



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103221420 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201180035686. 2

(22) 申请日 2011. 05. 19

(30) 优先权数据

61/346, 107 2010. 05. 19 US

61/436, 452 2011. 01. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/037149 2011. 05. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02011/146715 EN 2011. 11. 24

(71) 申请人 北卡罗莱纳州立大学

地址 美国北卡罗莱纳州罗利

申请人 弗吉尼亚大学专利基金会

(72) 发明人 T. R. 克莱恩汉默 R. L. 格兰特

G. L. 科林 E. 杜尔马斯 M. P. 丁科

C. A. 沃伦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

C07K 14/195(2006. 01)

C07K 14/315(2006. 01)

C07K 14/335(2006. 01)

C12N 1/06(2006. 01)

A23C 9/00(2006. 01)

A23L 1/03(2006. 01)

A61K 35/74(2006. 01)

C07K 14/00(2006. 01)

权利要求书3页 说明书24页

序列表14页 附图8页

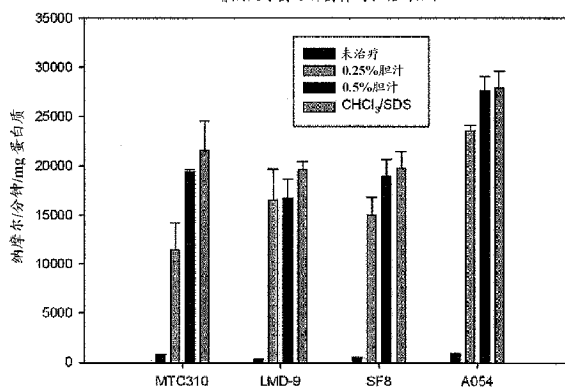
(54) 发明名称

用于递送治疗性肽的组合物和方法

(57) 摘要

提供了用于定向递送生物治疗剂的方法和组合物。所述组合物包含经修饰以在胆汁暴露后释放生物治疗剂的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌。通过本发明公开的嗜热链球菌细菌释放的生物治疗剂包括富含 AQ 和 AQR 的肽。本发明的方法包括将经修饰以在胆汁暴露后释放生物治疗剂的嗜热链球菌细菌给予受试者。给予嗜热链球菌细菌促进所需要的治疗反应。可对该细菌进行修饰以表达和释放富含 AQ 或 AQR 的肽,所述肽随后抑制细胞凋亡或减少粘膜损害。因此,本发明的方法应用于治疗或预防各种胃肠病症,包括艰难梭菌感染和抗生素相关腹泻。

嗜热链球菌 4 种菌株的乳糖酶活性



1. 经修饰以表达异源多肽的嗜热链球菌细菌,其中所述异源多肽在暴露于胆汁后从所述细菌中释放。

2. 权利要求 1 的细菌,其中所述异源多肽是治疗性多肽。

3. 权利要求 1 或 2 的细菌,其中所述异源多肽是富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽。

4. 权利要求 3 的细菌,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自:

a) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:2 或 8 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

b) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:4 或 10 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

c) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:6 或 12 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

d) 一种肽,其由包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中任一个所示核苷酸序列的多核苷酸编码;和

e) 一种肽,其由包含与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的核苷酸序列的多核苷酸编码。

5. 权利要求 3 的细菌,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12。

6. 权利要求 1-5 中任一项的细菌,其中所述细菌在所述胆汁暴露后不能存活。

7. 权利要求 1-6 中任一项的细菌,其中所述嗜热链球菌选自:

a) 嗜热链球菌 LMD-9,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

b) 嗜热链球菌 NCK2071,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

c) 嗜热链球菌 NCK2072,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

d) 嗜热链球菌 NCK2073,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;和

e) 一种益生的嗜热链球菌细菌。

8. 制备嗜热链球菌细菌的方法,所述方法包括对所述细菌进行遗传修饰以表达异源多肽,其中所述多肽在暴露于胆汁后从所述细菌中释放。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述异源多肽是富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽。

10. 权利要求 8 或 9 的方法,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自:

a) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:2 或 8 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

b) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:4 或 10 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

c) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:6 或 12 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

d) 一种肽,其由包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中任一个所示核苷酸序列的多核苷酸编码;和

e) 一种肽,其由包含与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的核苷酸序列的多核苷酸编

码。

11. 权利要求 8 或 9 的方法,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12。

12. 权利要求 8-11 中任一项的方法,其中所述细菌在所述胆汁暴露后不能存活。

13. 权利要求 8-12 中任一项的方法,其中所述嗜热链球菌选自:

a) 嗜热链球菌 LMD-9,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

b) 嗜热链球菌 NCK2071,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

c) 嗜热链球菌 NCK2072,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

d) 嗜热链球菌 NCK2073,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;和

e) 一种益生的嗜热链球菌细菌。

14. 将异源多肽递送给受试者的方法,所述方法包括经口给予受试者权利要求 1-7 中任一项的细菌。

15. 治疗或预防受试者的病症的方法,所述方法包括经口给予受试者治疗有效量的权利要求 1-7 中任一项的细菌。

16. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述受试者是动物。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述受试者是人。

19. 权利要求 16 的方法,其中所述受试者是驯养动物。

20. 权利要求 16 的方法,其中所述受试者是农用动物。

21. 权利要求 15-20 中任一项的方法,其中所述病症是胃肠病症。

22. 权利要求 15-20 中任一项的方法,其中所述病症是细菌感染。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述细菌感染是艰难梭菌感染。

24. 权利要求 14-23 中任一项的方法,其中所述细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。

25. 药物组合物,其包含权利要求 1-7 中任一项的细菌。

26. 食品或饲料产品,其包含权利要求 1-7 中任一项的细菌。

27. 权利要求 26 的食品,其中所述食品是乳制食品。

28. 用作药物的权利要求 1-7 中任一项的细菌。

29. 用于治疗或预防受试者的病症的权利要求 1-7 中任一项的细菌。

30. 权利要求 28 或 29 的细菌,其中所述病症是细菌感染。

31. 权利要求 30 的细菌,其中所述细菌感染是受试者中的艰难梭菌感染。

32. 权利要求 28-31 中任一项的细菌,其中将所述细菌配制为以治疗有效量给予受试者,其中细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。

33. 权利要求 1-7 中任一项的细菌作为药物的用途。

34. 权利要求 33 的细菌的用途,其中所述药物用于治疗或预防受试者的病症。

35. 权利要求 34 的细菌的用途,其中所述病症是细菌感染。

36. 权利要求 35 的细菌的用途,其中所述细菌感染是艰难梭菌感染。

37. 治疗受试者的炎症性胃肠道病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的分离的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌给予受试者。

38. 减少受试者的炎症的方法,所述方法包括将治疗有效量的分离的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌给予受试者。

39. 权利要求 37 或 38 的方法,其中所述受试者患有炎症性胃肠病症。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述炎症性胃肠病症是艰难梭菌感染。

41. 权利要求 37-40 中任一项的方法,其中所述胆汁敏感性嗜热链球菌细菌在所述受试者中减少一种或多种促炎细胞因子的产生。

42. 权利要求 41 的方法,其中所述促炎细胞因子选自:MIP1a、MIP3a、IL-16、IL-22、VEGF、嗜伊红粒细胞趋化因子、IL-1b、KC 和 LIF 或其任何组合。

43. 权利要求 37-42 中任一项的方法,其中所述细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。

用于递送治疗性肽的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于定向递送生物治疗剂的方法和组合物。

[0002] 联邦政府资助的研究或开发

本发明在 NIH-MARCE 授予的 U54 AI57168 和 NIH 授予的 U01 AI075526 的美国政府支持下完成。美国政府在本发明中享有一定权利。

[0003] 电子提交的序列表的引用

序列表的正式副本作为 ASCII 格式的序列表以电子形式通过 EFS-Web 提交, 文件名为 405777SEQLIST.txt, 创建于 2011 年 5 月 19 日, 大小为 15 KB, 并且与本说明书同时提交。该 ASCII 格式文件所包括的序列表是本说明书的组成部分, 并且通过引用以其整体结合到本文中。

[0004] 发明背景

各种发酵食品和乳制品中的乳酸菌 (LAB) 被人安全地消费。这些 LAB 中的许多拥有“公认安全的” (Generally Recognized as Safe, GRAS) 的地位, 并且可在无不良作用的情况下, 以接近 1 万亿个细胞 / 克食品的水平消费。所选择的 LAB 成员是耐酸的, 但却又是胆汁敏感性的, 并且通过胃肠道时不能存活。因此, 所选 LAB 的胆汁暴露可导致细胞完整性的破坏、透化和胞内蛋白质的释放。这类微生物可经口通过胃递送到小肠, 用于在微生物因胆汁引起透化时, 定向递送生物治疗性肽。另外, 微生物在胆汁透化时死亡, 因此在经口递送后, 保持包含在胃肠道内。

[0005] 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 是一种草绿色群 (*viridans* group) 的革兰氏阳性乳酸菌。嗜热链球菌通常存在于包括酸奶、发酵乳和乳酪在内的发酵乳制品中。包含嗜热链球菌的市售乳制品可用作抗生素相关腹泻的疗法 (Hickson, 2007, 335 (7610): 80)。

[0006] 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*, *C. difficile*) 是医院细菌性腹泻最常见的原因, 占抗生素相关腹泻病例的 10-20%。艰难梭菌感染可导致无症状携带、轻度腹泻或暴发性假膜性结肠炎。这种厌氧细菌主要通过两种大的外毒素即毒素 A 和毒素 B 的作用引起肠损害。当体内引入肠腔时, 经纯化的毒素 A (TxA) 引起肠分泌、肠上皮破坏和出血性结肠炎。TxA 诱导性结肠炎的机制涉及毒素与肠细胞受体结合, 导致引起肠分泌和肠蠕动增强的感觉神经和肠神经活化、肥大细胞脱粒和粘膜被嗜中性粒细胞浸润。除其促炎和促分泌活性以外, TxA 诱导细胞凋亡和非凋亡性细胞死亡, 这可造成肠粘膜破坏。具体地讲, 已经表明, TxA 影响肠粘膜修复过程的重要方面, 例如上皮细胞迁移、细胞凋亡和经上皮抗性的发展 (Brito 等 (2005) Dig Dis and Sci 50(7): 1271-1278)。

[0007] 谷氨酰胺 (Gln) 是肠细胞和结肠细胞两者的主要燃料, 并且是在正常和应激两种状态下维持肠结构所必需的 (Cario 等, Eur J Clin Invest. 2000 年 5 月 30(5): 419-429)。研究显示, 谷氨酰胺补充 (supplementation) 防止绒毛萎缩和细菌移位 (bacterial translocation) (与标准胃肠外营养有关的病况) (Van Der Hulst 等, Lancet 1993 341: 1363)。谷氨酰胺在若干代谢途径中起关键作用。已认识到其在组织培养中的重要性,

而且它是哺乳动物细胞中核苷酸、氨基糖和氨基酸生物合成的关键氮供体。预期当粘膜屏障功能常被破坏时,谷氨酰胺的可用性在持续性腹泻和营养不良期间将尤其重要。动物研究表明,富含谷氨酰胺的营养可减弱细菌移位、改善营养状况、减少肠损伤,并在甲氨蝶呤诱发性小肠结肠炎致死模型中导致存活得到改善。

[0008] 丙氨酰-谷氨酰胺 (Ala-Gln) 是稳定的谷氨酰胺衍生物,已经表明其在酸性水溶液中稳定得多(例如预期它们可面对患者的胃或肠),并促使盐和水的吸收相当于葡萄糖(如果不是更好的话)的吸收(参见美国专利号 5,561,111,其公开内容明确结合到本文中)。稳定的谷氨酰胺衍生物不仅仅可用于患腹泻的营养不良儿童,而且还可用于接受胃肠外 (IV) 流体或管喂食太长时间的患者或者因感染或化学疗法所致肠粘膜受损的患者。

[0009] 发明概述

提供了用于定向递送生物治疗剂的方法和组合物。所述组合物包含胆汁敏感性嗜热链球菌细菌,其经修饰以在胆汁暴露后释放生物治疗剂。通过本文公开的嗜热链球菌细菌释放的生物治疗剂包括富含 AQ 和 AQR 的肽。本发明的方法包括将经修饰以在胆汁暴露后释放生物治疗剂的嗜热链球菌细菌给予受试者。给予嗜热链球菌细菌促进所需要的治疗反应。可对该细菌进行修饰以表达和释放富含 AQ 或 AQR 的肽,所述肽随后抑制细胞凋亡或减少粘膜损害。因此,本发明的方法应用于治疗或预防各种胃肠病症,包括艰难梭菌感染和抗生素相关腹泻。

[0010] 若干附图简述

已概括地以此方式对本发明进行了描述,现将参照附图进行描述,附图不必按比例绘制,其中:

图 1 表示通过胞外 β -半乳糖苷酶活性定量测定的在胆汁暴露后所选嗜热链球菌菌株的透化。

[0011] 图 2 说明用于在嗜热链球菌中表达富含 AQ/AQR 的肽的基本载体 (pTRK989)。

[0012] 图 3 说明用于在嗜热链球菌中表达富含 AQ/AQR 的肽的载体。pTRK996 编码 AGRP-FH0, pTRK997 编码 AGRP-FH1, pTRK998 编码 AGRP-FH2。

[0013] 图 4 表示富含 AQ 的肽 AGRP-FH0、AGRP-FH1 和 AGRP-FH2 的 FLAG-BAP 蛋白质印迹。各种肽的表达可在白色框内所含区域看出。

[0014] 图 5 表明在 24 小时时,通过化学合成 (Ala-gln) 和生物合成 (rAla-gln) 的丙氨酰-谷氨酰胺体外促进 IEC-6 细胞单层中的迁移。

[0015] 图 6 说明通过用嗜热链球菌治疗,小鼠中使用 UVA24 的艰难梭菌感染减少。(A) 计算每只小鼠 ($n \geq 17$ 只/组) 相对于第 0 天体重的体重变化。与未治疗对照小鼠(三角形)相比,嗜热链球菌治疗的小鼠(圆形)显著较少地减轻体重 ($P=0.004$,应用 Wilks λ 多变量检验)。计算数据包括死于感染或因样品收集而处以安乐死的小鼠的最终体重。(B) 按照使用 ELISA 的检测,与对照 (UVA24) 相比,在第 3 天和第 5 天嗜热链球菌治疗的小鼠 (St+UVA24) 在盲肠内容物中显示出较低水平的 TcdA/B。(C) 感染后 3 天与对照相比,用嗜热链球菌治疗的小鼠的结肠具有显著较少的病理 ($P=0.006$,采用 Mann Whitney t 检验),而嗜热链球菌治疗的小鼠的盲肠组织显示较少病理 ($P=0.279$)。(D) 按方法中所述,对在第 3 和 4 天腹泻的发生率进行评分,并应用非配对 t 检验进行分析。

[0016] 图 7 表明,来自嗜热链球菌的分泌组分即乳酸减慢艰难梭菌生长。(A) 在 HEPES

缓冲液不存在或存在下,将来自嗜热链球菌的经过滤的上清液加入 BHI (50% v/v) 中,接种 (105 UVA24), 孵育 24 小时,并用平板计数法计数。(B) 以不同浓度将纯的 L- 乳酸加入 BHI 中,接种艰难梭菌,使之生长 24 小时,并对细菌计数。(C) 采用 ELISA,测定艰难梭菌 ± L- 乳酸 ± HEPES 缓冲液生长 24 小时的上清液 (斜线柱) 中 TcdA/B 的存在情况。

[0017] 图 8 报告了以下结肠裂解物中的细胞因子应答:用艰难梭菌 (UVA24) +/- 嗜热链球菌 (St+UVA24) 感染的小鼠在感染后第 3 天的结肠裂解物、暴露于抗生素 (Abx0) +/- 嗜热链球菌 (St/Abx0) 的小鼠的结肠裂解物和感染前正常小鼠 (正常) +/- 嗜热链球菌 (St/正常 0) 的结肠裂解物。

[0018] 发明详述

下面将参照附图,在下文中对本发明作更全面的描述,其中示出了一些但非全部的本发明的实施方案。实际上,这些发明可以许多不同的形式体现,不应解释为限于本文所给出的实施方案;更确切地说,提供这些实施方案,使得本公开内容可满足适用的法律要求。在全文中,同类数是指同类要素。

[0019] 本文给出的本发明的许多修改和其它实施方案可使这些发明所属领域技术人员想起具有前面描述和相关附图中提供的教导的益处。因此,要了解的是,本发明不限于所公开的具体实施方案,且修改和其它实施方案欲包括在随附权利要求书的范围内。虽然本文采用特定术语,但它们仅以通用和描述性含义使用,而非限制目的。

[0020] 概述

提供了用于定向递送生物治疗剂的方法和组合物,包括使用胆汁敏感性嗜热链球菌细菌将富含 AQ/AQR 的肽递送至肠上皮的方法和组合物。这类方法和组合物可用于治疗或预防由艰难梭菌感染所引起的肠损害。胆汁敏感性 LAB 可在抗生素治疗之前、期间和 / 或之后提供以将治疗性肽递送至肠道,同时避免机会性感染的顾虑。通过经胃的酸性环境而存活,本文公开的细菌可将治疗性肽直接递送至小肠。因此,提供各种细菌例如嗜热链球菌及其使用方法,所述方法通过将治疗剂或治疗性肽递送给有需要的受试者而促进肠修复。

[0021] 胆汁敏感性乳酸菌

提供了导致将治疗剂定向递送至受试者的胃肠道的的方法和组合物。本文所用的“释放”是指包含在细胞外膜内的组分流进进入环境中。术语“释放”要理解为包括天然存在的组分或异源组分 (例如肽) 跨细胞膜流出或部分流出,使得所释放的组分不再存在于细胞之内。术语“释放”要进一步理解为包括细胞组分的部分流出,例如释放可因细胞膜的透化或部分透化而产生。例如,在具体的实施方案中,本发明的微生物经口给予受试者,并通过胃而存活,其中微生物随后暴露于胆汁中,并释放胞内物质,包括目标生物治疗剂。在一些实施方案中,生物治疗剂的释放足以治疗或预防胃肠病症。

[0022] 本文所用“胆汁敏感性的”是指微生物在暴露于胆汁后变得透化并释放某些胞内组分的能力。术语“胆汁”是指由大多数脊椎动物的肝脏分泌的深绿色至黄褐色流体。本文所用“胆汁”意指包括胆汁盐和胆汁酸,包括但不限于胆酸、脱氢胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、甘氨胆酸、乙醇酸 (glycholic acid)、甘氨脱氧胆酸、牛磺胆酸、石胆酸、牛磺脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸、牛磺-24, 25- 二氢- 夫地酸钠、甘氨二氢夫地酸钠 (sodium glycodihydrofusidate)、聚氧乙烯-9- 月桂基醚或其任何组合。本文所用“暴露于胆汁”是指其中本文所述细菌与胆汁接触或本文所述细菌存在于胆汁存在的环境中的情况。暴露

于胆汁可持续至少约 1 秒钟、约 5 秒钟、约 15 秒钟、约 30 秒钟、约 1 分钟、约 3 分钟、约 5 分钟、约 15 分钟、约 30 分钟、约 45 分钟、约 1 小时、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时或足以透化胆汁敏感性细菌的膜的任何时间。

[0023] 在一些实施方案中,胆汁敏感性微生物在暴露于胆汁时不能存活。本文所用“不能存活”是指微生物或其部分不再能够繁殖或进行代谢功能的情况。在某些实施方案中,递送生物治疗剂所期望的胃肠部位的环境引起微生物的膜透化,其后生物不能存活。

[0024] 任何目标微生物都可用于本文所述的方法和组合物。在一些实施方案中,微生物包括细菌。在具体的实施方案中,微生物包括益生菌 (probiotic bacterium)。本文所用术语“益生的”是指当适量给予时赋予宿主健康益处的活微生物 (FAO 2001; 参见网址 isapp.net/docs/ProbioticDefinition.pdf), 有助于受试者肠道健康和均衡的至少一种生物。在具体的实施方案中,亦被称作“友好的”、“有益的”或“良好的”细菌,当被受试者摄入时,其促进健康肠道的维持,促进部分或完全减轻病症和 / 或疾病的一种或多种症状。

[0025] 在一些实施方案中,本文所述微生物是乳酸菌。本文所用“乳酸菌”意指选自以下属的预期细菌: 气球菌属 (*Aerococcus*)、肉杆菌属 (*Carnobacterium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、酒球菌属 (*Oenococcus*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、蜜蜂球菌属 (*Melissococcus*)、差异球菌属 (*Alloiococcus*)、狡诈球菌属 (*Dolosigranulum*)、乳球形菌属 (*Lactosphaera*)、四联球菌属 (*Tetragenococcus*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*) 和威斯氏菌属 (*Weissella*) (Holzapfel 等 (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 73:365S-373S; Sneath 等 (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 第 2 卷, Lippincott, Williams 和 Wilkins, Hagerstown, MD)。在某些实施方案中,待使用的微生物是链球菌。在具体的实施方案中,待使用的微生物是嗜热链球菌,例如嗜热链球菌 LMD-9。

[0026] 本文公开的细菌可标为通过食品与药物管理局 (Food and Drug Administration) 核准的公认安全的 (GRAS)。那些标为 GRAS 的生物被 FDA 视为安全的,因此豁免于美国联邦食品、药品和化妆品法案 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) 的食品添加剂限量要求。GRAS 细菌可以是胆汁敏感性的,并可用于定向递送生物治疗剂。

[0027] 可对本发明的细菌进行修饰 (例如遗传修饰) 以表达目标肽。本文所用术语“重组细菌”或“重组细菌细胞”是指含有至少一种遗传变化的细菌或大量细菌细胞 (其已用至少一个目标基因转化), 以及从如此改变的细胞传下来且包含遗传变化或目标基因的一个或多个细胞。因此,本文所用术语“修饰的”或“遗传修饰的”或“遗传修饰”是指遗传变化,例如核酸的缺失、添加或取代。在某些实施方案中,修饰产生在遗传上不同于野生型即天然存在的细菌的细菌。在一些实施方案中,遗传变化是细菌中插入目标编码序列。

[0028] 编码序列对于所述细菌可为同源或异源的。所谓“异源”欲指这样的序列,其起源于外来物种,或者如果来源于相同物种,则是通过刻意的人为干预自其天然形式在组成和 / 或基因组的基因座方面进行相当大的修饰。例如,与异源多核苷酸有效连接的启动子来自不同于从中获得多核苷酸的物种的物种,或者如果来自相同 / 类似物种,则其中一个或两者自其原有形式进行相当大的修饰,或者对于有效连接的多核苷酸,启动子不是天然启动子。在一些实施方案中,异源多核苷酸序列编码富含丙氨酰 - 谷氨酰胺 (AQ) 或丙氨酰 - 谷

氨酰胺 / 精氨酸 (AQR) 的肽。

[0029] 治疗剂

所谓“治疗剂”或“生物治疗剂”意指这样的物质,其治愈、缓解、消除或减轻感染任何病症或者人或动物体机能障碍的症状,或者预防或降低感染任何病症或者人或动物体机能障碍的可能性。生物治疗剂可以是任何肽、多肽、蛋白质、疫苗、细胞因子、细菌素、碳水化合物、脂质或当向受试者提供时起治疗剂作用的任何其它物质。本文公开的细菌已被修饰以表达用于递送到胃肠道内的特定部位的治疗性肽。所谓治疗性肽意指任何肽,例如当向受试者提供时起治疗剂作用的富含 AQ/AQR 的肽。

[0030] i. 富含丙氨酰 - 谷氨酰胺的肽

本文提供应用本文公开的各种富含丙氨酰 - 谷氨酰胺的肽的组合物和方法。本文所用“富含丙氨酰 - 谷氨酰胺的肽”或“富含 AQ 的肽”或“富含 ALA-GLN 的肽”包括已被修饰以提高其丙氨酰 - 谷氨酰胺和谷氨酰胺含量的生物合成的肽、寡肽和蛋白质。本文所用“富含丙氨酰 - 谷氨酰胺 / 精氨酸的肽”或“富含 AQR 的肽”或“富含 ALA-GLN-ARG 的肽”包括已被修饰以提高其丙氨酰 - 谷氨酰胺 / 精氨酸或谷氨酰胺 / 精氨酸含量的生物合成的肽、寡肽和蛋白质。在一些实施方案中,富含 AQ 的肽包含 $(\text{GLN})_n$ 、 $\text{ALA}(\text{GLN})_n$ 或 $(\text{ALA_GLN})_n$ 及其衍生物。这些肽可用作单独的肽,或经连接从而形成具有肽的重复单元的寡肽或蛋白质。或者,肽可与异类肽 (unlike peptide) 连接以形成备选的肽、寡肽或蛋白质。在一些情况下,肽可以是含有类肽 (like peptide) 和异类肽的寡肽或蛋白质或者与含有类肽和异类肽的寡肽或蛋白质连接。肽、寡肽、蛋白质或重复单元可含有蛋白酶切割位点或引导信号。蛋白酶切割位点可包括例如被胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶识别的位点。本文所用“富含 AQ/AQR 相关序列”或“富含 AQ/AQR 的多核苷酸序列”是指编码富含 AQ 或 AQR (AQ/AQR) 的多肽的多核苷酸序列。可通过例如本领域普遍已知的测序或质谱法测量 AQ/AQR 含量。富含 AQ/AQR 的多核苷酸序列的实例包括 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11。

[0031] 符号 ALA 在本文中被用来表示丙氨酸的缩写,符号 GLN 是谷氨酰胺缩写,符号 ALA-GLN 是二肽丙氨酰 - 谷氨酰胺。另外,本文所用 $\text{ALA}(\text{GLN})_n$ 表示在末端位置上具有丙氨酸和所连接的多个 (n) 谷氨酰胺单元的肽,而 $(\text{ALA-GLN})_n$ 表示由 n 个丙氨酰 - 谷氨酰胺亚单元组成的肽, $(\text{GLN})_n$ 表示由 n 个谷氨酰胺亚单元组成的肽。另外,“n”记录肽中亚单元或单元的数目。通常,本发明的肽含有约 1 和 20 个之间的亚单元或单元 (例如 n 为约 1- 约 20)。正如本文所公开的一样,肽可以是独立的种类或寡肽或蛋白质的亚单元。本发明的富含 AQ/AQR 的肽包括 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 所给出的多肽序列、SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 所给出的核酸序列及其变体和片段。用于本发明的目的,术语“蛋白质”、“肽单元”和“多肽”可互换使用。

[0032] 本文所用富 AQ 活性或富 AQR 活性是指富含 AQ/AQR 的肽抑制细胞凋亡和减少粘膜破坏的能力。所谓“抑制”、“阻抑”、“减少”或“降低”细胞凋亡或粘膜破坏欲指细胞或粘膜损伤在统计学上低于合适对照中的细胞或粘膜损伤。在具体的实施方案中,按照本公开主题,当与合适对照比较时,抑制细胞凋亡或减少粘膜损伤导致细胞凋亡或粘膜损伤至少约 95% 降低、至少约 90% 降低、至少约 80% 降低、至少约 70% 降低、至少约 60% 降低、至少约 50% 降低、至少约 40% 降低、至少约 30% 降低、至少约 20% 降低、至少约 10% 降低或至少约 5% 降低。在其它实施方案中,当与合适对照比较时,抑制细胞凋亡或减少粘膜损伤导致降低约

3%-约 15%、约 10%-约 25%、约 20%-约 35%、约 30%-约 45%、约 40%-约 55%、约 50%-约 65%、约 60%-约 75%、约 70%-约 90%、约 70%-约 80%、约 70%-约 85%、约 80%-约 95%、约 90%-约 100%。在本文其它部分论述了细胞凋亡和粘膜损伤水平的测定方法。

[0033] ii. 片段和变体

依上下文而定,“片段”是指多肽或蛋白质的氨基酸序列的一部分或者编码多肽或蛋白质的氨基酸序列的一部分的多核苷酸。片段可保持原蛋白质的活性,因此,这类“活性”片段包括例如富含 AQ/AQR 的蛋白质的片段。富含 AQ/AQR 的多核苷酸序列的片段,例如编码富含 AQ/AQR 的肽的 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 的片段可编码有生物活性的蛋白质片段。富含 AQ/AQR 的蛋白质的片段包括 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 和 12 的片段。生物活性核苷酸片段可通过分离富含 AQ/AQR 的多核苷酸或多肽的一部分,表达富含 AQ/AQR 的肽的编码部分来制备,并且评价富含 AQ/AQR 的肽的编码部分的 AQ/AQR 水平。富含 AQ/AQR 相关多核苷酸的片段包括 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 和 11 的片段。富含 AQ/AQR 相关多核苷酸的片段包含至少约 15、约 20、约 50、约 75、约 100、约 200、约 250、约 300、约 350、约 400、约 450、约 500、约 550、约 600、约 650、约 700、约 750、约 800、约 850、约 900、约 950、约 1000 个核苷酸或至多为存在于本文公开的全长富含 AQ/AQR 相关核苷酸序列的核苷酸总数。

[0034] 氨基酸序列的片段包括这样的肽,其包含与富含 AQ/AQR 的蛋白质或不完整长度蛋白质的氨基酸序列充分相同或者来源于富含 AQ/AQR 的蛋白质或不完整长度蛋白质的氨基酸序列,并且显示出富含 AQ/AQR 的蛋白质的至少一种活性(即与本文其它部分描述的 AQ/AQR 含量增加有关的活性)的氨基酸序列,但是其包括比本文公开的全长富含 AQ/AQR 的蛋白质少的氨基酸。富含 AQ/AQR 的蛋白质的生物活性部分可以是多肽,即长为例如约 10、约 25、约 50、约 100、约 150、约 200 个连续氨基酸或至多为存在于本文公开的全长富含 AQ/AQR 的蛋白质(即 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12)中的氨基酸的总数。这类生物活性部分可通过重组技术制备,并且可针对全长富含 AQ/AQR 的蛋白质功能活性的一种或多种(例如抑制细胞凋亡和减少粘膜破坏)来进行评价。本文所用片段包含 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 的至少 5 个邻接氨基酸。然而,本发明包括其它片段,例如大于约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 20、约 50、约 100、约 200、约 300、约 400 或大于约 500 个氨基酸的富含 AQ/AQR 的蛋白质的任何片段。

[0035] 在一些实施方案中,提供已被修饰以表达本文其它部分提供的富含 AQ/AQR 的核苷酸和氨基酸序列的变体的细菌。所谓“变体”欲指充分相同的序列。因此,本发明包括经修饰以表达与编码 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 中富含 AQ/AQR 的蛋白质的核苷酸序列充分相同的富含 AQ/AQR 的核苷酸序列的细菌,或经修饰以表达 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 的核苷酸序列或其互补序列的细菌。变体还包括由本文公开的富含 AQ/AQR 的多核苷酸序列编码的变体多肽。另外,本发明的多肽具有与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 所示氨基酸序列充分相同的氨基酸序列。所谓“充分相同”欲指与第二种氨基酸序列或核苷酸序列相比,一种氨基酸序列或核苷酸序列含有足够或最低数目的等同或相同的氨基酸残基或核苷酸,因此提供共同的结构域和/或表明共同的功能活性,例如抑制细胞凋亡和减少粘膜破坏。保守变体包括因遗传密码简并而不同的核苷酸序列。

[0036] 总的说来,分别与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 的任何氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 的任何核苷酸序列具有至少约 45%、55% 或 65% 同一性、优选至少约 70% 或

约 75% 同一性、更优选至少约 80%、约 85% 或约 90%、最优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或约 99.5% 序列同一性的氨基酸序列或核苷酸序列,在本文中被定义为充分相同。本发明所包括的变体蛋白质具有生物活性,即它们保持原富含 AQ/AQR 的序列所需功能活性,例如抑制细胞凋亡和减少粘膜破坏。参见例如 Varcamonti 等 (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1287-1289。蛋白质的生物活性变体可因少至 1-15 个氨基酸残基、少至 1-10 个、例如 6-10、少至 5 个、少至 4、3、2 个或甚至 1 个氨基酸残基而不同于该蛋白质。

[0037] 富含 AQ/AQR 的多肽可以多种方式改变,包括氨基酸取代、缺失、截短和插入。用于诱变和多核苷酸改变的方法是本领域众所周知的。参见例如 Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel 等 (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; 美国专利号 4,873,192; Walker 和 Gastra, 主编 (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) 和其中引述的参考文献。至于不影响目标蛋白质的生物活性的氨基酸取代的指导可参见 Dayhoff 等 (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) 的模型,通过引用结合到本文中。保守取代,例如可使一个氨基酸与另一个具有类似性质的氨基酸交换。本领域技术人员应理解的是本文公开的富含 AQ/AQR 的多肽的活性可通过常规筛选测定法评价,例如本文其它部分描述的测定法评价。

[0038] 例如,可改变本文公开的富含 AQ/AQR 的多肽以包括 FLAG 标签表位,例如 DYKDDDDK (SEQ ID NO: 13) (Hopp, 1988, *Bio/Technology*, 6:1204-1210)。FLAG 标签表位的加入可助于本文公开的富含 AQ/AQR 的肽的检测和纯化。FLAG 和 3xFLAG 可用于蛋白质印迹法、免疫细胞化学、免疫沉淀、流式细胞术、蛋白质纯化和蛋白质-蛋白质相互作用、细胞超微结构和蛋白质定位的研究。这些小的亲水标签当与特异性和灵敏性抗 FLAG 抗体一起使用时,可改进重组融合蛋白的检测和纯化。FLAG 系统可利于低丰度蛋白质的研究和不同蛋白质表达方案的优化。FLAG 肽包括若干特定的单克隆和多克隆抗体和缀合物的结合部位,其各具不同识别和结合特征。FLAG 肽对于抗体和肠激酶 (Ek) 切割可能是可及的。考虑到 FLAG 标签表位的尺寸小,预期加入表位不会影响本文公开的肽的活性、分泌或转运。

[0039] 在两个多核苷酸或多肽序列的情况下,本文所用“序列同一性”或“同一性”是指当在规定的比较窗内比对最大一致性时是相同的两个序列的残基。当序列同一性的百分比用于指蛋白质时,公认的是不相同的残基位置常常因保守氨基酸取代而不同,其中氨基酸残基被具有类似化学性质(例如电荷或疏水性)的其它氨基酸残基取代,因此不改变分子的功能性质。当序列在保守取代方面不同时,可向上调整百分比序列同一性以对取代的保守性质进行校正。因这类保守取代不同的序列被称为具有“序列相似性”或“相似性”。用于进行这种调整的手段为本领域技术人员所熟知。通常这包括对作为一部分而不是完全错配的保守取代评分,从而提高百分比序列同一性。因此,例如,如果把相同的氨基酸规定为 1 分,把非保守取代规定为零分,则把保守取代规定为零与 1 之间的分数。计算保守取代的评分,如在程序 PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California) 中实施的。

[0040] 本文所用“序列同一性的百分比”意指通过比较窗内两个最佳比对序列而确定的值,其中与用于两个序列的最佳比对的参比序列(其不含添加或缺失)相比,比较窗中多核苷酸序列的部分可包含添加或缺失(即空位)。如下计算百分比:确定出现在两个序列中

的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数,得到匹配的位置数,将匹配的位置数除以比较窗的位置总数,并将结果乘以 100,得到序列同一性的百分比。

[0041] 除非另有说明,否则本文提供的序列同一性/相似性值是指使用以下参数采用 GAP 10 版得到的值:使用 GAP 权重 (GAP Weight) 为 50、长度权重 (Length Weight) 为 3 和 nwsgapdna. cmp 评分矩阵的核苷酸序列的 % 同一性和 % 相似性;使用 GAP 权重为 8、长度权重为 2 和 BLOSUM62 评分矩阵的氨基酸序列的 % 同一性和 % 相似性;或其任何等同程序。所谓“等同程序”欲指对于任何的两个目标序列,当与通过 GAP 10 版产生的相应比对比较时,产生具有相同核苷酸或氨基酸残基匹配和相同百分比序列同一性的比对的任何序列比较程序。

[0042] iii. 重组表达载体

在载体优选表达载体中可包括编码本发明的治疗剂的核酸分子。“载体”是指能够转运其所连接的另一核酸的核酸分子。表达载体包括一个或多个调节序列,并指导与之有效连接的基因表达。所谓“有效连接”意指目标核苷酸序列与调节序列连接,使得允许该核苷酸序列表达(例如在体外转录/翻译系统中或当载体导入宿主细胞时在宿主细胞中)。术语“调节序列”欲包括可控的转录启动子、操纵基因、增强子、转录终止子和其它表达调控元件例如翻译控制序列(例如 Shine-Dalgarno 共有序列、起始和终止密码子)。例如根据所使用的宿主细胞,这些调节序列可不同。

[0043] 载体可在宿主细胞中自主复制(附加型载体)或可整合至宿主细胞的基因组中,并与宿主基因组一起复制(非附加型哺乳动物载体)。整合载体通常含有与细菌染色体同源的至少一个序列,其允许在载体和细菌染色体中同源的 DNA 之间发生重组。整合载体还可包含噬菌体或转座子序列。附加型载体或质粒是圆形的双链 DNA 环,其它 DNA 区段可与之连接。当采用重组 DNA 技术时,能够在宿主中稳定保持的质粒一般是优选的表达载体形式。

[0044] 本发明中所包括的表达构建体或载体包含本发明的核酸构建体,呈适于核酸在宿主细胞中表达的形式。本发明中包括在原核宿主细胞中的表达。本领域技术人员要理解的是,表达载体的设计可取决于以下这类因素:待转化宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等。可将本发明的表达载体导入宿主细胞中,从而产生由本文所述核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽(例如富含 AQ/AQR 的肽、富含 AQ/AQR 的肽的突变体形式、富含 AQ/AQR 的融合肽等)。

[0045] 调节序列包括指导核苷酸序列的组成型表达的调节序列以及只在某些环境条件下指导核苷酸序列的诱导型表达的调节序列。细菌启动子是能够结合细菌 RNA 聚合酶并引发编码序列的下游(3') (例如结构基因)转录为 mRNA 的任何 DNA 序列。启动子可具有转录起始区,其通常被置于接近编码序列的 5' 端。该转录起始区通常包括 RNA 聚合酶结合位点和转录起始位点。细菌启动子还可具有称为操纵基因的第二结构域,其可覆盖相邻的 RNA 聚合酶结合位点,在其上开始 RNA 合成。操纵基因允许负调节的(诱导型)转录,因为基因阻抑物可结合操纵基因,从而抑制特定基因的转录。在不存在负调节元件(例如操纵基因)时,可发生组成型表达。另外,正调节可通过基因激活蛋白结合序列实现,所述序列如果存在,则通常是 RNA 聚合酶结合序列的近端(5')。

[0046] 基因激活蛋白的实例是分解代谢激活蛋白(CAP),其有助于启动 lac 操纵子在大

肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中转录 (Raibaud 等 (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18:173)。因此,所调节的表达可以是正的或负的,从而提高或降低转录。正调节和负调节元件的其它实例是本领域众所周知的。蛋白质表达系统中可包括的各种启动子包括但不限于 T7/LacO 杂合启动子、trp 启动子、T7 启动子、lac 启动子、p6 启动子和噬菌体 λ 启动子。可使用任何合适的启动子实施本发明,包括天然启动子或异源启动子。异源启动子可以是组成型活性的或诱导型。Kullen 和 Klaenhammer 的美国专利号 6,242,194 给出了异源启动子的非限制实例。

[0047] 编码代谢途径酶的序列提供特别有用的启动子序列。实例包括来源于糖代谢酶的启动子序列,例如半乳糖、乳糖 (lac) (Chang 等 (1987) *Nature* 198:1056) 和麦芽糖。其它实例包括来源于生物合成酶的启动子序列例如色氨酸 (trp) (Goeddel 等 (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057;Yelverton 等 (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:731;美国专利号 4,738,921;EPO 公布号 36,776 和 121,775)。 β -内酰胺酶 (bla) 启动子系统 (Weissmann, (1981) "The Cloning of Interferon and Other Mistakes (干扰素的克隆和其它错误),"载于 *Interferon3* (主编 I. Gresser);噬菌体 λ PL (Shimatake 等 (1981) *Nature* 292:128);阿拉伯糖-诱导型 araB 启动子 (美国专利号 5,028,530);以及 T5 (美国专利号 4,689,406) 启动子系统亦提供有用的启动子序列。另参见 Balbas (2001) *Mol. Biotech.* 19:251-267,其中论述了大肠杆菌表达系统。

[0048] 另外,非天然存在的合成启动子也起细菌启动子的作用。例如,可将一个细菌或噬菌体启动子的转录活化序列与另一个细菌或噬菌体启动子的操纵子序列连接在一起,产生合成的杂合启动子 (美国专利号 4,551,433)。例如,tac (Amann 等 (1983) *Gene* 25:167; de Boer 等 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21) 和 trc (Brosius 等 (1985) *J. Biol. Chem.* 260:3539-3541) 启动子是 trp-lac 杂合启动子,由受 lac 阻抑物调节的 trp 启动子和 lac 操纵子序列两者组成。tac 启动子具有作为诱导型调节序列的额外特征。因此,例如可通过加入异丙基-1-硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG),在细胞培养中诱导与 tac 启动子有效连接的编码序列的表达。此外,细菌启动子可包括具有结合细菌 RNA 聚合酶和启动转录能力的非细菌源的天然存在的启动子。非细菌源的天然存在的启动子还可与相容的 RNA 聚合酶偶联以在原核生物中产生一些基因的高水平表达。噬菌体 T7 RNA 聚合酶 / 启动子系统是偶联的启动子系统的实例 (Studier 等 (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113;Tabor 等 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1074)。另外,杂合启动子也可由噬菌体启动子和大肠杆菌操纵基因区组成 (EPO 公布号 267,851)。

[0049] 载体还可含有编码该启动子的阻抑物 (或诱导物) 的基因。例如,本发明的诱导型载体可通过表达编码 LacI 阻抑蛋白的基因,调节自 Lac 操纵基因 (LacO) 的转录。其它实例包括使用 lexA 基因以调节 pRecA 的表达以及使用 trpO 调节 ptrp。可以使用增加阻抑程度 (例如 lacIq) 或修饰诱导方式 (例如 λ CI857,提供 λ pL 热诱导型或 λ CI+,提供 λ pL 化学诱导型) 的这类基因的等位基因。

[0050] 除功能性启动子序列以外,有效的核糖体结合接点也可用于融合构建体的表达。在原核生物中,核糖体结合部位称为 Shine-Dalgarno (SD) 序列,包括起始密码子 (ATG) 和位于起始密码子上游 3-11 个核苷酸处长度为 3-9 个核苷酸的序列 (Shine 等 (1975) *Nature* 254:34)。SD 序列被认为通过 SD 序列和细菌 16S rRNA 的 3' 端之间碱基的配

对而促进 mRNA 与核糖体结合 (Steitz 等 (1979) "Genetic Signals and Nucleotide Sequences in Messenger RNA (信使 RNA 中的遗传信号和核苷酸序列)," 载于 *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (主编 R. F. Goldberger, Plenum Press, NY)。

[0051] 治疗剂还可通过产生嵌合 DNA 分子 (其编码包含信号肽序列片段的蛋白质) 而从细胞中分泌, 所述信号肽序列片段使富含 AQ/AQR 的肽在细菌中分泌 (美国专利号 4, 336, 336)。信号序列片段通常编码信号肽, 所述信号肽由指导蛋白质从细胞中分泌的疏水氨基酸组成。蛋白质分泌到生长培养基 (革兰氏阳性细菌) 中, 或分泌到位于细胞内膜和外膜之间的周质间隙 (革兰氏阴性细菌) 中。优选存在在信号肽片段和富含 AQ/AQR 的肽之间编码的加工位点, 其可在体内或体外切割。

[0052] 编码合适的信号序列的 DNA 可来源于所分泌的细菌蛋白质的基因, 例如大肠杆菌外膜蛋白质基因 (ompA) (Masui 等 (1983) FEBS Lett. 151(1):159-164; Ghayeb 等 (1984) EMBO J. 3:2437-2442) 和大肠杆菌碱性磷酸酶信号序列 (phoA) (Oka 等 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212)。其它原核信号包括例如青霉素酶的信号序列 Ipp 或热稳定的肠毒素 II 前导序列。

[0053] 细菌例如嗜热链球菌一般利用起始密码子 ATG, 其指定氨基酸甲硫氨酸 (其在原核生物中被修饰为 N-甲酰甲硫氨酸)。细菌还识别备选的起始密码子, 例如密码子 GTG 和 TTG, 其分别编码缬氨酸和亮氨酸。然而, 当它们用作起始密码子时, 这些密码子指导甲硫氨酸而不是它们正常编码的氨基酸的掺入。嗜热链球菌识别这些备选的起始位点, 并掺入甲硫氨酸作为第一氨基酸。

[0054] 通常, 被细菌识别的转录终止序列是位于翻译终止密码子 3' 的调节区, 因此, 与启动子一起, 位于编码序列的侧翼。这些序列指导 mRNA 的转录, 所述 mRNA 可翻译成由该 DNA 编码的多肽。转录终止序列常常包括能够形成茎环结构的 DNA 序列 (约 50 个核苷酸), 所述茎环结构有助于终止转录。实例包括来源于具有强启动子的基因的转录终止序列, 例如大肠杆菌中的 trp 基因以及其它生物合成基因。

[0055] 表达载体可具有用于插入治疗剂的编码序列的多个限制位点, 使得它在调节区的转录调节之下。表达载体中还可包括确保将载体保持在细胞中的选择标记基因。优选的选择标记包括赋予药物 (例如氨苄西林、氯霉素、红霉素、卡那霉素 (新霉素) 和四环素) 抗性的选择标记 (Davies 等 (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469)。选择标记还可允许细胞在基本培养基中或在毒性代谢物存在下生长, 且可包括生物合成基因, 例如在组氨酸、色氨酸和亮氨酸生物合成途径中的生物合成基因。

[0056] 调节区对本发明的宿主细胞和 / 或核苷酸序列可以是天然 (同源) 的, 或可以是外源 (异源) 的。调节区也可以是天然的或合成的。如果调节区对宿主细胞是 "外源" 或 "异源" 的, 则意指该调节区不存在于调节区所导入的天然细胞中。如果调节区对编码本发明的治疗剂的核苷酸序列是 "外源" 或 "异源" 的, 则意指该调节区不是编码本发明治疗剂的有效连接的核苷酸序列的天然或天然存在的调节区。例如, 调节区可来源于噬菌体。虽然使用异源调节区表达该序列可能是优选的, 但是可使用天然区或同源区。可预期这类构建体在某些情况下改变治疗剂在宿主细胞中的表达水平。因此, 即使正在表达天然肽, 也可改变宿主细胞的表型。

[0057] 在制备表达盒时,可对各种 DNA 片段进行操作,以便在合适的方向上提供 DNA 序列,适当时在合适的读框上提供。为此目的,可使用衔接子或接头连接 DNA 片段,或者可涉及其它操作以提供方便的限制位点、除去过多的 DNA、除去限制位点等。为此,可包括体外诱变、引物修复、限制酶切 (restriction)、退火、再取代,例如转换和颠换。

[0058] 或者,可将上述组分一起置于转化载体中。如上所述,转化载体通常由选择标记组成,所述选择标记或在复制子中维持,或在整合载体中出现。

[0059] 可通过本领域已知方法将本发明的表达载体或氨基酸序列导入宿主细胞。所谓“导入”意指经由常规转化或转染技术,或通过噬菌体介导的感染导入原核细胞中。本文所用术语“转化”、“转导”、“缀合”和“原生质体融合”欲指用于将外源核酸 (例如 DNA) 导入宿主细胞的各种本领域公认技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可参见 Sambrook 等 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) 和其它实验室手册。

[0060] 将用于产生本发明的治疗剂或多肽的细菌细胞培养在合适培养基中,如 Sambrook 等 (1989) *Molecular Cloning, Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) 中一般性描述的。

[0061] 本发明所包括的细菌菌株包括生物学上纯的细菌培养物的菌株,其包含至少一个本发明的核苷酸或氨基酸序列。这些菌株可包括但不限于:乳杆菌属、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、嗜热链球菌。

[0062] 如上所述,在一个实施方案中,治疗剂是富含 AQ/AQR 的多肽。可使用异源或同源调节区,将这类多肽置于 DNA 构建体中。具体地讲,可使用 P6 启动子,表达富含 AQ/AQR 的多肽。虽然它可以在任何胆汁敏感性微生物中表达,但是在一个实施方案中,使用遗传修饰的嗜热链球菌细菌表达本文其它部分公开的富含 AQ/AQR 的多肽。

[0063] 治疗和预防的方法。

[0064] 提供了治疗和预防受试者的胃肠病症的方法,所述方法包括给予本文其它部分描述的细菌。在一些实施方案中,给予细菌,例如嗜热链球菌细菌,可在受试者中抑制细胞凋亡和减少与艰难梭菌释放的毒素 A 有关的粘膜破坏。在其它实施方案中,给予表达至少一种治疗剂的胆汁敏感性细菌,可在受试者中抑制细胞凋亡和减少与艰难梭菌释放的毒素 A 有关的粘膜破坏。在一些实施方案中,提供用于治疗 and / 或预防受试者的胃肠病症、治疗和 / 或预防与艰难梭菌感染有关的症状以及治疗肠局部性疼痛的方法。

[0065] “治疗”在本文中定义为治愈、愈合、减轻、缓解、改变、医治、改善、改进或影响患有胃肠病症的受试者的病况或症状。待治疗的受试者可能患有胃肠病症或有发生胃肠病症的风险,包括例如患有艰难梭菌感染或有发生艰难梭菌感染的风险。在一个实施方案中,可在将抗生素给予患者之前、同时或之后给予重组胆汁敏感性细菌。

[0066] 给予细菌可用于预防或治疗目的。所谓“预防”是指预防性地提供细菌,即在任何症状之前提供细菌。预防性给予重组细菌起预防或减轻任何后续症状的作用。当治疗性提供时,在症状开始时或之后提供细菌。治疗性给予所述物质起减轻任何实际症状的作用。

[0067] 所谓“受试者”是指动物。在具体的实施方案中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物或人。在其它实施方案中,受试者包括驯养动物,例如猫科动物或犬科动物或农用动

物,例如反刍动物、马、猪、家禽或绵羊。在具体的实施方案中,用本发明的药物制剂进行治疗的受试者是人。在一些实施方案中,进行治疗的人可以是新生儿、婴儿、幼童、青春期前的少年、青少年或成人。本发明的受试者可能患有胃肠病症的症状或可能有胃肠病症的风险(例如已进行抗生素治疗的受试者)。

[0068] 胃肠病症

本发明的方法涉及治疗和/或预防胃肠病症。本文所用术语“胃肠病症”或“胃肠道病症”是指胃肠道或肠的疾病。胃肠病症包括例如由各种微生物引起的细菌感染,包括病毒例如轮状病毒、巨细胞病毒、肠腺病毒、诺沃克病毒、小RNA病毒、腺病毒、冠状病毒、杯状病毒(杯状病毒科(Caliciviridae))和牛病毒性腹泻病毒;细菌,例如肠产毒性大肠杆菌和侵袭性大肠杆菌、志贺氏菌属(*Shigella*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、弧菌属(*Vibrio*)细菌(例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*))、艰难梭菌、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*);原生动物,例如微孢子虫(*Microsporidia spp.*)、隐孢子虫(*Cryptosporidia spp.*)(例如小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*))、贝氏等孢子球虫(*Isospora belli*)、人酵母菌(*Blastocystis hominis*)、脆双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、结肠小袋虫(*Balantidium coli*)、贝氏等孢子球虫(*Isospora belli*)、圆孢子球虫(*Cylclospora cayetanensis*)、比氏肠胞微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、兰伯贾第虫(*Giardia lamblia*)(亦称肠兰伯式鞭毛虫(*Lamblia intestinalis*))和肠道脑胞内原虫(*Encephalitozoon intestinalis*);以及蠕虫,例如肠类圆线虫(*Strongyloides stercoralis*)。抗生素介导的正常胃肠菌群的破坏可导致胃肠病症,包括真菌感染,例如侵袭性念珠菌病或艰难梭菌引起的抗生素相关性结肠炎。

[0069] 本发明的方法和组合物涉及炎症性胃肠病症的治疗。本文所用术语“炎症性胃肠病症”或“炎症性胃肠道病症”是指由免疫系统或免疫系统的细胞介导的胃肠道或肠疾病。炎症性胃肠病症包括例如炎性肠病(IBD),例如克罗恩病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、显微镜下结肠炎、胶原性结肠炎、自身免疫性肠病、变应性胃肠疾病和嗜酸性胃肠疾病,以及腹泻、胃气胀、气胀、腹部绞痛、腹痛或便秘。在某些实施方案中,本发明的方法涉及肥胖症或肥胖症症状的治疗或预防,肥胖症症状包括IBD、腹泻、胃气胀、气胀、腹部绞痛、腹痛或便秘。参见例如Kadooka Y等(2010) *Eur J Clin Nutr.* 64(6):636-43,通过引用结合到本文中。

[0070] 在一些实施方案中,炎症的减少可包括刺激肠健全;降低肠通透性;改善粘蛋白合成、分泌和/或质量;改善肠上皮的成熟和分化;改善营养吸收;增加转移抗微生物活性的可溶性因子的产生;刺激、改善或支持感染抗性;支持针对病毒或细菌感染的细胞或体液应答;增加细胞毒性(抗病毒和抗肿瘤两者);支持全身和/或粘膜接种应答;提高或支持细胞和/或体液免疫;提高或支持天然免疫(包括嗜中性粒细胞、吞噬细胞、巨噬细胞和天然杀伤细胞活性);提高或支持适应性T细胞和B细胞免疫;刺激辅助T细胞1(Th1)细胞因子模式(提高IL-1、IL-2、IFN- γ 、IL-12、TNF- α ;人白细胞抗原-Dr(HLA-Dr)表达);抑制炎症或产生全身和粘膜炎症介质(包括细胞因子和/或趋化因子);通过降低总

IgE 和 / 或变应原特异性 IgE 而降低敏化 ; 降低变应性细胞因子的产生 ; 支持免疫球蛋白概况的 Th2 的产生及其组合。

[0071] 本文所用术语“促炎细胞因子”是指有利于炎症的免疫调节细胞因子。本发明的促炎细胞因子包括 IL1- α 、IL1- β 、TNF- α 、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、VEGF、嗜伊红粒细胞趋化因子 (eotaxin)、KC、TNF- α 、MIP1a、MIP3a、LT、LIF、制癌蛋白或 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 。

[0072] 本发明的方法和组合物包括降低促炎细胞因子产生的方法和组合物,其可降低或防止炎症反应或者预防或治疗炎症性胃肠道病症。本文所用促炎细胞因子产生水平的降低包括与合适对照相比时受试者中促炎细胞因子产生水平的任何统计显著性降低。这类降低可包括例如促炎细胞因子水平降低至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%。测定细胞因子水平的方法是已知的,包括例如 Leng, 2008, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63(8): 879-884。测定促炎细胞因子产生的方法包括多重微珠测定法 (multiplex bead assay)、ELISPOT 和流式细胞术。参见例如 Maecker, 2005, *BMC Immunology* 6:13。

[0073] 本文所用“细胞凋亡”或“凋亡”是指保持细胞增殖和细胞消除间的平衡所必需的程序性细胞死亡。已知毒剂例如化学治疗药物、电离辐射、微生物和免疫介导的反应提高肠上皮细胞中的细胞凋亡率,导致上皮损伤。细胞凋亡由胞内半胱氨酸蛋白酶 (称为胱天蛋白酶) 家族实施。在艰难梭菌相关性腹泻中,由艰难梭菌释放的毒素 A 可在肠上皮细胞、肥大细胞和内皮细胞中起诱导细胞凋亡的作用,其可促使肠粘膜破坏。本文所用“粘膜破坏”是指刺激、炎症、糜烂、溃疡、上皮损伤、水肿或粘膜细胞的嗜中性粒细胞浸润。测定细胞凋亡和粘膜破坏的方法描述于本文的其它部分。要了解的是,给予细菌可促进肠伤口愈合。可如本文其它部分所公开的,通过测量细胞凋亡和粘膜破坏来测定伤口愈合,例如通过测量细胞迁移。

[0074] 在一些实施方案中,给予本发明的细菌导致在不干扰胱天蛋白酶 6 或 9 活化的情况下,抑制由 TxA 诱导的胱天蛋白酶 8 活化。在其它实施方案中,给予本发明的细菌导致诱导热激蛋白 (HSP),例如 HSP 72。

[0075] 药物组合物

在一些实施方案中,将表达本发明治疗剂的胆汁敏感性细菌菌株以营养药物组合物 (nutraceutical composition) 例如营养补剂和 / 或食品添加剂的形式给予受试者。在具体的实施方案中,药物组合物包含已经修饰以表达富含 AQ/AQR 的肽 (例如 SEQ ID NO: 1 和 2 所示多核苷酸和多肽) 的细菌。在其它实施方案中,将提取物以药物组合物的形式给予受试者。如本文其它部分所述,给予可包括单剂量或多剂量给予。

[0076] 药物组合物可以是液体制剂或固体制剂。当药物组合物是固体制剂时,其可配制成片剂、口含片 (sucking tablet)、咀嚼片、口香糖、胶囊剂、小药囊剂、散剂、颗粒剂、包衣颗粒、包衣片、肠包衣片、肠包衣胶囊、口溶条 (melting strip) 或膜。如果药物组合物是液体制剂,则其可配制成口服溶液剂、混悬剂、乳剂或糖浆剂。所述组合物还可包含独立选自 (但不限于) 以下的载体材料:乳酸发酵食品、发酵乳制品、抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质。药物组合物可作为人类消费的食品或农业或驯养动物消费的饲料产品递送。

[0077] 本文所用术语“药物组合物”可配制成食物组合物、膳食补充剂、功能食品、医药

用食品或营养制品,只要达到所需作用,即治疗或预防胃肠病症。所述食物组合物可选自饮料、酸奶、果汁、冰淇淋、面包、饼干、薄脆饼干、谷类食物、健康条(health bar)、涂味品(spreads)和营养制品。食物组合物还可包含载体材料,其中所述载体材料选自乳酸发酵食品、发酵乳制品、抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质。

[0078] 按照本发明使用的或按照本发明产生的本发明的药物组合物还可包含众所周知的其它物质,例如惰性溶媒或药学上可接受的辅助剂、载体、防腐剂等。

[0079] 本公开内容还包括本文公开的细菌彼此的组合和/或与可用于治疗胃肠道病症的一种或多种其它药剂的组合。例如,本发明的细菌可与有效剂量的常规抗生素组合给予,所述抗生素包括甲硝唑、头孢氨苄、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、吉米沙星、巴洛沙星、加替沙星、格帕沙星、帕珠沙星、司帕沙星、替马沙星、依诺沙星、氟罗沙星、洛美沙星、那氟沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、芦氟沙星、曲伐沙星、托氟沙星、克林霉素、四环素、氯霉素、头孢西丁、头孢美唑、头孢替坦、多西环素、红霉素、亚胺培南、美罗培南、替卡西林、哌拉西林、美洛西林(mezocillin)、三唑巴坦、氨苄西林及其组合。术语“组合给予”是指活性剂同时给予和序贯给予两者。组合疗法不限于本文提供的药剂,而是包括用于治疗病症的任何组合物。

[0080] 治疗有效量

所谓“治疗有效剂量”、“治疗有效量”或“有效量”意指当给予受试者时治疗或预防胃肠病症的本发明细菌的量。例如,给予治疗有效量的本发明的细菌可在患有艰难梭菌感染的受试者中抑制细胞凋亡和减少粘膜破坏。“积极的治疗反应”是指例如改善胃肠病症的至少一种症状的状况。

[0081] 有效量的治疗剂根据预定目的确定。术语“单位剂量”是指适用于受试者的物理独立单位,各单位含有经计算产生所需的与其给予(即合适的途径和治疗方案)相关的反应的治疗组合物的预定量。按照治疗次数和单位剂量两者的待给予的量,取决于待治疗的受试者、受试者的状态和所需保护。治疗组合物的确切量还取决于从业人员的判断,并且为每个个体所特有。一般而言,重组细菌的剂量可随例如患者的年龄、体重、身高、性别、一般医学状况和既往病史等因素而变化。在具体的实施方案中,可合乎需要的是,给予细菌的范围为约 10^4 -约 10^{12} CFU、约 10^5 -约 10^{11} CFU、约 10^6 -约 10^{10} CFU、约 10^8 -约 10^{10} CFU或约 10^8 -约 10^{12} CFU。

[0082] 在本发明的一些实施方案中,所述方法包括给予多剂量的细菌。所述方法可包括给予约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40或更多治疗有效剂量的包含本文所述细菌的组合物。在一些实施方案中,在约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约10天、约14天、约21天、约30天或约30天以上的时程内给予剂量。如此给予多剂量的组合物的频率和持续时间,使得降低或预防炎症反应,从而治疗或预防胃肠病症。此外,用治疗有效量的本发明的重组细菌治疗受试者可包括单一治疗或可包括系列治疗。还应理解的是,可在具体治疗进程中增加或减少用于治疗细菌的有效剂量。剂量的改变可起因于本领域已知的和本文描述的用于检测炎症的诊断测定结果,并且从该结果来看是显然的。

[0083] 本文所用的冠词“一个”“一种”是指一个或多于一个(即至少一个)该冠词的语法客体。举例来说,“要素”意指一个或多个要素。

[0084] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请表示本发明所属领域技术人员的水平。所有出版物和专利申请均通过引用结合到本文中,其程度就像每个出版物或专利申请具体而单独指明通过引用结合一样。

[0085] 虽然为了清楚理解的目的,通过示例和实例以某种详细程度对前述发明进行了描述,但可在随附权利要求书的范围内实施某些改变和修饰是显而易见的。

[0086] 保藏材料

申请人以美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA 20110 USA, ATCC 保藏号 XXXXXX 嗜热链球菌 LMD-9 (*Streptococcus thermophilus* LMD-9) 进行了保藏。申请人还进行了以下保藏:ATCC 保藏号为 XXXXXX 的嗜热链球菌 NCK2071、ATCC 保藏号为 XXXXXX 的嗜热链球菌 NCK2072,ATCC 保藏号为 XXXXXX 的嗜热链球菌 NCK2073。

[0087] 自本申请提交日期之前,在 ATCC 保藏的细菌培养物取自由 North Carolina State University, 100 Schaub Hall, Campus Box 7624, Raleigh, North Carolina, 27695 维持的保藏材料 (deposits)。在本申请未决期间,向专利商标局局长及局长授权而定的人员提出请求时,可获得该保藏材料。在本申请任何权利要求的许可时,申请人将依照 37 C.F.R. § 1.808 使公众可获得该保藏材料。该保藏材料将在作为公共保藏机构的 ATCC 保藏机构维持达 30 年的时间,或在最新要求后 5 年,或专利可实施期限 (哪个期限较长就维持该较长的期限),且如果保藏材料在该期限内变得非存活的,则可更换。另外,申请人已符合或将符合 37 C.F.R. §§ 1.801 - 1.809 的全部要求,包括在保藏时提供样品存活性的说明。申请人无权免除有关生物材料转移或其商业运输时法律所强加的任何限制。

[0088] 根据上文提供的描述,提供下列实施方案:

按照第一个方面,提供经修饰以表达异源多肽的嗜热链球菌细菌,其中所述异源多肽在暴露于胆汁后从所述细菌中释放出来。

[0089] 在一个实施方案中,异源多肽是治疗性多肽。在一个具体的实施方案中,异源多肽是富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽。

[0090] 在又一个实施方案中,富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自:

a) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:2 或 8 所示氨基酸序列有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的氨基酸序列;

b) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:4 或 10 所示氨基酸序列有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的氨基酸序列;

c) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:6 或 12 所示氨基酸序列有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的氨基酸序列;

d) 一种肽,其由包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个的序列的核酸或与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的核苷酸编码;和

e) 一种肽,其因一个或几个氨基酸而不同于 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 中的一个。

[0091] 在又一个实施方案中,富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12。

[0092] 在又一个实施方案中,前述实施方案中任一个的细菌在所述胆汁暴露后不能存活。

[0093] 在又一个实施方案中,前述实施方案中任一个的细菌是嗜热链球菌 LMD-9、嗜热链球菌 NCK2071、嗜热链球菌 NCK2072 或嗜热链球菌 NCK2073。

[0094] 第二方面,提供制备嗜热链球菌细菌的方法,所述方法包括对所述细菌进行遗传修饰以表达异源多肽,其中所述多肽在暴露于胆汁后从所述细菌中释放。

[0095] 在又一个实施方案中,所述异源多肽是富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽。

[0096] 在又一个实施方案中,富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自:

A) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:2 或 8 所示氨基酸序列有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的氨基酸序列;

b) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:4 或 10 所示氨基酸序列有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的氨基酸序列;

c) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:6 或 12 所示氨基酸序列有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的氨基酸序列;

d) 一种肽,其由包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个的序列的核酸或与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的核苷酸编码;和

e) 一种肽,其因一个或几个氨基酸而不同于 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12 中的任一个。

[0097] 在又一个实施方案中,所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12。

[0098] 在又一个实施方案中,所述细菌在所述胆汁暴露后不能存活。

[0099] 在又一个实施方案中,前述实施方案中任一个的细菌是嗜热链球菌 LMD-9、嗜热链球菌 NCK2071、嗜热链球菌 NCK2072 或嗜热链球菌 NCK2073。

[0100] 按照第三个方面,提供将异源多肽递送给受试者的方法,所述方法包括经口给予受试者前述实施方案中任一个的细菌。

[0101] 按照第四个方面,提供治疗或预防受试者的病症的方法,所述方法包括经口给予受试者治疗有效量的前述实施方案中任一个的细菌。

[0102] 在又一个实施方案中,受试者是动物,更具体地讲是哺乳动物。

[0103] 在另一个实施方案中,受试者是人。

[0104] 在又一个实施方案中,受试者是驯养动物。

[0105] 在再一个实施方案中,受试者是农用动物。

[0106] 在又一个实施方案中,受试者患有胃肠病症。

[0107] 在又一个实施方案中,所述病症是细菌感染,更具体地讲是艰难梭菌感染。

[0108] 在又一个实施方案中,以治疗有效量给予细菌,其中细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。

[0109] 按照第五个方面,提供包含本文所述细菌的药物组合物。

[0110] 按照第六个方面,提供包含本文所述重组细菌的食品或饲料产品。

[0111] 在又一个实施方案中,食品是乳制食品。

- [0112] 按照第七个方面,提供用作药物的本文所述细菌。
- [0113] 按照第八个方面,提供用于治疗或预防受试者的病症的本文所述细菌。
- [0114] 在又一个实施方案中,所述病症是胃肠病症。
- [0115] 在又一个实施方案中,细菌用于治疗细菌感染,更具体地讲是艰难梭菌感染。
- [0116] 在备选的实施方案中,所述病症是炎性病症。
- [0117] 细菌用于减少炎症。在一个实施方案中,细菌在所述受试者中减少一种或多种促炎细胞因子的产生,更具体地讲,胆汁敏感性嗜热链球菌细菌减少 MIP1a、MIP3a、IL-16、IL-22、VEGF、嗜伊红粒细胞趋化因子、IL-1b、KC 或 LIF 的产生。
- [0118] 应当理解的是,以治疗有效量提供细菌,其中细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。
- [0119] 按照第九个方面,提供本文所述细菌作为药物的用途。
- [0120] 在一个实施方案中,药物用于治疗或预防受试者的病症。
- [0121] 在一个实施方案中,药物用于治疗胃肠病症。
- [0122] 在又一个实施方案中,所述病症是细菌感染,更具体地讲是艰难梭菌感染。
- [0123] 在备选的优选实施方案中,所述病症是炎性病症。
- [0124] 所述药物用于减少炎症。在一个实施方案中,药物在所述受试者中减少一种或多种促炎细胞因子的产生,更具体地讲,胆汁敏感性嗜热链球菌细菌减少 MIP1a、MIP3a、IL-16、IL-22、VEGF、嗜伊红粒细胞趋化因子、IL-1b、KC 或 LIF 的产生。
- [0125] 按照第十个方面,提供治疗受试者的炎症性胃肠道病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的分离的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌给予受试者。
- [0126] 按照第十一个方面,提供减少受试者的炎症的方法,所述方法包括将治疗有效量的分离的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌给予受试者。
- [0127] 在又一个实施方案中,受试者患有炎症性胃肠病症,更具体地讲患有艰难梭菌感染。
- [0128] 在另一个实施方案中,胆汁敏感性嗜热链球菌细菌在所述受试者中减少一种或多种促炎细胞因子的产生,更具体地讲,胆汁敏感性嗜热链球菌细菌减少 MIP1a、MIP3a、IL-16、IL-22、VEGF、嗜伊红粒细胞趋化因子、IL-1b、KC 或 LIF 的产生。
- [0129] 应当理解的是,以治疗有效量提供细菌,其中细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。
- [0130] 根据上文提供的描述,进一步提供下列实施方案:
1. 经修饰以表达异源多肽的嗜热链球菌细菌,其中所述异源多肽在暴露于胆汁后从所述细菌中释放。
 - [0131] 2. 实施方案 1 的细菌,其中所述异源多肽是治疗性多肽。
 - [0132] 3. 实施方案 1 或 2 的细菌,其中所述异源多肽是富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽。
 - [0133] 4. 实施方案 3 的细菌,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自:
 - a) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:2 或 8 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;
 - b) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:4 或 10 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

c) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:6 或 12 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

d) 一种肽,其由包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中任一个所示核苷酸序列的多核苷酸编码;和

e) 一种肽,其由包含与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的核苷酸序列的多核苷酸编码。

[0134] 5. 实施方案 3 的细菌,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12。

[0135] 6. 实施方案 1-5 中任一个的细菌,其中所述细菌在所述胆汁暴露后不能存活。

[0136] 7. 实施方案 1-6 中任一个的细菌,其中所述嗜热链球菌选自:

a) 嗜热链球菌 LMD-9,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

b) 嗜热链球菌 NCK2071,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

c) 嗜热链球菌 NCK2072,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

d) 嗜热链球菌 NCK2073,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;和

e) 一种益生的嗜热链球菌细菌。

[0137] 8. 制备嗜热链球菌细菌的方法,所述方法包括对所述细菌进行遗传修饰以表达异源多肽,其中所述多肽在暴露于胆汁后从所述细菌中释放。

[0138] 9. 实施方案 8 的方法,其中所述异源多肽是富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽。

[0139] 10. 实施方案 8 或 9 的方法,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自:

a) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:2 或 8 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

b) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:4 或 10 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

c) 一种肽,其包含与 SEQ ID NO:6 或 12 所示氨基酸序列有至少 70%、80%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列;

d) 一种肽,其由包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中任一个所示核苷酸序列的多核苷酸编码;和

e) 一种肽,其由包含与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 或 11 中的至少一个有至少约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 序列同一性的核苷酸序列的多核苷酸编码。

[0140] 11. 实施方案 8 或 9 的方法,其中所述富含丙氨酸-谷氨酰胺的肽选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 或 12。

[0141] 12. 实施方案 8-11 中任一个的方法,其中所述细菌在所述胆汁暴露后不能存活。

[0142] 13. 实施方案 8-12 中任一个的方法,其中所述嗜热链球菌选自:

a) 嗜热链球菌 LMD-9,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

b) 嗜热链球菌 NCK2071,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

c) 嗜热链球菌 NCK2072,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;

d) 嗜热链球菌 NCK2073,已经以 ATCC 登记号 ATCC-XXXX 保藏;和

e) 一种益生的嗜热链球菌细菌。

[0143] 14. 将异源多肽递送给受试者的方法,所述方法包括经口给予受试者实施方案 1-7 中任一个的细菌。

[0144] 15. 治疗或预防受试者的病症的方法,所述方法包括经口给予受试者治疗有效量的实施方案 1-7 中任一个的细菌。

[0145] 16. 实施方案 14 或 15 的方法,其中所述受试者是动物。

[0146] 17. 实施方案 16 的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

[0147] 18. 实施方案 17 的方法,其中所述受试者是人。

[0148] 19. 实施方案 16 的方法,其中所述受试者是驯养动物。

[0149] 20. 实施方案 16 的方法,其中所述受试者是农用动物。

[0150] 21. 实施方案 15-20 中任一个的方法,其中所述病症是胃肠病症。

[0151] 22. 实施方案 15-20 中任一个的方法,其中所述病症是细菌感染。

[0152] 23. 实施方案 22 的方法,其中所述细菌感染是艰难梭菌感染。

[0153] 24. 实施方案 14-23 中任一个的方法,其中所述细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。

[0154] 25. 药物组合物,其包含实施方案 1-7 中任一个的细菌。

[0155] 26. 食品或饲料产品,其包含实施方案 1-7 中任一个的细菌。

[0156] 27. 实施方案 24 的食品,其中所述食品是乳制品。

[0157] 28. 用作药物的实施方案 1-7 中任一个的细菌。

[0158] 29. 用于治疗或预防受试者的病症的实施方案 1-7 中任一个的细菌。

[0159] 30. 实施方案 28 或 29 的细菌,其中所述病症是细菌感染。

[0160] 31. 实施方案 30 的细菌,其中所述细菌感染是受试者中的艰难梭菌感染。

[0161] 32. 实施方案 28-31 中任一个的细菌,其中将所述细菌配制为以治疗有效量给予受试者,其中所述细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12} CFU/天。

[0162] 33. 实施方案 1-7 中任一个的细菌作为药物的用途。

[0163] 34. 实施方案 33 的细菌的用途,其中所述药物用于治疗或预防受试者的病症。

[0164] 35. 实施方案 34 的细菌的用途,其中所述病症是细菌感染。

[0165] 36. 实施方案 35 的细菌的用途,其中所述细菌感染是艰难梭菌感染。

[0166] 37. 治疗受试者的炎症性胃肠道病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的分离的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌给予受试者。

[0167] 38. 减少受试者的炎症的方法,所述方法包括将治疗有效量的分离的胆汁敏感性嗜热链球菌细菌给予受试者。

[0168] 39. 实施方案 37 或 38 的方法,其中所述受试者患有炎症性胃肠病症。

[0169] 40. 实施方案 39 的方法,其中所述炎症性胃肠病症是艰难梭菌感染。

[0170] 41. 实施方案 37-40 中任一个的方法,其中所述胆汁敏感性嗜热链球菌细菌在所述受试者中减少一种或多种促炎细胞因子的产生。

[0171] 42. 实施方案 41 的方法,其中所述促炎细胞因子选自:MIP1a、MIP3a、IL-16、IL-22、VEGF、嗜伊红粒细胞趋化因子、IL-1b、KC 和 LIF 或其任何组合。

[0172] 43. 实施方案 37-42 中任一个的方法,其中所述细菌的治疗有效量为约 10^8 - 10^{12}

CFU/ 天。

[0173] 通过说明的方式而非通过限制的方式来提供下列实施例。

[0174] 实验

实施例 1

根据下文所示富含 Gln 的过客结构域 (passenger domain) 的氨基酸序列, 由 GenScript Corporation (Piscataway, NJ) 构建含有富含 Gln 的寡肽 AGRP-FH0、AGRP-FH1 和 AGRP-FH2 的质粒 pUC57-AGRP-FH0、pUC57-AGRP-FH1 和 pUC57-AGRP-FH2 (表 1)。3 个寡肽的每一个含有 FLAG 标签表位 (DYKDDDDK, SEQ ID NO: 13)。该表还含有编码的富含 Gln 的寡肽的分子量和等电点的信息。过客结构域的编码区用来构建下述嗜热链球菌表达载体。

[0175] 考虑长度、Gln 含量和释放时可促进其降解的蛋白酶切割位点的存在情况, 可设计质粒 pUC57-AGRP-FH0、pUC57-AGRP-FH1 和 pUC57-AGRP-FH2 中所含富含 Gln 的寡肽以改进稳定性。富含 Gln 的肽中也可包括其它氨基酸, 例如在口服补液疗法 (oral rehydration therapy) 中与 Gln 具有协同作用的精氨酸。

[0176] 表 1: 用于益生菌的第一代富含 AQ/AQR 的肽

SEQ ID NO:	构建体	过客结构域
2	AGRP-FH0	RAMDYKDDDDKALQQAQQAQKQVQQDIQPPA QQAQGGQQQAQQDIQQTAAQAQQIQRQK YPYDVPDYALD
4	AGRP-FH1	RAMDYKDDDDKAQAQGGQRQAQQIQAQGGQ RQAQAQQ QRQAQQIQAQGGQRQAQAQ QGGQAQQIQAQGGQRQYPYDVPDYALD
6	AGRP-FH2	RAMDYKDDDDKAQAQQRGAQQRGQIQQRGQ RAQAQQRGAQQRGQIQQRGQRAQAQQRGQAQ QRGQIQQRGQRAQAQGGQAQQRGQIQQRGQRY PYDVPDYALD
FLAG 标签表位用下划线表示。		

实施例 2

嗜热链球菌菌株 LMD-9 (亦称 NCK1125) 具有完整的基因组序列 (Makarova, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:15611-15616), 可通过电穿孔进行遗传学评价。该菌株已成功应用于用于提高反义 RNA 表达的高拷贝载体 (pTRK686) 的克隆, 所述反义 RNA 能够延迟噬菌体感染。另外, 使用同一基本载体在胞内顺式 (*in trans*) 表达已被定向突变毒害的噬菌体引发酶。用于表达富含 Gln 的寡肽构建体的载体来源于 pTRK686, 并且含有多个克隆位点和可用来驱动富含 Gln 的寡肽表达的强组成型启动子 (参见图 2 和 3)。

[0177] 选择大肠杆菌革兰氏阳性穿梭载体 pTRK989 以表达 AQQ 过客序列。质粒 pTRK989 携带强 P6 启动子, 并且是之前使用的 pTRK696 的 XbaI 缺失的衍生物 (Sturino, 2004, *Appl Env Microbiol* 70:1735-1743)。在 pTRK989 中克隆编码富含 AQ 的肽的核苷酸序列, 使用 Z 感受态大肠杆菌转化缓冲液 Set (Z-Competent E coli Transformation Buffer Set)

(Zymo Research),将所得质粒转化至大肠杆菌 MC1061 中。在具有 20 ug/ml 氯霉素的 LB 板上回收转化体。使用 Choice-Taq Blue DNA 聚合酶 (Denville Scientific Inc., Metuchen, NJ) 与载体特异性引物 (SauI Forward: 5' TGCTGAAGAGCATCTGATTG 3' (SEQ ID NO: 14) 和对每个插入片段有特异性的内部引物 (FH0 int: 5' GGCCATGGATTATAAAGACGAC 3' (SEQ ID NO: 15); FH1 int: 5' GGGTCAACGTCAGGCACAACAG 3' (SEQ ID NO: 16); FH2 int: 5' GATAAAGCCCAGGCCAGCAAC 3' (SEQ ID NO: 17)), 针对插入片段的方向对具有带有正确插入片段大小的质粒的分离物进行了分析。

[0178] 将具有正确方向的各个构建体的一个质粒分离物送往 Davis Sequencing (Davis, CA), 以对载体引物侧翼的插入片段的两条链进行测序 (SauI 正向, 如上所示, SauI 反向 (5' CCCGTTAGTTGAAGAAGGTT 3' (SEQ ID NO: 18))). 质粒图谱见图 3。在证实序列后, 通过电穿孔把质粒转化至嗜热链球菌 LMD-9 (Sturino, 2004, *Appl Env Microbiol* 70 : 1735-1743)。将具有 5 ug/ml 氯霉素的 Elliker-B 板在缺氧下孵育。得自分离物的质粒 DNA 用 SauI 正向引物和反正引物 (上文所示) 扩增, 对 PCR 产物测序以证实各构建体中 P6 启动子和编码富含 AQ 的肽的多核苷酸的序列。

[0179] 接着采用标准方案, 通过蛋白质印迹对肽表达进行检查。针对 AGRP-FH0、AGRP-FH1 和 AGRP-FH2 寡肽的存在情况, 对细胞流分和胆汁处理的细胞上清液两者进行了检查。

[0180] 简单地说, 使含有 pTRK989 (对照)、pTRK996、pTRK997 和 pTRK998 的嗜热链球菌菌株在具有合适抗生素的 Belliker 肉汤培养基中生长到对数期 (OD_{600} 约 0.6)。随后, 将 10 mL 的对数期培养物离心, 收集细胞沉淀。将沉淀再悬于 500 μ L PBS 中, 进行 BeadBeating 达 2 分钟, 并进一步离心。收集上清液, 用于蛋白质定量和蛋白质印迹法。参见图 4。

ATCC保藏材料	菌株命名	质粒构建体
	NCK1125	嗜热链球菌LMD-9, 无载体
	NCK2070	含有pTRK989, 用作载体对照
	NCK2071	含有pTRK996, 编码AGRP-FH0 (SEQ ID NO: 2)
	NCK2072	含有pTRK997, 编码AGRP-FH1 (SEQ ID NO: 4)
	NCK2073	含有pTRK998, 编码AGRP-FH2 (SEQ ID NO: 6)

[0181] 实施例 3

将嗜热链球菌 (LMD-9) 在补充 1% 牛肉提取物的 Elliker 肉汤培养基中在 42°C 下生长 18 小时, 得到 10^9 CFU/mL。使用作体内治疗的培养物沉淀, 洗涤, 并重新悬于肉汤培养基中至 10^8 /mL 的终浓度。将艰难梭菌的临床 BI 菌株 (UVA24 ; TcdA⁺、TcdB⁺、CdtA/B⁺) 或历史菌株 VPI10463 用于下文概述的研究中。使艰难梭菌在预先还原的碎肉肉汤培养基中在 37°C 下生长 18 小时以体内使用, 或在 BHI 肉汤培养基中过夜用于体外研究。采用肉汤培养基微量稀释方法 (broth microdilution) 和滴板方法 (drop plate method), 在含有 0.5% 中性红 (1% w/v, 在乙醇中) 的 BHI 琼脂上对艰难梭菌计数 (Chen, 2003, *J. Microbiol. Methods*, 55(2) : 475-479)。

[0182] 实施例 4

按照下列改动, 将艰难梭菌相关疾病小鼠模型 (Chen, 2008, *Gastroenterology*, 135(6) : 1984-1992) 用于体内研究 : 从抗生素混合物中省略卡那霉素并增加克林霉素 (32

mg/kg)。按照 University of Virginia ACUC 批准的方案进行所有实验。在所有研究中使用雄性小鼠 (8 w.o., Jackson Laboratories)。在抗生素混合物的 72 小时内,且之后经口管饲法每 24 小时给予嗜热链球菌治疗 (10^7 CFU/100 μ L)。动物用临床分离物 UVA24 (10^5 CFU/100uL) 感染。如果腹泻明显,则中断嗜热链球菌治疗。每日观察动物,同时称重。使用下列标度,对腹泻的严重程度评分:0 - 无症状,1 - clumped cobb,2 - 略湿尾,3 - 湿尾。在第 3 和 5 天,使具有类似临床征象的小鼠安乐死以收集样品(盲肠内容物和组织)。将样品冷冻并保存在 -80°C 下,或固定在 Bouin 溶液中;石蜡包埋,使用苏木精/伊红染色(由 University of Virginia Research Histology Core 提供服务)。载玻片是盲态的(blinded),采用公布的参数,由独立读数人评分(Pawlowski,2010, *J Infect Dis* 202(11):1708-1712)。

[0183] 实施例 5

所有测定都在 Bactron I 厌氧培养室 (Shel Labs, Cornelius, OR) 中进行。将艰难梭菌 (10^5 CFU) 接种到含有上清液、L-乳酸或 HEPES 缓冲液 (50mM) 的肉汤培养基中。将得自嗜热链球菌的上清液过滤 (0.2 μ m),并用 BHI 稀释至 50% (v/v) 以支持艰难梭菌的生长。同样,将 L-乳酸的原液在 BHI 中稀释至 10 - 100mM 的终浓度。在接种和生长 (24 小时, 37°C) 后,如上所述在 BHI 琼脂上对细菌计数。

[0184] 实施例 6

使用市售可获得的试剂盒 (艰难梭菌毒素 A/B II, Techlab, Blacksburg, VA) 检测小鼠的盲肠内容物或体外上清液中的毒素。对盲肠内容物称重,并使用试剂盒中提供的样品稀释液,归一化至称重最小的样品。将归一化样品 1:1000 稀释,并按照生产商的说明书对 150uL 进行测试。使用试剂盒,以 1:10 稀释度对体外上清液进行测试。

[0185] 实施例 7

为了解嗜热链球菌对抗生素相关性艰难梭菌感染的影响,在开始抗生素混合物的起初 72 小时内,将活的嗜热链球菌以类似用于人的剂量每日给予小鼠 (例如 5×10^{10} CFU/70 kg 人, (McFarland, 2009, *Anaerobe*, 15(6):274-280)),并在整个感染期间每日继续进行。初期研究使用 10^4 CFU (LD_{50}) 的 VPI10463,虽然仅 30% 随着嗜热链球菌治疗死亡 (相对于 50% 的对照;数据未显示),这种趋势不显著,我们研究的随后重点在于临床分离物。

[0186] 使用得自艰难梭菌结肠炎患者的产毒临床 REA BI 型分离物 (即 UVA24) 感染小鼠,在几乎没有死亡率的情况下提供足够的发病率。与对照相比,使用该菌株,因艰难梭菌感染所致,接受嗜热链球菌的小鼠失去显著较少的体重 (46%) (图 1A)。在感染期间,针对腹泻体征每日对小鼠评分,其中感染后第 3 和 4 天的数据 (图 1D) 显示嗜热链球菌治疗的小鼠中腹泻发病率降低。在单独的实验中,将 UV 照射的不能生存的嗜热链球菌给予小鼠,与感染对照相比,在体重或腹泻方面没有差异。感染后第 3 天,从治疗和未治疗的小鼠中采集盲肠内容物和组织样品,针对 TcdA/B 水平和组织病理学分别进行了分析 (图 4B、C)。盲肠内容物中的毒素水平不仅仅提供艰难梭菌所释放的 TcdA/B 的度量,而且还可用作小鼠中疾病进程的指示物,其中在感染后期 (即第 5 天相对于第 3 天) 观察到较低水平。虽然 TcdA/B 水平无显著差异,但用嗜热链球菌治疗的小鼠趋于具有较低的可检测水平的毒素。同样,嗜热链球菌治疗的小鼠的腹泻严重程度较低 (图 4D)。组织病理学评分显示,用嗜热链球菌治疗的小鼠在结肠中具有显著较少的艰难梭菌相关性病理和较少的盲肠病理 (图 4C)。有趣

的是,采用靶向 *tcdB* 的实时 PCR,在盲肠内容物中检出相当水平的艰难梭菌(在第3天,对于未治疗和治疗的平均 C_T 值分别为 34.67 和 34.49; $n=8$ 个孔/组)。总之,体内结果表明了嗜热链球菌对艰难梭菌的毒素产生的影响;因此,进行了其它体外实验以阐明作用方式。

[0187] 实施例 8

针对对艰难梭菌的活性,对来自嗜热链球菌的经过滤的上清液(50% v/v)进行测试,表明 24 小时后 5-log 降低(图 5A)。活性是剂量依赖性的,因为在 24 小时后,较少的上清液(33% v/v)允许艰难梭菌生长(数据未显示)。由几种乳酸菌分泌的主要组分包括乳酸、过氧化氢和细菌素。设计此处提供的实验以表征这些组分之一乳酸对艰难梭菌的作用。为了测试由嗜热链球菌产生的乳酸的参与,对经过滤的上清液(50% v/v)进行缓冲,用艰难梭菌接种,在 24 小时后对生长进行定量测定。在该实验中,缓冲液改变培养基的 pH 自 5 到 5.8,在表明抑菌作用的接种的初始水平下允许艰难梭菌存活(图 5A)。使用 L-乳酸的进一步实验表明尽管有缓冲液,但高剂量(100mM)对艰难梭菌是杀菌的,而 1/10 倍的水平允许生长,且对培养基进行缓冲似乎允许额外的生长(图 5B)。用 VPI10463 观察到 L-乳酸(1 和 10 mM)的类似作用,而在 24 小时后,100 mM 完全消除生长(数据未显示)。

[0188] 在该项研究中确定乳酸对艰难梭菌的作用的最后方面包括检查生长期间 TcdA 的相对丰度以证实用嗜热链球菌治疗的动物中较低毒素水平的体内结果。采用 TcdA/B ELISA,针对毒素对艰难梭菌上清液(即在乳酸 ± 缓冲液存在下的 24 小时生长)进行了测试,表明了虽然 10 mM 乳酸允许细菌生长(图 5B);但缓冲液不存在时,毒素产生是剂量依赖性降低的(图 5C)。

[0189] 实施例 9

艰难梭菌是无处不在的细菌菌种,主要由与人和动物有关的产毒和非产毒菌株组成。此处提供的研究试图检查嗜热链球菌对用 BI 菌株的实验性艰难梭菌感染的影响。与之前的研究(Chen, 2008, *Gastroenterology*, 135(6):1984-1992)类似,与 VPI10463 相比,在体内用 BI 菌株感染导致较低的死亡率。与未治疗对照相比,用活的嗜热链球菌治疗的动物失去显著较低的体重,表示腹泻严重程度较低,表明了较少病理和较低的盲肠毒素水平;然而,盲肠内容物中通过 PCR 的艰难梭菌的负荷不依赖于治疗。PCR 的一个限制是未考虑生物的存活性。

[0190] 然而,我们的结果反映了以下研究:在艰难梭菌攻击前,检查了建群和细胞毒性在具有人分离物的限菌小鼠中的影响(Corthier, 1985, *Appl Environ microbial* 49(1):250-252)。作者发现,与双歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)或大肠杆菌单相关的艰难梭菌感染的小鼠具有较低的细胞毒素(即 TcdB)盲肠水平,尽管病原体的水平高。虽然该工作中提供的数据并未具体观察 TcdB,但是两项研究表明了抑制艰难梭菌毒素产生的特定细菌和/或细菌代谢产物的作用。

[0191] 此处提供的结果基于用于临床测试相关治疗的艰难梭菌感染的工作模型,其可用于在带有艰难梭菌的患者中指导益生菌用法。在更基础的水平上,该模型允许在抗生素暴露后检查肠微生物群落和/或针对疾病易感性应用益生生物。细菌间和细菌内代谢过程对抑制艰难梭菌毒素代谢并因此抑制疾病发生可能是决定性的。

[0192] 实施例 10

采用细胞迁移测定法来测量粘膜损伤水平。该测定法按先前所述进行(McCormack,

1992, *Am J Physiol* 263 :G426-G435)。对于该测定法,按照生产商的说明书,将 35-mm 培养皿用基质胶 (Matrigel) 包被 ($40 \mu\text{g/ml}$)。为了启动迁移,以 6.25×10^4 个细胞 / cm^2 接种 IEC-6 细胞,生长至汇合。6 天后,我们用刀片刮下细胞层,以培养皿的直径开始,扩展到整个 30-mm 宽的面积。刮下后,更换培养基为正常培养基,加入 1、10 或 100 ng/ml 毒素 A。在下面的实验中,用不含 Gln- 培养基或用具有 Gln 或 Ala-Gln 的培养基 (10 mM) 进行培养基更换,然后加入毒素 A (10 ng/ml)。为了验证在机械损伤后 Gln 和 Ala-Gln 对迁移的作用,刮下后,在毒素 A 不存在时,用不含 Gln 的培养基或者含 Gln 或 Ala-Gln 的培养基 (1、3、10 或 30 mM) 进行培养基更换。然后将培养皿返回培养箱,在 6 和 24 小时后,对具有最高迁移率的区域拍照。使用目视网格对细胞进行计数。

[0193] 实施例 11

通过 AnnexinV Assay 测定毒素 A 诱导的细胞凋亡的剂量反应和时程。将 IEC-6 细胞接种在 6 孔板 (106 细胞 / 孔) 中,接种后 24 小时,更换培养基为正常培养基或含有 Gln 或 Ala-Gln (10 mM) 的培养基,在有或没有毒素 A (1-1000 ng/ml) 的情况下孵育细胞。对于剂量反应与毒素 A 一起孵育 24 小时后,而对于时程与毒素 A 一起孵育 2、6、18 和 24 小时后,排出培养基,贴壁细胞用 PBS 洗涤,胰蛋白酶消化,通过离心收集,用荧光素异硫氰酸酯缀合的膜联蛋白 V 和碘化丙啶 (propidium iodide) (ApoAlert 膜联蛋白 V 细胞凋亡试剂盒; Clonetechnology, Palo Alto, CA) 复染。通过流式细胞术测量凋亡细胞和坏死细胞的百分比。

[0001]

<110> Klaenhammer, Todd R.
Guerrant, Richard L.
Kolling, Glynnis L.
Durmaz, Evelyn
Timko, Michael P.
Alacantha-Warren, Cirle

<120> 用于递送治疗性肽的
组合物和方法

<130> 35051/405777

<150> 61/346, 107

<151> 2010-05-19

<150> 61/436, 452

<151> 2011-01-26

<160> 18

<170> 用于 Windows 4.0 版的 FastSEQ

<210> 1

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (222)

<223> AGRP-FH0

<220>

<221> CDS

[0002]

<222> (1)... (222)

<223> AGRP-FH0

<220>

<223> 人工的

<400> 1

cgg gcc atg gat tat aaa gac gac gat gat aaa gcg ctg cag caa gct 48

Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Leu Gln Gln Ala

1 5 10 15

cag cag gct cag cag aaa gtt cag cag gat atc cag cag ccg gcg caa 96

Gln Gln Ala Gln Gln Lys Val Gln Gln Asp Ile Gln Gln Pro Ala Gln

20 25 30

cag gcc cag cag ggt cag cag gtt cag cag gcc caa cag gac att cag 144

Gln Ala Gln Gln Gly Gln Gln Val Gln Gln Ala Gln Gln Asp Ile Gln

35 40 45

cag aca gca cag caa gca cag cag att cag cag cgt cag cag aaa tat 192

Gln Thr Ala Gln Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Arg Gln Gln Lys Tyr

50 55 60

ccg tat gat gtg ccg gac tat gct cta gac 222

Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp

65 70

<210> 2

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<400> 2

Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Leu Gln Gln Ala

[0003]

1	5	10	15
Gln Gln Ala Gln Gln Lys Val Gln Gln Asp Ile Gln Gln Pro Ala Gln			
20	25	30	
Gln Ala Gln Gln Gly Gln Gln Val Gln Gln Ala Gln Gln Asp Ile Gln			
35	40	45	
Gln Thr Ala Gln Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Arg Gln Gln Lys Tyr			
50	55	60	
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp			
65	70		

<210> 3

<211> 270

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AGRP-FH1

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (270)

<223> AGRP-FH1

<400> 3

cgg gcc atg gat tat aaa gat gat gat gat aaa gcc cag gca cag cag 48

Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln

1

5

10

15

ggt caa cgt cag gca caa cag atc cag caa gca cag cag ggc cag cgc 96

Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg

20

25

30

cag cag gcg cag gcc caa cag ggt cag cgc caa gct cag caa att caa 144

Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln

35

40

45

cag gct cag cag gga cag cgt cag cag gct cag gcc cag cag ggt cag 192

[0004]

Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln
50 55 60

cag gcc cag cag att cag cag gcg cag caa ggt cag cgt cag cag tat 240
Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Tyr
65 70 75 80

ceg tac gac gtt ceg gac tac gct eta gac 270
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp
85 90

<210> 4

<211> 90

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<400> 4

Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln
1 5 10 15
Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg
20 25 30
Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln
35 40 45
Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln
50 55 60
Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Tyr
65 70 75 80
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp
85 90

<210> 5

<211> 318

<212> DNA

[0005]

<213> 人工序列

<220>

<223> AGRP-FH2

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (318)

<223> AGRP-FH2

<400> 5

cgg gcc atg gat tac aaa gat gat gat gat aaa gcc cag gcc cag caa 48
Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln
1 5 10 15

egt ggt cag gca cag cag egt ggg cag atc cag cag cgc ggc cag cgc 96
Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg
20 25 30

gca cag gcg cag caa cgc ggc cag gcc cag cag cgt ggc caa atc cag 144
Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln
35 40 45

cag cgt ggt cag cgc gcc cag gct cag caa cgc gga cag gct caa caa 192
Gln Arg Gly Gln Arg Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln
50 55 60

egt ggt cag att caa cag cgc ggg cag cgc gcg caa gcc caa caa cgc 240
Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Ala Gln Ala Gln Gln Arg
65 70 75 80

ggt cag gcg cag cag cgc ggt cag att cag cag cgt gga caa cgc tat 288
Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Tyr
85 90 95

cct tat gat gtc cct gat tac gct cta gac 318
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp
100 105

[0006]

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<400> 6

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

<210> 7

<211> 247

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<220>

<221> CDS

<222> (26)... (247)

<223> AGRP-FH0s

[0007]

<400> 7

ctagaatatt tcaggeccgg tgtcc atg gcc cgg gcc atg gat tat aaa gac 52

Met Ala Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp

1

5

gac gat gat aaa gcg ctg cag caa get cag cag get cag cag aaa gtt 100

Asp Asp Asp Lys Ala Leu Gln Gln Ala Gln Gln Ala Gln Gln Lys Val

10

15

20

25

cag cag gat atc cag cag cgg gcg caa cag gcc cag cag ggt cag cag 148

Gln Gln Asp Ile Gln Gln Pro Ala Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Gln

30

35

40

gtt cag cag gcc caa cag gac att cag cag aca gca cag caa gca cag 196

Val Gln Gln Ala Gln Gln Asp Ile Gln Gln Thr Ala Gln Gln Ala Gln

45

50

55

cag att cag cag cgt cag cag aaa tat cgg tat gat gtg cgg gac tat 244

Gln Ile Gln Gln Arg Gln Gln Lys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr

60

65

70

gct

247

Ala

<210> 8

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<400> 8

Met Ala Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Leu Gln

1

5

10

15

[0008]

Gln Ala Gln Gln Ala Gln Gln Lys Val Gln Gln Asp Ile Gln Gln Pro
 20 25 30
 Ala Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Gln Val Gln Gln Ala Gln Gln Asp
 35 40 45
 Ile Gln Gln Thr Ala Gln Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Arg Gln Gln
 50 55 60
 Lys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 65 70

<210> 9

<211> 295

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<220>

<221> CDS

<222> (32)... (295)

<223> AGRP-FH1

<400> 9

ctagaatatt tcaggcccggtgtccatggc c cgg gcc atg gat tat aaa gat 52
 Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp
 1 5

gat gat gat aaa gcc cag gca cag cag ggt caa cgt cag gca caa cag 100
 Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln
 10 15 20

atc cag caa gca cag cag ggc cag cgc cag cag gcg cag gcc caa cag 148
 Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln
 25 30 35

ggt cag cgc caa get cag caa att caa cag gct cag cag gga cag cgt 196
 Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg
 40 45 50 55

[0009]

cag cag gct cag gcc cag cag ggt cag cag gcc cag cag att cag cag 244
 Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln
 60 65 70

geg cag caa ggt cag cgt cag cag tat ccg tac gac gtt ccg gac tac 292
 Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
 75 80 85

gct 295
 Ala

<210> 10

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<400> 10

Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln
 1 5 10 15
 Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg
 20 25 30
 Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Ala Gln Gln Ile Gln
 35 40 45
 Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Ala Gln Ala Gln Gln Gly Gln
 50 55 60
 Gln Ala Gln Gln Ile Gln Gln Ala Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gln Tyr
 65 70 75 80
 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 85

<210> 11

[0010]

<211> 343

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<220>

<221> CDS

<222> (32)...(343)

<223> AGRP-FH2

<400> 11

ctagaatatt tcaggcccggtgtccatggc c cgg gcc atg gat tac aaa gat 52

Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp

1

5

gat gat gat aaa gcc cag gcc cag caa cgt ggt cag gca cag cag cgt 100

Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg

10

15

20

ggg cag atc cag cag cgc gcc cag cgc gca cag gcg cag caa cgc gcc 148

Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly

25

30

35

cag gcc cag cag cgt gcc caa atc cag cag cgt ggt cag cgc gcc cag 196

Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Ala Gln

40

45

50

55

gct cag caa cgc gga cag gct caa caa cgt ggt cag att caa cag cgc 244

Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg

60

65

70

ggg cag cgc gcg caa gcc caa caa cgc ggt cag gcg cag cag cgc ggt 292

Gly Gln Arg Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly

75

80

85

cag att cag cag cgt gga caa cgc tat cct tat gat gtc cct gat tac 340

Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr

[0011]

90
95
100
get 343
Ala

<210> 12
<211> 104
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 12
Arg Ala Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gln Ala Gln Gln
1 5 10 15
Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg
20 25 30
Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln
35 40 45
Gln Arg Gly Gln Arg Ala Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ala Gln Gln
50 55 60
Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Ala Gln Ala Gln Gln Arg
65 70 75 80
Gly Gln Ala Gln Gln Arg Gly Gln Ile Gln Gln Arg Gly Gln Arg Tyr
85 90 95
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
100

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0012]

<223> FLAG-表位

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (20)

<223> SauI 正向引物

<400> 14

tgctgaagag catctgattg

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (22)

<223> AGRP-FHO 内部引物

<400> 15

ggccatggat tataaagacg ac

22

[0013]

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (22)

<223> AGRP-FH1 内部引物

<400> 16

gggtcaacgt caggcacaac ag

22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (22)

<223> AGRP-FH2 内部引物

<400> 17

gataaagccc aggcccagca ac

22

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (20)

<223> SauI 反向引物

<400> 18

cccgtagtt gaagaaggtt

20

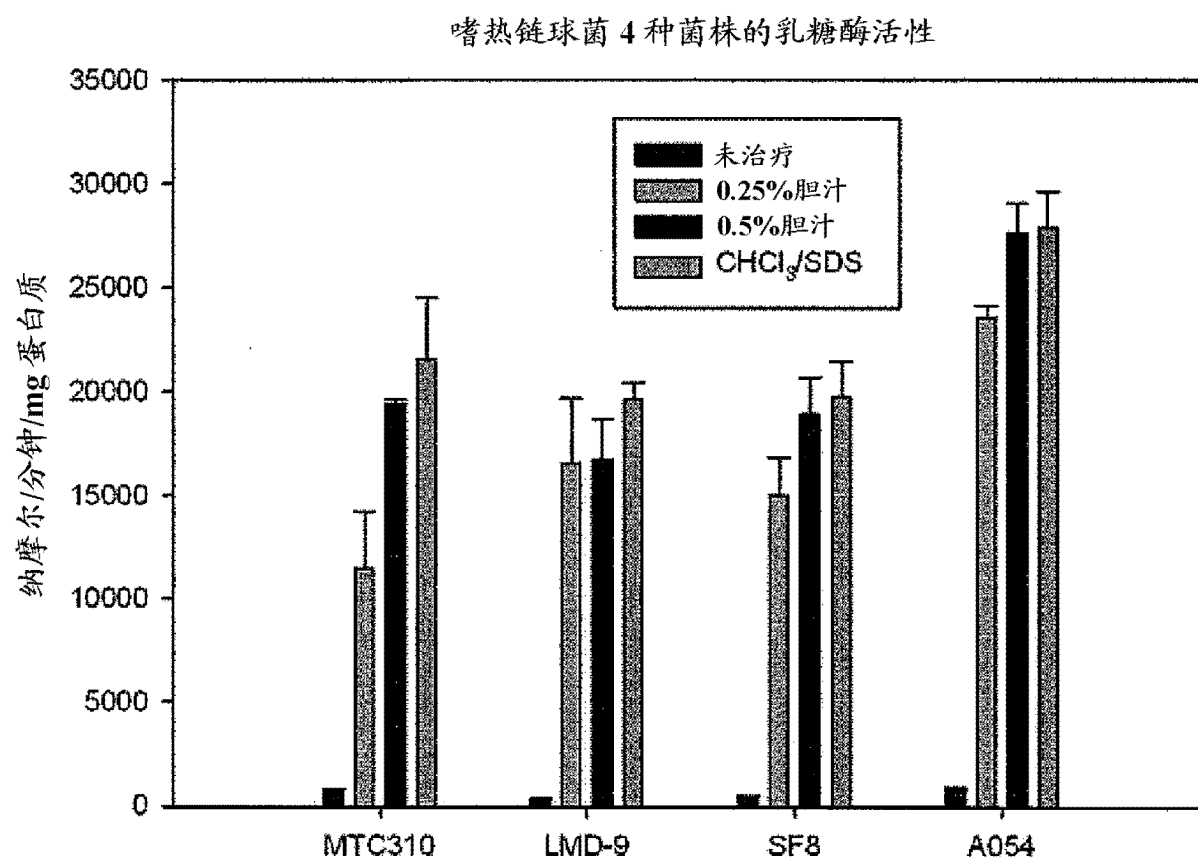


图 1

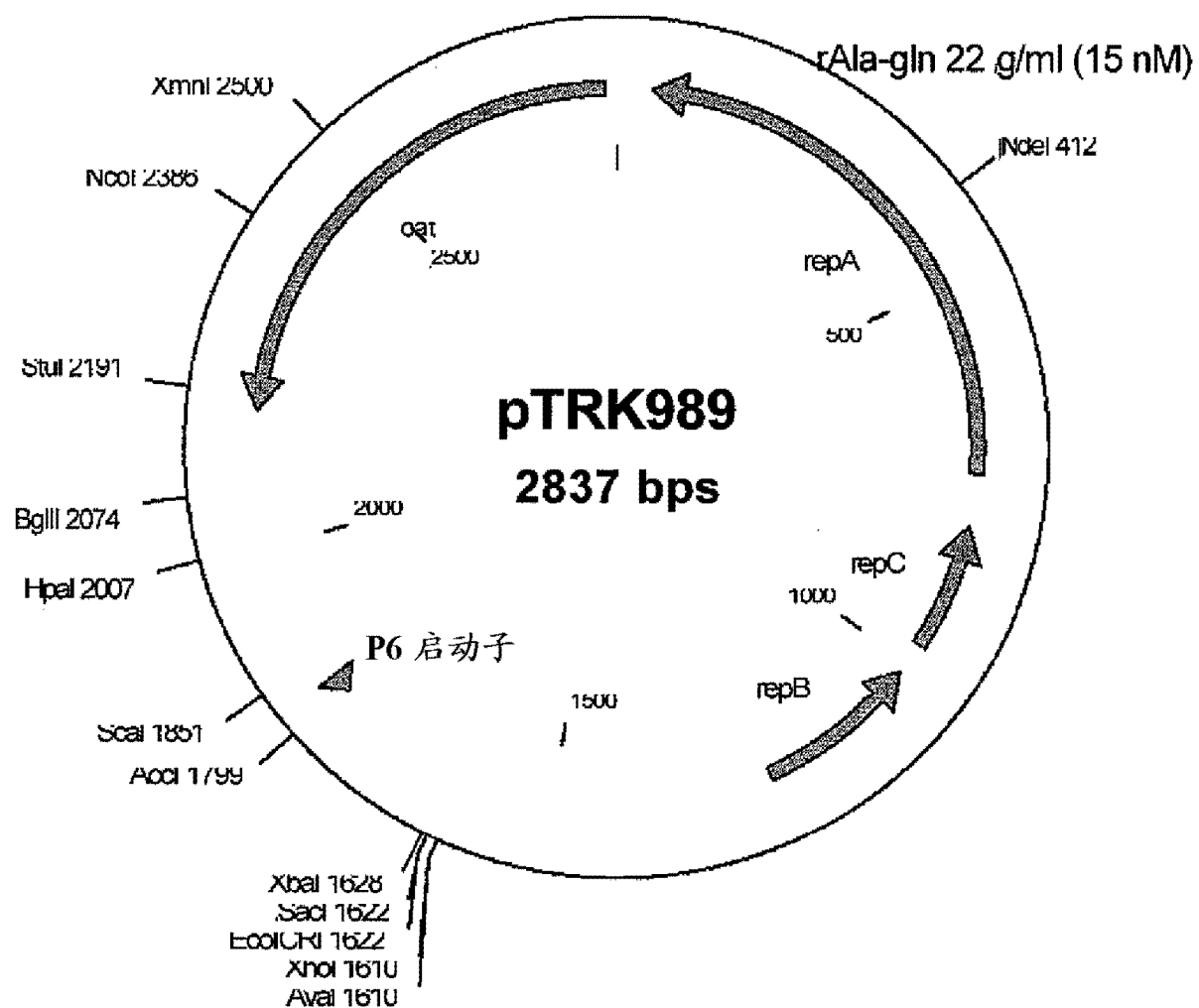


图 2

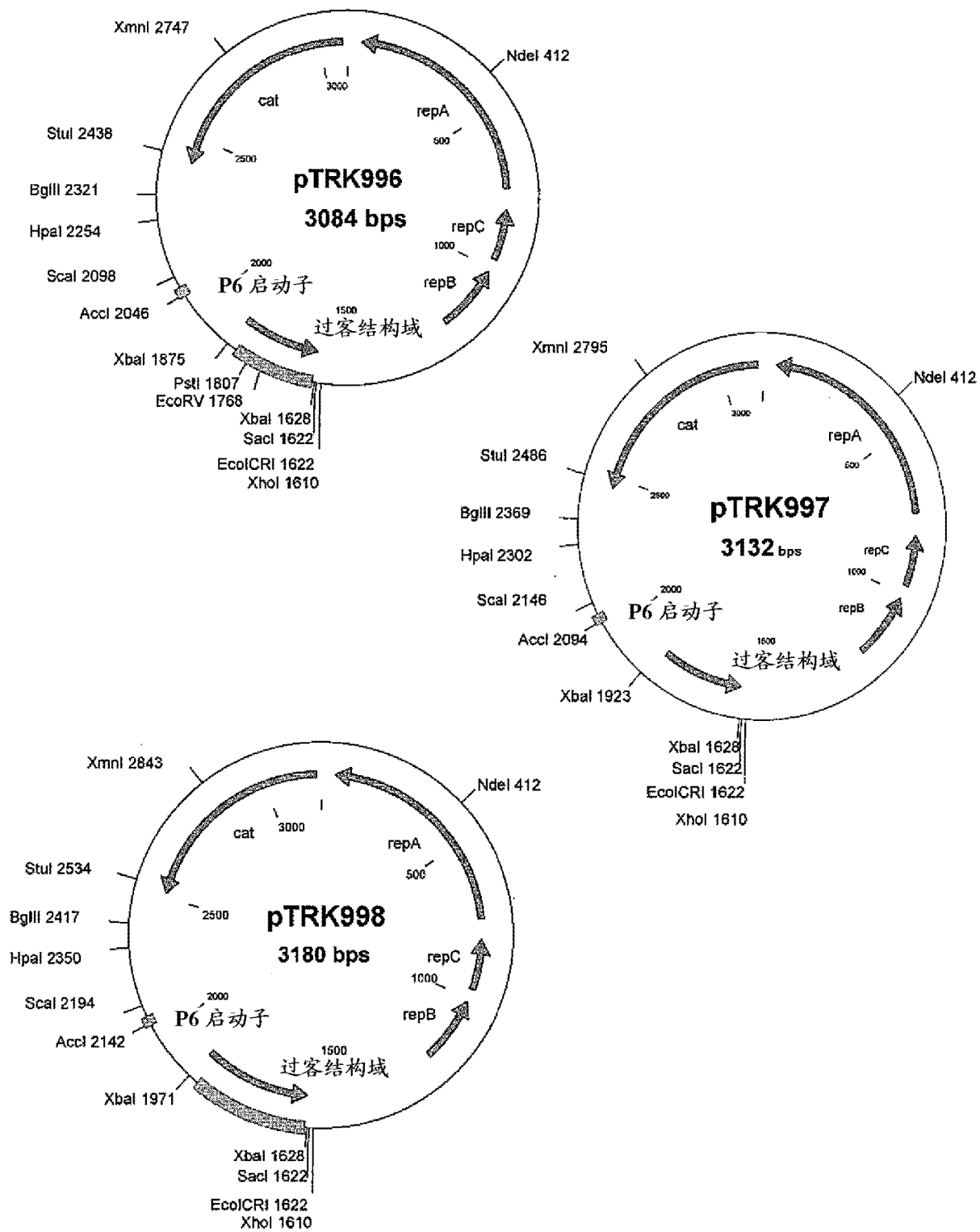


图 3

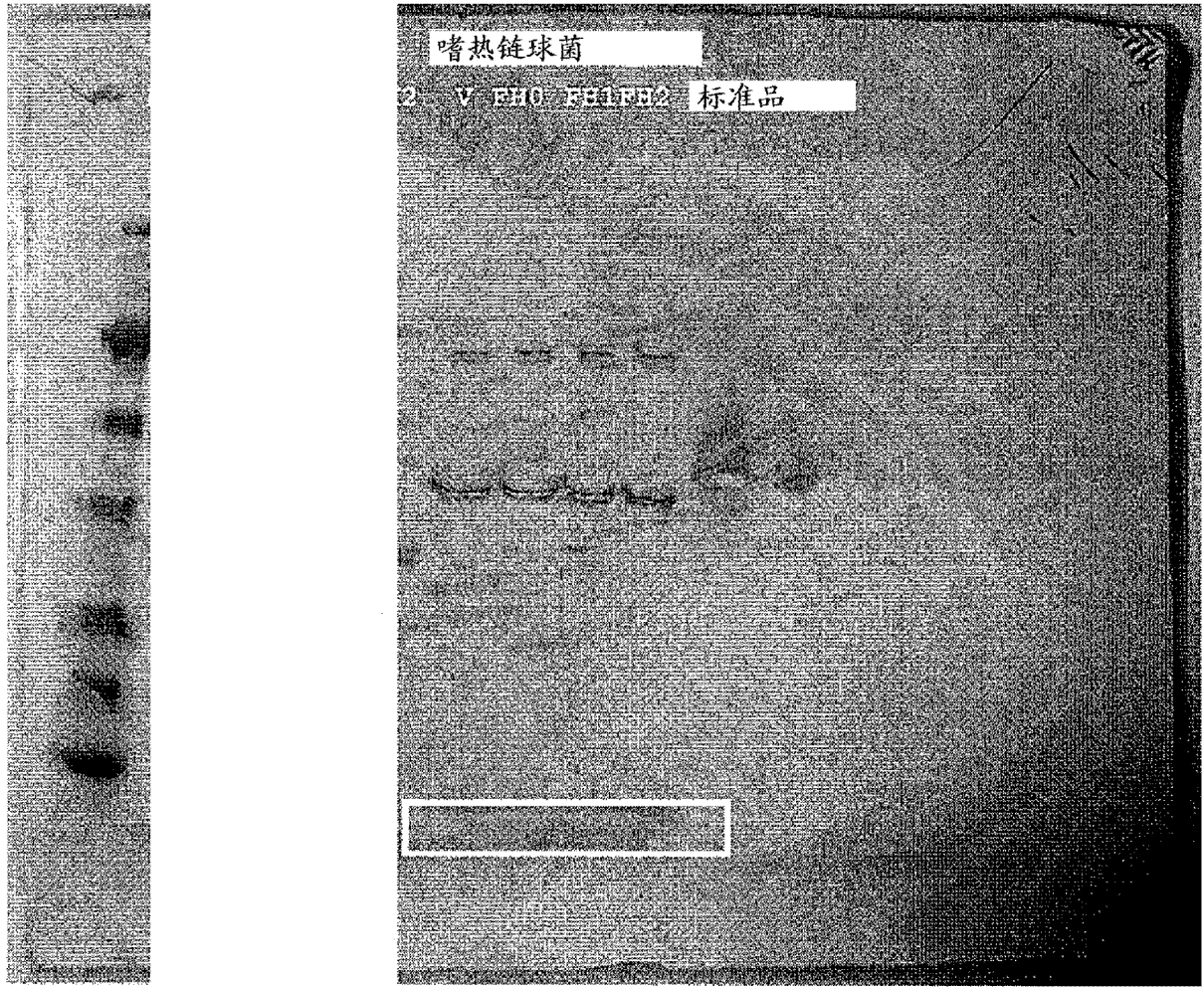


图 4

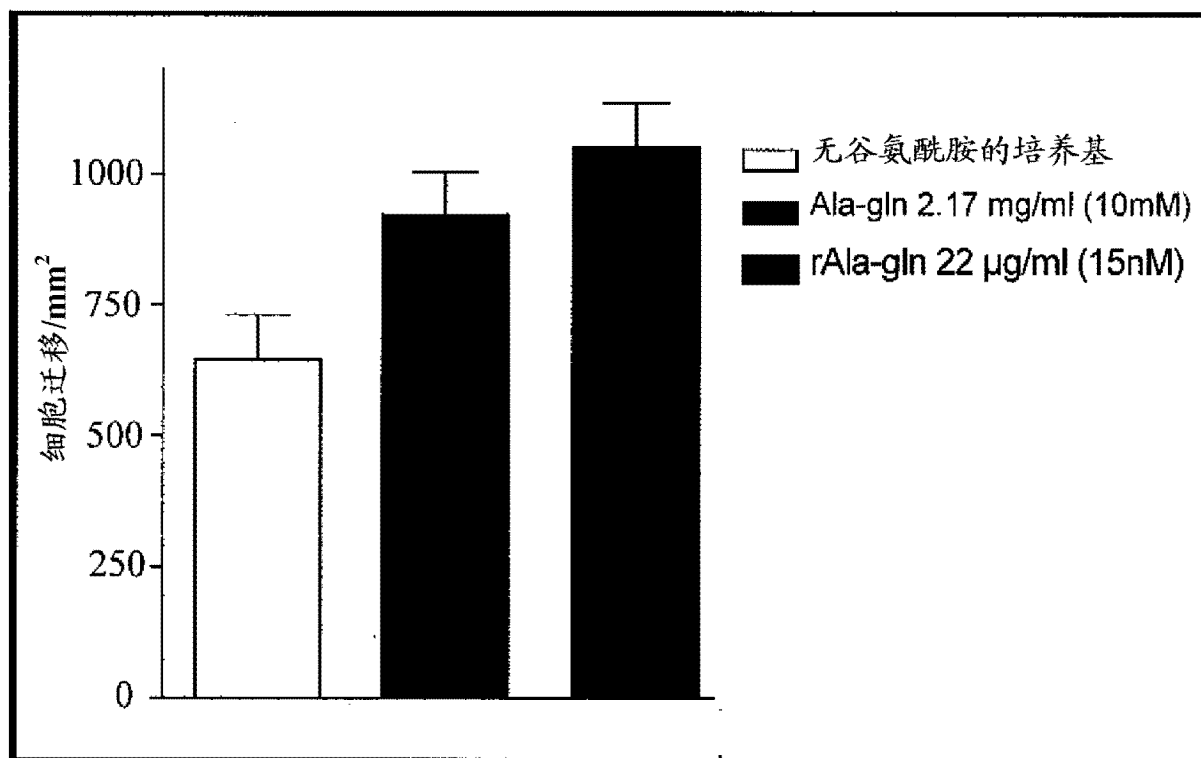


图 5

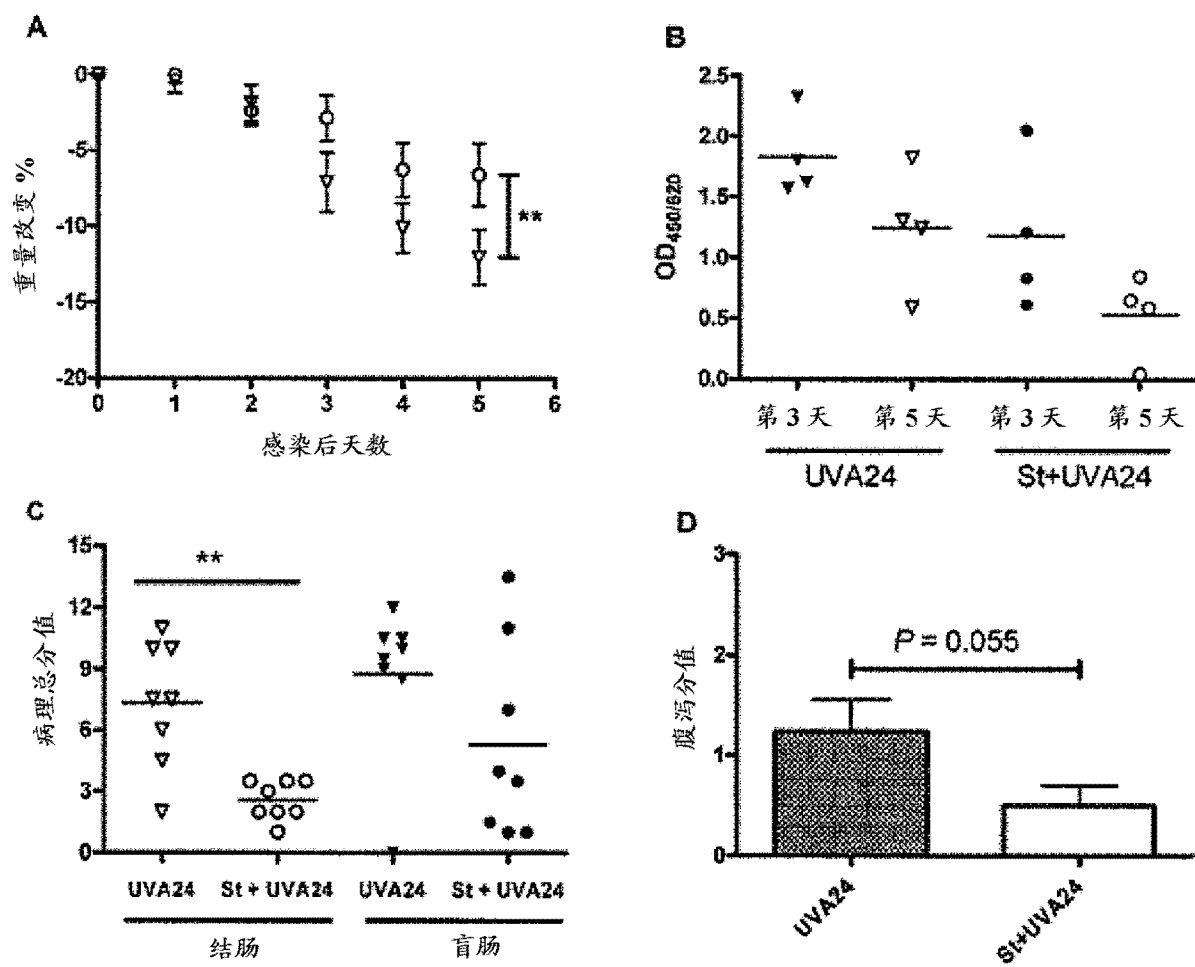


图 6

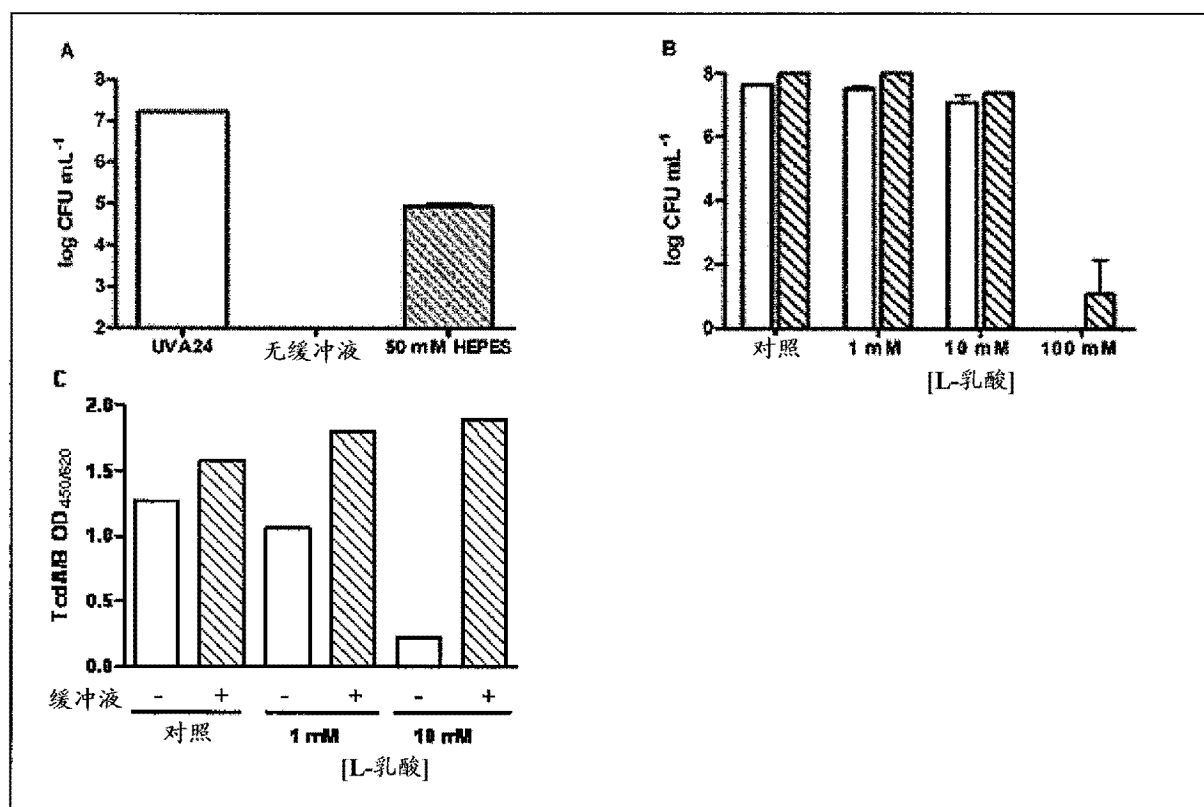


图 7

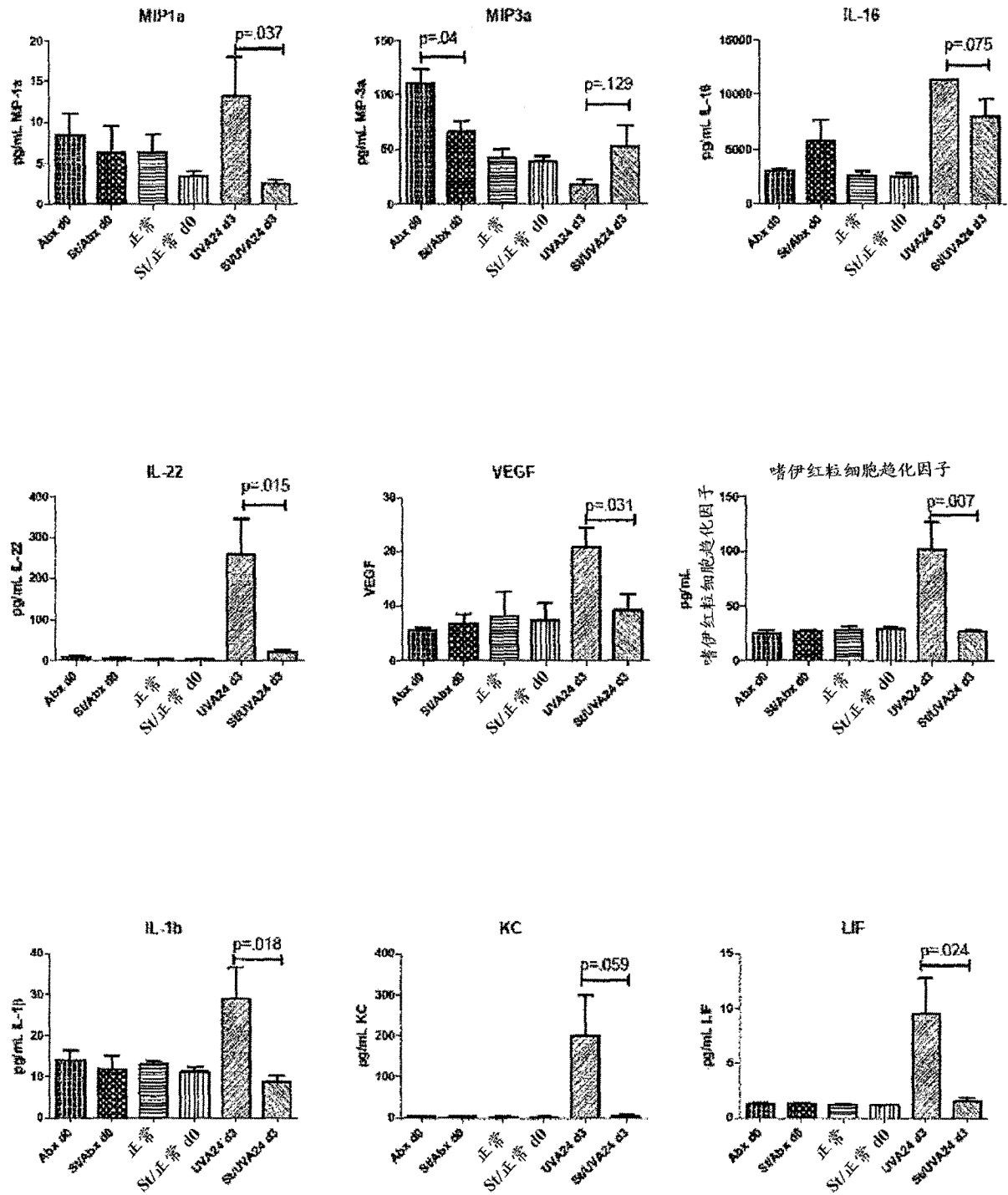


图 8