(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 107056902 A
(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710065320.9

(22)申请日 2007.08.17

(30)优先权数据
60/822715 2006.08.17 US
60/827348 2006.09.28 US
60/917178 2007.05.10 US

(62)分案原申请数据
200780038392.9 2007.08.17

(71)申请人 U A B研究基金会
地址 美国阿拉巴马州.伯明罕.大学站
申请人 赛诺菲巴斯德有限公司

(72)发明人 D.E.布莱利斯 S.K.霍林斯黑德
J.耶顿 王乔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 罗文锋

(51)Int.Cl.
*C07K 14/315*(2006.01)
*A61K 39/09*(2006.01)
*A61P 31/04*(2006.01)

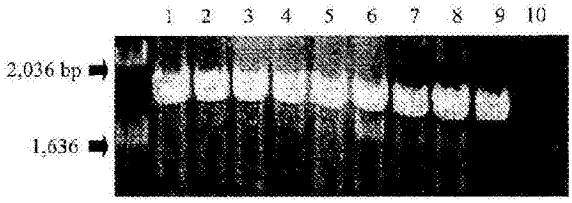
权利要求书1页 说明书23页
序列表23页 附图10页

(54)发明名称

# 免疫原性PcpA多肽和其用途

(57)摘要

本发明涉及免疫原性PcpA多肽和其用途。本文提供了针对肺炎链球菌引起免疫应答的组合物和方法。更具体地,所述组合物和方法涉及免疫原性多肽(包括PcpA的片段)和其变体和编码或表达所述多肽的核酸、载体和转染细胞。还描述了制备和使用所述免疫原性多肽的方法。




CN 107056902 A

1.一种免疫原性PcpA多肽，其包括天然存在的PcpA的N末端区，其中所述免疫原性PcpA多肽缺少天然存在的PcpA的胆碱结合结构域重复序列，并且其中所述PcpA多肽的N末端区包括SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:45或者具有一个或多个保守氨基酸取代的SEQ ID NO:41或具有一个或多个保守氨基酸取代的SEQ ID NO:45。

2.权利要求1的免疫原性PcpA多肽，其中所述PcpA多肽的N末端区包括SEQ ID NO:41、或SEQ ID NO:45。

3.如权利要求1所述的免疫原性PcpA多肽，其中PcpA多肽N末端区包括：SEQ ID NO:45。

4.一种组合物，其包括权利要求1-3中任一项所述的免疫原性PcpA多肽和药学上可接受的载体。

5.如权利要求4所述的组合物，其进一步包括佐剂。

6.如权利要求4所述的组合物，其进一步包括免疫原性葡萄球菌多肽。

7.如权利要求4所述的组合物，其进一步包括免疫原性PspA多肽、免疫原性肺炎球菌溶血素多肽或其组合。

8.如权利要求4所述的组合物，其进一步包括免疫原性肺炎球菌溶血素多肽。

9.如权利要求4所述的组合物，其中所述组合物适于肌内、皮下或粘膜施用。

10.如权利要求9所述的组合物，其中所述用于粘膜施用的组合物是鼻喷雾剂。

11.如权利要求9所述的组合物，其中所述用于粘膜施用的组合物是雾化溶液。

12.如权利要求9所述的组合物，其中所述用于粘膜施用的组合物是气溶胶吸入剂。

13.一种容器，其包括权利要求4所述的组合物。

14.如权利要求13所述的容器，其中所述容器是鼻喷雾器。

15.如权利要求13所述的容器，其中所述容器是雾化器。

16.如权利要求13所述的容器，其中所述容器是吸入器。

17.权利要求1或2所述的免疫原性PcpA多肽在制备用于在受治疗者中产生PcpA特异性抗体的药物中的用途。

18.权利要求1或2所述的免疫原性PcpA多肽在制备用于预防或减少受治疗者肺炎球菌鼻携带的药物中的用途。

19.权利要求1或2所述的免疫原性PcpA多肽在制备用于减少受治疗者感染肺炎球菌的风险的药物中的用途。

20.如权利要求19所述的用途，其中所述肺炎球菌感染是脑膜炎。

21.如权利要求19所述的用途，其中所述肺炎球菌感染是中耳炎。

22.如权利要求19所述的用途，其中所述肺炎球菌感染是肺炎。

23.如权利要求19所述的用途，其中所述肺炎球菌感染是溶血性尿毒症。

24.如权利要求19所述的用途，其中免疫原性PcpA多肽的施用不消除肺炎球菌的鼻携带。

25.如权利要求19所述的用途，其中所述药物进一步包括第二种免疫原性多肽，所述第二种免疫原性多肽选自免疫原性PspA多肽、免疫原性肺炎球菌溶血素多肽或其组合。

26.如权利要求19所述的用途，其中所述药物进一步包括免疫原性肺炎球菌溶血素多肽。

# 免疫原性PcpA多肽和其用途

[0001] 本申请为分案申请，原申请的申请日为2007年8月17日，申请号为200780038392.9(PCT/US2007/076180)，发明名称为“免疫原性PcpA多肽和其用途”。

## 技术领域

[0002] 本公开涉及针对肺炎链球菌引起免疫应答的组合物和方法。更具体地，本公开涉及免疫原性PcpA多肽(包括PcpA的片段)和其变体，和编码所述多肽的核酸。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2006年8月17日提交的美国系列号60/822,715；2006年9月28日提交的美国系列号60/827,348；和2007年5月10日提交的美国系列号60/917,178的优先权，其全部内容在此通过引用并入。

[0005] 联邦赞助研究的声明

[0006] 本发明由政府支持，在美国国立卫生研究院的R01 AI053749、R01 AI21548和T32HL 07553基金支持下进行。政府可以具有本发明的某些权利。

[0007] 背景

[0008] 肺炎链球菌(streptococcus pneumoniae)是非常普遍的人病原体，其可感染多种器官，包括肺、中枢神经系统(CNS)、中耳和鼻腔。感染产生多种症状，例如支气管炎、肺炎、脑膜炎、鼻窦感染和败血症。肺炎链球菌是人细菌性脑膜炎的主要起因，并且即使用抗生素治疗，其仍然伴随着显著的死亡率和发病率(Quagliarello等人，(1992)N.Eng.J.Med.327:864-872)。

[0009] 当前有两种可用的肺炎球菌疫苗。一种是成人疫苗，其由23个不同的荚膜多糖组成，其一起代表引起肺炎球菌感染的约90％菌株的荚膜型。然而，这一疫苗对儿童(对肺炎球菌感染具有高易感性的年龄组)不是免疫原性的。在成人中，所述疫苗已经表现出约60％有效的对抗细菌性肺炎，但是由于年龄或潜在的医疗条件而处于肺炎感染高风险的成人中，其是较不有效的。(Fedson和Musher.2004.″Pneumococcal Polysaccharide Vaccine(肺炎球菌多糖疫苗)，″第529-588页。Vaccines(疫苗)，S.A.Plotkin和W.A.Orenstein(编)，W.B.Saunders and Co.，Philadelphia，PA；Shapiro等人，N.Engl.J.Med.325:1453-1460(1991))。这一疫苗至今还没有表现出有效对抗非细菌性肺炎球菌肺炎(最普通的感染形式)。

[0010] 第二种可用的疫苗是7价结合疫苗，其在小于2岁的儿童中有效对抗细菌性肺炎球菌感染。还证明其对抗肺炎的效力(Black等人，Pediatr.Infect.Dis.21:810-5(2002)；Black等人，Arch.Pediatr.11(7):843-53(2004))。制备这一疫苗是复杂的，因为需要制备7个不同的结合物，这导致所述疫苗昂贵(约200美元/儿童)。此外，所述疫苗不能很好地覆盖发展中世界的感染，在发展中世界中非疫苗类型的肺炎链球菌是非常普通的(Di Fabio等人，Pediatr.Infect.Dis.J.20:959-967(2001)；Mulholland，Trop.Med.Int.Health 10:497-500(2005))。这一疫苗对抗中耳炎和群集(colonization)不如对抗侵袭性疾病那样有效。已表明，使用7价结合疫苗的使用已导致不是由所述疫苗包括的7种多糖代表的荚膜型

的菌株引起的群集和疾病的增加(Bogaert等人,Lancet Infect.Dis.4:144-154(2004);Eskola等人,N.Engl.J.Med.344:403-409(2001);Mbelle等人,J.Infect.Dis.180:1171-1176(1999))。因此,仍然需要肺炎链球菌的有效治疗。

[0011] 概述

[0012] 描述了针对肺炎链球菌引起免疫应答的组合物和方法。更具体地,本公开涉及免疫原性PcpA多肽(包括PcpA的片段)和其变体,和编码所述多肽的核酸。本公开进一步涉及制备和使用所述免疫原性多肽的方法。与目前可用的设计用于减少或预防肺炎球菌感染的组合物和方法相比,本发明的组合物和方法提供提高的效力和效率,并且降低了成本。

## 附图说明

[0013] 图1表示pcpA的PCR验证。多种肺炎链球菌菌株的基因组DNA的PCR分析。使用引物对(BGP1(SEQ ID NO:50)和BGP2(SEQ ID NO:51))扩增编码PcpA的N末端部分(包括LRR区)的核酸。泳道1,TIGR4;泳道2,L82013;泳道3,D1091B;泳道4,BG12730;泳道5,TJ0893;泳道6,R6;泳道7,BG10752;泳道8,V175;泳道9,EF3030;泳道10,阴性对照(非模板DNA)。

[0014] 图2表示在低Mn2+条件下的PcpA存在的蛋白质印迹分析。细菌在低Mn2+培养基中培养直到对数中期,并且制备总细胞蛋白质样品。样品通过SDS-PAGE分离,转移到硝酸纤维素并以rPcpA多克隆抗血清探测。泳道1,JEN11(pcpA-突变体);泳道2,JEN7(pcpA组成型突变体);泳道3,D1091B;泳道4,EF5668;泳道5,BG10752;泳道6,V175;泳道7,L82013;泳道8,BG12730;泳道9,TJ0893。

[0015] 图3表明,与仅佐剂比较,rPcpA免疫赋予的保护在肺炎的鼠模型中是统计学上显著的。用吸附于氢氧化铝的rPcpA或仅氢氧化铝皮下免疫CBA/N小鼠。在轻微的麻醉下,用5×$10^6$CFU的EF3030鼻内攻击小鼠。感染后7天处死小鼠,并且确定肺匀浆(图3A)和鼻洗液(图3B)中的细菌计数。水平线指中值Log10CFU(**:p=0.0019,Mann-Whitney)。

[0016] 图4表明,与仅佐剂比较,rPcpA免疫赋予的针对其他肺炎链球菌荚膜血清型的保护在肺炎的鼠模型中是统计学上显著的。小鼠用菌株(图4A)TJ0893,血清型14(**:p=0.0209);(图4B)L82016,血清型6B(**:p=0.0193);或(图4C)EF9303,血清型23F(**:p=0.0388,Mann-Whitney)攻击。水平线指中值Log10CFU。

[0017] 图5表示pcpA失活对肺炎链球菌的鼻内群集的效应。小鼠用$10^6$CFU的EF3030或其衍生物JEN18鼻内攻击。感染后7天处死小鼠并且确定鼻洗液的细菌计数。水平线指中值Log10CFU/鼻。

[0018] 图6表示与仅佐剂比较,rPcpA免疫赋予的保护在致命的败血症的鼠模型中是统计学上显著的。用吸附于氢氧化铝的rPcpA或仅氢氧化铝皮下免疫CBA/N小鼠。用300CFU的TIGR4静脉内攻击小鼠并且监测其存活时间,持续21天。水平线指中值存活时间(**:p=0.0067,Mann-Whitney)。将存活的小鼠安乐死,且当检查时它们的血液中没有可检测的肺炎链球菌。

[0019] 图7表示TIGR4和其pcpA失活衍生物JEN11在败血症的鼠模型中的毒性。用300CFU的TIGR4或JEN11静脉内攻击小鼠并且监测其存活时间,持续21天。水平线指中值存活时间(**:p=0.0299,Mann-Whitney)。

[0020] 图8表示,与仅佐剂相比,rPcpA粘膜免疫在肺炎的鼠模型中提供保护。用rPcpA和

霍乱毒素B的亚单位(CTB)或仅CTB鼻内免疫CBA/N小鼠。在轻微的麻醉下,用5×$10^6$CFU的EF3030鼻内攻击小鼠。感染后7天处死小鼠,并且确定肺匀浆中的细菌计数。水平线指中值Log10CFU(*:p=0.0001,Mann-Whitney)。

[0021] 图9表示pcpA+和pcpA-TIGR4菌株(分别为TIGR4和JEN11)对人肺上皮细胞的粘附。A549人肺上皮细胞单层和$10^6$CFU的pcpA+和pcpA-TIGR4菌株一起孵育150分钟,所述菌株已在高锰(高$Mn^{2+}$)或低锰(低$Mn^{2+}$)的生长条件下生长。清洗并溶解所述上皮细胞。在每个溶解产物中粘附的肺炎球菌的数量通过在血液琼脂平板上定量铺板确定。回收的Log 10CFU指实验结束时与肺上皮细胞结合的肺炎球菌的数量(**:p=0.0022,Mann-Whitney)。

[0022] 图10表示pcpA+和pcpA-TIGR4菌株没有粘附于人鼻上皮细胞。Detroit562人鼻上皮细胞单层和$10^6$CFU的pcpA+和pcpA-TIGR4菌株一起孵育150分钟,所述菌株已在高锰(高$Mn^{2+}$)或低锰(低$Mn^{2+}$)的生长条件下生长。然后清洗并溶解所述细胞。溶解产物中肺炎球菌的数量通过在血液琼脂平板上定量铺板确定。回收的Log 10CFU指实验结束时肺炎球菌的数量。

[0023] 图11表示PcpA的抗体对肺炎球菌粘附于A549细胞的抑制。A549人肺上皮细胞单层和$10^6$CFU的pcpA+和pcpA-TIGR4菌株一起,所述菌株在没有抗体、有1/100稀释或1/50稀释的PcpA抗体的高锰(高$Mn^{2+}$)或低锰(低$Mn^{2+}$)下生长。清洗并溶解所述细胞。溶解产物中肺炎球菌的数量通过在血液琼脂平板上定量铺板确定。

[0024] 图12表示使用针对PcpA的兔血清防御败血症。兔血清通过以下制备:用在弗氏完全佐剂中的100μg rPcpA免疫兔,随后在二和四周后用在弗氏完全佐剂中的100μg rPcpA免疫兔。最终加强(boost)后两周收集血清,并且通过点印迹测定表明其含有PcpA的抗体。在免疫开始前还收集了预免疫血清。分两组对小鼠检测兔抗血清的稀释物防御致命肺炎球菌感染的能力。在用TIGR4静脉内攻击前一小时,三组小鼠腹膜内接受免疫血清的0.1mL的1/10、1/100或1/1000稀释物。两只小鼠接受1/10预免疫(未免疫)兔血清并且两只小鼠仅接受稀释剂PBS。观察小鼠持续500小时或直到死亡的时候。接受1/10免疫血清的两只小鼠在整个实验中存活。所有其他的小鼠在攻击后40和60小时之间死亡。

[0025] 图13表示用PcpA和肺炎球菌溶血素(Ply)防御肺感染。小鼠用5μg rPcpA、5μg肺炎球菌溶血素(Ply)或5μg rPcpA加5μg Ply免疫3次。最先的两次注射是和明矾(alum)一起,并且第三次注射仅用蛋白质。使用的Ply是野生型Ply。小鼠用异氟烷(MinRAD,Buffalo,NY)麻醉(anethesized)并用40μL体积的5x$10^6$CFU的荚膜型19F菌株EF3030鼻内(i.n.)攻击。这一步骤导致肺感染和鼻的群集。七天后处死小鼠并且铺板匀浆的肺。观察到的CFU表明用PcpA或Ply免疫产生相似水平的保护。用PcpA和Ply免疫的小鼠产生与对照小鼠相比超过100倍的保护和与仅Ply或PcpA免疫相比超过10倍的保护。

[0026] 图14是表示质粒pJMS87的构建简图,所述质粒pJMS87由质粒pET30a和编码PcpA(来自肺炎链球菌菌株B6的ΔSPΔCBD PcpA)片段的核酸连接形成。

[0027] 图15A和15B是在鼠败血症模型中用实施例8的重组PcpA(rPcpA)(10至0.625μg/剂)免疫小鼠赋予的保护的图示。小鼠用300CFU的菌株WUBM3腹膜内攻击。图15A表明当与佐剂对照组(PBS)比较,在一段时间内,rPcpA以每种剂量免疫的小鼠被显著保护(费舍尔精确检验)。图15B表示攻击后第7天每组的保护的水平。

[0028] 图16是在小鼠肺炎模型中用实施例8的rPcpA免疫赋予的保护的图示。组1至6用安

慰剂(组1)、PspA(组2)或rPcpA(组3至6)免疫。大约每组14只CBA/N小鼠在第0天用初始剂量的免疫原皮下(s.c.)免疫。第二次免疫在第21天执行并且第三次免疫在第43天。在第63天，小鼠用5.6x10$^6$CFU的肺炎链球菌菌株EF3030鼻内攻击。感染五天后，确定匀浆肺组织中的CFU。

[0029] 详细描述

[0030] 本文描述了PcpA的免疫原性片段和变体以及制备和使用所述片段和变体的方法。最初被鉴定为肺炎链球菌的胆碱结合蛋白(CBP)的PcpA不同于CBP蛋白质PspA和PspC(Sanchez-Beato等人,FEMS Microbiol.Lett.164:207-214(1998))，并且已经表明pcpA的突变引起(1)在竞争模型中(其中允许突变菌株和野生型菌株竞争)，在小鼠的肺、菌血症和鼻咽中减少毒性(Hava和Camilli,Mol.Microbiol.45:1389-1406(2002))；(2)在肺群集的非竞争比较中，减少毒性和细菌负载量(Johnston等人,Infect.Immun.74:1171-1180(2006))；(3)减弱侵袭性菌株TIGR4(荚膜型4)肺炎链球菌在CBA/CaHN-Btkxid/J小鼠中引起败血症的能力;以及(4)与野生型菌株的竞争中减少肺群集。本公开首次提供PcpA是免疫原性的并且，特别地，PcpA的片段和变体是免疫原性的证据。

[0031] 免疫原性多肽包括全长PcpA氨基酸序列(存在或不存在信号序列)、其片段和其变体。全长PcpA包括来自肺炎链球菌菌株B6的GenBank登录号CAB04758、来自肺炎链球菌菌株TIGR4的GenBank登录号NP_346554和来自肺炎链球菌菌株R6的GenBank登录号NP_359536。

[0032] 任选地，PcpA的免疫原性多肽包括一个或多个亮氨酸富集区(LRR)。这些LLR存在于天然存在的PcpA或与天然存在的LRR具有约60％至约99％的序列同一性，包括例如80％、85％、90％或95％的序列同一性。成熟PcpA蛋白质(即缺少信号肽的蛋白质)中的LRR可见于SEQ ID NO:1、2、41或45。

[0033] PcpA的免疫原性多肽任选地缺少通常存在于天然存在的成熟PcpA蛋白质中的胆碱结合锚序列。所述天然存在的胆碱结合锚序列是成熟PcpA蛋白质的SEQ ID NO:52。更具体地，免疫原性多肽包含具有一个或多个氨基酸取代的天然存在的PcpA的N末端区，并与天然存在的PcpA具有约60％至约99％的序列同一性或其之间的任何同一性，例如80％、85％、90％和95％的同一性。所述N末端区可包括SEQ ID NO:1、2、3、4、41或45的氨基酸序列，其存在或缺少一个或多个保守氨基酸取代并且存在或缺少信号序列。所述N末端区可包括与SEQ ID NO:1、2、3、4、41或45具有约60％至约99％的序列同一性(或80％至99％的同一性之间的任何同一性)的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:1、2、3、4、41或45的免疫原性片段包括SEQ ID NO:1、2、3、4、41或45的5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190和191个氨基酸残基或在5和191之间的任何数量的氨基酸残基。作为例子，所述片段的例子包括含有以下的氨基酸:LEKIEDRAFD(SEQ ID NO:5)、FSELEEIELP(SEQ ID NO:6)、ASLEYIGTSA(SEQ ID NO:7)、FSFSQKLKKL(SEQ ID NO:8)、TFSSSSKLEL(SEQ ID NO:9)、ISHEAFANLS(SEQ ID NO:10)、NLEKLTLPKS(SEQ ID NO:11)、VKTLGSNLFR(SEQ ID NO:12)、LTTSLNMLML(SEQ ID NO:13)、LTTSLKHVDV(SEQ ID NO:14)、RGMIVASVDG(SEQ ID NO:15)、EEGNESFASVDG(SEQ ID NO:16)、VSFQSKTQLI(SEQ ID NO:17)、VLFSKDKTQLI(SEQ ID NO:18)、YYPSQKNDES(SEQ ID NO:19)、YKTPKETKEL(SEQ ID NO:20)、ASYSFNKNSY(SEQ ID NO:21)、LKKLELNEGL(SEQ ID NO:22)、QKIGTFAFAD(SEQ ID NO:23)、EKIGTFAFAD(SEQ ID NO:24)、ATKLEEISLP(SEQ ID

NO:25)、AIKLEEISLP(SEQ ID NO:26)、NSLETIERLA(SEQ ID NO:27)、FYGNLELKELIL(SEQ ID NO:28)。

[0035] 任选地,PcpA的免疫原性多肽缺少LRR。缺少LRR的免疫原性多肽的例子包括SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31或含有5个或更多氨基酸残基的SEQ ID NO:29、30或31的任何免疫原性片段。SEQ ID NO:30和31包括PcpA亮氨酸富集区的残基C末端。

[0036] 本文描述的免疫原性多肽的变体可包括一个或多个保守氨基酸取代。免疫原性多肽的变体包括与SEQ ID NO:1至31、41和45或其任何片段具有约60%至约99%的序列同一性(或60%和99%同一性之间的任何同一性)的氨基酸序列。使用本文教导的方法选择变体的免疫原性能力(capacity)。

[0037] 本文描述的PcpA的免疫原性多肽包括PcpA的片段和所述片段的变体。PcpA片段的变体可包括氨基酸序列修饰。例如,氨基酸序列的修饰包括取代、添加或缺失的变化。取代、缺失、添加或其任何组合可组合在单一变体中,只要所述变体是免疫原性多肽。添加包括氨基和/或羧基末端融合以及单一或多个氨基酸残基的序列内添加。添加通常将是比氨基或羧基末端融合的添加小的添加,例如大约一至四个残基。缺失以从蛋白质序列中移除一个或更多的氨基酸残基为特征。通常,在蛋白质分子的任何一个位点上缺失不超过约2至6个残基。这些变体通常如下制备:位点特异性诱变编码所述蛋白质的DNA中的核苷酸,从而产生编码所述变体的DNA,并且此后在重组细胞培养物中表达所述DNA。在具有已知序列的DNA中的预定位点产生取代突变的技术是熟知的并且包括但不限于M13引物诱变和PCR诱变。氨基酸取代通常是单一残基,但是可一次出现在多个不同的位置。取代的变体是其中至少一个残基已经被移除并且不同的残基添加入其位点的变体。所述取代通常根据以下表1进行并且被称为保守取代。然而,本领域技术人员熟知其他的取代。

[0038] 表1.保守氨基酸取代

[0039]

| 原始残基 | 示例取代 | 原始残基 | 示例取代 |
|---|---|---|---|
| Arg | Lys | Leu | Ile, Val |
| Asn | Gln | Lys | Arg, Gln |
| Asp | Glu | Met | Leu, Ile |
| Cys | Ser | Phe | Met, Leu, Tyr |
| Gln | Asn | Ser | Thr |
| Glu | Asp | Thr | Ser |
| Gly | Pro | Trp | Tyr |
| His | Gln | Tyr | Trp, Phe |
| Ile | Leu, Val | Val | Ile, Leu |

[0040] 如本文所用,变体还可包括来自替代菌株的天然存在的pcpA等位基因,所述替代菌株在同源pcpA基因中的一个或多个位点表现出多态性。变体可通过常规分子生物学技术制备。本文就与天然存在的pcpA比较的序列同一性来描述变体。本领域技术人员容易理解

如何确定两个多肽或核酸的序列同一性。例如，所述序列同一性可在比对所述两个序列后计算，以致所述同一性在其最高水平。比对在一定程度上依赖于比对程序中具体算法的使用。这可包括，例如Smith和Waterman Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法、Needleman和WunschJ.MoL Biol.48:443(1970)的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman PNAS USA 85:2444(1988)的搜索相似性方法、通过这些算法的计算机化实现(Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA，Genetics Computer Group，575 Science Dr.，Madison，WI)、BLAST和BLAST 2.0以及在以下文献中描述的算法：Altschul等人，Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1977；Altschul等人，J.Mol.Biol.215:403-410,1990；Zuker,M.Science 244:48-52,1989；Jaeger等人PNAS USA 86:7706-7710,1989和Jaeger等人Methods Enzymol.183:281-306,1989。通过引用至少与比对和同一性计算相关的材料而并入这些参考文献中的每一个。应理解，通常可使用任何所述的方法，并且在某些例子中，这些多种的方法的结果可不同。在将序列同一性提供为如95％时，那么所述同一性必须是用至少一种公认计算方法可检测的。

[0041] 本文描述的免疫原性多肽可包括一种或多种氨基酸类似物或非天然存在的立体异构体。这些氨基酸类似物和立体异构体可容易地掺入多肽链，其通过将选择的氨基酸载入tRNA分子并且构建使用例如琥珀密码子的遗传构建体以将类似氨基酸以位点特异性方式插入肽链(Thorson等人，Methods in Molec.Biol.77:43-73(1991)，Zoller，Current Opinion in Biotechnology，3:348-354(1992)；Ibba，Biotechnology&Genetic Engineering Reviews 13:197-216(1995)，Cahill等人，TIBS，14(10):400-403(1989)；Benner，TIB Tech，12:158-163(1994)；Ibba和Hennecke，Bio/technology，12:678-682(1994)至少对于氨基酸类似物相关的材料，通过引用在此并入所有文献)。可制备类似于肽的免疫原性片段，但是其不经由天然的肽键连接。例如，氨基酸或氨基酸类似物的键可包括CH2NH-、-CH2S-、-CH2-CH2-、-CH＝CH-(顺式和反式)、-COCH2-、-CH(OH)CH2-和-CHH2SO-(这些键和其他键可参见Spatola，A.F."Peptide backbone modifications:A structure-activity analysis of peptides containing amide bond surrogates，conformational constraints，and related backbone modifications(肽主链修饰：含有酰胺键替代、构象限制和相关主链修饰的肽的结构活性分析)."Chemistry and Biochemistry of Amino Acids，Peptides，and Proteins(氨基酸、肽和蛋白质的化学和生物化学)，第267-357页，Weinstein，B.编辑，Marcel Dekker，New York，N.Y.(1983)；Morley，Trends in Pharm.Sci.1(2):463-468(1980)；Hudson等人，Int J Pept Prot Res 14:177-185(1979)(-CH2NH-、CH2CH2-)；Spatola等人Life Sci 38:1243-1249(1986)(-CH H2-S)；Hann，Journal of the Chemical Society；Perkin Transactions 1第307-314页(1982)(顺式和反式的-CH-CH-)；Almquist等人，J.Med.Chem.23:1392-1398(1980)(-COCH2-)；Jennings-White等人，Tetrahedron Lett 23:2533(1982)(-COCH2-)；欧洲公布第EP0045665号，Szelke等人(1982)(-CH(OH)CH2-)；Holladay等人，Tetrahedron.Lett 24:4401-4404(1983)(-C(OH)CH2-)；和Hruby Life Sci 31:189-199(1982)(-CH2-S-)；至少对于关于键的材料，通过引用在此并入每篇文献)。

[0042] 氨基酸类似物和立体异构体通常具有增强的或预期的性质，例如更加经济的制备、更好的化学稳定性，增强的药理学性质(半衰期、吸收、效价、效力等等)、改变的特异性

(例如广谱生物学活性)以及其他。例如,因为天然存在的肽酶不识别D氨基酸,所以可使用D-氨基酸产生更加稳定的肽。用同类型的D氨基酸系统取代共有序列的一个或多个氨基酸(例如D-赖氨酸取代L-赖氨酸)可用于制备更加稳定的肽。半胱氨酸残基可用于将两个或更多的肽环化或连接到一起。这可有益于将肽限制为特定的构象(Rizo和Gierasch Ann.Rev.Biochem.61:387(1992),通过引用在此并入)。

[0043] 本文描述了含有PcpA免疫原性多肽和药学上可接受的载体的组合物。任选地,所述组合物进一步包括佐剂。含有免疫原性多肽的组合物可含有其他免疫原性多肽的组合,包括例如免疫原性葡萄球菌(Staphylococcus)多肽或PspA的免疫原性片段、肺炎球菌溶血素或其组合。

[0044] 任选地,本文描述的组合物适于施用于粘膜表面。例如,所述组合物可是鼻喷雾剂、雾化溶液或气溶胶吸入剂。因此,所述化合物可存在于容器中并且所述容器可是鼻喷雾器、雾化器或吸入器。

[0045] 药学上可接受的载体指不是生物学上地或以其他方式地不期望的材料,即所述材料可与PcpA的免疫原性片段一起施用于受治疗者,且不引起任何不期望的生物效应或以有害的方式与药物组合物(其中包含所述材料)的任何其他成分相互作用。如本领域技术人员所熟知,可自然挑选所述载体以将活性成分的任何降解降至最低并且将受治疗者的任何不良的副反应降至最低。

[0046] 合适的载体和它们的制剂参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy(雷明顿:药学理论与实践),第21版,David B.Troy编,Lippicott Williams& Wilkins(2005)。通常,将药学上可接受的盐的合适量用于所述制剂以提供制剂等渗性。药学上可接受的载体的例子包括但不限于,无菌水、盐水、诸如林格氏溶液的缓冲溶液和葡萄糖溶液。溶液的pH通常是从约5至约8或从约7至约7.5。其他载体包括缓释制剂,例如含有所述免疫原性PcpA多肽的固态疏水聚合物的半透基质。基质是成形制品的形式,例如薄膜、脂质体或微粒。本领域技术人员了解,某些载体依据例如施用的途径和将施用的组合物的浓度可是更加优选的。载体是适用于向人或其他受治疗者施用所述PcpA免疫原性片段的载体。

[0047] 药物组合物除了所述免疫原性多肽,还可包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、佐剂、免疫刺激剂。药物组合物还可包括一种或多种活性成分,例如抗菌剂、抗炎剂和麻醉剂。

[0048] 佐剂包括金属盐,例如铝盐,并且本领域熟知其提供具有佐剂活性的安全的赋形剂。认为这些佐剂的作用机理包括形成抗原贮存(depot),以致抗原可在施用后停留于注射位点多达3个星期;以及还形成抗原/金属盐复合体,其更容易被抗原呈递细胞摄取。除了铝之外,其他的金属盐也已经用于吸收抗原,包括锌、钙、铈、铬、铁和铍(berilium)盐。铝的氢氧化物和磷酸盐是最常用的。含有铝盐、抗原和其它免疫刺激剂的制剂或组合物为本领域所知。免疫刺激剂的一个例子是3-脱氧-酰化单磷酰脂质A(3D-MPL)。

[0049] 所述佐剂和/或免疫刺激剂可伴随着所述多肽组合物施用,或在施用所述组合物前或后立即施用。任选地,所述组合物进一步包括佐剂。佐剂制剂包括,例如靶向粘膜诱导位点的试剂。所述佐剂可任选地选自包括但不限于细胞因子、趋化因子、生长因子、血管生成因子、凋亡抑制剂和其组合的组。当选择细胞因子作为佐剂时,所述细胞因子可选自包括

但不限于下述的组:白介素,包括IL-1、IL-3、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12、IL-15和IL-18;转化生长因子β(TGF-β);粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);干扰素γ(IFN-γ);或具有佐剂活性的任何其他细胞因子。具有佐剂活性或其他生物活性的细胞因子的一部分或细胞因子的突变体或模拟物(或其组合)也可用于本发明的组合物和方法。

[0050] 当选择趋化因子作为佐剂时,所述趋化因子可任选地选自包括但不限于淋巴细胞趋化因子、RANTES、LARC、PARC、MDC、TAR C、SLC和FKN的组。当选择凋亡抑制剂作为佐剂时,所述凋亡抑制剂可任选地选自包括但不限于胱天蛋白酶8的抑制剂和其组合的组。当选择血管生成因子作为佐剂时,所述血管生成因子可任选地选自包括但不限于碱性成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、乙酰透明质酸(HA)片段和其组合的组。

[0051] 基本无毒的生物活性佐剂的其他例子包括激素、酶、生长因子或其生物活性部分。例如,所述激素、酶、生长因子或其生物活性部分可是人源、牛源、猪源、羊源、犬源、猫源、马源或禽源的,并且可是肿瘤坏死因子(TNF)、促乳素、表皮生长因子(EGF)、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、胰岛素样生长因子(IGF-1)、生长素(生长激素)或胰岛素,或其受体在免疫系统细胞上表达的任何其他激素或生长因子。

[0052] 佐剂还包括细菌毒素,例如霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定毒素(LT)、艰难梭菌毒素A和百日咳毒素(PT),或其组合、亚单位、类毒素、嵌合体或突变体。例如,可使用天然(native)霍乱毒素亚单位B(CTB)的纯化制品。任何这些毒素的片段、同系物、衍生物和融合物也是合适的,条件是它们保留佐剂活性。合适的佐剂的突变体或变体参见例如WO 95/17211(Arg-7-Lys CT突变体)、WO 96/6627(Arg-192-Gly LT突变体)和WO 95/34323(Arg-9-Lys和Glu-129-Gly PT突变体)。可用于本方法和组合物的其他LT突变体包括例如Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp和Glu-112-Asp突变体。还可使用其他佐剂,例如RH3配体;CpG基序寡核苷酸;例如大肠杆菌、明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)或志贺氏菌(Shigella exseri)的细菌单磷酰脂质A(MPLA);皂苷(例如QS21)或聚乳酸乙交酯(PLGA)微球。可能的其他佐剂是防卫素和CpG基序。

[0053] 提供了制备和使用本文描述的免疫原性多肽的方法和用于所述方法的组合物。所述多肽可通过标准分子生物学技术和表达系统制备(参见例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册),第三版,Sambrook等人,Cold Spring Harbor Press,2001)。例如,可分离编码免疫原性多肽的pcpA基因的片段并且可将所述编码免疫原性多肽的多核苷酸克隆于任何可商业获得的表达载体(例如pBR322和pUC载体(New England Biolabs,Inc.,Ipswich,MA))或表达/纯化载体(例如GST融合载体(Pfizer,Inc.,Piscataway,N.J.))并且然后在合适的原核、病毒或真核宿主中表达。然后,纯化可通过常规方法或就商业表达/纯化系统而言,依据生产商说明书来实现。

[0054] 本文提供含有编码SEQ ID NO:1至31、41和45中任何一个的序列的核酸。本文提供含有SEQ ID NO:32、33和47的核酸,其编码全长PcpA蛋白质或其片段。还提供SEQ ID NO:32、33和47的简并变体和这些简并变体的片段。

[0055] 描述了编码SEQ ID NO:1和2或其片段的核酸,分别地包括SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35,或其简并变体或片段。

[0056] 编码SEQ ID NO:3和4或其片段的核酸分别地包括但不限于SEQ ID NO:36和SEQ

ID NO:37,或其简并变体或片段。

[0057] 描述了编码SEQ ID NO:41或其片段的核酸,包括SEQ ID NO:42或其简并变体或片段。

[0058] 描述了编码SEQ ID NO:45或其片段的核酸,包括SEQ ID NO:46或其简并变体或片段。

[0059] 编码SEQ ID NO:29或其片段的示例核酸包括SEQ ID NO:38或其简并变体或片段。

[0060] 更加具体地,本文提供含有指定为SEQ ID NO:32至38、42、46和47的序列中的任何一个或其简并变体的核酸。

[0061] 还提供了分离的核酸,所述核酸包括在高严格条件下与杂交探针的全部或任何部分杂交的序列,所述杂交探针具有包括SEQ ID NO:32至38、42、46和47或SEQ ID NO:32至38、42、46和47的互补序列或所述序列或其互补序列的任何片段的核苷酸序列。所述杂交核酸的杂交部分的长度通常为至少15个(例如15、20、25、30、40或更多)核苷酸。所述杂交部分与其所杂交的序列的部分具有至少80%(例如85%、90%或95%)的同一性。杂交核酸是有用的,例如作为克隆探针、引物(例如PCR引物)或诊断探针。将核酸的双螺旋或杂交体的稳定性表示为解链温度或Tm,其是探针从靶DNA解离的温度。所述解链温度用于定义所需的严格严格条件。如果鉴定序列是与所述探针相关的并是基本同一的而不是同一的,那么首先建立只有同源杂交发生的最低温度和盐(例如SSC或SSPE)的特定浓度是有用的。假设1%的错配导致Tm降低1℃,那么杂交反应的最终洗涤温度相应地降低(例如,如果寻求具有多于95%同一性的序列,那么最终洗涤温度降低5℃)。在实践中,Tm的变化可为每1%错配0.5至1.5℃之间。高严格条件包括68℃下在5X SSC/5XDenhardt杂交溶液/1.0%SDS中杂交,并且室温下在0.2X SSC/0.1%SDS中洗涤。中度严格条件包括42℃下在3X SSC中洗涤。可改变盐浓度和温度以实现所述探针和靶核酸之间最佳水平的同一性。在本领域中,关于所述条件的其他指引是容易获得的,例如在Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册),第三版,Sambrook等人,Cold Spring Harbor Press,2001中。

[0062] 因此应理解,公开了可编码以上提到的肽序列、其变体和片段的核酸。这将包括与具体蛋白质序列相关的所有简并序列,即具有编码一个特定蛋白质序列的序列的所有核酸和编码所述蛋白质序列的公开的变体和衍生物的所有核酸,包括简并核酸。因此,尽管不会在此写出每个特定核酸序列,但是应理解,事实上在此通过公开的蛋白质序列来公开和描述每一个序列。

[0063] 还公开了含有本文描述的核酸的载体。因此,提供了含有编码免疫原性多肽(例如SEQ ID NO:1至31、41或45或其片段或变体)的核酸的载体。所述载体可包括任何的核酸序列SEQ ID NO:32至38、42和47或其简并变体或片段。任选地,将所述载体的核酸可操作地连接到表达控制序列(例如启动子或增强子或两者)。合适的表达载体为本领域技术人员所熟知并且可从多种商业来源获得,例如Novagen,Inc.,Madison,WI;Invitrogen Corporation,Carlsbad,CA;和Promega Corporation,Madison,WI。

[0064] 还提供了含有所述载体的培养细胞。所述培养细胞可是用所述载体转染的培养细胞或所述细胞的后代,其中所述细胞表达所述免疫原性多肽。合适的细胞系为本领域技术人员所知并且是商业上可获得的,例如通过美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0065] 所述转染细胞可用于制备免疫原性多肽的方法。所述方法包括在允许免疫原性多

肽表达(任选地在表达序列控制下)的条件下,培养含有所述载体的细胞。使用标准蛋白质纯化方法可将所述免疫原性多肽从所述细胞或培养基分离。

[0066] 所述免疫原性多肽可通过使用较大多肽或蛋白质的标准酶裂解来制备,或可通过用蛋白质化学技术将两个或更多的肽或多肽连接到一起来制备。例如,肽或多肽可使用目前可用的使用Fmoc(9-芴甲氧羰基)或Boc(叔丁氧基羰基)化学的实验室仪器(Applied Biosystems,Inc.,Foster City,CA)化学合成。通过肽缩合反应、自然化学连接、固相化学或酶促连接,两个片段可在其羧基和氨基末端经肽键共价连接以形成免疫原性PcpA多肽。(Synthetic Peptides:A User Guide.(合成肽:使用指南),Grant编,W.H.Freeman和Co.,New York,N.Y.(1992);Principles of Peptide Synthesis.(肽合成原理),Bodansky和Trost编,Springer-Verlag Inc.,New York,N.Y.(1993);Abrahmsen L等人,Biochemistry,30:4151(1991);Dawson等人Science,266:776-779(1994);Solid Phase Peptide Synthesis(固相肽合成),第二版,Stewart编,Pierce Chemical Company,Rockford,IL,(1984),对于文献描述的方法,通过引用在此并入所有文献)。

[0067] 所述免疫原性多肽和含有一种或多种多肽的组合物可用于产生抗体。因此,在受治疗者中产生PcpA特异性抗体的方法包括向受治疗者施用本文描述的免疫原性PcpA片段。本文还提供结合PcpA多肽的抗体以及结合PcpA多肽的抗体片段。

[0068] 抗体可是多克隆的或单克隆的,可是完全人类的或人源化的并且包括天然存在的抗体和单链抗体。可通过向受治疗者施用免疫原性PcpA多肽体内产生抗体。抗体产生包括使用杂交瘤方法制备单克隆抗体。杂交瘤方法为本领域所熟知并且描述于Kohler和Milstein,Nature,256:495(1975)以及Harlow和Lane.Antibodies,A Laboratory Manual(抗体的实验室手册)Cold Spring Harbor Publications,New York,(1988),对于其中描述的方法,通过引用整体并入所述文献。

[0069] 产生单链抗体的方法为本领域技术人员所熟知。参见例如,美国专利第5,359,046号(对于所述方法,通过引用其整体在此并入)。通过使用短肽连接体将重链和轻链的可变结构域融合到一起,从而在单一分子上重构抗原结合位点来制备单链抗体。在没有显著干扰抗原结合或结合的特异性下,已经开发了单链抗体可变片段(scFv),其中一个可变结构域的C末端经15至25个氨基酸的肽或连接体连接到另一个可变结构域的N末端。选择所述的连接体以允许重链和轻链以它们正确的构象取向结合到一起。参见例如Huston,J.S.等人Methods in Enzym.203:46-121(1991),对于其关于连接体的材料,通过引用在此并入所述文献。

[0070] PcpA多肽的完全人类和人源化抗体可用于本文描述的方法。人源化抗体包括人免疫球蛋白(接受者抗体),其中所述接受者的互补决定区(CDR)的残基由非人类物种(提供者抗体)(例如具有预期特异性、亲和性和能力的小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基取代。在一些例子中,所述人免疫球蛋白的Fv骨架残基由相应的非人类残基取代。可使用在免疫时能够产生人类抗体的全部所有组成成分(即完全人源化抗体)的转基因动物(例如,小鼠)。嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区(J(H))基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。所述种系突变小鼠中的人种系免疫球蛋白基因阵列的转移导致抗原攻击时产生人类抗体。(参见例如Jakobovits等人,PNAS USA,90:2551-255(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immuno.,7:33(1993))。还可在噬菌体展示文库

中产生人类抗体(Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991))。Cote等人和Boerner等人的技术还描述了制备人类单克隆抗体的方法(Cole等人,"The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer(EBV杂交瘤技术和其对人类肺癌的应用)."Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(单克隆抗体和癌症治疗),27卷,Reisfeld和Sell编,第77-96页,Alan R.Liss,Inc.,New York,N.Y.,(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991))。对于其中所述的方法,通过引用整体并入这些文献。

[0071] 如本文所用的抗体片段包括F(ab')2、Fab'和Fab片段,包括杂合片段。所述抗体片段保留了结合特异性PcpA多肽的能力。可使用方法来构建(ab)表达库(参见例如Huse等人,1989 Science 246:1275-1281)以使得快速和有效的鉴定具有预期的PcpA多肽特异性的单克隆F(ab)片段。含有所述多肽的个体基因型的抗体片段可通过本领域已知的技术制备,包括但不限于:(i)通过胃蛋白酶消化抗体分子制备的F(ab')2片段;(ii)通过还原F(ab')2片段的二硫键制备的Fab片段;(iii)用木瓜蛋白酶和还原剂处理所述抗体分子制备的F(ab)片段和(iv)F(v)片段。

[0072] 本文描述了降低受治疗者感染肺炎球菌的风险的方法,其包括向所述受治疗者施用PcpA的免疫原性片段或其组合物。肺炎球菌感染包括,例如脑膜炎、中耳炎、肺炎、败血症或溶血性尿毒症。因此,通过本文描述的方法可降低这些感染中的任何一种或多种的风险。所述方法可进一步包括施用第二种免疫原性片段的步骤。所述第二种免疫原性片段可来自PspA、肺炎球菌溶血素或其组合。所述第二种免疫原性片段可与所述PcpA免疫原性片段同时施用、在所述PcpA免疫原性片段前或后施用。

[0073] 含有PcpA多肽或其片段的组合物可口服、肠胃外(例如静脉内)、肌内、腹膜内、透皮或局部施用,所述局部施用包括鼻内施用或施用于呼吸系统的任何部位。如本文所用,施用于呼吸系统指所述组合物通过一个或两个鼻孔或通过口传递于鼻或鼻道,包括由喷雾机械或液滴机械通过雾化给药或插管法来传递。

[0074] 所需的所述组合物和PcpA多肽或片段的精确量将根据不同的受治疗者变化,其依赖于受治疗者的物种、年龄、体重和总的健康状态(general condition)、使用的多肽以及其施用方式。因此,指定每种组合物的精确量是不可能的。然而,本领域普通技术人员根据本说明书可确定合适的量。此外,PcpA多肽或片段的多剂量可用于包括例如初免和加强免疫方案(prime and boost regimen)。

[0075] PspA和肺炎球菌溶血素的组合引起对肺炎和败血症的防御性免疫比(that)任何单一的蛋白质更加有效(Briles等人,J.Infect.Immun.188:339-48(2003);Ogunniyi等人,Infect.Immun.68:3028-33(2000))。因此,含有PcpA或免疫原性片段的组合物可任选地包括PcpA、PspA或肺炎球菌溶血素的第二种免疫原性片段或其组合。对于其中教导的组合的方法和施用蛋白质的方法,通过引用在此整体并入这些参考文献。

[0076] 任何以上提到的治疗可用于和本文描述的组合物的任何组合。组合可共同地(例如,作为混合物)、分开但同时地(例如经不同的静脉通道进入同一个受治疗者)或顺序地(例如首先给予所述化合物或试剂中的一个随后是第二个)施用。因此,术语组合用于表示两种或多种试剂的任何共同的、同时的或顺序的施用。

[0077] 必须注意,除非上下文另外清楚地指出,如本说明书和所附的权利要求书所用,单

数形式一(a)、一(an)和所述(the)包括多个指示物。因此,例如,对一个抗原片段的提及包括抗原片段的混合物,对一种药物载体或佐剂的提及包括两种或多种所述载体或佐剂的混合物。

[0078] 如本文所用,受治疗者指个体。因此,所述受治疗者可包括家养动物(例如猫和狗)、家畜(例如牛、马、猪、绵羊和山羊)、实验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)和鸟类。在一方面中,所述受治疗者是哺乳动物,例如灵长类或人。

[0079] 任选的或任选地,指随后描述的事情或情况可发生或可不发生,并且所述描述包括其中事情或情况发生的例子和其中事情或情况没有发生的例子。例如,短语"任选地所述组合物可包括组合"表示所述组合物可包括不同分子的组合或可不包括组合,以使这一描述包括组合和无组合(即组合的个体成员)两种情况。

[0080] 本文可将范围表示为从约一个特定值和/或至约另一个特定值。当表示这样的范围时,另一个方面包括从一个特定值和/或至其他的特定值。相似地,当值通过使用其之前的约表示为近似时,应理解所述特定值形成另一方面。应进一步了解,每个范围的端点既明显与其他端点相关又独立于其他的端点。

[0081] 当术语预防(prevent)、预防(preventing)和预防(prevention)在本文中和指定疾患的指定治疗一起使用时(例如预防肺炎球菌感染),它们指治疗的患者完全没有发展为临床上可观察水平的疾患,或与他/她没有治疗相比,所述疾患更加缓慢地或以更低程度地发展。这些术语不只限于其中患者不经受任何疾患的方面(aspect)的情况。例如,如果在患者暴露于刺激物期间提供治疗并且导致患者经受比否则预期的少的和/或轻微的所述疾患的症状,那么所述治疗将称为已经预防了所述疾患,其中预期所述刺激物产生所述疾患的指定表现。治疗可通过引起患者仅表现出所述感染的轻微的明显症状来预防感染;其不暗示任何细胞必须没有被感染微生物侵入。

[0082] 相似地,如本文中与指定治疗的感染风险一起使用的减少(reduce)、减少(reducing)和减少(reduction)(例如减少肺炎球菌感染的风险)指与对照或没有治疗(例如施用免疫原性多肽)的发展感染的基本水平相比,受治疗者以更加缓慢或以更低程度地发展感染。感染风险的减少可导致患者仅表现出所述感染的轻微的明显症状或感染的延迟症状;其不暗示任何细胞必须没有被感染微生物侵入。

[0083] 应理解,除非另有规定,公开的方法和组合物不限于具体的合成方法、具体的分析技术或特定的试剂,并且因此可变化。还应该理解,本文使用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的并且不意为限制。

[0084] 已经描述了本发明的许多实施方案。然而应理解,可进行多种改良。此外,当描述一个特征或步骤时,其可与本文的任何其他特征或步骤组合,即使没有明确地陈述所述组合。因此,其他的实施方案属于本权利要求书的范围。

## 实施例

[0085] 实施例1:PcpA引起对肺感染和致命败血症的防御

[0086] 材料和方法。

[0087] 细菌菌株、培养基和生长条件。肺炎链球菌菌株TIGR4和EF3030和它们的衍生物用于本实验。除非另有指定,肺炎球菌在37℃下含有0.5%酵母提取物(THY)的Todd-Hewitt肉

汤培养基中或在血琼脂板上生长。适当时，将红霉素以0.3μg/ml的浓度加入所述培养基。使用肺炎链球菌的临床隔离群(表2)和主要克隆组的隔离群(表3)。

[0088] 表2.肺炎链球菌的临床隔离群

| 菌株 | 荚膜型 | PspA家族 | 起源 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| R6 | D39(2型)的无荚膜变体 | 1 | New York | (Belanger等人, *J. Bacteriol.* 186:8164-71 (2004); Ottolenghi和 Hotchkiss, *Science* 132:1257-8 (1960) |
| TIGR4* | 4 | 2 | Norway | Ren等人 *Infect. Immun.* 71:75-85 (2003); Roach等人, *PNAS* 102:9577-82 (2005) |
| BG12730* | 6 | 2/3 | Gambia | Shaper等人 *Infect. Immun.* 72:5031-40 (2004) |
| BG10752* | 9 | 1 | Alabama | 本研究 |
| TJ0893* | 14 | 2 | Mississippi | Wu等人 *J. Infect. Dis.* 175:839-46 (1997) |
| V175* | 18 | 2 | Tennessee | Robinson等人 *J. Infect. Dis.* 183:1501-7 (2001) |
| L82013* | 19 | 2 | Alaska | Briles等人, *Infect. Immun.* 188:339-48 (2003) |
| EF3030* | 19F | 1 | Sweden | Briles等人, *Infect. Immun.* 188:339-48 (2003); Briles等人, *Infect. Immun.* 73:6945-51 (2005); Johnston等人, *Infect. Immun.* 74:1171-80 (2006) |
| EP9303* | 23F | 未知 | Sweden | Wu等人, *Microb. Pathog.* 23:127-37 (1997) |
| L82016* | 6B | 1 | U.S.A. | Briles等人, *Infect. Immun.* 60:111-6 (1992); Briles等人, *Infect. Immun.* 188:339-48 (2003) |
| D-1091B* | 23 | 1 | 未知 | 本研究 |

[0089]

[0090] (*)不是从原始患者隔离群的超过10次传代分离的临床菌株。R6衍生于菌株D39，其是1920年代的患者隔离群。

[0091] 表3.主要克隆组的肺炎链球菌

[0092]

| 菌株 | 荚膜型 | 起源 | 特征 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|
| MA-14 | 14 | UK | 世界性Erm$^r$克隆; MLST序列类型9 | (1) |
| MB-23F | 23F | UK | 未知疾病; MLST序列类型81 | (1) |
| MC-6B | 6B | Spain | 未知疾病; MLST序列类型90 | (3,4) |
| MD-6B | 6B | Alaska | 未知疾病; MLST序列类型138 | (2) |
| ME-19 | 19 | Tennessee | 携带物克隆; MLST序列类型236 | (2) |
| MF-6A | 6A | Tennessee | 携带物克隆; 未知MLST序列类型 | (2) |
| MG-1 | 1 | UK | 主要侵袭性克隆; MLST序列类型227 | (1) |
| MI-7F | 7F | Norway | 主要侵袭性克隆; MLST序列类型191 | (1) |
| MJ-35 | 35 | Tennessee | 携带物克隆; MLST序列类型65 | (2) |
| MK-22 | 22 | Tennessee | 主要侵袭性克隆; 未知MLST序列类型 | (2) |
| ML-11 | 11 | Tennessee | 携带物克隆; MLST序列类型62 | (2) |
| MM-14 | 14 | Tennessee | 主要侵袭性克隆; MLST序列类型124 | (2) |
| MN-23F | 23 | Tennessee | 携带物克隆; MLST序列类型37 | (2) |

[0093] 1.Enright,M,C和B,G.Spratt.1998.A multilocus sequence typing scheme for Streptococcus pneumoniae:identification of clones associated with serious invasive disease.(肺炎链球菌的多位点序列分型方案:鉴定与严重的侵袭性疾病相关的克隆。)Microbiology 144:3049-60。

[0094] 2.Robinson,D.A.,K.M.Edwards,K.B.Waites,D.E.Briles,M.J.Crain和S.K.Hollingshead.2001.Clones of Streptococcus pneumoniae Isolated from Nasopharyngeal Carriage and Invasive Disease in Young Children in Central Tennessee.(从田纳西州中心地区的幼儿的鼻咽部携带物和侵袭性疾病中分离出的肺炎链球菌的克隆。)J Infect Dis 183:1501-7。

[0095] 3.Hakenbeck,R.,T.Briese,L.Chalkley,H.Ellerbrok,R.Kalliokoski,C.Latorre,M.Leinonen和C.Martin.1991.Antigenic variation of penicillin-binding proteins from penicillin-resistant clinical strains of Streptococcus pneumoniae.(来自肺炎链球菌的青霉素耐受临床菌株的青霉素结合蛋白的抗原性变异。)J Infect Dis 164:313-319。

[0096] 4.Hakenbeck,R.,T.Briese,L.Chalkley,H.Ellerbrok,R.Kalliokoski,C.Latorre,M.Leinonen和C.Martin.1991.Variability of penicillin-binding proteins from penicillin-sensitive Streptococcus pneumoniae.(来自青霉素敏感性肺炎链球菌的青霉素结合蛋白的变异性。)J Infect Dis 164:307-312。

[0097] 这些研究中使用的临床菌株在最近的25年内分离。为了检查PcpA可能的多样性，隔离群选自应用于肺炎链球菌基因组多样性计划(http://genome.microbio.uab.edu/strep/info)的菌株的组。

[0098] 在菌株构建期间，质粒保存在生长于Luria-Bertani(LB)肉汤培养基或含有1.5%琼脂的LB板的大肠杆菌(Escherichia coli)TOP10细胞(Invitrogen,Carlsbad,CA)中。将针对基于pCR2.1、pCR4和pET-20b的质粒的氨苄青霉素(50μg/ml)或针对基于pJY4164的质粒的红霉素(400μg/ml)加入到生长培养基中。

[0099] THY培养基用于细菌在高锰培养基中生长。对于在低锰条件下生长，制备锰贫化(depleted)形式的THY。根据生产商的说明书制备THY培养基，且在高压灭菌前加入Chelex-100(2%w/v)(Sigma Aldrich,St.Louis,Mo)。高压灭菌后，THY/Chelex混合物在室温下搅拌过夜，随后过滤灭菌。使用前加入$ZnCl_2$、$MgCl_2$、$CaCl_2$和$FeSO_4$至各自1mM的浓度并且加入$MnSO_4$至0.1μM的浓度。通过600nm的光密度监测生长。

[0100] 菌株构建。本研究使用的大肠杆菌菌株、质粒和引物已列出(表4)。在母体菌株TIGR4和EF3030中使用诱变以灭活pcpA。先前已执行并描述了突变菌株的构建(Johnston等人,Infect.Immun.74:1171-80(2006))。

[0101] 表4.本研究使用的其他细菌菌株和质粒

[0102]

| 菌株、质粒或引物 | 相关特征或序列和基因 | 参考文献 |
|---|---|---|
| 菌株 | | |
| 肺炎链球菌 | | |
| JEN7 | TIGR4 *psa*B::Erm (*pcpA* 组成型突变体) | Johnston,等人, Infect. Immun. 74:1171-80 (2006) |
| Jen11 | TIGR4 *pcpA*::Erm | Johnston,等人, Infect. Immun. 74:1171-80 (2006) |
| 大肠杆菌 | | |
| TOP10 | 一般克隆菌株 | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Rosetta (DE3) pLysS | 表达菌株 | Novagen, Madison, WI |
| 质粒 | | |
| pCR2.1 | 3.9 kb, $Amp^r$, $Kan^r$ | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| pCR4 | 3.9 kb, $Amp^r$, $Kan^r$ | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| pET-20b | 3.7 kb, $Amp^r$, C末端组氨酸标签 | Novagen, Madison, WI |
| pDG-1 | 具有 *pcpA* 片段的pCR4；$Amp^r$ | 本研究 |
| pJM-1 | 具有 *pcpA* 片段的pET-20b;$Amp^r$ | 本研究 |
| pJJ035 | 具有412bp内部 *pcpA* 片段的pCR2.1；$Amp^r$ | 本研究 |
| 引物[a] | | |
| DTG-16 | cgcggatccATATGTCCCTAATGAACC (SEQ ID NO:39); *pcpA* F | 本研究 |
| DTG-12 | gcgctcgagTTCCTTTAATGAATCTAAGACGC CACTTAGGAAGAAGGAC (SEQ ID NO:40); *pcpA* R | 本研究 |
| JW328 | AAC TGT TCA AGT GGG TAA TGG (SEQ ID NO:48); *pcpA* F | Johnston,等人, Infect. Immun. 74:1171-80 (2006) |
| JW329 | TGA ACT TGA GGA AAA GGT TAG C (SEQ ID NO:49); *pcpA* R | Johnston,等人, Infect. Immun. 74:1171-80 (2006) |
| BGP1 | ATGAAAAAACTACAATATTATCATTAAC TACAGCTGCG (SEQ ID NO:50); *pcpA* F | 本研究 |
| BGP2 | CCATAAACCTTTGTCTTTAACCCAACCA ACTAC (SEQ ID NO:51); *pcpA* R | 本研究 |

[0103] [a]引物基于肺炎链球菌TIGR4(2)的完整基因组序列。小写字母指用于产生限制核

酸内切酶位点的错配。所有序列以5'至3'表示。

[0104] 重组PcpA的表达和纯化。本研究使用的菌株、质粒和引物列于表2。设计引物DTG-16(5'-CGCGGATCCATATGTCCCTAATGAACC-3'(SEQ ID NO:39))和DTG-12(5'-GCGCTCGAGTTCCTTTAATGAATCTAAGACGCCACTTAGGAAGAAGGAC-3'(SEQ ID NO:40))以在菌株TIGR4中扩增pcpA的1126bp片段。所述引物分别含有设计的(engineered)限制核酸内切酶位点BamHI和XhoI。反应在50μl总体积的含有3.0mM$MgCl_2$、125μM dNTP、50皮摩尔(picomole)的每种引物和2.5个单位的Taq DNA聚合酶的混合物中执行30个循环。循环为94℃,1min;55℃,1min;72℃,5分钟。这一扩增的基因片段通过T加尾(T-tailed)方法首先克隆入pTOPO4(Invitrogen,Inc.,Carlsbad,CA),形成质粒pLMG。

[0105] 以TOPO TA克隆试剂盒(Invitrogen,Carlsbad,CA)将这一片段克隆入pCR4。纯化的质粒通过BamHI和XhoI(Promega,Madison,WI)的核酸内切酶消化筛选。琼脂糖凝胶电泳、PCR分析和DNA测序都用于确定所述pcpA片段插入所产生的质粒pDG-1中。将来自pDG-1的插入子亚克隆于pET-20b表达载体(Novagen,Madison,WI)。将产生的质粒pJM-1转化到大肠杆菌菌株RosettaBlue(DE3)pLysS(Novagen,Madison,WI)以制备蛋白质。所述菌株含有可诱导UV5启动子控制的T7启动子的染色体拷贝。当IPTG诱导时,表达含有氨基酸19-391的截短蛋白(truncated protein)。过表达的截短蛋白使用Novagen HIS-BIND®纯化试剂盒(Novagen,Madison,WI)纯化,所述试剂盒利用C-羧基末端组氨酸标签(tag)促进纯化。随后以考马斯亮蓝(Comassie Blue)染色的SDS-PAGE分析产生约41-kDa的单条带。

[0106] 以下是已经克隆和表达的rPcpA蛋白质的完整序列。下划线部分来自克隆载体。

[0107]

MDIGINSDPYVPNEPILADTPSSEVIKETKVGSIIQQNNIKYKVLTVEGNGTVQVGNGVTPVEFEAGQDGKPFTIPT
KITVGDKVFTVTEVASQAFSYYPDETGRIVYYPSSITIPSSIKKIQKKGFHGSKAKTIIFDKGSQLEKIEDRAFDFS
ELEEIELPASLEYIGTSAFSFSQKLKKLTFSSSSKLELISHEAFANLSNLEKLTLPKSVKTLGSNLFRLTTSLKHVD
VEEGNESFASVDGVLFSKDKTQLIYYPSQKNDESYKTPKETKELASYSFNKNSYLKKLELNEGLEKIGTFAFADAIK
LEEISLPNSLETIERLAFYGNLELKELILPNNVKNFGKHVMNGLPKLKSLTIGNNINSLPSFFLSGVLDSLKELEHH
HHHH(SEQ ID NO:41)

[0108] 抗PcpA多克隆抗体的制备。使用纯化的rPcpA皮下免疫NewZealand White Rabbit(Myrtle's Rabbity,Thompson Station,TN)兔以获得抗PcpA多克隆血清。对所述兔皮下注射在1ml弗氏完全佐剂中的100μg rPcpA,总体积2ml。2星期后提供用在弗氏不完全佐剂中的100μg rPcpA的第二加强(boost)并且第二加强的2星期后提供在弗氏不完全佐剂中的100μg PcpA的第三加强。最终加强后的两星期,麻醉下,心脏穿刺使所述兔流血。允许血液凝结,通过离心获得血清并储存于-80℃。

[0109] 肺炎链球菌菌株中pcpA的PCR确认。使用PCR引物对BGP-1和BGP-2检查在多种肺炎链球菌菌株中pcpA的存在或不存在。设计所述引物对以扩增菌株TIGR4中pcpA的1416bp N末端片段。然后,在T.A.E.琼脂糖凝胶上分离所述PCR产物,用溴化乙锭染色并且检查扩增带的正确大小。

[0110] 肺炎链球菌细胞分级分离。用略微改良的Yother和White(Yother 和White,J.Bacteriol.176:2976-85(1994))描述的方法制备原生质体。将生长于MTHY中的对数期细胞沉淀并在PBS中洗涤。然后,将所述细胞在0.5ml 2%的氯化胆碱中重悬浮并且将试管倒

置几次。然后沉淀所述细胞并且倾出上清液并储存于-20℃(胆碱洗提部分)。沉淀细胞并用300μl原生质体缓冲液(20％蔗糖、5mM Tris[pH 7.4]、2.5mM $MgSO_4$)洗涤一次。然后将所述沉淀重悬浮于1ml原生质体缓冲液,并以5U每毫升沉淀培养物加入变溶菌素(Sigma Aldrich,St.Louis,MO)。将所述悬浮液室温下过夜孵育。通过6000rpm离心10分钟沉淀细胞,将上清液储存于-20℃(细胞壁部分)。然后在1ml原生质体缓冲液中洗涤所述原生质体。原生质体的形成通过镜检确认。沉淀所述原生质体并在0.3-1ml的$dH_2O$中裂解,其储存于-20℃(细胞膜/胞质部分)。对每部分的样品通过蛋白质印迹分析检测PcpA的存在。

[0111] 肺炎链球菌的抗体染色。将生长于高锰或低锰培养基的对数中期细胞($OD_{600}$0.6)沉淀,用PBS洗涤,在含有1％牛血清白蛋白的PBS(PBSB)中重悬浮并且室温下孵育20分钟。沉淀细胞并在PBSB或1:100稀释抗-PcpA血清的PBSB中重悬浮并且37℃下孵育30分钟。孵育之后用PBS洗涤两次。然后在4℃下用PBSB稀释的羊抗兔免疫球蛋白G(重链和轻链)-荧光素异硫氰酸酯(Southern Biotechnology Associates,Inc.,Birmingham,AL)孵育细胞30分钟。然后用PBS洗涤所述细胞两次并在含有0.01mM的亲脂膜染料TMA-DPH(Invitrogen,Carlsbad,CA)和4％甲醛的PBS中重悬浮。然后通过使用Olympus IX 70显微镜的落射荧光(epifluorescence)检查细菌细胞。

[0112] 蛋白质印迹。细菌培养物生长在THY和MTHY中至对数中期,$OD_{600}$0.6。等量的每种菌株用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤两次,重悬浮于含有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)样品缓冲剂的PBS并且沸腾5分钟。根据生产商的说明书,将样品和预染色的蛋白质标准品(Invitrogen,Carlsbad,CA)加载到NuPAGE 10％Bis-Tris凝胶(Invitorgen,Carlsbad,CA)上并通过在吗啉乙磺酸(MES)-SDS电泳缓冲液(Invitrogen,Carlsbad,CA)中电泳来分离。然后以Trans-Blot SD半干转印槽(semidrytransfer cell)(Bio-Rad,Hercules,CA)将蛋白质转移至硝酸纤维素膜。印迹用PBSB中1:1000稀释的抗PcpA多克隆抗体探针检测。羊抗兔免疫球蛋白G(重链和轻链)-碱性磷酸酶和链霉亲和素-碱性磷酸酶(Southern Biotechnology Associates,Inc.,Birmingham,AL)用作二抗。用Sigma Fast硝基四氮唑蓝-5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐(NBT-BCIP)片(Sigma Aldrich,Switzerland)执行比色检测。

[0113] 小鼠的全身性免疫。对6-8星期大的CBA/CaHNBtkxid/J(CBA/N)小鼠(JacksonLabs,Bar Harbor,Maine)最初皮下注射10μg的rPcpA和作为佐剂的2μg氢氧化铝,总体积200μl。2星期后提供10μg rPcpA和氢氧化铝的第二加强。又2星期后提供含有10μg rPcpA没有氢氧化铝的第三加强。然后,用肺炎链球菌攻击前,允许所述小鼠休息2星期。感染前24小时给小鼠放血。

[0114] 败血症的鼠模型。在先前描述(Coats等人,Vaccine 23:4257-62(2005);Ren等人,Infect.Immun.71:75-85(2003))的感染的全身性模型中检测肺炎球菌的毒性。对6-8星期大的CBA/N小鼠静脉内注射稀释于乳酸钠林格氏液的300CFU的细菌。监测小鼠21天。当它们变得对触摸没有响应并且它们的体温降至正常以下时,将它们记为垂死状态并且记录日期和时间。将所有垂死状态的鼠用$CO_2$麻醉安乐死。

[0115] 肺炎的鼠模型。按照以前描述(Balachandran等人,Infect.Immun.70:2526-34(2002);Briles等人,J.Infect.Dis.188:339-48(2003);Takashima等人,Infect.Immun.65:257-260(1997))的执行肺感染。将6-8星期大的CBA/N小鼠用异氟烷

(MinRAD,Buffalo,NY)麻醉,并且将含有5×10$^6$细菌的40μl乳酸盐化林格氏液(lactated ringers solution)的悬浮液引入所述小鼠的鼻孔以诱导吸入性肺炎。7天后处死所述小鼠。如先前描述(Wu等人,J.Infect.Dis.175:839-46(1997)),用50μl乳酸盐化林格氏液洗涤处死小鼠的鼻腔。连续稀释所述鼻洗液并且铺板于含有庆大霉素(4μg/ml)的血琼脂上。收获肺部并且置于在stomacher袋中的2ml乳酸盐化林格氏液,匀浆,连续稀释并且以连续的3倍稀释物铺板于含有庆大霉素的血琼脂上。

[0116] 鼻咽群集的鼠模型:如先前所述(Balachandran等人,Infect.Immun.70:2526-34(2002);Wu等人,J.Infect.Dis.175:839-46(1997))的执行鼻内接种。没有麻醉下,将6-8星期大的CBA/N小鼠用含10$^6$细菌的10μl乳酸盐化林格氏液鼻内感染。然后处死感染的小鼠并用50μl林格氏液洗涤它们的鼻腔。连续稀释鼻洗液并且铺板于含有庆大霉素的血琼脂上。在37℃下烛罐中过夜孵育后,确定血琼脂板中的可见计数。

[0117] 统计分析。使用Instat(GraphPad Software Inc.,SanDiego,Ca)执行统计分析。使用Mann-Whitney两样品秩和检验(Mann-Whitney two sample rank test)进行对照和实验组之间达到垂死状态的时间或回收的CFU数量的比较。认为P值小于0.05为统计学上显著的。

[0118] 结果

[0119] pcpA存在于肺炎链球菌的临床相关菌株。以跨越pcpA的LRR区的引物(BGP1和BGP2)通过PCR检验pcpA的存在。检验的23种菌株(表2和3)的每一个均产生了大约1500-bp的片段。这些菌株中的八种为近25年内分离出的临床菌株,其代表由所述7价结合疫苗覆盖的7种普通荚膜型的菌株(图1)。其余12种菌株是选自作为基因组多样性计划(http://genome.microbio.uab.edu/strep/info/)的部分而集合的一组菌株的一组肺炎链球菌,所述计划包括选择用于跨越肺炎链球菌的多样性宽度的一组菌株。依据MLST数据,这12种菌株被选为是高度差异的(divergent)。四种菌株来自患有严重侵袭性疾病的患者,五种来自无症状的携带者,对于2种菌株的疾病/群集是未知的,并且一种菌株来自世界性耐抗生素克隆。这些菌株代表来自世界不同地区的12种不同的荚膜型。

[0120] 为了检验PcpA在所有菌株中的表达,将它们生长于低(≤0.1μM)锰中。总细胞蛋白质样品从培养于低锰培养基的对数中期细胞中制备。检验所有列于(表2和3)的菌株,但是只描绘代表包含在七价疫苗中的荚膜型的菌株(图2)。通过SDS-PAGE分离总细胞蛋白质样品并且转移至硝酸纤维素。印迹用抗PcpA多克隆抗血清探针检测,鉴定出荚膜(capsulare)血清型4、6、9、14、18、19、23的这些野生型菌株的每一种中约62-kDa的带(图2)。所述62-kDa带在pcpA-失活突变体JEN11中不存在但是存在于七种代表菌株。还从生长于高锰培养基的菌株中对相同菌株制备总细胞蛋白质样品,但是用抗PcpA抗血清没有鉴定出带。PCR分析与蛋白质印迹数据的组合证明,pcpA存在于列于表2和3的所有肺炎链球菌菌株中。

[0121] 低锰条件下,PcpA暴露于肺炎链球菌的表面。研究已经表明通过调节物PsaR的作用,锰控制所述pcpA基因的转录(Johnston等人,Infect.Immun.74:1171-80(2006))。如本文所述,锰依赖性调节直接影响PcpA在肺炎链球菌表面上的存在并且表面PcpA可接近甚至在带荚膜的肺炎球菌上的抗体。

[0122] 执行细胞分级分离以确定PcpA是否与肺炎链球菌的细胞壁或细胞膜/胞质结合。这些细胞部分的蛋白质印迹分析反映,在生长于低锰培养基的细菌中,PcpA主要存在于肺

炎链球菌的细胞壁中。小部分PcpA与细胞膜/胞质结合，并且可能代表PcpA又被输出到细菌的表面。

[0123] 除了细胞分级分离，将来自野生型肺炎链球菌菌株TIGR4的对数期细胞生长于高锰或低锰培养基，用抗PcpA多克隆抗血清染色随后用荧光素异硫氰酸酯(FITC)结合的抗兔免疫球蛋白来染色。具体地，将TIGR4培养于高Mn2+或低Mn2+培养基直至对数中期。用抗PcpA兔血清孵育细菌，随后用FITC结合的抗兔Ig抗体孵育。然后将细胞固定于含有膜染料TMA-DPH的4％甲醛中。然后通过免疫荧光显微术检测标记的细菌。PcpA的抗体能够介导生长于低锰中的细菌的染色，但是不能介导生长于高锰中的细菌的染色。

[0124] 这些结果表明PcpA表面暴露于在体外低锰条件下培养的野生型肺炎链球菌。这说明PcpA表达于并表面暴露于感染宿主中低锰位点(例如肺和血液)的细菌。这种PcpA的暴露促进感染期间细菌和宿主上皮细胞之间的PcpA-配体相互作用。这些结果还表明锰浓度对PcpA产生的调节可推广于大多数肺炎球菌。

[0125] rPcpA的免疫引起抗体并提供对肺和全身性感染的防御，但是不显著影响鼻咽的群集。在用于感染研究前，将小鼠用rPcpA和氢氧化铝免疫或仅接受氢氧化铝。通过ELISA定量两组小鼠的总Ig(H+L)。所述免疫小鼠的血清中的抗体特异性PcpA的几何平均水平是0.465(±0.119)μg/ml，仅接受佐剂的小鼠的平均值为0.002(±0.002)μg/ml(±SEM)。这表明该免疫途径成功引起对rPcpA的免疫应答。

[0126] 为了观察免疫是否保护小鼠不患肺炎，将免疫的和仅明矾的小鼠轻微的麻醉并且在其鼻孔中接种$5\times10^6$CFU的菌株EF3030。这一步骤导致无菌血症的局灶肺炎。因此，这一模型中的防御可与肺炎本身相关并且一般与败血症无关。感染后七天处死所有小鼠。确定在匀浆的肺组织和鼻洗液中的细菌计数。依据回收的中值CFU，从用rPcpA免疫的小鼠的肺匀浆中回收的肺炎球菌与仅接受佐剂的那些相比少于1/100(图3A)(P＝0.002)。这些结果表明用rPcpA免疫能引起对肺炎链球菌的肺部感染的防御。在从用rPcpA免疫的小鼠的鼻洗液回收的细菌计数与仅接受佐剂的那些没有显著的差异(图3B)。在肺炎的小鼠模型中，以下详细描述的来自肺炎链球菌菌株血清型6的重组PcpAΔSPΔCBD(rPcpA ΔSPΔCBD)也防御肺感染但是不防御群集。

[0127] 接着确定皮下免疫是否将赋予对肺炎链球菌其他菌株(TJ0893，血清型14；EF9303，血清型23F和L82016，血清型6B)的局灶肺部感染的防御。与仅接受佐剂免疫的小鼠相比，用rPcpA皮下免疫引起显著的针对每种菌株的防御(图5)。

[0128] 最佳鼻群集不需要PcpA的表达。因为免疫不影响从用于肺炎模型的小鼠的鼻洗液中回收的细菌数量，在鼻咽携带模型中检验PcpA失活的效应。与从肺炎模型中小鼠的鼻洗液中收集的间接观察相反，本模型提供PcpA对鼻携带的任何效应的直接观察。将没有先前麻醉的小鼠用$10^6$CFU的菌株EF3030或其pcpA失活突变株JEN18接种。感染七天后处死所述小鼠并且收集其鼻洗液并铺板以检测肺炎球菌。从用EF3030或JEN18接种的小鼠的鼻洗液中回收的细菌数量没有显著的差异(图5)。

[0129] 完整pcpA基因的存在或用rPcpA皮下免疫未能影响在小鼠的鼻洗液中回收的肺炎球菌的数量，符合鼻咽中锰浓度(>36μM)足够高以抑制pcpA的转录的事实。在这些条件下，pcpA在鼻咽中的转录将被psaR抑制。因此，将预期对PcpA的免疫性对宿主这一位点上的细菌具有很少的影响。

[0130] 在全身性感染的鼠模型中，PcpA和PcpA影响毒性的免疫性。为了评估PcpA防御败血症的免疫性能力，将CBA/N小鼠用在氢氧化铝中的PcpA或作为对照的仅氢氧化铝皮下免疫，并用荚膜型4TIGR4肺炎链球菌静脉内攻击。使用这一菌株而不用FE3030是因为这一菌株在小鼠中可容易地引起菌血症和败血症。对所述免疫动物静脉内注射300CFU的肺炎链球菌TIGR4菌株。监测存活率，持续21天。接受rPcpA免疫的小鼠达到垂死状态的中值时间与仅接受佐剂的小鼠相比延长了43.5小时(图6)。百分之二十六的用rPcpA免疫的小鼠存活，而仅用氢氧化铝免疫的小鼠没有存活；这一存活率的差异是统计学上显著的(P＝0.007)。

[0131] pcpA失活对肺炎球菌静脉内接种后引起小鼠达到垂死状态的能力的效应。在肺炎的鼠模型和肺败血症模型中，pcpA失活导致降低的毒性。如本文所述，pcpA失活对静脉内攻击后的全身性感染的效应通过用300CFU的TIGR4或其pcpA失活突变体JEN11感染首次用于试验的小鼠来检测。用$pcpA^-$突变体感染的小鼠达到垂死状态的中值时间比用野生型细菌感染的那些延长了31.5小时(P＝0.0299)(图7)。这证明PcpA在肺炎链球菌引起全身性疾病的能力中有作用。

[0132] 实施例2.用PcpA粘膜免疫防御肺感染。

[0133] 如图8所示，用PcpA粘膜免疫防御菌株EF3030的肺部感染。将CBA/N小鼠用5μg PcpA加上作为佐剂的霍乱毒素B的亚单位(CTB)鼻内免疫。将免疫后的小鼠放血，然后用$5x10^6$CFU的菌株EF3030鼻内攻击。图8表示感染后7天肺匀浆中细菌的logCFU。

[0134] 观察到粘膜免疫防御略微好于SC免疫。这些数据和实施例1表明使用至少粘膜或皮下施用途径可赋予对肺炎和败血症的防御。用PcpA粘膜免疫不能防御这一菌株的鼻群集。预期这是因为群集期间不表达PcpA。

[0135] 实施例3.由PcpA皮下或鼻内免疫引起的抗体。

[0136] 检测从用PcpA免疫的小鼠中获得的血清的PcpA抗体水平。在第0和第14天用作为佐剂的氢氧化铝或霍乱毒素B亚单位(CTB)皮下(CS)免疫CBA/N小鼠并在第21天用仅PcpA皮下(CS)免疫CBA/N小鼠。第35天将小鼠放血并通过使用与PspA涂布的微量滴定板反应的已知浓度的PspA抗体观察到的OD作为标准，确定血清中抗体的水平。作为对照，小鼠的其他组用稀释剂和仅佐剂免疫。观察到用SC而非鼻内(IN)免疫的IgG抗体应答高1.3倍(表5)。

[0137] 表5.用PcpA免疫的小鼠中PcpA的抗体

[0138]

| | | Ig(H+L) | IgG1 | IgG2a | IgG2b | IgA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| rPcpA 施用途径 | 组 | 平均值 μg/ml (± SEM) | | | | |
| S.C. | rPcpA + 佐剂 (n=10) | 0.465(0.159) | 1.768(0.378) | 0.123(0.041) | 0.125(0.048) | <0.001 |
| S.C. | 仅佐剂 (n=10) | 0.002(0.002) | 0.007(0.007) | <0.001 | 0.002(0.001) | <0.001 |
| I.N. | rPcpA + 佐剂 (n=10) | 0.356(0.159) | 0.151(0.085) | 0.118(0.057) | 0.093(0.033) | <0.001 |
| I.N. | 仅佐剂 (n=10) | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

[0139] 这类测定通常是，亚类的量的和达不到总Ig的量。这表明抗IgG血清不均等地识别所有的IgG亚类。

[0140] 实施例4.PcpA对向肺细胞的粘附是必要的。

[0141] PcpA对向转化肺上皮细胞的A549细胞系(图9)的粘附是必要的但对向转化人鼻上皮细胞的Detroit562细胞系(图10)的粘附则不是。已观察到对A549肺上皮细胞的粘附也需要肺炎球菌在低$Mn^{2+}$中生长，以使它们产生PcpA。用于这些研究的肺炎球菌生长于Todd-Hewitt和酵母培养基(高$Mn^{2+}$)或已经通过Chelex-100(Sigma)并用0.1μm $MnSO_4$和1mM $ZnCl_2$、$MgCl_2$、$CaCl_2$和$FeSO_4$重构的Todd-Hewitt和酵母培养基(低$Mn^{2+}$)(Briles等人，J.Infect.Dis.188:339-48(2003))。Detroit 562或A549细胞单层用$10^6$CFU的TIGR4(pcpA+)或JEN11(pcpA-TIGR4菌株)孵育150分钟。洗涤具有粘附细菌的上皮细胞并用0.5％Tween 20裂解。通过在血琼脂板上定量铺板而确定裂解产物中肺炎球菌的数量。

[0142] 肺炎球菌对A549细胞的粘附用PcpA抗体抑制(图11)。这些数据证明了肺炎球菌对肺上皮细胞的PcpA依赖性粘附。

[0143] 实施例5.被动保护模型。

[0144] 依据用PcpA主动免疫以引起防御肺感染的能力，确定PcpA抗体是否能够被动地保护小鼠免受肺感染。然而，在肺炎模型中还没有观察到被动保护。在第二个被动免疫研究中，使用PcpA的免疫兔血清确定针对TIGR4菌株的Ⅳ败血症的被动保护。已观察到检测的最高浓度的血清(1/10)能够保护两个小鼠免受死亡(图12)。未免疫的血清不能以同样的浓度保护。这些数据表明被动免疫可防御TIGR4菌株，其可是难以防御的菌株。(Roche等人，Infect.Immun.71:4498-505(2003))。

[0145] 实施例6.PcpA和肺炎球菌溶血素的保护。

[0146] 肺炎球菌溶血素(Ply)是可引起对肺感染的一些防御的另一种蛋白质(Briles等人，J.Infect.Dis.188:339-48(2003))。因为肺炎球菌溶血素和PcpA都是用于基于蛋白质的肺炎球菌疫苗的候选物，所以确定与任何一个单独使用时相比，当都用作免疫原时两种蛋白质是否产生更好的对肺感染的防御。将小鼠用5μg的PcpA、5μg肺炎球菌溶血素或5μg的PcpA加5μg肺炎球菌溶血素免疫三次。前两次与明矾一起注射并且第三次用仅蛋白质注射。本文使用的肺炎球菌溶血素是野生型肺炎球菌溶血素。图13表示肺炎球菌溶血素引起与PcpA引起的对肺感染的防御相似的防御。PcpA和肺炎球菌溶血素的组合比仅肺炎球菌溶血素具有显著更强的保护性。这些数据表明使用PcpA和肺炎球菌溶血素可赋予保护。

[0147] 实施例7:针对其他肺炎球菌的交叉保护

[0148] 为了确定PcpA是否引起交叉保护，使用以上描述的方法检验除实施例1-2中描述的菌株之外的菌株。对于研究败血症，检验除TIGR4之外的菌株，例如WU2、A66、BG7322、EF6796、D39。这些菌株是荚膜型3、3、6B、6A和2。对于检查肺感染，使用在局灶肺感染的小鼠模型中起很好作用的菌株。这些菌株包括EF9309、TG0893、L82016、BG7322和EF6796。这些为荚膜型23F、14、6B、6B和6A。

[0149] 实施例8.来自肺炎链球菌血清型6的重组PcpA的克隆和表达。

[0150] 按照以下克隆来自肺炎链球菌血清型6菌株14453(ATCC指定号55987)的PcpA基因片段。将缺少编码PcpA C末端胆碱结合结构域(CBD)重复序列(repeats)的部分，并且缺少编码天然信号肽(SP)序列的部分的pcpA基因克隆于pET-30a(Novagen,Inc.,Madison,WI)

的NdeI和XhoI克隆位点之间，如图14所示。通过聚合酶链式反应(PCR)从肺炎链球菌血清型6菌株的染色体(choromosomal)DNA扩增pcpA基因的内部基因片段(ΔSPΔCBD1335bp)，所述反应使用寡核苷酸引物5'-TAGCCTCGAGTTAACCTTTGTCTTTAACCCAACCAACTACTCCCTGATTAG-3'(SEQ ID NO:43)和5'-CTAATGAACCACATATGGCAGATACTCCTAGTTCGGAAGTAATC-3'(SEQ ID NO:44)。如实施例1所描述的执行PCR反应。所述PCR引物掺入限制核酸内切酶位点NdeI和XhoI。产生的编码PcpAΔSPΔCBD的1335个碱基对的片段在任一末端含有NdeI和XhoI位点。将扩增的片段凝胶纯化并用NdeI和XhoI消化，然后在具有强力的T7启动子和翻译信号的pET-30a载体(Novagen,Inc.,Madison,WI)的NdeI和XhoI位点之间连接pcpA基因片段(图14)。DNA测序确认重组质粒pJMS87含有pcpA基因片段ΔSPΔCBD1335bp。将质粒pJMS87转化到大肠杆菌菌株BL21(DE3)，用于蛋白质制备。当用IPTG诱导时，所述大肠杆菌菌株表达缺少天然信号肽(ΔSP)和C末端胆碱结合结构域(ΔCBD)的PcpA蛋白质。所表达的蛋白质用SDS-PAGE分析鉴定。

[0151] rPcpA蛋白质(也称为PcpAΔSPΔCBD)的序列如下。有下划线的残基(M)来自克隆载体。

[0152] MADTPSSEVI KETKVGSIIQ QNNIKYKVLT VEGNIGTVQV GNGVTPVEFE

[0153] AGQDGKPFTI PTKITVGDKV FTVTEVASQA FSYYPDETGR IVYYPSSITI

[0154] PSSIKKIQKK GFHGSKAKTI IFDKGSQLEK IEDRAFDFSE LEEIELPASL

[0155] EYIGTSAFSF SQKLKKL TFS SSSKLELISH EAFANLSNLE KLTLPKSVKT

[0156] LGSNLFRLTT SLKHVDVEEG NESFASVDGV LFSKDKTQLI YYPSQKNDES

[0157] YKTPKETKEL ASYSFNKNSY LKKLELNEGL EKIGTFAFAD AIKLEEISLP

[0158] NSLETIERLA FYGNLELKEL ILPDNVKNFG KHVMNGLPKL KSLTIGNNIN

[0159] SLPSFFLSGV LDSLKEIHIK NKSTEFSVKK DTFAIPETVK FYVTSEHIKD

[0160] VLKSNLSTSN DIIVEKVDNI KQETDVAKPK KNSNQGVVGW VKDKG

[0161] (SEQ ID NO:45)

[0162] 实施例9:在败血症模型中，用PcpA ΔSPΔCBD免疫引起针对肺炎的保护。

[0163] 为了确定PcpA ΔSPΔCBD是否在鼠败血症模型中防御感染，将小鼠用每剂10、5、2.5、1.25和0.625μg的纯化重组PcpA ΔSPΔCBD(rPcpA ΔSPΔCBD)免疫并且用每只小鼠约300CFU的肺炎链球菌菌株WUBM3攻击。rPcpA ΔSPΔCBD用磷酸铝佐剂配制。

[0164] 简单地说，用PBS佐剂对照、含有30μg三价重组PspA蛋白质的肺炎链球菌PspA蛋白质或每剂10、5、2.5、1.25或0.625μg的rPcpA ΔSPΔCBD免疫小鼠。健康的雌性BALB/c K-72小鼠(Charles River Laboratories,Wilmington,MA)，每组约14只，在第0天皮下(s.c)免疫。在第21天执行第二次免疫并且第三次免疫在第43天。在第63天，用0.4ml 300CFU肺炎链球菌菌株WU2BM3细菌的剂量腹膜内(IP)攻击小鼠。存活率的百分比对时间(天)的曲线如图15A所示。攻击后第7天存活率的百分比如图15B所示。

[0165] 这些结果表明rPcpA在每剂至少约0.625μg至每剂至少约10μg时具有保护性。与佐剂对照组相比，rPcpA赋予统计学上显著的保护(费舍尔单侧或双侧精确检验)。

[0166] 表6.rPcpA保护与对照相比的统计分析。

[0167] 费舍尔精确检验统计

[0168]

| SPN222 | PBS | PspA | PcpA 10μg | PcpA 5μg | PcpA 2.5μg | PcpA 1.25μg | PcpA 0.625μg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| %存活率 | 0 | 80 | 67 | 64 | 53 | 60 | 40 |
| 单侧P值 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.008 |
| 双侧P值 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.001 | 0.017 |

[0169] 实施例10:PcpA ΔSPΔCBD免疫引起对肺炎的防御。

[0170] 实施例5的rPcpA蛋白质还用于检验这一蛋白在小鼠肺炎模型中针对肺炎链球菌菌株FE3030的攻击的防御效力。10只CBA/N小鼠的组用如表7所示的200μl免疫原制剂以3星期的间隔皮下免疫三次(第0、21和42天)。第3次免疫后三星期(第63天),麻醉下用$5.6x10^6$CFU的菌株EF3030鼻内攻击小鼠。攻击后五天(第68天),处死小鼠,并且收获肺组织和血液并铺板,用于CFU回收。免疫组在3mg/ml的磷酸铝佐剂中配制。

[0171] 表7.免疫原制剂

| 组 | 免疫原制剂 |
|---|---|
| 1 | 安慰剂(3 mg/mL $AlPO_4$) |
| 2 | 三价 PspA(各 50 μg/mL+ 3 mg/mL $AlPO_4$) |
| 3 | PcpA - (100 μg/mL + 3 mg/mL $AlPO_4$) |
| 4 | PcpA - (50 μg/mL + 3 mg/mL $AlPO_4$) |
| 5 | PcpA - (25 μg/mL + 3 mg/mL $AlPO_4$) |
| 6 | PcpA - (12.5 μg/mL + 3mg/mL $AlPO_4$) |

[0172]

[0173] 三价PspA免疫原由来自肺炎链球菌Rx1-M1、EF3296和EF5668的PspA组成。

[0174] 结果如图16所示。与对照组(仅佐剂,组1)对比时,rPcpA蛋白质赋予显著保护(组3-6)和与阳性对照相似的保护水平(组2PspA)。来自Mann-Whitney检验的p值示于表8。

[0175] 表8.rPcpA保护与对照相比的Mann-Whitney检验

[0176]

| | 组1 | 组2 | 组3 | 组4 | 组5 | 组6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P值 | | 0.0848 | 0.0407 | 0.0106 | 0.0637 | 0.0087 |
| 平均数 | 3.987 | 2.360 | 2.223 | 1.823 | 2.375 | 1.876 |
| 中值 | 3.390 | 1.590 | 1.900 | 1.590 | 2.590 | 1.590 |
| 标准误差 | 0.6527 | 0.3397 | 0.6527 | 0.2009 | 0.1819 | 0.1332 |

[0177] 通过引用在此完整地并入本文提及的出版物和它们被提及所涉及的材料。

<110> UAB研究基金会
赛诺菲巴斯德有限公司
<120> 免疫原性PcpA多肽和其用途
<130> 20674-078W01
<150> US 60/822,715
<151> 2006-08-17
<150> US 60/827,348
<151> 2006-09-28
<150> US 60/917,178
<151> 2007-05-10
<160> 52
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 192
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 1

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

165 170 175
Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu Ile Leu
180 185 190

<210> 2
<211> 195
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 2

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

<210> 3
<211> 379
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 3

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

305 310 315 320
Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu Ile Leu
325 330 335
Pro Asp Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly Leu Pro
340 345 350
Lys Phe Leu Thr Leu Ser Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu Pro Ser Phe
355 360 365
Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu
370 375

<210> 4
<211> 373
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 4
Tyr Val Pro Asn Glu Pro Ile Leu Ala Asp Thr Pro Ser Ser Glu Val
1 5 10 15
Ile Lys Glu Thr Lys Val Gly Ser Ile Ile Gln Gln Asn Asn Ile Lys
20 25 30
Tyr Lys Val Leu Thr Val Glu Gly Asn Ile Gly Thr Val Gln Val Gly
35 40 45
Asn Gly Val Thr Pro Val Glu Phe Glu Ala Gly Gln Asp Gly Lys Pro
50 55 60
Phe Thr Ile Pro Thr Lys Ile Thr Val Gly Asp Lys Val Phe Thr Val
65 70 75 80
Thr Glu Val Ala Ser Gln Ala Phe Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu Thr Gly
85 90 95
Arg Ile Val Tyr Tyr Pro Ser Ser Ile Thr Ile Pro Ser Ser Ile Lys
100 105 110
Lys Ile Gln Lys Lys Gly Phe His Gly Ser Lys Ala Lys Thr Ile Ile
115 120 125
Phe Asp Lys Gly Ser Gln Leu Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala Phe Asp
130 135 140
Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu Tyr Ile
145 150 155 160
Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu Thr Phe
165 170 175
Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu Leu Ile Ser His Glu Ala Phe Ala Asn
180 185 190
Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys Thr Leu

195 200 205

Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu Thr Thr Ser Leu Lys His Val Asp Val
210 215 220

Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe Ala Ser Val Asp Gly Val Leu Phe Ser
225 230 235 240

Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn Asp Glu
245 250 255

Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr Ser Phe
260 265 270

Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
275 280 285

Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile
290 295 300

Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly
305 310 315 320

Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu Ile Leu Pro Asn Asn Val Lys Asn Phe
325 330 335

Gly Lys His Val Met Asn Gly Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu Thr Ile
340 345 350

Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly Val Leu
355 360 365

Asp Ser Leu Lys Glu
370

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 5

Leu Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 6

Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile Glu Leu Pro
1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 7
Ala Ser Leu Glu Tyr Ile Gly Thr Ser Ala
1 5 10
<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 8
Phe Ser Phe Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu
1 5 10
<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 9
Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu Leu
1 5 10
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 10
Ile Ser His Glu Ala Phe Ala Asn Leu Ser
1 5 10
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 11
Asn Leu Glu Lys Leu Thr Leu Pro Lys Ser
1 5 10
<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 12
Val Lys Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 13

Leu Thr Thr Ser Leu Asn Met Leu Met Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 14

Leu Thr Thr Ser Leu Lys His Val Asp Val

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 15

Arg Gly Met Ile Val Ala Ser Val Asp Gly

1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 16

Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe Ala Ser Val Asp Gly

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 17

Val Ser Phe Gln Ser Lys Thr Gln Leu Ile

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 18
Val Leu Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile
1 5 10
<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 19
Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn Asp Glu Ser
1 5 10
<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 20
Tyr Lys Thr Pro Lys Glu Thr Lys Glu Leu
1 5 10
<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 21
Ala Ser Tyr Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr
1 5 10
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 22
Leu Lys Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly Leu
1 5 10
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 23
Gln Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe Ala Asp
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 24
Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe Ala Asp
1 5 10
<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 25
Ala Thr Lys Leu Glu Glu Ile Ser Leu Pro
1 5 10
<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 26
Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ser Leu Pro
1 5 10
<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 27
Asn Ser Leu Glu Thr Ile Glu Arg Leu Ala
1 5 10
<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 28
Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu Ile Leu
1 5 10
<210> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 29

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

<210> 30

<211> 43

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 30

Pro Asp Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly Leu Pro
1 5 10 15
Lys Phe Leu Thr Leu Ser Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu Pro Ser Phe
20 25 30
Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu
35 40

<210> 31

<211> 44

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 31

Pro Asp Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly Leu Pro
1 5 10 15
Lys Leu Lys Ser Leu Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu Pro Ser
20 25 30
Phe Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu
35 40

<210> 32

<211> 2127

<212> DNA

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 32

atgaaaaaaa ctacaatatt atcattaact acagctgcgg ttattttagc agcatatgtc 60
cctaatgaac caatcctagc agcatatgtc cctaatgaac caatcctagc agatactcct 120
agttcggaag taatcaaaga gactaaagtt ggaagtatta ttcaacaaaa taatatcaaa 180
tataaggttc taactgtaga aggtaacata ggaactgttc aagtgggtaa tggagttact 240
cctgtagagt ttgaagctgg tcaagatgga aaaccattca cgattcctac aaaaatcaca 300
gtaggtgata aagtatttac cgttactgaa gtagctagtc aagcttttag ttattatcca 360
gatgaaacag gtagaattgt ctactatcct agctctatta ctatcccatc aagcataaaa 420
aaaatacaaa aaaaaggctt ccatggaagt aaagctaaaa ctattatttt tgacaaaggc 480
agtcagctgg agaaaattga agatagagct tttgattttt ctgaattaga agagattgaa 540
ttgcctgcat ctctagaata tattggaaca agtgcatttt cttttagtca aaaattgaaa 600
aagctaacct tttcctcaag ttcaaaatta gaattaatat cacatgaggc ttttgctaat 660
ttatcaaatt tagagaaact aacattacca aaatcggtta aaacattagg aagtaatcta 720
tttagactca ctactagctt aaacatgttg atgttgagag gaatgatcgt tgcctcagtt 780
gatggtgttt cgtttcaaag taaaactcaa ttaatttatt atccaagtca aaaaaatgac 840
gaaagttata aaacgcctaa ggagacaaaa gaacttgcat catattcgtt taataaaaat 900
tcttacttga aaaaactcga attgaatgaa ggtttacaaa aaatcggtac ttttgcattt 960
gcggatgcga ccaaacttga agaaattagc ttaccaaata gtttagaaac tattgaacgt 1020
ttagcctttt acggtaattt agaattaaaa gaacttatat taccagataa tgttaaaaat 1080
tttggtaaac acgttatgaa cggtttacca aaatttttaa cattatctgg taataatatc 1140
aactcattgc cgtccttctt cctaagtggc gtcttagatt cattaaagga aattcatatt 1200
aagaataaaa gtacagagtt ttctgtgaaa aaagatacat ttgcaattcc tgaaactgtt 1260
aagttctatg taacatcaga acatataaaa gatgttctta aatcaaattt atctactagt 1320
aatgatatca ttgttgaaaa agtagataat ataaaacaag aaactgatgt agctaaacct 1380
aaaaagaatt ctaatcaggg agtagttggt tgggttaaag acaaaggttt atggtattac 1440
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggttt atggtattac 1500
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggttt atggtattac 1560
ttaaatgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1620
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1680
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1740
ttaaatgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1800
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1860
ttaaatgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1920
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 1980
ttaaacgaat caggttcaat ggctactggt tgggttaaag acaaaggctt atggtattac 2040

ttaaatgaat caggttcaat ggctactggt tggtttaaag tttctggtaa atggtactat 2100
acctataatt caggagattt tatttag 2127

<210> 33
<211> 2106
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 33

atgaaaaaaa ctacaatatt atcattaact acagctgcgg ttattttagc agatgtccct 60
aatgaaccaa tcctagcaga tactcccagt tcggaagtaa tcaaagagac taaagttgga 120
agtattattc aacaaaataa tatcaaatat aaggttctaa ctgtagaagg taacatagga 180
actgttcaag tgggtaatgg agttactcct gtagagtttg aagctggtca agatggaaaa 240
ccattcacga ttcctacaaa aatcacagta ggtgataaag tatttaccgt tactgaagta 300
gctagtcaag cttttagtta ttatccagat gaaacaggta gaattgtcta ctatcctagc 360
tctattacta tcccatcaag cataaaaaaa atacaaaaaa aaggcttcca tggaagtaaa 420
gctaaaacta ttatttttga caaaggcagt cagctggaga aaattgaaga tagagctttt 480
gatttttctg aattagaaga gattgaattg cctgcatctc tagaatatat tggaacaagt 540
gcattttctt ttagtcaaaa attgaaaaag ctaacctttt cctcaagttc aaaattagaa 600
ttaatatcac atgaggcttt tgctaattta tcaaatttag agaaactaac attaccaaaa 660
tcggttaaaa cattaggaag taatctattt agactcacta ctagcttaaa acatgttgat 720
gttgaagaag gaaatgaatc gtttgcctca gttgatggtg ttttgttttc aaaagataaa 780
acccaattaa tttattatcc aagtcaaaaa aatgacgaaa gttataaaac gcctaaggag 840
acaaaagaac ttgcatcata ttcgtttaat aaaaattctt acttgaaaaa actcgaattg 900
aatgaaggtt tagaaaaaat cggtactttt gcatttgcag atgcgattaa acttgaagaa 960
attagcttac caaatagttt agaaactatt gaacgtttag ccttttacgg taatttagaa 1020
ttaaaagaac ttatattacc aaataatgtt aaaaattttg gtaaacacgt tatgaacggt 1080
ttaccaaaat taaaaagttt aacaattggt aataatatca actcattgcc gtccttcttc 1140
ctaagtggcg tcttagattc attaaaggaa attcatatta agaataaaag tacagagttt 1200
tctgtgaaaa aagatacatt tgcaattcct gaaactgtta agttctatgt aacatcagaa 1260
catataaaag atgttcttaa atcaaattta tctactagta atgatatcat tgttgaaaaa 1320
gtagataata taaaacaaga aactgatgta gctaaaccta aaaagaattc taatcaggga 1380
gtagttggtt gggttaaaga caaaggttta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1440
gctactggtt gggttaaaga caaaggttta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1500
gctactggtt gggttaaaga caaaggttta tggtattact taaatgaatc aggttcaatg 1560
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1620
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1680
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaatgaatc aggttcaatg 1740
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1800
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaatgaatc aggttcaatg 1860
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1920

gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaacgaatc aggttcaatg 1980
gctactggtt gggttaaaga caaaggctta tggtattact taaatgaatc aggttcaatg 2040
gctactggtt ggtttaaagt ttctggtaaa tggtactata cctataattc aggagatttt 2100
atttag 2106

<210> 34
<211> 393
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 34

ttagagaaac taacattacc aaaatcggtt aaaacattag gaagtaatct atttagactc 60
actactagct taaacatgtt gatgttgaga ggaatgatcg ttgcctcagt tgatggtgtt 120
tcgtttcaaa gtaaaactca attaatttat tatccaagtc aaaaaaatga cgaaagttat 180
aaaacgccta aggagacaaa agaacttgca tcatattcgt ttaataaaaa ttcttacttg 240
aaaaaactcg aattgaatga aggtttacaa aaaatcggta cttttgcatt tgcggatgcg 300
accaaacttg aagaaattag cttaccaaat agtttagaaa ctattgaacg tttagccttt 360
tacggtaatt tagaattaaa agaacttata tta 393

<210> 35
<211> 544
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 35

ttagagaaac taacattacc aaaatcggtt aaaacattag gaagtaatct atttagactc 60
actactagct taaaacatgt tgatgttgaa gaaggaaatg aatcgtttgc ctcagttgat 120
ggtgttttgt tttcaaaaga taaaacccaa ttaatttatt atccaagtca aaaaaatgac 180
gaaagttata aaacgcctaa ggagacaaaa gaacttgcat catattcgtt taataaaaat 240
tcttacttga aaaaactcga attgaatgaa ggtttagaaa aaatcggtac ttttgcattt 300
gcagatgcga ttaaacttga agaaattagc ttaccaaata gtttagaaac tattgaacgt 360
ttagcctttt acggtaattt agaattaaaa gaacttatat taccaaataa tgttaaaaat 420
tttggtaaac acgttatgaa cggtttacca aaattaaaaa gtttaacaat tggtaataat 480
atcaactcat tgccgtcctt cttcctaagt ggcgtcttag attcattaaa ggaaattcat 540
atta 544

<210> 36
<211> 1137
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 36

tatgtcccta atgaaccaat cctagcagca tatgtcccta atgaaccaat cctagcagat 60
actcctagtt cggaagtaat caaagagact aaagttggaa gtattattca acaaaataat 120
atcaaatata aggttctaac tgtagaaggt aacataggaa ctgttcaagt gggtaatgga 180

gttactcctg tagagtttga agctggtcaa gatggaaaac cattcacgat tcctacaaaa 240
atcacagtag gtgataaagt atttaccgtt actgaagtag ctagtcaagc ttttagttat 300
tatccagatg aaacaggtag aattgtctac tatcctagct ctattactat cccatcaagc 360
ataaaaaaaa tacaaaaaaa aggcttccat ggaagtaaag ctaaaactat tatttttgac 420
aaaggcagtc agctggagaa aattgaagat agagcttttg atttttctga attagaagag 480
attgaattgc ctgcatctct agaatatatt ggaacaagtg cattttcttt tagtcaaaaa 540
ttgaaaaagc taacctttc ctcaagttca aaattagaat taatatcaca tgaggctttt 600
gctaatttat caaatttaga gaaactaaca ttaccaaaat cggttaaaac attaggaagt 660
aatctattta gactcactac tagcttaaac atgttgatgt tgagaggaat gatcgttgcc 720
tcagttgatg gtgtttcgtt tcaaagtaaa actcaattaa tttattatcc aagtcaaaaa 780
aatgacgaaa gttataaaac gcctaaggag acaaaagaac ttgcatcata ttcgtttaat 840
aaaaattctt acttgaaaaa actcgaattg aatgaaggtt tacaaaaaat cggtactttt 900
gcatttgcgg atgcgaccaa acttgaagaa attagcttac caaatagttt agaaactatt 960
gaacgtttag ccttttacgg taatttagaa ttaaaagaac ttatattacc agataatgtt 1020
aaaaattttg gtaaacacgt tatgaacggt ttaccaaaat ttttaacatt atctggtaat 1080
aatatcaact cattgccgtc cttcttccta agtggcgtct tagattcatt aaaggaa 1137

<210> 37
<211> 1119
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 37

gatgtcccta atgaaccaat cctagcagat actcccagtt cggaagtaat caaagagact 60
aaagttggaa gtattattca acaaaataat atcaaatata aggttctaac tgtagaaggt 120
aacataggaa ctgttcaagt gggtaatgga gttactcctg tagagtttga agctggtcaa 180
gatggaaaac cattcacgat tcctacaaaa atcacagtag gtgataaagt atttaccgtt 240
actgaagtag ctagtcaagc ttttagttat tatccagatg aaacaggtag aattgtctac 300
tatcctagct ctattactat cccatcaagc ataaaaaaaa tacaaaaaaa aggcttccat 360
ggaagtaaag ctaaaactat tatttttgac aaaggcagtc agctggagaa aattgaagat 420
agagcttttg atttttctga attagaagag attgaattgc ctgcatctct agaatatatt 480
ggaacaagtg cattttcttt tagtcaaaaa ttgaaaaagc taacctttc ctcaagttca 540
aaattagaat taatatcaca tgaggctttt gctaatttat caaatttaga gaaactaaca 600
ttaccaaaat cggttaaaac attaggaagt aatctattta gactcactac tagcttaaaa 660
catgttgatg ttgaagaagg aaatgaatcg tttgcctcag ttgatggtgt tttgttttca 720
aaagataaaa cccaattaat ttattatcca agtcaaaaaa atgacgaaag ttataaaacg 780
cctaaggaga caaaagaact tgcatcatat tcgtttaata aaaattctta cttgaaaaaa 840
ctcgaattga atgaaggttt agaaaaaatc ggtacttttg catttgcaga tgcgattaaa 900
cttgaagaaa ttagcttacc aaatagttta gaaactattg aacgtttagc cttttacggt 960
aatttagaat taaaagaact tatattacca aataatgtta aaaattttgg taaacacgtt 1020
atgaacggtt taccaaaatt aaaaagttta acaattggta ataatatcaa ctcattgccg 1080

tccttcttcc taagtggcgt cttagattca ttaaaggaa 1119

<210> 38

<211> 366

<212> DNA

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)

<400> 38

agttcggaag taatcaaaga gactaaagtt ggaagtatta ttcaacaaaa taatatcaaa 60

tataaggttc taactgtaga aggtaacata ggaactgttc aagtgggtaa tggagttact 120

cctgtagagt ttgaagctgg tcaagatgga aaaccattca cgattcctac aaaaatcaca 180

gtaggtgata aagtatttac cgttactgaa gtagctagtc aagcttttag ttattatcca 240

gatgaaacag gtagaattgt ctactatcct agctctatta ctatcccatc aagcataaaa 300

aaaatacaaa aaaaaggctt ccatggaagt aaagctaaaa ctattatttt tgacaaaggc 360

agtcag 366

<210> 39

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成制备的寡核苷酸

<400> 39

cgcggatcca tatgtcccta atgaacc 27

<210> 40

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成制备的寡核苷酸

<400> 40

gcgctcgagt tcctttaatg aatctaagac gccacttagg aagaaggac 49

<210> 41

<211> 390

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 41

Met Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro Tyr Val Pro Asn Glu Pro Ile
1 5 10 15

Leu Ala Asp Thr Pro Ser Ser Glu Val Ile Lys Glu Thr Lys Val Gly

20 25 30

Ser Ile Ile Gln Gln Asn Asn Ile Lys Tyr Lys Val Leu Thr Val Glu

35 40 45

Gly Asn Ile Gly Thr Val Gln Val Gly Asn Gly Val Thr Pro Val Glu

50 55 60

Phe Glu Ala Gly Gln Asp Gly Lys Pro Phe Thr Ile Pro Thr Lys Ile

65 70 75 80

Thr Val Gly Asp Lys Val Phe Thr Val Thr Glu Val Ala Ser Gln Ala

85 90 95

Phe Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu Thr Gly Arg Ile Val Tyr Tyr Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Thr Ile Pro Ser Ser Ile Lys Lys Ile Gln Lys Lys Gly Phe

115 120 125

His Gly Ser Lys Ala Lys Thr Ile Ile Phe Asp Lys Gly Ser Gln Leu

130 135 140

Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala Phe Asp Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile

145 150 155 160

Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe

165 170 175

Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu

180 185 190

Leu Ile Ser His Glu Ala Phe Ala Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu

195 200 205

Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu

210 215 220

Thr Thr Ser Leu Lys His Val Asp Val Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe

225 230 235 240

Ala Ser Val Asp Gly Val Leu Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile

245 250 255

Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn Asp Glu Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu

260 265 270

Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys

275 280 285

Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly Leu Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe

290 295 300

Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu

305 310 315 320

Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu

325 330 335

Ile Leu Pro Asn Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly
340 345 350
Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu
355 360 365
Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu Leu Glu
370 375 380
His His His His His His
385 390

<210> 42
<211> 1162
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 42
ggatccatat gtccctaatg aaccaatcct agcagcatat gtccctaatg aaccaatcct 60
agcagatact cccagttcgg aagtaatcaa agagactaaa gttggaagta ttattcaaca 120
aaataatatc aaatataagg ttctaactgt agaaggtaac ataggaactg ttcaagtggg 180
taatggagtt actcctgtag agtttgaagc tggtcaagat ggaaaaccat tcacgattcc 240
tacaaaaatc acagtaggtg ataaagtatt taccgttact gaagtagcta gtcaagcttt 300
tagttattat ccagatgaaa caggtagaat tgtctactat cctagctcta ttactatccc 360
atcaagcata aaaaaaatac aaaaaaaagg cttccatgga agtaaagcta aaactattat 420
ttttgacaaa ggcagtcagc tggagaaaat tgaagataga gcttttgatt tttctgaatt 480
agaagagatt gaattgcctg catctctaga atatattgga acaagtgcat tttcttttag 540
tcaaaaattg aaaaagctaa ccttttcctc aagttcaaaa ttagaattaa tatcacatga 600
ggcttttgct aatttatcaa atttagagaa actaacatta ccaaaatcgg ttaaaacatt 660
aggaagtaat ctatttagac tcactactag cttaaaacat gttgatgttg aagaaggaaa 720
tgaatcgttt gcctcagttg atggtgtttt gttttcaaaa gataaaaccc aattaattta 780
ttatccaagt caaaaaaatg acgaaagtta taaaacgcct aaggagacaa aagaacttgc 840
atcatattcg tttaataaaa attcttactt gaaaaaactc gaattgaatg aaggtttaga 900
aaaaatcggt acttttgcat ttgcagatgc gattaaactt gaagaaatta gcttaccaaa 960
tagtttagaa actattgaac gtttagcctt ttacggtaat ttagaattaa aagaacttat 1020
attaccaaat aatgttaaaa attttggtaa acacgttatg aacggtttac caaaattaaa 1080
aagtttaaca attggtaata atatcaactc attgccgtcc ttcttcctaa gtggcgtctt 1140
agattcatta aaggaactcg ag 1162

<210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物

<400> 43

tagcctcgag ttaacctttg tctttaaccc aaccaactac tccctgatta g 51

<210> 44

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 44

ctaatgaacc acatatggca gatactccta gttcggaagt aatc 44

<210> 45

<211> 445

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)血清型6

<400> 45

Met Ala Asp Thr Pro Ser Ser Glu Val Ile Lys Glu Thr Lys Val Gly
1 5 10 15

Ser Ile Ile Gln Gln Asn Asn Ile Lys Tyr Lys Val Leu Thr Val Glu
20 25 30

Gly Asn Ile Gly Thr Val Gln Val Gly Asn Gly Val Thr Pro Val Glu
35 40 45

Phe Glu Ala Gly Gln Asp Gly Lys Pro Phe Thr Ile Pro Thr Lys Ile
50 55 60

Thr Val Gly Asp Lys Val Phe Thr Val Thr Glu Val Ala Ser Gln Ala
65 70 75 80

Phe Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu Thr Gly Arg Ile Val Tyr Tyr Pro Ser
85 90 95

Ser Ile Thr Ile Pro Ser Ser Ile Lys Lys Ile Gln Lys Lys Gly Phe
100 105 110

His Gly Ser Lys Ala Lys Thr Ile Ile Phe Asp Lys Gly Ser Gln Leu
115 120 125

Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala Phe Asp Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile
130 135 140

Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe
145 150 155 160

Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu
165 170 175

Leu Ile Ser His Glu Ala Phe Ala Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu
180 185 190

Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu
195 200 205
Thr Thr Ser Leu Lys His Val Asp Val Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe
210 215 220
Ala Ser Val Asp Gly Val Leu Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile
225 230 235 240
Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn Asp Glu Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu
245 250 255
Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys
260 265 270
Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly Leu Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe
275 280 285
Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu
290 295 300
Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu
305 310 315 320
Ile Leu Pro Asp Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly
325 330 335
Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu
340 345 350
Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu Ile His
355 360 365
Ile Lys Asn Lys Ser Thr Glu Phe Ser Val Lys Lys Asp Thr Phe Ala
370 375 380
Ile Pro Glu Thr Val Lys Phe Tyr Val Thr Ser Glu His Ile Lys Asp
385 390 395 400
Val Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Ser Asn Asp Ile Ile Val Glu Lys
405 410 415
Val Asp Asn Ile Lys Gln Glu Thr Asp Val Ala Lys Pro Lys Lys Asn
420 425 430
Ser Asn Gln Gly Val Val Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly
435 440 445

<210> 46
<211> 1338
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)血清型6
<400> 46
atggcagata ctcctagttc ggaagtaatc aaagagacta aagttggaag tattattcaa 60
caaaataata tcaaatataa ggttctaact gtagaaggta acataggaac tgttcaagtg 120

ggtaatggag ttactcctgt agagtttgaa gctggtcaag atggaaaacc attcacgatt 180
cctacaaaaa tcacagtagg tgataaagta tttaccgtta ctgaagtagc tagtcaagct 240
tttagttatt atccagatga aacaggtaga attgtctact atcctagctc tattactatc 300
ccatcaagca taaaaaaaat acaaaaaaaa ggcttccatg gaagtaaagc taaaactatt 360
atttttgaca aaggcagtca gctggagaaa attgaagata gagcttttga tttttctgaa 420
ttagaagaga ttgaattgcc tgcatctcta gaatatattg gaacaagtgc attttctttt 480
agtcaaaaat tgaaaaagct aacctttcc tcaagttcaa aattagaatt aatatcacat 540
gaggcttttg ctaatttatc aaatttagag aaactaacat taccaaaatc ggttaaaaca 600
ttaggaagta atctatttag actcactact agcttaaaac atgttgatgt tgaagaagga 660
aatgaatcgt ttgcctcagt tgatggtgtt ttgttttcaa aagataaaac tcaattaatt 720
tattatccaa gtcaaaaaaa tgacgaaagt tataaaacgc ctaaggagac aaaagaactt 780
gcatcatatt cgtttaataa aaattcttac ttgaaaaaac tcgaattgaa tgaaggttta 840
gaaaaaatcg gtacttttgc atttgcggat gcgattaaac ttgaagaaat tagcttacca 900
aatagtttag aaactattga acgtttagcc ttttacggta atttagaatt aaaagaactt 960
atattaccag ataatgttaa aaattttggt aaacacgtta tgaacggttt accaaaatta 1020
aaaagtttaa caattggtaa taatatcaac tcattgccgt ccttcttcct aagtggcgtc 1080
ttagattcat taaaggaaat tcatattaag aataaaagta cagagttttc tgtgaaaaaa 1140
gatacatttg caattcctga aactgttaag ttctatgtaa catcagaaca tataaaagat 1200
gttcttaaat caaatttatc tactagtaat gatatcattg ttgaaaaagt agataatata 1260
aaacaagaaa ctgatgtagc taaacctaaa aagaattcta atcagggagt agttggttgg 1320
gttaaagaca aaggttaa 1338

<210> 47
<211> 1926
<212> DNA
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 47

atgaaaaaaa ctacaatatt atcattaact acagctgcgg ttattttagc agcatatgtc 60
cctaatgaac caatcctagc agatactcct agttcggaag taatcaaaga gactaaagtt 120
ggaagtatta ttcaacaaaa taatatcaaa tataaggttc taactgtaga aggtaacata 180
ggaactgttc aagtgggtaa tggagttact cctgtagagt ttgaagctgg tcaagatgga 240
aaaccattca cgattcctac aaaaatcaca gtaggtgata aagtatttac cgttactgaa 300
gtagctagtc aagcttttag ttattatcca gatgaaacag gtagaattgt ctactatcct 360
agctctatta ctatcccatc aagcataaaa aaaatacaaa aaaaaggctt ccatggaagt 420
aaagctaaaa ctattatttt tgacaaaggc agtcagctgg agaaaattga agatagagct 480
tttgattttt ctgaattaga agagattgaa ttgcctgcat ctctagaata tattggaaca 540
agtgcatttt cttttagtca aaaattgaaa aagctaacct tttcctcaag ttcaaaatta 600
gaattaatat cacatgaggc ttttgctaat ttatcaaatt tagagaaact aacattacca 660
aaatcggtta aaacattagg aagtaatcta tttagactca ctactagctt aaaacatgtt 720
gatgttgaag aaggaaatga atcgtttgcc tcagttgatg gtgttttgtt ttcaaaagat 780

aaaactcaat taatttatta tccaagtcaa aaaaatgacg aaagttataa aacgcctaag 840
gagacaaaag aacttgcatc atattcgttt aataaaaatt cttacttgaa aaaactcgaa 900
ttgaatgaag gtttagaaaa aatcggtact tttgcatttg cggatgcgat taaacttgaa 960
gaaattagct taccaaatag tttagaaact attgaacgtt tagcctttta cggtaattta 1020
gaattaaaag aacttatatt accagataat gttaaaaatt ttggtaaaca cgttatgaac 1080
ggtttaccaa aattaaaaag tttaacaatt ggtaataata tcaactcatt gccgtccttc 1140
ttcctaagtg gcgtcttaga ttcattaaag gaaattcata ttaagaataa aagtacagag 1200
ttttctgtga aaaaagatac atttgcaatt cctgaaactg ttaagttcta tgtaacatca 1260
gaacatataa aagatgttct taaatcaaat ttatctacta gtaatgatat cattgttgaa 1320
aaagtagata atataaaaca agaaactgat gtagctaaac ctaaaaagaa ttctaatcag 1380
ggagtagttg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1440
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1500
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1560
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1620
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1680
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1740
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1800
atggctactg gttggtttac agtttctggt aaatggtact atacctataa ttcaggagat 1860
ttattagtaa acacgactac acccgatggc tatcgagtca atgctaacgg tgagtgggta 1920
ggataa 1926

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 48
aactgttcaa gtgggtaatg g 21

<210> 49
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 49
tgaacttgag gaaaaggtta gc 22

<210> 50
<211> 38
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 50
atgaaaaaac tacaatatta tcattaacta cagctgcg 38
<210> 51
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 51
ccataaacct ttgtctttaa cccaaccaac tac 33
<210> 52
<211> 311
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
<400> 52

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

165 170 175

Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr

180 185 190

Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly

195 200 205

Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu

210 215 220

Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu

225 230 235 240

Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys

245 250 255

Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr

260 265 270

Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly

275 280 285

Ser Met Ala Thr Gly Trp Phe Lys Val Ser Gly Lys Trp Tyr Tyr Thr

290 295 300

Tyr Asn Ser Gly Asp Phe Ile

305 310

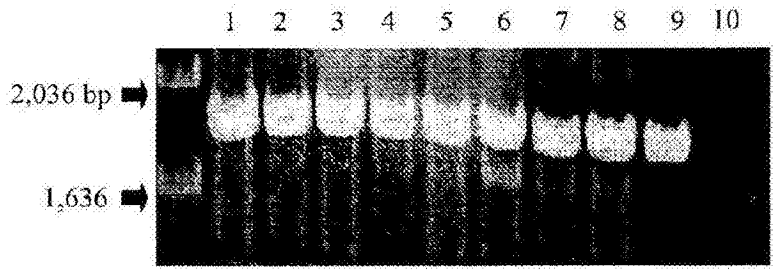

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2,036 bp
1,636

图1

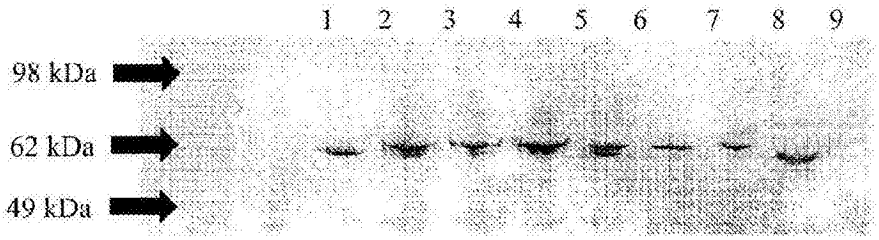

1 2 3 4 5 6 7 8 9
98 kDa
62 kDa
49 kDa

图2

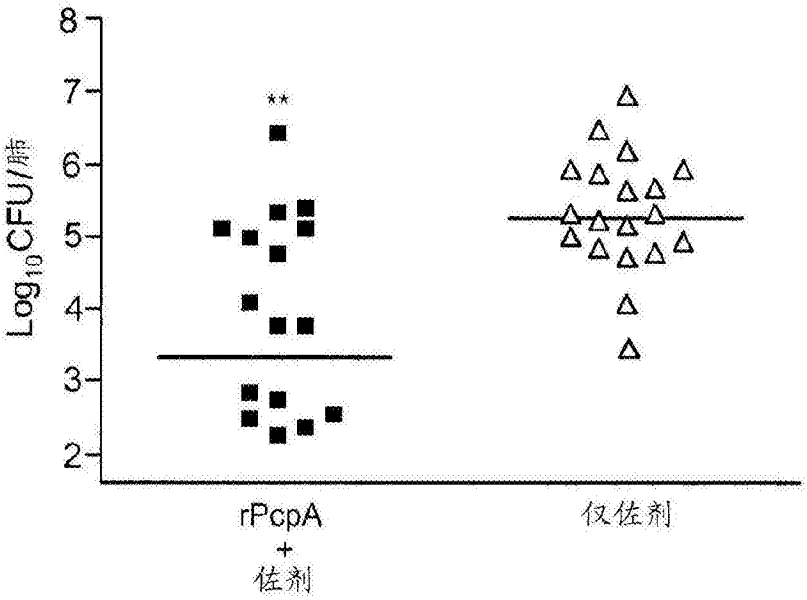

8
7
6
5
4
3
2
Log10CFU/肺
**
rPcpA
+
佐剂
仅佐剂

图3A

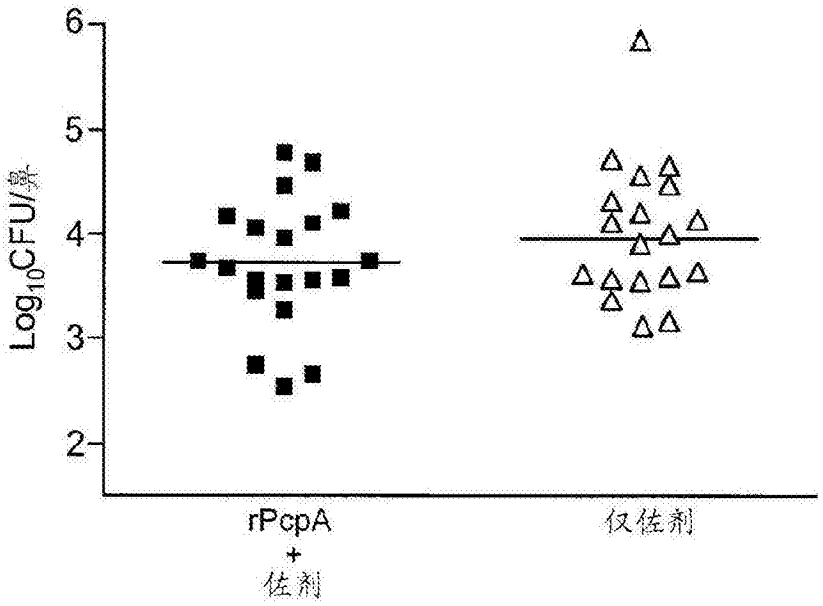

6
5
4
3
2
Log10CFU/鼻
rPcpA
+
佐剂
仅佐剂

图3B

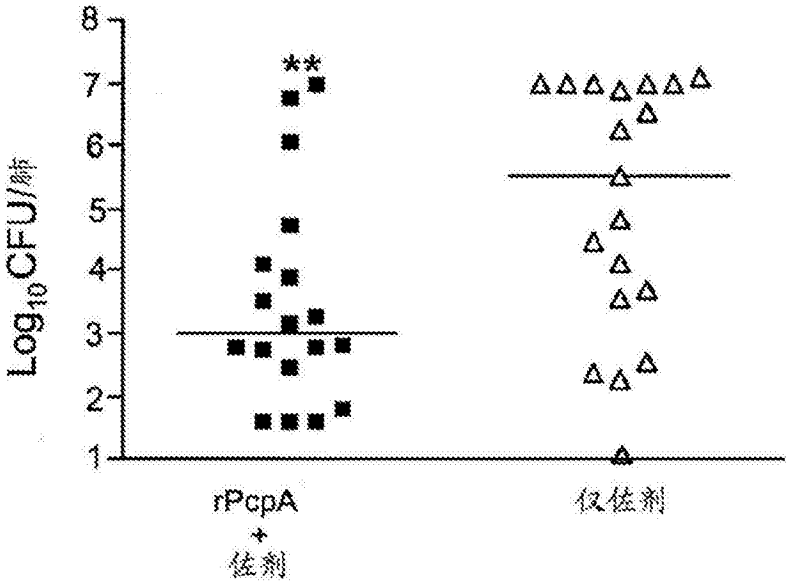

8
7
6
5
4
3
2
1
**
Log10CFU/肺
rPcpA
+
佐剂
仅佐剂

图4A

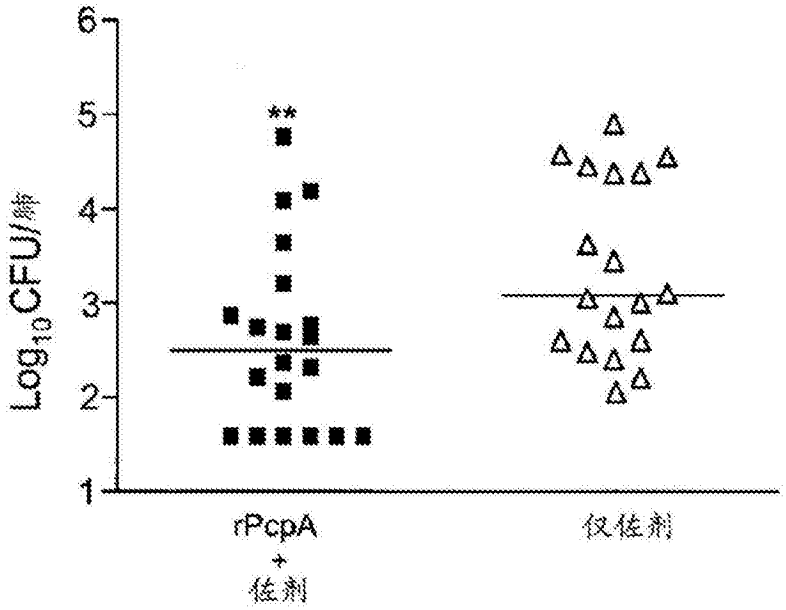

6
5
4
3
2
1
Log10CFU/肺
**
rPcpA
+
佐剂
仅佐剂

图4B

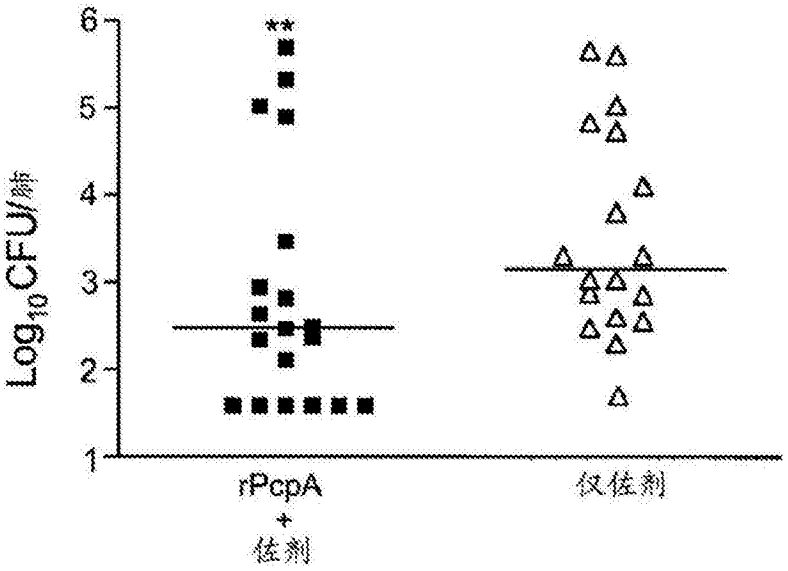

6
5
4
3
2
1
Log10CFU/肺
**
rPcpA
+
佐剂
仅佐剂

图4C

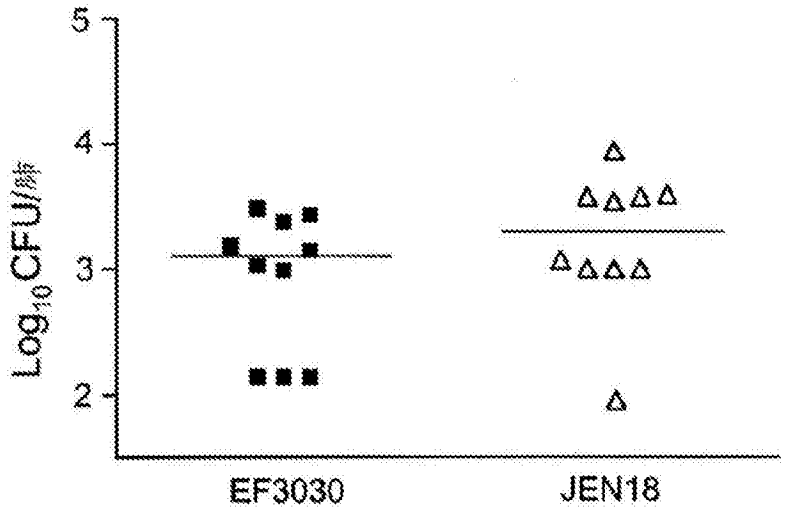

5
4
3
2
$Log_{10}CFU/$肺
EF3030
JEN18

图5

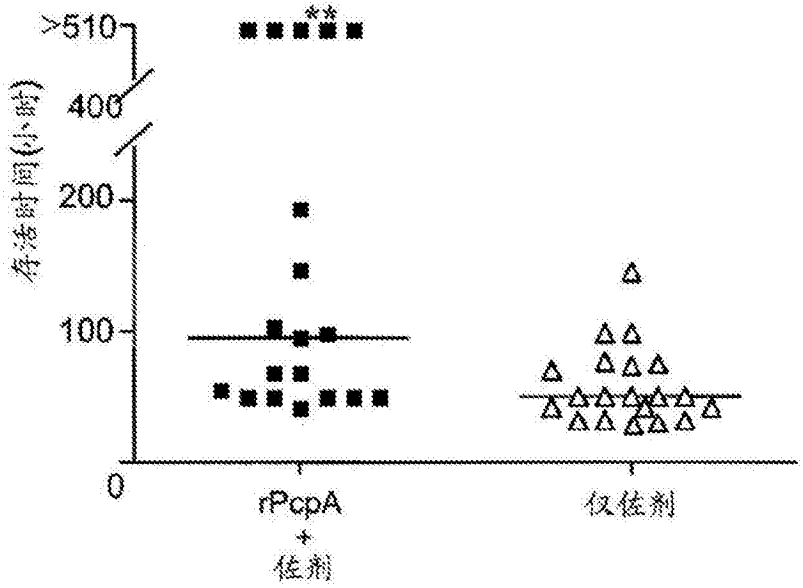

>510
400
200
100
0
存活时间(小时)
**
rPcpA
+
佐剂
仅佐剂

图6

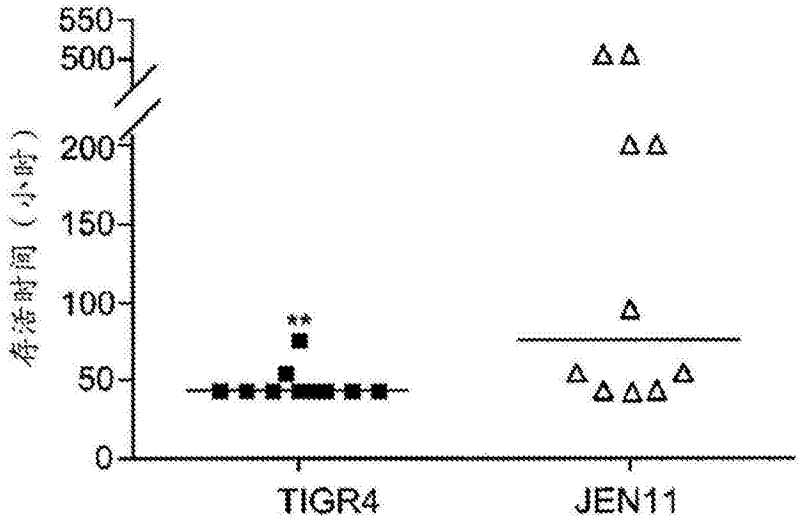

550
500
200
150
100
50
0
存活时间（小时）
**
TIGR4
JEN11

图7

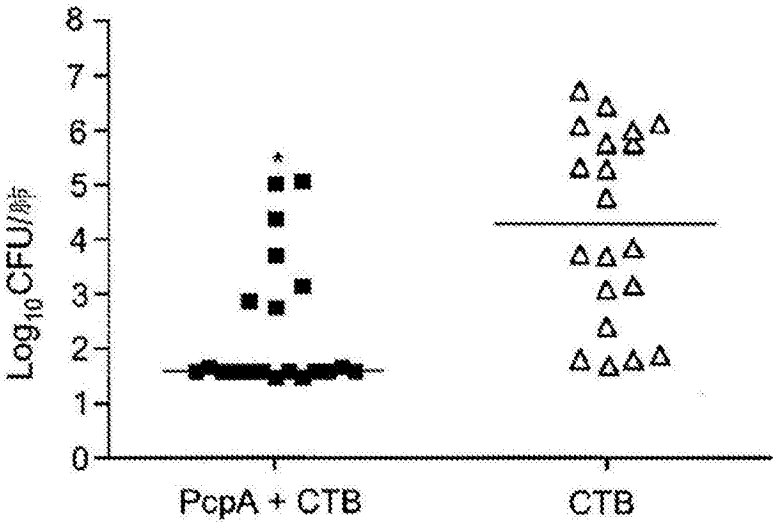

8
7
6
5
4
3
2
1
0
Log10CFU/肺
*
PcpA + CTB
CTB

图8

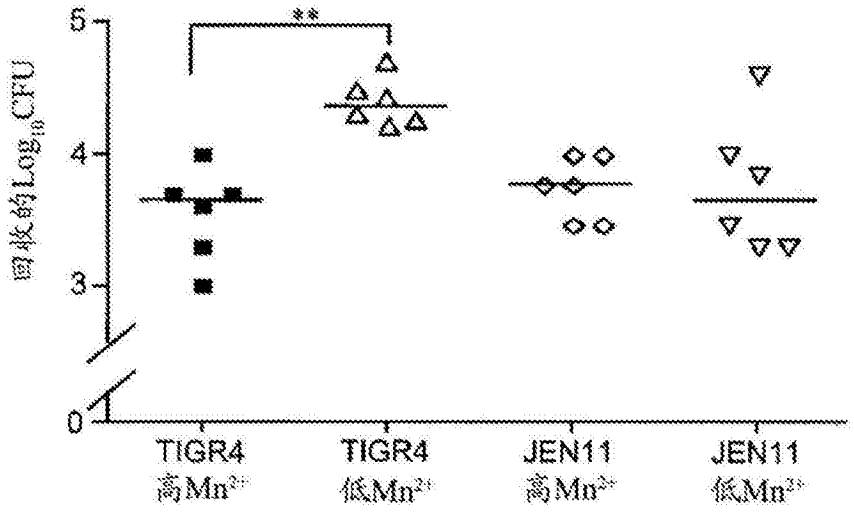

**
5
4
3
0
回收的Log10 CFU
TIGR4
高Mn2+
TIGR4
低Mn2+
JEN11
高Mn2+
JEN11
低Mn2+

图9

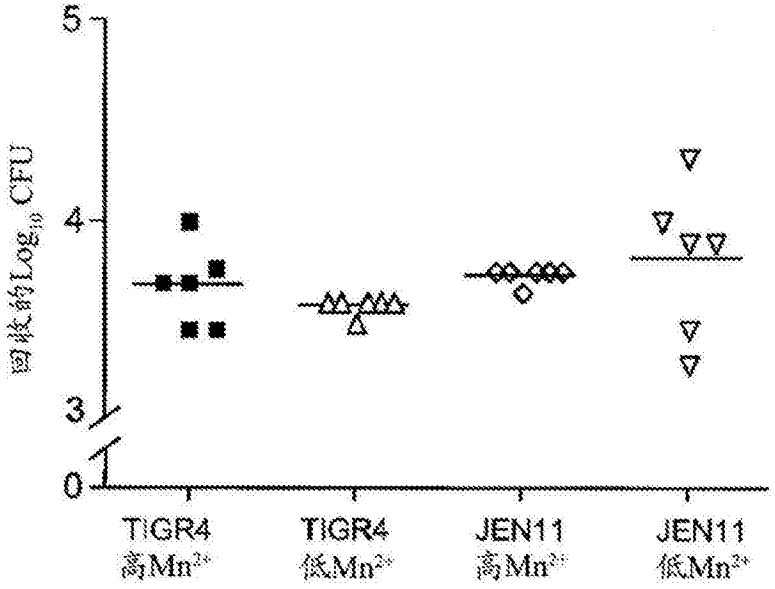

5
4
3
0
回收的Log10 CFU
TIGR4
高Mn2+
TIGR4
低Mn2+
JEN11
高Mn2+
JEN11
低Mn2+

图10

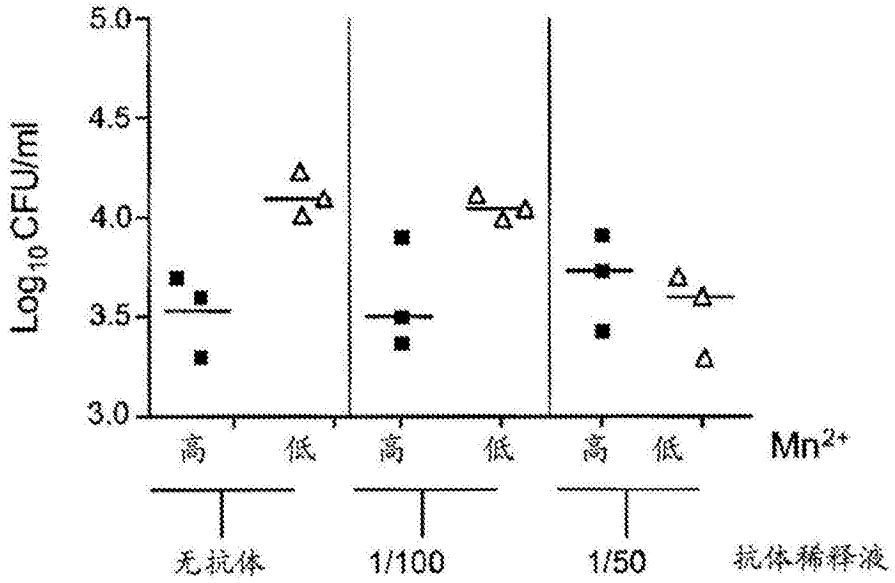

5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
Log10CFU/ml
高
低
高
低
高
低
Mn2+
无抗体
1/100
1/50
抗体稀释液

图11

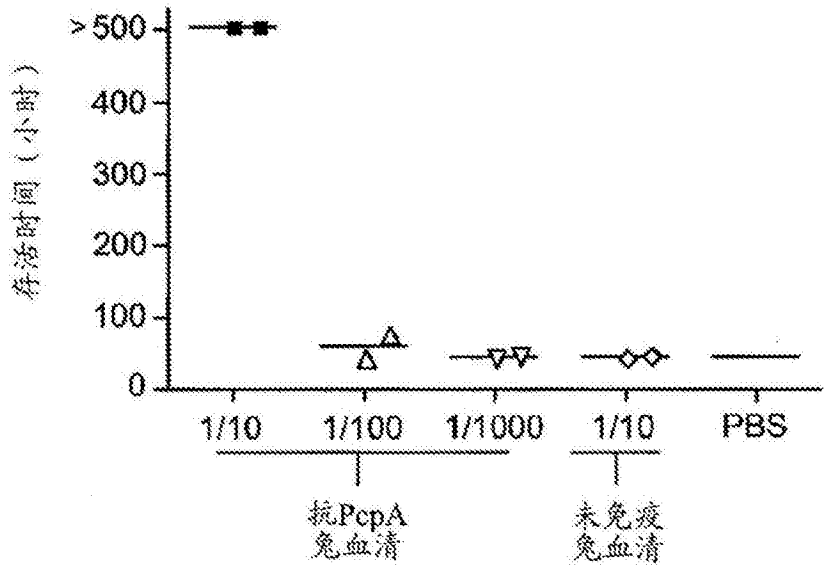

>500
400
300
200
100
0
存活时间（小时）
1/10
1/100
1/1000
1/10
PBS
抗PcpA
兔血清
未免疫
兔血清

图12

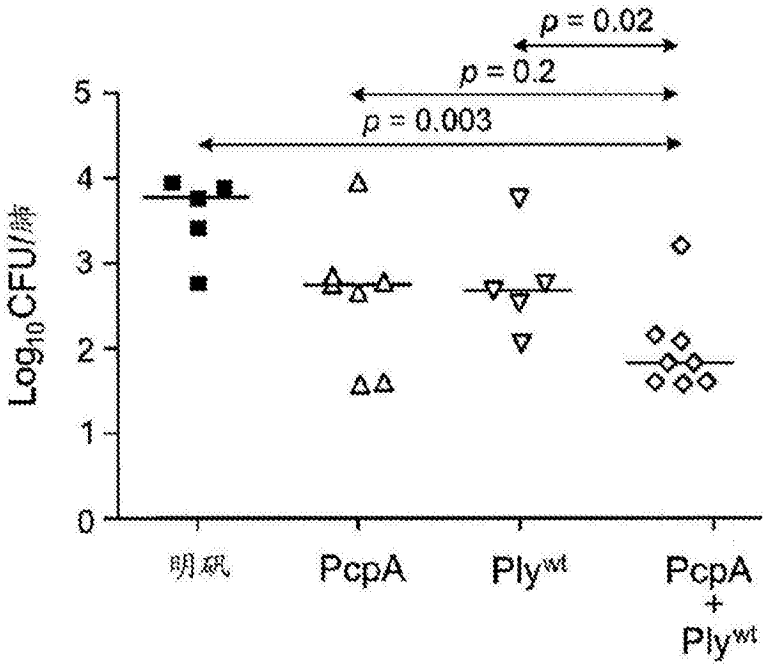



图13

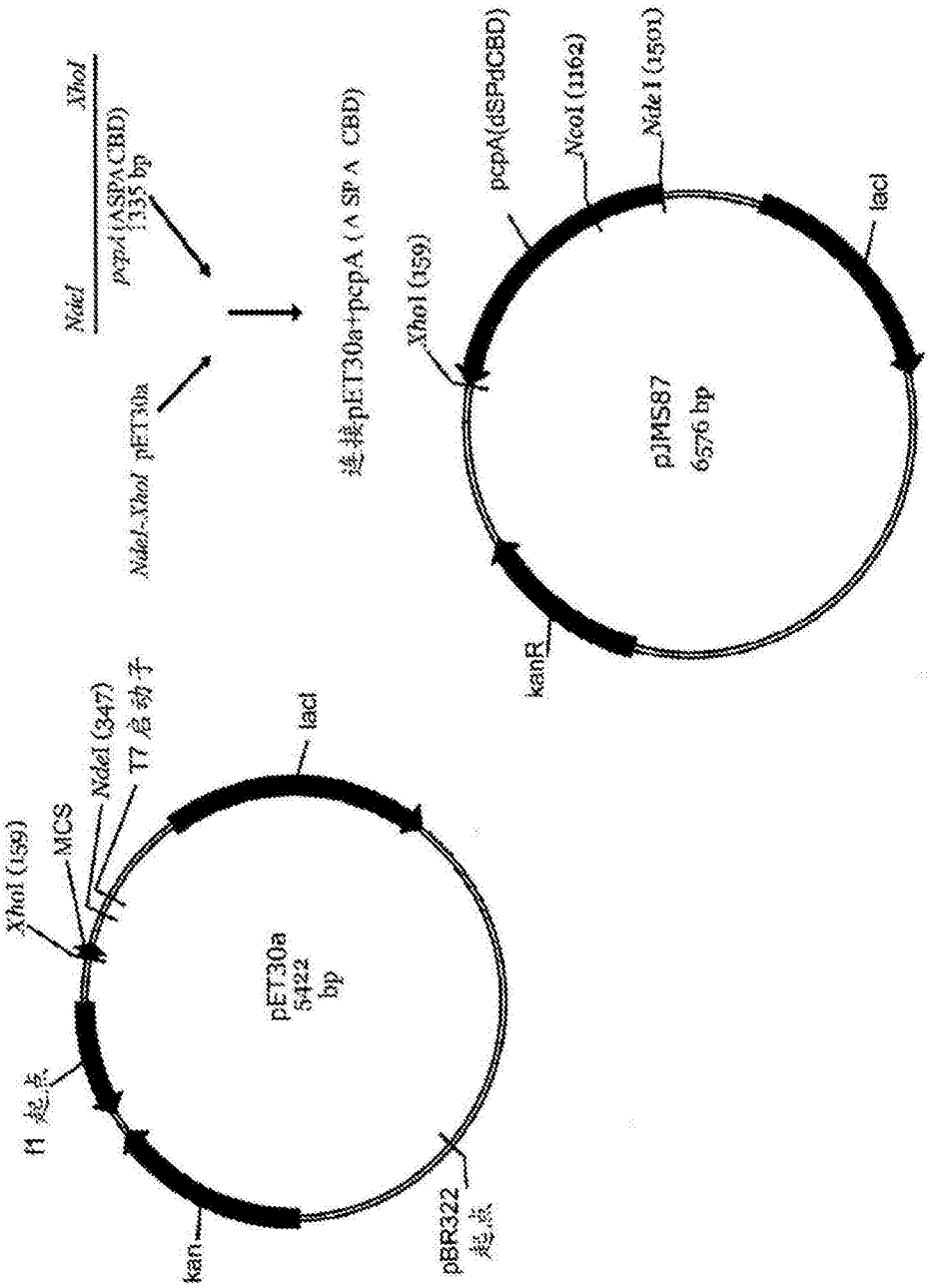

NdeI
XhoI
pcpA(ASPACBD)
1335 bp
NdeI-XhoI pET30a
连接pET30a+pcpA(ΔSPΔCBD)
pcpA(dSPdCBD)
NcoI (1162)
NdeI (1501)
XhoI (159)
lacI
pJMS87
6576 bp
kanR
XhoI (159)
MCS
NdeI (347)
T7 启动子
lacI
pET30a
5422
bp
f1 起点
kan
pBR322
起点

图14

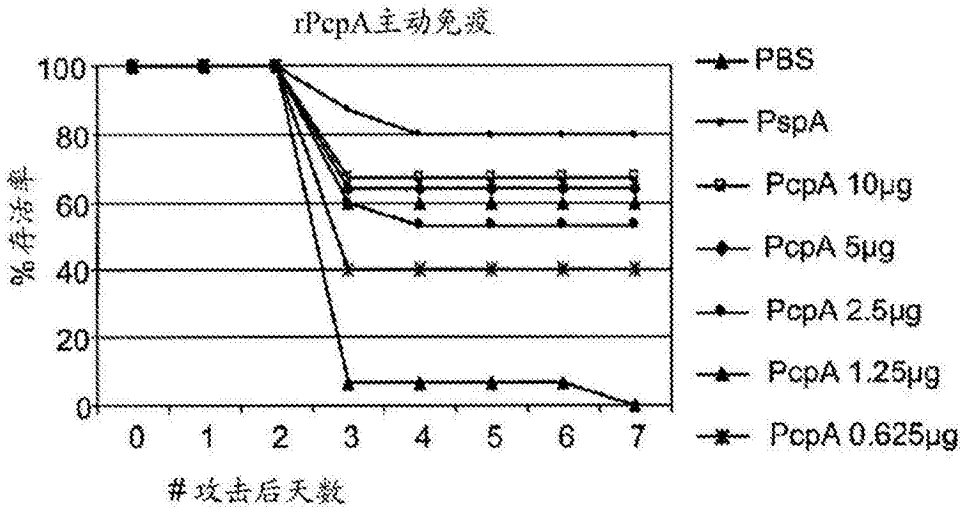



图15A

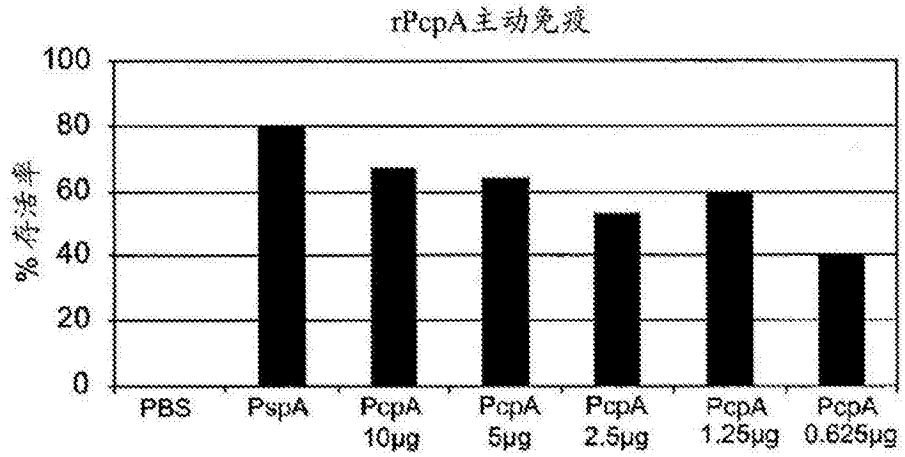



图15B

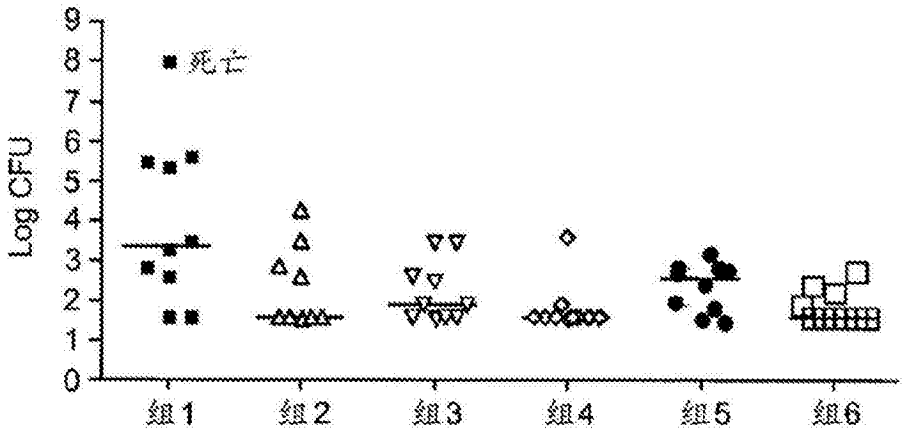



图16