是表达载体。可以使用本领域已知的任何合适的载体,如pET系列的载体和所有基于T7的载体。例如,载体可以是质粒。因此,本发明的一个方面涉及包含本发明多核苷酸的质粒。本领域技术人员将认识到可以通过宿主细胞的选择来确定表达载体的选择。

[0067] 本发明还提供了包含根据本发明的多核苷酸或根据本发明的载体/质粒的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是微生物细胞,例如,细菌细胞。优选宿主细胞是非致病的。最优选,宿主细胞是大肠杆菌。因此,本发明的一个方面涉及包含本发明的质粒的细菌宿主细胞,优选其中细菌宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0068] 本发明还包涵用于生产本发明的内容素的方法,包括在内容素在其中表达的条件下培养包含根据本发明的多核苷酸分子或根据本发明的载体/质粒的宿主细胞群。

[0069] 本发明的再一个方面提供了药物组合物,其包含

[0070] (a) 根据本发明的内容素;

[0071] (b) 根据本发明的多核苷酸分子;

[0072] (c) 根据本发明的载体/质粒;

[0073] (d) 根据本发明的宿主;和/或

[0074] (e) 能够表达根据本发明的内容素的噬菌体

[0075] 和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。例如,本发明的药物组合物可以包含本发明的内容素、本发明的多核苷酸分子和药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0076] 本发明的再一个方面涉及

[0077] (a) 根据本发明的内容素;

[0078] (b) 根据本发明的多核苷酸分子;

[0079] (c) 根据本发明的载体/质粒;

[0080] (d) 根据本发明的宿主;

[0081] (e) 能够表达根据本发明的内容素的噬菌体;和/或

[0082] (f) 根据本发明的药物组合物

[0083] 用于治疗疾病或病症。例如,本发明提供了根据本发明的内容素、根据本发明的多核苷酸分子或根据本发明的药物组合物,用于治疗疾病或病症。所述疾病或病症可以是细菌感染,优选细菌性阴道病。例如,细菌性阴道病可以由*Gardnerella vaginalis sensu stricto*、*Gardnerella leopoldii*、*Gardnerella piovani*和/或*Gardnerella swidsinskii*引起的。

[0084] 在本发明的一个方面中,本发明的重组内容素、本发明的多核苷酸分子或本发明的药物组合物可以局部给药,优选局部给药于受试者的阴道中。因此,在本发明的一个方面中,本发明的重组内容素、本发明的多核苷酸或本发明的药物组合物给药于受试者的阴道中。

[0085] 所附实施例显示了本发明的重组内容素的活性在约pH5的pH下特别高。因此,本发明的一个方面涉及本发明的重组内容素、本发明的多核苷酸分子或本发明的药物组合物,其中将所述重组内容素、多核苷酸或药物组合物与将阴道的pH调节至4.0-6.0,优选调节至4.5-5.5,更优选调节至约5的化合物或组合物共同给药。合适的调节阴道pH的化合物或组合物包括但不限于磷酸盐、乳酸(例如,乳杆菌分泌以建立酸性环境的天然酸化物质)或其他有机酸,例如,羧基取代的聚合物。

[0086] 本发明的再一个方面涉及

[0087] (a) 本发明的内容素;

[0088] (b) 本发明的多核苷酸分子;

[0089] (c) 本发明的载体/质粒;

[0090] (d) 本发明的宿主;

[0091] (e) 能够表达本发明的内容素的噬菌体;和/或

[0092] (f) 本发明的药物组合物

[0093] 用作药物。

[0094] 本发明的再一个方面涉及以下物质在制造用于治疗细菌感染和病症的药物中的用途

[0095] (a) 本发明的内容素;

[0096] (b) 本发明的多核苷酸分子;

[0097] (c) 本发明的载体/质粒;

[0098] (d) 本发明的宿主;

[0099] (e) 能够表达本发明的多肽的噬菌体;和/或

[0100] (f) 本发明的药物组合物。

[0101] 本发明的再一个方面提供了一种用于治疗细菌感染和病症(如BV)的方法,包括将治疗有效量的以下物质给药于需要的受试者

[0102] (a) 本发明的内容素;

[0103] (b) 本发明的多核苷酸分子;

[0104] (c) 本发明的载体/质粒;

[0105] (d) 本发明的宿主;

[0106] (e) 能够表达本发明的多肽的噬菌体;和/或

[0107] (f) 本发明的药物组合物。

[0108] 在一些实施方案中,治疗有效量是10至100ug内容素的剂量,任选以每天几次来给药。

[0109] 本发明的再一个方面提供了包含如本文所述的内容素和使用说明的药盒,特别是用于治疗疾病或病症,优选如上定义的BV。所述药盒还可以包含将阴道的pH调节至4.0-6.0,优选调节至4.5-5.5,更优选调节至约5的化合物或组合物。上下文针对本发明的内容

素限定的定义和优选方面经必要的修改也适用于本发明的多核苷酸分子、载体/质粒、宿主细胞、药物组合物、治疗方法和药盒。

[0110] 本发明的再一个方面提供了用于诊断可以用根据本发明的内容素治疗的疾病或病症的体外方法,该方法包括步骤:

[0111] (i) 将获自受试者的样品接触包含以下的或由以下的组成的多肽:根据本发明的内容素的C-末端细胞壁结合区和任选根据本发明的内容素的N-末端催化结构域,其中样品包含微生物细胞,并且其中所述内容素的C-末端细胞壁结合区任选是标记的;

[0112] (ii) 测试多肽是否结合,和/或裂解样品的微生物细胞;和

[0113] (iii) 如果多肽结合,和/或裂解微生物细胞,确定疾病或病症可以用根据本发明的内容素治疗。

[0114] 微生物细胞可以是加德纳菌细胞,优选*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*、*G.swidsinskii*或加德纳菌属的其他种的细胞。

[0115] 本发明的其他特征和优势将从以下详述显而易见。

[0116] 附图简述

[0117] 图1显示了本公开的天然加德纳菌原噬菌体内内容素的序列比对 (CLUSTAL0(1.2.4)多序列比对)。大部分内容素具有306个残基,除了两种具有251个残基。

[0118] 图2显示了本公开的天然加德纳菌原噬菌体内内容素的系统发育树。内容素之间没有相同的对,即使它们高度同源。

[0119] 图3显示了用InterPro测定的本公开的加德纳菌原噬菌体内内容素的结构域结构 (Mitchell等,2019,Nucleic Acids Res.47,D351-D360)。由于其与糖苷水解酶家族25的同源性,内容素196个残基的N-末端部分被确定为催化结构域。催化结构域之后是接头区和两个结构域,由于它们与溶菌酶Cp1-7的C-末端结构域(CW_7结构域)的同源性,因此被确定为两个细胞结合结构域。根据本申请的命名法,催化结构域表示水解酶或“H-结构域”,而接头区和细胞壁结合结构域共同表示结合或“B-区”。

[0120] 图4A至4C显示了三种酶活性分析,其中通过检测加德纳菌细胞悬浮液的浊度变化来测量本公开的天然加德纳菌原噬菌体内内容素的酶活性。在图4A中,通过检测*G.leopoldii*株Gv_10悬液在pH 6.0下的浊度变化来测量内容素的酶活性。在图4B中,通过检测*G.piotii*株Gv_17悬液在pH 7.0下的浊度变化来测量内容素的酶活性。在图4C中,通过检测*G.swidsinskii*株Gv_23悬液在pH 7.4下的浊度变化来测量内容素的酶活性。在调节至适当pH值的培养基中进行处理,在光度比色皿中相对缓冲液进行。然后,通过测量600nm处的光密度(OD)来评估浊度的变化。因此,与缓冲液相比,内容素处理组的浊度下降更明显,表明了酶活性。

[0121] 图5显示了集落形成单位 (Colony Forming Units,CFU) 测定的定量减少,该测定比较了在不同pH值下在含或不含咪唑的培养基中孵育的*G.vaginalis sensu stricto*株Gv_9的未处理细胞。将 5×10^7 CFU/ml细胞在图下所示的条件下在37°C厌氧条件下孵育5小时,然后通过定量涂布测定存活的CFU/ml。结果表明,在试验条件下,阴道加德纳菌Gv_9的存活高度依赖于咪唑的缺乏和低pH值。

[0122] 图6显示了集落形成单位 (CFU) 测定的定量减少,比较了在不同pH值下用含有重组内容素H10B1和250mM咪唑的洗脱液或不同pH值下用含有250mM咪唑的对照处理的

G.vaginalis sensu stricto株Gv_9的细胞。将 5×10^7 CFU/ml细胞在图下所示的条件下在37°C厌氧条件下孵育5小时,然后通过定量涂布测定存活CFU/ml。标记为咪唑对照品的列描绘了与图5中相同的数据。结果表明,H10B1的酶活性(作为本发明所有内容素的示例)在低pH值下较高,pH 5.5和pH 5.0显示出最强的活性。

[0123] 图7A至7D显示了集落形成单位(CFU)测定中的四个定量减少,该测定测量了本公开的天然和重组加德纳菌原噬菌体内内容素抗四个主要加德纳菌种的杀灭活性。在图7A、7B、7C和7D中,分别通过检测*G.vaginalis* sensu strict株Gv_9、*G.leopoldii*株Gv_11、*G.piotii*株Gv_17和*G.swidsinskii*株Gv_23悬液中的活CFU来测量内容素的杀灭活性。将 $90 \mu\text{l}$ 5×10^7 CFU/ml所示菌株在pH 5.0的厌氧条件下,用10 μl 内容素溶液孵育5小时(如有可能,将浓度调至0.2mg/ml,参见表4)。对数Y轴表示存活细胞的计数。虚线表示通过涂布2 μl 反应混合物(500CFU/ml)得出的检测限(LOD)。结果表明,本发明的内容素具有裂解四个主要加德纳菌种的能力。结果还指出,本发明的一些重组内容素具有比本发明的天然内容素更高的杀灭活性。

[0124] 图8显示了用Clustal Omega(Sievers等,2011Mol.Syst.Biol.7,539)形成的H-结构域的系统发育关系树(氨基酸水平)。

[0125] 图9显示了用Clustal Omega(Sievers等,2011Mol.Syst.Biol.7,539)形成的B-区的系统发育关系树(氨基酸水平)。

[0126] 图10显示了使用Clustal Omega(Sievers等,2011Mol.Syst.Biol.7,539)的本发明的天然内容素的B-区内的细胞壁结合结构域(也称为B-结构域)的序列比对。对于每个B-区,N-端细胞壁结合域用_N后缀表示(Bx_N),C-端细胞壁结合域用_C后缀表示(Bx_C)。举例来说,B3_C表示B3的第二个(C-端的)B-结构域。

[0127] 图11显示了使用Clustal Omega(Sievers等,2011Mol.Syst.Biol.7,539)的单个B-结构域的系统发育关系树。

[0128] 图12显示了活集落形成单位(CFU)测定中的三个定量减少,该测定测量了在pH5.0的厌氧条件下,本公开的重组加德纳菌原噬菌体内内容素抗三个最常见的有益乳杆菌种的杀灭活性。结果表明,本发明的内容素对对抗有益的乳杆菌株无效。

[0129] 图13显示了测量甲硝唑和克林霉素(作为注射用溶液从Ratiopharm获得,300mg/2ml)对四个主要加德纳菌种悬液生长影响的MIC微培养液稀释(microbroth dilution)活性测定。将 2.5×10^7 CFU/ml的加德纳菌悬液用各图x轴上所示的抗生素浓度孵育,并在37°C厌氧条件下孵育48h。在孵育前后,通过在610nm(OD(610))处的光密度测量来评估细胞生长,以确定最小抑制浓度(MIC)。结果表明,所有加德纳菌株对甲硝唑和克林霉素(作为注射用溶液从Ratiopharm获得,300mg/2ml)均有耐药性,MIC分别为64至<128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (图13)。

[0130] 图14显示了测量甲硝唑和盐酸克林霉素(从Sigma-Aldrich获得)对 1×10^5 - 1×10^6 CFU/ml加德纳菌悬液的作用的MIC微培养液稀释活性测定。这次结果表明,甲硝唑对所有测试的加德纳菌株的MIC在8至128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,而盐酸克林霉素粉(从Sigma-Aldrich获得(C5269-10MG))表现出的MIC在0.25至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间。

[0131] 图15显示了测量H2B10(本文所述的结构域交换内容素的代表)对三个主要加德纳菌种生长的影响的MIC微培养液稀释活性测定。将 1×10^5 - 1×10^6 CFU/ml的加德纳菌悬液与每

张图的x-轴上所示浓度的H2B10一起孵育,并在37°C厌氧条件下孵育48h。在孵育前后,通过OD(610)测量来评估细胞生长,以确定最小抑制浓度(MIC)。获得了在1至4 μ g/ml之间的MIC值,表明所有加德纳菌株对结构域交换内容素H2B10均高度敏感。

[0132] 详述

[0133] 定义

[0134] 术语“溶素”是指由噬菌体(内容素)或细菌(自溶素)编码的细胞壁裂解酶,其在外源添加时(自外裂解(lysis-from-without))能够水解目标细菌的细胞壁。与经典抗生素相比,这类新的抗菌剂具有重要的优势,例如,新的作用方式;易感细菌的狭小范围;快速杀死静止和指数生长的细菌;对粘膜和细菌生物膜的活性;发生抗性的概率低;以及对正常微生物群的影响减少。这些独特的特性提高了对溶素的生物技术和药理学开发的兴趣,并使其包括在目前对抗抗生素耐药性的首选替代品中。来自革兰氏阳性细菌及其噬菌体的溶素通常包含至少一个催化结构域和一个或多个细胞壁结合结构域。相比之下,革兰氏阴性种或其噬菌体产生的许多溶素仅含有催化结构域,尽管也有报道称模块内容素。催化单元决定待裂解的肽聚糖(PG)键的类型,而细胞壁结合域主要通过对以属或种/株特异性方式分布的细胞壁元素的特异性识别来决定裂解谱。

[0135] 在本公开的内容中,术语“天然内容素”是指由细菌基因组内,特别是加德纳菌细胞基因组内的原噬菌体序列编码的内容素。在本公开的内容中,术语“天然内容素”因此是指未经结构域交换的内容素。天然内容素可以不经修饰,这意味着内容素的氨基酸序列对应于天然序列。或者,可以修饰天然内容素,这意味着与天然序列相比,内容素的氨基酸序列包含至少一个突变。天然内容素E1-E14的氨基酸序列如下表7所示。NCBI登录号WP_014554482(2013年5月27日WP_014554482.1版)也提供了已知的1,4- β -N-乙酰壁酰胺酶(天然内容素EL1)序列的示例。

[0136] 在本公开的内容中,术语“重组内容素”是指经结构域交换的内容素。在本公开的内容中,术语“结构域交换的内容素”是指具有来自第一天然内容素的N-末端催化结构域和至少一个来自第二天然内容素的细胞壁结合结构域的内容素,其中第一和第二天然内容素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码。本发明的重组内容素可以包含以下的或由以下的组成:来自第一天然内容素的N-末端催化结构域和来自第二天然内容素的两个细胞壁结合结构域,其中第一和第二天然内容素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码。或者,本发明的重组内容素可以包含以下的或由以下的组成:来自第一天然内容素的N-末端催化结构域、来自第二天然内容素的第一(N-末端)细胞壁结合结构域和来自第三天然内容素的第二(C-末端)细胞壁结合结构域,其中第一和第二天然内容素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码,和其中第三天然内容素任选由来自不同于第一和第二天然内容素的原噬菌体的不同基因组编码。重组内容素可以是未修饰的,意味着内容素的氨基酸序列对应于构成内容素的各自结构域的天然序列。或者,重组内容素可以是修饰的,意味着与构成内容素的各自结构域的天然序列相比,内容素的氨基酸序列包含至少一个突变。根据这个定义,本领域技术人员容易理解如本文所述的“结构域交换的”或“重组”内容素是非天然产生的内容素。即,本发明的重组内容素已经手动修饰并且通过定义排除了天然内容素,即,因为后者可以在自然界中自然地找到。所附实施例提供了如何产生本发明的人工内容素的合适方法。

[0137] 术语“催化结构域”或“酶促结构域”是指含有其中发生催化的化学反应的区域的

蛋白质链的部分。在本公开的内容中,术语“H-结构域”是指本发明的内容素含有催化结构域的部分。

[0138] 在本公开的内容中,术语“B-区”是指包含具有细胞壁结合活性的多肽或由具有细胞壁结合活性的多肽组成的本发明的内容素的部分。在优选实施方案中,B-区包含接头区和一个、两个或三个细胞壁结合结构域或“B-结构域”或由接头区和一个、两个或三个细胞壁结合结构域组成。

[0139] 在本发明的内容中,术语“B-结构域”是指B-区内含有的细胞壁结合结构域。

[0140] 在本公开的内容中,术语“CW_7结构域”是指蛋白质Cp1-7的细胞壁结合结构域,即,由肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)Cp-7编码的内容素(参见,Bustamante等,2010J.Biol.Chem.285,33184-33196,2012PLoS One 7,e46654)。简而言之,Cp1-7蛋白具有由3个连续的CW_7结构域组成的C-末端细胞壁结合区。每个CW_7结构域由38个氨基酸长的类似氨基酸序列组成,称为“CW_7基序”,由Interpro定义(Mitchell等,2019,Nucleic Acids Res.47,D351-D360),由氨基酸序列

[0141] TVANEVIQGLWGNGQERYDSLANAGYDPQAVQD KVNEXL组成,其中X在CW_7基序No:1(氨基酸207-245)和No:2(氨基酸255-293)中是I,并且其中X在CW_7基序No:3(氨基酸303-341)中是L。在Cp1-7蛋白中,CW_7基序No:1和No:2之间以及CW_基序No:2和No:3之间有9个残基的短接头,因此总重复序列为47个残基长。相比之下,本发明的天然内容素的重复序列为49个残基长。

[0142] 术语“最小抑制浓度”或“MIC”是指防止细菌可见生长的化学物质(通常是药物)的最低浓度。MIC在本申请中定义为通过OD测量在48h后检测不到生长的抗生素的最小浓度。

[0143] 术语“最小杀菌浓度”或“MBC”是指杀灭特定细菌所需的抗菌剂的最低浓度。通常,测量MBC₉₀,即在规定时间内杀灭90%细胞的抗生素浓度,而MBC在本申请中定义为完全消除 2.5×10^7 CFU/ml悬液的最小浓度。虽然MIC是抑制可见生长所需的抗菌剂的最低浓度,但MBC是导致悬液中所有细胞的细菌死亡的抗菌剂的最低浓度。

[0144] 术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”和这些术语的变体分别指肽、寡肽、寡聚体或蛋白质,包括融合蛋白,包含通过正常或修饰的肽键彼此连接的至少两个氨基酸,如在等排肽的情况下。这些术语在此还包括“肽模拟物”,其定义为含有非肽结构元件的肽类似物,该肽能够模拟或拮抗天然亲本肽的生物学作用。肽模拟物缺乏经典的肽特征,如酶促可裂解肽键。肽或多肽可由除遗传密码定义的20个氨基酸以外的氨基酸组成。它可以由L-氨基酸和/或D-氨基酸组成。肽或多肽同样可以由通过本领域技术人员公知的自然过程(如翻译后成熟过程)或化学过程修饰的氨基酸组成。此类修改在文献中有充分详细的描述。这些修饰可以出现在多肽的任何地方:肽骨架中、氨基酸链中或甚至在羧基或氨基末端。肽或多肽可以在泛素化后分支或者是有或没有分支的环状。这种类型的修饰可以是本领域技术人员公知的天然或合成的翻译后过程的结果。例如,肽或多肽修饰可以包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、核苷酸或核苷酸衍生物的共价固定、脂质或脂质衍生物的共价固定、磷脂酰肌醇的共价固定、共价或非共价交联、环化、二硫键形成、去甲基化、糖基化(包括聚乙二醇化)、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解过程、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒酰化、硫酸化、氨基酸加成,如精氨酸化或泛素化。此类修饰在文献中有充分详细的描述且为本领域技术人员所熟知。

[0145] 如本文所用的,“细菌感染和病症”是指由细菌引起的感染和病症,特别是由选自 *Gardnerella vaginalis sensu stricto*、*Gardnerella leopoldii*、*Gardnerella piotii* 和 *Gardnerella swidsinskii* 和其他加德纳菌种的至少一种加德纳菌属菌株引起的感染和病症。细菌感染和病症包括但不限于细菌性阴道病 (BV)。

[0146] 如本文定义的,术语内容素抗特定细菌的“杀灭活性”表示由所述内容素的裂解活性引起的活细菌细胞数量的减少。内容素抗所述细菌的杀灭活性可以是完全的,意味着 100% 的细菌细胞被裂解,或是部分的,意味着至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99%,或至少约 99.9% 的细菌细胞被裂解。杀灭活性可以通过测量暴露于待测内容素后细菌细胞悬液在 610-620nm 处的光密度的降低和/或每毫升细菌细胞悬液菌落形成单位 (CFU) 的降低来确定。

[0147] 如本文定义的,术语内容素对特定细菌的细胞壁的“结合能力”是指所述内容素与所述细菌的细胞壁特异性地相互作用并粘附的能力。内容素对细菌的细胞壁的结合能力可以通过本领域已知的方法来测定。

[0148] 如本文所用的,“治疗 (treatment)”和“治疗 (treating)”等通常表示获得所需的药理和生理作用。就预防或部分预防疾病、其症状或病症而言,所述作用可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病、病症、病症或归因于疾病的不利影响而言,所述作用可以是治疗性的。本文使用的术语“治疗”涵盖哺乳动物,特别是人的疾病的任何治疗,并且包括:(a) 防止在可能易患该疾病但尚未被诊断患该疾病的受试者中发生该疾病;(b) 抑制疾病,即阻止其发展;或缓解疾病,即导致疾病和/或其症状或病症的消退,如损害的改善或补救。特别地,细菌感染的治疗包括预防、减少或甚至根除感染,例如通过杀死细菌并因此控制、减少或抑制细菌增殖以及减少活细菌细胞的数量。在本文中,优选疾病(例如 BV)就部分或完全治愈疾病或症状而言进行治疗。

[0149] 如本文所用的,术语“受试者”是指哺乳动物。例如,本发明考虑的哺乳动物包括人、灵长类、家养动物,如牛、羊、猪、马、实验室啮齿动物等。优选受试者是人。

[0150] 如本文所用的,术语“有效量”是指根据本发明的至少一种内容素、其组合物或药物制剂在所寻求的组织、系统、动物或人中引发生物学或医学反应的量。在一个实施方案中,有效量是用于缓解待治疗的疾病或病症的症状的“治疗有效量”。在另一个实施方案中,有效量是用于预防待预防的疾病或病症的症状的“预防有效量”。该术语在本文中还包括足以减少疾病进展,特别是减少或抑制病症或感染并由此引发所寻求的反应的活性多肽的量(即“抑制有效量”)。

[0151] 术语根据本发明的治疗的“功效”可以基于响应根据本发明的使用或方法的疾病过程中的变化来测量。预防传染病的功效最终通过人群的流行病学研究来评估,这通常与血清中中和抗体的滴度和多功能病原体特异性 T 细胞反应的诱导相关。临床前评估可以包括感染病原体攻击后对感染的抗性。传染病的治疗可以通过抑制病原体的生长或消除病原体(并且因此,没有检测到病原体)来衡量,这与病原体特异性抗体和/或 T 细胞免疫反应相关。

[0152] 术语“生物材料”是指从受试者身体获得的任何材料或样品。这包括,例如,全血、血清、血浆、尿液、痰、唾液、阴道拭子或脊髓液样本。

[0153] 术语“无生命材料或表面”包括溶液、介质、设备、物体、地板、桌子表面。

[0154] 术语“介质”包括水、空气或食物。

[0155] 术语“药物制剂”或“药物组合物”是指这样的制剂,其形式使得活性成分的生物活性明确有效,并且不包含对将施用所述制剂的受试者有毒的附加成分。

[0156] 术语“药学上可接受的”是指由不是在生物学上或其他方面不合需要的材料组成的载体。

[0157] 术语“载体”是指药物制剂中存在的除活性剂之外的任何组分,并且因此包括稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、填充剂、着色剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂等。

[0158] 术语“变体”是指相对于天然氨基酸序列包括非保守或优选保守的插入、缺失和/或取代的多肽。例如,多肽可以包含与天然氨基酸序列具有至少80%同一性、优选至少85%同一性、更优选至少90%同一性、甚至更优选至少95%同一性、甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,且最优选至少99.7%同一性的氨基酸序列。可以通过本领域公知的方法,使用合适的计算机程序,例如MatGAT 2.0(Myers and Miller,CABIOS (1989))确定同一性百分比。优选,同一性%是在待比较的序列的完整长度上鉴定的。将理解百分比同一性是相对于其序列已最佳比对的多肽计算的。氨基酸序列的片段和变体可以使用本领域公知的任何蛋白质工程、定向进化和/或定点诱变方法制备(例如,参见Molecular Cloning:aLaboratory Manual,第3版,Sambrook&Russell,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press)。本领域技术人员将理解,根据本发明的多肽,或片段、变体或其融合体,可以包含天然氨基酸序列的衍生物,或其片段或变体或由天然氨基酸序列的衍生物,或其片段或变体组成。一个或多个氨基酸的化学衍生物可以通过与官能侧基反应来实现。此类衍生分子包括例如其中游离氨基酸基团已衍生形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、羧基苯氧基、叔丁氧基羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。游离羧基可衍生形成盐、甲酯和乙酯或其他类型的酯和酰肼。游离羟基可衍生形成O-酰基或O-烷基衍生物。还包括作为化学衍生物的是含有二十种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物的那些肽。例如:4-羟脯氨酸可以代替脯氨酸;5-羟基赖氨酸可以代替赖氨酸;3-甲基组氨酸可以代替组氨酸;高丝氨酸可以代替丝氨酸和鸟氨酸代替赖氨酸。衍生物还包括含有一个或多个添加或缺失的肽,只要保持必要的活性即可。其他包括的修饰是酰胺化、氨基末端酰化(例如乙酰化或巯基乙酸酰胺化)、末端羧基酰胺化(例如用氨或甲胺)等末端修饰。本领域技术人员将进一步理解,肽模拟物化合物也可以是有用的。因此,通过“多肽”,我们包括呈现出内溶素活性的肽模拟物化合物。术语“肽模拟物”是指模拟作为治疗剂的特定多肽的构象和所需特征的化合物。

[0159] 根据本发明的内溶素

[0160] 本发明的内溶素具有抗加德纳菌株的抗菌活性。根据本发明的内溶素呈现抗菌活性的最佳pH包括约4至6,优选约5的pH。本发明的内溶素包括以下的或由以下的组成:

[0161] (i)N-末端催化结构域,或其功能性变体;

[0162] (ii)C-末端细胞壁结合区,或其功能性变体,其中C-末端细胞壁结合区包含至少一个细胞壁结合结构域或由至少一个细胞壁结合结构域组成;和

[0163] (iii)N-末端催化结构域和C-末端细胞壁结合区之间的接头区,

[0164] 并具有抗加德纳菌细胞的杀灭活性。

[0165] 在一些实施方案中,N-末端催化结构域来自第一天然内容素,接头区和C-末端细胞壁结合区来自第二天然内容素,且第一和第二天然内容素由来自不同原噬菌体的不同基因组编码。设想了本发明的内容素抗加德纳菌的杀灭活性是物种选择性的抗加德纳菌属的杀灭活性。

[0166] N-末端催化结构域是功能性多肽,其中所述功能包括裂解加德纳菌细胞壁的能力。N-末端催化结构域可以是N-乙酰胞壁酰胺酶、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶、L-丙酰-D-谷氨酸内肽酶、肽间桥内肽酶或N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶。优选,N-末端催化结构域是N-乙酰胞壁酰胺酶,最优选1,4- β -N-乙酰胞壁酰胺酶。例如,N-末端催化结构域可以是包含以下的或由以下的组成的多肽:SEQ ID NO:1至5、7或10至12任一个的氨基酸或其与SEQ ID NO:1至5、7或10至12任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选地具有至少99%同一性,甚至更优选地至少99.5%同一性,和最优选地至少99.7%同一性)的任何变体,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌细胞壁的能力。优选,N-末端催化结构域是包含SEQ ID NO:2或7的氨基酸或其与SEQ ID NO:2或7的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,和最优选至少99.7%同一性)的任何变体的多肽,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括裂解加德纳菌细胞壁的能力。

[0167] 根据本发明,C-末端细胞壁结合区是功能性多肽,其中所述功能包括结合加德纳菌细胞壁的能力。C-末端细胞壁结合区可以包含一个、两个、三个或更多个细胞壁结合结构域或由一个、两个、三个或更多个细胞壁结合结构域组成。例如,一个、两个、三个或更多个细胞结合结构域可以独立地选自分别包含以下的或由以下的组成的多肽:SEQ ID NO:15至24和26至33的氨基酸序列,及其分别与SEQ ID NO:15至24和26至33的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,和最优选至少99.7%同一性)的任何变体,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括结合加德纳菌细胞壁的能力。优选,一个、两个、三个或更多个细胞壁结合结构域独立地选自多肽,所述多肽包含以下的或由以下的组成:SEQ ID NO:19、20和28-33任一个的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:19、20和28-33任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,和最优选至少99.7%同一性)的任何变体,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括结合加德纳菌细胞壁的能力。更优选,一个、两个、三个或更多个细胞壁结合结构域独立地选自多肽,所述多肽包括SEQ ID NO:28-33任一个的氨基酸序列或与其与SEQ ID NO:28-33任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性(优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,和最优选至少99.7%同一性)的任何变体,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括结合加德纳菌细胞壁的能力。

性,和最优选至少99.7%同一性)的任何变体,由此所述多肽是功能性的,其中所述功能包括结合加德纳菌细胞壁的能力。

[0168] 最优选,C-末端细胞壁结合区包括第一细胞壁结合结构域和第二细胞壁结合结构域,其中所述第一细胞壁结合结构域选自SEQ ID NO:15、17、19、21、23、26、28、30和32,和所述第二细胞壁结合结构域选自SEQ ID NO:16、18、20、22、24、27、29、31和33。在优选实施方案中,所述第一细胞壁结合结构域在所述第二细胞壁结合结构域的N-末端。

[0169] 在本发明的一个方面中,接头区由具有6至18个氨基酸长度,优选9至15个氨基酸长度,甚至更优选12个氨基酸长度的多肽组成。优选,接头区由多肽组成,所述多肽包含以下的氨基酸序列或由以下的氨基酸序列组成:(i) $(XXX)_n$,其中每个X可以独立地是G、A或S,优选其中氨基酸序列 $(XXX)_n$ 是 $(GGS)_n$,其中n对应于序列XXX的重复数,优选其中n是2、3、4、5或6,或(ii) $X_1X_2GLNGX_3X_4NGGS$,其中 X_1 是N或K, X_2 是A或V, X_3 是Y或C和 X_4 是K或Q。包含接头的片段可以不存在。包含接头的片段也可以存在并且可以增强本发明多肽的细胞壁结合和/或裂解活性。

[0170] 本发明进一步提供了具有如上所述的抗加德纳菌的杀灭活性的内容素,用于治疗疾病或病症。所述待治疗的疾病或病症可以是细菌感染,优选细菌性阴道病。细菌性阴道病可以由*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*和/或*G.swidsinskii*,或加德纳菌属的其他种引起。

[0171] 本发明的内容素优选能够特异性结合和/或裂解加德纳菌的细胞,用于治疗加德纳菌感染(如BV)的方法中。

[0172] 如上所述,充分确认了许多噬菌体内内容素由两个不同的结构域组成(例如,参见,Sheehan等,1996,FEMS Microbiology Letters 140:23-28)。一个是负责细胞壁降解的催化结构域并且已知这些以几种形式存在。另一个结构域是识别细胞表面基序并允许内容素附着于靶细胞的细胞壁结合结构域。后者涉及的精确模式识别提供了特异性。酶促结构域可以通过其与具有相同类型裂解活性的裂解酶的其他相似区域的氨基酸同源性来鉴定。在本发明人新发现的天然加德纳菌原噬菌体内内容素的情况下,已经确定结构域排列由196个残基的N-末端结构域、随后是12个残基的接头区和分别为49个残基的两个重复结构域组成,除了EL6和EL9,其中只有一个43个残基的不完整结构域。这些新发现的内容素的天然氨基酸序列总结在表7中。本发明人确定N-末端结构域是催化结构域,因为它与糖苷水解酶家族25具有同源性,并且两个重复结构域是两个细胞壁结合域,因为它们与溶菌酶Cp1-7的C-末端结构域具有同源性(参见实施例2和图3)。

[0173] 在一些实施方案中,包含酶促结构域的片段是未修饰的,即,对应于天然氨基酸序列。在可替换的实施方案中,包含酶促结构域的片段可以包含改变,如氨基酸的置换、缺失、插入或其改变的任意组合。在一些实施方案中,包含酶促结构域的片段是与SEQ ID NO:1至5、7或10至12任一个的氨基酸序列具有至少80%,优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,甚至更优选至少99.7%同一性和最优选100%同一性的变体片段。

[0174] 在一些实施方案中,包含细胞壁结合结构域的片段是未修饰的,即,对应于天然氨基酸序列。在可替换的实施方案中,包含酶促结构域的片段可以包含改变,如氨基酸的置

换、缺失、插入或其改变的任意组合。在一些实施方案中,包含细胞壁结合结构域的片段是与SEQ ID NO:15至24和26至33任一个的氨基酸序列具有至少80%,优选至少85%同一性,更优选至少90%同一性,甚至更优选至少95%同一性,甚至更优选至少96%同一性,甚至更优选至少97%同一性,甚至更优选至少98%同一性,甚至更优选至少99%同一性,甚至更优选至少99.5%同一性,甚至更优选至少99.7%同一性和最优选100%同一性的变体片段。

[0175] 在本发明的再一个方面中,内容素包含多肽的融合体,或其片段、变体或衍生物或由多肽的融合体,或其片段、变体或衍生物组成。例如,多肽可以包含一个或多个其他氨基酸,在根据本发明的内容素的氨基酸序列,或其片段、变体或衍生物的内部插入和/或在其N-和/或C-末端。

[0176] 因此,如上所述,在一个实施方案中,本发明的第一个方面的内容素包含由一个或多个细胞壁结合结构域组成的片段,所述细胞壁结合结构域分别包含SEQ ID NO:15至24和26至33任一个的氨基酸序列(或这样的结构域序列保留其细胞壁结合活性的变体)或由SEQ ID NO:15至24和26至33任一个的氨基酸序列(或这样的结构域序列保留其细胞壁结合活性的变体)组成,来自不同来源的酶促结构域与其融合。其他合适的酶促结构域的示例包括但不限于L-丙氨酰-D-谷氨酸内肽酶、D-谷氨酰-m-DAP内肽酶、肽间桥特异性内肽酶、V-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(胞壁酰水解酶)、N-乙酰- β -D-胞壁酸酶(溶菌酶)或裂解转糖基酶。此外,也可以利用来自其他来源的N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶。

[0177] 在本发明的一个方面中,内容素可以与多肽或蛋白质融合,以促进所述内容素的纯化。这样的融合体的示例是本领域技术人员公知的。相似地,内容素可以与寡聚组氨酸标签(如His6)或由抗体识别的表位(如公知的Myc标签表位)融合。与根据本发明的内容素的任何片段变体或衍生物的融合体也包括在本发明的范围中。将认识到优选保留所需特性(即内容素活性)的融合体(或其变体或衍生物)。如果融合体是适用于本文所述方法中的融合体,也是特别优选的。例如,融合体可以包含再一个部分,其给予本发明的内容素所需的特征;例如,所述部分可以在检测或分离内容素、促进内容素的细胞吸收或指引蛋白质从细胞分泌中是有用的。如本领域技术人员公知的,该部分可以是例如生物素部分、放射性部分、荧光部分,例如,小的荧光团或绿色荧光蛋白(GFP)荧光团。该部分可以是免疫原性标签,例如,Myc标签,如本领域技术人员已知的,或可以是能够促进内容素的细胞吸收的亲油性分子或多肽结构域,如本领域技术人员已知的。

[0178] 本发明的内容素的必需特征是裂解加德纳菌属的细胞的能力。优选,内容素能够裂解加德纳菌的多个株的细胞。最优选,内容素能够裂解加德纳菌属的所有株,包括*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*和*G.swidsinskii*(Vanechoutte等, 2019Int.J.Syst.Evol.Biol.898661)。在一个实施方案中,本发明的内容素基本上或完全不能裂解是健康阴道微生物群的共生成员(并且已知没有引起对宿主的不良影响)的细菌。例如,如果内容素不理解乳杆菌属的细胞,是有利的。最优选,本发明的内容素基本上或完全不能裂解卷曲乳杆菌(*L.crispatus*)、加氏乳杆菌(*L.gasseri*)和詹氏乳杆菌(*L.jensenii*)的细胞。任选,本发明的内容素不裂解惰性乳杆菌(*L.iners*)的细胞。有利地,内容素能够选择性地裂解致病细菌的细胞,即,比非致病细菌的细胞程度更高。

[0179] 根据本发明的内容素对特定微生物的杀灭活性可以通过本领域的标准程序来测定,包括基于抗微生物剂的最小抑制浓度(MIC)测定的那些,最小抑制浓度定义为过夜孵育

后抑制微生物可见生长的所述抗微生物剂的最低浓度,如Andrews,2001,J Antimicrobial Chemotherapy,48,Suppl.SI,5-16或Clinical and Laboratory Standards Institute出版的“Document M7-A7,Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically;Approved standards,第7版,2006年1月,vol.26, No.2”中所述的。另一种合适的用于测定根据本发明的内容素的杀灭活性的方法描述于本申请的实施例部分中,并且包括测定在610-620nm处测量的细菌悬液的光密度的降低,所述细菌的易感性将在根据本发明的纯化的内容素存在下进行的体外浊度测定中进行测试。根据另一个实施方案,在如本文所述的体外浊度测试中,根据本发明的内容素将至少一种加德纳菌株的悬液的OD (610-620nm)降低超过20%,超过30%、超过40%、超过50%、超过60%、超过70%、超过80%、超过90%或超过95%。

[0180] 用于生产根据本发明使用的内容素或其片段、变体、融合体或衍生物的方法是本领域公知的。方便地,内容素或其片段、变体、融合体或衍生物是或包含重组内容素。根据本发明的内容素可以通过基因工程的标准技术产生,包括使用包含编码如本文所述的内容素的多核苷酸的重组载体。可以使用多种表达系统,包括细菌质粒和衍生的载体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件、病毒(如杆状病毒、乳头状瘤病毒(如SV40)、痘苗病毒、腺病毒、狐狸痘病毒、伪狂犬病病毒、逆转录病毒)、粘粒或噬菌粒衍生物。可以通过本领域技术人员公知的方法将核苷酸序列插入到重组表达载体中,例如在MOLECULAR CLONING: ALABORATORY MANUAL, Sambrook等,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y., 2001中所述的那些。重组载体可以包括控制编码内容素的多核苷酸的调控、表达、转录和/或翻译的核苷酸序列,这些序列根据所用的宿主细胞来选择。重组载体可以进一步包括如编码His标签那些的核苷酸序列,用于促进纯化步骤。随后,可以根据本领域技术人员公知的方法将这样的重组载体引入宿主细胞中,如BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis等,第2版,McGraw-Hill Professional Publishing, 1995和MOLECULAR CLONING: ALABORATORY MANUAL, 上文中描述的那些,如通过磷酸钙转染、通过DEAE葡聚糖转染、转染、微注射、通过阳离子脂质转染、电穿孔、转导或感染。宿主细胞可以是例如细菌细胞,如大肠杆菌,真菌细胞,如酵母细胞或曲霉菌的细胞、链霉菌、昆虫细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、C127小鼠细胞系、叙利亚仓鼠细胞的BHK细胞系、人胚肾293 (HEK 293) 细胞。优选,宿主细胞是大肠杆菌。然后在适当的条件下培养所述宿主细胞,以产生本文所述的内容素,其可以进一步从培养基或从宿主细胞裂解物通过任何标准纯化方法来纯化,所述方法包括固定化金属亲和色谱(IMAC) (Block等,2008,Protein Expr.Purif.27, 244-254)。

[0181] 根据本发明的组合物

[0182] 在本发明的再一个方面中,提供了在特定药物组合物中包含根据本发明的第一个方面的内容素、根据本发明的第二个方面的核酸、根据本发明的第三个方面的载体/质粒、根据本发明的第四个方面的宿主细胞或能够表达根据本发明的第一个方面的内容素的噬菌体的抗菌组合物。

[0183] 如本文使用的,“药物组合物”表示用于本发明方法中的治疗有效的制剂。如本文使用的,“治疗有效量”,或“有效量”或“治疗有效的”是指对于给定病症和给药方案提供治疗效果的含量。这是与所需的添加剂和稀释剂(即载体或给药载体)结合计算以产生所需治

疗效果的预定量的活性材料。此外,其意指足以减少且最优选防止宿主的活性、功能和反应的临床显著缺陷的量。或者,治疗有效量足以引起宿主临床上显著的状况改善。正如本领域技术人员所理解的,化合物的量可以根据其比活性而变化。合适的剂量可以包含预定量的活性组合物,该活性组合物经计算以产生与所需稀释剂相关的所需治疗效果。在用于制造本发明组合物的方法和用途中,提供了治疗有效量的活性成分。治疗有效量可根据患者特征,如本领域技术人员公知的,如年龄、体重、性别、状况、并发症、其他疾病等,由普通技术人员或兽医学工作者来确定。在本发明的一个实施方案中,药物组合物包含根据本发明第一个方面的内容素。因此,药物制剂可包含一定量的内容素或其片段、变体、融合体或衍生物,足以至少部分抑制加德纳菌属细胞在感染或易感染所述细胞的患者中的生长。优选,药物制剂包含足以杀死患者体内加德纳菌属细胞的量的内容素或其片段、变体、融合体或衍生物。本领域技术人员将理解,本发明的内容素通常与根据预期给药途径和标准药学实践选择的合适的药物赋形剂、稀释剂或载体混合给药(例如,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995年,编辑Alfonso Gennaro,Mack Publishing Company,Pennsylvania,USA)。例如,内容素可以局部给药,即,局部给药于女性受试者的阴道中,和/或男性受试者龟头、包皮或尿道入口之中或之上。本文中的术语“(给药)于龟头之中或之上”还包括“(给药于)龟头之中和之上”。与这致,术语“(给药)于男性受试者的龟头、包皮或尿道入口之中或之上”还包括“(给药于)男性受试者的龟头之中和之上和包皮之上和尿道入口之上”。在另一个实施方案中,内容素可以与调节阴道pH的化合物或组合物共同给药。在一些实施方案中,化合物或组合物将阴道的pH调节至pH 4.0至6.0,优选至pH 5.0。

[0184] 在本发明的可替换实施方案中,药物组合物不包含内容素自身,而是替代地包含能够表达所述内容素的核酸分子。合适的核酸分子、表达载体和宿主细胞在上文已详述。例如,可以使用重组益生菌(LAB株,例如,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)或乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.))。在本发明的再一个实施方案中,药物组合物包含能够表达根据本发明的第一个方面的内容素的噬菌体。用于进行此类基于噬菌体的治疗的方法是本领域公知的(例如,参见,Watanabe等,2007,Antimicrobial Agents&Chemotherapy51:446-452)。因此,对于本文所述的细菌感染的治疗,可以作为同源蛋白质,作为表达同源蛋白质的核酸构建体、载体或宿主细胞,作为表达同源蛋白质的活生物体(包括噬菌体)的一部分,或通过本领域已知的任何其他方便的方法,来给药本发明的内容素,以实现内容素与其细菌靶标的接触,所述靶标不管是致病性细菌,如阴道加德纳菌,或是另一种病原体或潜在的病原体,如本文进一步描述的。

[0185] 本发明的组合物可以含有一种或多种内容素多肽。在这个实施方案中,内容素多肽可以作为独立的多肽存在或作为包含所述内容素多肽或其片段的融合蛋白存在。

[0186] 本发明的药物组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的其他成分,如明矾、稳定剂、抗微生物剂、缓冲剂、着色剂、调味剂、佐剂等。优选,本发明的药物组合物不包含咪唑。

[0187] 本发明的内容素与常规使用的佐剂、载体、稀释剂或赋形剂一起可以制成药物组合物及其单位剂量的形式,并且可以以固体形式使用,如片剂或填充胶囊,或液体,如溶液、悬液、气雾剂、乳液、酏剂或装有它们的胶囊,均用于口服,或以无菌注射溶液的形式供肠胃

外(包括皮下)使用。此类药物组合物及其单位剂型可包含常规比例的成分,具有或不具有额外的活性化合物或成分,且此类单位剂型可包含与待使用的预期日剂量范围相称的任何合适有效量的活性成分。本发明的组合物也可以是液体制剂,包括但不限于水性或油性悬液、溶液、乳液、糖浆和酏剂。组合物也可配制成干燥产品,用于在使用前用水或其他合适的赋形剂重新配制。此类液体制剂可包含添加剂,包括但不限于悬浮剂、乳化剂、非水性载体和防腐剂。悬浮剂包括但不限于山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶和氢化食用脂肪。乳化剂包括但不限于卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯和阿拉伯胶。非水性载体包括但不限于食用油、杏仁油、分馏椰子油、油性酯、丙二醇和乙醇。防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸甲酯或丙酯和山梨酸。其他材料以及加工技术等列于Remington's "The Science and Practice of Pharmacy",第22版,2012, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins的第5部分的部分5中。

[0188] 本发明的固体组合物可以是以常规方式配置的片剂或锭剂的形式。片剂可以根据本领域公知的方法来包衣。注射组合物通常是基于注射无菌盐水或磷酸盐缓冲盐水或本领域已知的其他可注射载体。

[0189] 本发明的组合物还可以配制成栓剂,其可以含有栓剂基料,包括但不限于可可脂或甘油酯。本发明的组合物还可以配制成包含水性或非水性载体的经皮制剂,包括但不限于霜剂、膏剂、洗剂、糊剂、药膏、贴剂或膜剂。

[0190] 本发明的组合物还可以配制成用于胃肠外给药,包括但不限于,通过注射或连续输注给药。用于注射的制剂可以是油性或水载体中的悬液、溶液或乳液形式,并且可以含有配制剂,包括但不限于,悬浮剂、稳定剂和分散剂。组合物还可以以粉末形式提供,用于用合适的载体重建,所述载体包括但不限于无菌、无热原水。

[0191] 本发明的组合物还可以配制成长效(depot)制剂,其可以通过植入或通过肌肉注射来给药。组合物可以用合适的聚合的或疏水的材料(例如,作为可接受的油中的乳液)、离子交换树脂,或作为难溶性衍生物(例如,作为难溶性盐)来配制。

[0192] 本发明的化合物也可以以持续释放形式或从持续释放药物系统来给药。代表性的持续释放材料的描述也可以在Remington的"The Science and Practice of Pharmacy"中找到。

[0193] 给药方法

[0194] 本发明的组合物优选局部给药于女性受试者的阴道中和/或男性受试者的龟头、包皮或尿道入口之中或之上。然而,这些组合物也可以以任何方式来给药,包括静脉内注射、动脉内、腹膜内注射、皮下注射、肌肉内、鞘内、口服途径(包括舌下或经由颊给药)、局部、皮肤施用、手术期间直接组织灌注或其组合。

[0195] 在优选实施方案中,如本文所述的本发明的内容素、多核苷酸或药物组合物局部给药。在进一步优选的实施方案中,将本文所述的本发明的内容素、多核苷酸或药物组合物给药于女性受试者的阴道中和/或男性受试者的龟头、包皮或尿道入口之中或之上。在进一步优选的实施方案中,将本文所述的本发明的内容素、多核苷酸或药物组合物局部给药于受试者的阴道中。

[0196] 作为单剂或多剂给药于个体的剂量将根据各种因素而改变,包括药代动力学特

性、患者状况和特征(性别、年龄、体重、健康、体型)、症状程度、同时治疗、治疗频率和所需效果。

[0197] 根据一个方面,本发明的组合物可以在性关系之前以预防方式给药于患者。

[0198] 联合

[0199] 根据本发明,内容素可以单独给药或联合在预防和/或治疗加德纳菌感染或病症中有用的共同药剂联合给药,所述感染或疾病包括由*Gardnerella vaginalis sensu stricto*、*Gardnerella leopoldii*、*Gardnerella piovani*、*Gardnerella swidsinskii*和/或加德纳菌属的其他种引起的那些。

[0200] 根据本发明的内容素可以联合以下的来给药:

[0201] (a) 一种或多种常规抗生素治疗。这样的抗生素可以包括克林霉素、甲硝唑或任何其他合适的本领域技术人员已知的抗生素;

[0202] (b) 一种或多种其他内容素,或能够表达所述内容素的核酸分子、载体、宿主细胞或噬菌体;

[0203] (c) 调剂阴道pH的化合物或组合物。在一些实施方案中,化合物或组合物将阴道pH调节至pH4.0至6.0,优选至pH5.0。合适的pH调节化合物可以包括磷酸盐、乳酸(例如,乳杆菌(*Lactobacilli*)分泌的天然酸化物质以建立酸性环境)或其他有机酸,例如,羧基取代的聚合物;

[0204] (d) 中和阴道内的加德纳菌细胞的细菌裂解时释放的毒素的治疗。合适的中和治疗可以包括抗体(参见,Babcock等,2006, *Infect. Immun.*

[0205] 74:6339-6347) 和毒素吸收剂,如tolevamer(参见,Barker等,2006, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24:1525-1534);

[0206] (e) 益生菌。

[0207] 根据本发明的用途和方法

[0208] 本发明的再一个方面提供了根据本发明的内容素、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的宿主细胞、根据本发明的能够表达内容素的噬菌体或根据本发明的药物组合物用于药物中。因此,本发明的内容素可以用于通过手术或疗法治疗人或动物体的方法中和/或用于在人或动物体上实施的诊断方法中。特别地,本发明提供了根据本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物,用于治疗疾病或病症的方法中。

[0209] 本发明的再一个方面提供了本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或根据本发明的药物组合物,用作药物。

[0210] 本发明的再一个方面提供了本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物在制备用于杀灭和/或抑制/防止患者中的微生物细胞生长的药物中的用途,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素的裂解易感的细菌细胞。特别地,本发明提供了本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物在制造用于治疗细菌感染和病症的药物中的用途。

[0211] 本发明的再一个方面提供了本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质

粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物用于杀灭和/或抑制/防止患者中的微生物细胞生长,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素的裂解易感的细菌细胞。

[0212] 本发明的再一个方面提供了用于杀灭和/或抑制/防止患者中的微生物细胞生长的方法,所述方法包括将本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物给药于患者,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂解易感的细菌细胞。

[0213] 本发明的再一个方面提供了本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物在制备用于治疗或预防与患者中的微生物细胞相关的疾病或病症的药物中的用途,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂解易感的细菌细胞。

[0214] 本发明的再一个方面提供了本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物用于治疗或预防与患者中的微生物细胞相关的疾病或病症,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用本发明的内容素裂解易感的细菌细胞。

[0215] 本发明的再一个方面提供了用于治疗或预防需要此类治疗的患者中与微生物细胞相关的疾病或病症的方法,该方法包括将本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物给药于患者,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用本发明的内容素裂解易感的细菌细胞。

[0216] “患者中与微生物细胞相关的疾病或病症”包括患者感染加德纳菌引起或对抗的疾病或病症。所述疾病和病症包括BV。

[0217] “治疗”包括受试者(或患者)的治疗性和预防性治疗。在一个实施方案中,本发明的内容素、本发明的核酸、本发明的载体/质粒、本发明的宿主细胞、能够表达本发明的内容素的噬菌体或本发明的药物组合物、本发明的用途和方法用于治疗现有的疾病或病症。替换地或另外地,本发明的用途和方法可以用于预防。术语“预防性的”或“预防”用于包括本文所述的内容素或组合物防止或减少患者或受试者中加德纳菌感染的可能性的用途。预防可以是初级预防(即,防止疾病发展)或二级预防(其中疾病已经发展并且保护患者以对抗这个过程的恶化)。优选本文提供的方式和方法用于治疗现有的疾病或病症,特别是用于治疗现有的BV。

[0218] 如上所述,术语“有效量”在本文中用于描述根据本发明的内容素可以用于在治疗的疾病或病症中产生有利变化的浓度或含量,不管所述变化是缓解、有利的生理结果、治疗的病况或病症的逆转或减轻、正在发生的病症或病况的可能性的预防或减少,这取决于治疗的疾病或病症。在一个实施方案中,根据本发明第一个方面的内容素、根据本发明第二个方面的核酸、根据本发明第三个方面的载体/质粒、根据本发明第四个方面的宿主细胞、能够表达根据本发明第一个方面的内容素的噬菌体或根据本发明第六个方面的药物组合物以单剂来给药。或者,内容素、核酸、载体/质粒、宿主细胞、噬菌体或药物组合物作为多剂来给药(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多剂)。内容素、核酸、载体/质粒、宿主细胞、噬菌体或药物组合物优选以

足以维持根据本发明第一个方面的内容素在受试者阴道中持续存在的频率来给药。优选,剂量和给药频率足以防止受试者中与微生物细胞(例如,加德纳菌)相关的疾病或病症的出现或复发。优选,剂量和给药频率足以防止受试者中与微生物细胞(例如,加德纳菌)相关的生长阻抗的出现或复发。

[0219] 在一个实施方案中,本发明的用途和方法、宿主细胞或包含宿主细胞的药物组合物用于递送本发明第一个方面的内容素(优选宿主细胞)。

[0220] 将认识到本文描述的药物可以联合一种或多种其他治疗剂给药于受试者。例如,本文描述的药物可以联合以下的给药于受试者:

[0221] (a) 一种或多种常规的抗生素治疗。这样的抗生素可以包括克林霉素、甲硝唑或任何其他合适的本领域技术人员已知的抗生素;

[0222] (b) 一种或多种其他内容素,或能够表达所述内容素的核酸分子、载体、宿主细胞或噬菌体;

[0223] (c) 调剂阴道pH的化合物或组合物,优选调节至pH4.0至6.0,更优选至约pH5.0。此类pH调节化合物可以包括磷酸盐、乳酸(例如,乳杆菌(*Lactobacilli*)分泌的天然酸化物质以建立酸性环境)或其他有机酸,例如,羧基取代的聚合物;

[0224] (d) 中和阴道内的加德纳菌细胞的细菌裂解时释放的毒素的治疗。合适的中和治疗可以包括抗体(参见,Babcock等,2006, *Infect. Immun.*

[0225] 74:6339-6347)和毒素吸收剂,如tolevamer(参见,Barker等,2006, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24:1525-1534);

[0226] (e) 益生菌。

[0227] 本发明的再一个方面提供了具有抗加德纳菌的细胞裂解活性的内容素或能够表达其的核酸分子、载体/质粒、宿主细胞或噬菌体用于在体外和/或离体杀灭和/或抑制/防止微生物细胞生长的用途,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用本发明的内容素裂解易感的细菌细胞。例如,具有所述活性的内容素可以用于清洁表面,如医院、厨房等中的那些,其可能对此类细胞细菌的污染是易感的。优选,微生物细胞包含*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*、*G.swidsinskii*或加德纳菌属的其他种的细胞或由*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*、*G.swidsinskii*或加德纳菌属的其他种的细胞组成。

[0228] 本发明的再一个方面提供了试剂盒。所述试剂盒包含本文所述的内容素和使用说明,特别是用于治疗疾病或病症,优选BV。所述试剂盒可以用于治疗性或预防性目的并且可以进一步包含将阴道的pH调节至4.0-6.0,优选至4.5-5.5,更优选至约5的化合物或组合物。然而,本发明的试剂盒还可以用于检测样品中微生物细胞的存在,该试剂盒包含具有根据本发明的内容素的细胞裂解活性和/或细胞结合特异性的多肽或能够表达其的核酸分子、载体/质粒、宿主细胞或噬菌体,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂解易感的细菌细胞。

[0229] 本发明的相关方面提供了:

[0230] (a) 具有根据本发明的内容素的细胞壁结合活性和/或细胞裂解活性的多肽或能够表达其的核酸分子、载体/质粒、宿主细胞或噬菌体在制备用于与微生物细胞相关的疾病或病症的诊断剂中的用途,所述微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂

解易感的细菌细胞;

[0231] (b) 具有根据本发明的内容素的细胞壁结合活性和/或细胞裂解活性的多肽或能够表达其的核酸分子、载体/质粒、宿主细胞或噬菌体用于诊断与微生物细胞相关的疾病或病症,所述微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂解易感的细菌细胞;

[0232] (c) 具有根据本发明的内容素的细胞壁结合活性和/或细胞裂解活性的多肽或能够表达其的核酸分子、载体/质粒、宿主细胞或噬菌体用于在体外和/或离体检测样品中存在微生物细胞的用途,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂解易感的细菌细胞;和

[0233] (d) 用于诊断可以用根据本发明的内容素治疗的疾病或病症的体外方法,该方法包括步骤:(i) 将获自受试者的样品接触多肽,所述多肽包含以下的或由以下的组成:根据本发明的内容素的C-末端细胞壁结合区和任选的根据本发明的内容素的N-末端催化结构域,其中样品包含微生物细胞,和其中所述内容素的C-末端细胞壁结合区任选是被标记的;(ii) 测试多肽是否结合和/或裂解样品的微生物细胞;和(iii) 如果多肽结合和/或裂解微生物细胞,则确定疾病或病症可以用根据本发明的内容素治疗。微生物细胞可以是加德纳菌细胞,优选*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*、*G.swidsinskii*或加德纳菌属的其他种的细胞。因此,本发明提供了用于诊断受试者中可以用本发明的内容素治疗的疾病或病症的体外方法,该方法包括获自受试者的细胞样品接触具有根据本发明的内容素的细胞壁结合活性和/或细胞裂解活性的多肽,或表达其的核酸分子、载体/质粒、宿主细胞或原噬菌体,并测定样品中的细胞是否由此已经被裂解,其中微生物细胞选自加德纳菌细胞和其他对使用所述内容素裂解易感的细菌细胞。优选,微生物细胞包括以下的或由以下的组成:*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*、*G.swidsinskii*或加德纳菌属的其他种的细胞。在这样的诊断用途和方法中,可以使用本领域公知的方法来检测细胞的裂解。例如,可以作为细胞裂解的指示剂来测量ATP水平。

[0234] 在以上定义的本发明的用途和方法的可替换实施方案中,多肽包括根据本发明的内容素的细胞壁结合结构域或由根据本发明的内容素的细胞壁结合结构域组成。为了允许检测,这样的多肽可以与磁珠融合或作为包含合适的报告子或标记(例如,绿色荧光蛋白或颜色形成酶,如HRP)的融合蛋白来使用。这样的诊断方法对于来自其他系统的内容素是充分确立的,如李斯特菌(*Listeria*)内容素(例如,参见,Loessner等,2002,*Mol Microbiol* 44,335-49;Kretzer et al,2007,*Applied Environ.Microbiol.* 73:1992-2000)。

[0235] 参照以下附图,在以下非限制性实施例中描述本发明的说明性实施方案。

实施例

[0236] 实施例1-加德纳菌基因组中的天然内容素的鉴定

[0237] 内容素是噬菌体产生的水解酶,以在裂解周期的最后阶段裂解宿主的细胞壁。它们能够靶向细菌细胞壁的主要成分肽聚糖(胞壁质)中的五个键中的一个,这允许从裂解的细胞中释放子代病毒粒子。迄今为止,尚未分离出抗加德纳菌裂解性的噬菌体。因此,是否可以成功鉴定来自噬菌体来源并具有抗加德纳菌的裂解活性的内容素也是未知的。本发明人研究了是否可以在各种加德纳菌基因组上鉴定由原噬菌体序列编码的内容素。原噬菌体是插入并整合到环状细菌DNA染色体中或作为染色体外质粒存在的噬菌体基因组。这是一

种潜伏形式的噬菌体,其中病毒基因存在于细菌中而不会破坏细菌细胞。细菌基因组和质粒内的原噬菌体序列的鉴定可以使用本领域技术人员已知的基于网络的工具来进行。例如,此类工具包括但不限于PHASTER (Arndt等,2016Nucleic Acids Res.44,W16-W21.)、PROPHINDER (Lima-Mendez等,2008Bioinformatics 24,863-865)等。发明人成功地鉴定了预测构成完整或部分原噬菌体的14个加德纳菌基因组上的序列。这些序列是通过识别基因簇预测为病毒来源的DNA区来发现的。还包括预测为仅部分原噬菌体而不是完全原噬菌体的病毒基因簇。

[0238] 然后,推定的原噬菌体序列通过blast预测的编码序列进行注释,以识别推定的内容素。具体而言,搜索了与能够切割构建肽聚糖的任何关键化学键的酶同源的蛋白质序列。特别地,搜索了与N-乙酰胞壁酰胺酶、N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸酰胺酶、L-丙氨酰-D-谷氨酸内肽酶、肽间桥内肽酶或N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶同源的蛋白质序列。在分析的每个单独的原噬菌体或部分原噬菌体上,发明人发现了与1,4- β -N-乙酰胞壁酰胺酶同源的蛋白质的编码序列,并将它们命名为EL1至EL14。源基因组的名称分配如表1所示。

[0239] [表1]

[0240]

推定的内容素的名称	从其鉴定出推定内容素的菌株名称
EL 1	株HMP9231
EL 2	株Gv18-4
EL 3	株Gv18-4
EL 4	株Gv5-1
EL 5	株JCP7276
EL 6	株1400E
EL 7	株AMD
EL 8	株JCP7719
EL 9	株0288E
EL 10	株G30-4
EL 11	株JCP8017A
EL 12	株3549624
EL13	株Gv37_1
EL 14	株Gv37_2

[0241] 在每种情况下,每个原噬菌体仅发现一个拷贝,并且没有发现预测为能够裂解细菌细胞壁的酶的其他编码序列。将推定的1,4- β -N-乙酰胞壁酸酶比对以了解同源性和结构域结构(参见图1)。从图1中可以看出,即使来自不同基因组上的不同原噬菌体,大多数细胞内容素也恰好具有306个残基。两个例外是EL6和EL9。EL6在C-末端被移码截断。EL9在与EL6完全相同的位置结束,但在这种情况下,整个重叠群都结束了。内容素之间没有完全相同的对,即使它们高度同源,如图2所示。

[0242] 实施例2-天然加德纳菌原噬菌体内内容素的结构域结构的测定

[0243] 用InterPro(Mitchell等,2019Nucleic Acids Res.47,D351-D360)测定了新发现的内容素的结构域结构。简而言之,InterPro是一个蛋白质家族、结构域和功能位点的数据库,其中已知蛋白质中发现的可识别特征可以应用于新的蛋白质序列,以便对其进行功能

表征。InterPro的内容由显著匹配的诊断特征和蛋白质组成。特征由模型组成,例如简单类型,如正则表达式或更复杂的类型,如描述蛋白质家族、结构域或位点的Hidden Markov模型。从图3中可以看出,所有具有306个残基的内溶素都具有相同的结构域排列。196个残基的N-末端结构域被鉴定为催化结构域,因为它与糖苷水解酶家族25具有同源性。所述催化结构域后面是接头区和两个与溶菌酶C-末端结构域Cp1-7(也称为CW_7结构域(García等, 1990Gene 86,81-88;Lopez和García,2004FEMS Microbiol.Rev.28,553-580;Bustamante等,2010J.Biol.Chem.285,33184-33196,2012PLoS One 7,e46654))同源的细胞结合结构域。在以下实施例中,以上鉴定的催化结构域代表“N-末端催化结构域”或“H-结构域”,其中例如“H2”是指天然EL2的H-结构域。在以下实施例中,“接头区”和“C-末端细胞壁结合区”,后者包含一个或多个细胞壁结合域或“B-结构域”或由一个或多个细胞壁结合域或“B-结构域”组成,一起代表“B-区”,其中,例如,B10是指天然EL10的B-区。同样,B11_N是指天然EL11的N-末端细胞壁结合域,B12_C是指天然EL12的C-末端细胞壁结合域,依此类推。

[0244] 实施例3-天然加德纳菌原噬菌体内溶素对加德纳菌细胞的酶活性的测定

[0245] 发明人研究了新发现的内溶素抗加德纳菌的酶活性。在计算机上是无法预测与1,4- β -N-乙酰胞壁酸酶同源的已识别序列是否有活性的。正如本领域公知的,细菌可以突变它们的原噬菌体序列,且相应的原噬菌体可能因此失去它们的繁殖活性。此外,即使新发现的噬菌体编码的肽聚糖水解酶确实是活性蛋白质,仍然没有证明所述蛋白质能够酶促降解加德纳菌的特定肽聚糖层。事实上,加德纳菌的特殊之处在于它是革兰氏可变种:它不形成定义真正革兰氏阴性种的外膜。它的细胞壁通常很薄,且肽聚糖含量只有10%或更少。因此,本领域技术人员会认为肽聚糖降解酶,如内溶素蛋白,不能有效地裂解加德纳菌的细菌细胞壁。

[0246] 用His-标签克隆了14个识别的内溶素EL1至EL14,在大肠杆菌中表达并使用参照实施例1中所述的方法通过单步Ni-NTA柱纯化。内溶素名称对源基因组的分配如表1中所示。使用的加德纳菌株显示于表2中。

[0247] [表2]

[0248]	名称	加德纳菌株(新命名按照(Vaneechoutte等,2019))
	Gv_1	UGent 09.07,G.vaginalis sensu stricto的株
	Gv_8	UGent 25.49,G.vaginalis sensu stricto的株
	Gv_9	ATCC 14018,G.vaginalis sensu stricto的模式株
	Gv_10	UGent 06.41,G.leopoldii的模式株
	Gv_11	UGent 09.48,G.leopoldii的模式株
	Gv_17	UGent 18.01,G.piotii的模式株
	Gv_23	GS10234(FC2),G.swidsinskii的模式株

[0249] 为了测试纯化的内溶素的活性,基本上使用参照实施例2中描述的方法在610-620nm处测量加德纳菌悬液(见表2)的浊度变化,其中将以所示pH值的95ul Hardy Broth中的细菌悬液在室温下在有氧条件下与5ul内溶素溶液在光度比色杯中混合。在浊度降低测定中,可在分光光度计中使用活细胞悬液的光散射降低(即浊度降低)来测定肽聚糖水解酶的活性。光密度随时间(分钟)的降低可用于计算水解速率。将结果与进行了相同的处理并进行了相同的时间段的“不添加酶,仅缓冲液”的对照制剂比较。以这种方式,可以将酶制剂

的比活性报告为 $\Delta OD/\text{时间}/\mu\text{l}$ 溶素蛋白。从图4A到4C可以看出,内容素处理组的浊度下降比缓冲液更显著,表明了酶活性。令人惊讶的是,发明人因此发现新发现的内容素EL1、EL2、EL3、EL4、EL5、EL7、EL10、EL11和EL12是具有裂解加德纳菌细胞壁能力的活性蛋白质。如上所述,由于细胞壁中肽聚糖的含量低,肽聚糖降解酶(如识别的内容素)可以有效裂解细菌细胞壁的事实是一个预料不到和令人惊讶的发现。

[0250] 实施例4-具有人工结构域交换的内容素的最活跃的结构域的识别

[0251] 发明人随后评估了不同的N-末端酶促结构域是否可以具有不同的裂解活性以及B区(包括接头和细胞壁结合结构域)是否可以介导对不同菌株的特异性。为此,人工生成了结构域交换的内容素。

[0252] 4.1-内容素构建体

[0253] 为了人工生成结构域交换的内容素,将包含催化结构域的第一个天然胞内容素的N-末端196个残基作为一个块进行交换,相对于第二个天然胞内容素的包含接头区和两个细胞壁结合结构域的110个残基的完整C-末端区。通过执行以下方法制备结构域交换的蛋白质。原始构建体EL1-14是从GeneWiz订购的,作为对大肠杆菌进行密码子优化的合成基因。这些构建体由GeneWiz使用NcoI和NotI酶的识别位点通过限制/连接方法克隆到pETM14_ccdB载体中。

[0254] 以下的表3总结了所使用的引物。对于选定的10个构建体的结构域交换,每个H-结构域与T7启动子一起使用PhusionFlash聚合酶(Thermo,F-548L)通过共同正向引物(no 2)和构建体特异性反向引物(no 3-12)来扩增。类似地,每个B-区都通过构建体特异性内部引物(no 13-21)和包括T7终止子的共同反向引物(no 1)扩增。所有引物都包含带有BsaI识别位点的延伸,使外端与pETM14衍生的载体骨架pETMdest兼容。结构域之间的突出端设计为在接头序列的两个氨基酸GL内的序列“GGCT”。因此,出于本实验的目的,这2个氨基酸代表了结构域之间的确切边界。

[0255] 因此,随后使用GoldenGate克隆策略通过BsaI限制(BsaI-HFv2、NEB、R3733S)/连接(T4 DNA连接酶, Thermo, EL0011)循环反应,将扩增的和凝胶纯化的结构域(GeneJet凝胶纯化试剂盒, Thermo, K0692)组合成90个新的表达构建体。

[0256] 用于转化目的,使用了NEB10 β 大肠杆菌株(NEB, C3019)并使用GeneGet质粒Miniprep试剂盒(Thermo, K0502)纯化质粒。

[0257] [表3]

[0258]

1	T7 盒-16-rev	aacaggtctcaatacaatccggatatagttctctcttcage
2	T7 盒-01-for	aacaggtctcaacctcegcgaaattaatacgactcactatagg

[0259]

3	EL_H1-rev	aacaggtctcaagcggcatttttgatgatgctcggg
4	EL_H2-rev	aacaggtctcaagccaacatttttaataatgctcggataatcc
5	EL_H3-rev	aacaggtctcaagcggcggttttgataacgctcggg
6	EL_H4-rev	aacaggtctcaagcccaacgttcttgatgatgctcgg
7	EL_H5-rev	aacaggtctcaagcggcggttttgatgatgctcgg
8	EL_H6-rev	aacaggtctcaagcggcattcttaataatgctcggata
9	EL_H7-rev	aacaggtctcaagcggcggttttaataatgctcggataatc
10	EL_H10-rev	aacaggtctcaagcggcggttttgatcacgctcgg
11	EL_H11-rev	aacaggtctcaagcggccttcttgataacgctcggataatc
12	EL_H12-rev	aacaggtctcaagcggcattcttgatcacgctcgg
13	EL_B6-for	aacaggtctcaggcttaaacggctgcaaaaatggcgg
14	EL_B7-for	aacaggtctcaggcttaaacggctgcaaaaacgggtgg
15	EL_B10-for	aacaggtctcaggcttaaacggctataaaaacggcggc
16	EL_B11-for	aacaggtctcaggcttaaatggttacaagaatggcggcag
17	EL_B12-for	aacaggtctcaggcttaaatggctaccagaacggcgg
18	EL_B1-for	aacaggtctcaggcttaaacggctgcaagaatggtgg
19	EL_B2-for	aacaggtctcaggcttaaatggttgcaagaacggcgg
20	EL_B3-for	aacaggtctcaggcttaaatggctaccagaatggcggc
21	EL_B4-for	aacaggtctcaggcttaaatggctgcaaaaacgggtggc
23	T7term-STOP-for	aacaggtctcatgacgccattaacctgatgttctggg

[0260] 为便于参考,人工内溶素的结构域组合用N-末端催化结构域(以下称为H-结构域)的H-码和包含C-末端细胞壁结合区和接头区的部分(以下称为B-区)的B-码来表示。举例来说,H2B10是指具有来自天然内溶素EL2的N-末端结构域以及来自天然内溶素EL10的接头区和C-末端细胞壁结合区的结构域交换的内溶素。换言之,H2B10是指由天然内溶素EL2的196个N-末端残基(SEQ ID NO:2)和天然内溶素EL10的110个C-末端残基组成的结构域交换的内溶素。在这个示例中,对应于天然内溶素EL10的110个C-末端残基的B-区B10,从C-末端到N-末端顺序包含C-末端细胞壁结合结构域“B10_C”(SEQ ID NO:29)、N-末端细胞壁结合结构域“B10_N”(SEQ ID NO:28)和接头区域“L10”(NAGLNGYKNGGS)。命名和相应的氨基酸序列详细显示在表7中。

[0261] 因此,根据以上命名,天然内溶素,例如,EL3,可以互换地定义为H3B3或H3-L3(B3_N)(B3_C)。同样,重组内溶素,例如,H2B10,也可以互换地定义为H2-L1-(B10_N)(B10_C)。

[0262] 本领域技术人员将理解在其他实施方案中元件“Lx”、“(Bx_N)”和“(Bx_C)”也可以独立地交换。命名进一步显示在以下表7中。

[0263] 4.2-测定参数的优化

[0264] 分析了活性对三个潜在关键参数的依赖性,即pH、厌氧/微需氧/需氧条件、咪唑的

不存在/存在。选择三个评估标准的原因如下:

[0265] -pH:本发明的内容素的杀伤活性已通过约7的pH值下进行的实验成功证明。然而,健康阴道中的pH值约为3.5,而BV阴道中的pH值高达约5.5,甚至更高。因此,研究了内容素活性的pH依赖性。

[0266] -氧:在文献中,加德纳菌被描述为厌氧或微需氧。因此,已经研究了在实验的孵育期(通常为5小时)中的厌氧、微需氧或需氧条件下是否有更多的未处理细胞存活。

[0267] -咪唑:根据参照实施例1中描述的方法,通过一步Ni-NTA柱纯化本发明的内容素,其中用于从Ni-NTA基质洗脱内容素的缓冲液含有咪唑。因此,在没有进一步透析样品的步骤的情况下,获得的洗脱液含有250mM咪唑。在这方面,已经研究了咪唑对加德纳菌的影响。

[0268] 首先,评估了阴道*G.vaginalis* Gv_9存活对在不同pH值下含或不含咪唑的培养基中孵育的敏感性(参见图5)。将 5×10^7 CFU/ml细胞在图下方所示的条件下在37°C厌氧条件下孵育5小时。随后通过定量涂布确定存活的CFU/ml。如图5所示,在pH 6.0下,分别有中位数为 1×10^7 和 1×10^6 个细胞在没有和有咪唑孵育的情况下存活。在pH 7.0下,只有中位数为 2×10^6 和 3×10^4 的细胞分别在有无咪唑的情况下存活。在pH 5.0的未处理对照中, $1e7$ 细胞在该程序中存活,而在pH 7处理的咪唑的中位存活为 $3e4$,即比前者低3个对数级。因此,阴道*G.vaginalis* Gv_9的存活高度依赖于咪唑的不存在,尤其是在pH>6.0和低pH下。

[0269] 其次,评估了阴道*G.vaginalis* Gv_9在不同pH值下相对含咪唑的对照对用重组内容素H10B1处理的敏感性(参见图6)。将 5×10^7 CFU/ml细胞在图下方所示的条件下在37°C厌氧条件下孵育5小时。随后通过定量涂布确定存活的CFU/ml。标记为咪唑对照的柱描绘了与图5中相同的数据。如图6中所示,内容素在低至pH 5.0时具有高活性,甚至在这种低pH下,与对照相比的相对减少也更加明显,其中活的CFU减少了2.5个对数级。虽然在pH 7.0下,H10B1处理和未处理细胞之间的存活差异小于 $1 \log_{10}$,但在pH 5.0下,差异为 $2 \log_{10}$ 单位。在咪唑的存在下,未用H10B1处理的细胞的存活在低于6.0的pH值下没有增加。因此,内容素H10B1的活性是高度pH依赖性的。在有氧条件下进行类似实验时,与无氧条件相比,对照细胞的存活降低了几个 $\log_{10}$ 单位(数据未显示)。

[0270] 因此,已经得出结论,用本发明的内容素进行实验的最佳参数是在厌氧条件下,pH 5.0,并且具有从内容素洗脱液中除去咪唑的步骤。

[0271] 4.3-表达水平

[0272] 表4描述了所有内容素构建体的浓度概览。去除咪唑后浓度高于0.2mg/ml的每个构建体通过稀释调整至0.2mg/ml的浓度。具有较低浓度的构建体保持原样并测试其活性。天然内容素EL6(表4中未显示)的浓度低于0.2mg/ml。H4、H11和H12似乎赋予低溶解度和表达水平,因为大多数构建体都低于0.2mg/ml的阈值。同样对于H1,一些构建体具有低浓度。

[0273] [表4]

[0274] 表达水平概览(定量)

[0275]

	B1	B2	B3	B4	B5	B7	B10	B11	B12
H1	0.2				0.2	0.2	0.2	0.2	
H2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H4							0.2	0.2	
H5	0.2	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2	0.2	0.2
H7		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H10	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H11			0.2				0.2		0.2
H12									

[0276] 4.4-在优化条件下通过悬液中的内容素作用对四个主要加德纳菌种的裂解进行定量评估

[0277] 使用参照实施例2中描述的方法定量评估了对91个构建体(天然和结构域交换的内容素)的四个主要加德纳菌种的裂解活性。简而言之,将 9.0×10^7 CFU/ml的指定菌株在厌氧条件下在pH 5.0下用10 μ l内容素(浓度尽可能调整为0.2mg/ml,参见表4)孵育5小时。

[0278] 结果与表5A至5C一起显示在图7A至7D中。在图7A到7D中,对数Y轴描绘了存活细胞的计数。虚线表示通过涂布2 μ l反应混合物(500CFU/ml)给出的检测限(LOD)。评估了天然的10个H-结构域和天然的9个B-域的每种组合,包括天然内容素(H1B1、H2B2、H3B3等),以及H6B6。没有测试具有B-结构域B6的其他构建体,因为B6使所有与其融合的H-结构域失活,如通过OD测量确定的(数据未显示)。测量了每个构建体对4个主要加德纳菌种*G.vaginalis sensu stricto*、*G.leopoldii*、*G.piotii*和*G.swidsinki*中的每一种的活性。表5总结了所得到的CFU的log10减少,按H-结构域和B-区组织。所有条件都一式三份测量。在厌氧条件下在pH 5.0下用内容素vs.缓冲液孵育5小时后的存活通过定量涂布来测量。这些值表示处理过vs.未处理的细胞的存活CFU比率的log10。使用三次重复测量的平均值。在表5A和5B中,高的负log10值,例如-6.7、-5.5、-4.8等,与高的酶活性相关,而接近于零的log10值或甚至正的log10值与低的酶活性或无酶活性相关。举例来说,如果对Gv_9的3个对照处理测量值的平均CFU为 1.0×10^7 CFU/ml,而用H2B10处理的3个样品的平均值为 2.5×10^3 CFU/ml,则通过H2B10的Gv_9的CFU减少的log10值将是 $\log_{10}(2.5 \times 10^3 / 10^7) = -3.7$ 。反过来说,-3.7的减少值意味着与未处理的对照相比,处理过的样品中的活CFU减少了 $10^{3.7}$ 倍(=5012倍)。在无活性的内容素的情况中,例如,H4B3对Gv_9,处理后的Gv_9CFU将等于在对照处理样品中测量的CFU,并且两个CFU值的比率将为1。因此,H4B3对Gv_9的减少值为 $\log_{10}(1) = 0.0$ 。

[0279] [表5A]

[0280]

	B1			B2			B3			B4			B5			B6		B7		B10			B11			B12											
	Gv9	Gv11	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23	Gv9	Gv11	Gv17	Gv23						
H1	-1.9	-1.3	-0.9	-3.5	-0.4	-0.3	-0.2	-1.4	-0.7	-0.7	-0.3	-1.9	-0.8	-0.7	-0.7	-2.3	-1.8	-0.8	-0.8	-3.3	-1.6	-1.2	-0.9	-3.3	-2.5	-2.3	-1.5	-4.9	-1.5	-1.6	-0.8	-3.8	-0.7	-0.6	-0.4	-2.3	
H2	-1.6	-1.2	-1.0	-3.5	-1.2	-1.1	-2.5	-5.4	-2.9	-2.1	-1.6	-5.4	-2.3	-1.8	-1.6	-4.5	-1.1	-1.5	-2.7	-4.7	-1.0	-1.3	-2.6	-6.7	-3.6	-3.3	-3.8	-6.7	-3.3	-3.0	-3.7	-6.7	-2.8	-3.3	-3.6	-6.7	
H3	-1.1	-1.3	-2.9	-4.3	-1.6	-1.4	-3.1	-4.1	-3.0	-2.0	-1.6	-5.4	-1.9	-1.4	-1.2	-4.0	-1.4	-1.2	-0.6	-3.5	-0.9	-1.1	-0.3	-2.8	-1.5	-2.2	-0.6	-3.8	-1.6	-2.0	-0.8	-4.2	-1.3	-1.9	-0.5	-3.7	
H4	0.1	0.7	0.4	0.0	0.1	0.5	0.4	0.0	0.0	0.4	0.2	-0.3	-0.4	-0.5	-0.4	-2.0	0.1	0.3	0.5	0.1	0.1	0.1	-0.4	-1.3	-3.0	-2.9	-1.9	-4.8	-2.9	-3.3	-1.8	-4.8	-0.3	-1.1	-0.3	-3.9	
H5	-1.3	-1.5	-1.1	-3.8	-1.2	-1.3	-0.9	-3.3	-2.8	-3.0	-1.8	-4.8	-1.8	-3.0	-2.2	-4.5	0.2	0.3	-0.1	-0.1	-1.6	-2.2	-1.2	-4.2	-2.5	-3.6	-1.1	-4.7	-2.4	-1.6	-1.6	-4.4	-2.3	-1.9	-1.6	-4.3	
H6	-0.3	-0.1	-0.4	-1.8	-0.8	-0.4	-0.7	-2.4	-0.3	-0.5	-0.3	-1.6	-0.4	-0.7	-0.3	-1.6	-0.4	-0.5	-0.4	-1.7	0.1	0.2	-0.2	-0.1	-0.1	-0.2	-0.2	-0.1	-1.8	-1.0	-1.5	-0.7	-2.7	-0.4	-0.6	-0.3	-1.3
H7	-0.9	-1.4	-0.9	-3.1	-2.0	-2.2	-1.3	-4.2	-3.2	-3.3	-2.0	-4.8	-2.5	-3.1	-1.7	-4.0	-1.6	-2.1	-1.2	-3.2	-1.6	-2.1	-1.2	-3.2	-3.4	-3.0	-1.8	-5.1	-3.5	-3.3	-1.9	-3.7	-2.6	-3.3	-1.7	-4.1	
H10	-1.7	-1.1	-1.4	-3.2	-1.6	-1.2	-1.2	-3.9	-2.7	-1.9	-2.1	-4.9	-2.3	-1.5	-1.7	-4.2	-1.2	-0.8	-1.2	-3.5	-1.4	-0.8	-1.2	-3.5	-3.5	-1.6	-2.4	-5.5	-3.2	-1.7	-1.8	-4.6	-3.6	-2.8	-1.6	-5.0	
H11	-0.8	-1.3	-0.8	-2.3	-0.2	-0.4	-0.4	-0.3	-2.5	-2.2	-1.7	-4.2	-1.7	-1.7	-1.1	-2.8	-1.5	-1.7	-0.9	-3.2	-0.1	-0.9	-0.7	-1.9	-2.8	-2.2	-1.4	-4.1	0.1	-1.6	-1.0	-3.5	-3.0	-2.3	-1.3	-4.1	
H12	0.0	-0.8	-0.2	-1.5	-0.2	-0.9	-0.3	-2.1	-0.2	-1.2	-0.6	-2.5	0.0	-0.7	-0.3	-2.3	-0.2	-1.1	-0.4	-2.1	-0.8	-0.6	-0.4	-2.6	-1.3	-0.3	-0.4	-2.9	-2.4	-1.0	-1.0	-3.9	-0.2	-1.0	-0.3	-1.9	

[0281] 下面的表5B描述了与表5A相同的数据,但显示为每个构建体对四个加德纳菌株的log10活性的平均值。在右侧和底部,分别显示了相对于所有天然的B-区(B6除外)的每个天

然的H-结构域和相对于对所有天然的H-结构域的每个天然的B-区 (B6除外) 的平均值以及各自的天然的H-结构域和天然的B-区的活性排位。

[0282] [表5B]

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B10	B11	B12	Avg	Rank
H1	-1.9	-0.6	-0.9	-1.1	-1.7		-1.8	-2.8	-1.9	-1.0	-1.5	7
H2	-1.8	-2.6	-3.0	-2.5	-2.5		-2.9	-4.3	-4.2	-4.1	-3.1	1
H3	-2.4	-2.5	-3.0	-2.2	-1.7		-1.3	-2.0	-2.1	-1.9	-2.1	5
H4	0.3	0.3	0.1	-0.8	0.3		-0.4	-3.1	-3.2	-1.4	-0.9	9
H5	-1.9	-1.7	-3.1	-2.9	0.1		-2.3	-3.0	-2.5	-2.5	-2.2	4
H6	-0.7	-1.1	-0.7	-0.8	-0.8	0.0	-1.0	-0.9	-1.5	-0.7	-0.8	10
H7	-1.6	-2.4	-3.4	-2.8	-2.0		-2.0	-3.3	-3.1	-3.0	-2.6	2
H10	-1.9	-2.0	-2.9	-2.4	-1.7		-1.7	-3.3	-2.9	-3.3	-2.4	3
H11	-1.3	-0.3	-2.6	-1.8	-1.8		-0.9	-2.6	-1.5	-2.7	-1.7	6
H12	-0.6	-0.9	-1.1	-0.8	-1.0		-1.1	-1.2	-2.1	-0.9	-1.1	8
Avg	-1.4	-1.4	-2.1	-1.8	-1.3		-1.5	-2.7	-2.5	-2.1		
Rank	7	8	4	5	9		6	1	2	3		

[0284] 表5C描绘了所有内容素的活性排位, 基于表5B的数据[表5C]

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B10	B11	B12
H1	44	83	72	63	53		50	21	43	67
H2	49	25	12	26	29		17	1	2	3
H3	33	27	13	35	52		61	39	36	46
H4	91	90	88	76	89		84	9	8	59
H5	42	55	11	18	87		34	14	30	28
H6	80	66	79	78	77	86	68	71	58	81
H7	56	32	4	20	38		40	5	10	15
H10	45	41	16	31	54		51	6	19	7
H11	60	85	24	47	48		70	23	57	22
H12	82	74	64	75	69		65	62	37	73

[0286] 表5D描绘了所用的每个加德纳菌株的平均log10裂解。平均值是针对所有有测试的构建体的log10活性计算的。

[0287] [表5D]

[0288] 所有构建体对菌株的log10平均活性

Gv_9 (<i>G. vaginalis</i>)	-1.5
Gv_11 (<i>G. leopoldii</i>)	-1.5
Gv_17 (<i>G. piovii</i>)	-1.1
Gv_23 (<i>G. swidsinkii</i>)	-3.4

[0290] 表5A至5C显示了内容素的活性高度特异性地依赖于H-结构域/B-区组合和对其进行测试的细菌菌株。每个构建体都针对四个加德纳菌株进行了测定(参见表5A)。平均而言, 活性最高的H-结构域是H2, 所有B-区 (B6除外) 的CFU平均减少3.1个log10单位, 其次是H7、

H10和H5(参见表5B)。在B-区中,B10活性最高,平均CFU减少了2.7个log10单位,其次是B11、B12和B3。

[0291] 令人惊讶且出乎意料的是,发明人发现了几种重组内容素具有比任何天然内容素(H1B1至H12B12)更强的活性,尤其是在测试的所有4个加德纳菌株中观察时(参见图7A至7D)。特别是H2B10、H2B11和H2B12分别具有活性排位1、2和3,并且每个都比任何天然内容素活性更高(参见表5C)。H7B3的总体为第4名(参见表5C),并且比实验中包括的任何其他天然内容素活性更高。事实上,排名前10位活性最高的天然内容素是H10B10(第6名),其次活性最高的天然内容素是H3B3(第13名)。总之,根据本公开的重组细胞内容素可能呈现出比天然内容素显著更高的活性。

[0292] 虽然不受特定理论的限制,但通过结构域交换根据本发明的内容素观察到的抗加德纳菌的杀灭活性的意外增加可以如下解释。原噬菌体上的天然内容素经历达尔文进化过程,其中整个原噬菌体的繁殖得到优化。然而,通过同时提高内容素的催化活性并同时在仅加德纳菌属内扩大其跨物种的宿主范围而导致相应原噬菌体更高繁殖的突变的可能性非常低。相反,一些加德纳菌原噬菌体必须将内容素的N-末端催化结构域进化到最高活性,而其他一些原噬菌体必须优化内容素的C-末端区,以获得最广泛的跨加德纳菌种活性。因此,通过将本发明的内容素之一的高度进化的N-末端催化结构域与由来自不同原噬菌体的不同基因组编码的本发明的另一种内容素的高度进化的C-末端区组合,可以获得比本发明的天然内容素具有更高的优化的抗加德纳菌种杀灭活性的重组内容素。这例如通过本发明的重组内容素H2B10、H2B11、H2B12和H7B3来实现,它们都具有比天然内容素EL2或任何其他天然内容素更高的杀灭活性,并且跨越所有加德纳菌种(参见图7A至7D和表5A)。

[0293] 此外,大多数构建体对Gv_23(*G. swidsinskii*)的活性比其他三个测试菌株的活性高得多(参见表5A)。对每个加德纳菌株的所有构建体的平均活性(参见表5D)证实了Gv_23对内容素最易感,其次是Gv_9和Gv_11,而Gv_17(*G. piovii*)最不易感。这种易感性顺序主要是内容素构建体的情况。虽然Gv_23是最易感菌株,但对于许多构建体差几个log10单位,有时Gv_17比Gv_9或Gv_11更易感(例如,对于H2B10,整体上活性最高的内容素)。不受特定理论的束缚,易感性差异可以通过结构缺陷(如Gv_23较弱/较薄/更易接近的细胞壁)或测试的内容素对Gv_23的酶活性更强来解释。

[0294] 此外,可以得出结论,溶液中的内容素浓度对其在测定中的活性至关重要。表4中描述的低浓度构建体在活性测定中通常也具有低活性-特别是具有H-结构域H4、H11和H12的构建体(它们在B-区中具有低溶解度)。有一些令人惊讶的情况,例如H12B11,它的表达水平非常低,但活性相对较高。

[0295] 4.5-活性模式分析

[0296] 如图8的树状图所示,对天然H-结构域的序列进行比对和比较以与活性模式相关联。预期活性最高的H-结构域也彼此最密切相关。然而,令人惊讶的是,活性最高的N-末端结构域H2与H6同源性最高,但H6是活性最低的。活性次最高的H-结构域H7和H10彼此之间以及与H2的关系也相当远。活性第四高的H-结构域H5与H7的关系最接近。此外,与使得重组内容素活性最高的B-区的组合不会导致可预测的模式。H2与B10、B11和B12结合活性最高。然而,活性第二高的H-结构域H7与B3结合活性最高,与其最接近的同源物H5的情况一样。

[0297] 对B-区也进行了比对以核对与活性模式的同源性,如图9中的树状图所示。表5A至

5C的分析中活性最高的B-区是B10、B11、B12,其次是B3,全部具有高于2个log10单位的平均CFU减少值。与H-结构域的模式相反,这4个活性最高的B-区是测试的B-区组内最接近的4个同源物。有趣的是,B5和B7区是相同的(参见图9)。从图7A到7D中可以看出,H2B10、H2B11和H2B12获得了最好的总体结果。

[0298] 如实施例2中所解释的,每个天然B-区包含两个B-结构域,即N-末端细胞壁区和C-末端细胞壁结构域。如图10和11中所示,还比对和比较了B-区内每个天然B-结构域的序列。B-结构域的边界可以通过用Interpro分析序列(Mitchell等,2019Nucleic Acids Res.47,D351-D360))和通过比对每个B-区内的两个重复基序来识别。所有B-结构域的C-末端是一个保守序列(VNELL或VNKLL),在蛋白质Cp1-7的CW_7基序(VNELL或VNEIL)的C-末端也可以找到与之同源的序列,从而定义了每个B-区中两个B-结构域的边界。作为例外,B6只有一个被截断的B-结构域,这很可能是EL6完全无活性的原因。

[0299] 结论是,H-结构域和B-区的特定组合已被证明是至关重要的,且与天然内容素相比,导致具有更高杀灭活性的内容素的每一个H/B组合都是令人惊讶且不可预测的发现。

[0300] 实施例5-抗有益的乳杆菌(Lactobacilli)的活性测定

[0301] 健康的阴道主要由3个乳杆菌种定植:卷曲乳杆菌(*L.crispatus*)、加氏乳杆菌(*L.gasseri*)和詹氏乳杆菌(*L.jensenii*)。它们通过产生乳酸维持3.5-4.5的酸性pH值,并通过产生H₂O₂维持保护性的氧化环境。从BV恢复伴随这些乳杆菌(Lactobacilli)在阴道内重新增殖有关,并且抗BV的药物应该有利地不干扰这个过程。抗生素显然干扰了这个过程,这就是为什么仍然强烈需要改进的方法和组合物来治疗加德纳菌感染和BV的原因。在成功证明本发明的内容素对加德纳菌的高活性后,发明人研究了那些内容素是否可以裂解健康阴道中3个最常见的乳杆菌(Lactobacilli)种的菌株。该实验是在厌氧条件下使用参照实施例2中描述的方法在pH 5.0下进行的。如图12中所示的,所测试的重组内容素对所使用的三个有益乳杆菌,卷曲乳杆菌(*L.crispatus*)、加氏乳杆菌(*L.gasseri*)和詹氏乳杆菌(*L.jensenii*),没有呈现出任何杀灭活性。本发明的内容素虽然呈现出抗加德纳菌的高杀灭活性,但对最常见的有益乳杆菌无效。因此,这些结果证实了本发明的内容素的属选择性活性及其作为抗BV的创新药物的候选药物地位。在这方面,用本发明的内容素治疗BV远优于目前可用的治疗方法,如用抗生素甲硝唑和克林霉素的治疗。

[0302] 实施例6-标准治疗的抗生素甲硝唑和克林霉素对加德纳菌株悬液中生长的活性测定

[0303] BV治疗的主要缺陷之一是许多女性中的高复发率,这导致抗生素的重复给药并伴随微生物组的不稳定和其他副作用。然后使用参照实施例6和7中描述的方法测量对也用于内容素活性测定的菌株的加德纳菌细胞的最小抑制浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。简而言之,测量方案必须大幅改编自国际标准,后者不适用于对加德纳菌的MIC和MBC测量。要改变的主要参数是生长培养基(加德纳菌在通常用于MIC测量的Mueller-Hinton肉汤中不生长)、厌氧条件、孵育时间以及第一轮实验中的细菌起始浓度。起始浓度从标准的 5×10^5 CFU/ml改为 2.5×10^7 CFU/ml,主要是因为BV患者的阴道中,细胞也非常集中,并且抗生素的效果应该在细胞密度与用于内容素活性测定的那些更相当的情况下测量。评估了甲硝唑(从Gatt-Koller获得)和克林霉素(从Ratiopharm获得)对加德纳菌株悬浮生长的影响。基本上,将 2.5×10^7 CFU/ml的加德纳菌悬液与指定浓度的抗生素一起孵育,并在37°C厌氧

条件下孵育48小时。MIC定义为通过OD测量在48小时后检测不到生长的最小抗生素浓度。在实验开始和结束时测量OD (610)。在实验结束时,将2u1的每种反应混合物点在琼脂上以确定MBC。表6A总结了图13中描述的实验结果。耐药性 (R) 定义为对于甲硝唑 $\geq 32\mu\text{g/ml}$ 和对于克林霉素 $\geq 8\text{mg/ml}$ 。根据国际标准,灵敏度 (S) 定义为甲硝唑 $\leq 8\mu\text{g/ml}$ 和克林霉素 $\leq 2\mu\text{g/ml}$ 。

[0304] [表6A]

	甲硝唑		克林霉素	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>G. vaginalis</i> (Gv_9)	128ug/ml-R	>128ug/ml	16ug/ml-R	128ug/ml
<i>G. leopoldii</i> (Gv_11)	>128ug/ml-R	>128ug/ml	16ug/ml-R	32ug/ml
<i>G. piovii</i> (Gv_17)	64ug/ml-R	>128ug/ml	16ug/ml-R	64ug/ml
<i>G. swidsinskii</i> (Gv_23)	>128ug/ml-R	>128ug/ml	16ug/ml-R	>128ug/ml

[0306] [表6B]

	甲硝唑[$\mu\text{g/ml}$]		克林霉素[$\mu\text{g/ml}$]	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>G. vaginalis</i> (Gv_9)	8	16 (R)	0.25	0.5
<i>G. leopoldii</i> (Gv_11)	128(R)	>128(R)	0.5	1
<i>G. piovii</i> (GV_17)	16	64(R)	0.25	1
<i>G. swidsinskii</i> (Gv_23)	32(R)	>128(R)	0.25	0.25

[0308] 根据图13中显示的结果,所有加德纳菌株对甲硝唑和克林霉素均具有低易感性。MIC和MBC的测量条件比标准更严格。例如,通常测量 MBC_{90} ,即在限定时间内杀灭90%细胞的抗生素浓度,而MBC在本申请中被定义为完全消除 $2.5 \times 10^7 \text{CFU/ml}$ 悬液的最小浓度。尽管如此,这些情况与BV患者阴道中发现的情况更具有可比性。在这些条件下测量的高MIC和MBC值可以解释BV的高复发率。相比之下,测定的内容素根据定义是杀菌的,因为它们导致细菌细胞的完全分解。因此,这些结果表明本发明的细胞内容素在治疗BV方面优于抗生素。

[0309] 进行了第二轮MIC和MBC实验,其中一些实验参数发生了变化(i) 根据CLSI(临床和实验室标准协会)标准,现在起始细胞数为 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$, (ii) 盐酸克林霉素使用粉末(Sigma Aldrich,目录号no.C5269), (iii) NYC-III肉汤代替Hardy肉汤,以及(iv) 96孔板代替384孔板。如图14和表6B中所示,所有加德纳菌株对甲硝唑仍具有非常低的MIC(8-128 $\mu\text{g/ml}$),而盐酸克林霉素-与图13和表6A中呈现的克林霉素相反-现在在低浓度($\text{MIC} \leq 1\mu\text{g/ml}$)下具有抑制和杀菌作用。

[0310] 实施例7-代表性的结构域交换内容素(H2B10)对不同加德纳菌株悬浮生长的活性测定。

[0311] 为了分析内容素H2B10的MIC和MBC,使用了 1×10^5 - 1×10^6 的细胞悬液。H2B10显示出低 $\mu\text{g/ml}$ 范围(0.5-4 $\mu\text{g/ml}$)的MIC,表明加德纳菌细胞对内容素高度敏感(图15,表7)。测量MBC的条件比标准更严格。例如,通常测量MBC₉₀,即在限定时间内杀灭90%细胞的抗微生物浓度,而MBC在本申请中被定义为使起始细胞数减少至少99.5%的剂量。H2B10作为本文请求保护的内容素的代表,显示出远优于标准治疗抗生素甲硝唑的MIC和MBC,而后者由于抗性形成对许多加德纳菌株无效。然而,克林霉素给出了不一致的结果。根据国际标准,所有四个加德纳菌株都应对克林霉素(从Ratiopharm获得的)具有抗性(MIC>8 $\mu\text{g/ml}$) (图13),而盐酸克林霉素(Sigma Aldrich)在浓度 $\leq 1\mu\text{g/ml}$ 下的杀菌效果已经要好得多(图15)。一般而言,已知仅抗生素不能充分根除作为BV标志的加德纳菌生物膜,这是据报道BV复发率非常高的一个可疑原因。除了留下残留的活生物膜,抗生素会清除阴道微生物群的部分有益生物,然后为其他病原体(例如,真菌)开放生态位。因此,基于内容素的治疗可以选择性地根除加德纳菌属的细菌细胞并推定地根除生物膜,而不伤害有益的乳杆菌(Lactobacilli),这被认为优于BV的标准抗生素治疗。

[0312] 表7

		H2B10 [$\mu\text{g/ml}$]	
		MIC	MBC
[0313]	<i>G. vaginalis</i> (Gv_9)	1	2
	<i>G. leopoldii</i> (Gv_11)	4	16
	<i>G. swidsinskii</i> (GV_23)	0.5	1

[0314] 参照实施例1-内容素的克隆、表达和纯化

[0315] 材料:

[0316] • 96-孔Multiscreen HTSDurapore 96-孔Filterplatten,PS (Labshop目录号no.44.MSGVS22)

[0317] • 带有Sephadex G-25的PD MiniTrap脱盐柱 (GE Lifescience,目录号no.28918007)

[0318] • Slide-A-Lyzer™MINI渗析装置,10K MWC0,2mL (Thermo Scientific,目录号no.88404)

[0319] • Fastbreak试剂 (Promega,目录号no.V8571)

[0320] • 裂解缓冲液:50mM磷酸盐pH 6,150mM NaCl,20mM咪唑,1mM TCEP,1x FastBreak,Benzonase

[0321] • 洗涤缓冲液I:50mM磷酸盐pH 6,150mM NaCl,20mM咪唑,1mM TCEP(1,5ml)

[0322] • 洗涤缓冲液II:50mM磷酸盐pH 6,150mM NaCl,40mM咪唑,1mM TCEP(1,5ml)

[0323] • 洗脱缓冲液:50mM磷酸盐pH 6,150mM NaCl,250mM咪唑,1mM TCEP(1,1ml)。

[0324] 方法:

[0325] 将表达构建体转化到大肠杆菌菌株B121 (DE3) 中并使用适当的抗生素进行选择。将来自2ml培养物(TB+乳糖,25°C,0/N)的细胞重悬于1.5ml裂解缓冲液中,并通过

FastBreak试剂(Promega)裂解。通过在15000g、30min、4℃下离心分离细胞内可溶级分。将可溶性蛋白质级分上样到100μL镍亲和基质上,分别用15个柱体积(CV)的洗涤缓冲液I和II洗涤,然后在10个CV洗脱缓冲液中洗脱。然后,可以使用脱盐柱将洗脱液缓冲液更换为20mM磷酸盐pH6.0、150mM NaCl,以去除咪唑。洗脱(或适当更换缓冲液)后,将纯化蛋白质的浓度调整为0.2mg/ml,然后溶液用96-孔滤板过滤除菌。

[0326] 参照实施例2-细菌悬液中的活性测定

[0327] 材料:

[0328] 1.Hardy肉汤,在121℃下高压蒸汽灭菌20min:

[0329] • 12.0g酪蛋白的胰酶消化物(SigmaAldrich,目录号no.70172-100G)

[0330] • 10.0g示蛋白胨(SigmaAldrich,目录号no.82450-100G)

[0331] • 5.0g动物组织的肽消化物(SigmaAldrich,目录号no.70174-100G)

[0332] • 5.0g氯化钠(CarlRoth,目录号no.3957.1)

[0333] • 3.0g牛肉提取物(SigmaAldrich,目录号no.B4888-50G)

[0334] • 3.0g酵母提取物(SigmaAldrich,目录号no.Y1625-250G)

[0335] • 1.0g可溶性淀粉(SigmaAldrich,目录号no.S9765-250G)

[0336] • 去离子H₂O至1升(在PhagoMed实验室使用Millipore RiOs Essential16生产)

[0337] 2.Hardy肉汤琼脂,在121℃下高压蒸汽灭菌20min:与Hardy肉汤相同,但使用15g Agar Bacteriological(OXOID目录号.#LP0011)

[0338] 3.Hardy肉汤顶层琼脂,在121℃下高压蒸汽灭菌20min:与Hardy肉汤相同,但使用7g Agar Bacteriological(OXOID目录号.#LP0011)

[0339] 4.NYC-III培养基,pH5.0,在121℃下高压蒸汽灭菌20min,此后加入马血清(NYC-III-HS-5.0)

[0340] • 12g HEPES(Sigma Aldrich,目录号no.H4034-100G)

[0341] • 7.5g示蛋白胨No.3(BD,目录号no.211693)

[0342] • 1.9g酵母提取物(Sigma Aldrich,目录号no.Y1625-250G)

[0343] • 2.5g氯化钠(Sigma Aldrich,目录号S9888-1kg-M)

[0344] • 2.5g葡萄糖(MW 180.16g/mol)(Sigma Aldrich,目录号no.G6152-1KG)

[0345] • 去离子水至450ml总体积

[0346] • 50ml马血清(HS),热灭活的100ml(Thermo Fisher Scientific,目录号no.26050070),高压蒸汽灭菌后添加

[0347] 5.一般材料:

[0348] • 用于加德纳菌的BD巧克力琼脂平板(BD,目录号no.254060)

[0349] • 用于乳杆菌的BD Schaedler/5%绵羊血平板(BD,目录号no.24042)

[0350] • Isovitallex(BD,目录号no.211876)

[0351] • Hardy肉汤+Isovitalex(参见上文),调节至所示的pH

[0352] • Hardy琼脂+Isovitalex(参见上文)

[0353] • Hardy顶层琼脂+Isovitalex(参见上文)

[0354] • 96-U-孔平板(Sigma Aldrich,目录号no.M2311-100EA)

[0355] • 带盖的96平底平板(Labshop,目录号no.44.781662)

- [0356] • Greiner **CELLSTAR®** 384孔平板 (Sigma Aldrich, 目录号no.M1937-32EA)
- [0357] • 厌氧剂袋 (Sigma-Aldrich, 目录号no.68061-10SACHETS-F)
- [0358] • 厌氧指标测试 (Sigma-Aldrich, 目录号no.59886-1PAK-F)
- [0359] • 厌氧罐 (Sigma-Aldrich, 目录号no.28029-1EA-F) 或用橡胶垫圈密封的塑料饭盒, 在当地家电商店购买。

[0360] 6. 细菌株:

[0361] 加德纳菌株:

- [0362] • Gv_1:UGent 09.07
- [0363] • Gv_8:UGent 25.49
- [0364] • Gv_9:ATCC 14018
- [0365] • Gv_10:UGent 06.41
- [0366] • Gv_11:UGent 09.48
- [0367] • Gv_17:UGent 18.01
- [0368] • Gv_23:GS10234 (FC2)

[0369] 乳杆菌株:

- [0370] • 詹氏乳杆菌 (*L. jensenii*) PB2003-013-T2-2
- [0371] • 加氏乳杆菌 (*L. gasseri*) 020566
- [0372] • 卷曲乳杆菌 (*L. crispatus*) LAB117

[0373] 方法:

[0374] 通过在巧克力琼脂平板 (Beckton Dickinson) 上涂布并在厌氧条件下在37°C孵育48h, 从冷冻原液中回收加德纳菌细胞。对于乳杆菌, 使用BD Schaedler/5% 绵羊血琼脂平板代替。从平板上刮下菌落, 重悬于所示pH值下的Hardy肉汤或NYC-III-HS-5.0中, 并将悬液调节至OD (如所示的610或620nm) 0.1。必须注意的是, 两个Tecan微孔板读取器 (分别具有610nm或620nm滤光器) 在实验中可互换使用。尽管它对实验没有造成任何差异, 但在每个示例中都指定了所用的确切波长。如果没有另外说明, 对于不同的种/内容素组合, 在384孔板中将90μl细胞悬液与10μl内容素溶液混合。在反应开始时和结束时测量OD (如所示的610-620nm), 作为Tecan F200微孔板读取器中的连续动力学或两个测量点。在所示厌氧、微需氧或需氧条件下, 将反应在37°C下孵育5小时 (或另外指定的时间)。厌氧条件意味着从容器 (Sigma-Aldrich厌氧罐或密封饭盒) 完全耗尽氧气, 其中用厌氧袋孵育细菌的并通过容器内的厌氧指示剂确认缺氧。在所示微需氧条件的情况下, 使用罐中蜡烛法 (在适当的可密封容器中点燃茶蜡烛, 这会降低氧气含量直到火焰熄灭)。然后使用96-U孔底板按5个步骤 (10^{-1} 到 10^{-5}) 稀释每个孔, 并将每个反应混合物的每个稀释液的2μl接种到BD巧克力琼脂平板或BD Schaedler/5% 羊血琼脂平板上, 分别用于加德纳菌和乳杆菌, 用于检测和量化存活CFU。检测平板在厌氧条件下在37°C下孵育48小时。

[0375] 参照实施例6和7-MIC和MBC测量

[0376] 材料:

[0377] 一般材料:

- [0378] • 甲硝唑 (Gatt-Koller, Metronidazolium mikronisiert, 10g, 606293914)
- [0379] • 克林霉素 (Ratiopharm, 300mg/2ml安瓿5x)

- [0380] • 盐酸克林霉素 (Sigma Aldrich, 10mg, 目录号no.C5269)
- [0381] • MES缓冲液 (50mM MES, 100mM NaCl, 8mM MgSO₄, pH=5.5) 中的内容素H2B10 [530 µg/ml]
- [0382] • 用于加德纳菌的BD巧克力平板 (BD, 目录号no.254060)
- [0383] • 用于乳杆菌的BD Schaedler/5%羊血琼脂平板 (BD, 目录号no.254042)
- [0384] • Isovitallex (BD, 目录号no.211876)
- [0385] • Hardy肉汤+Isovitallex (参见上文), 调节至所示的pH
- [0386] • NYC-III+HS肉汤, pH5.5 NYC-III-HS琼脂平板: 如上所述的NYC-III+HS培养基, 但在高压灭菌前添加了1.5%琼脂
- [0387] • Hardy琼脂+Isovitallex (参见上文)
- [0388] • Hardy顶层琼脂+Isovitallex (参见上文)
- [0389] • 96-U-孔平板 (Sigma Aldrich, 目录号no.M2311-100EA)
- [0390] • 带盖的96平底平板 (Labshop, 目录号no.44.781662)
- [0391] • Greiner**CELLSTAR**®384孔平板 (Sigma Aldrich, 目录号no.M1937-32EA)
- [0392] • 厌氧剂袋 (Sigma-Aldrich, 目录号no.68061-10SACHETS-F)
- [0393] • 厌氧指标测试 (Sigma-Aldrich, 目录号no.59886-1PAK-F)
- [0394] • 厌氧罐 (Sigma-Aldrich, 目录号no.28029-1EA-F) 或用橡胶垫圈密封的塑料饭盒, 在当地家电商店购买。

[0395] 方法:

[0396] 将细菌从冷冻原液涂布到BD Choc琼脂平板 (加德纳菌) 上, 并在厌氧条件下在37°C下培养48h。从平板上刮下菌落, 重悬于Hardy肉汤或NYC-III-HS-pH 5.0中, 并将悬液调节至OD (如所示的610或620nm) 0.05。必须注意的是, 两个Tecan微孔板读取器 (分别具有610nm或620nm滤光器) 在实验中可互换使用。尽管它对实验没有造成任何差异, 但在每个示例中都指定了所用的确切波长。对于每个所需的终浓度, 将抗生素制成20×原液。在384孔板中将95µl细胞悬液与5µl抗生素稀释液混合。测量反应开始时的OD (如所示的610-620), 然后将平板在厌氧条件下在37°C下孵育48h。之后, 再次测量OD (所示的610-620) 用于MIC测定, 其中MIC定义为其中OD (所示的610-620) 不高于实验开始时测量的水平的抗生素的最低浓度。测量OD后, 在NYC-III+HS琼脂平板上点样每孔2µl。然后将平板在厌氧条件下在37°C下再孵育48h。孵育后, 评估每个点上的细胞生长, 并将MBC定义为平板上没有细菌生长的最低抗生素浓度。对于每个条件, 实验一式三份进行。

[0397] 在第二轮使用抗生素的MIC和MBC实验中, 将加德纳菌细胞悬液调节至McFarland标准0.5 (大约OD (610) 0.07), 随后根据CLSI (临床和实验室标准协会) 标准1:75稀释。根据CLSI标准制备抗生素并将50µl细胞悬液在96-孔平板中与50µl抗生素混合。另外, 如上所述测定了MIC和MBC。

[0398] 对于结构域交换的内容素H2B10的MIC和MBC测定, 将50µl加德纳菌细胞悬液在96-孔平板中与50µl含H2B10的溶液混合, 其连续1:1稀释。测量了反应开始时的OD₆₁₀, 然后将平板在厌氧条件下在37°C下孵育48h。此后, 再次测量了OD (610), 用于MIC测定, 其中MIC定义为其中OD不高于或仅略微高于实验开始时测量的水平的H2B10的最低浓度。

[0399] [表7]

[0400]

天然内 溶素	从 N-末端到 C-末端的结构*			
EL1	H1	L1	B1_N	B1_C
	SEQ ID NO: 1	NAGLNGCKNGGS	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
EL2	H2	L2	B2_N	B2_C
	SEQ ID NO: 2	NVGLNGCKNGGS	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
EL3	H3	L3	B3_N	B3_C
	SEQ ID NO: 3	NAGLNGYQNGGS	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
EL4	H4	L4	B4_N	B4_C
	SEQ ID NO: 4	NVGLNGCKNGGS	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
EL5	H5	L5	B5_N	B5_C
	SEQ ID NO: 5	NAGLNGCKNGGS	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
EL6	H6	L6	B6_N	
	SEQ ID NO: 6	NAGLNGCKNGGS	SEQ ID NO: 25	
EL7	H7	L7	B7_N	B7_C
	SEQ ID NO: 7	NAGLNGCKNGGS	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
EL8	SEQ ID NO: 8			
EL9	SEQ ID NO: 9			
EL10	H10	L10	B10_N	B10_C
	SEQ ID NO: 10	NAGLNGYKNGGS	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
EL11	H11	L11	B11_N	B11_C
	SEQ ID NO: 11	KAGLNGYKNGGS	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
EL12	H12	L12	B12_N	B12_C
	SEQ ID NO: 12	NAGLNGYQNGGS	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
EL13	SEQ ID NO: 13			
EL14	SEQ ID NO: 14			

[0401] *第1排=如果适用,根据本申请命名的名称;第2排=相应的天然氨基酸序列

序列表

SEQ ID NO: 1

>H1

>196 aa

MSKKGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTAGLDVGAYWYSYANSFGFEAAEEAQSLMNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQ
LNRGRAFCDSLITSFCNKLEACGYAGFYTSLSTANNLVSAHVRNRYALWIA
QWNTHCNYQGSYGLWQYSSNGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSIIK

SEQ ID NO: 2

>H2

>196 aa

MSKRGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTCGLDVGAYWYSYANSFGFEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQ
LNRGRAFCDSLITGFCNKLESCGYAGFYTSLSTANNLVSAHVRNRYALWI
AQWNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSIIK

[0402] SEQ ID NO: 3

>H3

>196aa

MSKKGIDVSVWQGDIDFNSVKASGVEFVIIRAGYGIGHKDKWFEENYRKA
KTAGLDVGSYWYSYASSAGEASEEAQSCVNILSGKSFEYPIYFDLEEKSQLN
RGRDFCDSLITSFCNKLEACGYAGFYTSLSVANNLVSSHVRDRYALWIAQ
WNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVNGIAGRVDMDYAYVDYPSVIK

SEQ ID NO: 4

>H4

>196aa

MSKKGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTCGLDVGAYWYSYANSFGFEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQ
LNRGRAFCDSLITSFCSKLETYGYAGFYTSLSVVNNLVSAHVRDRYALWIA
QWNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSIIK

SEQ ID NO: 5

>H5

>196 aa

MSKKGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTAGLDVGAYWYSYANSSSEAAEEAQSCANMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
NRGRAFCDSLITGFCSKLEACGYAGFYTSLSTANNLVSAHVRNRYALWIA
QWNTHCSYQGSYGLWQYSSNGSVPGVAGRVDMDYAYKDYPSTIK

SEQ ID NO: 6

>H6

>196 aa

MSKKGIDVSVWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTCGLDVGAYWYSYANSFGFEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
LNRGRAFCDSLITSFCSKLESCGYAGFYTSLSTANNLVSAHVRNRYALWIA
QWNTHCDYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYKNYPSTIK

SEQ ID NO: 7

>H7

>196aa

[0403] MSKKGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTAGLDVGAYWYSYANSASEAAEEAQSCANMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
LNRGRAFCDSLITSFCSKLETYGYAGFYTSLSTANNLVSSHVRNRYALWIA
QWNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYKDYPSTIK

SEQ ID NO: 8

>EL8

>306 aa

MSKKGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTAGLDVGAYWYSYANSSSEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
NRGRAFCDSLITSFCSKLETYGYAGFYTSLSTANNLVSSHVRNRYALWIAQ
WNTHCSYQGSYGLWQYSSNGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSTIKNAGLNGY
KNGGSYTAPQTSSIDDVAREVINGAWGNGNERKQRLTQAGYDYTSVQNKV
NKLLGVKACRKSVDLAREVIRGTWGNGNERKNRLTQAGYDYDTVQKRV
NELL

SEQ ID NO: 9

>EL9

>251 aa

**MSKKGIDVSEWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNYRKA
KTCGLDVGAYWYSYANSFGFEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
LNRGRVFCDSLITSFCNKLEACGYAGFYTSLSTANNLVSSHVRNRYALWIA
QWNTHCDYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSIIKNAGLNG
CKNGGSDQAARTSSIDEVAREVINGAWGNGSTRKQRLTSAGYDYASVAK**

SEQ ID NO: 10

>H10

>196aa

**MSKRGIDVSVWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGHKDKWFEENYRKA
KTVGLDVGAYWYSYASSAGEASEEAQSCVNILSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
NRGRDFCDSLITSFCNKLEACGYAGFYTSLSVANNLVSSHVRDRYALWIAQ
WNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVNGIAGRVDMDYAYVDYPSVIK**

SEQ ID NO: 11

>H11

[0404] **>196aa**

**MSKRGIDVSVWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGHKDKWFEQNYRKA
KTTGLDVGAYWYSYASSAGEAAEEAQSCVNILSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
NRGRDFCDSLITSFCNKLETYGYAGFYTSLSVANNLVSSHVRDRYALWIAQ
WNTHCDYQGSYGLWQYSSSGSVDGIAGRVDMDYTYVDYPSVIK**

SEQ ID NO: 12

>H12

>196 aa

**MSKKGIDVSVWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGHKDKWFEENYRKA
KTAGLDVGSYWYSYASSAGEVALEAQSCVNILSGKSFEYPVYFDLEEKSQL
NRGRDFCDSLITSFCNKLEACGYAGFYTSLSVANNLVSSHVRDRYALWIAQ
WNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVNGIAGRVDMDYAYVDYPSVIK**

SEQ ID NO: 13

>EL13

>306 aa

MSKKGIDVSVWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIECKDKWFEQNYRKA

KTAGLDVGAYWYSYANSGFEEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQ
LNRGRAFCDSLITSFCNKLESCGYAGFYTSLSTANNLVAHVNRNRYALWIA
QWNTHCDYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSIIKNAGLNG
YKNGESHQATRRTTSIDEVAREVINGAWGNGNERKQRLTQAGYDYASVQNK
VNELLGVKACRKSVDLAREVIRGTWGNGNERKNRLTSAGYDYDTVQKR
VNELL

SEQ ID NO: 14

>EL14

>306 aa

MSKKGIDVSVWQGDIDFNAVKASGVEFVIIRAGYGIGCKDKWFEQNRYKA
KTCGLDVGAYWYSYANSGFEEAAEEAQSCVNMLSGKSFEYPVYFDLEEKSQ
LNRGRAFCDSLITSFCNKLEACGYAGFYTSLSTANNLVSAHVNRNRYALWIA
QWNTHCSYQGSYGLWQYSSSGSVPGVAGRVDMDYAYVDYPSIIKNAGLNG
YKNGESHQATRRTTSIDEVAREVINGAWGNGNERKQRLTSAGYDYASVQNK
VNELLGVKACRKSVDLAREVIRGAWGNGSTRKQRLTSAGYDYDTVQKR
VNELL

[0405]

SEQ ID NO: 15

>B1_N

>49 aa

DQAARTSSIDEVAREVINGAWGNGSTRKQRLTSAGYDYASVQNKVNELL

SEQ ID NO: 16

>B1_C

>49 aa

GVKACRKSVDLAREVIRGAWGNGSTRKQRLAQAGYDYDTVQKRVNELL

SEQ ID NO: 17

>B2_N

>49 aa

DQAARTSSIDEVAREVINGAWGNGNERKQRLTSAGYDYASVQNKVNELL

SEQ ID NO: 18

>B2_C

>49 aa

GVKACRKSVDIELAREVIRGTWGNNGSTRKQRLTQAGYDYDTVQKRVNELL

SEQ ID NO: 19

>B3_N

>49 aa

YTAPQTSSIDEVAREVINGDWGNGNDRKNRLISAGYDYASVQNKVNELL

SEQ ID NO: 20

>B3_C

>49 aa

GVKAYRKSVDIELAREVIRGTWGNNGSMRKHRLTQAGYDYDAVQKRVNELL

SEQ ID NO: 21

>B4_N

>49 aa

[0406] **DQATRTSSIDEVAREVINGAWGNGNERKQRLTSAGYDYASVQNKVNKLL**

SEQ ID NO: 22

>B4_C

>49 aa

GVKAYRKSVDIELAREVIRGTWGNNGNERKQRLAQAGYDYDTVQKRVNELL

SEQ ID NO: 23

>B5_N

>49 aa

DQAARTSSIDEVAREVINGAWGNGNERKQRLTQAGYDYTSVQNKVNKLL

SEQ ID NO: 24

>B5_C

>49 aa

GVKACRKSVDIELAREVIRGTWGNNGNERKNRLTQAGYDYDTVQKRVNELL

SEQ ID NO: 25

>B6_N

>43 aa

NQAARTSSIDDVAREVINGAWGNGNERKQRLTQAGYDYASVAK

SEQ ID NO: 26

>B7_N

>49 aa

DQAARTSSIDEVAREVINGAWGNGNERKQRLTQAGYDYTSVQNKVNKLL

SEQ ID NO: 27

>B7_C

>49 aa

GVKACRKSVDLAREVIRGTWGNGNERKNRLTQAGYDYDTVQKRVNELL

SEQ ID NO: 28

>B10_N

>49 aa

[0407]

YTAPQISSIDEVAREVINGDWGNGNERKQRLTSAGYDYASVQNKVNELL

SEQ ID NO: 29

>B10_C

>49 aa

GVKAYRKSVDLAREVIRGTWGNGSTRKQRLTQAGYDYNVQKRVNELL

SEQ ID NO: 30

>B11_N

>49 aa

YTAPQTSSIDEVAREVINGDWGNGNERKNRLTSAGYDYTSVQNKVNELL

SEQ ID NO: 31

>B11_C

>49 aa

GVKAYRKSVDLAREVIRGTWGNGSTRKQRLTQAGYDYDAVQKRVNELL

SEQ ID NO: 32

>B12_N

>49 aa

YTAPQTSSIDEVAREVINGDWGNGIERKNRLTSAGYDYTSVQNKVNELL

[0408]

SEQ ID NO: 33

>B12_C

>49 aa

GVKAYRKSVDLAREVIRGTWGNGKTRKQRLTQAGYDYNNAVQKRVNELL

图1

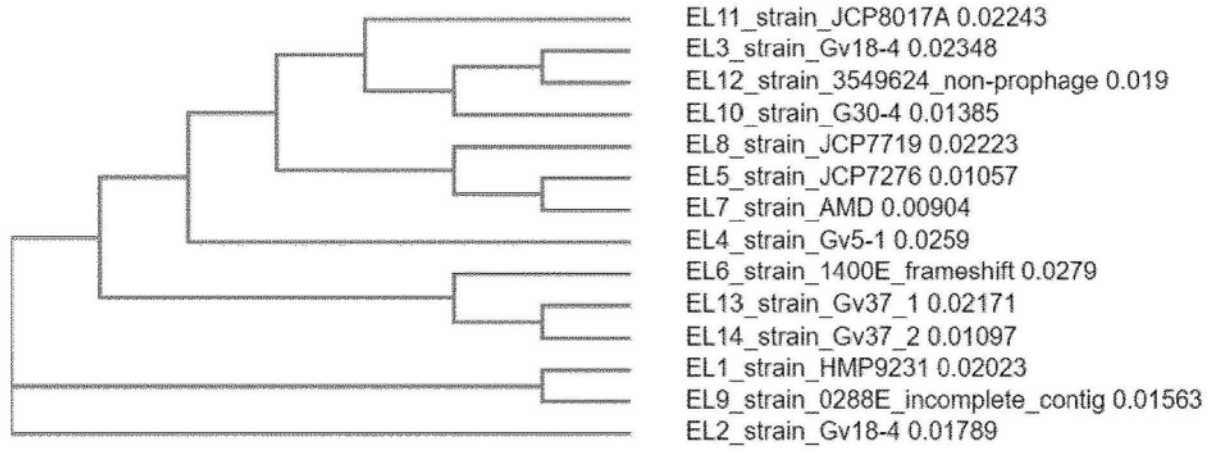


图2

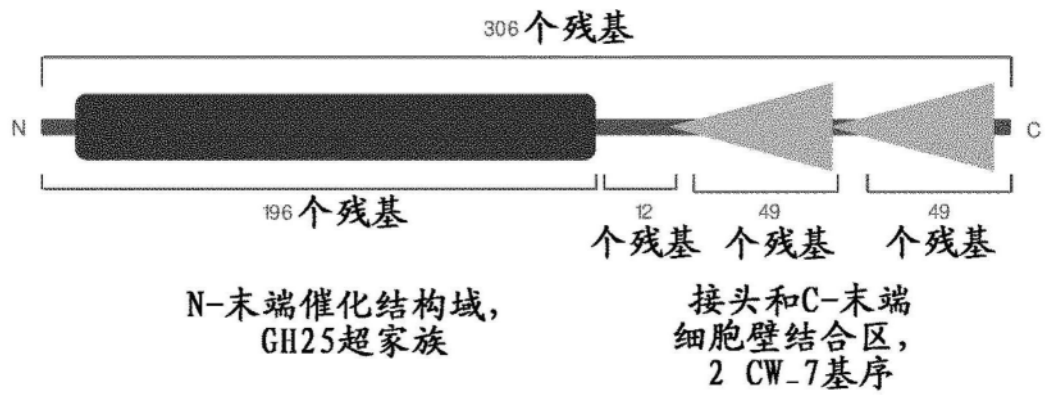


图3

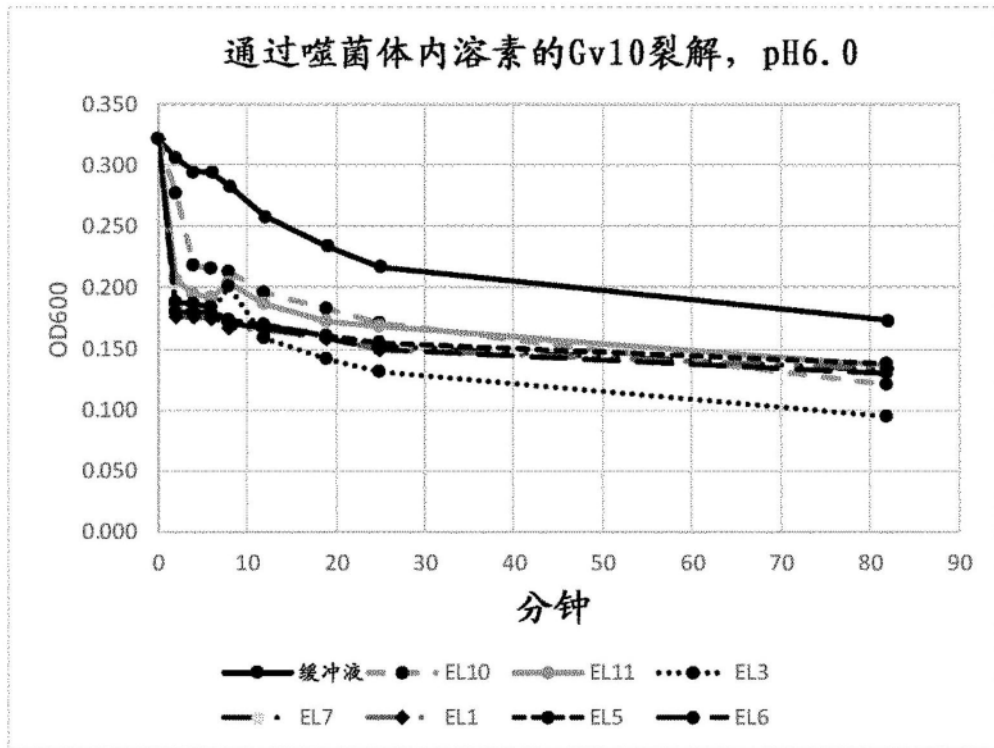


图4A

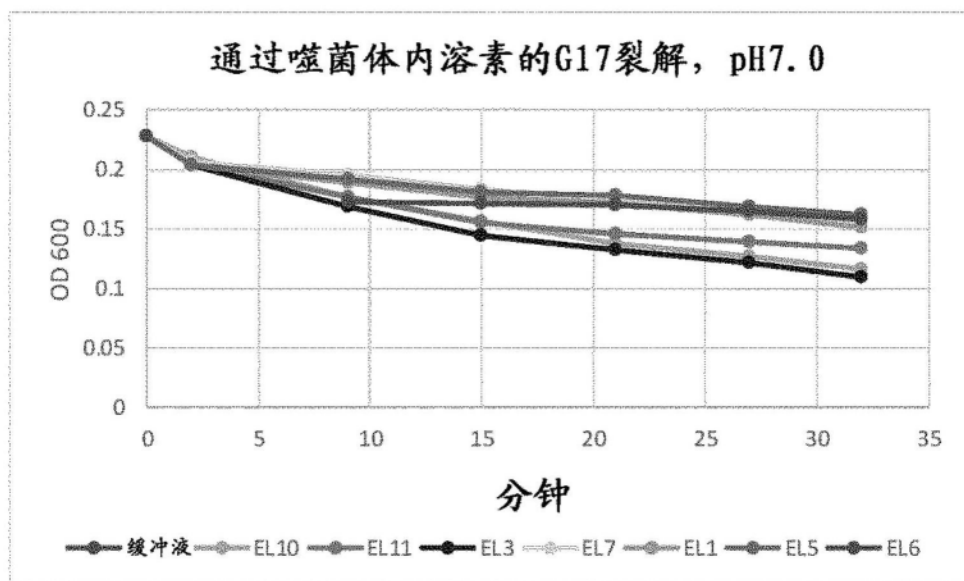


图4B

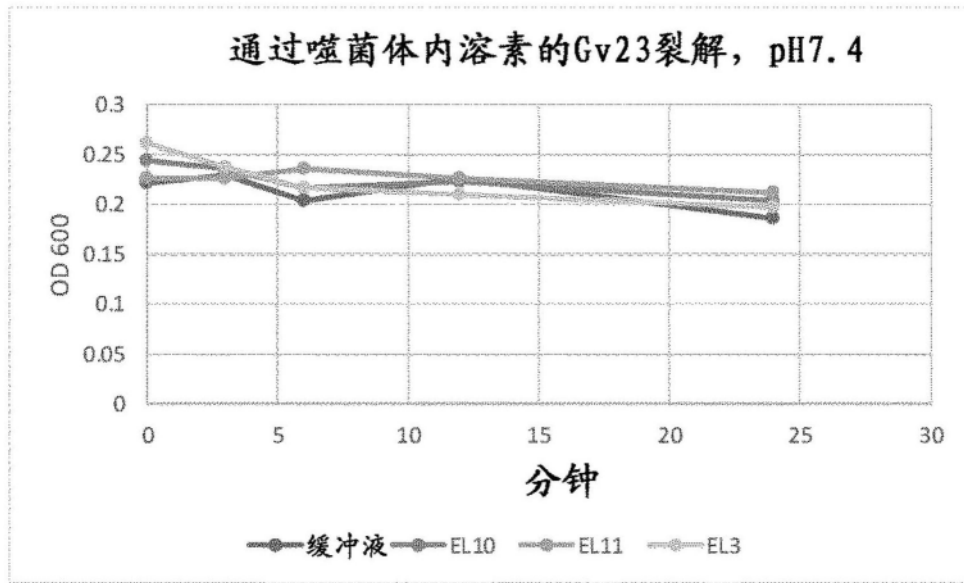


图4C

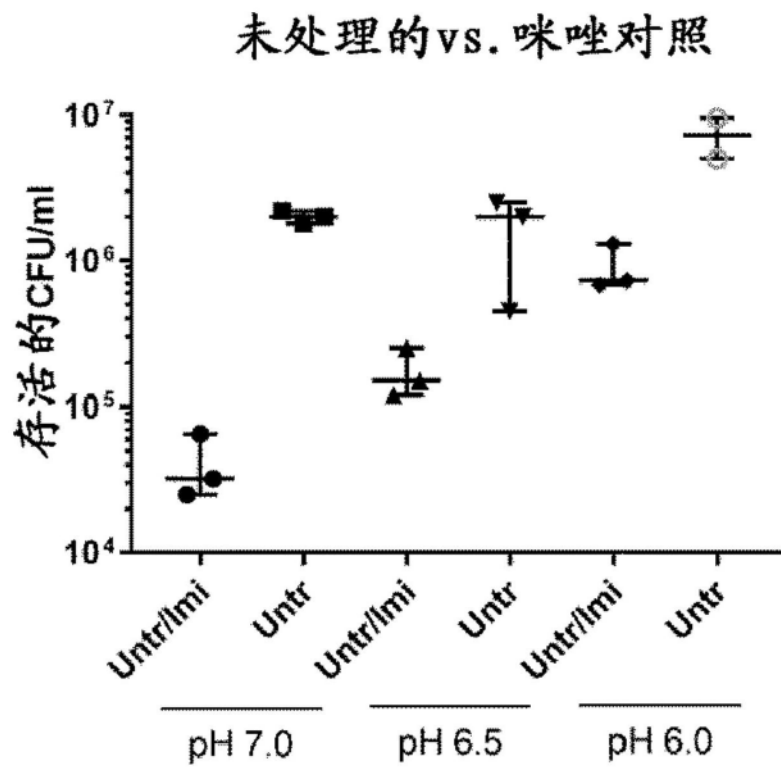


图5

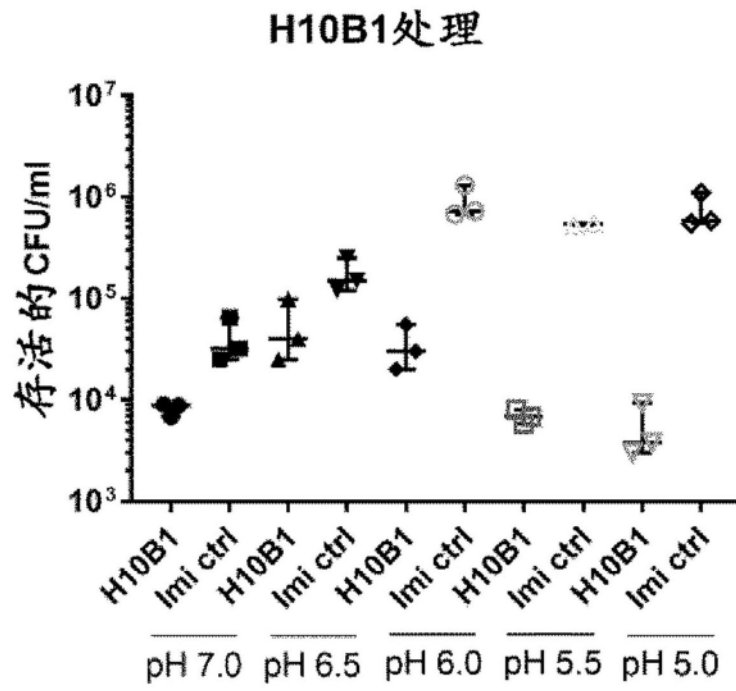


图6

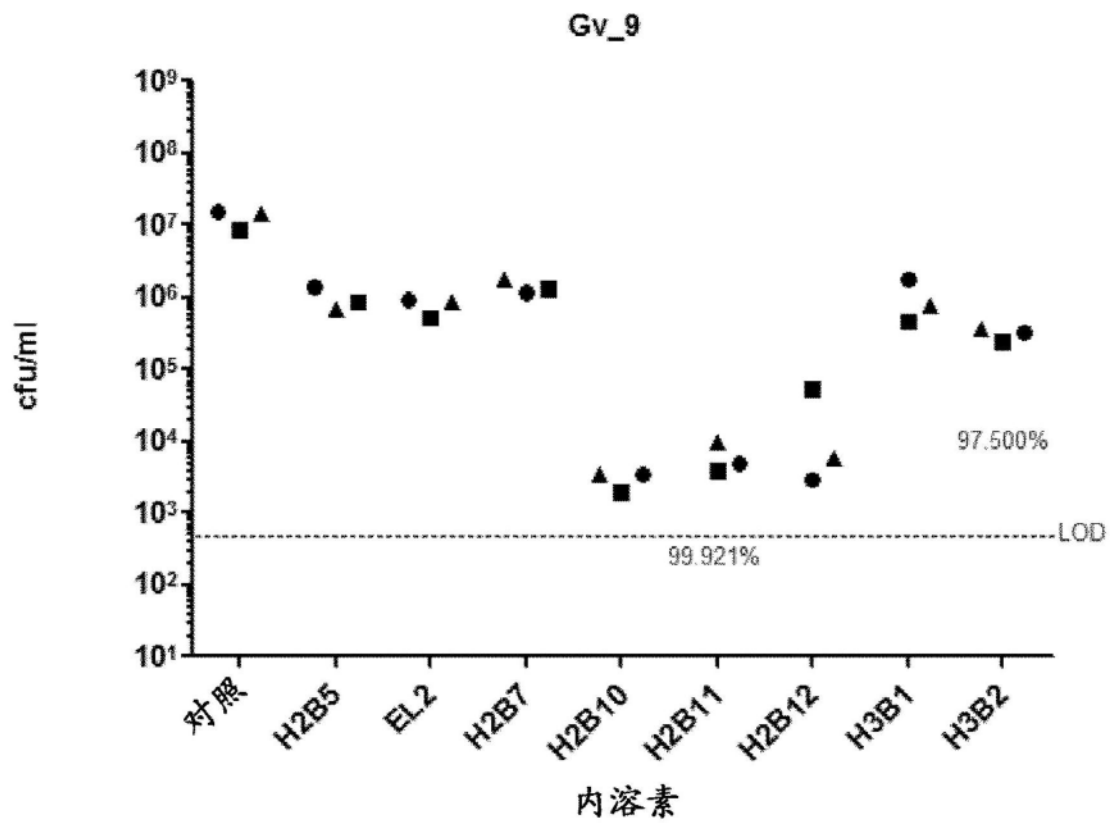


图7A

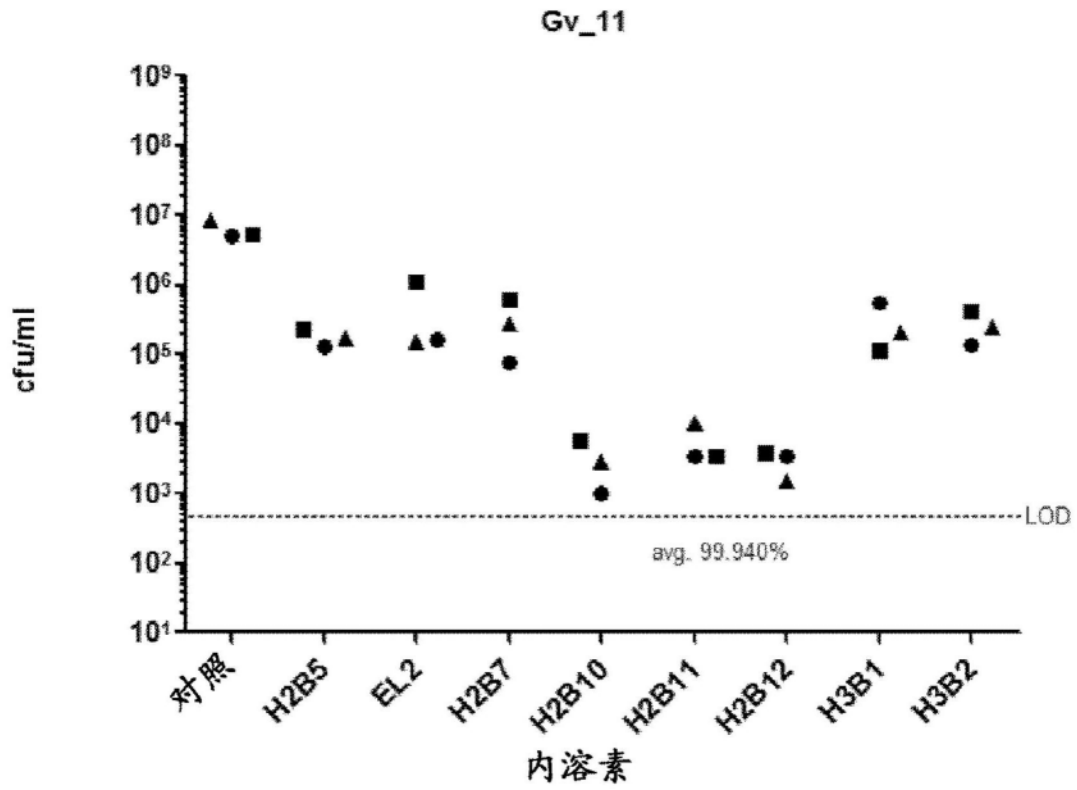


图7B

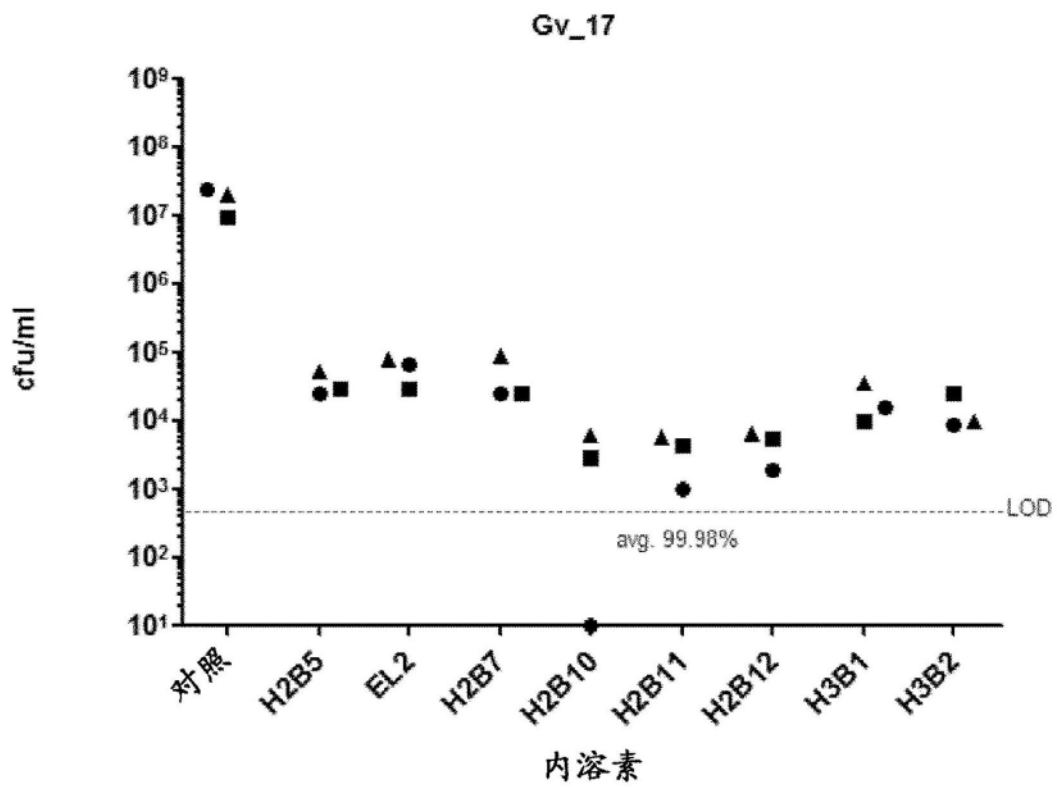


图7C

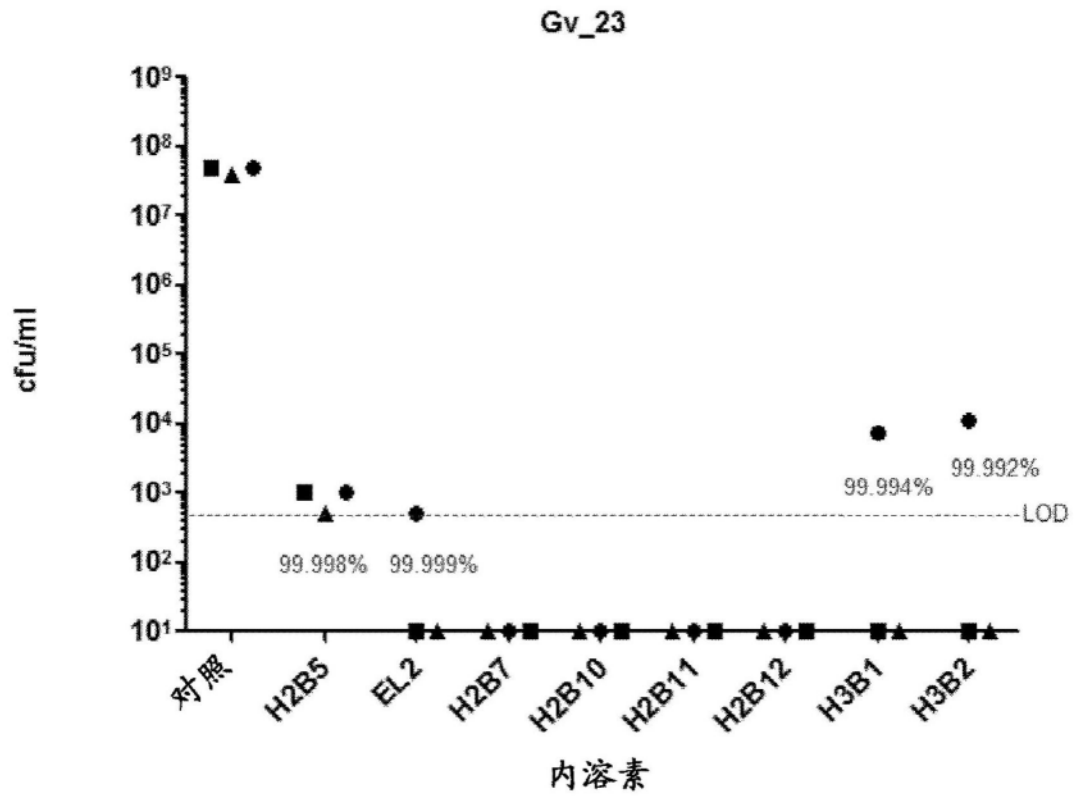


图7D

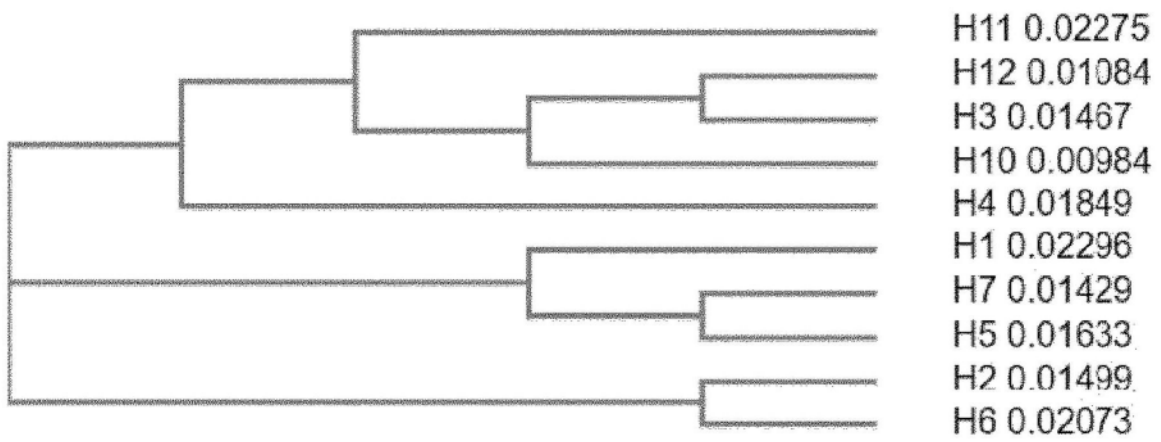


图8

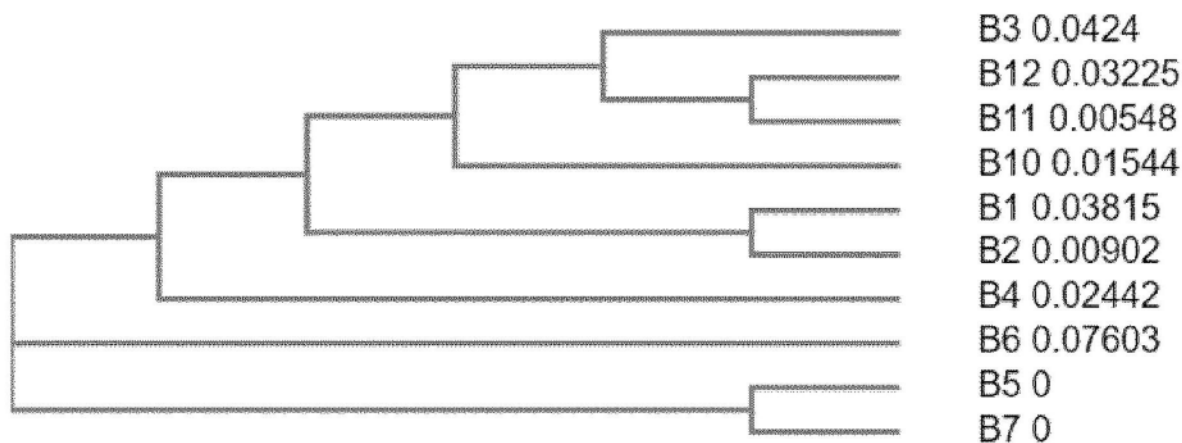


图9

B3_C	GVKAYRKSVDLAREVIRGTWNGNSMRKHRLTQAGYDYDAVQKRVNELL	49
B12_C	GVKAYRKSVDLAREVIRGTWNGNKTRKQRLTQAGYDYNQKRVNELL	49
B10_C	GVKAYRKSVDLAREVIRGTWNGSSTRKQRLTQAGYDYNQKRVNELL	49
B11_C	GVKAYRKSVDLAREVIRGTWNGSSTRKQRLTQAGYDYDAVQKRVNELL	49
B1_C	GVKACRKSVDLAREVIRGAWNGSSTRKQRLAQAGYDYDTVQKRVNELL	49
B2_C	GVKACRKSVDLAREVIRGTWNGSSTRKQRLTQAGYDYDTVQKRVNELL	49
B4_C	GVKAYRKSVDLAREVIRGTWNGNERKQRLAQAGYDYDTVQKRVNELL	49
B5_C	GVKACRKSVDLAREVIRGTWNGNERKNRLTQAGYDYDTVQKRVNELL	49
B7_C	GVKACRKSVDLAREVIRGTWNGNERKNRLTQAGYDYDTVQKRVNELL	49
B10_N	YTAPQISSIDEVAREVINGDWNGNERKQRLTSAGYDYASVQNKVNELL	49
B3_N	YTAPQTSSIDEVAREVINGDWNGNDRKNRLISAGYDYASVQNKVNELL	49
B11_N	YTAPQTSSIDEVAREVINGDWNGNERKNRLTSAGYDYTSVQNKVNELL	49
B12_N	YTAPQTSSIDEVAREVINGDWNGNIERKNRLTSAGYDYTSVQNKVNELL	49
B6_N	NQAARTSSIDVAREVINGAWNGNERKQRLTQAGYDYASVAK-----	43
B5_N	DQAARTSSIDEVAREVINGAWNGNERKQRLTQAGYDYTSVQNKVNKLL	49
B7_N	DQAARTSSIDEVAREVINGAWNGNERKQRLTQAGYDYTSVQNKVNKLL	49
B4_N	DQATRTSSIDEVAREVINGAWNGNERKQRLTSAGYDYASVQNKVNKLL	49
B1_N	DQAARTSSIDEVAREVINGAWNGSSTRKQRLTSAGYDYASVQNKVNELL	49
B2_N	DQAARTSSIDEVAREVINGAWNGNERKQRLTSAGYDYASVQNKVNELL	49
	.:*:*****. * ****. ***:**.:*****.:*:	

图10

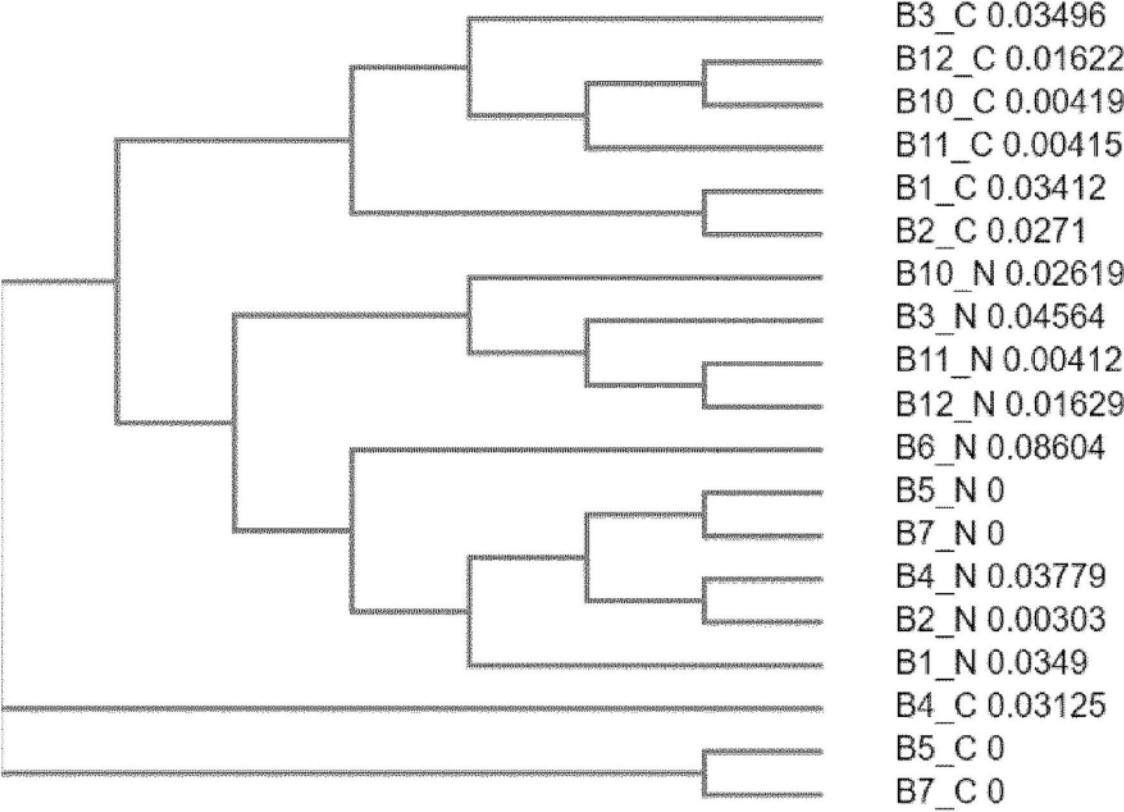


图11

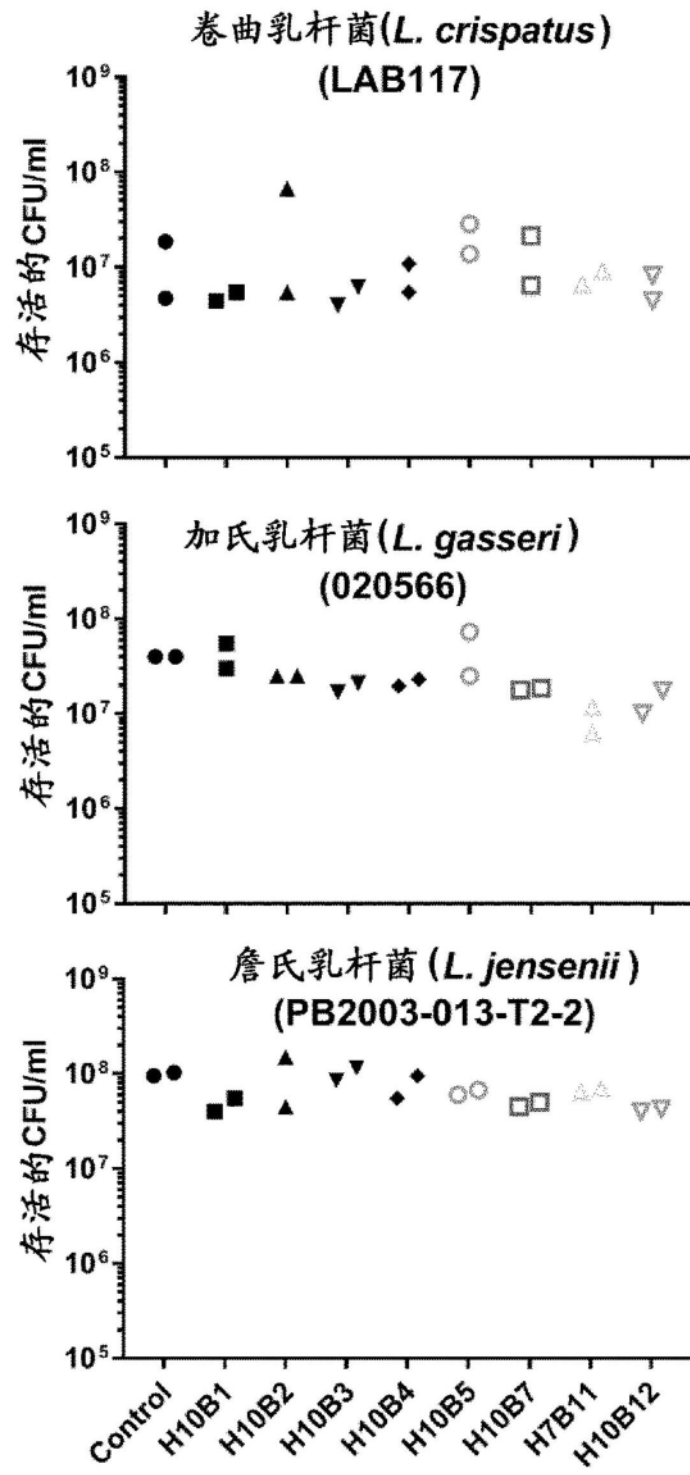


图12

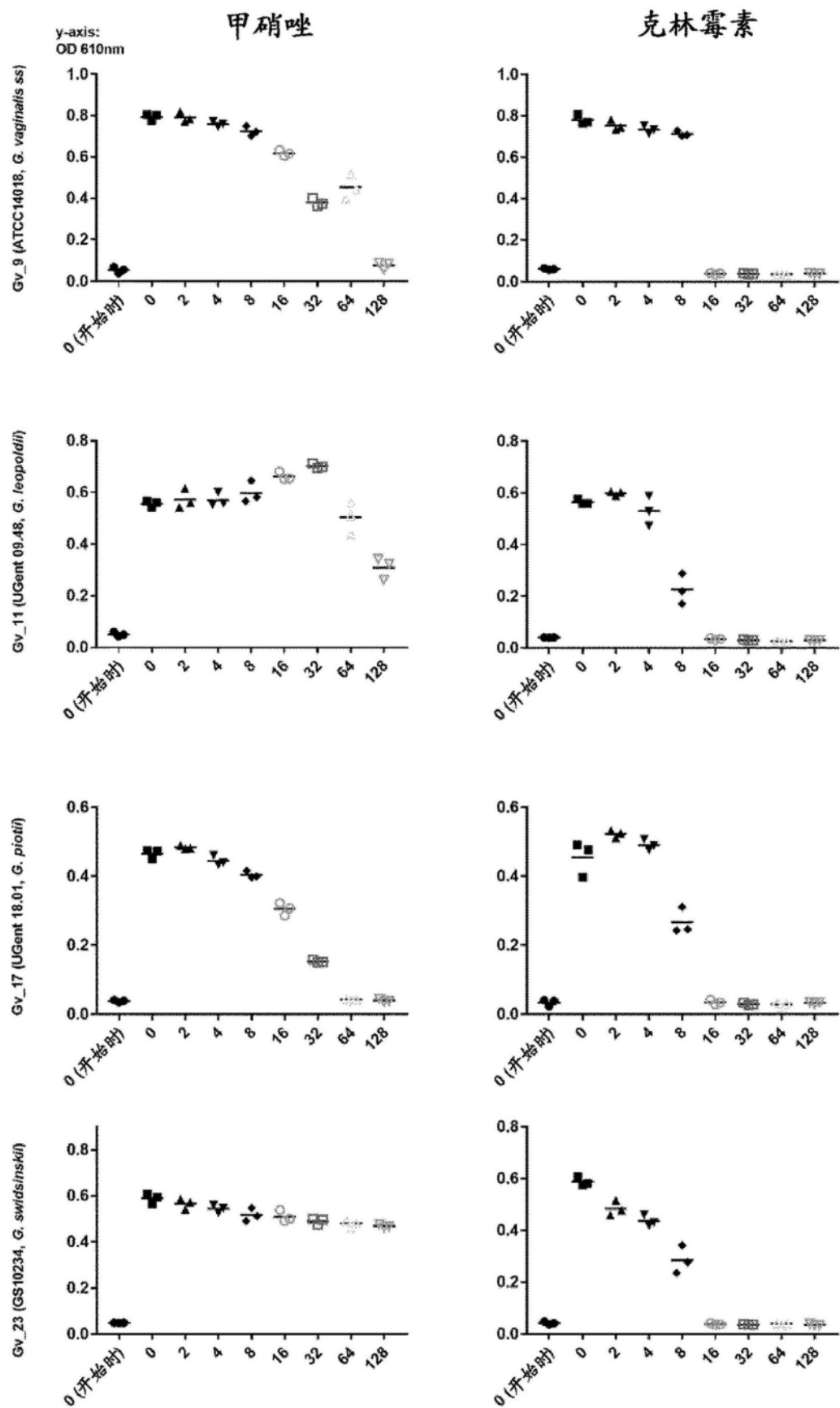


图13

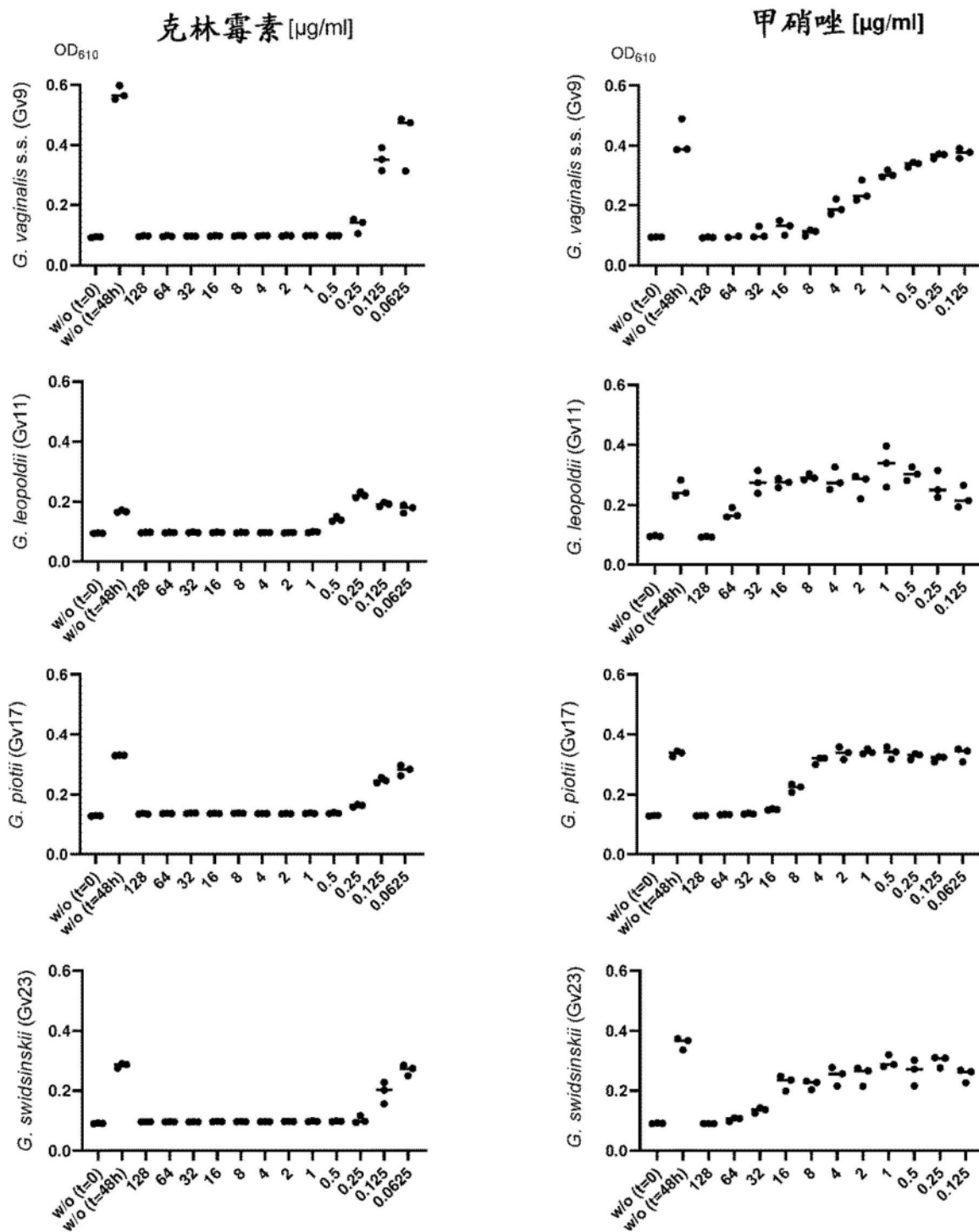


图14

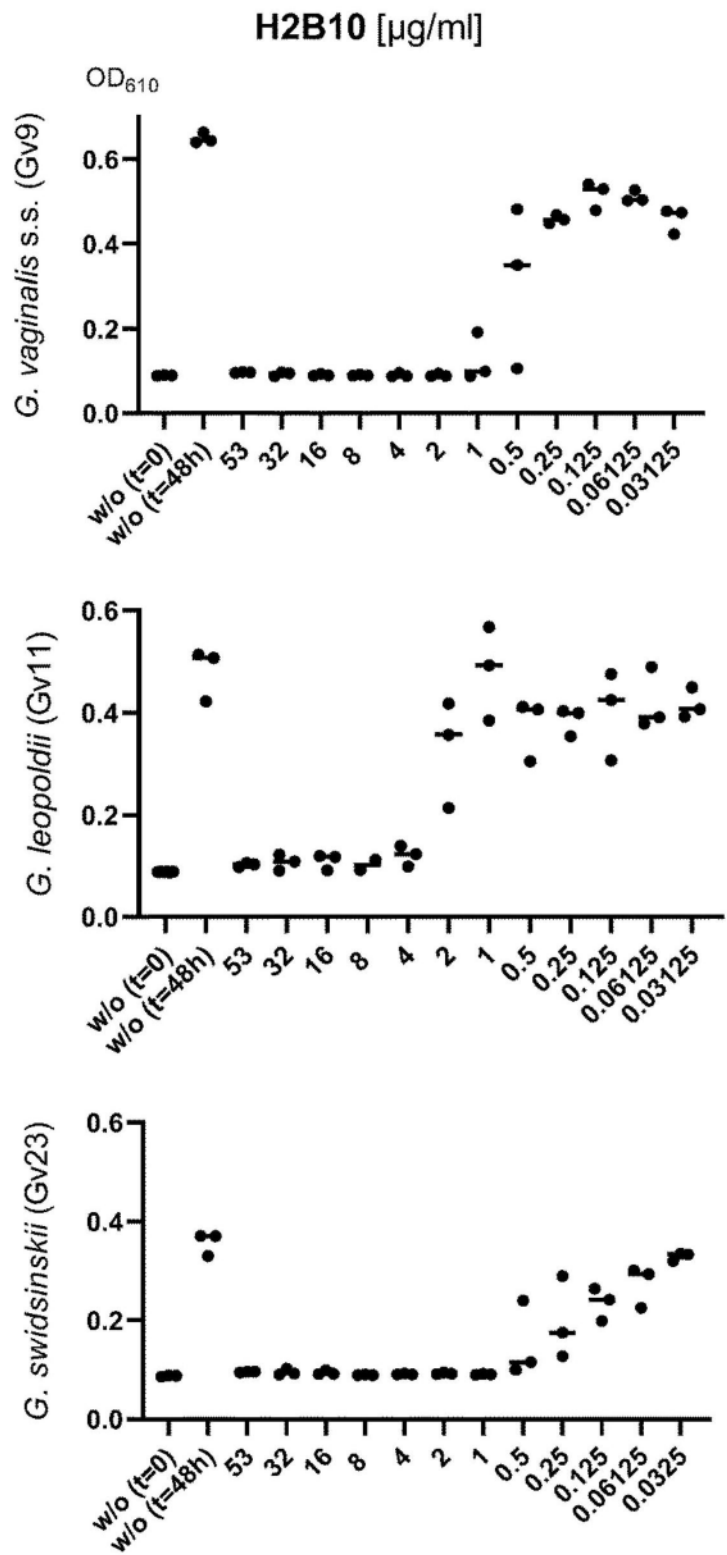


图15