

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 97181626.3

C12N 15/31

C07K 14/315

A61K 39/09

C12N 1/21

C12N 5/10

//(C12N15/31,

C12R1 : 46)

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1211487C

[22] 申请日 1997. 12. 5 [21] 申请号 97181626.3

[30] 优先权

[32] 1996. 12. 6 [33] US [31] 60/032,930

[86] 国际申请 PCT/US1997/022228 1997. 12. 5

[87] 国际公布 WO1998/024911 英 1998. 6. 11

[85] 进入国家阶段日期 1999. 8. 2

[71] 专利权人 明尼苏达大学董事会

地址 美国明尼苏达州

[72] 发明人 P·M·施利弗特 M·罗格阿尼

J·施托赫 D·奥伦多弗

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 64 页 附图 13 页

[54] 发明名称 链球菌毒素 A 突变体及其使用方法

[57] 摘要

本发明涉及 SPE - A 毒素突变体或其片段、疫苗和药物组合物，以及疫苗和药物组合物的使用方法。与野生型 SPE - A 毒素相比，优选的 SPE - A 毒素至少有一个氨基酸变化而且是基本不致死的。该 SPE - A 毒素突变体可制成用于保护动物抵抗野生型 SPE - A 生物活性的疫苗组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种分离的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该突变体含有取代, 选自:
将 Asn-20 替换为天冬氨酸;
5 将 Asp-45 替换为天冬酰胺; 或
将 Lys-157 替换为谷氨酸。
2. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变体含有将 Asn-20 替换为天冬氨酸和将 Cys-98 替换为丝氨酸。
3. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变
10 体含有将 Asn-20 替换为天冬氨酸和将 Lys-157 替换为谷氨酸。
4. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变体含有将 Asn-20 替换为天冬氨酸, 将 Asp-45 替换为天冬酰胺和将 Cys-98 替换为丝氨酸。
5. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变
15 体是不致死的。
6. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变体是抗原性的和不致死的。
7. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变体是不致死的, 且保留野生型 SPE-A 毒素的促有丝分裂性。
- 20 8. 如权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体, 其特征在于, 该 SPE-A 毒素突变体不增强内毒素休克。
9. 一种药物组合物, 其特征在于, 该组合物包含与生理上可接受载体相混合的权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体。
10. 如权利要求 9 所述的组合物, 其特征在于, 该组合物是疫苗。
- 25 11. 权利要求 1 所述的 SPE-A 毒素突变体的用途, 其特征在于, 用于制备疫苗, 该疫苗抵抗野生型 SPE-A 毒素。
12. 如权利要求 11 所述的用途, 其特征在于, 该疫苗还用于抵抗内毒素休克。

链球菌毒素 A 突变体及其使用方法

5

发明背景

化脓链球菌也称为 β -溶血性 A 族链球菌(GAS)，它是一种人病原，它可引起轻度感染，如咽炎和脓疱病。感染后可发生自身免疫并发症，即风湿热和急性肾小球性肾炎。GAS 还引起严重的急性病，如猩红热和链球菌中毒性休克综合征(STSS)。在本世纪初，在美国和全世界，严重的 GAS 感染是一个很大的问题。在四十年代中期，病例数及其严重程度稳定下降，其原因还未完全明白。然而，最近，再次出现了 GAS 引起的严重疾病，在美国每年可能有 10-20,000 件 STSS 病例。这些患者中多达 50-60%将患坏死性筋膜炎和肌炎；30-60%的人将死亡，而幸存者有多达一半的人将截肢。

在 1986 和 1987 年，两份报道描述了在洛基山区域爆发了严重的 GAS 感染。在其后的几年里，其它一些报道描述了一种具有类似临床表现的疾病。对该疾病描述的症状与中毒性休克综合征(TSS)所描述的症状非常相似，在 1992 年，科学家委员会将这一临床表现正式命名为 STSS，并设定了其诊断的标准。STSS 被定义为存在下列情况：

1. 低血压和休克；
2. 分离到 A 族链球菌；
3. 具有以下症状的两种或多种：发烧 38.5 °C 或更高、猩红热皮疹、呕吐和腹泻、肝肾功能紊乱、成年人呼吸窘迫综合征、弥漫性血管内凝血、坏死性筋膜炎和/或肌炎、细菌血症。

从 STSS 患者所得链球菌分离物主要是 M1 和 M3 型，其余主要是 M18 型和不能分型的细菌。大多数与 STSS 相关的不可分型细菌以及 M1、M3、M18 产生 A 型致热性外毒素(SPE-A，即猩红热毒素 A)。与之相反，一般的链球菌分离株中仅 15%产生该毒素。此外，给兔动物模型施用 SPE-A 以及在两次偶然性人接种时，再现了 STSS 症状。

SPE-A 是一个分子量等于 25,787 道尔顿的单肽，其编码序列被携带于温和噬菌体 T12 中。SPE-A 的基因 *speA* 已经被克隆并在大肠杆菌中成功地表达。SPE-A 是链球菌和葡萄球菌产生的外毒素大家族中的一个成员，根据其能诱导发热并且使宿主对内毒素的易感性提高达 100,000 倍的能力，而称为致热性毒素。

最近这些毒素已经被称为超抗原,因为它们能以依赖于 T 细胞受体 β 链可变区的组成成分的方式,诱导 T 淋巴细胞大量增殖(而不管 T 细胞的抗原特异性)。这些毒素还刺激 IFN- γ 、IL-1、TNF- α 和 TNF- β 的大量释放。这一家族的其它成员是 B 型和 C 型链球菌致热性外毒素,葡萄球菌中毒性休克综合征毒素 1,葡萄球菌肠毒素 A、B、Cn、D、E、G 和 H,以及非 A 族链球菌的致热性外毒素。这些毒素有相似的生物化学性能、生物活性和各种程度的序列相似性。

STSS 最严重的表现是低血压和休克,这些表现可导致死亡。通常认为,体液从血管内渗漏到组织间隙是造成低血压的最终原因,这得到了如下观察结果的支持,即在上述 STSS 家兔模型中进行体液替换治疗成功地防止了休克。已经提出假设, SPE-A 可能以几种方式作用于宿主从而诱发该病。

已经表明, SPE-A 通过危害肝枯否氏细胞(Kupffer cell)的活力,来阻断肝脏清除内源菌群所产生的内毒素。这看来引起了循环内毒素的显著增加,内毒素通过结合于脂多糖结合蛋白质(LBP)和 CD14 信号传导而导致激活巨噬细胞,随后释放出 TNF- α 和其它细胞因子。通过给动物施用多粘菌素 B 或是使用无病原的兔,至少可部分中和 SPE-A 的致死作用,这一发现对内毒素在疾病中的作用提供了支持。

诱导休克的另一种方式可能是该毒素对于毛细血管内皮细胞有直接活性。这种假设基于这样的发现:即葡萄球菌致热性毒素 TSST-1 直接结合人脐带静脉细胞并对分离的猪主动脉内皮细胞有细胞毒性。

该毒素的另一种作用方式是其超抗原性,即毒素与高达 50% 的宿主 T 淋巴细胞反应并将其激活。这一 T 细胞大量刺激导致产生异常高水平的循环细胞因子 TNF- β 和 IFN- γ ,它们对巨噬细胞有直接作用,从而诱导释放 TNF- α 和 IL-1。这些细胞因子也可在没有 T 细胞存在下,由 SPE-A 通过 MHC II 类结合和信号传导而诱导巨噬细胞直接释放出来。TNF- α 和- β 水平的升高引起了通常在革兰阴性菌诱导性休克中所见的几种效应,其中有对内皮细胞的损伤和毛细血管渗漏。然而,给 SPE-A 处理过的兔施用环孢菌素 A(环孢菌素 A 可阻断 IL-2 的上调和 T 细胞增殖),不能保护动物免遭休克,这提示在引起毛细血管渗漏中还有其它更重要的作用机理。

因此,需要确定 SPE-A 分子上担负不同生物活性的部位。需要发展生物活性(如毒性和促细胞有丝分裂性)改变的 SPE-A 突变体。需要发展用于预防或缓和链球菌中毒性休克综合征的疫苗用组分。还需要开发出治疗链球菌中毒性休克综合征和其它疾病的治疗剂。

发明概述

本发明包括突变的 SPE-A 毒素及其片段, 疫苗和药物组合物, 以及该疫苗和药物组合物的使用方法。

突变的 SPE-A 毒素至少有一个氨基酸变化, 并且与基本对应于野生型 SPE-A 毒素的蛋白质相比, 它基本上不致死。用于疫苗组合物时, 毒素突变体还激发针对野生型 SPE-A 毒素的至少一种生物活性的保护性免疫应答。疫苗组合物用的毒素突变体还进一步被任意选择, 使其与野生型 SPE-A 相比内毒素休克增强作用和促 T 细胞有丝分裂性均有所减弱。一种特别优选的用于疫苗组合物的突变体, 是在相当于野生型 SPE-A 毒素的 20 位氨基酸处发生氨基酸改变的突变体。用于药物组合物时, 较佳的毒素突变体基本上不致死, 同时保持了与野生型 SPE-C 毒素相当的促 T 细胞有丝分裂性。

本发明还包括野生型 *speA* 毒素和 *speA* 毒素突变体的片段。衍生自野生型 SPE-A 的片段和肽是 SPE-A 毒素突变体。这些片段可包括不同的毒素分子的结构域或分子区域, 它们可联合在一起。与野生型 SPE-A 毒素相比, 此种片段基本上是不致死的。对于毒素突变体, 与野生型 SPE-A 氨基酸序列相比, 该片段至少有一个氨基酸不同。片段也可用于疫苗和药物组合物。

本发明还包括表达盒、载体和转化的细胞。表达盒包括编码 SPE-A 毒素突变体或其片段的 DNA 序列, 该 DNA 序列与在宿主细胞中起作用的启动子可操作地相连。DNA 盒宜插入载体中。载体包括质粒或病毒。载体可用来提供模板 DNA, 以产生编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA。DNA 盒和载体也可用于疫苗组合物。编码 SPE-A 毒素突变体或其片段的核酸可直接输送, 从而在哺乳动物细胞中进行表达。启动子宜为在哺乳动物细胞中起作用的启动子。直接输送给细胞的核酸可在个体中表达 SPE-A 毒素突变体, 从而产生了针对野生型 SPE-A 毒素的至少一种生物活性的保护性免疫应答反应。

其它的疫苗组分包括: 包含编码 SPE-A 毒素突变体或其片段的表达盒且稳定转化的细胞或病毒载体。病毒载体如牛痘可用来对人免疫接种, 以产生抗野生型 SPE-A 毒素至少一种生物活性的保护性免疫应答反应。转化的细胞宜为微生物, 如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌或沙门氏菌属。转化的微生物或者在其表面上有 SPE-A 毒素突变体或其片段, 或能分泌毒素突变体。转化的微生物可作为活疫苗、减毒疫苗或热杀灭疫苗来施用。

本发明还包括疫苗和药物组合物的使用方法。给予动物的疫苗量可有效地产生针对野生型 SPE-A 毒素至少一种生物活性的保护性免疫应答反应。较佳地, 是

将疫苗组合物给予人体，以起防止 STSS 发作的保护作用。药物组合物也用于刺激 T 细胞增殖的方法中。在治疗那些用白细胞介素、干扰素或其他免疫调制剂治疗的癌症，以及 T 细胞淋巴瘤，卵巢癌和子宫癌时，该药物组合物特别有用。该组合物可施用于癌症病人。

- 5 SPE-A 毒素突变体和/或其片段以及其它疫苗组合物，可用来产生被动免疫血清。SPE-A 毒素突变体或其片段、DNA 表达盒或载体、或转化的微生物，可用来对动物免疫接种，以产生针对野生型 SPE-A 至少一种生物活性的中和抗体。该中和抗体能与 SPE-A 毒素突变体和/或其片段以及野生型 SPE-A 毒素发生免疫反应。被动免疫血清可施用于有链球菌 A 感染和 STSS 症状的动物。

10

附图简述

图 1 是链球菌致热性外毒素 A 的模型化三维结构的带状图，标明了结构域 A 和 B。

- 15 图 2 是对于图 1 所示的标准图，从背面观看时的 SPE-A 图。被编号的残基是那些与 TSST-1 评估的降低全身性致死率的残基同源的残基。

图 3 显示了克隆的来自 T12 的 SPE-A 毒素的 DNA 序列(SEQ ID NO: 12)和预计的氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)。

- 20 图 4 为 T 细胞增殖分析。在 96 孔微量滴定板中，将兔脾细胞与 SPE-A、K16N-SPE-A 和 N20D-SPE-A 一起孵育 72 小时(每种重复 4 次)。细胞用³H]胸苷脉冲处理 18-24 小时，通过滤膜收集，然后在闪烁计数器上测定³H]胸苷的掺入量。结果表示为以每分钟的计数(CPM)对以微克/毫升($\mu\text{g/ml}$)表示的毒素浓度。所示的数据来自 3 次独立试验中最具代表性的试验。

- 25 图 5 为 T 细胞增殖分析。在 96 孔微量滴定板中，将兔脾细胞与 SPE-A、C87S-SPE-A、C98S-SPE-A 和 C90S-SPE-A 一起孵育 72 小时(每种重复 4 次)。细胞用³H]胸苷脉冲处理 18-24 小时，通过滤膜收集，然后在闪烁计数器上测定³H]胸苷的掺入量。结果表示为每分钟的计数(CPM)对以微克/毫升($\mu\text{g/ml}$)表示的毒素浓度。所示的数据来自 3 次独立试验中最具代表性的试验。

- 30 图 6 为 T 细胞增殖分析。在 96 孔微量滴定板中，将兔脾细胞与 SPE-A、K157E-SPE-A 和 S195A-SPE-A 一起孵育 72 小时(每种重复 4 次)。细胞用³H]胸苷脉冲处理 18-24 小时，通过滤膜收集，然后在闪烁计数器上测定³H]胸苷的掺入量。结果表示为每分钟的计数(CPM)对以微克/毫升($\mu\text{g/ml}$)表示的毒素浓度。所示的数据来自 3 次独立试验中较具代表性的试验。

图 7 是与单突变体相比时野生型 SPE-A 的超抗原性。将兔脾细胞与所示剂量的 SPE-A 或突变体一起孵育 4 天。对于每个剂量的 SPE-A 和突变体，使用 4 个重复的孔。在第 3 天，将 $1\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ 胸苷加至各孔。超抗原性指数==在 SPE-A 或突变体存在时 ^3H 胸苷在脾细胞中的掺入量除以在无 SPE-A 或突变体存在时 ^3H 胸苷的掺入量。

图 8 是与双突变体相比时野生型 SPE-A 的超抗原性。使用图 7 中所述的方法。

图 9 显示了免疫的兔血清对 SPE-A 的抑制作用。来自用单突变体或双突变体免疫的兔子的兔血清，被用于显示在 SPE-A 存在下该血清中和脾细胞的促细胞分裂的能力。

图 10 显示了 SPE-A 带状结构的前视图，其中 SPE-A 取向显示了在复合体中与 II 型主要组织相容性复合体接触的位点。

图 11 显示了 SPE-A 带状结构的前视图，其中 SPE-A 取向显示了在复合体中与 T 细胞受体接触的位点。

图 12 显示了 SPE-A 带状结构的后视图，其中 SPE-A 取向显示了构成凹沟表面的中央 α 螺旋的残基，在与肝脏肾小管细胞受体形成的复合物中该凹沟与该受体接触。

图 13 显示了模型化的 SPE-A 三维结构的带状立体图的前视(标准)图。给出了已编排的结构如 β -链和 α -螺旋。标出了结构域 A 和 B。突变残基和某些其他残基的 α 碳原子用球形表示。

发明详述

本发明涉及 SPE-A 毒素突变体及其片段、包含 SPE-A 毒素突变体或其片段的疫苗和药物组合物、制备 SPE-A 毒素突变体及其片段的方法，以及 SPE-A 毒素及其片段的使用方法。

SPE-A 毒素突变体是与基本上对应的野生型 SPE-A 毒素的蛋白质相比，至少有一个氨基酸变化并且其生物功能至少有一个变化的蛋白质。较佳地，在相同剂量下与野生型 SPE-A 毒素相比，SPE-A 毒素突变体基本上不致死。SPE-A 毒素突变体可用各种方法生产，这些方法包括：定点诱变、随机诱变、常规诱变、体外诱变、自发突变和化学合成。SPE-A 毒素突变体宜选择成：1)确保氨基酸中至少有一个变化；和 2)分子生物功能至少有一个变化，较佳的是全身致死率的下降或消除。毒素突变体可用于疫苗组合物，以抵抗 SPE-A 毒素的至少一种生物活性

(如防止或缓和 STSS); 可用于治疗具 STSS 症状的动物的方法; 可用于刺激 T 细胞增殖的方法; 以及用于治疗肿瘤。测试了单突变、双突变或三突变的 SPE-A 突变体, 而针对突变体的抗体可抑制细胞对 SPE-A 的应答。

5 A. SPE-A 毒素突变体或其片段、疫苗和药物组合物

本发明包括 SPE-A 毒素突变体, 与基本上对应于野生型 SPE-A 并有野生型 SPE-A 相同生物活性的蛋白质相比, 它具有至少一个氨基酸变化, 并且其生物活性上至少有一个变化。

10 野生型 SPE-A 毒素由噬菌体 T12 上的基因 *speA* 编码。根据成熟蛋白质的推导氨基酸序列计算, 野生型 SPE-A 毒素的分子量为 25,787 道尔顿。编码野生型 SPE-A 毒素的 DNA 序列和预计的野生型 SPE-A 毒素氨基酸序列示于图 3。编码野生型 SPE-A 毒素的 DNA 序列已被克隆到大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中。本申请中的氨基酸编号是根据图 3 的序列, 并以 31 位谷氨酰胺为第一个氨基酸。前 30 个氨基酸是不存在于成熟蛋白质中的前导序列。

15 野生型 SPE-A 毒素的结构模型示于图 1。该结构模型是用 Insight/Homology 程序(BioSym Corp., San Diego, CA), 通过同源模型建立法构建的。该模型表明, 野生型 SPE-A 毒素有数个清晰的结构特征。这些结构特征包括: 螺旋 2(氨基酸 11-15); N 末端 α 螺旋 3(氨基酸 18-26); 螺旋 4(氨基酸 64-72); 中央- α 螺旋 5(氨基酸 142-158); 螺旋 6(氨基酸 193-202); 结构域 B β 链包括链 1(氨基酸 30-36)、
20 链 2(氨基酸 44-52)、链 3(氨基酸 55-62)、链 4(氨基酸 75-83)、链 5(氨基酸 95-106); 结构域 A β 链包括链 6(氨基酸 117-126)、链 7(129-135)、链 8(氨基酸 169-175)、链 9(氨基酸 180-186)和链 10(氨基酸 213-220)。此外, 位于 87、90 和 98 处的半胱氨酸对于形成假定的二硫键或维持局部三维结构是至关重要的。

25 野生型 SPE-A 毒素有几种生物活性。这些生物活性包括: 1)发热; 2)STSS; 3)由于 STSS 发展或内毒素休克增强而引起的全身性致死; 4)增强内毒素休克; 5)诱导毛细血管渗漏和低血压; 6)诱导细胞因子(如 IFN- γ 、IL-1、TNF- α 和 TNF- β)的释放; 7)与猪主动脉内皮细胞结合; 8)与 MHC II 类分子结合; 9)与 T 细胞受体结合; 和 10)促 T 细胞有丝分裂性(超抗原性)。这些活性可用本领域技术人员已知的方法来分析和定性研究。

30 如本文所用, 定义“野生型 SPE-A 毒素”包括生物活性与野生型 SPE-A 毒素相同的野生型 SPE-A 毒素的变异体。这些 SPE-A 毒素的氨基酸或其基因的核苷酸序列可能与图 3 所示的不同, 但是却没有不同的生物活性。氨基酸序列的改

变在表型上是沉默的。较佳的，这些毒素分子的全身致死性和增强内毒素休克的活性与图 3 所示野生型 SPE-A 毒素的程度相同。较佳的，这些毒素与图 3 所示野生型 SPE-A 毒素氨基酸序列有至少 60-99%的同源性(经 Altschul, S. F., Bull. Math. Bio. 48:603(1986)所述的 SS2 序列对比算法加以确定)。有这些性质的蛋白质基本上对应于野生型 SPE-A。

SPE-A 毒素突变体是与基本上对应于野生型 SPE-A 毒素蛋白质相比，至少有一个氨基酸变化的毒素。该变化可以是氨基酸取代、缺失或插入。在氨基酸序列中可以有一个以上的变化，较佳的有 1 至 6 个变化。较佳地，氨基酸序列中宜有一个以上的变化，从而最大程度地减少 SPE-A 毒素突变体回复成具有全身致死性或毒性的野生型 SPE-A 毒素的可能。对于疫苗中所用的 SPE-A 毒素突变体，较佳的是，毒素氨基酸序列的改变不会改变毒素刺激产生中和野生型 SPE-A 毒素的抗体的应答的能力。对于疫苗中所用的 SPE-A 毒素突变体，尤其优选的是毒素突变体可被针对 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体(如来自 Toxin Technologies, Boca Raton, Fla.或 Dr. Schlivert (University of Minnesota, Minneapolis, MN)的抗体)所识别，并且与野生型 SPE-A 相比，其蛋白质水解图谱没有改变。

氨基酸序列的改变可以是在野生型 SPE-A 毒素一个或多个选定氨基酸残基上的位点特异性改变。通过鉴定分子特定结构域中的残基(如前所述)或半胱氨酸残基所处位置，可选择位点特异性变化。还可通过比较一级序列同源性或三维结构，来确定某位置或结构域中的氨基酸与其它同源分子的等价残基是否相同或有相似性质，从而进一步任意选择特定位置处的位点特异性变化。同源分子是指可通过上述 Altschul 等的 SS2 序列对比算法(同上)、或同源性模型程序(如 BioSym, San Diego, CA 的 Insight/Homology 程序)比较一级序列的同源性而被鉴定的分子。同源分子是指，当与野生型 SPE-A 毒素比较时，显示出明显数量的氨基酸(通常为 30-99%)相同或保守性变化，或有相似的三维结构(通常保守区域的 RMS 误差小于 2 埃)的分子。

可在特定位点处随机改变氨基酸序列，或者可选择特异性变化。一旦选择了特异性位点，就用其氨基酸编号和图 3 所示野生型 SPE-A 中该位点处的氨基酸表示。在本申请中，氨基酸编号以图 3 中 31 位的谷氨酰胺为第一个氨基酸进行编号。与基本上对应的野生型 SPE-A 毒素蛋白质中特定位点所鉴定的那些氨基酸对应的等价氨基酸，可以有不同的氨基酸编号，这取决于参照序列或者它们是否是片段。通过比较一级氨基酸结构、或与图 1 所示模型结构比较、或与同源分子的已知晶体结构比较，在同源分子中也可发现等价残基，它们可被鉴定成与基本对

应的野生型 SPE-A 毒素蛋白质中的氨基酸等价。本发明覆盖了相同或相似位置处的等价氨基酸变化，不论其氨基酸编号是否相同。

如果选择对特异性位点处的氨基酸作特异性取代，则在该位置作取代的氨基酸应包含一个可影响生物活性(与野生型 SPE-A 该位置处的氨基酸相比)的结构变化。取代可以是保守性的或非保守性的。导致结构变化影响生物活性的取代包括：1)从一种类型电荷变成另一种；2)从带电荷变成不带电荷；3)半胱氨酸残基和形成二硫键方面的变化；4)疏水性残基变成亲水性残基，或亲水性残基变成疏水性残基；5)氨基酸大小改变；6)变成构象上限制性氨基酸或类似物；和7)变成非天然存在的氨基酸或类似物。所选特异性取代还可取决于所选位点的位置。例如，N端 α 螺旋中的氨基酸宜有与外露的酰胺氮原子相互作用的羟基，或者它们带有能与N端 α 螺旋中的部分正电荷相互作用的负电荷。

毒素突变体还可包括针对一个或多个特异性位点的随机突变。一旦选出位点，就可用例如 Aiyar 等, *Biotechniques* 14:366(1993)或 He 等, *Gene* 77:51-54(1984)中所述的方法产生在该位点由其它 19 种氨基酸的每一种取代的突变体。利用 Anthony-Cahill 等 *Trends Biochem. Sci.* 14:400(1989)所述的方法，也可通过体外诱变在特定位置用其它 19 种氨基酸的每一种或非天然存在的氨基酸或类似物来取代。

毒素突变体还包括在非特异性选定的、分子的一个或多个位点处有变化的毒素，以及在氨基酸中有变化的毒素，该氨基酸不是特异性选定的，但可以是其它 19 种氨基酸的任一种或非天然存在的氨基酸。

特异性位点处的取代还可包括(但不局限于)非天然存在的氨基酸的取代，该氨基酸例如是 3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、同型半胱氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基庚二酸、鸟氨酸、同型精氨酸、N-甲基赖氨酸、二甲基赖氨酸、三甲基赖氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、羟基赖氨酸、取代的苯丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、 γ -缬氨酸和卤代的酪氨酸。特异性位点处的取代还可包括采用非肽类化学物质的类似物，其包括(但不局限于)酯、醚和磷酰基和硼键。

毒素突变体可用各种方法来产生。那些方法包括定点诱变、采用化学物质(如 EMS、亚硫酸氢钠或 UV 照射)诱变、自发突变、体外诱变和化学合成。诱变方法可在 Sambrook 等, *A Guide to Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, New York(1989)中找到。定点诱变的特别佳的方法是用三个引物的不对称 PCR，如 Perrin 和 Gilliland, 1990. *Nucleic Acid Res.* 18:7433 所述。

一旦产生了一个 SPE-A 毒素突变体，该突变体与基本对应的野生型 SPE-A

毒素蛋白质相比至少有一个氨基酸变化, 则筛选非致死性的 SPE-A 毒素突变体。较佳的是, 当用微型渗透泵(如实施例 2 所述)以相同或高于野生型 SPE-A 毒素的剂量给药时, 从该筛选中选出的 SPE-A 毒素突变体在家兔中是基本上不致死的。如果以相同于野生型毒素的剂量给药时, 少于大约 10-20%的家兔死亡, 则称

5 SPE-A 毒素突变体或其片段是基本上不致死的。不致死的毒素突变体可用于疫苗和药物组合物。尽管不意味着限制本发明, 据信影响全身致死性的一些氨基酸残基或结构域可与其它生物活性(尤其是促 T 细胞有丝分裂性)分开。

对于可用于疫苗组合物的毒素突变体, 更优选的是选出那些可刺激产生抗体应答的 SPE-A 毒素突变体, 其中该抗体应答能中和野生型 SPE-A 毒素活性。选择能刺激中和野生型 SPE-A 毒素活性的抗体应答的毒素突变体的方法是, 测定毒

10 素突变体是否能与野生型 SPE-A 的多克隆中和抗体(如可从 Toxin Technologies, Boca Raton, Fla.或 Dr. Schlievert 获得)发生免疫反应。测定 SPE-A 毒素突变体是否与野生型 SPE-A 毒素抗体起免疫反应的方法包括: ELISA、Western 印迹法、双重免疫扩散试验等。

15 还可任选地筛选毒素突变体, 以确定毒素突变体的蛋白质水解图谱是否与野生型 SPE-A 毒素相同。在一些情况下, 较佳的是, 与野生型 SPE-A 毒素相比, 产生的突变体在整体三维结构上没有显著改变。检查整体结构是否改变的一种方式是, 观察与野生型 SPE-A 毒素抗体的免疫反应性和/或测定 SPE-毒素突变体的蛋白质水解图谱。该蛋白质水解图谱可用酶如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和 V8 蛋白酶, 通过本领域技术人员已知的方法

20 来测定。具有图 3 所示序列的野生型 SPE-A 的蛋白质水解图谱是已知的。可选出曲线与该野生型 SPE-A 相似的突变体。

任选地, 还可筛选和选出生物活性有其它变化的毒素突变体。如上所述, 野生型 SPE-A 毒素有几种生物活性。这些生物活性包括: 1)发热; 2)STSS; 4)增

25 强的内毒素休克; 5)毛细血管渗漏和低血压; 6)诱导细胞因子(如 IFN- γ 、IL-1、TNF- α 和 TNF- β)的释放; 7)与内皮细胞结合; 8)与 MHC II 类分子结合; 9)与 T 细胞受体结合; 和 10)促 T 细胞有丝分裂性(超抗原性)。这些生物活性可用本领域技术人员已知的方法来测定。

对于用于疫苗组合物的 SPE-A 毒素突变体或其片段, 较佳的是它们基本上没有毒性, 并能与野生型 SPE-A 的中和抗体起免疫反应。中和抗体包括在动物中测试时抑制野生型毒素致死性的那些抗体。任选地, SPE-A 毒素突变体在前述野生型 SPE-A 毒素其它生物活性方面还可有一种或多种变化。

30

任选地, 还可对较佳的疫苗组合物用毒素突变体作进一步筛选, 选出不增强内毒素休克的突变体。检查不增强内毒素休克的较佳的试验在实施例 4 中有所描述。在测试前, 家兔最好没有可证明的细菌或病毒感染。当将 SPE 毒素突变体与内毒素共同给药时, 与相同剂量的野生型 SPE-A 活性相比, 少于大约 25% 的动物发生休克时, 则表明不增强内毒素休克或基本上不增强内毒素休克。更佳的是, 没有动物发生休克。

任选地, 还可对较佳的疫苗组合物用突变体进行进一步筛选, 选出促 T 细胞有丝分裂性改变的突变体。通过下列方法可测定促 T 细胞有丝分裂性的变化: 测定家兔淋巴细胞的标准 ^3H 胸苷试验中 T 细胞增殖(如实施例 4 所述); 测定细胞因子(如 $\text{IFN}\gamma$ 或 $\text{TNF-}\beta$)的产生水平; 测定 $\text{V}\beta$ 型 T 细胞反应; 或测定分子与 II 类 MHC 受体的相互作用。检测促 T 细胞有丝分裂性减少的较佳方法是在毒素突变体存在和不存在下测定家兔淋巴细胞的 T 细胞增殖。T 细胞对野生型 SPE-A 毒素的反应大大超过对抗原的正常体外反应。当 SPE-A 毒素突变体刺激的 T 细胞增殖反应不高于抗原或阴性对照刺激的反应, 则可视为促 T 细胞有丝分裂性有显著降低。较佳地, 当用家兔淋巴细胞以与野生型 SPE-A 毒素相同的剂量进行测定时, 可观察到对 SPE-A 毒素突变体的 T 细胞增殖反应降低, 而且降低至不超过背景的两倍。

任选地, 还可对用于疫苗组合物用的 SPE-A 毒素突变体进行进一步筛选, 选出内皮细胞中毛细血管渗漏减少的突变体。较佳的方法是如 Lee 等 *J. Infect. Dis.* 164:711(1991)所述的采用猪主动脉内皮细胞。通过测定放射性标记过的化合物的释放减少或放射性标记过的化合物转运的变化, 就可在 SPE-A 毒素突变体存在下确定毛细血管渗漏的减少。与野生型毒素活性相比, 当放射性标记过的化合物释放或转运减少至低于背景的两倍时, 则视为毛细血管渗漏减少。

尤其佳的疫苗组合物用 SPE-A 毒素突变体在与具有野生型 SPE-A 毒素活性的蛋白质相比时没有生物活性。没有生物活性是指毒素突变体有很少或没有全身致死性、内毒素休克增强和促 T 细胞有丝分裂性。较佳的是, 选用作疫苗组合物的 SPE-A 毒素突变体基本上没有这些生物活性, 即, 它们象阴性对照那样反应或它们刺激出的反应不超过背景的两倍。

其它生物活性变化可如下测得。用 Jardetzky, *Nature* 368:711(1994)所述的方法可检测与 II 类 MHC 分子的结合。给予 SPE-A 毒素突变体后监测温度随时间的变化来检测发热的改变。采用商业上可获得的方法可测定在 SPE-A 毒素突变体的存在下细胞因子产生水平的变化, 这些方法在目前的免疫技术文献中有所描述

(Ed. Coligan, Kruisbeck, Margulies, Shevach,和 Stroker. National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc.).

现在描述具有至少一个氨基酸改变而且基本上无毒性的 SPE-A 毒素突变体的具体例子。

- 5 尤其优选的疫苗组合物用突变体,是与野生型 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体起免疫反应、无毒的 SPE-A 毒素突变体,其还可任选地具有减少的内毒素休克能力和减少的促 T 细胞有丝分裂性。特别优选的突变体在 20 位氨基酸的天冬酰胺处有改变,例如突变体 N20D,它在成熟的毒素的 20 位残基处用天冬氨酸替换天冬酰胺(N20D)。已表明, N20D 突变体是无毒性的,没有增强的内毒素休克而且
- 10 促 T 细胞有丝分裂性下降 5 倍。此外,在 98 位氨基酸的改变,即导致该位置上缺少半胱氨酸,会形成内毒素休克增强的下降且促有丝分裂性下降 4 倍的突变毒素。在该位置的特别优选的突变体是用丝氨酸替换半胱氨酸(C98S)。

- 用于刺激 T 细胞增殖和用于治疗癌症的优选突变体,是基本上不致死的毒素突变体。较佳地,这些毒素突变体保留至少野生型 SPE-A 水平的促 T 细胞有丝分裂性。特别优选的突变体在野生型 SPE-A 的 157 位残基上有氨基酸改变,例如在
- 15 该残基处用谷氨酸替换赖氨酸(K157E)。已表明, K157E 突变体是不致死的,但是保留了与野生型 SPE-A 毒素相当的促有丝分裂性。

- 如下通过改变分子的特定结构域中的氨基酸,可以产生实现功能改变的突变体。野生型 SPE-A 毒素的分子模型示于图 1。特别优选的结构域包括: N-端
- 20 螺旋 3(氨基酸 18-26)、中央 α 螺旋 5(氨基酸 142-158)、结构域 B 的 β 链(氨基酸 33-36; 44-52; 55-62; 75-83; 和 95-106)、结构域 A 的 β 链(氨基酸 117-126; 129-135; 169-175; 180-186; 和 213-220)。87、90 和 98 位的半胱氨酸残基也至关重要。

- 在不对本发明进行限制的情况下,据信这些结构域构成了对野生型 SPE-A 的
- 25 生物学活性至关重要的特异的三维结构。如图 2 所示, N-端 α 螺旋和中央 α 螺旋相互靠近,因而此处的残基对于野生型 SPE-A 分子的毒性可能特别重要。此外,在紧靠中央 α 螺旋的相邻 B 链中的氨基酸,可能对毒性也至关重要。图 1 和 2 所示的分子模型有助于鉴别结构域的表面残基和包埋残基。

- 对于疫苗组合物,改变宜发生在 N 末端 α 螺旋 3(残基 18-26),然后进行筛选
- 30 和选择,从而降低全身致死性或内毒素增强或促 T 细胞有丝分裂性,或者同时降低三者。

在 N 末端 α 螺旋 3 发生改变的一个具体例子,是在 20 位氨基酸残基处的改

变。在该残基处将天冬酰胺改为天冬氨酸可导致内毒素休克增强的下降、全身致死性的下降以及促有丝分裂性下降 5 倍。在 20 位残基处的其他变化较佳地可改变表面残基电荷分布, 或者可改变 N 末端 α 螺旋与中央 α 螺旋的相互作用。在 20 位氨基酸处用带电荷的氨基酸(如谷氨酸、赖氨酸、精氨酸)进行取代, 会具有相同的效果。在该区域的改变, 较佳地可降低因 STSS 而导致的全身致死性。

较佳地, 还可在中央 α 螺旋 5 的残基 142-158 中进行改变。为了降低 STSS 所导致的全身致死性, 宜选择在该区域有至少一个氨基酸改变的突变体。已表明, 在其他毒素分子中所鉴别的类似中央 α 螺旋与毒性相关。一个具体的例子是在 157 残基处的改变。在该残基处将赖氨酸改为谷氨酸, 可导致内毒素休克增强的下降以及由 STSS 所导致的全身致死性的下降。

然而, 促 T 细胞有丝分裂性并不受该残基处改变的影响。这些结果表明, 毒性和内毒素休克增强是与促 T 细胞有丝分裂性相互分离的活性。对于疫苗组合物, 为了减低促 T 细胞有丝分裂性, 可任选地对该区域有改变的其他突变毒素进行筛选和选择。在 157 位氨基酸处电荷类型的改变表明, 用天冬氨酸替换赖氨酸可能有类似效果。

为了非致死性, 以及任选地为了内毒素休克增强的下降和/或促 T 细胞有丝分裂性的下降, 宜筛选和选择在结构域 B β 链中的改变, 其中包括残基 30-36(β 链 1)、残基 44-52(β 链 2)、残基 55-62(β 链 3)、残基 75-83(β 链 4)、残基 95-106(β 链 5)(结构域 5)。已表明, 在数种毒素(如 SEB、SEA、TSST-1)中构成 N 端 β -折叠桶的多个残基, 对于与 II 类 MHC 分子发生结合是至关重要的。突变毒素与 II 类 MHC 的结合力的下降, 还可通过测试方法(例如 Jardetzky 等人的方法(同上))来选择。选择在这些残基处的改变, 使其可破坏 β 折叠结构、或改变与 II 类 MHC 分子相接触的残基(尤其是位于 β 折叠桶的凹表面的残基), 参见图 1。对于疫苗组合物, 这些改变局部结构的变化, 宜不改变突变毒素与抗野生型 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体之间的免疫反应性。

较佳地, 可选择结构域 A β 链的改变以使其不致死、内毒素休克下降和/或促 T 细胞有丝分裂性下降, 其中包括残基 117-126(结构域 β 链 6)、残基 129-135(结构域 7)、残基 169-175(结构域 8)、残基 180-186(结构域 9)和残基 213-220(结构域 10)。较佳地, 所选择的残基变化可改变 β 折叠结构而不改变 SPE-A 突变毒素与抗野生型 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体之间的免疫反应性。

叠加四个葡萄球菌超抗原(TSST-1、SEA、SEB 和 SEC-3)以及 SPE-A 的三维结构后, 表明这些蛋白质共享 18 个结构上保守的氨基酸(表 A)。用这 18 个结

构上保守的氨基酸残基作为参照点,能使这 5 个蛋白质结构重叠的 RMS(均方根)差小于等于 2 埃,这对于有最小氨基酸序列保守的蛋白质是明显的。这种根据 18 个结构上保守的氨基酸进行的重叠使得能够详细比较 SPE-A 与葡萄球菌超抗原的结构。

5 葡萄球菌超抗原 SEB 和 II 类主要组织相容性复合体(MHC-II)的复合物晶体结构表明,与 MHC-II 接触的 SEB 上的氨基酸,它们包括列在表 B 中的那些残基。将 SPE-A 结构的加以叠加后,显示了在这两种蛋白质的复合物中与 MHC-II 接触(与残基接触或与区域接触)的 SPE-A 氨基酸的位置。这些位置在图 10 中以小球表示。

10 具体地,图 10 显示了带有 B 结构域 2 的 SPE-A 1,它是由多种链(strand)和环(loop)所构成的,其中 B 结构域 2 含有 β -桶 3。位置 4-7 在链 8 上。位置 4 所处的距离相当于距链 8 羧基端约 3 个氨基酸,该羧基端是链 8 和环 9 的接头;位置 4 正好位于链 8 转角的下方(按图 10 所示的方向)。位置 4 可被极性氨基酸占据,较佳地是 SPE-A 的 Asn-49。位置 5 靠近链 4 的中央,可以被疏水氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Ile-47。在位置 5 和 6 之间有约 1 个氨基酸的间隔。位置 6 可以被疏水氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Leu-41。位置 7 是链 8 的氨基端。位置 7 可以被疏水氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Leu-42。

位置 10-12 位于链 13 的 β 桶 3 上。位置 10 距离环 9 和链 13 的接头处约 3 个氨基酸,并且在位置 10 和该接头之间有一转角。位置 10 可以被带电荷的氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Lys-57。位置 11 靠近链 13 的中央,它可以被带电荷的氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Lys-58。位置 11 靠近位置 5。位置 12 最接近环 14 和链 13 之间的接头但位于链 13 上,它可以被带电荷的氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Glu-61。位置 53 位于链 13 和环 14 的接头处。位置 13 可以被疏水氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Leu-62。

25 位置 15、16 和 17 位于环 18 上。位置 15 在环 18 上,所处的位置是环 18 穿过链 8 和 13 所确定的平面的地方。位置 15 靠近 α 螺旋 25 的中央转角 26。位置 15 可以被不带电荷或极性的氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Ser-43。位置 16 位于环 18 上,所处位置是环 18 从链 8 上升起的地方,如图 10 所示。位置 16 可以被极性氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 His-44。位置 17 在环 18 上并靠近位置 6 和 5。位置 17 可以被极性氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A 的 Gln-40。

位置 19-21 在环 22 上。这些位置被约一个氨基酸所隔开。位置 19 和 20 约在环 22 长度的中间。位置 19 可以被中性或极性的氨基酸所占据,较佳地是 SPE-A

的 Cys-90。位置 20 可以被中性或极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Tyr-88。位置 21 可以被疏水氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Leu-86。

位置 23 位于 α -螺旋 24 上，在最靠近螺旋 24 和环 18 的接头处的转角中。位置 23 可以被极性氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 His-44。

- 5 葡萄球菌 SEC-与 T 细胞受体的复合物的晶体结构显示了 SEC-3 上与 T 细胞受体接触的氨基酸，其中包括表 C 中列出的残基。将 SPE-A 结构叠加后，表明了 SEC-3 上与这两种蛋白质的复合物中 T 细胞受体接触的氨基酸。这些位置在图 11 中以球状表示。

- 10 具体参照图 11，其中包括上面描述过的位置 10-12。位置 27-30 位于环 22 上。每个位置都与前一位置相邻。位置 30 位于环 22 和链 31 的接头处。位置 27 可以被极性氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Asn-92。位置 28 可以被中性氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Ala-93。位置 29 可以被带电荷的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Glu-94。位置 30 可以被带电荷的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Arg-95。

- 15 位置 32 位于链 9 上，约处于链 9 的中间。位置 32 可以被极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Asn-54。位置 33 位于环 22 和链 34 的接头处。位置 33 可以被极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Tyr-84。位置 35 位于环 22 上，与位置 33 相邻。位置 35 可以被极性氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 His-85。

- 20 位置 36-40 处于 N 末端 α -螺旋 41 中。位置 36 在 N 末端 α -螺旋 41 的环 42 上。位置 36 距离 N 末端 α -螺旋 41 与环 44 之间的接头 1 个残基。位置 37-40 在 N 末端 α -螺旋 41 的环 43 上的位置是相邻的。位置 36 可以被疏水氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Phe-23。位置 37 可以被极性氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Asn-20。位置 38 可以被极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Gln-19。位置 39 可以被疏水氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Leu-18。位置 40 可以被极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Asn-17。

位置 45 和 46 在靠 N 末端 α -螺旋 41 转角 43 的环 47 区域中。位置 45 可以被极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Tyr-160。位置 46 可以被极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Asn-162。位置 45 和 46 被约 1 个氨基酸残基所隔开。

- 30 SPE-A 与肝肾小管受体之间的相互作用，包括图 12 所示的与中央 α 螺旋 48 的相互作用。对于与肝受体的相互作用至关重要的中央 α 螺旋 48 上位置，包括位置 49-54。位置 49-55 界定了构成 SPE-A 结构中的凹沟基底的中央 α 螺旋 45 表面。

位置 49-54 是该表面上优选的位置。位置 49 和 51 可以被极性的氨基酸所占据。

位置 50 和 52-54 可以被带电荷的残基所占据。较佳地，位置 49 是 Asn-156，位置 50 是氨基酸 Asp-55，位置 51 是氨基酸 Tyr-152，位置 5 是氨基酸 Lys-151，位置 53 是氨基酸 Lys-148，或位置 54 是氨基酸 Glu-144。更佳的位置是 50、51、53 和 54，它们在由位置 49-55 所界定的表面上占有最大比例的位置。位置 55 靠近环 56 和中央 α 螺旋 45 的接头处。位置 55 可以被中性或极性的氨基酸所占据，较佳地是 SPE-A 的 Thr-141。

表 B 列出了在 SEB 和 II 类 MHC 这两个蛋白质的复合物晶体结构中，与 II 类 MHC 相互作用的 SEB 残基。将 SEC-3、SEA 和 TSST-1 的结构与 SEB：MHC-II 复合物的结构叠加后，显示了这些蛋白质中的，与和 MHC-II 相作用的 SEB 氨基酸残基相对应的残基，其中包括表 B 中所示的这些蛋白质的残基。较佳的 SPE-A 突变体包括 SPE-A 残基的取代，而该残基对应于 SEB、SEC-3、SEA 或 TSST-1 中与 MHC-II 相互作用的残基。这些较佳的 SPE-A 残基包括表 B 中所列出的 SPE-A 残基。该表的列中列出了不同蛋白质的对应残基。

表 C 列出了在 T 细胞受体和 SEC-3 这两个蛋白质的复合物晶体结构中，与 T 细胞受体作用的 SEC-3 残基。将 SEC-3、SEA 和 TSST-1 的结构与 SEB：T 细胞受体复合体的结构叠加，其结果表明了这些蛋白质中的，和与 T 细胞受体相互作用的 SEB 的残基相对应的氨基酸，其中包括了表 C 中所示的残基。较佳的 SPE-A 突变体包括 SPE-A 残基的取代，而该残基对应于 SEB、SEC-3、SEA 或 TSST-1 中与 T 细胞受体相互作用的残基。这些较佳的 SPE-A 残基包括表 C 所列出的 SPE-A 残基。该表的各行中列出了不同蛋白质的对应残基。

较佳的 SPE-A 突变体，在与 T 细胞受体、MHC-II 或肝肾小管细胞受体作用的至少一个位置或至少一个氨基酸残基上有氨基酸取代。这些氨基酸取代可如上述进行选择，以破坏相互作用。

表 A
PTSAG 保守残基

TSST-1	SEA	SEB	SEC-3	SPE-A
TYR 13	TYR 30	TYR 28	TYR 28	TYR 25
ASP 27	ASP 45	ASP 42	ASP 42	ASP 39
LYS 58	LYS 81	LYS 78	LYS 78	LYS 72
VAL 62	VAL 85	VAL 82	VAL 82	VAL 76
ASP 63	ASP 86	ASP 83	ASP 83	ASP 77
GLY 87	GLY 110	GLY 117	GLY 114	GLY 102
THR 89	THR 112	THR 119	THR 116	THR 104
LYS 121	LYS 147	LYS 152	LYS 151	LYS 137
LYS 122	LYS 148	LYS 153	LYS 152	LYS 138
LEU 129	LEU 155	LEU 160	LEU 159	LEU 145
ASP 130	ASP 156	ASP 161	ASP 160	ASP 146
ARG 134	ARG 160	ARG 162	ARG 161	ARG 150
LEU 137	LEU 163	LEU 168	LEU 167	LEU 153
LEU 143	LEU 169	LEU 171	LEU 170	LEU 159
TYR 144	TYR 170	TYR 172	TYR 171	TYR 160
GLY 152	GLY 182	GLY 185	GLY 184	GLY 170
ASP 167	ASP 197	ASP 199	ASP 199	ASP 185
ILE 189	ILE 226	ILE 230	ILE 230	ILE 214

表 B
在 II 类 MHC 相互作用中所涉及的残基

SEB	TSST-1	SEA	SEC-3	SPE-A
Gln 43	Asn 28	Gln 46	Lys 43	Gln 40
Phe 44	Ser 29	Phe 47	Phe 44	Leu 41
Leu 45		Leu 48	Leu 45	Leu 42
Tyr 46	Leu 30	Gln 49	Ala 46	Ser 43
Phe 47	Gly 31	His 50	His 47	His 44
				Asp 45
Gln 92	Lys 71	Gln 95	Asn 92	Leu 86
Tyr 94	Gln 73	Ala 97	Tyr 94	Tyr 88
Ser 96		Gly 99	Ser 96	Cys 90
Met 215	Asn 175	Arg 211	Met 215	Met 199

表 C
在 T 细胞受体相互作用中所涉及的残基

5

TSST-1	SEC-3	SEA	SPE-A	SEB
ASN 5	GLY 19	THR 21	ASN 17	GLY 19
	THR 20	ALA 22	LEU 18	LEV 20
ASP 8	ASN 23	ASN 25	ASN 20	ASN 23
ASP 11	TYR 26	GLN 28	PHE 23	VAL 26
	ASN 60		ASN 54	
LYS 70	TYR 90	GLY 93	TYR 84	TYR 90
	VAL 91	TYR 94	HIS 85	TYR 91
	GLY 102		ASN 92	
	LYS 103		ALA 93	
	VAL 104		GLU 94	
	SER 106	LYS 103	ARG 95	
ARG 145	PHE 176	ASN 171	ASN 162	TYR 175
	GLN 210	SER 206	GLN 194	GLN 210

可以选择改变半胱氨酸残基或引入二硫键的 SPE-A 毒素突变体, 它们的致死性下降, 或者可任选地存在内毒素休克增强的下降和/或促 T 细胞有丝分裂性的下降。一种具体的例子是在 98 位半胱氨酸处的改变。在该残基处将半胱氨酸变为丝氨酸, 所形成的毒素突变体其促有丝分裂性下降约 4 倍, 且内毒素休克增强下降以及因 STSS 致死性也下降。在 98 位残基处消除半胱氨酸基团, 这一改变会与用丝氨酸替换相类似的方式影响生物活性。在 98 位残基处还可进行的其他变化包括: 用其他小脂族残基如丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸进行替换。改变位于 90 和 97 位氨基酸残基处的其他半胱氨酸残基, 会导致促有丝分裂性的下降。

有利的是, 用于治疗方法的 SPE-A 毒素突变体可制成其氨基酸序列中有一个以上的变化。希望在一个以上的位置有变化, 以使回复成具有毒性或致死性分子的可能性最小。对于疫苗组合物, 希望具有多个变化的突变体仍能产生抗野生型 SPE-A 的保护性免疫应答和/或与野生型 SPE-A 的多克隆中和抗体起免疫反应。对于药物组合物, 较佳的是, 具有多个变化的突变体基本上是不致死的, 并同时维持了 T 细胞的促细胞有丝分裂性。尤其佳的是具有大约 2 至 6 处变化。这样的突变体的例子包括具有 N20D 突变的突变体, 其中包括双突变体例如 N20D/K157E、N20D/C98S, 三重突变体如 N20D/D45N/C98S 等。双突变体 N20D/C98S 已保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 保藏号为 No. 55821。双突变体 N20D/C98S 已保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 保藏号为 No. 55822。三重突变体 N20D/D45N/C98S 已保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 保藏号为 No. 55993。

双突变体 SPE-A 可提供优于单突变体的优势。这在实施例 6 中详细描述 3 个试验中加以评估。结果示于图 7-9。数据显示, N20D/C98S 突变体的毒性比 N20D 单突变体更低, 而 N20D/K157E 双突变体介于其他两种蛋白中间。所有 3 种突变体的毒性都明显低于野生型 SPE-A。来自用单或双突变体免疫的兔的血清, 可抑制对应于非突变 SPE-A 毒素的淋巴细胞增殖。淋巴细胞增殖与毒素的全毒性相关并且是全毒性所必需的。

如实施例 7 所述, 对动物进行抗 N20D、N20D/C98S 或 N20D/K157E 免疫。结果示于表 9。用任一种双突变体免疫的动物得到了完全的保护, 从而避免发热和对内毒素休克的易感性的增强。

三重突变体也在本申请的构思之中, 在一个例子中, 用此处所公开的引物和实施例 1-7 的方法和测试手段, 测试了 SPE-A 突变体 N20D/C98S/D45N。

还可优选地在特定的位点缺失残基, 例如缺失氨基酸残基 20 位处的天冬酰胺

胺和/或缺失氨基酸 157 位的赖氨酸或 98 位的半胱氨酸。对于疫苗组合物，可以选择缺失突变体，而这些缺失突变体可与针对野生型 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体发生免疫反应，和/或能够激发针对野生型 SPE-A 活性的保护性免疫应答。

- 5 SPE-A 突变毒素可用于制备疫苗组合物。较佳的疫苗组合物突变体具有至少一个氨基酸变化，没有全身毒性，并且能与针对野生型 SPE-A 的多克隆中和抗体起免疫反应。特别优选的突变体包括：在 20 位氨基酸处有改变的 SPE-A 毒素突变体，例如 N20D、N20D/K157E、N20D/C98S，以及在残基 20 位处缺失天冬酰胺的突变体。

- 10 毒素突变体可与生理上可接受的载体相混合。生理上可接受的稀释剂包括生理盐溶液和在中性 pH 下的缓冲盐溶液，如磷酸缓冲溶液。其它类型的生理性载体包括脂质体或聚合物等。任选地，突变体毒素可以与佐剂(如 Freund's 不完全佐剂、Freund's 完全佐剂、明矾、单磷酸类脂 A、磷酸铝或氢氧化铝、QS-21 等)相混合。任选地，毒素突变体或其片段可以与免疫调节剂如白细胞介素、干扰素等混合。许多疫苗配方是本领域技术人员已知的。

- 15 在疫苗配方中加入有效量的 SPE-A 毒素突变体或其片段，以在动物体内刺激出针对野生型 SPE-A 毒素至少一种生物活性的保护性免疫应答。保护性免疫应答的产生可通过抗体(较佳的是中和野生型 SPE-A 毒素的抗体)的产生来测定。野生型 SPE-A 毒素的中和可用包括抑制野生型 SPE-A 在动物体内致死性的方法来测定。此外，通过测定至少一种野生型 SPE-A 毒素生物活性的减少(如内毒素休克增强的症状或 STSS 的改善或消除)，可测知有无保护性免疫反应。可形成保护性免疫应答的毒素突变体的量约为每千克体重 0.1 微克至 100 毫克，更佳的每千克体重约为 1 微克至 100 微克。约 25 微克/千克体重的野生型 SPE-A 毒素用量可有效地诱导家兔中的保护性免疫力。
- 20

疫苗组合物可给予动物如家兔、啮齿类动物、马和人。较佳的动物是人。

- 25 SPE-A 毒素突变体还可制成药物组合物。药物组合物可用于需要刺激 T 细胞增殖的治疗场合，例如在肿瘤治疗中。较佳的 SPE-A 毒素突变体，是不致死但维持了与野生型 SPE-A 毒素相当的促 T 细胞有丝分裂性的那些突变体。优选的突变体是那些在野生型 SPE-A 毒素的残基 157 位的赖氨酸处发生改变的突变体。例如 K157E。

- 30 药物组合物可通过混合 SPE-A 毒素突变体和生理上可接受的载体(如生理盐溶液、中性 pH 缓冲盐溶液，如磷酸缓冲盐溶液)来制得。SPE-A 毒素突变体构成组合物时的用量，应有效刺激出与相同剂量野生型 SPE-A 毒素相当的 T 细胞增

殖。通过家兔淋巴细胞的标准³H 胸苷试验、和荧光激活 T 细胞分选仪测定体内 T 细胞种群或用诸如 ELISPOT 的试验，可测定 T 细胞应答性的增强。有效量还可以是能够有效缓和/或减缓癌细胞生长的量。这可以通过测量 SPE-A 突变毒素对体内癌细胞生长的影响，或者通过测量癌症-特异性 T 细胞的刺激作用而加以确定。有效量的范围为每千克体重 100 纳克至 100 毫克，更佳的每千克体重 1 微克至 1 毫克。约 10⁻⁶ 微克野生型 SPE-A 毒素可刺激增强的 T 细胞反应性。例如，这些 SPE-A 毒素突变体可单独使用或与白细胞介素或干扰素治疗结合。

本发明还包括 SPE-A 毒素片段和 SPE-A 毒素突变体的片段。对于疫苗组合物，这些片段宜足够大以刺激产生保护性免疫应答。B 细胞表位的大小最小约为 4-7 个氨基酸，对于 T 细胞表位，最小约为 8-12 个氨基酸。野生型 SPE-A 总共有大约 251 个氨基酸(包括前导序列在内)。这些片段是约有 4 至 250 个氨基酸的肽，更佳的约有 10-50 个氨基酸。

片段可以是单个肽，或包括不同位置连接在一起的肽。较佳的，片段包括图 1 所示和上面所述的一个或多个结构域。另外，当与基本上对应的野生型 SPE-A 毒素蛋白质比较时，较佳的 SPE-A 毒素突变体片段的氨基酸序列中有至少一个变化，更佳的，氨基酸序列中有 1 至 6 个变化。

较佳的，这些片段基本上没有全身致死性。对片段进行筛选，选出在剂量相同或高于具有野生型 SPE-A 毒素活性的蛋白质时、用微型渗透泵模型在家兔中有很少或没有毒性的突变体(如上所述)。当给予相当于野生型 SPE-A 毒素的剂量时，在人体内没有毒性的片段也是较佳的。

对于疫苗组合物，片段宜包括中央 α 螺旋和/或 N 端 α 螺旋的残基。特别优选的是，该片段在相当于野生型 SPE-A 毒素的 20 位残基处有氨基酸残基的变化(例如 N20D)，或者在相当于野生型 SPE-A 毒素的 98 位残基处有氨基酸残基的变化。

对于疫苗组合物，较佳的是片段刺激产生了抗具有野生型 SPE-A 毒素活性的蛋白质的中和抗体反应。可对片段进行筛选，选出与针对野生型 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体起免疫反应的片段。片段还可用来对动物免疫接种，形成的抗体经测试应能中和野生型 SPE-A 毒素。

对于疫苗组合物，还可筛选出尤其佳的没有生物活性的片段。没有生物活性是指该片段没有全身致死性、引起的内毒素休克增强很少或没有、以及引起的 T 细胞刺激很少或没有。任选地，可对片段进行筛选，选出对猪内皮细胞有毛细血管渗漏作用减少的片段。

筛选和选择用于疫苗组合物的片段可以结合入疫苗组合物中并如上所述那

样使用。任选地，片段可以与载体分子(如牛血清白蛋白质、人血清白蛋白质、匙孔絨血蓝蛋白质、破伤风类毒素等)结合。

对于药物组合物，该片段宜包括单独的 N-端 B 结构域 β 链 1-5 中的氨基酸残基或与中央 α 螺旋组合的残基。特别优选的是，该片段在相当于野生型 SPE-A 毒素的 157 位氨基酸赖氨酸处有氨基酸残基的变化，如 K157E。

对于药物组合物，宜对这些片段筛选，选出没有全身致死性，以及任选地内毒素休克增强很少或没有(如上所述)的片段。片段宜保留类似于野生型 SPE-A 毒素的促 T 细胞有丝分裂性。SPE-A 毒素突变体的片段可如上所述那样制成药物组合物。

10 SPE-A 毒素突变体的片段可用 PCR、限制性酶消化和/或连接、体外诱变和化学合成来制得。对于较小的片段来说，化学合成也许是理想的。

SPE-A 毒素突变体片段可用于关于 SPE-A 毒素突变体所描述的相同的组合物和方法中。

15 B. SPE-A 毒素突变体、疫苗组合物或药物组合物的使用方法

SPE-A 毒素突变体和/或其片段可用来保护动物抵抗野生型 SPE-A 毒素的作用、改善或治疗患 STSS 的动物、诱导增强的 T 细胞增殖和应答、以及治疗或改善癌症症状。

一种保护动物抗野生型 SPE-A 毒素的至少一种生物活性的方法，该方法涉及
20 步骤：向动物给予疫苗组合物以建立抗 SPE-A 毒素至少一种生物活性的保护性免疫应答。保护性免疫应答宜为中和与保护以抗致死性或 STSS 症状。疫苗组合物宜包括具有至少一个氨基酸变化的 SPE-A 毒素突变体或其片段，该突变体或其片段可与野生型 SPE-A 的多克隆中和抗体起免疫反应，并且不致死。特别优选的突变体在 20 位氨基酸残基天冬酰胺处发生改变，例如突变体 N20D、或 N20D/K157E
25 或 N20D/C98S。

疫苗组合物可以各种方式给予动物，包括皮下、肌肉、静脉内、经皮、口服、鼻内、眼内、腹膜内等方式。较佳的给药途径是肌肉给予。

疫苗组合物可给予各种动物，包括家兔、啮齿类动物、马和人。较佳的动物是人。

30 疫苗组合物可单剂量或多剂量给药直至建立起抗野生型 SPE-A 的至少一种生物活性的保护性免疫力。保护性免疫力可通过用标准方法测定野生型 SPE-A 的中和抗体的存在来检测。给予有效量，以建立起保护性免疫力而不产生显著的毒

性。

SPE-A 毒素突变体或其片段也可用来产生与 SPE-A 毒素突变体和野生型 SPE 毒素发生免疫反应的中和抗体。这些抗体可用作被动免疫血清来治疗或改善患有 STSS 症状的患者体内的症状。上述疫苗组合物可给予动物(如马或人),直至产生抗野生型 SPE-A 的中和抗体。然后可收获这些中和抗体、纯化,并用来治疗具有 STSS 症状的患者。抗野生型 SPE-A 毒素的中和抗体还可由野生型 SPE-A 制成。然而,给予野生型 SPE-A 的剂量必须大大低于诱导出毒性的剂量,例如为野生型 SPE-A 在家兔中的 LD50 的 1/50 至 1/100。

向表现出 STSS 症状(例如发热、低血压、A 族链球菌感染、肌炎、筋膜炎和肝脏损伤)的患者给予有效量的中和抗体,以中和 SPE-A 毒素的作用。中和抗体可通过静脉内、肌内、经皮、皮下等方式给药。较佳的途径是静脉内给药,或对于局部化感染是在组织损伤部位局部进行清创。中和抗体也宜与抗生素治疗结合给药。中和抗体可单剂量或多剂量给予直至使休克或组织损伤减少。通常给予的中和抗体较佳的量约为 1 至 1000 毫克/千克(体重),更佳的约为 50-200 毫克/千克体重。

SPE-A 毒素突变体和/或其片段还可用于刺激 T 细胞增殖的药物组合物中,尤其在肿瘤治疗中。特别优选的是,这些药物组合物可替换目前的使用白细胞介素、干扰素或肿瘤坏死因子的肿瘤疗法,或者与目前的疗法联合使用。SPE-A 毒素突变体还可用于治疗 T 细胞淋巴瘤、卵巢癌和子宫癌。在不限制本发明的情况下,据信 SPE-A 毒素突变体对 T 淋巴瘤有选择性的毒性。

药物组合物含有不致死同时又保留促 T 细胞有丝分裂性的 SPE-A 毒素突变体和/或其片段。优选的 SPE-A 毒素突变体是在 157 位氨基酸残基赖氨酸处有变化(例如 K157E)的突变体。

药物组合物可通过静脉内、肌内、经皮、口服、腹腔内或皮下等方式向癌症病人给药。较佳的途径是静脉内给药,药物组合物可以单剂量或多剂量地施用。药物组合物的施用量可有效地刺激更强的 T 细胞增殖应答和/或减缓癌症的生长,但基本上没有毒性。优选的量为 100 纳克至 100 毫克/千克(体重),更佳的约为 1 微克-1 毫克/千克体重。特别优选的是 SPE-A 突变体的药物组合物与使用白细胞介素、干扰素或肿瘤坏死因子的肿瘤疗法联合使用,或者替换使用。

30

C. 编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 表达盒和该 DNA 表达盒的制备方法

本发明还包括用于表达 SPE-A 毒素突变体和/或其片段的 DNA 序列和表达

盒。表达盒包括：编码 SPE-A 毒素突变体或其片段的 DNA 序列，以及与其操作性相连的在宿主细胞中起作用的启动子，其中所述突变体或其片段与基本对应野生型 SPE-A 毒素的蛋白质相比至少有一个氨基酸变化和至少一种生物功能变化。将表达盒插入转化载体中并在转化细胞中生产 SPE-A 毒素突变体。然后可从宿主细胞或宿主细胞上清液中纯化获得毒素突变体。转化的宿主细胞也可用作疫苗组合物。

SPE-A 毒素突变体或其片段也可通过类似定点或随机诱变的方式筛选和选择自发突变体来制得。SPE-A 毒素突变体可用体外诱变或从某步骤产生的片段以半合成法来制得。最后，SPE-A 毒素突变体可用化学合成方法来制得。

生产 SPE-A 毒素突变体或其片段的方法包括，用包括该表达盒的载体转化或转染宿主细胞，在允许宿主细胞表达该 SPE-A 毒素突变体或其片段的条件下培养宿主细胞。

编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列

根据所选的变化类型，可用各种方法来制得编码氨基酸序列至少有一个变化的 SPE-A 毒素突变体的突变型 DNA 序列。将编码基本对应野生型 SPE-A 毒素功能的蛋白质的 DNA 序列作为模板 DNA 来制得编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列。编码野生型 SPE-A 毒素的 DNA 序列如图 3 所示，并且已保藏在 ATCC 保藏号 69830 的微生物中。

为了作特定变化或在一个或数个特定位置变化，较佳的是根据 Perrin 等(前述)的方法采用 PCR。为了使变化靶向特定的位置，混合物中包括了编码该氨基酸变化的改变的核苷酸的内部引物以及 5'和 3'侧接引物。5'侧接引物与野生型 SPE-A 编码序列翻译起始位点上游 DNA 区域同源或杂交。较佳的，5'侧接区域在 *speA* 启动子和调节区域的上游。例如，5'侧接引物可以与翻译起始位点上游约 760 碱基处的区域同源或杂交，如图 2 所示。一种包含上游调控区域中的 SPE-A 启动子的 5'侧引物具有如下序列：

5' GGT GGA TTC TTG AAA CAG

BamH1

GTG-3'(SEQ ID NO:1).

下游侧接引物与野生型 SPE-A 编码序列终止密码子下游的 DNA 区域同源或杂交。下游侧接引物宜提供转录和翻译终止信号。例如，3'侧接引物可以与 SPE-A 编码序列终止密码子下游 200 碱基对的区域杂交或同源。一种 3'侧引物例子具有

如下序列:

5' CCC CCC GTC GAC GAT AAA ATA GTT GCT

SalI

AAG CTA CAA GCT-3'(SEQ ID NO:2)

5

每次PCR反应中均存在上游和下游侧接引物,以确保所得PCR产物包括 *speA* 启动子和上游调节区、转录和翻译终止信号。本领域技术人员也很容易构建出其它上游和下游引物。天然的 *speA* 启动子和上游调节区没有绝对必要被包括在PCR产物内,尽管这是较佳的。

10 每种在特定位点处的突变是通过使用内部引物而产生的,该内部引物含有编码特定残基变化的DNA序列。例如,在特定位点的氨基酸取代可用下列内部引物来产生:

突变体	内部引物
N20D	5' AAA AAC CTT CAA GAT ATA TAT TTT CTT - 3'(SEQ ID NO:3)
C87S	5'-TCC-ACA-TAA-ATA GCT GAG ATG GTA ATA- TCC-3'(SEQ ID NO:4)
C90S	5'-CTC TGT TAT TTA TCT GAA AAT GCA GAA-3' (SEQ ID NO:5)
C98S	5' CCC TCC GTA GAT CGA TGC ACT CCT TTC TGC-3' (SEQ ID NO:6)
K157E	5'-CTT ACA GAT AAT GAG CAA CTA TAT ACT-3' (SEQ ID NO:7)
S195A	5'-CCA GGA TTT ACT CAA GCT AAA TAT CTT ATG- 3' (SEQ ID NO:8)
K16N	5'- CAA CTT CAC AGA TCT AGT TTA GTT AAC AAC CTT-3' (SEQ IDNO:9) (正向引物)和 5'- T TTG AAG GTT GTT AAC TAA ACT AGA TCT GTG AAG TTG-3' (反向引物)(SEQ ID NO:10)

带下划线的核苷酸表示, 与图3所示的野生型*speA*基因相比, 核苷酸序列的变化。

内部引物可设计成利用编码野生型 SPE-A 的 DNA 序列(如图 3 所示的序列)在某特定位置产生变化。引物可被设计成在某特定位置(例如上面所示的)处编码一个特定的氨基酸取代。引物可设计成使得在特定位点产生随机取代, 如 Rennell 等, J. Mol. biol. 22:67(1991)中所述。引物可被设计成在特定位点处产生氨基酸缺失。引物还可被设计成使特定位点中加入一个额外氨基酸的编码序列。

引物宜约为 15 至 50 个核苷酸长, 更佳的约 15 至 30 个核苷酸长。引物宜用自动化合成制得。5'和 3'侧接引物宜与编码野生型 SPE-A 毒素编码序列的侧接 DNA 序列杂交。这些侧接引物宜包括约 10 个与侧接 DNA 序列 100%同源或互补的核苷酸。内部引物并不与编码该位置氨基酸的 DNA 序列 100%互补, 因为它们编码了该位置的变化。内部引物在约 15 至 30 个核苷酸长的引物内可以有与野生型 SPE-A 序列不同的 1 至 4 个不匹配。此二侧接引物和内部引物还包括编码限制性位点和夹子位点的其它核苷酸, 最好靠近引物的末端。根据已知的原理(如 Sambrook 等, Molecular Cloning-A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 中所述的), 可结合考虑引物中的不匹配数目来改变杂交条件。

如果希望在多个位点上变化, 则可采用多个内部引物。例如, 为了产生在改变氨基酸 20 位天冬酰胺和改变氨基酸 157 位处的赖氨酸, 可以如实施例 5 中所示的那样在两个独立的反应中使用上述的内部引物。在 Aiyar 等人的文献(同上)中描述了在多个位点上产生位点特异性变化的 PCR 方法。另一种方法在实施例 5 中有所描述。

在一种方法中, 获得在一个特定位点有一个变化的编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列, 然后将其作为模板, 以产生在第二个位点有改变的突变型 DNA 序列。在 PCR 的第一轮中, 采用第一内部引物来产生具有第一个变化的突变型 DNA 序列。然后将具有第一个变化的突变型 DNA 序列作为模板 DNA, 用编码不同位点有变化的第二内部引物, 形成编码氨基酸序列中两个位置有改变的突变型毒素的 DNA 序列。可用 PRC 方法来产生编码氨基酸中有大约 2 至 6 个变化的 DNA 序列。

Perrin 等(同上)描述了一种较佳的 PCR 方法。简言之, PCR 反应条件是: PCR 在 100 微升反应混合物中进行, 该混合物含有 10mM Tris-HCl(pH=8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、dNTP 各 200μM、2ng 模板质粒 DNA、100 微微摩尔侧接引物、5 微微摩尔内部引物、2.5 单位 Ampli Taq DNA 聚合酶(Perkin

Elmer Cetus)。在第二次扩增步骤中，反应混合物的组成如上所述，只是采用了等摩尔浓度(每种 5 微微摩尔)的侧接引物和巨引物(megaprimer)和 1 μ g 模板。PCR 进行 30 次循环，每次循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟、37 $^{\circ}$ C 或 44 $^{\circ}$ C 退火 2 分钟和 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟。

- 5 分离出 PCR 产物，然后克隆到穿梭载体(如 Murray 等 J. Immunology 152:87(1994)的方法中构建的 pMIN 164，可从 Dr. Schlievert, University of Minnesota, Mpls, MN 获得)中。该载体是携带氨苄青霉素抗性的大肠杆菌质粒 pBR328 与赋予红霉素抗性的葡萄球菌质粒 pE194 的嵌合体。用抗野生型 SPE-A 的多克隆中和抗体(Toxin Technologies, Boca Raton, Fla 或来自 Dr. Schlievert)在大肠杆菌中筛选生产毒素的连接的质粒混合物。用 Hsiao 等, Nucleic Acid Res. 19:2787(1991)的方法对 SPE-A 毒素突变体进行测序，以确认存在所需的突变和不存在其它突变。

用这种方式产生的具体的 DNA 序列包括：编码 N20D 型突变体的 DNA 序列，该序列具有与图 3 所示相同的编码序列，不同点在于 939 位的腺嘌呤变为鸟嘌呤。编码 C87S 型突变体的 DNA 序列具有图 3 相同的编码序列，不同点在于 1152 位的胸腺嘧啶变为腺嘌呤且 1154 位的胸腺嘧啶变为胞嘧啶。编码 C98S 型 SPE-A 突变毒素的 DNA 序列具有图 3 相同的编码序列，不同点在于 1185 位的鸟嘌呤变为胞嘧啶且 1186 位的胸腺嘧啶变为鸟嘌呤。编码 C90S 型 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列具有图 3 相同的编码序列，不同点在于 1161 位的鸟嘌呤变为胞嘧啶。编码 K157E 型 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列具有图 3 相同的编码序列，不同点在于 1351 位的腺嘌呤变为鸟嘌呤。编码 S195A 型 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列具有与图 3 的编码序列相同的 DNA 序列，不同点在于 1464 位的胸腺嘧啶变为鸟嘌呤。编码 K16N 型 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列具有图 3 相同的序列，不同点在于 941 位的腺嘌呤变为胞嘧啶。

- 25 本领域技术人员应当理解，由于遗传密码的简并性，许多 DNA 序列可编码氨基酸中的相同变化。本发明包括具有不同核苷酸序列但编码氨基酸序列中相同变化的 DNA 序列。

为了在其特定位点产生随机诱变，可设计一系列引物，使得该特定位点被取代成其它 19 种氨基酸的一种或非天然存在的氨基酸或类似物。以上述相似方式或 Rennell 等(同上)描述的方法进行 PCR。亚克隆 PCR 产物，然后通过抗野生型 SPE-A 多克隆中和抗体的免疫反应性来监测毒素的产生。通过对编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列进行测序，可以确认氨基酸序列中存在的变化。较佳的，

筛选这些毒素突变体，选出了非致死性突变体。

可用其它诱变方法以在编码野生型 SPE-A 毒素的 DNA 序列中产生随机突变。文中所用的随机突变或随机诱变指并非在所选定位点的突变和/或并非是选定的改变。含有编码野生型 SPE-A 毒素的 DNA 序列(较佳地在 pMIN 164 上)的细菌

5 宿主细胞，可用其它各种标准方法(如化学诱变和 UV 辐射)来诱变。这种方式产生的突变体，可用抗野生型 SPE-A 的多克隆中和抗体来筛选以确定有无毒素产生。然而，还需进一步筛选以鉴定毒素突变体在生物活性上是否至少有一种变化，较佳的是非致死性变化。还可筛选自发产生的突变体中是否有野生型 SPE-A 生物活性的至少一种变化的突变体。

10 采用如 Anthony-Cahill 等, Trends Biochem. Sci. 14:400(1989)中所述的体外诱变，也可进行随机诱变。

此外，SPE-A 毒素突变体可通过化学合成来制得。化学合成蛋白质的方法在 Wallace, FASEB J. 7:505(1993)中有所描述。可合成部分蛋白质，然后用酶连接在一起，或直接化学缩合。采用化学合成尤其适用于本领域技术人员在所需位置

15 插入非天然存在的氨基酸。此外，化学合成尤其适用于制备 SPE-A 毒素突变体的片段。

本文所述的任何方法均可用来形成 SPE-A 毒素突变体的片段。另外，片段也很容易通过限制性酶消化和/或连接来产生。产生片段的较佳的方法是通过直接化学合成(对于 20 个氨基酸或更少的片段来说)或通过基因克隆(对于较大片段来说)。

20

编码突变型毒素的 DNA 序列无论是定点突变还是随机突变，均可作进一步筛选，以选出与野生型 SPE-A 毒素生物活性不同的其它变化。这种筛选至少一种生物活性变化的筛选方法如上所述。一旦选出的 DNA 序列编码的 SPE-A 毒素突变体在生物活性上至少有一种变化，它们就可用来形成表达盒。

25 表达盒的形成涉及使编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列与提供 SPE-A 毒素突变体在宿主细胞中表达的启动子结合。对于用本文所述的 PCR 方法产生的那些 SPE-A 毒素突变体来说，存在天然的 *speA* 启动子可提供在宿主细胞中表达。

任选地，DNA 序列可以与不同的启动子结合以在特定类型的宿主细胞中表达或增强在宿主细胞中的表达水平。较佳的，启动子所提供的 SPE-A 毒素突变体

30 表达水平可被抗 SPE-A 的抗体检测到。在原核细胞中可用的其它启动子包括 PLAC、PTAC、T7 等。

一旦将编码 SPE-A 毒素突变体的 DNA 序列与合适的启动子结合成表达盒，

就将该表达盒亚克隆到合适的转化载体中。合适的转化载体包括至少一种可检测的标记物基因，它最好是能在大肠杆菌和革兰阳性微生物中扩增的穿梭载体。合适的穿梭载体例子包括 pMIN164 和 pCE104。其它类型的载体包括病毒载体如杆状病毒载体，SV40，痘病毒如牛痘、腺病毒和巨细胞病毒。较佳的载体是

5 pMIN164 载体，一种可在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中扩增的穿梭载体。

一旦形成了携带编码 SPE-A 毒素突变体表达盒的转化载体，就将其引入供表达 SPE-A 毒素突变体的合适宿主细胞中。合适的宿主细胞是那些能高水平表达突变型毒素并使其它不需要的分子(如内毒素和 M 蛋白质)污染可能性最少的细胞。合适的宿主细胞包括哺乳动物细胞、细菌细胞如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙

10 门氏菌属、酵母细胞以及昆虫细胞。

转化方法是本领域技术人员已知的，其包括原生质体转化、脂质体介导的转化、磷酸钙沉淀和电穿孔。较佳的方法是原生质体转化。

优选的转化细胞所携带的表达盒，编码在 20 位氨基酸天冬酰胺处有变化的 SPE-A 毒素突变体。这种转化细胞已保藏在美国典型培养物保藏中心(Rockville, Maryland)。被保藏的微生物的特征是携带 pMIN 164 的金黄色葡萄球菌，该

15 pMIN164 含有编码 N20D 突变的 DNA 序列，该 DNA 序列与天然 *speA* 启动子和其他调控区域可操作地相连。该微生物是根据布达佩斯条约进行保藏，其保藏号为 69831。

另一种微生物也保藏在 ATCC。该微生物是金黄色葡萄球菌，它携带与天然 *speA* 启动子和调控区域可操作地相连的野生型 SPE-A 毒素的 DNA 编码序列。该微生物是根据布达佩斯条约保藏于 ATCC，其保藏号为 69830。

20

转化细胞可用来大量产生可用于疫苗组合物的突变型 SPE-A 毒素。转化的微生物可用于活疫苗、减毒疫苗或热灭活疫苗。转化的微生物包括突变型 SPE-A 毒素，其用量足以刺激产生抗野生型 SPE-A 的保护性免疫应答。SPE-A 毒素突变体宜是分泌的。该微生物最好是对人是不致病的，其包括的突变型毒素具有多个

25 氨基酸变化，以使回复成毒性形式的可能性最小。根据已知的原理，微生物可作为活的或热灭活的疫苗来给药。作为活疫苗的较佳的微生物是转化的细胞如沙门氏菌属细菌。

病毒载体也可用于如上所述的疫苗组合物中，该载体包括的表达盒的 DNA

30 序列编码了 SPE-A 毒素突变体或其片段，其与在宿主细胞中起作用的启动子操作性相连。较佳的，启动子可在哺乳动物细胞中起作用。合适的病毒载体例子包括痘病毒如牛痘病毒、腺病毒、巨细胞病毒等。牛痘病毒载体可用来对人免疫接种

以抵抗野生型 SPE-A 毒素的至少一种生物活性。

本发明还包括一种疫苗组合物，该组合物包含编码 SPE-A 毒素突变体或其片段的核酸序列，该核酸序列与在宿主细胞中起作用的启动子操作性相连。启动子宜在哺乳动物宿主细胞中起作用。核酸序列可以是 DNA 或 RNA。将疫苗组合物递送到宿主细胞或个体中，使 SPE-A 毒素突变体或其片段在个体自己的细胞中表达。SPE-A 毒素突变体或其片段的核酸序列在个体中表达提供了抗野生型 SPE-A 毒素的保护性免疫应答。任选地，可将表达盒插入载体中。核酸分子可直接给药或在病毒载体中给药。疫苗组合物还可任选地包括将疫苗递送到细胞内的递送剂，如脂质体等。疫苗组合物还可任选地包括佐剂或其它免疫调节性化合物，以及增强细胞吸收核酸的附加化合物。疫苗组合物可通过各种途径给药，包括肠胃外途径如静脉内、腹膜内或与粘膜表面接触。

大规模生长和生产 SPE-A 毒素突变体的条件是本领域技术人员已知的。从微生物来源纯化 SPE-A 毒素突变体的方法如下。使在 pMIN164 中携带的野生型 *speA* 或突变体的金黄色葡萄球菌在 37 °C、通气下在可透析牛心培养基(含 5 微克/毫升红霉素)中生长至静止阶段。用四倍体积乙醇使培养物沉淀，将蛋白质重新溶解在无热原水中。使粗制品在 3.5 至 10 和 4 至 6 的 pH 梯度中进行连续平台等电点聚焦分离。用无热原水对经抗体反应性试验具有毒性的阳性级分进行充分透析，在 15%(重量/体积)胶中通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳来测试每一部分取样的纯度。抗 SPE-A 的多克隆中和抗体购自 Toxin Technologies, Boca Raton, Fla 或 Dr. Schlievert。可采用其它纯化方法，包括柱层析或 HPLC。

通过下列实施例可更好地了解本发明，它们代表了较佳的实例，但不应被理解成限制了本发明的范围。

实施例 1

25 野生型 SPE-A 的克隆和表达

按 Johnson 等人, Mol. Gen. Genet. 194:52-56(1984)所述的方法，从大肠杆菌中克隆编码野生型 SPE-A 毒素的基因(*speA*)。简而言之，通过对 E. Coli RR1 中 pBR322 中的噬菌体 T12 DNA 的 Hind III 消化片段进行克隆，鉴别出 *speA* 基因。用针对 A 毒素的多克隆中和抗血清，通过鉴别产生毒素的阳性转化子而挑选出转化子。A 毒素的核苷酸序列由 Weeks 等人, Inf. Imm. 52: 144(1986)所报道。

含有 *speA* 基因的 DNA 序列被亚克隆，然后在金黄色葡萄球菌中表达。携带在大肠杆菌质粒上的 *speA*，用限制性内切酶 Hind III 和 SalI 消化。片段被纯化并

连于 pMIN164(可如前所述获得)的 Hind III-SalI 位点。载体 pMIN164 是葡萄球菌质粒 pE194(携带红霉素抗性)和大肠杆菌载体 pBR328(携带 Amp 和 Tet 抗性)构成的嵌合载体。将 *speA* 克隆入该载体的 Hind III-SalI 时, 会破坏 Tet 抗性。在该质粒中直接位于克隆基因上游的启动子是天然的 *speA* 启动子。

- 5 通过双免疫扩散分析, 用本发明人实验室制备的针对 SPE-A 毒素的多克隆中和抗体检测毒素来证实 *speA* 基因的表达。

实施例 2

将重组产生的野生型 SPE-A 给兔进行施用和免疫

- 10 将重组产生的 SPE-A 给动物施用, 可诱发 STSS。用重组产生的 SPE-A 免疫动物, 可减少动物在被 M3 或 M1 链球菌侵袭时的死亡率, 并且可保护动物免患 STSS。

- 施用 SPE-A 可在兔中诱发 STSS。通过将用微型渗透泵将 SPE-A 皮下植入, 已建立了 STSS 的兔模型动物。Lee 等人, Infect Immun. 59:879(1991)。这些泵被设计成在 7 天时间内释放恒定数量的毒素, 从而使动物持续暴露于毒素。将重组产生的 SPE-A 给予家兔, 7 天内总剂量为 0.2 毫升内的 200 μ g。结果表明, 用 SPE-A 处理过的动物产生 STSS 症状, 几乎所有动物均在 7 天内死亡(数据未显示)。家兔 STSS 症状包括: 体重下降、腹泻、脸部出现花斑、发热、结膜和粘膜变红、透明棕色尿液。如所预计的那样, 未用毒素处理过的对照动物保持健康。
- 15 主要作了以下其它两项观察: 1)如预计的那样, 体液替换可完全保护动物; 和 2)没有一只经毒素处理过的动物发生坏死性筋膜炎和肌炎, 这表明软组织损伤还需要其他因素, 或者在 SPE-A 之外的其他因素。

STSS 临床特征的发生与施用 SPE-A 是相关的。注射 SPE-A 阳性链球菌的兔子会患 STSS, 而注射 SPE-A 阴性链球菌的兔子不显示 STSS 的症状。

- 25 众所周知, SPE-A 是某些 A 类链球菌产生的可变性状。SPE-A 基因是由噬菌体 T12 编码的, 并且特性已很清楚的链球菌菌株已表明, 差别仅在于是否存在被称为“T12 噬菌体”的 SPE-A 噬菌体。链球菌菌株 T253 T12 自愈型(cured T12)可产生 SPE-A(阳性), 而 T253 自愈型是 SPE-A 阴性。

- 按 Scott 等人, Infect Immunity 39:383(1983)所述的方法, 用 SPE-A 阳性链球菌 T253 T12 自愈型或用 SPE-A 阴性 T253 自愈型对兔子进行皮下注射(注入移植的 Wiffle 高尔夫球中)。结果示于表 1。结果表明, 用 SPE-A 阳性链球菌注射的动物患有 STSS 临床特征, 并且 8 只动物中 6 只死亡。2 只存活的动物产生了抗
- 30

SPE-A 的抗体。与之相反，毒素阴性菌株(即 T253 自愈型)仅引起发热，而且没有观察到死亡，即使是在高得多的细菌细胞浓度下。与以前的动物模型试验一致，没有观察到软组织坏死。此外，链球菌仍维持在高尔夫球中，这暗示这些链球菌菌株不是高度侵袭性的。

5

表1: 在Wiffle球兔模型中，*speA*对STSS的引发作用

处理方式	最高温度平均值(℃)	死亡数/总数
无	39.1	0/4
T253 T12自愈型*	41.2	6/8 [†]
T253 自愈型*	40.7	0/6
T253 自愈型+	41.0	0/6

* 约1 × 10⁸细胞
+ 约1 × 10¹¹细胞
I 2只存活动物产生了抗SPE-A的抗体

10 用重组产生的SPE-A来免疫动物，可减少兔子在用M3或M1链球菌侵袭时的死亡率。用衍生自金黄色葡萄球菌的克隆SPE-A来免疫兔子，以防止动物被污染性的链球菌产物(如M蛋白)免疫的可能性。对照动物没有对SPE-A进行免疫。兔子皮下接受乳化于不完全Freund氏佐剂中的50微克重组产生的SPE-A。在9天之后，皮下注射25毫升生长于透析的牛心培养基中的M3(1.4 × 10⁹总CFU)或M1(4.2 × 10⁹总CFU)链球菌，对兔子
15 进行侵袭。M1和M3链球菌分离株是临床分离株。M1分离株被命名为MNST，M3分离株被命名为MNBY。这些分离株可从Dr. Schlievert, University of Minnesota, Mpls. MN获得。

表2的数据显示了一些试验的惊人结果。

表2: 事先进行抗SPE-A免疫, 可保护兔子免受M3或M1链球菌所引发的 STSS(坏死性筋膜炎和肌炎)

动物数目	免疫剂*	侵袭剂 ⁺	存活数目 ¹ /总数
20	--	M3	4/20
			P<<0.001 ¹
20	SPE-A	M3	16/19
17	--	M1	9/17
			P<0.04 ¹
15	SPE-A	M1	13/15

* 动物的免疫针对从金黄色葡萄球菌制备的克隆 SPE-A; 针对 SPE-A 的 ELISA 效价大于 10,000。

+ 皮下注射生长于透析的牛心培养基中的 M3(1.4×10^9 总 CFU)或 M1(4.2×10^9 总 CFU)链球菌, 对动物进行侵袭

I 根据 University of Minnesota Animal Care Committee 的指南, 使用 M3 链球菌的试验在 24 小时后终止, 使用 M1 链球菌的试验在 48 小时后终止。

¹ 用 Fisher 精确概率测试法确定 P 值。

如所示的那样, 在用 M3 链球菌侵袭下, 19 只 SPE-A 免疫的兔子中的 16 只存活下来, 而 20 只未免疫动物中仅 4 只存活。存活的免疫动物显示出明显的形成内含的软组织脓肿, 对脓肿进行液体检查, 发现充满了 PMN。类似的结果在 M1 链球菌的研究中也获得, 不同点在于: M1 菌的毒性没有 M3 菌的毒性强(表 2)。使用了较高数目的 M1 链球菌, 并观察到兔子死亡率的下降, 即使在未免疫的对照动物中。这可能反映了, 与 M3 菌株相比, M1 菌株的 SPE-A 产量要低约 50 倍。

与之相反, 未免疫动物中都不显示脓肿, 对 2/2 动物进行液体检查揭示, 没有 PMN 浸润液。这些结果表明, SPE-A 免疫动物和未免疫动物之间的一个主要差别, 似乎是否会引起炎症反应。以前的工作表明, SPE-A 以及其他致热的毒素超抗原会诱导巨噬细胞产生高水平的 TNF- α 。TNF- α 大大降低了 PMN 趋化性, 这表现上是通过趋化受体的下调作用。因此, 据信试验结果显示了, 在 SPE-A 免疫动物中抗体通过中和 SPE-A 而阻断了巨噬细胞释放 TNF- α , 从而产生了保护性的炎症反应。在未免疫的动物中, SPE-A 造成 TNF- α 的大量释放, 这又防止了产生保护性的趋化反应。

至关重要的是, 应注意所有死亡的动物(除了一只动物)都表现出广泛的软组织损

伤，其证据是整侧变为紫黑色而且在许多情况下出现腐肉。免疫组中有一只动物在免疫后死亡。在这些动物的组织中缺乏可检测的炎症，这暗示是链球菌因子而不是宿主的免疫应答造成了坏死性筋膜炎和肌炎。其他胞外因子可能也造成软组织损伤，例如 SPE B 和链球菌溶血素 O 和 S。

5 所有上述数据构成了一个有力的例子，它说明了存在的致热毒素超抗原(尤其是 SPE-A)，在患 STSS 的过程中起着致病作用。

实施例 3

对编码 SPE-A 的 DNA 序列进行定点诱变

10 用定点诱变法鉴别出 SPE-A 分子中对生物活性至关重要的位置。如下所述，在分子的各区域引入单氨基酸变化。

SPE-A 的三维结构模型示于图 1。该模型结构是用 Insight/Homology 程序 (BioSym Corp., San Diego, CA)，通过同源法构建的。该分子已鉴别出下列结构域：

<u>结构域</u>	<u>对应的氨基酸</u>
螺旋 2	11-15
N 端 α -螺旋, 螺旋 3	18-26
结构域 B - β 链	
链 1	30-36
链 2	44-52
链 3	55-62
链 4	75-83
链 5	95-106.
中央 α -螺旋, 螺旋 5	142-158
结构域 A - β 链	
链 6	117-126
链 7	129-135
链 8	169-175
链 9	180-186
链 10	213-220
螺旋 4	64-72
螺旋 6	193-202

氨基酸编号根据图 3 的序列给出。

在每个结构域中挑选氨基酸，并改变分子中的半胱氨酸残基。特别优选的区域是 N 端 α -螺旋(18-26)；中央 α -螺旋(142-158)；结构域 A β 链和结构域 B β 链。

如前所述，用计算机程序通过比较一级氨基酸序列和/或三维结构相似性或同源性，在致热毒素家族里保守氨基酸中挑选诱变靶残基。挑选每个氨基酸的改变形式，使得在具体位点处改变残基的氨基酸侧链的特性。例如，在 3 个残基(87、90 和 98)处，用丝氨酸替换半胱氨酸，从而改变分子的巯基(sulphydryl)。在另三个氨基酸残基处，改变所述位点处存在的电荷。例如，将赖氨酸改为谷氨酸(157)，将赖氨酸改为天冬酰胺(16)，以及将天冬酰胺改为天冬氨酸(20)。

10 其他氨基酸可影响毒素与 II 类 MHC 分子的相互作用。在另一分子中，TSST-1 的 N 端 β 桶链，对于与 II 类 MHC 分子的 α 和 β 链接触是至关重要的。因此，在结构域 A 和结构域 B 的 β 链处的改变，对于控制这些分子与 II 类 MHC 分子的相互作用可能是重要的。此外，还可用随机诱变和在特定位置处用其他 19 种氨基酸中的每一种来进行替换，从而得到残基的改变，然后再选择生物活性(例如致死性)改变的突变体。

15 突变的 SPE-A 分子是通过聚合酶链反应(PCR)定点诱变法制备的，其中模板 DNA 是来自噬菌体 T12 的克隆 SPE-A 基因。对于每个产生的突变，使用引物。每个突变的产生涉及使用如下三种引物：上游 5'侧引物，包含编码氨基酸变化的改变的 DNA 序列的内部引物，和下游一侧的引物。上游一侧的引物在每个 PCR 反应中都被包括，而且该引物与翻译起始位点上游约 760 碱基处的 DNA 区域同源，其序列如下：

5' GGT GGA TCC TTG AAA CAG GTG CA-3'(SEQ ID NO:11)

BamH1

25

形成的 PCR 产物包含 *speA* 启动子和可能的上游调控区域。下游一侧引物与终止密码子下游约 270 碱基处的区域互补，其序列如下：

5' CCC CCC GTC GAC GAT AAA ATA GTT GCT AAG

SalI

30

CTA CAA GCT-3'(SEQ ID NO:2)

每次 PCR 反应中均存在下游侧接引物，并且因为引物所处的位置所以 PCR 产物含有假定的转录终止序列。

每种在特定位点处的突变是通过使用内部引物而产生的，该内部引物含有编码特定残基变化的 DNA 序列。例如，用于产生各突变的内部引物如下：

5

突变体	内部引物
N20D	5' AAA AAC CTT CAA GAT ATA TAT TTT CTT -3'(SEQ ID NO:3)
C87S	5'-TCC-ACA-TAA-ATA GCT GAG ATG GTA ATA-TCC-3'(SEQ ID NO:4)
C90S	5'-CTC TGT TAT TTA TCT GAA AAT GCA GAA-3' (SEQ ID NO:5)
C98S	5' CCC TCC GTA GAT CGA TGC ACT CCT TTC TGC-3' (SEQ ID NO:6)
K157E	5'-CTT ACA GAT AAT GAG CAA CTA TAT ACT-3' (SEQ ID NO:7)
S195A	5'-CCA GGA TTT ACT CAA GCT AAA TAT CTT ATG-3' (SEQ ID NO:8)
K16N	5'- CAA CTT CAC AGA TCT AGT TTA GTT AAC AAC CTT-3' (SEQ IDNO:9) (正向引物)和 5'- T TTG AAG GTT GTT AAC TAA ACT AGA TCT GTG AAG TTG-3' (SEQ ID NO:10)(反向引物)

带下划线的核苷酸表示，与编码野生型SPE-A的DNA序列相比，编码序列有变化。

PCR 如下进行：简而言之，在标准 PCR 反应中，混合不同摩尔的下游侧接

引物和正向引物, 该正向引物横跨突变位点并且含有产生氨基酸变化所需的核苷酸取代, 获得的 DNA 产物在链中普遍含有突变。该产物(即巨引物)可以长数百碱基, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳将其分离出来, 然后用 Geneclean 试剂盒按制造商的建议(Bio 101, La Jolla, California)进行洗脱。

- 5 简言之, PCR 反应条件是: PCR 在 100 微升反应混合物中进行, 该混合物含有 10mM Tris-HCl(pH=8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、dNTP 各 200μM、2ng 模板质粒 DNA、100 微微摩尔侧接引物、5 微微摩尔内部引物、2.5 单位 Ampli Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer Cetus)。在第二次扩增步骤中, 反应混合物的组成如上所述, 只是采用了等摩尔浓度(5 微微摩尔)的侧接引物和巨引物
- 10 (megaprimer)和 1μg 模板。PCR 进行 30 次循环, 每次循环为 94 °C 变性 1 分钟、37 °C 或 44 °C 退火 2 分钟和 72 °C 延伸 3 分钟。杂交条件可按照已知的原则根据引物大小、错配和 GC 含量而加以改变。

含有 *speA* 克隆基因和侧翼序列的质粒被用作模板。在第二步骤中, 巨引物和上游侧接引物被等摩尔地合并入反应混合物中, 从而产生全长的突变 *speA*。

- 15 突变的 *speA* 用合适的限制性酶消化, 然后克隆入穿梭载体 pMIN164 中。该载体是携带氨苄青霉素抗性的大肠杆菌质粒 pBR328 与赋予红霉素抗性的葡萄球菌质粒 pE194 的嵌合体。连接的质粒混合物被转化, 并在大肠杆菌中选择和筛选。用双免疫扩散分析所确定的产生毒素的阳性克隆, 用 Hsiao(同上)的方法进行测序, 以证实存在所需的突变并且没有其他突变。然后, 将质粒转入金黄色葡萄球菌 RN4220(可从 Richard Novick, Skirball Institute, New York, NY 获得), 以便表达
- 20 和生产突变毒素。

- 在 pMIN164 中携带突变型或野生型 *speA* 的金黄色葡萄球菌, 在含 5 微克/毫升红霉素的透析牛心培养基中, 于 37 °C 通气生长至稳定期。用 4 倍体积的乙醇沉淀培养物, 蛋白质重溶解于无热原的水中。对粗制品在 3.5-10 和 4-10 的 pH
- 25 梯度下, 进行连续的平板等电聚焦分离。对于通过抗体反应而确定的毒素阳性组份, 用无热原的水充分进行透析。然后各取一份样品, 在 15%(重量/体积)凝胶上用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定纯度(数据未给出)。制备的所有突变体都与天然毒素一样能够耐 60 分钟的胰蛋白酶(2 微克/微克 SPE-A)处理, 这一现象以及保留与针对天然 SPE-A 的多克隆抗体的反应性, 都表明引入的突变没有造成毒素总
- 30 体结构的改变。用这些方法, 产生了 7 种在氨基酸序列中有单氨基酸取代的突变体。

实施例 4

SPE-A 突变体的生物活性情况

对突变毒素的生物活性进行评估，并与野生型 SPE-A 的生物活性进行比较。测试了突变毒素的刺激 T 淋巴细胞增殖的能力(超抗原性)、增强宿主对内毒素休克易感性的能力、以及患毒素休克综合症的能力和致死性。

测量刺激 T 淋巴细胞增殖的能力，以兔脾细胞 DNA 中 $[^3\text{H}]$ 胸苷的掺入量表示。在 96 孔微量滴定板中进行标准的 4 天促有丝分裂性测试。每个孔含有 2×10^5 个悬浮于 200 微升 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY)(其中补充有 25mM HEPES, 2.0mM L-谷氨酰胺, 100U 青霉素, 100 微克/毫升链霉素和 2%热灭活的 FCS)中的兔脾细胞。一式四份地加入 20 微升外毒素样品, 最终数量是: 1 微克至 10-5 微克/孔。一式四份地将 20 微升 RPMI 加至脾细胞, 以测定细胞增殖背景。在增湿箱中于 37 °C 和 7%二氧化碳中孵育 3 天之后, 将 1.0 μCi (20 微升体积的 5-[甲基- ^3H]-胸苷 (46Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL))加至各孔中, 并孵育 18 小时。在玻璃纤维过滤器中收集细胞 DNA, 用液闪计数法测定[甲基- ^3H]-胸苷的掺入量。用 3 个不同的兔供体进行了 3 次独立的分析。在 3 次分析中, 每次都一式四份地测试外蛋白(exoprotein)的浓度。结果以 CPM 表示。

在 American Dutch Belted 兔中, 测试增强宿主对内毒素休克易感性的能力。重量 1-2 千克的动物, 在其耳边缘静脉中注射 5 微克/千克体重的 SPE-A(等于 1/50 的 LD50), 然后在 4 小时后 IV 注射 1 或 10 微克/千克体重的来自鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)的内毒素(约为 LD50 的 1/100)。对照兔子接受 PBS 注射。在 48 小时后监测动物的死亡情况。

还用微型渗透泵测量了致死性, 其中将含有 200 微克毒素的微型渗透泵皮下植入 American Dutch Belted 兔中。将各种蛋白(200 微克)注入微型渗透泵(Alzet, AlzaCo, Palo Alto, CA)的 0.2 毫升 PBS 中。泵被设计成能在 7 天时间内输送恒定数量的毒素。在 8 天之内, 每天 3 次观察兔子是否有毒素休克综合症例如腹泻、结膜和耳的红斑、休克和死亡。

促 T 细胞有丝分裂性研究的结果示于图 4、5 和 6。结果表明, N20D 突变蛋白的超抗原性(即促 T 细胞有丝分裂性活性)下降了 5 倍。C87S 和 C98S 突变体的促 T 细胞有丝分裂性也下降了 4 倍。因此, 几种突变都影响了超抗原性(即促 T 细胞有丝分裂性)这一生物活性。

内毒素休克增强和致死性的结果示于下表 3、4 和 5 中。

表3 分析当SPE-A-K16N和SPE-A-N20D以皮下微型渗透泵形式输送时，所造成的内毒素增强能力或致死性。数据表示为死亡数与全部测试兔子数目之比

	蛋白质		
	SPE-A	K16N	N20D
内毒素增强 1 μg/kg 内毒素)	3/3	6/7	0/3
微型渗透泵输送时的致死性	3/4	ND	0/4

5 表4 分析当突变体SPE-A-C87S、SPE-A-C90S和SPE-A-C98S以皮下微型渗透泵形式输送时，诱发内毒素增强的能力或致死性。数据表示为死亡数与测试兔子总数之比

	蛋白质			
	SPE-A	C87S	C98S	C90S
内毒素增强 1 μg/kg体重	2/3	1/3	0/3	ND
内毒素增强 10 μg/kg体重	2/3	3/3	1/3	ND
微型渗透泵输送时的致死性	3/4	ND	ND	3/3

10 表5 分析当突变体SPE-A-K157E和SPE-A-S195A以皮下微型渗透泵形式输送时，诱发致死的能力。数据表示为死亡数与测试兔子总数之比

	蛋白质		
	SPE-A	K157E	S195A
微型渗透泵输送时的致死性	6/8	0/4	3/3

结果表明，当用任一种 STSS 模型测试时，用 N20D 突变体处理的动物都不患 STSS。N20D 突变位于靠近毒素背部深沟的结构化的α 螺旋中(图 1)。该残基对于分子
15 子的超抗原性和致死性功能都至关重要。

消除巯基因而干扰可能存在的二硫键的突变，对于 SPE-A 的生物活性有多种效应，这取决于突变哪个半胱氨酸残基。C90S 突变体完整地保留了致死性(表 4)，而且 T 细胞刺激活性也没有明显下降(图 5a)。与之相反，C87S 和 C98S 突变使毒素的促有丝分裂性下降了约 4 倍(图 5b)。然而，这两种突变对导致内毒素休克的能力的影响是

不同, C98S 仅有弱毒性, 但 C87S 是强毒性的(表 4)。对于这些结果的解释基于这 3 个半胱氨酸在一级序列和三维结构中的相对位置(图 1)。缺少 C98 的巯基可防止形成葡萄球菌内毒素中所见的二硫键, 因而环的结构会丧失。如果在该环中的氨基酸, 负责与宿主细胞受体的接触或者具有该分子生物活性的某种其他功能, 那么这对活性有不利影响。在 C87S 突变情况下, 假定的二硫键仍可在 C90 和 C98 之间形成, 从而保留了大多数结构并因而保留了活性。

K157E 突变体(突变位于长的中央 α -螺旋中), 保留了完整的超抗原性(图 6a), 但是用微型渗透泵输送给兔子时却是不致死的(表 6)。

残基 S195A 是 α -5 螺旋的一部分, 它可能对于所测试的生物活性是不重要的, 因为该突变对所测试的活性的影响并不大。该残基可能并不暴露于外部环境, 或者可能对结合不作出贡献。

这些结果显示, 通过在数个位点上的突变, 可以影响致死性和超抗原性。在 N 端 α -螺旋的残基(N20D)和中央 α -螺旋的残基(K157E)发生突变, 可影响致死性。在 N 端 α -螺旋处的突变以及改变巯基都可影响促有丝分裂性。

这些结果还显示, 促有丝分裂性和致死性是相互独立的活性, 因为可产生影响致死性但不影响促有丝分裂性的突变体(K157E), 以及影响促有丝分裂性但不影响致死性的突变体(C87S)。

实施例 5

用 PCR 制备双突变体和三突变体

有多种方法可用于产生双或三突变 SPE-A 毒素或片段。

在氨基酸序列中有 2 个或多个变化的 SPE-A 毒素突变体, 可以如前所述用 PCR 法进行制备。在第一次 PCR 反应中, 将第一个内部引物(编码选定位点处第一个变化)与 5'和 3'侧接引物联合使用, 以产生第一 PCR 产物。第一 PCR 产物是一 DNA 序列, 它编码氨基酸序列中有一个变化的 SPE-A 毒素突变体。然后, 将该第一 PCR 产物作为模板 DNA, 以产生与具有野生型 SPE-A 活性的蛋白质相比氨基酸序列中有 2 个变化的第二 PCR 产物。第一 PCR 产物是与第二内部引物(编码第二位点处的氨基酸变化)相结合的模板 DNA。第二内部引物还与 5'和 3'侧翼引物联合使用, 从而形成第二 PCR 产物。第二 PCR 产物是一 DNA 序列, 它编码氨基酸序列中有二个位点变化的 SPE-A 毒素突变体。接着, 将第二 PCR 产物用作第三次反应中的模板, 从而形成编码氨基酸序列中有 3 个位点变化的 SPE-A 毒素突变体的产物 DNA 序列。这种方法可用于产生编码氨基酸序列中有一个以上位点变化的突变毒素的 DNA 序列。

另一种制备编码多个变化的 DNA 序列的方法，是通过自动化合成来制得编码氨基酸序列中变化的 DNA 序列片段。然后用几种独特的限制性位点将片段亚克隆到野生型 SPE-A 编码序列中。限制性位点对于本领域技术人员来说是已知的，且很容易根据野生型 SPE-A 毒素的 DNA 序列来确定。用 Revi 等人，《核酸研究》(Nucl. Acids Res.) 16:1030(1988)中所述的三片段连接方法，在一个步骤中实现克隆。

突变体 D45N 是用体外定点诱变系统 Altered Sites II(Promega, Madison, WI)获得的。经 *speA* 的 1.75kb BamHI-SalI 片段亚克隆入诱变试剂盒(Promega)所提供的载体 pAlter 中。 诱变寡核苷酸是 CTT TTA TCT CAC AAT TTA ATA TAT AAT G。诱变反应按制造商的建议进行。

产生三突变体

用单氨基酸突变体(例如刚在上面论述过的 D45N)来产生双突变体和三突变体，这是通过将携带所需的新突变 *speA* 片段亚克隆入具有单或双 *speA* 突变的质粒中。表 10 描述了用于交换 DNA 片段的独特限制性位点以及用于各亚克隆程序的接受质粒。对突变体在新引入突变的区域内进行测序，以证实亚克隆是成功的。

表 10 引入 SPE-A 的多重突变以及用于发生交换
以便从单突变体产生多突变体的限制性片段的清单

突变体	限制性片段	供体	受体
N20D/D45N/C98S			
步骤 1	<i>SalI</i> - <i>BstEII</i>	D45N	N20D
步骤 2	<i>BamHI</i> - <i>BfrI</i>	N20D/D45N	C98S

实施例 6

与单突变体和双突变体相关的毒性研究

根据刺激兔脾细胞增殖的能力，来评估野生型 SPE-A、SPE-A N20D、SPE-A K157E、SPE-A N20/C98S 和 SPE-A N20D/K157E 的超抗原性(见图 7 和 8)。

双突变体 SPE-A(N20D/C98S, N20D/K157E)是用上述的技术通过 PCR 诱变法制得的。将突变的 SPE-A 基因 *speA* N20D 作为模板 DNA 来引入第二个突变。如上对双突变基因进行测序，以保证仅存在所指出的变化。只存在所需的变化。

在 SPE-A 和 SPE-A 突变体存在下，体外培养兔脾细胞 3 天，接着在加入 1μCi/

孔 ^3H 胸苷后再培养一天。掺入淋巴细胞 DNA 的 ^3H 胸苷掺入量, 被用作 T 细胞增殖的测量值。超抗原性指数的计算是: 在刺激细胞中 ^3H 胸苷掺入的平均计数/分钟除以在无 SPE-A 或突变体下培养的细胞的平均计数/分钟。

野生型 SPE-A 在 1 至 0.001 微克/孔的剂量下有显著的超抗原性(图 7)。SPE-A
5 K157E 在 0.01 和 0.001 微克/孔的剂量下有显著的促有丝分裂性(图 7)。三种其他的
SPE-A 突变体(SPE-A N20D、SPE-A N20D/C98S、SPE-A N20D/K157E)在 1 至 0.001
微克的剂量下有明显低于野生型 SPE-A 的超抗原性($p < 0.001$)。有趣的是, 在 1 和 0.1
微克的剂量下, N20D 的超抗原性明显高于 SPE-A N20D/C98S(图 8)(分别为
10 $p < 0.0005$ 、 $p < 0.001$)。此外, 在 1 微克/孔剂量下, SPE-A N20D 的促有丝分裂性高于
SPE-A N20D/K157E($P < 0.01$)。因此, 数据表明 N20D/C98S 突变体的毒性小于 N20D
单突变体, 而 N20D/K157E 双突变体的毒性介于其他两种蛋白质之间。所有 3 种突变
体的毒性都明显低于野生型 SPE-A。

在第二个试验中,先用 10 微克/千克的 SPE-A 或突变体,然后在 4 小时后用内毒素(5 微克/千克)通过静脉注射方式侵袭兔子(3 只/组)。监测动物 48 小时,以观察是否有因施用 SPE 和内毒素而导致致死性上升。该分析是体内测定 SPE-A 致死活性最灵敏的方法,如表 6 所示,在 3 只用野生型 SPE-A 和内毒素侵袭的动物中没有一只存活。与之相反,用 SPE-A N20D 侵袭的动物中除了一只以外都存活,而且用 SPE-A N20D/C98S 或 SPE-A N20D/K157E 侵袭的所有动物都存活。

20 表 6 SPE-A(10 μ g/kg)或突变体(10 μ g/kg)在增强兔子对内毒素致死性的易感性方面的能力

SPE A或突变体	死亡数/总数
野生型 SPE A	3/3
SPE A N20D	1/3
SPE A N20D/C98S	0/3
SPE A N20D/K157E	0/3

注: SPE-A 或突变体是在 0 小时时静脉注射的, 而内毒素是在 4 小时时静脉注射的。对动物监测 48 小时, 以观察致死性。

在第三个试验中, 兔子用 SPE-A N20D、SPE-A N20D/C98S、或 SPE-A N20D/K157E 免疫, 然后用野生型 SPE-A(10 微克/千克)和内毒素(5 微克/千克或

25 微克/千克)如前面实施例那样进行侵袭。对照动物没有被免疫，但用野生型 SPE-A 加内毒素进行侵袭。兔子是通过每隔一周共注射 2 次而进行免疫，其中所用的突变蛋白(50 微克/每次注射)被乳化于不完全佐剂(Freunds, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)中。接着，兔子休息一周，再用野生型毒素进行侵袭。野生型

5 SPE-A 和内毒素的组合是 20 LD50 时用 10 微克/千克 SPE-A 和 5 微克/千克内毒素，而 100LD50 时用 10 微克/千克 SPE-A 和 25 微克/千克 内毒素。

如表 7 所示，用 100 LD50 的 SPE-A 和内毒素侵袭的所有动物都死亡。类似地，用 SPE-A N20D 或 N20D/K157E 免疫的所有动物，当用 20 LD50 SPE-A 和内毒素侵袭时也都死亡。与之相反，用双突变体 N20D/C98S 免疫的动物却存活了。

10 用双突变体 N20D/K157E 免疫的动物比其他动物死亡得更早。上述数据表明，双突变体尤其是 SPE-A N20D/C98S 可有效地作为测试动物的类毒素疫苗。

表 7： 用 SPE-A 突变体免疫兔子，以
对抗野生型 SPE-A 的增强对致死性内毒素休克易感性方面的能力

免疫剂	SPE-A和内毒素的侵袭剂量	死亡数/总数
无	10 µg/kg SPE A, 25 µg/kg 内毒素	3/3
SPE A N20D	10 µg/kg SPE A, 25 µg/kg 内毒素	2/2
SPE A N20D/C98S	10 µg/kg SPE A, 25 µg/kg 内毒素	2/2
SPE A N20D/K157E	10 µg/kg SPE A, 25 µg/kg 内毒素	2/2
无	10 µg/kg SPE A, 5 µg/kg 内毒素	3/3
SPE A N20D	10 µg/kg SPE A, 5 µg/kg 内毒素	2/2
SPE A N20D/C98S	10 µg/kg SPE A, 5 µg/kg 内毒素	0/3
SPE A N20D/K157E	10 µg/kg SPE A, 5 µg/kg 内毒素	3/3

15 注： 一些动物在该次试验时逃走。这些动物没有包括在上述数据中。

实施例 7

用针对 SPE-A 突变体的抗体抑制 SPE-A 以及用 SPE-A 突变体免疫

20 从每只用 N20D、 N20D/C98S 和 N20D/K157E SPE-A 免疫的和未免疫的对照兔子的耳边缘静脉，抽取 1 毫升血液。在最后一次免疫后 6 天(在动物被用于表 6 所示的试验之前一天)，动物被放血。在血块凝结之后，通过离心(13,000 × g， 10

分钟)分离出血清。将来自各组的血清合并在一起,并用33 1/3%的硫酸铵(终浓度)在室温下处理1小时,以沉淀出免疫球蛋白。沉淀的免疫球蛋白通过离心($13,000 \times g$, 10分钟)收集,重新溶解于磷酸盐缓冲液(0.005M 磷酸钠, pH 7.0, 0.15M 氯化钠)至原来的体积,用1升0.15M氯化钠于4℃透析24小时。透析液被过滤灭菌(0.45微米孔径),然后在研究中用于中和0.01微克SPE-A对兔脾细胞的促有丝分裂性(超抗原性)(图9)。来自一只用亚致死剂量的野生型SPE-A免疫的兔子的血清,被可比地进行分级并用作阳性对照。将来自各组血清的20微升免疫球蛋白组份(Ig),用完全RPMI 1640哺乳动物细胞培养基进行1/5和1/50稀释(相对于原血清体积进行稀释),然后在我们标准的促有丝分裂性分析中加至4个孔中,每个孔含有野生型SPE-A和 2×10^5 兔脾细胞。在0时刻,将Ig和野生型毒素都加至淋巴细胞。结果示于图9。

1/5稀释的Ig,无论是来自免疫的动物还是未免疫的对照动物,都可抑制脾细胞增殖,这可能是因为在Ig中残留有硫酸铵。然而,来自SPE-A免疫动物的Ig和来自N20D、N20D/C98S和N20D/K157E免疫动物的Ig,其抑制性高于未免疫的对照(SPE-A对未免疫对照的 $p=0.006$; N20D对未免疫对照的 $p=0.035$; N20D/C98S对未免疫对照的 $p=0.0002$; N20D/K157E对未免疫对照的 $p=0.0001$,其中用Student氏测试分析法对正态分布的非配对数据进行分析)。这表明了对促有丝分裂性的特异性抑制。

当Ig以1/50稀释度加入时,与未免疫的对照相比,双突变体N20D/C98S造成了脾细胞增殖的明显抑制($p=0.046$)。在该Ig浓度下,没有一种组份导致淋巴细胞促有丝分裂性的非特异性抑制。

这些数据暗示,双突变体N20D/C98S能比单突变体N20D或另一个双突变体N20D/K157E更好地免疫动物,以对抗野生型SPE-A的促有丝分裂性。然而,双突变体N20D/K157E是比单突变体N20D更好的免疫原。在不受以下限制的情况下,可能在N20D/C98S突变体中的两个变化干扰了与致死性有关的宿主细胞受体位点、T细胞受体相互作用,并可能间接地干扰了抗原呈递细胞上II类MHC的相互作用。因为II类MHC相互作用取决于在毒素标准视图中 β 桶结构域(结构域B)的氨基酸残基,因此我们还提出了,在该区域(如D45N)的变化甚至可进一步提高N20D/C98S的免疫原性。该假设的基础是,野生型毒素(以及很可能在II类MHC作用结构域中没有变化的突变体)直接与II类MHC结合,而不需要抗原呈递细胞的正常加工过程。含有干扰这种与II类MHC的直接作用的氨基酸变化的突变体,可能免疫原性更强,因为突变体更易被内化和加工。因此,用评估其他突变体的方法来评估三突变体

N20D/C98S/D45N。

得自未免疫对照和各组用 N20D、 N20D/C98S 或 N20D/K157E 免疫的兔子的血清。直接测试抗野生型 SPE-A 的 ELISA 效价(L. Hudson 和 F.C. Hay, Practical Immunology, 2 版, 1980, Blackwell Scientific Publications, Boston p 237-239)。来自
5 各动物的血清被分别评估。获得的抗体效价被平均, 并示于表 8。如预期的那样, 未免疫的对照动物具有非常低的抗 SPE-A 抗体效价。与之相反, 用突变体免疫的所有动物都有明显的抗体效价。用双突变体 N20D/K157E 免疫的动物有最高的平均效价, 而且另两种突变体有相近的效价。然而, 与两种双突变体相比, N20D 免疫动物的效价范围要大得多(对于 6 只动物中的每只为 20、 40、 160、 640、
10 640)。这些数据暗示, 双突变体可产生更一致的免疫作用。

表 8： 用 N20D、 N20D/C98S、 N20D/K157E SPE-A 免疫的
动物和未免疫对照的 ELISA 抗体效价

免疫剂	抗体平均效价 ^a	范围 ^b
无	10	<10-20
N20D SPE A	250	20-640
N20D/C98S SPE A	80	80
N20D/K157E SPE A	425	320-640

a： 6 只动物/组

5 b： 可检测的最低效价是 10。效价是产生阳性结果的最后稀释度的倒数。

在最后一次试验中, 动物(3 只/组)用 N20D、 N20D/C98S、 或 N20D/K157E SPE-A 免疫(50 微克/每次静脉注射), 即通过每隔一天共注射 5 次突变蛋白, 然后让动物休息一天。接着评估动物对抗野生型 SPE-A 引起发热的免疫力(在注射后 4
20 小时, 20 倍最低致热剂量(MPD)/千克体重(20 MPD-4))。SPE-A 是已知最强的热原中的一种, 其在兔中的单 MPD-4 为 0.15 微克/千克。在 4 小时时, 给动物注射内毒素(25 微克/千克), 以评估对内毒素休克增强易感性的免疫力。数据示于表 9。

未免疫动物和用 N20D SPE-A 免疫的动物都显出明显的热反应(两组都为 0.8 ℃)和对内毒素的易感性上升(在两组中, 在 48 小时内 2/3 死亡)。相反, 用两种双
25 突变体中任一种所免疫动物被完全保护而没有发热和增强现象。

总而言之, 所有上述数据揭示, 双突变体比单突变体更能免疫动物以对抗 SPE-A 的毒性效应。没有一种突变体本身是对动物有毒的。双突变体 N20D/C98S

是比 N20D/K157E 更好的免疫原，当然两者都是有效的。

表 9： N20D 、 N20D/C98S 和 N20D/K157E SPE-A 突变体的免疫动物的能力，以抵抗 SPE-A 致热性以及 SPE-A 和内毒素攻击时的致死性

5

免疫剂	发热反应 4小时时的变化(℃)	死亡数目/总数
无	0.8	2/3
N20D SPE A	0.8	2/3
N20D/C98S SPE A	0.0	0/3
N20D/K157E SPE A	0.1	0/3

实施例 8

三重突变体的评估和特性

三重突变体的构建和稳定性测定

10 N20D/D45N/C98S 是通过两轮亚克隆而构建的。对形成的突变 *speA* 基因进行测序，以确保在克隆过程中含有合适突变的 DNA 片段被连接。携带三重突变 *speA* 基因的质粒 pMIN164 被转入金黄色葡萄球菌 RN4220 中，然后按用于其他突变体的所述方法产生和纯化三重突变蛋白质。

15 评估蛋白质 N20D/D45N/C98S 的稳定性。该蛋白质从细菌培养物中纯化出的数量与双突变 SPE 相仿。在双免疫扩散分析中，三重突变蛋白也与对野生型 SPE-A 特异的多克隆抗体反应。此外， N20D/D45N/C98S 与野生型一样可耐胰蛋白酶的切割。

三重突变蛋白的增殖活性

20 评估了 N20D/D45N/C98S 在兔和鼠脾细胞和人 PBMC 中的增殖活性。与野生型 SPE-A 相比，该蛋白质的诱发兔子(表 11)和人(表 13)细胞增殖的活性低得多。在鼠细胞中，当在 100ng/孔下，该蛋白质的活性接近于 50%野生型活性，当使用 1000ng/孔的毒素剂量时活性甚至更高(表 12)。在兔细胞中， N20D/D45N/C98S 的活性也低于测试的单突变体(N20D 和 D45N)，而与双突变体 N20D/C98S 的活性
25 相同(表 11)。然而，在鼠系统中，三重突变蛋白可与单突变蛋白 D45N 相同地引发细胞增殖，而且活性比 N20D/C98S 更高(表 12)；而在人细胞中，N20D/D45N/C98S 也与 D45N 活性相同(在 100ng/孔时)，但是在 10ng/孔时活性低

得多(表 13)。这表明，引入第三个突变增加了蛋白质的活性。也许，在 45 位由 Asp 变为 Asn 所导致的电荷减少，对缺乏 Cys98 的巯基的蛋白质有稳定作用。

5

表 11：与单突变体、双突变体和野生型 SPE-A 相比，
三突变的 SPE-A 诱导兔脾细胞的增殖的能力

蛋白质	100 ng/孔			10 ng/孔			1 ng/孔		
	cpm	SD ^b	%	cpm	SD	%	cpm	SD	%
	(10 ³) ^a		^c	(10 ³)			(10 ³)		
SPE A	97	8		116	20		99	7	
N20D	23	4	23	9	2	8	3	1.4	3
D45N	10	1.3	10	21	4.5	18	3.2	1.7	3
N20D/C98S	13	2	13	2.4	1.5	2	0.5	1.5	0.5
N20D/D45N/C98S	7.6	2	8	4.4	1.3	4	1.7	0.4	2

- a: 结果来自掺入增殖脾细胞 DNA 中[³H]胸苷掺入量
- b: 样品一式四份
- c: 突变体活性除以在相同剂量和相同分析的野生型 SPE-A 活性，再乘以 100

10

表 12：与单突变体、双突变体和野生型 SPE-A 相比，
三突变的 SPE-A 诱导鼠脾细胞的增殖的能力

蛋白质	1,000 ng/孔			100 ng/孔		
	cpm(10 ³) ^a	SD ^b	% ^c	cpm(10 ³)	SD	%
SPE A	23	2.5		NT ^d		
N20D/C98S	0.6	0.5	2.6	NT		
SPE A	15	3.4		52	1.8	
D45N	9	2.4	60	24	8.4	44
N20D/D45N/C98S	12	5	80	23	1.8	46

- a: 结果来自掺入增殖脾细胞 DNA 中[³H]胸苷掺入量
- b: 样品一式四份
- c: 突变体活性除以在相同剂量和相同分析的野生型 SPE-A 活性，再乘以 100
- d: NT，未测试

15

表 13：与单突变体、双突变体和野生型 SPE-A 相比，
三突变的 SPE-A 诱导人 PBMC 的增殖的能力

蛋白质	100 ng/孔			10 ng/孔		
	cpm(10 ³) ^a	SD ^b	% ^c	cpm(10 ³)	SD	%
SPE A	31	3		22	2	
D45N	11	1.5	35	14.4	1.5	65
N20D/C98S	2.6	1	8	0.1	0.3	0.5
N20D/D45N/C98S	10	0.6	32	0.9	0.3	4

- a: 结果来自掺入增殖脾细胞 DNA 中[³H]胸苷掺入量
- b: 样品一式四份
- 5c: 突变体活性除以在相同剂量和相同分析的野生型 SPE-A 活性, 再乘以 100
- d: NT，未测试

诱导 IFN-γ 和 TNF-α 分泌

还评估了 N20D/D45N/C98S 诱导鼠脾细胞和人 PBMC 细胞分泌 IFN-γ 和

10 TNF-α 的能力。在用于测试增殖性(表 12 和 13)的细胞培养物的上清液中测试这些细胞因子。在用突变型或野生型 SPE-A 处理的细胞培养物被孵育 96 小时后，回收用于测试细胞因子的上清液，其中对于鼠和人细胞使用的剂量分别为 1,000ng/孔和 100ng/孔。IFN-γ 和 TNF-α 两者的分泌在人细胞中都比在鼠细胞中更受影响(表 14)。这与观察到的细胞增殖水平(表 12 和 13)是相关的。然而，在各

15 个种类的因子中，TNF-α 分泌似乎较不依赖于细胞增殖(表 14)。人细胞在受到 D45N 和三重突变蛋白的刺激时其增殖水平相同，但是在用 N20D/D45N/C98S 处理时 TNF-α 的分泌量更多。与之相反，鼠细胞用 N20D/D45N/C98S 处理时增殖得较好，而用同一毒素刺激时 TNF-α 的分泌量却较小。在用透明质酸酶处理的细胞和未处理的人细胞的上清液中，只观察到非常少的细胞因子分泌，但是未处理

20 的鼠对照细胞却在分泌两种被测试细胞因子方面较活跃。这可部分归咎于，在用任一种突变蛋白处理的鼠细胞上清液中 IFN-γ 和 TNF-α 的惊人高水平(表 14)。

表 14 三重突变的 SPE-A 在鼠脾细胞和人 PBMC 中诱导细胞因子分泌

蛋白质	IFN- γ^a				TNF- α^b			
	人 ^c		鼠 ^d		人		鼠	
	pg/ml ^e	%	pg/ml	%	pg/ml	%	pg/ml	%
N20D/D45N/C98S	2880	27	2508	41	782	59	680	72
D45N	2708	26	3058	50	428	32	898	96
SPE A	10484		6076		1336		940	
透明质酸酶	0		0		46		11	
无	0		592	2	40		305	

a: IFN- γ , γ -干扰素

b: TNF- α , α -肿瘤坏死因子

c: 人 PBMC, 2×10^5 /孔, 用 100ng/孔的野生型和突变型毒素进行刺激。每个增殖
5 分析的样品在 96 小时收获, 然后测定上清液中的细胞因子浓度。

d: 鼠脾细胞, 5×10^5 /孔, 用 1,000ng/孔的野生型和突变型毒素进行刺激。每个增殖
分析的样品在 96 小时收获, 然后测定上清液中的细胞因子浓度。

e: 在突变体刺激后释放的细胞因子的 pg/ml 除以同一测试中在野生型刺激后释放
的因子的 pg/ml。

10

N20D/D45N/C98S 蛋白的毒性。在 American Dutch 条纹兔中, 测试
N20D/D45N/C98S 蛋白的增强内毒素休克性的能力。给动物静脉注射 5 微克/千克体
重的 N20D/D45N/C98S 蛋白或野生型 SPE-A 蛋白。4 小时后, 静脉注射 10 微克/
15 千克体重的来自鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的内毒素。在注射内毒素
后, 在 48 小时内监测动物的 STSS 症状和死亡情况。数据列于表 15。所有施用
N20D/D45N/C98S 蛋白的动物都存活, 并且尸体解剖检查也未发现器官受损。与
与之相反, 用野生型 SPE-A 处理的所有动物都死亡了。这一结果表明, 三重突变蛋
白没有可检测的体内毒性。

20

表 15: 三重突变的 N20D/D45N/C98S SPE-A 在
兔内毒素增强模型中的致死性和毒性

蛋白质	多器官毒性 ^a	未死亡数目/动物总数 ^b	p ^c
N20D/D45N/C98S	0/9	0/3	0.05
SPE A	ND ^d	3/3	

- a:仅对存活动物通过尸体解剖检查肝、脾、肺和心而加以判断。对每只动物中的每个受损器官给一分。可能分值的总和为 3/动物。数值指总的受损分/该组动物。
- b: 动物是静脉施用 5 微克/千克体重的野生型 SPE-A 或突变体。在 4 小时后，给它们施用 10 微克/千克体重的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)内毒素。
- 5 c: 将三重突变体的致死性与野生型的致死性相比。
- d: ND，未测试

D45N 和 N20D/D45N/C98S 蛋白抗原性。对蛋白 D45N、N20D/C98S、N20D/D45N/C98S 和起始突变蛋白 N20D，评估了它们在动物刺激产生对野生型 SPE-A 特异的抗体应答的能力。对于 5 组 American Dutch 条纹兔，每组或者未被处理，或者用 D45N、N20D、N20D/C98S、N20D/D45N/C98S 之一进行处理。在 IFA 中，每隔一周通过皮下注射 25 微克蛋白质，共 3 次。抗 SPE-A 抗体的效价是通过 ELISA 法，在最后一次免疫后 7 天所获得的血清中进行测定。如表 16 所示，除了未处理组之外，在所有组中的动物都有明显比对应的免疫前效价更高的抗体效价。

10

15

表 16 与单突变体、双突变体、和野生型 SPE-A 相比，
三重突变 SPE-A 在兔中的抗原性

免疫剂	免疫前 ^a		免疫 ^c		p ^d
	效价 ^b	范围	效价	范围	
无	18	10-20	24	20-40	0.21
N20D	60	20-160	1600	1000-2000	0.003
D45N	26	10-40	6400	4000-8000	0.003
N20D/C98S	32	20-80	1220	100-2000	0.03
N20D/D45N/C98S	16	10-40	3400	1000-8000	0.037

- a:在施用第一次毒素剂量之前，对兔子进行放血。
- 20 b: 5 只兔子血清的平均效价
- c:在第三次施用免疫剂量后 7 天，对兔子进行放血。
- d:在各组中，将免疫前的血清效价与免疫后的效价用双尾 t-测试法进行比较，其中假设方差不相等。

表 17

在用不同物质免疫的动物组中，用双尾 t-测试法
(其中假设方差不相等)确定的血清效价差异的显著性，

免疫剂	无	N20D/D45N/C98S	D45N	N20D/C98S
N20D	<0.001	0.0656	<0.001	0.3471
N20D/C98S	0.0015	0.0748	0.0185	
D45N	<0.001	0.0656		
N20D/D45N/C98S	<0.001			

- 5 此外，全部免疫组的抗体效价都显著高于未免疫的对照组(表 17)。蛋白质 D45N 的免疫原性最强，可刺激的平均效价达 6,400，而且其范围仅两个系列 1：2 稀释(表 16)。该蛋白质比 N20D 能明显更有效地作为抗原(表 17)。当 D45N 与 N20D 和 C98S 存在于同一分子中时，其免疫原性下降较多，如所示其平均效价为 3,400(表 17)。与仅有 N20D 相比，对 N20D/D45N/C98S 的抗体反应的一致性也较
- 10 低，其效价在 1000 和 8000 之间(4 次 1：2 稀释)。然而通过比较 D45N 免疫效价和 N20D/D45N/C98S 免疫效价的对数(用 t-测试法比较)，可以认为两组的差别仅有 10%可信度(表 17)。类似地，用 N20D 免疫的和 N20D/C98S 免疫的兔子的效价(分别为 1,600 和 1,220)相互并没有显著不同(表 26 和 27)，它们各与 N20D/D45N/C98S 免疫效价有 10%可信度的差异。总而言之，N20D/D45N/C98S
- 15 蛋白具有中等的引发抗 SPE-A 的抗体应答的能力。

- N20D/D45N/C98S 的保护能力。在保护动物免受野生型 SPE-A 的侵袭的能力方面，评估了三重突变蛋白，并将其与 N20D、D45N 和双突变体 N20D/C98S 比较。对于前面章节中的兔子(其抗体效价示于表 16)，通过微型渗透泵方式进行侵袭。在泵中装载 500 微克(等于致死剂量的 2.5 倍)得自化脓链球菌(*S. Pyogenes*)的
- 20 SPE-A。在植入微型渗透泵后 15 天，监测动物的 STSS 症状和死亡情况。在植入之前和植入之后二天各测量直肠温度一次。用 SPE-A 类毒素免疫的所有动物都存活了，而未免疫组的 5 只动物都死亡了(表 18)。

18: 与单突变体相比, SPE-A 双突变体和三突变体的免疫能力

免疫剂	多器官毒性 ^a	发热动物数目/ 动物总数 ^b	死亡数目/ 动物总数 ^c	p ^d
无	17/20	4/5	5/5	
N20D	0/15	0/5	0/5	0.004
N20D/C98S	0/15	0/5	0/5	0.004
D45N	0/15	2/5	0/5	0.004
N20D/D45N/C98S	0/15	1/5	0/5	0.004

a: 通过尸体解剖检查肝、脾、肺和心而加以判断。对每只动物中的每个受损器官给一分。可能分值的总和, 对于对照组为 20 分, 对于处理组为 15 分(省略了肺)。分数指总受损分/各组动物的总分。

5 b: 摄氏度。在基线和植入微型渗透泵后 2 天测量直肠温度。当温度增加 $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ 时, 认为发热。

c: 微型渗透泵装载有 500 微克野生型 SPE-A

d: 用 Fisher 精确概率测试法, 比较免疫接种组动物和未处理组之间的致死性数据。

10

致死性结果是显著的($p=0.004$)。未免疫组的 4 只动物的体温显著上升: (超过 0.5°C)(表 18)。在免疫组中, 用 D45N 和 N20D/D45N/C98S 免疫时有一些动物发热(分别为 2/5 和 1/5)。或者在死亡后(对照组)或在安乐死后(处理组), 评估所有的动物的总体器官异常情况。免疫组动物都没有器官受损(表 18)。这表明, 免疫接

15 种对兔子没有毒性, 而且在所有动物中的针对类毒素的抗体能够阻断野生型 SPE-A 的侵袭毒性。相反, 未免疫动物有 17 分的器官受损分值(可能的总分为 20 分)(表 18), 这表明, 每只动物至少有 2 个外观异常的器官。这些结果一起表明, 用 N20D/D45N/C98S 突变体来免疫接种可安全而有效地保护 STSS 模型动物。

20 尽管本发明结合具体例子进行了描述, 但是专利的覆盖范围并不限于这些具体例子, 而应由下面的权利要求所决定。

序列表

(1) 一般信息:

5 (i) 申请人:

(A) 姓名: Regents of the University of Minnesota

(B) 街道: Morrill Hall, 100 Church Street, S.E.

(C) 城市: Minneapolis

(D) 州: Minnesota

10 (E) 国家: 美国

(F) 邮政编码 (邮编): 55415-1226

(ii) 发明名称: 链球菌毒素A突变体及其使用方法

15 (iii) 序列数目: 13

(iv) 计算机可读形式:

(A) 记录介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容型

20 (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(v) 本申请资料:

(A) 申请号:

25 (B) 申请日: 07-6月-1996

(C) 分类:

(vi) 在先申请资料:

(A) 申请号: US 08/480,261

30 (B) 申请日: 07-6月-1995

(C) 分类:

(2) SEQ ID NO:1的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 29 碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

CCATCACGGG TGGATTCTTG AAACAGGTG 29

15 (2) SEQ ID NO:2的信息:

(i) 序列特征:

- 20 (A) 长度: 47 碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

CCATCACGCC CCCCCTCGAC GATAAAATAG TTGCTAAGCT ACAAGCT 47

(2) SEQ ID NO:3的信息:

30

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 172 碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

5 (ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

```

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA    60
10 TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA    120
ATTTCATATA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAATAAT AAATAATTAA TC              172

```

15 (2) SEQ ID NO:4的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 172 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- 20 (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

```

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA    60
TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA    120
30 ATTTCATATA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAATAAT AAATAATTAA TC              172

```

(2) SEQ ID NO:5的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 172 碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA 60
15 TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA 120
ATTTCATAA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAAATAAT AAATAATTAA TC 172

(2) SEQ ID NO:6的信息:

20

(i) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 172 碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

30

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA 60

TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA 120

ATTTCCATAA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAAATAAT AAATAATTAA TC 172

5 (2) SEQ ID NO:7的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 172 碱基对

(B) 类型: 核酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

15 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA 60

TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA 120

20

ATTTCCATAA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAAATAAT AAATAATTAA TC 172

(2) SEQ ID NO:8的信息:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 172 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

30

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA 60

5 TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA 120

ATTTCATAA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAAATAAT AAATAATTAA TC 172

10 (2) SEQ ID NO:9的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 172 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- 15 (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA 60

TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA 120

25 ATTTCATAA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAAATAAT AAATAATTAA TC 172

(2) SEQ ID NO:10的信息:

30

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 172 碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

5 (ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

CCATCACCAT CACCAAGAAG AAATAATTAC ATATTAAATA CAATACATAT GTAATAATAA 60
10 TAAATATATA AATAAAATAA TTACATATTA AAAATAATAC TTAATTATAA AAACACTATA 120
ATTTCATAA ATATTAATAA ATAATTAAAA ATAAAATAAT AAATAATTAA TC 172

15

(2) SEQ ID NO:11的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 31 碱基对
- 20 (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

CCATCACGGG TGGATCCTTG AACAGGTGC A 31

30

(2) SEQ ID NO:12的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1851 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

5 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(ix) 特征:

10 (A) 名称/分类名称: CDS

(B) 位置: 828..1583

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

```

15  CCATCAGCA TCACTCATGT TTGACAGCTT ATCATCGATA AGCTTACTTT TCGAATCAGG      60
    TCTATCCTTG AAACAGGTGC AACATAGATT AGGGCATGGA GATTTACCAG ACAACTATGA      120
    ACGTATATAC TCACATCACG CAATCGGCAA TTGATGACAT TGGAACATAA TTCAATCAAT      180
20  TTGTTACTAA CAAGCAACTA GATTGACAAC TAATTCTCAA CAAACGTTAA TTTAACAACA      240
    TTCAAGTAAC TCCCACCAGC TCCATCAATG CTTACCGTAA GTAATCATAA CTTACTAAAA      300
    CCTTGTTACA TCAAGGTTTT TTCTTTTGT CTTGTTTATG AGTTACCATA ACTTTCTATA      360
    TTATTGACAA CTAAATTGAC AACTCTTCAA TTATTTTCT GTCTACTCAA AGTTTTCTTC      420
    ATTTGATATA GTCTAATTCC ACCATCACTT CTTCCACTCT CTCTACCGTC ACAACTTCAT      480
30  CATCTCTCAC TTTTTCGTGT GGTAACACAT AATCAAATAT CTTTCCGTTT TTACGCACTA      540

```

	TCGCTACTGT GTCACCTAAA ATATACCCCT TATCAATCGC TTCTTTAAAC TCATCTATAT	600
	ATAACATATT TCATCCTCCT ACCTATCTAT TCGTAAAAAG ATAAAAATAA CTATTGTTTT	660
5	TTTTGTTATT TTATAATAAA ATTATTAATA TAAGTTAATG TTTTTTAAAA ATATACAATT	720
	TTATTCTATT TATAGTTAGC TATTTTTTCA TTGTTAGTAA TATTGGTGAA TTGTAATAAC	780
10	CTTTTTAAAT CTAGAGGAGA ACCCAGATAT AAAATGGAGG AATATTA ATG GAA AAC	836
	Met Glu Asn	
	1	
	AAT AAA AAA GTA TTG AAG AAA ATG GTA TTT TTT GTT TTA GTG ACA TTT	884
	Asn Lys Lys Val Leu Lys Lys Met Val Phe Phe Val Leu Val Thr Phe	
15	5 10 15	
	CTT GGA CTA ACA ATC TCG CAA GAG GTA TTT GCT CAA CAA GAC CCC GAT	932
	Leu Gly Leu Thr Ile Ser Gln Glu Val Phe Ala Gln Gln Asp Pro Asp	
	20 25 30 35	
20	CCA AGC CAA CTT CAC AGA TCT AGT TTA GTT AAA AAC CTT CAA AAT ATA	980
	Pro Ser Gln Leu His Arg Ser Ser Leu Val Lys Asn Leu Gln Asn Ile	
	40 45 50	
25	TAT TTT CTT TAT GAG GGT GAC CCT GTT ACT CAC GAG AAT GTG AAA TCT	1028
	Tyr Phe Leu Tyr Glu Gly Asp Pro Val Thr His Glu Asn Val Lys Ser	
	55 60 65	
	GTT GAT CAA CTT TTA TCT CAC CAT TTA ATA TAT AAT GTT TCA GGG CCA	1076
30	Val Asp Gln Leu Leu Ser His His Leu Ile Tyr Asn Val Ser Gly Pro	
	70 75 80	

	AAT TAT GAT AAA TTA AAA ACT GAA CTT AAG AAC CAA GAG ATG GCA ACT	1124
	Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Thr Glu Leu Lys Asn Gln Glu Met Ala Thr	
	85 90 95	
5	TTA TTT AAG GAT AAA AAC GTT GAT ATT TAT GGT GTA GAA TAT TAC CAT	1172
	Leu Phe Lys Asp Lys Asn Val Asp Ile Tyr Gly Val Glu Tyr Tyr His	
	100 105 110 115	
	CTC TGT TAT TTA TGT GAA AAT GCA GAA AGG AGT GCA TGT ATC TAC GGA	1220
10	Leu Cys Tyr Leu Cys Glu Asn Ala Glu Arg Ser Ala Cys Ile Tyr Gly	
	120 125 130	
	GGG GTA ACA AAT CAT GAA GGG AAT CAT TTA GAA ATT CCT AAA AAG ATA	1268
	Gly Val Thr Asn His Glu Gly Asn His Leu Glu Ile Pro Lys Lys Ile	
15	135 140 145	
	GTC GTT AAA GTA TCA ATC GAT GGT ATC CAA AGC CTA TCA TTT GAT ATT	1316
	Val Val Lys Val Ser Ile Asp Gly Ile Gln Ser Leu Ser Phe Asp Ile	
	150 155 160	
20	GAA ACA AAT AAA AAA ATG GTA ACT GCT CAA GAA TTA GAC TAT AAA GTT	1364
	Glu Thr Asn Lys Lys Met Val Thr Ala Gln Glu Leu Asp Tyr Lys Val	
	165 170 175	
25	AGA AAA TAT CTT ACA GAT AAT AAG CAA CTA TAT ACT AAT GGA CCT TCT	1412
	Arg Lys Tyr Leu Thr Asp Asn Lys Gln Leu Tyr Thr Asn Gly Pro Ser	
	180 185 190 195	
	AAA TAT GAA ACT GGA TAT ATA AAG TTC ATA CCT AAG AAT AAA GAA AGT	1460
30	Lys Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Pro Lys Asn Lys Glu Ser	
	200 205 210	

	TTT TGG TTT GAT TTT TTC CCT GAA CCA GAA TTT ACT CAA TCT AAA TAT	1508
	Phe Trp Phe Asp Phe Phe Pro Glu Pro Glu Phe Thr Gln Ser Lys Tyr	
	215 220 225	
5	CTT ATG ATA TAT AAA GAT AAT GAA ACG CTT GAC TCA AAC ACA AGC CAA	1556
	Leu Met Ile Tyr Lys Asp Asn Glu Thr Leu Asp Ser Asn Thr Ser Gln	
	230 235 240	
	ATT GAA GTC TAC CTA ACA ACC AAG TAA CTTTTTGCTT TTGGCAACCT	1603
10	Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys *	
	245 250	
	TACCTACTGC TGGATTTAGA AATTTTATTG CAATTCTTTT ATTAATGTAA AAACCGCTCA	1663
15	TTTGATGAGC GGTTTTGTCT TATCTAAAGG AGCTTTACCT CCTAATGCTG CAAAATTTTA	1723
	AATGTTGGAT TTTTGTATTT GTCTATTGTA TTTGATGGGT AATCCCATTT TTCGACAGAC	1783
	ATCGTCGTGC CACCTCTAAC ACCAAAATCA TAGACAGGAG CTTGTAGCTT AGCAACTATT	1843
20	TTATCGTC	1851

(2) SEQ ID NO:13的信息:

- 25 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 252 氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑结构: 线性

- 30 (ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

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

66

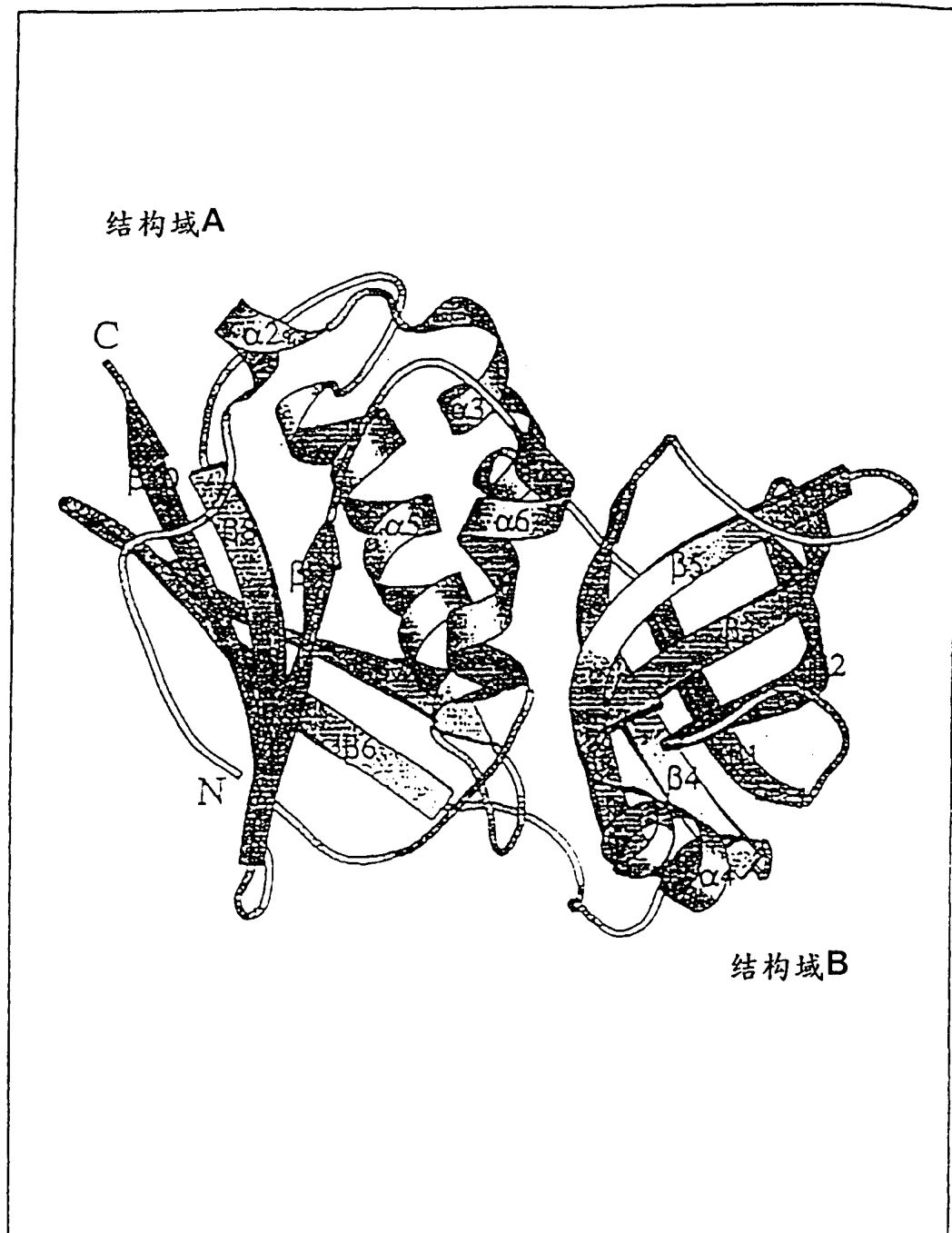


图 1

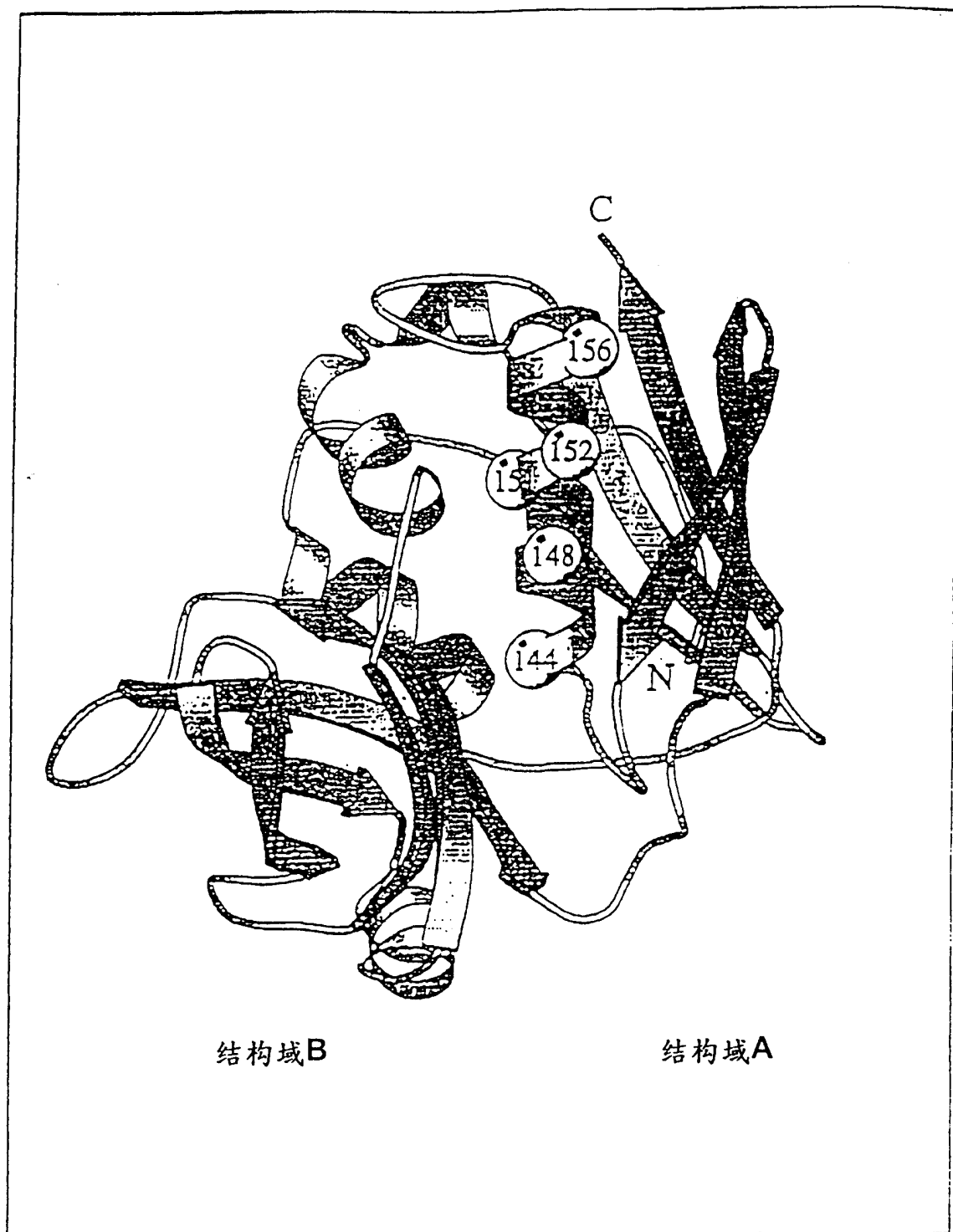


图 2

[illegible]

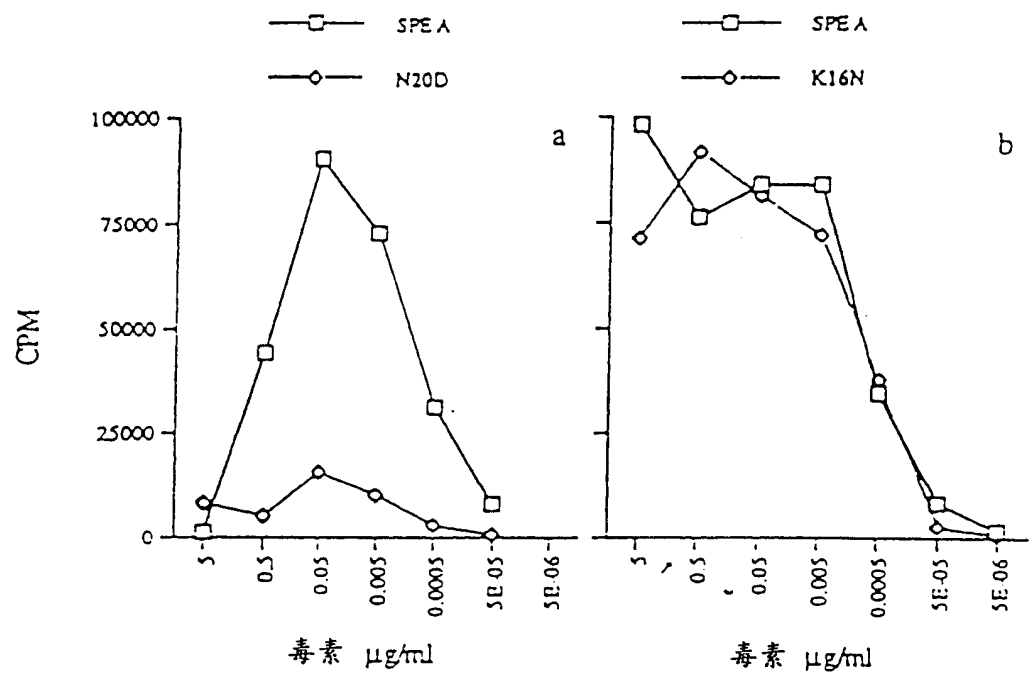


图 4

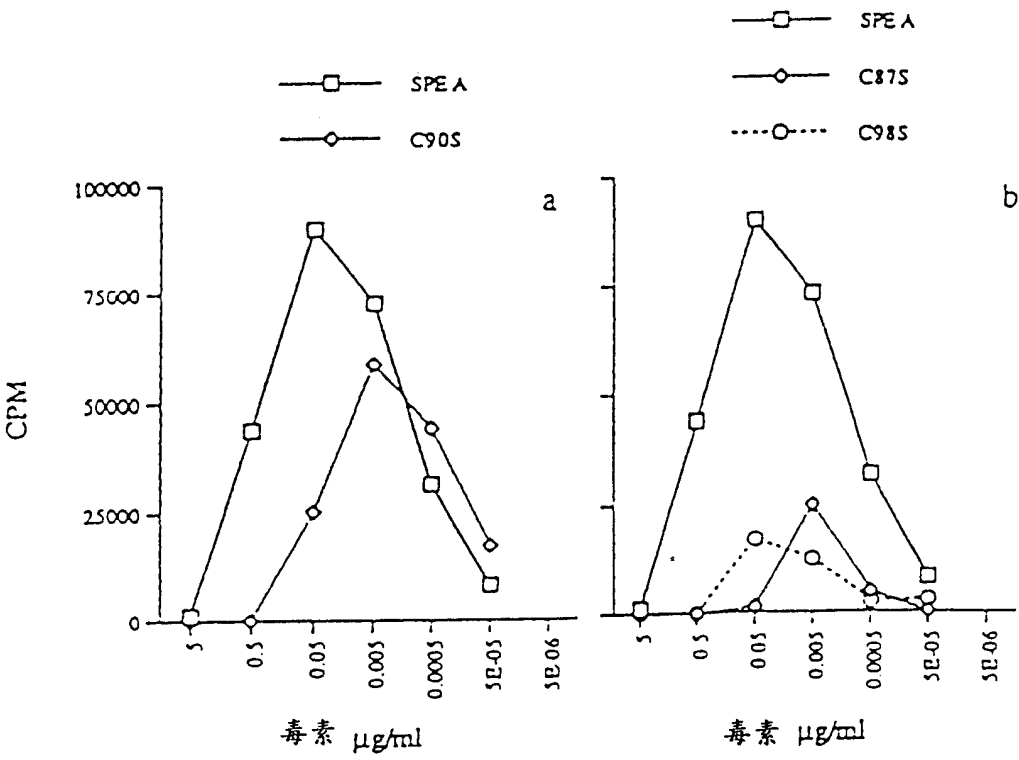


图 5

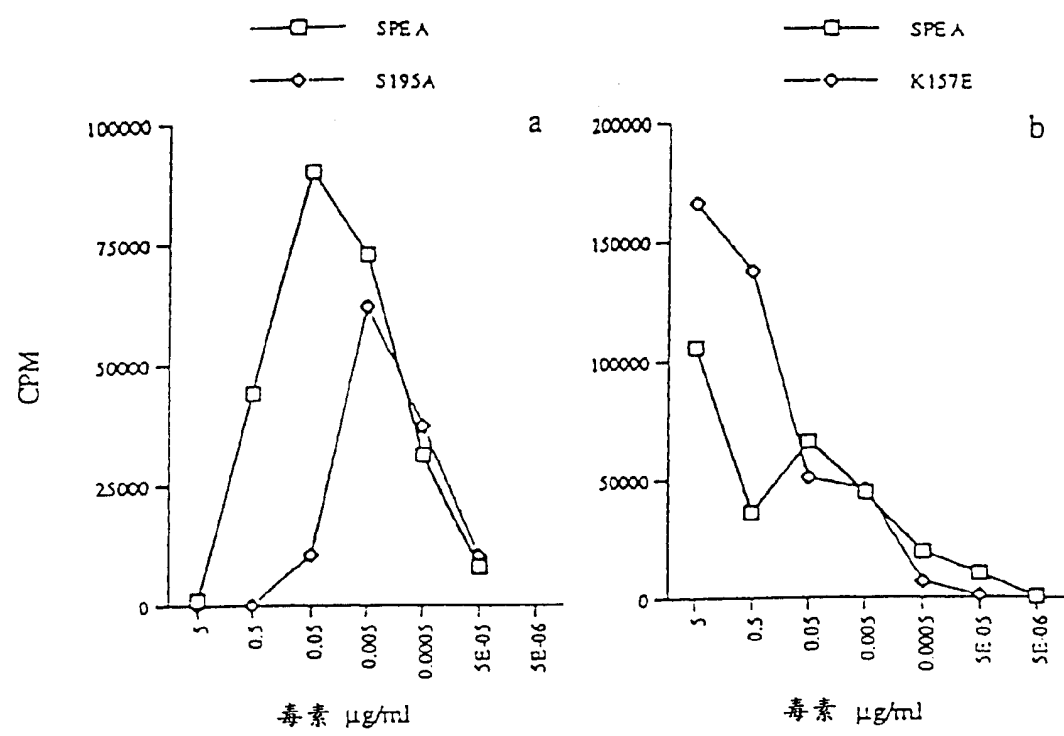


图 6

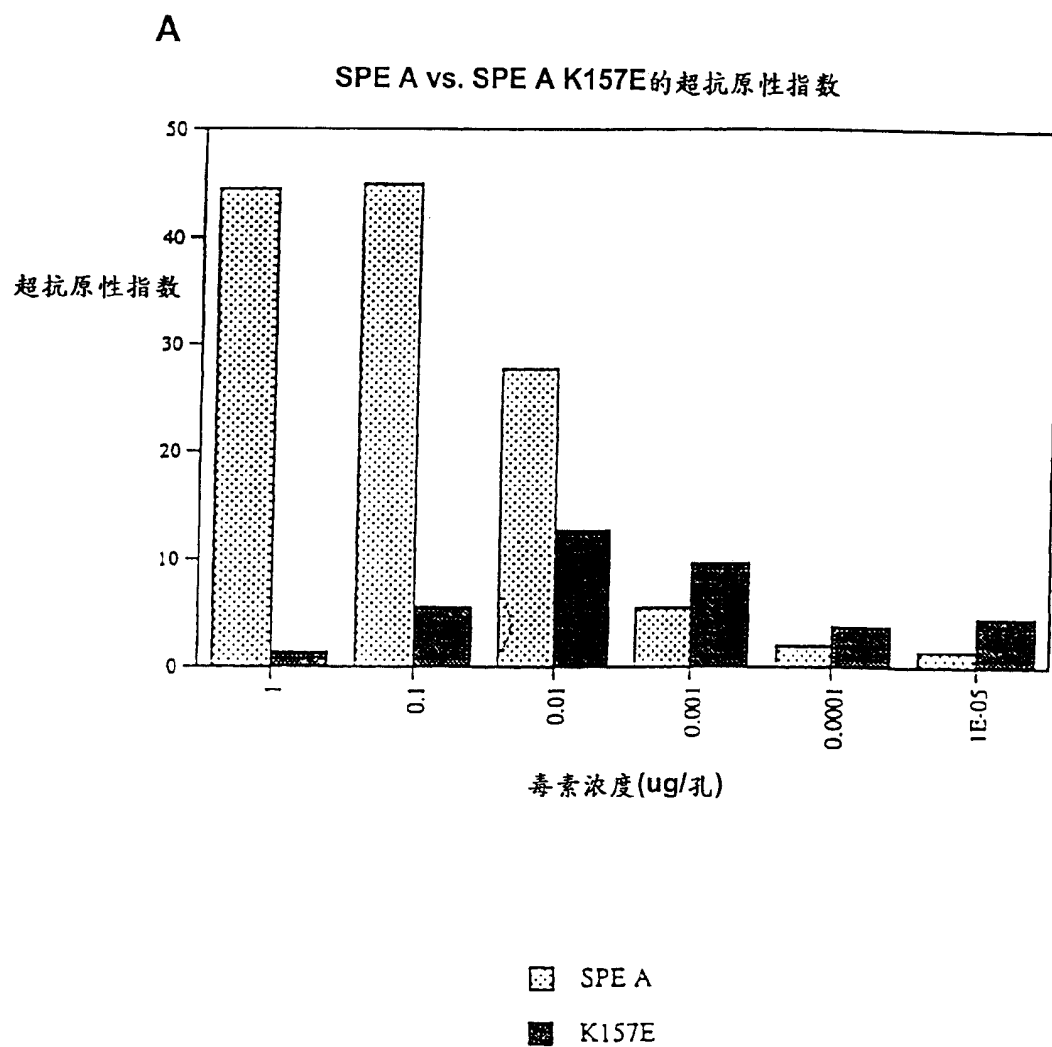
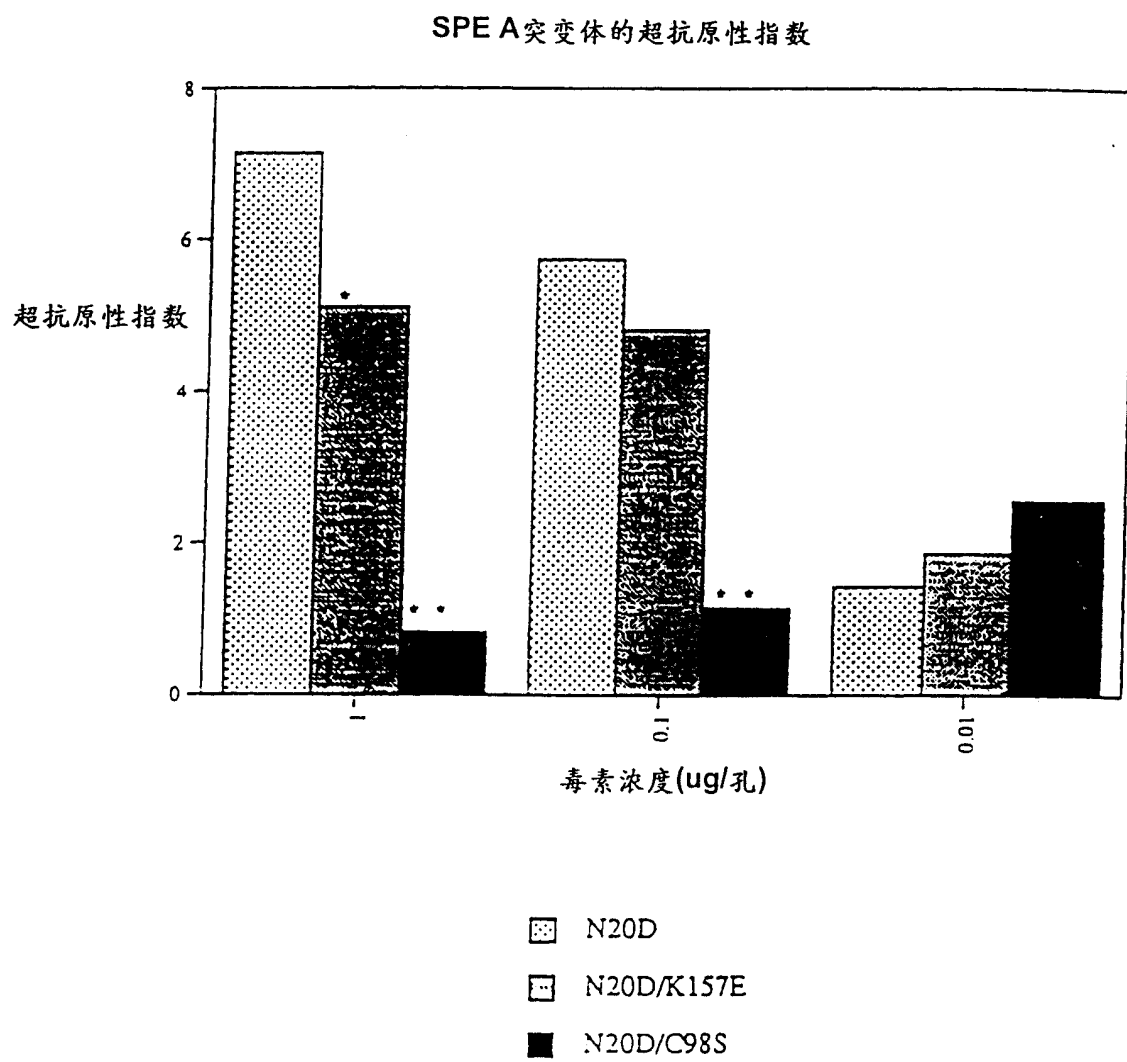


图 7

B

· 与N20D显著不同, $p<0.01$

.. 与N20D显著不同, $p<0.01$,在1ug时; $p<0.001$,在0.1ug时

图 8

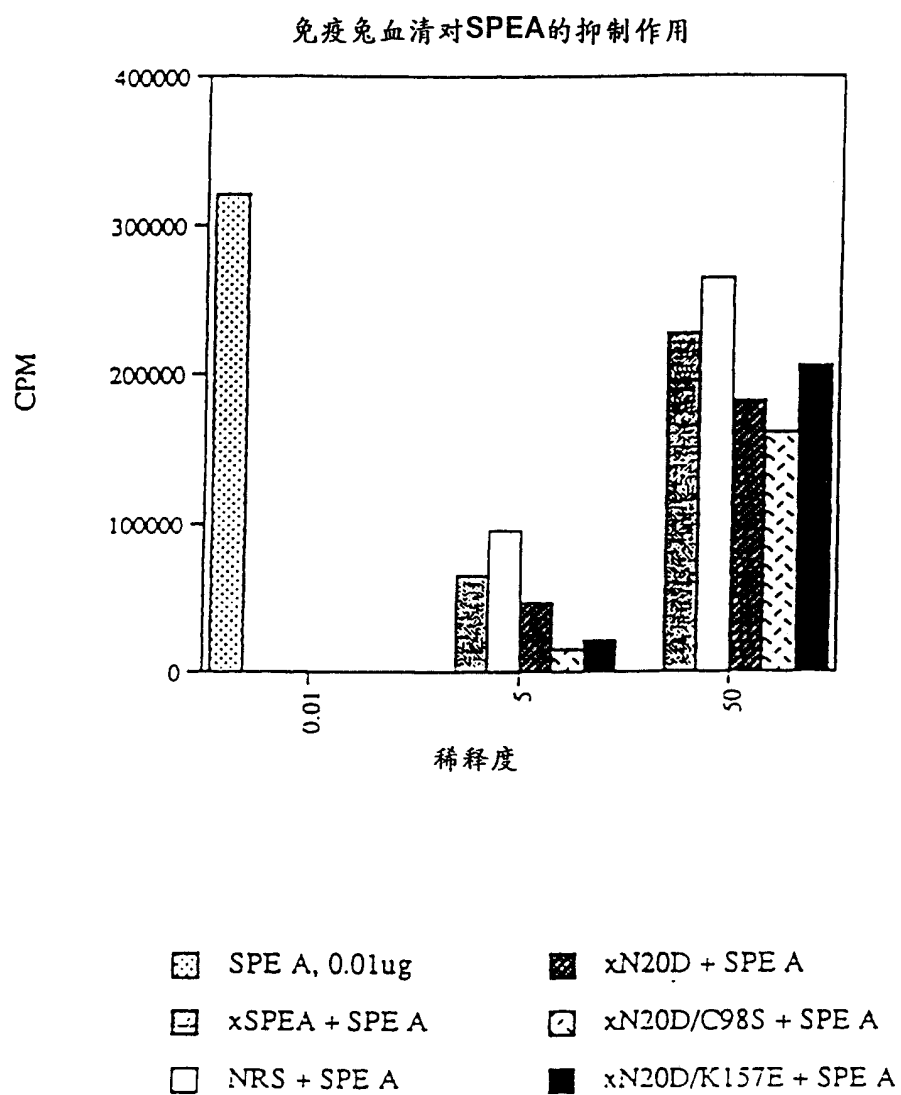


图 9

SPE A

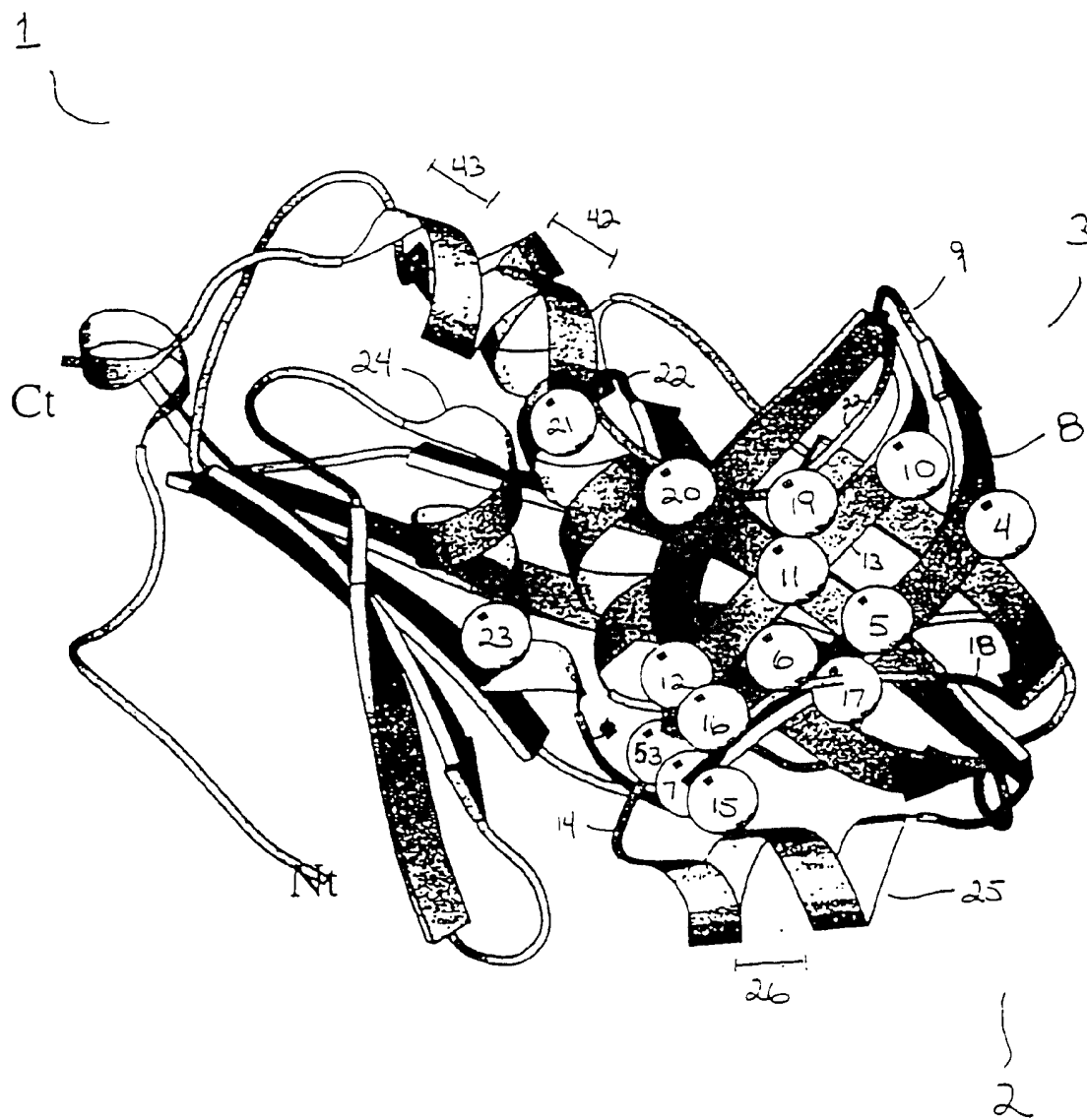
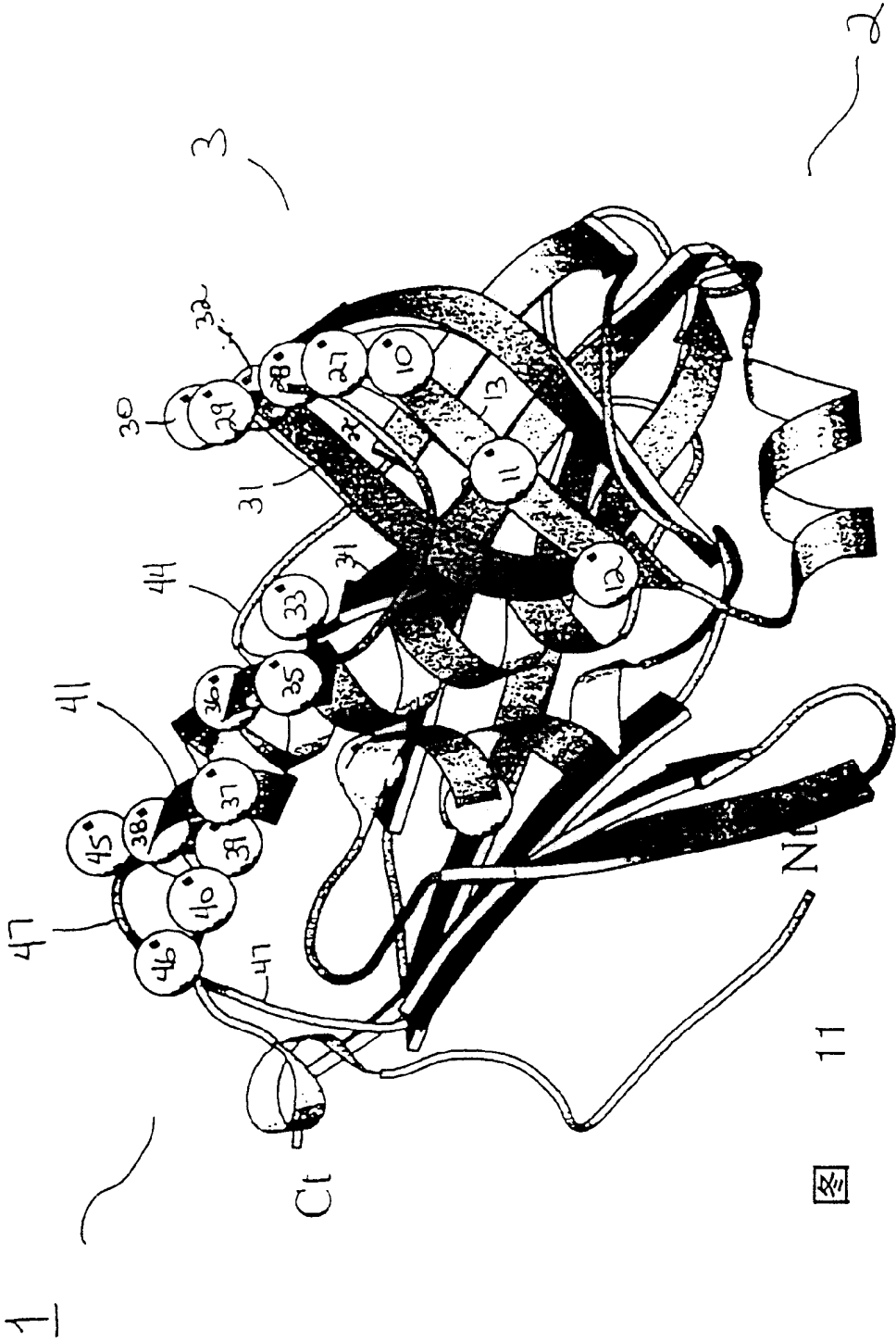
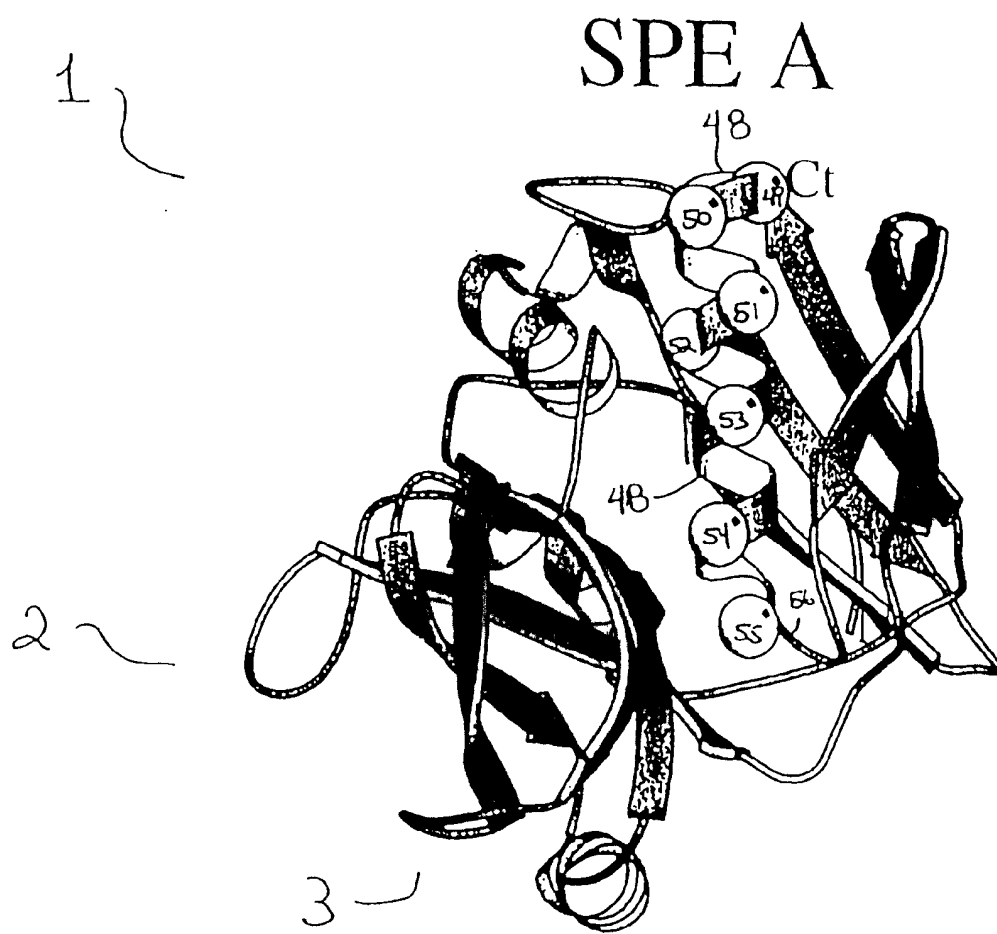


图 10

SPE A





图

12

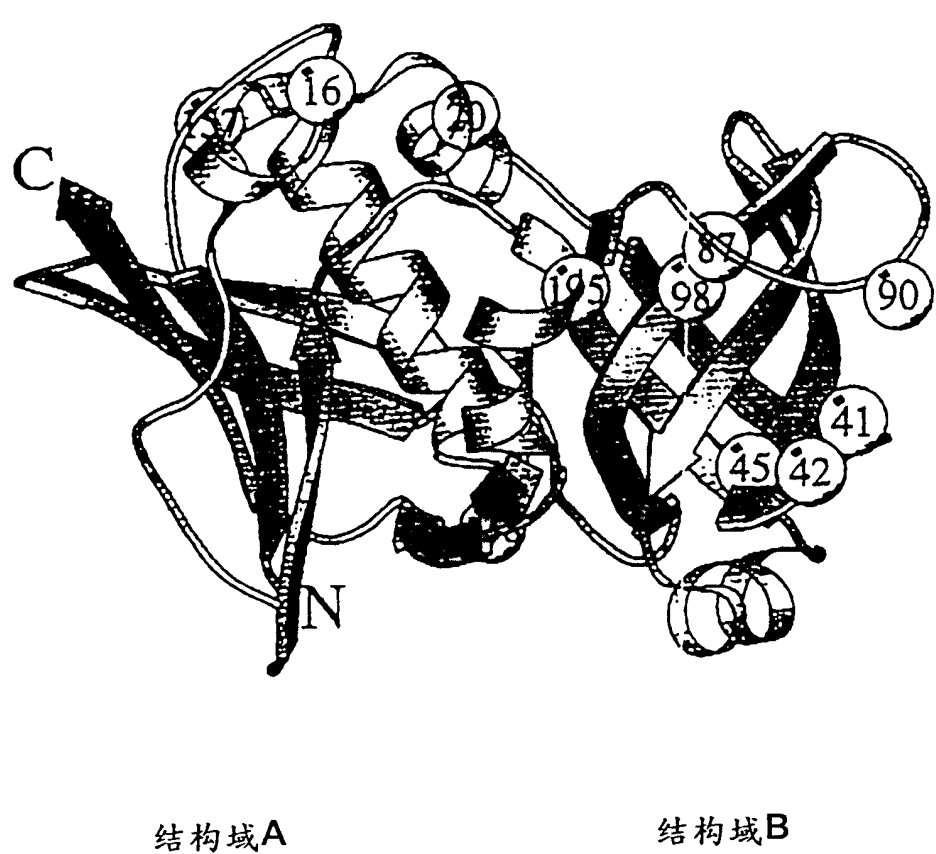


图 13