



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101977927 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 200980109218. 8

(22) 申请日 2009. 03. 17

(30) 优先权数据

08102655. 1 2008. 03. 17 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/053119 2009. 03. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/115508 EN 2009. 09. 24

(71) 申请人 英特塞尔股份公司

地址 奥地利维也纳

(72) 发明人 A · 迈因克 A · 托伊本巴赫 B · 森

M · 泽布斯 M · 汉纳 J · 皮卡洛

E · 纳吉 C · 吉芬 A · 冯加拜因

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 14/315 (2006. 01)

C07K 16/12 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

A61K 39/09 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 48 页 附图 12 页

(54) 发明名称

针对肺炎链球菌保护的肽以及与其有关的组
合物、方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) 的
保护肽或该保护肽的功能活性变体 ; 包括至少 2
种保护肽或其功能活性变体的组合物 ; 包括选自
下述的至少 2 种蛋白质的组合物 : i) 第一种类型
的保护肽或其功能活性变体, ii) 第二种类型的
保护肽或其功能活性变体, 和 iii) 支持肽或其功
能活性变体 ; 编码保护肽或其功能活性变体或组
合物中包括的至少 2 种蛋白质的一种或多种核
酸 ; 包括保护肽或其功能活性变体、组合物或一
种或多种核酸的药物组合物 ; 使用保护肽或其功
能活性变体或组合物产生抗体的方法 ; 保护肽或
其功能活性变体和 / 或组合物和 / 或一种或多种
核酸用于制造药剂的用途, 所述药剂用于受试者
的免疫或治疗 ; 使用保护肽或其功能活性变体、
组合物或对于一种或多种核酸特异的引物和 / 或
探针诊断肺炎链球菌感染的方法 ; 用于鉴定能够
与保护肽或其功能活性变体结合的配体的方法 ;
和保护肽或其功能活性变体用于分离和 / 或纯化
和 / 或鉴定肽的相互作用配偶体的用途。

1. 保护肽或所述保护肽的功能活性变体,所述保护肽由 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成。

2. 权利要求 1 的保护肽的功能活性变体,其中所述功能活性变体

a) 是所述保护肽的功能活性片段,所述功能活性片段包括所述保护肽序列的至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

b) 通过至少一个氨基酸置换和 / 或缺失而衍生自所述保护肽,其中所述功能活性变体与所述保护肽或如 a) 中限定的所述功能活性片段具有至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ;和 / 或

c) 由所述保护肽或其功能活性变体和另外对于所述保护肽异源的至少一个氨基酸组成。

3. 组合物,其包括选自保护蛋白质的至少 2 种蛋白质,所述保护蛋白质包括权利要求 1 或 2 的保护肽或其功能活性变体、或由权利要求 1 或 2 的保护肽或其功能活性变体组成。

4. 组合物,其包括选自下述的至少 2 种蛋白质

i) 包括权利要求 1 或 2 的保护肽或其功能活性变体、或由权利要求 1 或 2 的保护肽或其功能活性变体组成的保护蛋白质 ;

ii) 包括另外保护肽或所述另外保护肽的功能活性变体、或由另外保护肽或所述另外保护肽的功能活性变体组成的另外保护蛋白质,所述另外保护肽由 SEQ ID NO :6 或 7 的氨基酸序列组成,和

iii) 包括 SEQ ID NO :8 的支持肽或所述支持肽的功能活性变体、或由 SEQ ID NO :8 的支持肽或所述支持肽的功能活性变体组成的支持蛋白质,

其中所述至少 2 种蛋白质选自亚组 i)、ii) 和 iii) 中的至少 2 个。

5. 组合物,其包括选自下述的至少 3 种蛋白质

i) 包括权利要求 1 或 2 的保护肽或其功能活性变体、或由权利要求 1 或 2 的保护肽或其功能活性变体组成的保护蛋白质 ;

ii) 包括另外保护肽或所述另外保护肽的功能活性变体、或由另外保护肽或所述另外保护肽的功能活性变体组成的另外保护蛋白质,所述另外保护肽由 SEQ ID NO :6 或 7 的氨基酸序列组成,和

iii) 包括 SEQ ID NO :8 的支持肽或所述支持肽的功能活性变体、或由 SEQ ID NO :8 的支持肽或所述支持肽的功能活性变体组成的支持蛋白质,

其中所述至少 3 种蛋白质选自亚组 i)、ii) 和 iii) 中的至少 2 个。

6. 根据权利要求 5 的组合物,其中至少 1 种蛋白质选自亚组 i),并且至少 2 种蛋白质选自亚组 ii) 和 / 或 iii)。

7. 根据权利要求 5 的组合物,其中所述至少 3 种蛋白质选自 3 个亚组 i)、ii) 和 iii)。

8. 权利要求 3-7 中任一项的组合物,其中将所述至少 2 种蛋白质的 2 种或更多种蛋白质组合到 1 种融合蛋白内。

9. 权利要求 4-8 中任一项的组合物,其包括

- 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 ii) 中定义的至少 1 种蛋白质 ;或

- 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 iii) 中定义的至少 1 种蛋白质 ;或
- 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 ii) 中定义的至少 2 种蛋白质 ;或
- 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 iii) 中定义的至少 2 种蛋白质 ;或
- 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 ii) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 iii) 中定义的至少 1 种蛋白质。

10. 权利要求 4-9 中任一项的组合物,其包括

- 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :6 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

- 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :7 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

- 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :8 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

- 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :6 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

- 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :6 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

- 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :7 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质。

11. 权利要求 4-10 中任一项的组合物,其中所述另外保护肽的所述功能活性变体

a) 是所述另外保护肽的功能活性片段,所述功能活性片段包括所述另外保护肽序列的至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

b) 通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而衍生自所述另外保护肽,并且与所述另外保护肽或如 a) 中限定的所述功能活性片段具有至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ;和 / 或

c) 由所述另外保护肽或其功能活性变体和对于所述另外保护肽异源的至少一个氨基酸组成。

12. 权利要求 4-11 中任一项的组合物,其中所述支持肽的所述功能活性变体

a) 是所述支持肽的功能活性片段,所述功能活性片段包含所述支持肽序列的至少

60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99%；

b) 通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而衍生自所述支持肽, 并且与所述支持肽或如 a) 中限定的所述功能活性片段具有至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性; 和 / 或

c) 由所述支持肽或其功能活性变体和对于所述支持肽异源的至少一个氨基酸组成。

13. 一种或多种核酸, 其编码根据权利要求 1 或 2 中任一项的保护肽或其功能活性变体中的任何、或在根据权利要求 3-12 中任一项的组合物中包括的一种或多种保护蛋白质。

14. 权利要求 13 的一种或多种核酸, 其中所述一种或多种核酸位于载体或除肺炎链球菌外的细胞中。

15. 药物组合物, 特别是疫苗, 其包括根据权利要求 1 或 2 中任一项的至少一种保护肽或其功能活性变体、或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物、和任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

16. 药物组合物, 其包括

(i) 根据权利要求 13 或 14 中任一项的一种或多种核酸、或与之互补的一种或多种核酸, 和

(ii) 任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

17. 用于产生抗体的方法, 其特征在于下述步骤:

(a) 给动物施用有效量的根据权利要求 1 或 2 中任一项的至少一种保护肽或其功能活性变体、和 / 或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物; 和

(b) 从所述动物中分离响应步骤 (a) 的施用由所述动物产生的抗体。

18. 用于产生抗体的方法, 其特征在于下述步骤:

(a) 使 B 细胞与有效量的根据权利要求 1 或 2 中任一项的至少一种保护肽或其功能活性变体、和 / 或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物相接触;

(b) 使步骤 (a) 的所述 B 细胞与骨髓瘤细胞相融合, 以获得杂交瘤细胞; 和

(c) 分离通过所述培养的杂交瘤细胞产生的所述抗体。

19. 权利要求 17 或 18 的方法, 其中所述经分离的抗体是另外纯化的。

20. 根据权利要求 1 或 2 中任一项的保护肽、和 / 或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物、和 / 或根据权利要求 13 或 14 中任一项的一种或多种核酸用于制造药剂的用途, 所述药剂用于受试者的免疫或治疗, 优选针对肺炎链球菌, 更优选针对由肺炎链球菌引起的肺炎、菌血症、中耳炎、脑膜炎、鼻窦炎、腹膜炎和 / 或关节炎。

21. 诊断肺炎链球菌感染的方法, 其包括步骤:

(a) 使得自受试者的样品与根据权利要求 1 或 2 中任一项的保护肽、和 / 或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物相接触; 和

(b) 检测所述样品中针对所述保护肽、所述功能活性变体和 / 或所述组合物的抗体的存在,

其中所述抗体的存在指示肺炎链球菌感染。

22. 用于诊断经由肺炎链球菌的感染的方法, 其包括步骤:

a) 使得自受试者的样品与对于根据权利要求 13 或 14 中任一项的一种或多种核酸特异的引物和 / 或探针相接触 ; 和

b) 检测所述样品中权利要求 13 或 14 中任一项的一种或多种核酸的存在, 其中所述一种或多种核酸的存在指示肺炎链球菌感染。

23. 用于鉴定能够与根据权利要求 1 或 2 中任一项的保护肽或其功能活性变体、和 / 或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物结合的配体的方法, 其包括 :

(a) 提供包括所述肽和 / 或所述组合物的测试系统,

(b) 使所述测试系统与测试化合物相接触, 和

(c) 检测响应所述测试化合物与所述肽和 / 或所述组合物结合产生的信号。

24. 根据权利要求 1 或 2 中任一项的保护肽或其功能活性变体、和 / 或根据权利要求 3-12 中任一项的组合物用于分离和 / 或纯化和 / 或鉴定所述肽的相互作用配偶体的用途。

针对肺炎链球菌保护的肽以及与其有关的组合物、方法和用途

[0001] 本发明涉及肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) (*S. pneumoniae*) 的保护肽或该保护肽的功能活性变体;包括至少 2 种保护肽或其功能活性变体的组合物;包括选自下述的至少 2 种蛋白质的组合物:i) 第一种类型的保护肽或其功能活性变体,ii) 第二种类型的保护肽或其功能活性变体,和 iii) 支持肽或其功能活性变体;编码保护肽或其功能活性变体或组合物中包括的至少 2 种蛋白质的一种或多种核酸;包括保护肽或其功能活性变体、组合物或一种或多种核酸的药物组合物;使用保护肽或其功能活性变体或组合物产生抗体的方法;保护肽或其功能活性变体和 / 或组合物和 / 或一种或多种核酸用于制造药剂用于受试者的免疫或治疗的用途;使用保护肽或其功能活性变体、组合物或对于一种或多种核酸特异的引物和 / 或探针诊断肺炎链球菌感染的方法;用于鉴定能够与保护肽或其功能活性变体结合的配体的方法;和保护肽或其功能活性变体用于分离和 / 或纯化和 / 或鉴定肽的相互作用配偶体的用途。

[0002] 肺炎链球菌 (肺炎球菌) 是柳叶刀 (lancet) 形状、革兰氏阳性、兼性厌氧菌。它是对于人类和实验动物致病的唯一有荚膜的生物体。荚膜是抗原性的并且构成用于通过血清型使肺炎球菌分类的基础。基于其与类型特异性抗血清的反应,已鉴定了 90 种血清型。肺炎链球菌的基因组包含约 2.16Mb。它具有 39.7% 的平均 GC 含量。肺炎链球菌是严格地人类病原体。通过随机鸟枪法测序策略测定指定为 TIGR4 (在本申请中称为 TIGR4_Tettelin) 的肺炎链球菌的荚膜血清型 4 分离物的完全基因组序列 (GenBank 登记号 AE005672)。这个临床分离物取自挪威 Kongsvinger 中的 30 岁男性患者的血液,并且在小鼠感染模型中是高度侵袭性和强毒的。

[0003] 已显示大多数肺炎链球菌血清型引起严重疾病,并且估计 10 种最常见的血清型占全世界约 62% 的侵袭性疾病。等级和血清型流行由于年龄组和地理区域而不同。

[0004] 肺炎球菌是呼吸道的常见定居菌,并且可以从 5% -70% 正常成人的鼻咽中分离出。无症状携带率随着年龄、环境和上呼吸道感染的存在而改变。仅 5% -10% 成人不包括儿童是携带者。在学校和孤儿院中,27% -58% 的学生和居民可能是携带者。在军事设施中,多达 50% -60% 的服务人员可能是携带者。携带持续时间不同,并且一般在儿童中比成人中更长 (在 *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 第 7 版 - 第二次印刷, *The Pink Book* 中综述)。

[0005] 携带与天然免疫性发展以及允许疾病在携带者中发生的免疫机制的关系知之甚少。

[0006] 肺炎链球菌是在极端年龄时和在具有潜在疾病的人中人类疾病的重要病因。肺炎球菌疾病在美国每年杀死 40,000 或更多人,这超过所有其他疫苗可预防性疾病相组合。肺炎球菌疾病的主要临床症状包括肺炎、菌血症和脑膜炎。该疾病最通常在素因性条件特别是肺疾病存在时发生。它是先前的病毒性呼吸道感染和慢性病状的常见细菌并发症,所述病毒性呼吸道感染例如流感和麻疹,所述慢性病状例如慢性阻塞性肺疾病、糖尿病、充血性心力衰竭、肾衰竭、吸烟和酒精中毒。肺炎球菌感染在冬季和早春期间当呼吸性疾病更流行

时更常见。免疫缺陷（脾功能障碍、医源（iatrogen）等）是关于致命肺炎球菌感染发展的危险因素，由于细菌清除减少和抗体缺乏。潜伏期很短，1-3 天。症状包括发热和恶寒战栗或寒战的突然发生、排痰性咳嗽、胸膜炎性胸痛、呼吸困难（dyspnoe）、心动过速和缺氧。

[0007] 肺炎链球菌负责美国中 88% 的菌血症感染。肺炎是最常见形式的侵袭性肺炎球菌疾病：150,000-570,000 例/年（美国）。36% 的成人社区获得性和 50% 的医院获得性肺炎由肺炎链球菌引起（美国）。已报告疾病在年龄 65 岁和更年长的成人中的发病率是 ~ 60 例/100,000。关于这种疾病的病死率从关于 2 岁或更年幼的人的 1.4% 增加到在 80 岁或更年长的人中多至 20.6%。由流感和肺炎球菌（Pneumococcus）引起的疾病一起是关于 65 岁和更年长的人中的第 5 大死因。可归于这些病原体的死亡率在这个年龄组中超过 90%。菌血症在约 25-30% 具有肺炎的患者中发生。菌血症的总体死亡比率是约 20%，但在老年人中可能多至 60%。在 1998 年，51% 可归于侵袭性肺炎球菌疾病的所有死亡在超过 65 岁的年龄组中发生。肺炎球菌引起美国中 13% -19% 的所有细菌性脑膜炎病例。每年发生估计 3,000-6,000 例肺炎球菌性脑膜炎。四分之一的具有肺炎球菌性脑膜炎的患者也具有肺炎。临床症状、脊髓液概况和神经系统并发症类似于其他形式的化脓性细菌性脑膜炎（在 *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 第 7 版 - 第二次印刷, *The Pink Book* 中综述）。

[0008] 在儿童中，肺炎球菌是急性中耳炎的常见原因，并且在 28% -55% 的中耳抽吸物中检测出。到年龄 12 个月时，62% 的儿童已具有急性中耳炎的至少一次发作。中耳感染是关于美国中的儿科诊室就诊的最频繁原因，导致每年超过 20,000,000 次就诊。肺炎球菌性中耳炎的并发症可以包括乳突炎和脑膜炎。无已知感染部位的菌血症是 < 2 岁的儿童中最常见的侵袭性临床表现，占这个年龄组中约 70% 的侵袭性疾病。菌血症肺炎占 < 2 岁的儿童中 12% -16% 的侵袭性肺炎球菌疾病。伴随侵袭性 Hib 疾病的下降，肺炎链球菌已成为美国 < 5 岁的儿童中的细菌性脑膜炎的主因。< 1 岁的儿童具有肺炎球菌性脑膜炎的最高比率，约 10 例/100,000 人口。< 5 岁的儿童中肺炎球菌疾病的负荷是显著的。每年发生估计 17,000 例侵袭性疾病，其中 13,000 例是无已知感染部位的菌血症并且约 700 例是脑膜炎。每年估计有 200 名儿童由于侵袭性肺炎球菌疾病而死亡。尽管不视为侵袭性疾病，但 < 5 岁的儿童中每年发生估计 5,000,000 例急性中耳炎（在 *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 第 7 版 - 第二次印刷, *The Pink Book* 中综述）。

[0009] 由肺炎链球菌感染的确定诊断一般依赖于生物体从血液或其他通常无菌的身体部位中的分离。检测体液中的荚膜多糖抗原的测试也是可用的。

[0010] 青霉素是选择用于治疗的药物。然而，由于广泛的抗微生物抗性，抗感染疗法的成功实现已变得越来越难。对青霉素的抗性在上升，并且根据近期报告，它在美国达到 ~ 25% (Whitney, C., 等人 (2000), *N Engl J Med* 343:1917-24)。大环内酯抗性菌株的比例达到 ~ 20% (Hyde, T., 等人 (2001), *JAMA* 286:1857-62)。抗微生物剂的使用与肺炎链球菌对于 β -内酰胺和大环内酯的抗性中的增加高度相关 (McCormick, A., 等人 (2003), *Nat Med* 9:424-30)。

[0011] 然而，即使使用有效的抗生素治疗（敏感菌株），侵袭性疾病的病死率也很高，在发达国家中平均 10%，并且对于特定血清型、在老年患者和菌血症或脑膜炎的病例（多至 80%）中可以高得多。

[0012] 因此,仍需要预防或改善肺炎球菌感染的有效治疗。疫苗不仅可以预防经由链球菌属的感染,而且更特异性预防或改善宿主组织(特别是在鼻咽中)的建群(colonization),从而减少上呼吸道感染和其他化脓性感染例如中耳炎的发病率。侵袭性疾病——肺炎、菌血症和脑膜炎以及脓毒症的消除将是减少急性感染的发病率和生物体的携带的直接结果。能够显示针对引起人类感染的大多数肺炎链球菌菌株的交叉保护的疫苗也将用于预防或改善由所有其他链球菌属物种即 A、B、C 和 G 族引起的感染。

[0013] 疫苗可以包含多种不同抗原。抗原的例子是完全杀死或减毒的生物体、这些生物体/组织的亚级分、蛋白质或以其最简单形式的肽。抗原还可以以糖基化蛋白质或肽的形式由免疫系统识别,并且还可以是或包含多糖或脂质。可以使用短肽,因为例如细胞毒性 T 细胞(CTL)识别与主要组织相容性复合物(MHC)缀合的以短的、通常长 8-11 个氨基酸的肽的形式的抗原。B 细胞可以识别短至 4-5 个氨基酸的线性表位,以及三维结构(构象表位)。在某些情况下,佐剂可以用于维持抗原特异性免疫应答。主要地,佐剂作用于所谓的抗原呈递细胞(APC),但并不限于其作用方式。这些细胞通常首先遇到一种或多种抗原,随后将经加工或未经修饰的抗原呈递给免疫效应细胞。还可以涉及中间细胞类型。在生产性免疫应答中仅激活具有合适特异性的效应细胞。佐剂还可以局部保留抗原和共注射的其他因子。此外,佐剂可以充当关于其他免疫细胞的化学吸引剂或可以局部和/或全身地充当关于免疫系统的刺激试剂。

[0014] 开发有效的肺炎球菌疫苗的努力早在 1911 年开始。然而,随着 20 世纪 40 年代青霉素的出现,对疫苗的兴趣下降,直到观察到尽管有抗生素治疗,许多患者仍死亡时。到 60 年代晚期时,再次采取努力开发多价疫苗。第一种肺炎球菌疫苗包含来自 14 种不同类型肺炎球菌细菌的经纯化的荚膜多糖抗原。在 1983 年,23- 价多糖疫苗(PPV23)获得批准,并且替代不再生产的 14- 价疫苗。PPV23 包含来自 23 种类型肺炎球菌细菌的多糖抗原,其引起 88% 的菌血症肺炎球菌疾病。此外,对于占另外 8% 的菌血症疾病的几种荚膜类型发生交叉反应性。在美国可获得 2 种多糖疫苗(Pneumovax 23, Merck, 和 Pnu-Immune23, Wyeth-Lederle)。2 种疫苗都包含 25 μ g 每种抗原/剂量,并且包括苯酚或硫柳汞作为防腐剂。

[0015] 第一种肺炎球菌缀合物疫苗(PCV7, Prevnar)在美国在 2000 年获得批准。它包括与称为 CRM197 的白喉毒素无毒变体缀合的 7 种肺炎链球菌血清型(4, 9V, 14, 19F, 23F, 18C 和 6B)的经纯化荚膜多糖。Prevnar 中包括的血清型占美国在 1978-1994 期间 < 6 岁的儿童中 86% 的菌血症、83% 的脑膜炎、和 65% 的急性中耳炎(在 Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases, 第 7 版 - 第二次印刷, The Pink Book 中综述)。包含 9 种和 11 种肺炎链球菌血清型的另外肺炎球菌多糖缀合物疫苗正在开发中。该疫苗肌肉施用。在 Prevnar 疫苗的 4 次剂量后,基本上所有健康婴儿都发展针对疫苗中包含的所有 7 种血清型的抗体。也已显示 Prevnar 在婴儿和儿童中是免疫原性的,包括具有镰状细胞病和 HIV 感染的那些。在大型临床试验中,显示 Prevnar 减少由疫苗血清型引起的侵袭性疾病,并且减少由所有血清型包括不在疫苗中的血清型引起的侵袭性疾病。与未接种疫苗的儿童比较,接受 Prevnar 的儿童具有更少的急性中耳炎发作,并且经历更少的鼓膜造孔插管放置。在 Prevnar 后的保护持续时间目前未知。用 Prevnar 免疫减少疫苗血清型的鼻咽携带比率,而总体携带比率不受影响。不幸的是,它也已显示诱导血清型再分布,即疫苗血

清型被未由 Prevnar 覆盖的菌株替代 (Pelton, S., 等人 (2003), *Vaccine* 21:1562-71)。

[0016] 肺炎球菌疫苗被推荐常规施用于 i., 所有儿童作为常规儿童期免疫接种程序表的部分, ii., 65 岁和更年长的成人, 和 iii., 具有正常免疫系统的 > 2 岁的人, 其具有慢性病, 包括心血管疾病、肺疾病、糖尿病、酒精中毒、肝硬化或脑脊髓液渗漏。在老年人群中, 关于肺炎球菌疫苗和流感疫苗的靶群重叠。这些疫苗可以同时在不同部位给予而无增加的副作用。

[0017] 即使使用有效的抗生素疗法, 在高危个体 (具有潜在疾病——主要是病毒性呼吸道感染, 免疫受损的) 中也观察到高死亡率。mAb 方法靶向具有严重疾病的患者, 并且提供立即的免疫增强用于清除细菌。通过调理素作用, 细菌在吞噬细胞内被杀死并且不在血液中被抗生素裂解。这种作用机制可以帮助消除毒素 (例如肺炎球菌溶血素和其他细胞毒素) 的释放, 所述毒素的释放恶化脓毒症患者的临床情况。单克隆抗体生产技术中的近期进展提供产生人抗体试剂和再引入抗体治疗的方法, 同时避免与血清疗法相关的毒性。免疫球蛋白是非常多用途类型的抗微生物蛋白质, 其可以用于预防和治疗新出现的感染性疾病。抗体疗法已有效针对多种不同微生物, 在 (Burnie, J., 等人 (1998), *J Antimicrob Chemother* 41:319-22) 中综述。

[0018] 尽管荚膜特异性抗体已显示是高度保护性的, 但这些血清型特异性抗体的何种浓度保护以抵抗疾病仍不明了, 并且最近已逐渐明了这些抗体的调理素活性和亲合力是比浓度更关键的关于保护决定因素。

[0019] 蛋白质缀合物疫苗无疑是在对抗肺炎球菌疾病的战斗中关于 amarmatorium 的重要的新添加物, 但疫苗包含有限数目的肺炎球菌血清型, 并且考虑到足够的生态压力, 由非疫苗血清型引起的替代疾病仍是实际威胁, 特别是在具有极高疾病负荷的地区中。

[0020] 在过去 10 年期间, 几种肺炎球菌蛋白质的免疫原性和保护能力已在动物模型中得到描述, 并且这些目前正在研究中用于开发基于物种共有的蛋白质的疫苗。此类蛋白质是肺炎球菌表面蛋白质 A (PspA, McDaniel, L., 等人 (1991), *Infect Immun* 59:222-8; Roche, H., 等人 (2003), *Infect Immun* 71:1033-41)、肺炎球菌表面粘附素 A (PsaA, Talkington, D., 等人 (1996), *Microb Pathog* 21:17-22)、胆碱结合蛋白质 A (CbpA, Rosenow, C., 等人 (1997), *Mol Microbiol* 25:819-29)、LytB 氨基葡萄糖苷酶、LytC 胞壁酸酶、PrtA 丝氨酸蛋白酶、PhtA (三联组氨酸 A) 和肺炎球菌疫苗抗原 A (PvaA) Wizemann, T., 等人 (2001), *Infect Immun* 69:1593-8; Adamou, J., 等人 (2001), *Infect Immun* 69:949-58)

[0021] 在革兰氏阳性生物体表面上展示的特定蛋白质或酶明显促成发病机制, 并且可能涉及由这些病原体引起的疾病过程。通常, 这些蛋白质涉及与宿主组织的直接相互作用或对宿主防御机制隐藏细菌表面 (Navarre, W., 等人 (1999), *Microbiol Mol Biol Rev* 63:174-229)。肺炎链球菌在这点上不是例外。几种表面蛋白质已表征为对于肺炎球菌致病性重要的毒力因子, 如 Jedrzejewski, M. (2001), *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207 中综述的。如果针对这些蛋白质的抗体可以对人类提供更好的保护, 那么它们可以提供新型、基于蛋白质的肺炎球菌疫苗的来源, 以与更常规的荚膜多糖疫苗结合使用或代替更常规的荚膜多糖疫苗使用。在 Di Guilmi, A., 等人 (2002), *EMBO Rep* 3:728-34 中综述的某些上述蛋白质作为关于潜在疫苗的抗原的用途以及许多另外的候选物, 主要起因于基于鉴定的容易性或可用性的机会的选择。为了满足鉴定关于肺炎链球菌的相关抗原在更广泛方

法中的需求,已开发了用于鉴定、分离和生产来自特定病原体的高免疫血清反应抗原的方法,所述特定病原体特别是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcusepidermidis*) (WO 02/059148)。此外,已提供了用于鉴定反应抗原的方法以及肺炎链球菌的反应抗原 (WO 04/092209)。

[0022] 本发明的根本问题是提供用于开发针对肺炎链球菌感染的药剂例如疫苗的备选方法。更具体而言,问题是提供来自可以用于制造所述药剂的肺炎链球菌的备选保护肽或其组合,特别是更有效的蛋白质或其组合。

[0023] 令人惊讶地,该目标通过由下述氨基酸序列组成的一种或多种肽得以解决

[0024] -SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 / 或 SEQ ID NO :5 ; 和

[0025] -任选地 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 / 或 SEQ ID NO :8。

[0026] 然而,这些序列的功能活性变体也可以在本发明的背景中使用。

[0027] 因此,本发明的第一个主题是由 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的保护肽,或保护肽的功能活性变体。这些肽 (SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列的保护肽,及其功能活性变体) 被称为亚组 i) 的抗原肽。

[0028] 由 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的保护肽衍生自肺炎链球菌菌株 TIGR4_Tettelin (Tettelin 等人 (2001), Science 293 :498-506), 并且已分别由 SP0498、SP0609、SP0749、SP2027 和 SP2194 指示。衍生由 SEQ ID NO :1、2、3、4 和 5 的氨基酸序列组成的保护肽的全长蛋白质的氨基酸和 DNA 序列公开于 WO 04/092209 中。

[0029] SEQ ID NO :1、2、3、4 和 5 的氨基酸序列公开于实施例以及所附序列表中。已显示 SEQ ID NO :1、2、3、4 和 5 的肽在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导针对肺炎链球菌的保护性免疫应答 (参见实施例和附图)。

[0030] 功能活性变体可以通过改变如下限定的保护肽的序列而获得,并且特征在于具有类似于通过由其衍生变体的 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 序列的保护肽显示的那种的生物活性,包括例如在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导保护性免疫应答和 / 或显示针对肺炎链球菌的保护的能力,其中任何变体都可以在实施例中描述的任何测试中进行测试。

[0031] 保护肽的功能活性变体可以通过保护肽中的序列改变而获得,其中具有序列改变的肽保留未经改变的保护肽的功能,例如具有类似于由未经改变的保护肽显示的那种的生物活性 (参见上文)。此类序列改变可以包括但不限于, (保守) 氨基酸置换、缺失、突变和插入。

[0032] 在本发明的一个优选实施方案中,由 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的保护肽的功能活性变体

[0033] a) 是保护肽的功能活性片段,所述功能活性片段包括保护肽序列的至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

[0034] b) 通过至少一个氨基酸置换和 / 或缺失而衍生自保护肽,其中功能活性变体与保护肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ; 和 / 或

[0035] c) 由保护肽或其功能活性变体,优选 a) 和 / 或 b) 的变体,以及另外对于保护肽异

源的至少一个氨基酸组成。

[0036] 本发明的功能活性变体的特征在于具有类似于由保护肽显示的那种的生物活性，包括例如在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导保护性免疫应答和 / 或显示针对肺炎链球菌的保护的能力。保护肽的变体在本发明的背景中是功能上活性的，如果变体的活性总计占不含序列改变的保护肽的活性的至少 10%、优选至少 25%、更优选至少 50%、更加优选至少 70%、更加优选至少 80%、特别是至少 90%、特别是至少 95%、最优选至少 99%。变体的活性可以如实施例所述进行测定或测量，并且随后与关于 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列的保护肽获得的那种相比较。

[0037] 保护肽的功能活性片段的特征在于通过一个或多个氨基酸缺失而衍生自 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的保护肽，导致包括保护肽序列的至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的肽。序列同一性可以如下所述进行测定。一个或多个氨基酸缺失可以是 C 末端、N 末端和 / 或内部地。优选地，片段通过 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个，更优选 1、2、3、4 或 5 个，更加优选 1、2 或 3，更加优选 1 或 2，最优选 1 个氨基酸缺失而获得。

[0038] 备选地或另外地，变体可以通过至少一个氨基酸置换和 / 或缺失而得自保护肽，其中功能活性变体与保护肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性。序列同一性可以如下所述进行测定。一个或多个氨基酸置换和 / 或一个或多个缺失可以是 C 末端、N 末端和 / 或内部地。优选地，通过 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个，更优选 1、2、3、4 或 5 个，更加优选 1、2 或 3，更加优选 1 或 2，最优选 1 个氨基酸置换和 / 或缺失，由保护肽或片段获得功能活性变体。

[0039] 此外，变体可以由保护肽或其功能活性变体，优选 a) 和 / 或 b) 的变体，以及对于保护肽或其变体异源的至少一个氨基酸残基组成，例如标记蛋白质。特征“异源氨基酸”或“对于保护肽或其变体异源的氨基酸”指这样的任何氨基酸，其不同于在肺炎链球菌的任何天然存在的蛋白质中位于与保护蛋白质邻近的那个氨基酸，所述蛋白质特别是来自肺炎链球菌菌株 TIGR4_Tettelin 的那种，特别是上文提及的序列。因此，包括至少一个异源氨基酸的本发明的蛋白质指这样的蛋白质，其不同于肺炎链球菌的任何天然存在的蛋白质，特别是来自肺炎链球菌菌株 TIGR4_Tettelin 的那种。一个或多个另外的氨基酸可以是对于保护肽或其变体 C 末端、N 末端或 C 和 N 末端地。

[0040] 下述细节意指亚组 i) 的保护肽、如下限定的另外保护肽以及如下限定的支持肽和这些的变体：

[0041] 如上限定的置换的或另外的序列或一个或多个氨基酸残基由一个或多个氨基酸残基组成，所述氨基酸残基可以是任何氨基酸，其可以是 L- 和 / 或 D- 氨基酸、天然存在的或其他的。优选地，氨基酸是任何天然存在的氨基酸例如丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。

[0042] 然而，一个或多个氨基酸残基也可以是 (a) 经修饰的或一个或多个稀有氨基酸。这些的例子是 2- 氨基己二酸、3- 氨基己二酸、 β - 丙氨酸、2- 氨基丁酸、4- 氨基丁酸、6- 氨基己酸、2- 氨基庚酸、2- 氨基异丁酸、3- 氨基异丁酸、2- 氨基庚二酸、2,4- 二氨基丁酸、锁

链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、羟赖氨酸、别-羟赖氨酸、3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸或鸟氨酸。此外,可以对一个或多个氨基酸实施修饰例如翻译后修饰。修饰的例子包括乙酰化、酰胺化、封闭、甲酰化、 γ -羧基谷氨酸羟基化、糖基化、甲基化、磷酸化和硫酸化。如果超过一个置换的或另外的或异源的氨基酸残基存在于肽中,那么氨基酸残基可以彼此相同或不同。

[0043] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明的肽的功能活性变体基本上等同于亚组 i) 的保护肽、如下限定的另外保护肽或如下限定的支持肽,但分别不同于 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或 8 的肽,因为它衍生自肺炎链球菌的不同血清型的同源序列。如上详述的,迄今为止已鉴定了超过 90 种不同的肺炎球菌血清型。因此,这些血清型中的任何都可以是关于功能活性变体的基础。然而,优选地菌株是 R6、TIGR4_Tettelin 或 TIGR4_IC。血清型优选是 1、2、3、4、5、6 (特别是 6A 或 6B)、7 (特别是 7F)、8、9 (特别是 9N 或 9V)、10 (特别是 10A)、11 (特别是 11A)、12 (特别是 12F)、14、15 (特别是 15B)、17 (特别是 17F)、18 (特别是 18C)、19 (特别是 19A 或 19F)、20、22 (特别是 22F)、23 (特别是 23F) 或 33 (特别是 33F)。在一个优选实施方案中,血清型是 4、6B、14、19A 和 19F 或 23F。

[0044] 衍生自其他肺炎链球菌菌株或血清型的 SEQ ID NO:1、2、3、4 和 5 的肽的变体例子显示于表 2、表 4-8 和表 9,以及序列表中。

[0045] 衍生自其他肺炎链球菌菌株或血清型的 SEQ ID NO:6 的肽的变体例子显示于序列表中的 SEQ ID NO 206-218 中。

[0046] 衍生自其他肺炎链球菌菌株或血清型的 SEQ ID NO:7 的肽的变体例子显示于序列表中的 SEQ ID NO 219-317 中。

[0047] 衍生自其他肺炎链球菌菌株或血清型的 SEQ ID NO:8 的肽的变体例子显示于序列表中的 SEQ ID NO 318-331 中。

[0048] 不同血清型和 / 或不同肺炎链球菌菌株的同源序列的进一步例子在下文详述并且也公开于所附序列数据中。

[0049] 表 9 列出了几种不同的肺炎链球菌菌株及其血清型。从这些菌株的大多数中,已测序了 5 种全长蛋白质 SP0498、SP0609、SP0749、SP2027 和 SP2194 中的一种或多种;当序列仍未测定时,显示“n. d.”。

[0050] 如果来自表 9 中列出的分别菌株的 SP0498 的全长氨基酸序列已通过 DNA 测序加以证实,并且等同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP0498 的全长氨基酸序列,那么这在表 9 的第二列中用“IDENT.”指示。如果来自分别菌株的 SP0498 的全长氨基酸序列不同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP0498 的全长氨基酸序列,即具有至少一个氨基酸置换、插入或缺失,那么所述菌株的全长 SP0498 的分别 SEQ ID NO (如序列表中列出的) 在表 9 的第二列中给出。因此,来自与 TIGR4_Tettelin 相比较具有至少一个氨基酸差异的菌株的 SP0498 的全长氨基酸序列显示为 SEQ ID NO:45-93。

[0051] 如果来自表 9 中列出的分别菌株的 SP0609 的全长氨基酸序列已通过 DNA 测序加以证实,并且等同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP0609 的全长氨基酸序列,那么这在表 9 的第三列中用“IDENT.”指示。如果来自分别菌株的 SP0609 的全长氨基酸序列不同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP0609 的全长氨基酸序列,即具有至少一个氨基酸置换、插入或缺失,

那么所述菌株的全长 SP0609 的分别 SEQ ID NO(如序列表中列出的)在表 9 的第三列中给出。因此,来自与 TIGR4_Tettelin 相比较具有至少一个氨基酸差异的菌株的 SP0609 的全长氨基酸序列显示为 SEQ ID NO :94-136。

[0052] 如果来自表 9 中列出的分别菌株的 SP0749 的全长氨基酸序列已通过 DNA 测序加以证实,并且等同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP0749 的全长氨基酸序列,那么这在表 9 的第四列中用“IDENT.”指示。如果来自分别菌株的 SP0749 的全长氨基酸序列不同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP0749 的全长氨基酸序列,即具有至少一个氨基酸置换、插入或缺失,那么所述菌株的全长 SP0749 的分别 SEQ ID NO(如序列表中列出的)在表 9 的第四列中给出。因此,来自与 TIGR4_Tettelin 相比较具有至少一个氨基酸差异的菌株的 SP0749 的全长氨基酸序列显示为 SEQ ID NO :137-172。

[0053] 如果来自表 9 中列出的分别菌株的 SP2027 的全长氨基酸序列已通过 DNA 测序加以证实,并且等同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP2027 的全长氨基酸序列,那么这在表 9 的第五列中用“IDENT.”指示。如果来自分别菌株的 SP2027 的全长氨基酸序列不同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP2027 的全长氨基酸序列,即具有至少一个氨基酸置换、插入或缺失,那么所述菌株的全长 SP2027 的分别 SEQ ID NO(如序列表中列出的)在表 9 的第五列中给出。因此,来自与 TIGR4_Tettelin 相比较具有至少一个氨基酸差异的菌株的 SP2027 的全长氨基酸序列显示为 SEQ ID NO :173-186。

[0054] 如果来自表 9 中列出的分别菌株的 SP2194 的全长氨基酸序列已通过 DNA 测序加以证实,并且等同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP2194 的全长氨基酸序列,那么这在表 9 的第六列中用“IDENT”指示。如果来自分别菌株的 SP2194 的全长氨基酸序列不同于来自 TIGR4_Tettelin 的 SP2194 的全长氨基酸序列,即具有至少一个氨基酸置换、插入或缺失,那么所述菌株的全长 SP2194 的分别 SEQ ID NO(如序列表中列出的)在表 9 的第六列中给出。因此,来自与 TIGR4_Tettelin 相比较具有至少一个氨基酸差异的菌株的 SP2194 的全长氨基酸序列显示为 SEQ ID NO :187-205。

[0055] 来自不同肺炎链球菌菌株的基因组序列可以得自下述来源:

[0056] a) 肺炎链球菌 TIGR4(也称为 TIGR4_Tettelin,如 Tettelin 等人(2001),Science 293 :498-506 中所述)

[0057] (GenBank 登记号 :AE005672 ;备注 :完成)

[0058] <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=bsp>

[0059] b) 肺炎链球菌 R6

[0060] (GenBank 登记号 :AE007317 ;备注 :完成)

[0061] <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=ntsD02>

[0062] c) 肺炎链球菌血清型 2 菌株 D39

[0063] (GenBank 登记号 :CP000410 ;备注 :完成)

[0064] d) 肺炎链球菌 G54

[0065] (GenBank 登记号 :- ;备注 :未完成)

[0066] <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=ntsD05>

[0067] 术语“功能活性变体”包括天然存在的等位基因变体、以及突变体或任何其他非天然存在的变体。如本领域已知的,等位基因变体是备选形式的(多)肽,其被表征为具有一

个或多个氨基酸的置换、缺失或添加,这基本上不改变多肽的生物学功能。“生物学功能”意指肽在其天然存在的细胞中的功能,即使该功能对于细胞的生长或存活不是必需的。例如,孔蛋白的生物学功能是允许细胞外介质中存在的化合物进入细胞内。生物学功能不同于抗原性功能。多肽可以具有超过一种生物学功能。

[0068] 因此,本发明还涉及抗原肽,即保护肽及其功能活性变体,任选与不同肺炎链球菌分离物的,如下定义的一种或多种另外保护肽或其功能活性变体组合,和/或任选与如下定义的一种或多种支持肽或其功能活性变体组合。基于本文公开的核酸和氨基酸序列,此类同系物可以容易地进行鉴定且分离。不同血清型的同源保护肽、另外保护肽或支持肽可以通过例如序列比对进行鉴定。通过一个或多个氨基酸置换、缺失和/或添加,同源序列可以不同于亚组 i) 的保护肽,SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、6、7 或 8 序列的如下限定的另外保护肽或如下限定的支持肽。

[0069] 序列同一性百分率可以例如通过序列比对进行测定。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。多种程序和比对算法已例如在 Smith 和 Waterman (1981), Adv. Appl. Math. 2 :482 或 Pearson 和 Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :2444-48 中描述。

[0070] NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul 等人 (1990), J. Mol. Biol. 215 :403-10) 可得自数种来源,包括美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, Bethesda, MD) 和在因特网上,用于与序列分析程序 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 结合使用。例如 SEQ ID NO :1-8 序列的任何保护、另外保护或支持肽的变体一般使用 NCBI Blast 2.0, 设为缺省参数的缺口 blastp 进行表征。对于例如至少 35 个氨基酸的氨基酸序列的比较,可以采用 Blast 2 序列功能,使用设为缺省参数的缺省 BLOSUM62 矩阵 (缺口存在成本 11 和每残基缺口成本 1)。

[0071] 在一个优选实施方案中,通过氨基酸交换、缺失或插入而衍生自如上限定的肽的功能活性变体也可以保存活性,或更优选地改善活性 (如上定义)。此外,这些肽还可以覆盖表位,其触发相同的或优选地改善的 T 细胞应答。这些表位被称为“变态的 (heteroclitic)”。它们具有与 MHC/HLA 分子相似的或优选更大的亲和力,以及以相似的或优选地更强的方式刺激针对原始表位的 T 细胞受体 (TCR) 的能力。不规则变化的表位可以通过合理设计而获得,即考虑个别残基对于与 MHC/HLA 结合的贡献,如例如由 (Rammensee, H. 等人 (1999), Immunogenetics. 50 :213-19) 描述的,与和 TCR 潜在相互作用的残基的系统交换相组合,并且用针对原始表位的 T 细胞测试所得到的序列。无需过多实验,此类设计对于本领域技术人员是可能的。

[0072] 保守置换是在其侧链和化学性质方面相关的氨基酸的家族内发生的那些。此类家族的例子是具有碱性侧链、具有酸性侧链、具有非极性脂肪族侧链、具有非极性芳香族侧链、具有不带电的极性侧链、具有小侧链、具有大侧链等的氨基酸。在一个实施方案中,在肽中包括 1 个保守置换。在另一个实施方案中,在肽中包括 2 个或更少的保守置换。在一个进一步的实施方案中,在肽中包括 3 个或更少的保守置换。

[0073] 保守氨基酸置换的例子包括但不限于下文列出的那些:

[0074] 原始残基 保守置换

[0075] Ala Ser

[0076]	Arg	Lys
[0077]	Asn	Gln ;His
[0078]	Asp	Glu
[0079]	Cys	Ser
[0080]	Gln	Asn
[0081]	Glu	Asp
[0082]	His	Asn ;Gln
[0083]	Ile	Leu ;Val
[0084]	Leu	Ile ;Val
[0085]	Lys	Arg ;Gln ;Asn
[0086]	Met	Leu ;Ile
[0087]	Phe	Met ;Leu ;Tyr
[0088]	Ser	Thr
[0089]	Thr	Ser
[0090]	Trp	Tyr
[0091]	Tyr	Trp ;Phe
[0092]	Val	Ile ;Leu

[0093] 在本发明的另一个实施方案中,如上限定的肽可以通过多种化学技术中的一种或多种进行修饰,以产生具有与经修饰的肽基本上相同的活性(如上文对于片段和变体定义的)的衍生物,且任选具有其他所需性质。例如,蛋白质的羧基基团,无论是C末端还是侧链的,都可以以药学上可接受的阳离子的盐的形式提供或经酯化以形成酯,或转变成酰胺。肽的氨基,无论是氨基末端还是侧链的,都可以以药学上可接受的酸加成盐的形式,例如HCl、HBr、乙酸、苯甲酸、甲苯磺酸、马来酸、酒石酸和其他有机盐,或可以转变成酰胺。肽侧链的羟基可以使用公认的技术转变成烷氧基或酯。肽侧链的苯和酚环可以用一个或多个卤素原子置换,例如氟、氯、溴或碘,或用烷基、烷氧基、羧酸或其酯、或此类羧酸的酰胺置换。硫醇可以用许多公认的保护基团例如乙酰胺基团中的任何一种进行保护。

[0094] 本发明的肽可以与外表面蛋白质或其他蛋白质或其他蛋白质的抗原组合。在此类组合中,一种或多种肽可以以一种或多种融合蛋白的形式。本发明的抗原肽或支持肽可以任选与衍生自其他微生物的所选择的肽或蛋白质融合。例如,本发明的肽或蛋白质可以在其N末端或C末端在序列中与来自另一种病原体的多肽或超过一种多肽融合。对于这个目的有用的肽包括通过现有技术鉴定的多肽。

[0095] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明的肽与表位标签融合,所述表位标签提供抗标签物质可以与之选择性结合的表位。表位标签一般置于肽的N或C末端处,但当生物活性允许时可以作为内部插入物或置换而掺入。此类加表位标签形式的肽的存在可以使用物质例如针对加标签的肽的抗体进行检测。此外,表位标签的提供使得肽能够通过亲和纯化容易地进行纯化,其中使用与表位标签结合的抗标签抗体或另一种类型的亲和基质。多种标签多肽及其分别抗体是本领域众所周知的。例子包括聚-组氨酸(聚-his)标签例如如实施例描述的六组氨酸标签、聚-组氨酸-甘氨酸(聚-his-gly)标签、HA标签多肽、c-myc标签、Strep标签和FLAG标签。

[0096] 融合物还可以包括与除氨基酸外的部分融合或偶联的本发明的肽,所述部分包括脂质和碳水化合物。此外,可以采用与由现有技术描述的其他疫苗试剂组合的本发明的肽/蛋白质/组合物,以及衍生自其他微生物的其他种类的疫苗试剂。此类蛋白质在预防、治疗和诊断由广谱链球菌属(*Streptococcus*)分离物引起的疾病中 useful。

[0097] 构建这些融合蛋白用于在本发明的方法和组合物中使用。这些融合蛋白或多聚体蛋白质可以重组产生,或可以化学合成。

[0098] 本文描述的肽和蛋白质可以通过许多常规技术中的任何进行制备。所需肽可以化学合成。备选方法涉及通过酶促消化产生已知肽的片段,例如通过用已知在由特定氨基酸残基限定的位点处切割蛋白质的酶处理蛋白质,或通过用合适的限制性酶消化 DNA,表达所消化的 DNA 且分离所需片段。另外一种合适的技术涉及分离且扩增编码所需肽片段的 DNA 片段,通过聚合酶链反应(PCR)。采用限定 DNA 片段的所需末端的寡核苷酸作为 PCR 中的 5' 和 3' 引物。用于在具有已知序列的 DNA 中且因此在蛋白质中的预定位点处进行突变的技术是众所周知的,所述突变例如缺失、插入和置换。本领域技术人员使用常规技术例如 PCR,可以容易地使用本文提供的肽、蛋白质和组合物,以鉴定且分离其他相似蛋白质。此类方法是常规的并且不视为需要过度实验,考虑到本文提供的信息。例如,使用寡核苷酸介导的定点诱变(Carter 等人(1985),*Nucl. Acids Res.* 13:4431;Zoller 等人(1987),*Nucl. Acids Res.* 10:6487)、盒式诱变(Wells 等人(1985),*Gene*, 34:315)、限制性选择诱变(Wells 等人(1986),*Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317:415)、PCR 诱变可以进行变异,或可以对经克隆的 DNA 执行其他已知技术,以产生本发明的肽或组合物。

[0099] 本发明的另一个主题涉及包括选自保护蛋白质的至少 2 种蛋白质的组合物,所述保护蛋白质包括如上所述的保护肽或其功能活性变体、或由如上所述的保护肽或其功能活性变体组成。

[0100] 本发明的另一个主题涉及包括选自下述的至少 2 种蛋白质的组合物:

[0101] i) 包括亚组 i) 的抗原肽或由亚组 i) 的抗原肽组成的保护蛋白质;

[0102] ii) 包括另外保护肽或其功能活性变体、或由另外保护肽或其功能活性变体组成的另外保护蛋白质,所述另外保护肽由 SEQ ID NO:6 或 7 的氨基酸序列组成,和

[0103] iii) 包括 SEQ ID NO:8 的支持肽或其功能活性变体、或由 SEQ ID NO:8 的支持肽或其功能活性变体组成的支持蛋白质,

[0104] 其中至少 2 种蛋白质选自亚组 i)、ii) 和 iii) 中的至少 2 个。

[0105] SEQ ID NO:6 或 7 的氨基酸序列的另外保护肽及其功能活性变体被称为亚组 ii) 的抗原肽。亚组 i) 和 ii) 的抗原肽被称为抗原肽。

[0106] SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的支持肽及其功能活性变体被称为亚组 iii) 的支持肽。

[0107] 由 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成的另外保护肽衍生自肺炎链球菌血清型 4 菌株 TIGR4_Tettelin,并且已由 SP2216-1 指定。由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成的另外保护肽衍生自肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259,并且已由 SP1732-3 指定。衍生由 SEQ ID NO:6 和 7 的氨基酸序列组成的另外保护肽的全长蛋白质的氨基酸和 DNA 序列在 WO 04/092209 中分别公开为 SEQ ID NO:243 和 99、以及 SEQ ID NO:214 和 70。然而,如 WO 04/092209 中公开的 SEQ ID NO:214 和 70 的序列涉及肺炎链球菌菌株 TIGR4_Tettelin,而本发明的 SEQ

IDNO :7 涉及肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259。应当指出,本发明的 SEQ ID NO :7 不同于 WO 04/092209 的那种,因为与 WO 04/092209 的序列中的 A(丙氨酸)相比较,在 SEQ ID NO :7 的位置 279 处是 V(缬氨酸)。

[0108] SEQ ID NO :6 和 7 的氨基酸序列公开于实施例以及所附序列表中。已显示 SEQ ID NO :6 和 / 或 7 的肽在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导针对肺炎链球菌的保护性免疫应答(参见实施例和附图)。

[0109] 功能活性变体可以通过改变如本文限定的另外保护肽的序列而获得,并且特征在于具有类似于通过由其衍生变体的 SEQ ID NO :6 或 7 序列的另外保护肽显示的那种的生物活性,包括例如在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导保护性免疫应答和 / 或显示针对肺炎链球菌的保护的能力,其中任何变体都可以在实施例中描述的任何测试中进行测试。

[0110] 另外保护肽的功能活性变体可以如上所述获得。

[0111] 在本发明的一个优选实施方案中,由 SEQ ID NO :6 或 7 的氨基酸序列组成的另外保护肽的功能活性变体

[0112] a) 是另外保护肽的功能活性片段,所述功能活性片段包括另外保护肽序列的至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

[0113] b) 通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而衍生自另外保护肽,其中功能活性变体与另外保护肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ;和 / 或

[0114] c) 由另外保护肽或其功能活性变体,优选 a) 和 / 或 b) 的变体,以及另外对于另外保护肽异源的至少一个氨基酸组成。

[0115] 根据本发明的另外保护肽的功能活性变体的特征在于具有类似于通过另外保护肽显示的那种的生物活性,包括例如在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导保护性免疫应答和 / 或显示针对肺炎链球菌的保护的能力。另外保护肽的变体在本发明的背景中是功能上活性的,如果变体的活性总计占不含序列改变的另外保护肽的活性的至少 10%、优选至少 25%、更优选至少 50%、更加优选至少 70%、更加优选至少 80%、特别是至少 90%、特别是至少 95%、最优选至少 99%。另外保护肽的变体的活性可以如实施例中所述进行测定或测量,并且随后与关于 SEQ ID NO :6 或 7 的氨基酸序列的另外保护肽获得的那种相比较。

[0116] 另外保护肽的功能活性片段的特征在于通过一个或多个氨基酸缺失而衍生自 SEQ ID NO :6 或 7 的保护肽,导致包括另外保护肽序列的至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的肽。序列同一性可以如下所述进行测定。一个或多个氨基酸缺失可以是 C 末端、N 末端和 / 或内部地。优选地,片段通过 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个,更优选 1、2、3、4 或 5 个,更加优选 1、2 或 3,更加优选 1 或 2,最优选 1 个氨基酸缺失而获得。

[0117] 备选地或另外地,变体可以通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而得自另外保护肽,其中功能活性变体与另外保护肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 75%、优选至少 80%、更优选至少 85%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性。序列同一性可以如下所述进行测定。氨基酸的一个或多

个置换、一个或多个添加和 / 或一个或多个缺失可以是 C 末端、N 末端和 / 或内部地。优选地,通过 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个,更优选 1、2、3、4 或 5 个,更加优选 1、2 或 3,更加优选 1 或 2,最优选 1 个氨基酸置换、添加和 / 或缺失,由另外保护肽或片段优选另外保护肽获得功能活性变体。

[0118] 此外,变体可以由另外保护肽或其功能活性变体,优选 a) 和 / 或 b) 的变体,以及另外对于另外保护肽或其变体异源的至少一个氨基酸残基组成,例如标记蛋白质。特征“异源氨基酸”或“对于另外保护肽或其变体异源的氨基酸”指这样的任何氨基酸,其不同于在肺炎链球菌的任何天然存在的蛋白质中位于与另外保护蛋白质邻近的那个氨基酸,所述蛋白质特别是来自肺炎链球菌菌株 TIGR4_Tettelin 或血清型 6B 的那种,特别是上文提及的序列。因此,包括至少一个异源氨基酸的本发明的蛋白质指这样的蛋白质,其不同于肺炎链球菌的任何天然存在的蛋白质,特别是来自肺炎链球菌菌株 TIGR4_Tettelin 或血清型 6B 的那种。一个或多个另外的氨基酸可以是对于另外保护肽或其变体 C 末端、N 末端或 C 和 N 末端地。

[0119] 由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的支持肽衍生自来自肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259 的肺炎球菌表面粘附素 A (PsaA)。衍生由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的支持肽的全长蛋白质的氨基酸和 DNA 序列在 US 5,854,416 中公开为 SEQ ID NO :2 和 1 (GenBank 登记号 :AAE22907 和 AR069091)。本发明的完整说明书自始至终 (包括附图),PsaA 可以进一步被指定为 SP1650。

[0120] SEQ ID NO :8 的氨基酸序列公开于实施例以及所附序列表中。已显示 SEQ ID NO :8 的肽如果与本发明的抗原肽组合使用,那么在脓毒症和 / 或肺炎模型中支持诱导针对肺炎链球菌的保护性免疫应答 (参见实施例和附图)。

[0121] 功能活性变体可以通过改变如本文限定的支持肽的序列而获得,并且特征在于具有类似于由其衍生变体的 SEQ ID NO :8 序列的支持肽显示的那种的支持活性,包括与本发明的一种或多种抗原肽组合例如在脓毒症和 / 或肺炎模型中诱导保护性免疫应答和 / 或显示针对肺炎链球菌的保护的能力,其中任何变体都可以在实施例中描述的任何测试中进行测试。

[0122] 支持肽的功能活性变体可以通过支持肽中的序列改变而获得,其中具有序列改变的肽保留未经改变的保护肽的功能,例如具有类似于由未经改变的支持肽显示的那种的生物活性 (参见上文)。此类序列改变可以包括但不限于, (保守) 氨基酸置换、缺失、突变和插入。关于改变和变体的进一步细节参见上文。

[0123] 在一个优选实施方案中,支持肽的功能活性变体

[0124] a) 是支持肽的功能活性片段,所述功能活性片段包含支持肽序列的至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

[0125] b) 通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而衍生自支持肽,并且与支持肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ; 和 / 或

[0126] c) 由支持肽或其功能活性变体,优选 a) 和 / 或 b) 的变体,以及另外对于支持肽异源的至少一个氨基酸组成。

[0127] 根据本发明的支持肽的功能活性变体的特征在于具有类似于由支持肽显示的那种的生物活性,包括如果与本发明的抗原肽组合使用,那么在脓毒症和 / 或肺炎模型中支持诱导针对不同血清型的保护性免疫应答和 / 或针对肺炎链球菌的保护的能力(参见实施例)。

[0128] 支持肽的变体在本发明的背景中是功能上活性的,如果与本发明一种或多种抗原肽组合的变体的活性总计占不含序列改变的、与本发明一种或多种抗原肽组合的支持肽的活性的至少 10%、优选至少 25%、更优选至少 50%、更加优选至少 70%、更加优选至少 80%、特别是至少 90%、特别是至少 95%、最优选至少 99%。与本发明一种或多种抗原肽组合的支持肽的变体的活性可以如实施例中所述进行测定或测量,并且随后与关于与本发明一种或多种抗原肽组合的 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列的支持肽获得的那种相比较。

[0129] 支持肽的功能活性片段的特征在于通过一个或多个缺失而衍生自 SEQ ID NO :8 的支持肽,导致包括支持肽序列的至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的肽。序列同一性可以如上所述进行测定。一个或多个缺失可以是 C 末端、N 末端和 / 或内部地。优选地,片段通过 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个,更优选 1、2、3、4 或 5 个,更加优选 1、2 或 3,更加优选 1 或 2,最优选 1 个缺失而获得。

[0130] 备选地或另外地,变体可以通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而得自支持肽,其中功能活性变体与支持肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性。序列同一性可以如上所述进行测定。一个或多个置换、一个或多个添加和 / 或一个或多个缺失可以是 C 末端、N 末端和 / 或内部地。优选地,通过 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个,更优选 1、2、3、4 或 5 个,更加优选 1、2 或 3,更加优选 1 或 2,最优选 1 个氨基酸置换、添加和 / 或缺失,由支持肽或片段优选支持肽获得功能活性变体。

[0131] 此外,变体可以由支持肽或其功能活性变体,优选 a) 和 / 或 b) 的变体,以及对于支持肽或其变体异源的至少一个氨基酸残基组成,例如标记蛋白质。特征“异源氨基酸”或“对于支持肽或其变体异源的氨基酸”指这样的任何氨基酸,其不同于在肺炎链球菌的任何天然存在的蛋白质中位于与支持蛋白质邻近的那个氨基酸,所述蛋白质特别是上文提及的序列。一个或多个另外的氨基酸可以是对于支持肽或其变体 C 末端、N 末端或 C 和 N 末端地。

[0132] 本发明的另一个主题涉及包括选自下述的至少 3 种蛋白质的组合物

[0133] i) 包括亚组 i) 的抗原肽、或由亚组 i) 的抗原肽组成的保护蛋白质;

[0134] ii) 包括亚组 ii) 的抗原肽、或由亚组 ii) 的抗原肽组成的另外保护蛋白质,和

[0135] iii) 包括亚组 iii) 的支持肽、或由亚组 iii) 的支持肽组成的支持蛋白质,

[0136] 其中至少 3 种蛋白质选自亚组 i)、ii) 和 iii) 中的至少 2 个。

[0137] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物包括选自亚组 i) 的至少 1 种蛋白质,和选自亚组 ii) 和 / 或 iii) 的至少 2 种蛋白质。

[0138] 在另一个优选实施方案中,本发明的组合物包括选自 3 个亚组 i)、ii) 和 iii) 的至少 3 种蛋白质。

[0139] 在另外一个优选实施方案中,本发明的组合物在至少 2 种蛋白质的 2 种或更多种

蛋白质组合到 1 种融合蛋白内的方面进行限定。因此,2 种或更多种蛋白质可以组合到一种或多种融合蛋白内。所得到的一种或多种融合蛋白可以包括如上限定的亚组 i)、ii) 和 / 或 iii) 的 2 种或更多种蛋白质。

[0140] 融合蛋白可以包括如上限定的 2 种或更多种蛋白质、或由如上限定的 2 种或更多种蛋白质组成。此外,融合蛋白可以包括接头,例如蛋白质接头,以使 2 种或更多种蛋白质或另外的 C 或 N 末端序列例如标签连接,以便纯化融合蛋白。当制备在融合蛋白下的核酸序列时,另外的序列也可以起因于遗传工程和合适限制位点的使用。

[0141] SEQ ID NO :1-8 的蛋白质预期涉及如上定义分别包括 SEQ IDNO :1-8 的肽、或由 SEQ ID NO :1-8 的肽组成的保护 / 另外保护 / 支持蛋白质。SEQ ID NO :1-8 的蛋白质的变体预期涉及如上定义分别包括 SEQ ID NO :1-8 的功能活性变体、或由 SEQ ID NO :1-8 的功能活性变体组成的保护 / 另外保护 / 支持蛋白质。

[0142] 在融合蛋白中相组合的亚组 i)、ii) 和 / 或 iii) 的蛋白质可以彼此直接连接,或可以在接头上相组合。接头可以例如是短氨基酸序列。接头可以起因于合适融合蛋白的遗传工程,或可以是引入的以便允许单一蛋白质有效运作。

[0143] 在本发明的另一个实施方案中,除如上详述的融合蛋白外,组合物可以包括亚组 i)、ii) 和 / 或 iii) 的至少一种进一步蛋白质。

[0144] 在另一个优选实施方案中,本发明的组合物包括

[0145] - 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 ii) 中定义的至少 1 种蛋白质 ;或

[0146] - 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 iii) 中定义的至少 1 种蛋白质 ;或

[0147] - 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 ii) 中定义的至少 2 种蛋白质 ;或

[0148] - 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 iii) 中定义的至少 2 种蛋白质 ;或

[0149] - 如 i) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 ii) 中定义的至少 1 种蛋白质和如 iii) 中定义的至少 1 种蛋白质。

[0150] 更优选地,如上述实施方案的任何中限定的本发明的组合物包括

[0151] - 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :6 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

[0152] - 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :7 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

[0153] - 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :8 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

[0154] - 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :6 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

[0155] - 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQID NO :6 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :6 的

氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质 ;或

[0156] - 包括 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列,或由 SEQ IDNO :1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质,和包括 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列、或由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的至少 1 种蛋白质。

[0157] 最优选的组合物的例子包括下述蛋白质 :

[0158] -SEQ ID NO :1 的蛋白质、SEQ ID NO :6 的蛋白质和 SEQ IDNO :7 的蛋白质 ;

[0159] -SEQ ID NO :2 的蛋白质、SEQ ID NO :6 的蛋白质和 SEQ IDNO :7 的蛋白质 ;

[0160] -SEQ ID NO :3 的蛋白质、SEQ ID NO :6 的蛋白质和 SEQ IDNO :7 的蛋白质 ;

[0161] -SEQ ID NO :4 的蛋白质、SEQ ID NO :6 的蛋白质和 SEQ IDNO :7 的蛋白质 ;

[0162] -SEQ ID NO :5 的蛋白质、SEQ ID NO :6 的蛋白质和 SEQ IDNO :7 的蛋白质 ;

[0163] -SEQ ID NO :1 的蛋白质、SEQ ID NO :7 的蛋白质和 SEQ IDNO :8 的蛋白质 ;

[0164] -SEQ ID NO :2 的蛋白质、SEQ ID NO :7 的蛋白质和 SEQ IDNO :8 的蛋白质 ;

[0165] -SEQ ID NO :3 的蛋白质、SEQ ID NO :7 的蛋白质和 SEQ IDNO :8 的蛋白质 ;

[0166] -SEQ ID NO :4 的蛋白质、SEQ ID NO :7 的蛋白质和 SEQ IDNO :8 的蛋白质 ;或

[0167] -SEQ ID NO :5 的蛋白质、SEQ ID NO :7 的蛋白质和 SEQ IDNO :8 的蛋白质。

[0168] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物包括另外保护肽的功能活性变体,其中功能活性变体

[0169] a) 是另外保护肽的功能活性片段,所述功能活性片段包括另外保护肽序列的至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

[0170] b) 通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而衍生自另外保护肽,并且与另外保护肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ;和 / 或

[0171] c) 由另外保护肽或其功能活性变体和对于另外保护肽异源的至少一个氨基酸组成。

[0172] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物包括支持肽的功能活性变体,其中功能活性变体

[0173] a) 是支持肽的功能活性片段,所述功能活性片段包括支持肽序列的至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% ;

[0174] b) 通过至少一个氨基酸置换、添加和 / 或缺失而衍生自支持肽,并且与支持肽或如 a) 中限定的功能活性片段具有至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、更加优选至少 90%、更加优选至少 95% 且最优选至少 97%、98% 或 99% 的序列同一性 ;和 / 或

[0175] c) 由支持肽或其功能活性变体和对于支持肽异源的至少一个氨基酸组成。

[0176] 本发明的另外一个主题涉及编码如上限定的亚组 i) 的任何抗原肽或如上限定的本发明组合物中包括的一种或多种保护蛋白质的一种或多种核酸。

[0177] 本发明的核酸分子可以以 RNA 的形式,例如 mRNA 或 cRNA,或以 DNA 的形式,包括例如通过克隆或通过化学合成技术产生或通过其组合获得的例如 cDNA 和基因组 DNA。DNA 可以是三链、双链或单链的。单链 DNA 可以是编码链,也称为有义链,或它可以是非编码链,也称为反义链。如本文所使用的,核酸分子还尤其指单链和双链 DNA,其为单链和双链 RNA 的混合物的 DNA,和其为单链和双链区的混合物的 RNA,包括 DNA 和 RNA 的杂交分子,所述 DNA 和 RNA 可以是单链或更一般地双链或三链的、或单链和双链区的混合物。此外,如本文所使用的,核酸分子指包括 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 的三链区。

[0178] 核酸可以是肺炎链球菌特别是肺炎链球菌菌株 R6 和 TIGR4_Tettelin 中天然存在的核酸的片段。血清型优选是 1、2、3、4、5、6(特别是 6A 或 6B)、7(特别是 7F)、8、9(特别是 9N 或 9V)、10(特别是 10A)、11(特别是 11A)、12(特别是 12F)、14、15(特别是 15B)、17(特别是 17F)、18(特别是 18C)、19(特别是 19A 或 19F)、20、22(特别是 22F)、23(特别是 23F)或 33(特别是 33F)。在一个优选实施方案中,血清型是 4、6B、14、19A 和 19F 或 23F。

[0179] 核酸还包括其为遗传密码简并的结果的序列。存在 20 种天然氨基酸,其中大多数由超过一个密码子指定。因此,编码如上限定的肽的所有核苷酸序列都包括在本发明中。

[0180] 优选地,一种或多种核酸包括选自下述的至少一个核酸序列、或由选自下述的至少一个核酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13。

[0181] 此外,核酸可以包含一个或多个经修饰的碱基。此类核酸还可以包含例如在磷酸核糖主链中的修饰,以增加此类分子在生理环境中的稳定性和半衰期。因此,具有就稳定性或其他原因修饰的主链的 DNA 或 RNA 是“核酸分子”,因为那个特征是本文预期的。此外,仅举 2 个例子,包括稀有碱基例如肌苷或经修饰的碱基例如三苯甲基化碱基的 DNA 或 RNA 是在本发明的背景中的核酸分子。应当理解已对 DNA 和 RNA 进行各种各样的修饰,其发挥对于本领域技术人员已知的许多有用目的。如它在本文中采用的,术语核酸分子包括此类化学、酶促或代谢修饰形式的核酸分子,以及化学形式的病毒和细胞特有的 DNA 和 RNA,尤其包括单和复杂细胞。例如,可以进行核苷酸置换,其不影响由核酸编码的本发明的肽或蛋白质或组合物,并且因此编码如上限定的本发明的抗原肽或其功能活性变体或组合物的任何核酸分子由本发明包括。

[0182] 此外,使用标准技术例如标准克隆技术,可以使编码本发明的抗原肽或组合物的任何核酸分子在功能上与任何所需调节序列连接,无论是肺炎链球菌调节序列还是异源调节序列、异源引导序列、异源标记序列或异源编码序列,以制备融合蛋白。

[0183] 本发明的核酸可以最初在体外或在培养中的细胞中形成,一般而言,通过经由核酸内切酶和/或核酸外切酶和/或聚合酶和/或连接酶和/或重组酶或技术人员已知的其他方法处理核酸,以产生核酸。

[0184] 在本发明的一个实施方案中,本发明的一种或多种核酸位于载体或除肺炎链球菌外的细胞中。

[0185] 载体可以另外包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点、一种或多种所需基因和/或可选标记基因和本领域已知的其他遗传元件,例如指导所编码的肽或蛋白质的转录、翻译和/或分泌的调节元件。载体可以用于转导、转化或感染细胞,从而引起细胞表达所插入的核酸和/或除对于细胞天然的那些外的蛋白质。载体任选包括帮助

实现核酸进入细胞内的材料,例如病毒颗粒、脂质体、蛋白质外壳等。通过标准分子生物学技术,用于蛋白质表达的众多类型的合适表达载体是本领域已知的。此类载体选自常规载体类型中,包括昆虫例如杆状病毒表达或酵母、真菌、细菌或病毒表达系统。其他合适的表达载体也可以用于这个目的,其中众多类型是本领域已知的。用于获得此类表达载体的方法是众所周知的(参见例如, Sambrook 等人 (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 第 2 版, ColdSpring Harbor Laboratory, New York)。在一个实施方案中,载体是病毒载体。病毒载体包括但不限于,逆转录病毒和腺病毒载体。

[0186] 用于通过这种方法转染的合适宿主细胞或细胞系包括细菌细胞。例如,大肠杆菌的多种菌株作为生物技术领域中的宿主细胞是众所周知的。枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和其他杆菌等的多种菌株也可以在这个方法中采用。本领域技术人员已知的许多酵母细胞菌株也可用作宿主细胞用于表达本发明的肽。其他真菌细胞或昆虫细胞例如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 细胞也可以用作表达系统。备选地,可以使用哺乳动物细胞,例如 HeLa, C127, BHK, Bowes 黑素瘤细胞,人 293 细胞,中国仓鼠卵巢细胞 (CHO),猴 COS-1 细胞系,Vero 细胞,衍生自 Swiss-3T3 或 NIH 小鼠的 **PER.C6**[®] 或鼠类 3T3 细胞。另外其他合适的宿主细胞以及用于转染、培养、扩增、筛选、产生和纯化的方法是本领域已知的。

[0187] 本发明的抗原肽或组合物或其组分可以通过在合适的宿主细胞中表达本发明的核酸而产生。宿主细胞可以例如通过常规方法例如电穿孔用至少一种表达载体进行转染,所述表达载体包含在转录调节序列控制下的本发明的核酸。随后在允许蛋白质表达的条件下培养经转染的或经转化的宿主细胞。通过本领域技术人员已知的合适方法,从细胞(或从培养基中,如果细胞外表达)中回收、分离和任选纯化所表达的蛋白质。例如,蛋白质在细胞裂解后以可溶形式进行分离,或使用已知技术例如在胍氯化物中进行提取。需要时,本发明的肽或片段作为融合蛋白产生。此类融合蛋白是上文描述的那些。备选地,例如,可能希望产生融合蛋白,以增强蛋白质在所选择的宿主细胞中的表达或改善纯化。包括本发明的肽和组合物的分子可以使用多种常规方法中的任何进行进一步纯化,所述常规方法包括但不限于:液相色谱法例如正相或反相,使用 HPLC、FPLC 等;亲和色谱法(例如用无机配体或单克隆抗体);尺寸排阻色谱法;固定金属螯合色谱法;凝胶电泳等。本领域技术人员可以选择最合适的分离和纯化技术而不背离本发明的范围。此类纯化提供以基本上不含微生物的其他蛋白质性质和非蛋白质性质材料的形式的肽/蛋白质/组合物。

[0188] 本发明的一个进一步主题涉及药物组合物,特别是疫苗,其包括根据本发明的至少一种保护肽或其功能活性变体或根据本发明的组合物、和任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

[0189] 本发明的抗原肽或组合物可以用于关于免疫或治疗具有由肺炎链球菌感染引起的疾病的人和/或动物的方法。因此,抗原肽或组合物可以在药物组合物内使用。本发明的药物组合物可以进一步包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。在本发明中有用的药学上可接受的载体和/或赋形剂是常规的,并且可以包括缓冲剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂和增溶剂。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第 15 版 (1975), 描述了适合于本文公开的(多)肽/蛋白质的药学递送的组合物和制剂。

[0198] 组合物可以用于例如受试者的免疫或治疗。药物组合物包括本发明的至少一种抗原肽或组合物；然而，它还可以包含混合剂 (cocktail) (即简单混合物)，所述混合物包含本发明的不同抗原肽 (包括片段和变体) 或蛋白质或组合物，任选与其他病原体的支持肽或蛋白质或不同抗原肽或蛋白质相混合。这些肽、多肽、蛋白质或其片段或变体的此类混合物用于例如产生针对广谱肺炎链球菌分离物的所需抗体。本发明的一种或多种 (多) 肽 / 组合物也可以以药学上可接受的盐的形式使用。能够与本发明的肽形成盐的合适的酸和碱是本领域技术人员众所周知的，并且包括无机和有机酸和碱。

[0199] 备选地，药物组合物包括

[0200] (i) 本发明的一种或多种核酸或与之互补的一种或多种核酸，和

[0201] (ii) 任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

[0202] 单独地或与编码肽 / 蛋白质 / 组合物或抗体或针对其他致病微生物的其他核酸序列组合的核酸序列，可以进一步用作药物组合物的组分。组合物可以用于免疫或治疗具有由肺炎链球菌感染引起的疾病的人和 / 或动物。

[0203] 药学上可接受的载体或赋形剂可以是如上限定的。

[0204] 在另一个实施方案中，单独地或与编码来自其他致病微生物的其他抗原或抗体的核酸序列组合的本发明核酸序列，可以进一步用于涉及在受试者中主动 (actively) 诱导针对病原体的保护性免疫应答的组合物中。本发明的这些组分在用于在人和 / 或动物中诱导针对经由肺炎链球菌的感染的保护性免疫应答的方法中。

[0205] 对于在制备治疗性或疫苗组合物中的用途，核酸递送组合物和方法是有用的，这是本领域技术人员已知的。本发明的核酸或与之互补的一种或多种核酸可以在本文描述的本发明的方法或组合物中采用作为 DNA 序列，作为裸露 DNA 施用，或与药学上可接受的载体结合且提供用于抗原、肽或多肽的体内表达。所谓的“裸露 DNA”可以用于在患者体内表达本发明的抗原肽或组合物。(参见例如，Cohen, J. (1993), Science 259:1691-2, 其描述了“裸露 DNA”的相似用途)。例如，与调节序列结合的“裸露 DNA”可以在治疗上施用或作为疫苗组合物的部分例如通过注射施用。

[0206] 备选地，编码本发明的抗原肽或组合物的核酸或与之互补的核酸可以在药物组合物内使用，例如以便在体内表达本发明的抗原肽或组合物，例如以诱导抗体。

[0207] 本发明的一个优选实施方案涉及药物组合物，其中核酸包括在载体和 / 或除肺炎链球菌外的细胞中。在本发明的背景中合适的载体和细胞在上文描述。特别采用用于 DNA 疫苗的载体。用于递送的合适载体可以由本领域技术人员容易地选择。用于体内基因递送的示例性载体可容易地得自各种研究院和商业来源，并且包括例如腺伴随病毒 (WO 91/18088)、腺病毒载体 (Kay, M. 等人 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2353; Ishibashi, S. 等人 (1993), J. Clin. Invest. 92:883)、或其他病毒载体，例如各种痘病毒、痘苗病毒等。重组病毒载体例如逆转录病毒或腺病毒优选用于将外源 DNA 整合到细胞的染色体。

[0208] 在本发明的范围内还包括的是针对根据本发明的抗原肽或组合物的抗体的产生。这包括例如单克隆和多克隆抗体、嵌合、单链和人源化抗体、以及 Fab 片段或 Fab 表达文库的产物，其能够与根据本发明的抗原肽或组合物特异性结合。

[0209] 在一个优选实施方案中，抗体是单克隆、多克隆、嵌合或人源化抗体或其功能活性

片段。在另一个优选实施方案中,功能活性片段包括 Fab 片段。

[0210] 针对根据本发明的抗原肽或组合物产生的抗体可以这样获得:通过将根据本发明的抗原肽或组合物直接注射到动物内,或将根据本发明的抗原肽或组合物施用于动物,优选非人。如此获得的抗体随后将结合根据本发明的抗原肽或组合物。此类抗体随后可以用于从表达其的组织中分离反应抗原、肽或蛋白质。

[0211] 关于单克隆抗体的制备,可以使用本领域已知的任何技术,其提供通过连续细胞系培养例如杂交瘤细胞系产生的抗体。

[0212] 对于单链抗体产生所描述的技术(美国专利号 4,946,778)可以适应于产生针对根据本发明的抗原肽或组合物的单链抗体。此外,转基因小鼠或其他生物体例如其他哺乳动物可以用于表达针对根据本发明的抗原肽或组合物的人源化抗体。

[0213] 抗体还可以使用杂交瘤细胞系产生。表达所需单克隆抗体的杂交瘤细胞系通过众所周知的常规技术产生。通过使正常激活的、产生抗体的 B 细胞与骨髓瘤细胞相融合可以产生杂交瘤细胞。在本发明的背景中,杂交瘤细胞能够产生与根据本发明的抗原肽或组合物特异性结合的抗体。

[0214] 相似地,通过将已知重组技术应用于对于这些肽/蛋白质/组合物开发的单克隆或多克隆抗体而产生所需高滴度抗体(参见例如,WO86/01533;British Patent Publication No. GB2188638A;Amit 等人(1986), Science 233:747-53;Queen 等人(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-33;WO 90/07861;Riechmann 等人(1988), Nature 332:323-7;Huse 等人(1988), Science 246:1275-81)。

[0215] 因此,本发明的另一个主题是用于产生抗体的方法,其特征在于下述步骤:

[0216] (a) 给动物施用有效量的如上限定的本发明的至少一种保护肽或其功能活性变体、和/或如上限定的本发明的组合物;和

[0217] (b) 从动物中分离响应步骤(a)的施用由动物产生的抗体。

[0218] 用于产生抗体的本发明的备选方法的特征在于下述步骤:

[0219] (a) 使 B 细胞与有效量的如上限定的本发明的至少一种保护肽或其功能活性变体、和/或如上限定的本发明的组合物相接触;

[0220] (b) 使步骤(a)的 B 细胞与骨髓瘤细胞相融合,以获得杂交瘤细胞;和

[0221] (c) 分离由培养的杂交瘤细胞产生的抗体。

[0222] 特别地,抗体可以这样产生:通过经由给动物施用本发明的抗原肽或组合物在非人动物中起始免疫应答,从所述动物中取出包含抗体的体液,并且通过对所述包含抗体的体液实施进一步纯化步骤而产生抗体。备选地,抗体可以这样产生:通过经由给非人动物施用如本发明中限定的抗原肽或组合物在所述动物中起始免疫应答,从所述动物中取出脾或脾细胞和/或产生所述脾或脾细胞的杂交瘤细胞,选择且克隆对于根据本发明的抗原肽或组合物特异的杂交瘤细胞,且通过培养所述经克隆的杂交瘤细胞而产生抗体。在一个优选实施方案中,根据本发明的方法产生的抗体另外进行纯化。纯化方法是技术人员已知的。

[0223] 抗体可以在用于预防或治疗感染的方法中使用。因此,本发明的另外一个主题涉及包括根据本发明产生的抗体的药物组合物,特别是疫苗。药物组合物可以包括如上详述的进一步组分。组合物可以进一步包括增加其刺激 T 细胞的能力的物质。这些包括 T 辅助细胞表位、脂质或脂质体或优选的修饰,如 WO01/78767 中描述的。增加表位的 T 细胞刺

激能力的另一种方法是其与免疫刺激物质的配制,所述免疫刺激物质例如细胞因子或趋化因子如白介素-2、-7、-12、-18、I 和 II 类干扰素 (IFN) 特别是 IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、flt3-配体及其他。

[0224] 本发明的一个进一步主题涉及如上限定的本发明的保护肽或其功能活性变体和 / 或如上限定的本发明的组合物和 / 或如上限定的本发明的核酸用于制造药剂用于受试者的免疫或治疗的用途,优选针对肺炎链球菌,更优选针对由肺炎链球菌引起的肺炎、菌血症、中耳炎、脑膜炎、鼻窦炎、腹膜炎和 / 或关节炎。

[0225] 本发明的肽、蛋白质、组合物或核酸一般用于在受试者中诱导免疫应答。用于免疫接种的疫苗可以施用于对经由肺炎链球菌的感染敏感的受试者,优选哺乳动物,并且更加优选人,以任何方便的方式,包括经口、局部、鼻内、肌内、淋巴结内、皮内、腹膜内、皮下及其组合,但最优选通过肌内注射。用于肌内注射的剂量的体积优选多至约 5ml、更加优选 0.5ml-3ml、且最优选约 1-2ml。当皮下注射是所选择的施用途径时,剂量的体积优选多至约 5ml、更加优选 0.5ml-3ml、且最优选约 1-2ml。在每个剂量中的物质质量应足以对接受以其的疫苗接种的受试者赋予针对肺炎链球菌的有效免疫,并且降低发展起因于肺炎链球菌感染的临床体征的危险。优选地,蛋白质的单位剂量应是多至约 5 μ g 蛋白质 /kg 体重、更优选约 0.2-3 μ g、更加优选约 0.3-1.5 μ g、更优选约 0.4-0.8 μ g、并且更加优选约 0.6 μ g。蛋白质的备选优选单位剂量可以多至约 6 μ g 蛋白质 /kg 体重、更优选约 0.05-5 μ g、更加优选约 0.1-4 μ g。剂量优选施用 1-3 次,例如伴随 1-4 周的间隔。蛋白质 / 剂量的优选量是约 1 μ g- 约 1mg、更优选约 5 μ g- 约 500 μ g、更加优选约 10 μ g- 约 250 μ g、并且最优选约 25 μ g- 约 100 μ g。

[0226] 在本发明的另外一个方面,根据本发明产生的抗体或其功能片段用于制造药剂用于治疗感染,优选肺炎链球菌感染。治疗涉及给受试者,优选哺乳动物,更优选人施用有效量的抗体。因此,可以采用针对本发明的保护肽或其变体或组合物的抗体,以抑制和 / 或治疗感染,特别是细菌感染且特别是起于肺炎链球菌的感染。

[0227] 本发明的肽、蛋白质、组合物或核酸或根据本发明产生的抗体的“有效量”可以计算为能够显示出体内效应的量,例如预防或改善感染特别是肺炎链球菌感染的体征或症状。此类量可以由本领域技术人员决定。此类物质可以以任何方便方式施用,包括经口、局部、鼻内、肌内、淋巴结内、皮内、腹膜内、皮下及其组合,但优选肌内或皮下。然而,它还可以配制为通过任何其他合适途径施用,包括经口或局部。此类治疗性组合物的递送途径和剂量的选择在本领域的技术内。

[0228] 在本发明的背景中的治疗指治疗性治疗和防止或预防性措施,其中目标是预防或减缓(减少)所靶向的病理学病状或病症。需要治疗的那些包括已具有病症的那些以及易于具有病症的那些或其中待预防病症的那些。

[0229] 本发明的另外一个进一步的主题涉及诊断肺炎链球菌感染的方法,其包括步骤:

[0230] (a) 使得自受试者的样品与如上限定的本发明的保护肽或其功能活性变体、和 / 或如上限定的本发明的组合物相接触;和

[0231] (b) 检测样品中针对保护肽、功能活性变体和 / 或组合物的抗体的存在,

[0232] 其中抗体的存在指示肺炎链球菌感染。

[0233] 本发明的抗原肽或组合物可以用于检测肺炎链球菌。优选地,此类检测用于诊断、

更优选用于诊断疾病、更优选用于诊断肺炎链球菌感染。抗原肽或组合物可以用于检测例如在得自受试者的样品中肺炎链球菌特异性抗体或其片段的存在。样品可以是例如血样。备选地,肺炎链球菌特异性保护肽的存在可以使用根据本发明的方法制备的抗体进行检测。

[0234] 本发明还涉及诊断测定法例如定量和诊断测定法,用于检测细胞和组织或体液中本发明的肽、蛋白质或抗体的水平,包括正常和异常水平的测定。可以用于测定衍生自宿主的样品中肽、组合物或抗体的水平的测定法技术是本领域技术人员众所周知的。此类测定方法包括放射性免疫测定法、竞争结合测定法、western 印迹分析法和 ELISA 测定法。在这些中,ELISA 通常是优选的。ELISA 测定法最初包括制备对于肽或组合物特别是保护肽特异的抗体,优选单克隆抗体。此外,一般制备与单克隆抗体结合的报道分子抗体。使报道分子抗体与可检测试剂例如放射性、荧光或酶促试剂例如辣根过氧化物酶附着。

[0235] 本发明的抗原肽或组合物也可以用于阵列的目的或与阵列结合使用。更具体而言,本发明的至少一种抗原肽或组合物可以固定在支持物上。所述支持物一般包括各种肽/蛋白质,由此通过使用本发明的一种或数种肽或组合物可以产生多样性。此类阵列以及一般而言的任何阵列的特有特征是下述事实:在所述支持物或其表面上在独特或预定区域或位置处,固定独特多肽。因为这点,在阵列的独特位置或区域处的任何活性都可以与特定多肽相关联。固定在支持物上的本发明的不同肽或抗体的数目可以从少至 10 种到数千种不同的本发明的肽或组合物。备选地,根据本发明产生的抗体可以用于检测本发明的抗原肽或组合物。

[0236] 此类阵列的制造是本领域技术人员已知的,并且例如在美国专利 5,744,309 中描述。阵列优选包括具有至少第一个表面的平面、多孔或无孔固体支持物。优选的支持物材料尤其是玻璃或纤维素。阵列用于本文描述的任何诊断应用也在本发明内。除本发明的肽或抗体外,根据本发明的核酸分子也可以用于产生如上所述的阵列。

[0237] 用于诊断经由肺炎链球菌的感染的备选方法包括步骤:

[0238] a) 使得自受试者的样品与对于本发明的一种或多种核酸特异的引物和 / 或探针相接触;和

[0239] b) 检测样品中本发明的一种或多种核酸的存在,

[0240] 其中一种或多种核酸的存在指示肺炎链球菌感染。

[0241] 通过使用特异性引物和 / 或探针用于检测探针中的核酸的一系列方法是本领域已知的。一般而言,这些方法基于引物或探针与所讨论的核酸的特异性结合。方法可以涉及在实际检测步骤前扩增核酸例如 RNA 或 DNA。因此,引物可以用于特异性诱导 RNA 或 DNA 的转录和 / 或扩增,以便产生可检测量的核酸。合适的众所周知的技术可以是 PCR 和 RT-PCR。用于本发明的方法的合适引物和探针可以基于本申请中提供的序列信息而产生。关于设计针对特定核酸的引物和探针的指导和计算机的辅助程序(例如 Primer **Express**[®], Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)是本领域技术人员已知的。

[0242] 在扩增步骤后,经扩增的核酸一般而言 DNA 可以例如通过其大小(例如,涉及琼脂糖凝胶电泳)或使用经标记的探针进行检测,所述经标记的探针与经扩增的核酸特异性结合。探针可以用染料、放射性标记、荧光标记、酶联标记或任何其他标记进行标记。

[0243] 例如, FRET (**F**örster 共振能量转移) 可以用于检测本发明的核酸。在 FRET 中,

供体荧光团分子吸收激发能,并且经由偶极-偶极相互作用将这递送给附近的受体荧光团分子。这个过程仅在供体和受体分子彼此足够接近时发生。用于测定供体和受体部分的最佳物理排列的几种不同策略是技术人员已知的。为此,荧光供体在其特定荧光激发波长处进行激发。通过大范围偶极-偶极偶联机制,这个激发状态随后非辐射地转移给第二种分子——受体。供体恢复电子基底状态。所述能量转移机制被称为“**Förster**共振能量转移”(FRET)。该过程涉及当 FRET 供体和受体部分由于 DNA 杂交而在一起时测量荧光。例如,各自用合适标记进行标记的 2 种探针在允许 FRET 发生的距离内与本发明的核酸杂交。合适标记包括 Cyan 500、Cy5、Cy3、SYBRGreen I、荧光素、HEX、Red 610 和 Red 640,其中所涉及的 2 种标记必须基于其激发和发射谱进行选择,如技术人员已知的。用于检测核酸的合适系统是**LightCycler**[®] (Roche Diagnostics)。

[0244] 本发明的一个进一步主题涉及用于鉴定能够与根据本发明的保护肽或其功能活性变体和/或根据本发明的组合物结合的配体的方法,其包括:

[0245] (a) 提供包括肽和/或组合物的测试系统,

[0246] (b) 使测试系统与测试化合物相接触,和

[0247] (c) 检测响应测试化合物与肽和/或组合物结合产生的信号。

[0248] 更具体而言,该方法可以这样执行:通过在允许候选配体与肽结合的条件下,使经分离的或经固定的根据本发明的抗原肽或组合物与候选配体相接触,其中测试系统包括能够响应候选配体与所述肽结合提供可检测信号的组分;并且检测响应配体与肽结合产生的信号的存在或不存在。配体可以是激动剂或拮抗剂。

[0249] 用于检测配体的结合的测试系统是技术人员已知的,并且包括例如用经标记的配体例如放射性配体、荧光标记的配体或酶标记的配体的结合测定法。

[0250] 测试化合物可以是天然存在或化学合成的任何测试化合物。天然存在的测试化合物特别包括抗体,优选显示与本发明的抗体的相似性的那些。在本发明的一个优选实施方案中,测试化合物以化学化合物文库的形式提供。化学化合物文库包括多种化学化合物,并且已由多重来源中的任何装配,包括化学合成分子和天然产物,或已通过组合化学技术产生。它们特别适合于高通量筛选。它们可以由特定结构的化学化合物或特定生物例如植物的化合物组成。

[0251] 本发明的一个进一步主题涉及根据本发明的保护肽或其功能活性变体或根据本发明的组合物用于分离和/或纯化和/或鉴定抗原肽和/或组合物的相互作用配偶体的用途。配体的分离和/或纯化和/或鉴定可以如上详述的或如本领域技术人员已知的执行。在本发明的一个优选实施方案中,可以使用亲和力装置。亲和力装置可以包括至少支持物材料,和与支持物材料附着的根据本发明的任何抗原肽或组合物。由于根据本发明的抗原肽和/或组合物对于其靶细胞或靶分子或其相互作用配偶体的特异性,抗原肽和/或组合物允许从应用于支持物材料的任何种类的样品中选择性取出其一种或多种相互作用配偶体,前提是满足用于结合的条件。样品可以是生物学或医学样品,包括但不限于,发酵肉汤、细胞碎片、细胞制剂、组织制剂、器官制剂、血液、尿、淋巴液体、液剂等。肽或组合物可以以共价或非共价方式与基质附着。合适的载体材料是本领域技术人员已知的,并且可以选自纤维素、硅、玻璃、铝、顺磁珠、淀粉和右旋糖酐。

[0252] 本发明通过下述附图、实施例和序列列表进一步举例说明,从其中可以获得进一步

特征、实施方案和优点。应当理解呈现的实施例仅为了举例说明而不是为了限制公开内容给出。

[0253] 图例

[0254] 图 1 显示在小鼠致死率模型中通过用所选择的肺炎链球菌抗原主动免疫实现的保护。C3H/HeN 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用从血清型 4 肺炎链球菌菌株 TIGR4_IC 中克隆的重组抗原进行免疫, 并且用血清型 6B 菌株 Pj-1259 进行攻击。监控存活以攻击后 2 周。小鼠用 50 μ g 分别的重组蛋白质进行皮下免疫, 所述重组蛋白质用氢氧化铝 (ALUM) (A) 或 CFA/IFA (B) 进行辅助。小鼠随后用 10^4 cfu 肺炎链球菌 6B 进行腹膜内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。监控存活以攻击后 15 天, 并且描述为总动物的百分率。

[0255] 图 2 显示在小鼠致死率模型中用与 SP1732-3 和 SP2216-1 组合的所选择的肺炎链球菌抗原的组合主动免疫实现的保护。C3H/HeN 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用从血清型 4 肺炎链球菌菌株 TIGR4_IC 中克隆的重组抗原的组合进行免疫, 并且用血清型 6B 菌株 Pj-1259 进行攻击。监控存活以攻击后 2 周。小鼠用 50 μ g 每种重组蛋白质抗原的混合物进行皮下免疫, 所述重组蛋白质抗原用氢氧化铝或 (ALUM) 进行辅助。小鼠随后用 10^4 cfu 肺炎链球菌 6B 进行腹膜内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。监控存活以攻击后 15 天, 并且描述为总动物的百分率。(在 A 和 B 中描述了 2 次不同实验)。

[0256] 图 3 显示在小鼠致死率模型中用与 SP1732-3 和 SP1650 (PsaA) 组合的所选择的肺炎链球菌抗原的组合主动免疫实现的保护。C3H/HeN 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用从血清型 4 肺炎链球菌菌株 TIGR4_IC 中克隆的重组抗原的组合进行免疫, 并且用血清型 6B 菌株 Pj-1259 进行攻击。监控存活以攻击后 2 周。小鼠用 50 μ g 每种重组蛋白质抗原的混合物进行皮下免疫接种, 所述重组蛋白质抗原用氢氧化铝或 (ALUM) 进行辅助。小鼠随后用 10^4 cfu 肺炎链球菌 6B 进行腹膜内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。监控存活以攻击后 15 天, 并且描述为总动物的百分率。(在 A 和 B 中描述了 2 次不同实验)。

[0257] 图 4 显示在肺炎模型中通过用所选择的肺炎链球菌抗原主动免疫实现的保护。CD-1 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 50 μ g 蛋白质抗原进行皮下免疫, 所述蛋白质抗原用 ALUM 进行辅助。(A) 小鼠用 10^5 cfu 肺炎链球菌 WU2 (血清型 3) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 和裂解物 (WU2) 充当阳性对照。(B) 小鼠用 5×10^7 cfu 肺炎链球菌 EF3030 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 和 Prevnar 充当阳性对照。作为关于肺炎的读出, 在第 3 天时, 在无菌条件下取出肺, 匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每只个别小鼠 (10 只小鼠 / 组) 测定 cfus/ 器官。

[0258] 图 5 显示在肺炎模型中用与 SP1732-3 和 SP2216-1 组合的所选择的肺炎链球菌抗原的组合主动免疫实现的保护。CD-1 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 50 μ g 蛋白质抗原进行皮下免疫, 所述蛋白质抗原用 ALUM 进行辅助。(A) 小鼠用 10^5 cfu 肺炎链球菌 WU2 (血清型 3) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 和裂解物充当阳性对照。(B) 小鼠用 5×10^7 cfu 肺炎链球菌 EF3030 (血清型 19F) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 和 Prevnar 充当阳性对照。作为关于肺炎的读出, 在第 3 天时, 在无菌条件下取出肺, 匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每只

个别小鼠 (10 只小鼠 / 组) 测定 cfus/ 器官。

[0259] 图 6 显示在小鼠致死率模型中用所选择的肺炎链球菌抗原主动免疫实现的保护。C3H/HeN 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用从 TIGR4_IC 或 Pj-1259 肺炎链球菌菌株中克隆的重组抗原进行免疫, 并且用血清型 6B 菌株 Pj-1259 进行攻击。监控存活以攻击后 14 天。小鼠用 $50 \mu\text{g}$ gSP2216-1、SP1732-3、PsaA 或这些抗原的组合进行皮下免疫, 所述抗原用氢氧化铝 (ALUM) 或 **IC31**[®] (100nmol KLKLLLLLKLK ; 4nmol ODN1a ([dIdC]13)) 进行辅助。小鼠随后用 10^4cfu 肺炎链球菌 6B 进行腹膜内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。在第 7 天 (A) 时或在第 14 天 (B) 时描绘存活百分率。描述了使用氢氧化铝 (黑色条) 的 2 次独立实验或使用 **IC31**[®] (白色条) 的 2 次独立实验。

[0260] 图 7 显示在鼻内小鼠脓毒症模型中用 SP1732-3 和 SP2216-1 主动免疫实现的保护。NMRI 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质抗原进行皮下免疫, 所述蛋白质抗原用 CFA/IFA 进行辅助。小鼠用 $5 \times 10^6\text{cfu}$ 肺炎链球菌 6301 (血清型 1) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。监控存活以攻击后 16 天, 并且描述为总动物的百分率。

[0261] 图 8 显示在鼻内小鼠脓毒症模型中用 SP1732-3 和 SP2216-1 主动免疫实现的保护。CBA/N 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质抗原进行皮下免疫, 所述蛋白质抗原用 CFA/IFA 进行辅助。小鼠用 $5 \times 10^4\text{cfu}$ 肺炎链球菌 TIGR4_DB (血清型 4) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。监控存活以攻击后 12 天, 并且描述为总动物的百分率。

[0262] 图 9 显示在肺炎模型中用 SP1732-3 和 SP2216-1 主动免疫实现的保护。CBA/N 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质抗原进行皮下免疫, 所述蛋白质抗原用 CFA/IFA 进行辅助。小鼠用 10^7cfu 肺炎链球菌 EF3030 (血清型 19F) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。作为关于肺炎的读出, 在攻击后第 6 天时, 在无菌条件下取出肺, 匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每只个别小鼠 (5-10 只小鼠 / 组) 测定 cfus/ 器官。

[0263] 图 10 显示在肺炎模型中用 SP1732-3、SP2216-1 和 SP1650 (PsaA) 以及 SP1732-3、SP2216-1 (和 SP1650) 的组合主动免疫实现的保护水平。CD-1 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质抗原进行皮下免疫, 所述蛋白质抗原用氢氧化铝 (ALUM) 进行辅助。小鼠用 (A) 10^5cfu 肺炎链球菌 WU2 (血清型 3) 或 (B) $5 \times 10^7\text{cfu}$ 肺炎链球菌 EF3030 (血清型 19F) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, 而 PspA (SP0117)、Prevnar 和 / 或裂解物充当阳性对照。作为关于肺炎的读出, 在第 3 天时, 在无菌条件下取出肺, 匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每只个别小鼠测定 cfus/ 器官。显示了 2 或 3 次实验的概括 (10 只小鼠 / 组 / 实验)。统计显著性 (曼 - 怀氏双样本秩和检验) 用星号指示。

[0264] 图 11 显示在小鼠致死率模型中用 SP1732-3 和 SP2216-1 的组合或用 SP1732-3、SP2216-1 和 SP1650 (PsaA) 的组合主动免疫实现的保护水平。C3H/HeN 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用重组抗原的分别组合进行 (A) 皮下或 (B) 肌内免疫, 所述重组抗原用 ALUM 进行辅助。小鼠用 10^4cfu 肺炎链球菌 6B 进行腹膜内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照, PspA (SP0117)

充当阳性对照。监控存活以攻击后 12 天,并且描述为总动物的百分率。

[0265] 图 12 显示在鼻内小鼠脓毒症模型中用 SP1732-3 和 SP2216-1 的组合或用 SP1732-3、SP2216-1 和 SP1650 (PsaA) 的组合主动免疫实现的保护。NMRI 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 用 50 μ g 蛋白质抗原进行皮下免疫,所述蛋白质抗原用 ALUM 进行辅助。小鼠用 5×10^6 cfu 肺炎链球菌 6301 (血清型 1) 进行鼻内攻击。佐剂对照小鼠用作阴性对照,而 PspA (SP0117) 充当阳性对照。监控存活以攻击后 10 天,并且描述为总动物的百分率。

实施例

[0266] 实施例 1:重组肺炎球菌抗原的克隆和表达、其序列分析和保守抗原的鉴定

[0267] 实验操作

[0268] 基因 /DNA 片段的克隆:使用基因特异性引物通过 PCR,从肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259 或血清型 4 菌株 TIGR4_IC 的基因组 DNA 中扩增目的基因 /DNA 片段。除基因特异性部分外,引物具有帮助定向克隆经扩增的 PCR 产物的限制位点。引物的基因退火 (特异性) 部分长度范围为 15-30 个碱基。所获得的 PCR 产物用合适的限制酶进行消化,并且克隆用于加 His 标签的蛋白质的 pET28b (+) 载体 (Novagen) 内。构建体在表 1 中列出。证实重组质粒包含目的基因后,转化充当表达载体的大肠杆菌 BL21 **Star**[®] 细胞 (Invitrogen)。

[0269] 表 1:选择用于表达的基因列表。基因的命名法和编号衍生自肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的公开基因组。对于每个构建体指出了用于克隆的限制位点 (RE) 和扩增子的位置 (起始 / 终止)。*,根据表达构建体的序列证实,将相对于天然蛋白质在位置 50 处的残基丝氨酸改变成脯氨酸。**,根据表达构建体的序列证实,将相对于天然蛋白质在位置 9 处的残基谷氨酸改变成甘氨酸。2 个突变可以是由于 PCR 扩增或用于 PCR 扩增的具体 TIGR4_IC 菌株中的突变。

[0270]

构建体	基因	菌株	载体	RE	aa (起始/终止)	nt (起始/终止)	Seq ID (aa, nt)
1	SP0498	TIGR4_IC	pET28b (+)	BamHI / NotI	881-1658	2641-4974	1, 9
2	SP0609	TIGR4_IC	pET28b (+)	NcoI / NotI	1-254 *	1-762	2, 10
3	SP0749	TIGR4_IC	pET28b (+)	NcoI / NotI	28-386	82-1158	3, 11
4	SP2027	TIGR4_IC	pET28b (+)	NcoI / XhoI	2-136	4-408	4, 12
5	SP2194	TIGR4_IC	pET28b (+)	NcoI / NotI	2-810 **	4-2430	5, 13
6	SP2216-1	TIGR4_IC	pET28b (+)	NcoI / NotI	28-278	82-834	6, 14
7	SP1732-3	Pj-1259	pET28b (+)	NcoI / XhoI	345-659	1033-1977	7, 15
8	SP1650 (PsaA)	Pj-1259	pET28b (+)	NcoI / XhoI	21-309	61-927	8, 16

[0271] 蛋白质的表达和纯化:

[0272] 具有重组质粒的大肠杆菌 BL21 **star**[®] 细胞在所需培养体积中培养到对数期。达到 OD_{600nm} 0.6 后,在 37°C 下用 0.5mM IPTG 诱导培养物 3 小时。通过离心收获细胞,通过冻融法的组合进行裂解随后用 '**Bug-buster**[®] (Novagen) 破坏细胞。通过离心使裂解物分离成可溶性 (上清液) 和不溶性 (团块) 部分。依赖于蛋白质的位置,应用不同的纯化策略。

[0273] A) 如果加 His 标签的蛋白质在可溶性部分中,那么通过使上清液与 Ni-Sepharose 珠 (Ni-Sepharose[™] 6Fast Flow, GE Healthcare) 结合来完成蛋白质纯化。由于在所表达

的蛋白质的 C 末端处 6 组氨酸 (6xHIS) 的存在, 它与 Ni-Sephrose 结合, 而其他污染蛋白质通过洗涤缓冲液从柱中洗掉。通过在 pH 7.4 下的 20mM NaH_2PO_4 , 0.5mM NaCl 缓冲液中的 500mM 咪唑洗脱蛋白质。使洗脱物浓缩, 通过 Bradford 或 BCA 测定蛋白质浓度, 并且通过 SDS-PAGE 和 western 印迹进行检查。

[0274] B) 如果蛋白质存在于不溶性部分中, 那么使用如上所述相同的材料和操作, 使团块溶解于包含 8M 尿素的合适缓冲液中, 并且在变性条件下 (在包含 8M 尿素的缓冲液中) 施加到 Ni-NTA 柱上。通过不含尿素的洗涤缓冲液从柱中洗掉污染蛋白质。在蛋白质固定在 Ni-NTA 基质上的同时执行加 His 标签的蛋白质的重折叠。在复性后, 通过加 500mM 咪唑洗脱蛋白质。使洗脱物透析以去除痕量尿素, 并且如果体积很大则进行浓缩, 通过 SDS-PAGE 进行检查, 并且通过 Bradford 或 BCA 方法进行测量。

[0275] 链球菌属基因组 DNA 的制备

[0276] 用来自冷冻穿刺 (stab) 的肺炎链球菌的分别菌株接种 5ml Todd-Hewitt 肉汤培养基, 并且无需振荡在 37°C 下培养过夜。随后通过在 13,000rpm 下在 biofuge fresco (Heraeus) 中离心 5 分钟收获 4ml 培养物, 并且去除上清液。根据 **Wizard**[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) 的方案从细菌细胞团块中分离出 DNA。DNA 团块最后进行风干并且溶解于 70 μl ddH₂O 中。

[0277] 肺炎球菌抗原的 PCR 扩增

[0278] 用对于目的基因特异的引物对一系列独立的肺炎链球菌分离物 (表 2) 执行 PCR。使用公共程序 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.slow.cgi) 对于 3 种疫苗候选物设计作为引物的寡核苷酸序列。对于所选择的抗原设计作为引物用于 PCR 的寡核苷酸序列, 以便能够扩增完全基因。如上所述制备所有肺炎链球菌菌株的基因组 DNA。根据制造商说明书 (Invitrogen, 荷兰), 使用 Taq 聚合酶 (1U)、200nM dNTPs、10pMol 每种寡核苷酸、约 10-20ng DNA 和试剂盒, 在 25 μl 的反应体积中执行 PCR。作为标准, 执行 30 个循环 (1x : 5 分钟 95°C, 30x : 30 秒 95°C, 30 秒 56°C, 120 秒 72°C, 1x : 4 分钟 72°C), 除非条件必须适合个别引物对。在 Biometra T3 Thermocycler 中执行 PCR 扩增。

[0279] 应用下述条件重复在第一个扩增循环中的所有阴性 PCR 反应:

[0280] 5 μl 基因组 DNA (在 ddH₂O 中 1 : 33 稀释; 约 10-20ng)

[0281] 2.5 μl 10x 缓冲液 (Invitrogen Taq 聚合酶 I)

[0282] 1.0 μl 50mM MgCl_2

[0283] 2.5 μl 2mM dNTPs

[0284] 各 1 μl 10pM 寡核苷酸

[0285] 0.2 μl Invitrogen Taq 聚合酶 I (5U/ μl)

[0286] 11.8 μl ddH₂O

[0287] 随后通过在 1% 琼脂糖凝胶上电泳显现 DNA 样品, 并且用溴化乙锭 (EtBr) 染色。可能时, 执行寡核苷酸设计以掺入鉴定为抗原性的所有区域。在其中基因小于 1,000bp 的情况下, 完整基因用于分析。所有寡核苷酸都在表 3 中列出。

[0288] 表 1 中提及的 2 个点突变 (用 * 和 ** 标记) 可以是源于 PCR 扩增。因此, 不含这些点突变的 SP0609 和 SP2194 的保护肽的分别序列分别显示为 SEQ ID NO: 17 和 18。

[0289] 表 2: 用于本研究的肺炎链球菌菌株。*, TIGR4_DB (Ren, B., 等人 (2003),

Infect Immun. 71 :75-85) 和 TIGR4_IC 菌株不同于用于序列比较的 TIGR4_Tettelin 菌株 (Tettelin 等人 (2001), Science293 :498-506), 如基因组数据库中可公开获得的。

[0290]

编号	菌株	血清型
1	Pj-102-59	18C
2	Pj-102-62	23F
3	Pj-102-70	23F
4	Pj-102-77	3
5	Pj-102-93	19F
6	Pj-102-94	7F
7	Pj-102-98	6B
8	Pj-102-113	4
9	Pj-102-148	3
10	Pj-102-160	9V
11	Pj-102-161	9V
12	Pj-102-163	7F
13	Pj-102-174	4
14	Pj-102-228	19F
15	Pj-102-386	6B
16	Pj-102-468	18C

[0291]

17	Pj-1344	1
18	Pj-1364	14
19	Pj-1484	14
20	Pj-1490	1
21	Pj-1228	1
22	Pj-1229	19F
23	Pj-1230	3
24	Pj-1231	8
25	Pj-1232	19A
26	Pj-1233	19A
27	Pj-1234	14
28	Pj-1236	9N
29	Pj-1237	7F
30	Pj-1241	6A
31	Pj-1242	18C
32	Pj-1244	4
33	Pj-1248	23F
34	Pj-1250	6B
35	Pj-1255	9V
36	Pj-1262	9N
37	Pj-1279	6A
38	Pj-1283	33F
39	Pj-1284	17F
40	Pj-1291	22F
41	Pj-1297	35A
42	Pj-1298	8
43	Pj-1300	22F
44	Pj-1322	35F
45	Pj-1330	17F
46	Pj-1345	12F
47	Pj-1347	12F
48	Pj-1369	35F
49	Pj-1386	33F
50	PBI-71	5
51	I-33_Andersson	3
52	Pj-1291_Andersson	22F
53	TIGR4_DB*	4
54	TIGR4_IC*	4

[0292] 表3:用于序列保守性分析的寡核苷酸。显示的是 ORF 和引物名称、SEQ ID NO、引物相对于基因的方向、序列和相对于基因的位置。寡核苷酸用于基因或基因片段的 PCR 扩

增和后续序列分析。

[0293]

ORF	引物名称 (Seq ID)	方向	序列	相对于基因的位置
SP0498	ICC5875 (Seq ID 19)	有义	TGTGATTATCATGGTTCTA GAGTTTGA	-92 至 -65
	ICC6198 (Seq ID 20)	有义	TGCAAACAGTTATTGGTTT TTGTC	-138 至 -114
	ICC5876 (Seq ID 21)	反义	GGATGGTTTACCTTAGCAG CA	1079 至 1100
	ICC5877 (Seq ID 22)	有义	TGATGGCTATTTTCATCAAC CA	986 至 1007
	ICC5878 (Seq ID 23)	反义	CGCTTCTTGGGCAATTTTA AG	2157 至 2178
	ICC5879 (Seq ID 24)	有义	CGAGCATGAAGGTGCTGTA A	2045 至 2065
	ICC5880 (Seq ID 25)	反义	CCACCTCTAAGGTCCAAAT CC	3233 至 3254
	ICC5881 (Seq ID 26)	有义	CCTAGCAGTTTCCGTTCCA A	3143 至 3163
	ICC5882 (Seq ID 27)	反义	CACTTGCTTGAACACGCTC T	4205 至 4225
SP0609	ICC5883 (Seq ID 28)	有义	CAGAGTCTAAAAGATCTGG TTGCTT	4080 至 4105
	ICC5884 (Seq ID 29)	反义	TTTGCCATGTTACAAAAAC TCC	5055 至 5077
SP0749	ICC5885 (Seq ID 30)	有义	TTGACAATCCAAGCGAACC T	-116 至 -96
	ICC5886 (Seq ID 31)	反义	AAGAGGAAACCATTGAAAA ATTG	822 至 845
SP2027	ICC5887 (Seq ID 32)	有义	TCATCGAAAAAGTTCAAGG AAAA	-90 至 -67
	ICC5888 (Seq ID 33)	反义	CGTTGACGCAGTTTGAAGA G	1233 至 1253
	ICC5889 (Seq ID 34)	有义	TAGCGAACGCTACAAAAGC A	373 至 393
SP2194	ICC5890 (Seq ID 35)	有义	CCAGACCCTTGGTATACAG GA	-97 至 -76
	ICC5891 (Seq ID 36)	反义	TTGCTTGGAAGAGGGATT G	480 至 500
SP2194	ICC5892 (Seq ID 37)	有义	CTTTGGATCGCGTTTTAGG A	-93 至 -73
	ICC5893 (Seq ID 38)	反义	GCCAAGGCTGGTTTCAAGA T	975 至 995
	ICC5894 (Seq ID 39)	有义	TGAAGAAGATGGCCAAGTC A	881 至 901
	ICC5895 (Seq ID 40)	反义	AGACACCGTCATCCAGAAC C	1907 至 1927
	ICC5896 (Seq ID 41)	有义	GGAGCTCCTCCAGGCTATG T	1773 至 1793
	ICC5897 (Seq ID 42)	反义	GCGGCTAGCTGCCTAGTTT T	2500 至 2519
	ICC6004 (Seq ID 43)	反义	AACGATCCGTGGTTTTTCAT C	2613 至 2633
	ICC6279 (Seq ID 44)	反义	GATAGAGCTGACGTGGTTT GAAGAGATT	2550 至 2578

[0294]

[0295] 肺炎链球菌基因的序列分析

[0296] 为了测定来自各种肺炎链球菌菌株的抗原的序列,如上所述用对于目的基因特异的引物执行 PCR。用于这些分析的肺炎链球菌菌株显示于表 2 中。使用 PCR 产物作为模板用专门引物执行测序。寡核苷酸的序列在表 3 中列出。如上所述制备所有肺炎链球菌菌株的基因组 DNA。如上所述在 25 μ l 的反应体积中执行 PCR,除非条件必须适合个别引物对。用如表 3 中列出的寡核苷酸测序 PCR 样品。测序在 Agowa(德国)执行。

[0297] 结果

[0298] 所选择的肺炎球菌抗原是高度保守的

[0299] 如在方法下所述执行 5 种所选择的基因的 PCR 和测序。表 2 显示用于测序的菌株,而表 3 列出了用于 PCR 和测序分析的寡核苷酸。总之,表 9 列出了对其测定分别基因的序列的所有菌株。这些菌株已与参考菌株肺炎链球菌 TIGR4(Tettelin 等人 (2001), Science 293 :498-506);本文指定为 TIGR4_Tettelin 相比较。因此,表 4-8 中的参考位置指肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的分别位置。

[0300] SP0498 的序列分析

[0301] 序列得自 51 种肺炎球菌菌株。与来自肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的 SP0498 的序列相比较,氨基酸序列同一性水平从 98.2%到 100%。表 4 列出了与来自参考菌株 TIGR4_Tettelin 的 SP0498 相比较,显示不同氨基酸的所有 119 个氨基酸位置。

[0302] 表 4 :SP0498 的基因保守性。^{1,2},在分别肺炎链球菌菌株经测序的基因的任何中在分别位置处观察到的氨基酸。-,氨基酸缺失。菌株 Pj-1298 显示相对于参考菌株 TIGR4_Tettelin 菌株,在位置 788 后的 36 个氨基酸的插入片段 (GVRSEAATTIYLPKVSRSASAQGTTQEL KVVAVGKN)。

[0303]

参考位置	比对位置	参考中的氨基酸	AA 改变 ¹	AA 改变 ²	具有分别改变的菌株	具有分别改变的菌株
32	32	A	V		Pj-1364, Pj-1233, Pj-1234	
47	47	G	R		Pj-102-94, Pj-102-163, Pj-1237	
50	50	T	P		Pj-102-59, Pj-1231, Pj-1298, Pj-1386	
61	61	T	I		Pj-102-77	
69	69	E	K		Pj-102-161	
73	73	A	T		Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-160, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1233, Pj-1234, Pj-1248, Pj-1255, Pj-1297, Pj-1322, Pj-1330, Pj-1369	
81	81	A	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
82	82	E	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
83	83	G	-	A	Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	Pj-1230
84	84	V	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
85	85	A	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
86	86	I	-	T	Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-148, Pj-102-160, Pj-102-163, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1229, Pj-1230, Pj-1233, Pj-1234, Pj-1237, Pj-1241, Pj-1248, Pj-1255, Pj-1279, Pj-1291, Pj-1297, Pj-1322, Pj-1330, Pj-1369, PBI-71
87	87	A	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
88	88	S	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
89	89	E	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
90	90	T	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
91	91	A	-		Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300	
92	92	S	-		Pj-102-59, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-160, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1229, Pj-1231, Pj-1233, Pj-1236, Pj-1241, Pj-1248, Pj-1255, Pj-1262, Pj-1283, Pj-1297, Pj-1298, Pj-1300, Pj-1322, Pj-1330, Pj-1369, Pj-1386, PBI-71	
93	93	P	-		Pj-102-59, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-160, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1229, Pj-1231, Pj-1233, Pj-1236, Pj-1241, Pj-1248, Pj-1255, Pj-1262, Pj-1283, Pj-1297, Pj-1298, Pj-1300, Pj-1322, Pj-1330, Pj-1369, Pj-1386, PBI-71	
94	94	A	-		Pj-102-59, Pj-102-77, Pj-102-93,	

[0304]

				Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
95	95	S	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
96	96	N	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
97	97	E	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
98	98	A	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
99	99	A	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
100	100	T	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
101	101	T	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 ,	

[0305]

				Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
102	102	E	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
103	103	T	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
104	104	A	-	Pj-102-59 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-160 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1241 , Pj-1248 , Pj-1255 , Pj-1283 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1322 , Pj-1330 , Pj-1369 , Pj-1386, PBI-71	
110	110	A	T	Pj-1279	
116	116	A	V	Pj-1229	
117	117	S	G	Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1229 , Pj-1230 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300, PBI-71	
119	119	V	A	Pj-102-160, Pj-1255	
120	120	V	I	Pj-1241	
126	126	A	V	Pj-1279	
153	153	A	E	Pj-102-94 , Pj-102-148 , Pj-102-163 , Pj-102-468 , Pj-1229 , Pj-1232 , Pj-1237 , Pj-1242 , Pj-1347	
164	164	P	S	Pj-1279	
194	194	A	V	Pj-102-148	
225	225	K	-	Pj-102-160	
226	226	V	-	Pj-102-160	
227	227	Q	-	Pj-102-160	
228	228	A	- T	Pj-102-160	Pj-102-148
229	229	L	-	Pj-102-160	
230	230	S	-	Pj-102-160	
231	231	N	-	Pj-102-160	
232	232	T	-	Pj-102-160	
233	233	N	-	Pj-102-160	
234	234	S	-	Pj-102-160	
235	235	K	-	Pj-102-160	
236	236	A	-	Pj-102-160	
324	324	A	V	Pj-1364	
348	348	E	R	Pj-1490	
359	359	E	A	Pj-102-77	
405	405	A	V	Pj-1369	

[0306]

603	603	D	V	Pj-102-160, Pj-1229, Pj-1255
641	641	P	S	Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-160, Pj-1229, Pj-1255
666	666	D	A	Pj-102-59, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1231, Pj-1233, Pj-1234, Pj-1279, Pj-1283, Pj-1298, Pj-1386
685	685	E	K	Pj-102-98, Pj-102-386, Pj-1250
692	692	Q	R	Pj-1236, Pj-1262
694	694	N	H	Pj-102-59
750	750	S	N	Pj-1241, Pj-1297, Pj-1369
800	836	D	E	Pj-1230, Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300
806	842	K	Q	Pj-1230, Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300
812	848	K	R	Pj-1230, Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300
826	862	D	G	Pj-1230, Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300
831	867	K	D	Pj-1230, Pj-1236, Pj-1262, Pj-1300
869	905	P	S	Pj-102-468, Pj-1242, Pj-1291, Pj-1347
907	943	E	K	Pj-1300
924	960	I	V	Pj-1364, Pj-1484, Pj-1233, Pj-1234, Pj-1241, Pj-1297
974	1010	A	V	Pj-1241
989	1025	A	S	Pj-102-160, Pj-1229, Pj-1255, Pj-1369
992	1028	P	Q	Pj-102-62, Pj-102-70
1006	1042	Q	P	Pj-1364, Pj-1484, Pj-1234
1007	1043	T	I	Pj-102-148, PBI-71
1054	1090	P	Q	Pj-1233
1142	1178	Q	K	Pj-102-160, Pj-1255
1158	1194	E	K	Pj-1322
1162	1198	D	N	Pj-102-148, Pj-1322
1168	1204	S	N	Pj-102-59, Pj-1231, Pj-1283, Pj-1298, Pj-1386
1170	1206	D	N	Pj-102-62, Pj-102-70
1175	1211	R	C	Pj-102-148
1205	1241	T	I	Pj-1322
1213	1249	H	R	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-148, Pj-102-163, Pj-102-228, Pj-102-468, Pj-1344, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1490, Pj-1230, Pj-1231, Pj-1232, Pj-1234, Pj-1236, Pj-1237, Pj-1241, Pj-1242, Pj-1262, Pj-1283, Pj-1291, Pj-1297, Pj-1298, Pj-1300, Pj-1322, Pj-1347, Pj-1386
1219	1255	V	F	Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-1230
1220	1256	S	N	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-148, Pj-102-163, Pj-102-228, Pj-102-468, Pj-1344, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1490,

[0307]

				Pj-1230 , Pj-1231 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1236 , Pj-1237 , Pj-1241 , Pj-1242 , Pj-1262 , Pj-1283 , Pj-1291 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322, Pj-1347, Pj-1386	
1257	1293	S	P	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-148 , Pj-102-160 , Pj-102-163 , Pj-102-228 , Pj-102-468 , Pj-1344 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1490 , Pj-1230 , Pj-1231 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1236 , Pj-1237 , Pj-1241 , Pj-1242 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1279 , Pj-1283 , Pj-1291 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1347 , Pj-1386	
1261	1297	E	A	Pj-1347	
1262	1298	A	V	Pj-1241	
1277	1313	H	R	Pj-1230	
1279	1315	T	I	Pj-102-148 , Pj-1279 , Pj-1322 , Pj-1347, PBI-71	
1291	1327	K	E	Pj-1369	
1306	1342	T	K	Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-94, Pj-102-98 , Pj-102-148 , Pj-102-160 , Pj-102-161 , Pj-102-163, Pj-102-386, Pj-1344, Pj-1490 , Pj-1230 , Pj-1236 , Pj-1237 , Pj-1241 , Pj-1250 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1279 , Pj-1284 , Pj-1297 , Pj-1300 , Pj-1322, Pj-1347, PBI-71	
1319	1355	V	A	Pj-102-59, Pj-102-77, Pj-102-468, Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1231 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1242 , Pj-1283 , Pj-1291 , Pj-1298, Pj-1386	
1324	1360	A	D	Pj-1322, Pj-1347	
1325	1361	A	T	Pj-1297	
1344	1380	A	V	Pj-1241, Pj-1322, Pj-1347	
1357	1393	T	A	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-94, Pj-102-98, Pj-102-148 , Pj-102-161 , Pj-102-163 , Pj-102-386 , Pj-102-468 , Pj-1344 , Pj-1490 , Pj-1230 , Pj-1231 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1237 , Pj-1241 , Pj-1242 , Pj-1250 , Pj-1262 , Pj-1279 , Pj-1283 , Pj-1284 , Pj-1291 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1347, Pj-1386, PBI-71	
1359	1395	A	T	Pj-102-93, Pj-102-228	
1365	1401	D	Y	Pj-1232	
1375	1411	P	S	Pj-102-59, Pj-102-77, Pj-102-94, Pj-102-163, Pj-102-468, Pj-1231 ,	

[0308]

				Pj-1232 , Pj-1237 , Pj-1242 , Pj-1283 , Pj-1291 , Pj-1298 , Pj-1386	
1395	1431	T	S	Pj-102-163, Pj-102-174	
1428	1464	L	W	Pj-1236	
1436	1472	D	A	Pj-1230	
1464	1500	E	G	Pj-102-93, Pj-1291	
1469	1505	A	T	Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-161, Pj-1232	
1477	1513	V	I	Pj-1233	
1482	1518	P	S	Pj-1232	
1507	1543	T	K	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-98, Pj-102-161, Pj-102-386, Pj-1344, Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1490 , Pj-1230 , Pj-1231 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1241 , Pj-1250 , Pj-1283 , Pj-1284 , Pj-1291 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322, Pj-1386, PBI-71	
1517	1553	T	A	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-98 , Pj-102-148 , Pj-102-160 , Pj-102-161 , Pj-102-163 , Pj-102-228 , Pj-102-386, Pj-102-468, Pj-1344, Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1490 , Pj-1229 , Pj-1230 , Pj-1231 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1236 , Pj-1237 , Pj-1241 , Pj-1242 , Pj-1250 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1279 , Pj-1283 , Pj-1284 , Pj-1291 , Pj-1297 , Pj-1298 , Pj-1300 , Pj-1322 , Pj-1347, Pj-1386, PBI-71	
1539	1575	E	D	Pj-1230	
1543	1579	T	A	Pj-102-59, Pj-102-62, Pj-102-70, Pj-102-77, Pj-102-94, Pj-102-98, Pj-102-148 , Pj-102-160 , Pj-102-161 , Pj-102-163 , Pj-102-386, Pj-102-468, Pj-1344, Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1490 , Pj-1228 , Pj-1229 , Pj-1230 , Pj-1231 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1234 , Pj-1236 , Pj-1237 , Pj-1242 , Pj-1250 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1279 , Pj-1283 , Pj-1284 , Pj-1298 , Pj-1322 , Pj-1347, Pj-1386, PBI-71	
1570	1606	N	K	Pj-1279, Pj-1291	
1601	1637	V	I	PBI-71	
1604	1640	T	I	Pj-102-148	
1634	1670	A	T	Pj-1279	
1638	1674	G	V	Pj-1344, Pj-1490	
1650	1686	T	I	Pj-1364, Pj-1484, Pj-1234	
1658	1694	K	E	Pj-1364, Pj-1484, Pj-1234	

[0309] SP0609 的序列分析

[0310] 序列得自 54 种肺炎球菌菌株。与来自肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的 SP0609 的序列相比较,氨基酸序列同一性水平从 90.3% 到 100%。表 5 列出了与来自参考菌株 TIGR4_

Tettelin 的 SP0609 相比较,显示不同氨基酸的所有 42 个氨基酸位置。

[0311] 表 5 :SP0609 的基因保守性。^{1,2},在分别肺炎链球菌菌株经测序的基因的任何中在分别位置处观察到的氨基酸。n. p. ,相对应氨基酸不存在。

[0312]

参考位置	比对位置	参考中的氨基酸	AA 改变 ¹	AA 改变 ²	具有分别改变的菌株 ¹	具有分别改变的菌株 ²
n.p.	1	n.p.	M		所有 54 种菌株	
n.p.	2	n.p.	K		所有 54 种菌株	
n.p.	3	n.p.	K		所有 54 种菌株	
n.p.	4	n.p.	K		所有 54 种菌株	
n.p.	5	n.p.	F		所有 54 种菌株	
n.p.	6	n.p.	F		所有 54 种菌株	
n.p.	7	n.p.	L		所有 54 种菌株	
n.p.	8	n.p.	S		所有 54 种菌株	
n.p.	9	n.p.	A		所有 54 种菌株	
n.p.	10	n.p.	L		所有 54 种菌株	
5	15	F	L		I-33 Andersson	
6	16	G	S		Pj-1229, Pj-1291 Andersson	
8	18	A	T	V	Pj-1291 Andersson	Pj-102-77, Pj-1230, Pj-1232, Pj-1284, Pj-1369
16	26	D	N		Pj-102-77, Pj-1230, Pj-1232, Pj-1284, Pj-1369	
18	28	S	N		Pj-1279	
19	29	I	V		I-33 Andersson, Pj-1291 Andersson	
31	41	G	D		Pj-1322	
48	58	T	S		Pj-1291 Andersson	
59	69	M	I		Pj-102-93, Pj-102-228	
60	70	V	I		Pj-1291 Andersson	
68	78	I	V		I-33 Andersson, Pj-1291 Andersson	
69	79	R	H		Pj-102-77, Pj-1230	
79	89	G	A		Pj-1250	
84	94	N	H		Pj-1322	
87	97	V	G		Pj-1236, Pj-1248, Pj-1262, Pj-1330	
124	134	K	N		Pj-1291 Andersson	
127	137	K	S		I-33 Andersson, Pj-1291 Andersson	
133	143	G	S		Pj-102-94, Pj-102-163, Pj-1237, Pj-1297, Pj-1345	
141	151	G	S		Pj-102-148, Pj-1297	
146	156	R	C		Pj-102-94, Pj-102-163, Pj-1233, Pj-1237, Pj-1297, Pj-1345	
156	166	G	D		Pj-1242	

[0313]

158	168	K	T		Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-148, Pj-102-163, Pj-102-228, Pj-1232, Pj-1233, Pj-1237, Pj-1284, Pj-1297, Pj-1322, Pj-1345, Pj-1369, PBI-71, Pj-1291_Andersson	
181	191	T	A		Pj-102-59, Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-98, Pj-102-148, Pj-102-163, Pj-102-228, Pj-102-386, Pj-1344, Pj-1490, Pj-1228, Pj-1230, Pj-1231, Pj-1232, Pj-1233, Pj-1236, Pj-1237, Pj-1241, Pj-1242, Pj-1248, Pj-1250, Pj-1262, Pj-1283, Pj-1284, Pj-1297, Pj-1298, Pj-1300, Pj-1322, Pj-1330, Pj-1345, Pj-1369, Pj-1386, PBI-71, I-33_Andersson, Pj-1291_Andersson	
193	203	T	I		I-33_Andersson, Pj-1291_Andersson	
194	204	S	N		Pj-102-59, Pj-102-98, Pj-102-386, Pj-1231, Pj-1241, Pj-1242, Pj-1250, Pj-1283, Pj-1298, Pj-1300, Pj-1386, PBI-71	
198	208	A	E	V	Pj-102-77, Pj-102-93, Pj-102-94, Pj-102-163, Pj-102-228, Pj-1344, Pj-1490, Pj-1228, Pj-1230, Pj-1232, Pj-1233, Pj-1237, Pj-1284, Pj-1297, Pj-1322, Pj-1345, Pj-1369, Pj-1291_Andersson	I-33_Andersson
220	230	L	F		Pj-1236, Pj-1248, Pj-1262, Pj-1330	
222	232	D	N		Pj-1322	
224	234	L	F		Pj-1291_Andersson	
226	236	N	Q	T	Pj-1291_Andersson	Pj-102-93 Pj-102-160 Pj-102-161 Pj-102-228, Pj-1255
242	252	D	G		Pj-1322	

[0314] SP0749 的序列分析

[0315] 序列得自 53 种肺炎球菌菌株。与来自肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的 SP0749 的序列相比较,氨基酸序列同一性水平从 99%到 100%。表 6 列出了与来自参考菌株 TIGR4_Tettelin 的 SP0749 相比较,显示不同氨基酸的所有 13 个氨基酸位置。

[0316] 表 6 :SP0749 的基因保守性。¹,在分别肺炎链球菌菌株经测序的基因的任何中在分别位置处观察到的氨基酸。菌株 Pj-1298 显示相对于参考菌株 TIGR4_Tettelin 菌株,在位置 294 后的 2 个氨基酸的插入片段 (AK)。

[0317]

参考位置	比对位置	参考中的氨基酸	AA 改变 ¹	具有分别改变的菌株 ¹
22	22	G	V	Pj-1344, Pj-1490, Pj-1228
73	73	A	G	Pj-1231, Pj-1298

[0318]

85	85	V	I	Pj-102-62 , Pj-102-70 , Pj-102-77 , Pj-102-93 , Pj-102-161, Pj-1230, Pj-1233, Pj-1279
123	123	A	V	Pj-1279
126	126	A	S	Pj-102-62, Pj-102-70
224	224	K	N	Pj-1344, Pj-1490, Pj-1228
228	228	K	R	Pj-102-93, Pj-102-161, Pj-1279
252	252	M	K	Pj-1279
275	275	A	V	Pj-102-62, Pj-102-70
341	343	N	D	Pj-102-62 , Pj-102-70 , Pj-102-77 , Pj-102-98 , Pj-102-148 , Pj-102-160 , Pj-102-386 , Pj-1344 , Pj-1490 , Pj-1228 , Pj-1230 , Pj-1232 , Pj-1233 , Pj-1236 , Pj-1250 , Pj-1255 , Pj-1262 , Pj-1284 , Pj-1291 , Pj-1297 , Pj-1300 , Pj-1330 , Pj-1345 , Pj-1347, Pj-1369, PBI-71
342	344	N	S	Pj-1300
362	364	H	Y	Pj-1283
386	388	P	S	Pj-1322

[0319] SP2027 的序列分析

[0320] 序列得自 53 种肺炎球菌菌株。与来自肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的 SP2027 的序列相比较,氨基酸序列同一性水平从 97.8%到 100%。表 7 列出了与来自参考菌株 TIGR4_Tettelin 的 SP2027 相比较,显示不同氨基酸的所有 7 个氨基酸位置。

[0321] 表 7 :SP2027 的基因保守性。¹,在分别肺炎链球菌菌株经测序的基因的任何中在分别位置处观察到的氨基酸。

[0322]

参考位置	比对位置	参考中的氨基酸	AA 改变 ¹	具有分别改变的菌株 ¹
1	1	V	M	I-33 Andersson
4	4	L	P	Pj-1231, Pj-1298, Pj-1322
5	5	T	K	I-33 Andersson
18	18	P	Q	I-33 Andersson
22	22	L	I	Pj-102-161 , Pj-1364 , Pj-1484 , Pj-1234 , Pj-1255 , Pj-1284, Pj-1300
24	24	A	T	Pj-1364, Pj-1484, Pj-1234, Pj-1284
86	86	A	S	Pj-102-148

[0323] SP2194 的序列分析

[0324] 序列得自 18 种肺炎球菌菌株。与来自肺炎链球菌 TIGR4_Tettelin 的 SP2194 的序列相比较,氨基酸序列同一性水平从 99.3%到 100%。表 8 列出了与来自参考菌株 TIGR4_Tettelin 的 SP2194 相比较,显示不同氨基酸的所有 17 个氨基酸位置。

[0325] 表 8 :SP2194 的基因保守性。¹,在分别肺炎链球菌菌株经测序的基因的任何中在

分别位置处观察到的氨基酸。

[0326]

参考位置	比对位置	参考中的氨基酸	AA 改变	具有分别改变的菌株
4	4	S	L	Pj-1234
54	54	M	L	Pj-1237
86	86	V	I	Pj-1237
91	91	A	S	Pj-1237
109	109	L	F	Pj-1250, Pj-1284
116	116	S	G	Pj-102-228, Pj-1364, Pj-1230, Pj-1231, Pj-1234, Pj-1236, Pj-1237, Pj-1241, Pj-1250, Pj-1262, Pj-1283, Pj-1284, Pj-1291
257	257	P	S	Pj-1241
262	262	K	N	Pj-1250
433	433	A	S	Pj-102-228, Pj-1230, Pj-1236, Pj-1262
435	435	H	Y	Pj-102-93, Pj-1250
565	565	V	A	Pj-102-228
714	714	V	A	Pj-1232
739	739	T	A	Pj-102-70, Pj-102-93, Pj-102-161, Pj-102-228, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1230, Pj-1231, Pj-1232, Pj-1234, Pj-1236, Pj-1237, Pj-1241, Pj-1250, Pj-1262, Pj-1283, Pj-1284, Pj-1291
742	742	G	C	Pj-1237
759	759	G	V	Pj-102-228
762	762	P	L	Pj-1230
794	794	S	N	Pj-102-161, Pj-1364, Pj-1484, Pj-1232, Pj-1234

[0327] 表 9 :肺炎链球菌基因在多种菌株中的序列保守性

[0328]

菌株名称	SP0498	SP0609	SP0749	SP2027	SP2194
Pj-102-59	Seq ID 45	Seq ID 94	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-102-62	Seq ID 46	IDENT.	Seq ID 137	IDENT.	n. d.
Pj-102-70	Seq ID 47	IDENT.	Seq ID 138	IDENT.	Seq ID 187
Pj-102-77	Seq ID 48	Seq ID 95	Seq ID 139	IDENT.	n. d.
Pj-102-93	Seq ID 49	Seq ID 96	Seq ID 140	IDENT.	Seq ID 188
Pj-102-94	Seq ID 50	Seq ID 97	IDENT.	IDENT.	n. d.

[0329]

Pj-102-98	Seq ID 51	Seq ID 98	Seq ID 141	IDENT.	n. d.
Pj-102-113	IDENT.	IDENT.	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-102-148	Seq ID 52	Seq ID 99	Seq ID 142	Seq ID 173	n. d.
Pj-102-160	Seq ID 53	Seq ID 100	Seq ID 143	IDENT.	n. d.
Pj-102-161	Seq ID 54	Seq ID 101	Seq ID 144	Seq ID 174	Seq ID 189
Pj-102-163	Seq ID 55	Seq ID 102	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-102-174	Seq ID 56	IDENT.	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-102-228	Seq ID 57	Seq ID 103	IDENT.	IDENT.	Seq ID 190
Pj-102-386	Seq ID 58	Seq ID 104	Seq ID 145	IDENT.	n. d.
Pj-102-468	Seq ID 59	IDENT.	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-1344	Seq ID 60	Seq ID 105	Seq ID 146	IDENT.	n. d.
Pj-1364	Seq ID 61	IDENT.	IDENT.	Seq ID 175	Seq ID 191
Pj-1484	Seq ID 62	IDENT.	IDENT.	Seq ID 176	Seq ID 192
Pj-1490	Seq ID 63	Seq ID 106	Seq ID 147	IDENT.	n. d.
Pj-1228	Seq ID 64	Seq ID 107	Seq ID 148	IDENT.	n. d.
Pj-1229	Seq ID 65	Seq ID 108	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-1230	Seq ID 66	Seq ID 109	Seq ID 149	IDENT.	Seq ID 193
Pj-1231	Seq ID 67	Seq ID 110	Seq ID 150	Seq ID 177	Seq ID 194
Pj-1232	Seq ID 68	Seq ID 111	Seq ID 151	IDENT.	Seq ID 195
Pj-1233	Seq ID 69	Seq ID 112	Seq ID 152	IDENT.	n. d.
Pj-1234	Seq ID 70	IDENT.	IDENT.	Seq ID 178	Seq ID 196
Pj-1236	Seq ID 71	Seq ID 113	Seq ID 153	IDENT.	Seq ID 197
Pj-1237	Seq ID 72	Seq ID 114	IDENT.	IDENT.	Seq ID 198
Pj-1241	Seq ID 73	Seq ID 115	IDENT.	IDENT.	Seq ID 199
Pj-1242	Seq ID 74	Seq ID 116	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-1244	IDENT.	IDENT.	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-1248	Seq ID 75	Seq ID 117	IDENT.	IDENT.	n. d.
Pj-1250	Seq ID 76	Seq ID 118	Seq ID 154	IDENT. -	Seq ID 200
Pj-1255	Seq ID 77	Seq ID 119	Seq ID 155	Seq ID 179	n. d.

[0330]

Pj-1262	Seq ID 78	Seq ID 120	Seq ID 156	IDENT.	Seq ID 201
Pj-1279	Seq ID 79	Seq ID 121	Seq ID 157	IDENT.	n. d.
Pj-1283	Seq ID 80	Seq ID 122	Seq ID 158	IDENT.	Seq ID 202
Pj-1284	Seq ID 81	Seq ID 123	Seq ID 159	Seq ID 180	Seq ID 203
Pj-1291	Seq ID 82	IDENT.	Seq ID 160	IDENT.	Seq ID 204
Pj-1297	Seq ID 83	Seq ID 124	Seq ID 161	IDENT.	n. d.
Pj-1298	Seq ID 84	Seq ID 125	Seq ID 162	Seq ID 181	n. d.
Pj-1300	Seq ID 85	Seq ID 126	Seq ID 163	Seq ID 182	n. d.
Pj-1322	Seq ID 86	Seq ID 127	Seq ID 164	Seq ID 183	n. d.
Pj-1330	Seq ID 87	Seq ID 128	Seq ID 165	IDENT.	n. d.
Pj-1345	n. d.	Seq ID 129	Seq ID 166	IDENT.	n. d.
Pj-1347	Seq ID 88	IDENT.	Seq ID 167	IDENT.	n. d.
Pj-1369	Seq ID 89	Seq ID 130	Seq ID 168	IDENT.	n. d.
Pj-1386	Seq ID 90	Seq ID 131	IDENT.	IDENT.	n. d.
PBI-71	Seq ID 91	Seq ID 132	Seq ID 169	IDENT.	n. d.
I-33 Andersson	n. d.	Seq ID 133	n. d.	Seq ID 184	n. d.
Pj-1291 Andersson	n. d.	Seq ID 134	Seq ID 170	n. d.	n. d.
TIGR4 DB	Seq ID 92	Seq ID 135	Seq ID 171	Seq ID 185	n. d.
TIGR4 IC	Seq ID 93	Seq ID 136	Seq ID 172	Seq ID 186	Seq ID 205

[0331] 实施例 2:在致命脓毒症和肺炎模型中诱导针对肺炎链球菌的保护性免疫应答的肺炎球菌抗原和组合

[0332] 实施例 2.1:5 种新型肺炎球菌抗原关于在致命脓毒症和肺炎模型中的保护性的评估

[0333] 实验操作

[0334] 重组肺炎球菌蛋白质的表达和纯化:如实施例 1 中所述。

[0335] 动物保护研究

[0336] 动物:使用 C3H/HeN 和 CD-1 雌性小鼠。

[0337] 主动免疫:50 μ g 重组蛋白质进行皮下注射,用完全弗氏佐剂 (CFA) 或氢氧化铝 (ALUM) 进行辅助。在第 14 和 28 天时,动物用相同量的蛋白质和佐剂加强 2 次 (除 CFA 外,而使用不完全弗氏佐剂 (IFA))。公开的保护性抗原 PspA (SP0117)、裂解物或 Prevnar 用作阳性对照,而仅用佐剂免疫的小鼠充当阴性对照。使用分别的重组蛋白质通过 ELISA 在第 35 天时测量抗体滴度。

[0338] 细菌攻击:制备肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259、血清型 19F 菌株 EF3030 或血清型 3 菌株 WU2 的冷冻甘油原种,并且用于所有实验。为了测定细菌接种物中存在的活细

胞数目,经由在血琼脂平板上铺平板测定 cfus。作为攻击将 1×10^4 – 5×10^7 cfu 腹膜内或鼻内应用到个别小鼠内。对于鼻内应用,在处理前使小鼠麻醉。对于脓毒症和肺炎模型,测量通过免疫接种的保护。在 i. p. 脓毒症模型(血清型 6B 菌株 Pj-1259)中,跟踪存活率以攻击后 2 周,并且存活以动物总数目的百分率表达(10 只小鼠/组)。对于肺炎模型(血清型 19F 菌株 EF3030,血清型 3 菌株 WU2),在攻击后第 3 天时无菌条件下取出肺,匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每只个别小鼠测定 cfus/ 器官(5–10 只小鼠/组)。

[0339] 结果

[0340] 在本发明中,鉴定在小鼠脓毒症/致死率以及肺炎模型中显示高水平保护的单一抗原和不同肺炎球菌抗原的组合。对于起始实验,选择通过最初 AIP 筛选和体外验证所选择的另外 19 种抗原,以在脓毒症模型中就其保护性进行评估。执行 2 种实验,一种其中蛋白质用 ALUM 进行辅助,并且在另一种实验中,使蛋白质与 CFA/IFA 相混合以诱导最大抗体滴度。在与 ALUM 组合中测试的 19 种抗原中的 5 种在脓毒症模型中显示至少部分保护,即 SP0498、SP0609、SP0749、SP2027 和 SP2194(图 1A)。在用 CFA/IFA 的重复实验中,在 19 种测试候选物中,在第一种实验中也是保护性的 3 种候选物再次显示一定保护,SP0749、SP2027 和 SP2194(图 1B)。

[0341] 使 5 种单一蛋白质与 SP1732-3+SP2216-1 或 SP1732-3+SP1650(PsaA) 相组合。与阴性对照相比较,包括在与 SP1732-3 和 SP2216-1 的组合中(图 2)所有 5 种蛋白质都显示增加的保护水平。当 5 种候选抗原与 SP1732-3 和 PsaA 相组合时(图 3),同样可以观察到这点。

[0342] 与在脓毒症模型中测试抗原保护性平行,也在肺炎模型中执行实验。这可以与其中肺炎是主要病因的老年人疫苗特别相关。

[0343] 使用 WU2 肺炎模型的免疫和攻击实验显示在单一蛋白质中,在攻击后第 3 天时仅 SP0609、SP2027(1–2 个对数的减少)对建群有作用(图 4A)。最有效的是来自同源菌株的粗裂解物(4 个对数的减少)。相同蛋白质还在 EF3030 肺炎模型中进行测试。如较早实验中已见的,在该实验内的变异性比关于 WU2 模型广泛得多。对于 SP2027 和 SP2194 可见约 4 个对数的显著减少。对于 SP0609、PspA 和 Prevnar 可见较小减少(1–2 个对数减少;图 4B)。

[0344] 当在 WU2 肺炎模型中测试与 SP1732-3 和 SP2216-1 组合中的新候选物时(图 5A),包括 SP0749、SP2027 或 SP2194 的组合使肺中的细菌计数减少约 2 个对数。另外在与 SP0498 和 SP0609 的组合中可见较小减少(~1 个对数减少)。在 EF3030 模型中(图 5B),用包括 SP2027 或 Prevnar 的组合可见最佳减少(~4 个对数)。对于与 SP2027 的组合,小鼠在肺中具有高细菌计数或到第 3 天时使其完全清除。包括 SP0609、SP0749 和 SP2194 的组合在攻击后第 3 天时显示在肺建群中~2 个对数的中等减少。

[0345] 实施例 2.2:3 种另外的肺炎球菌抗原关于在致命脓毒症和肺炎模型中的保护性的评估

[0346] 实验操作

[0347] 重组肺炎球菌蛋白质的表达和纯化:如实施例 1 中所述。

[0348] 动物保护研究

[0349] 动物:使用 C3H/HeN、CBA/N 和 NMRI 雌性小鼠。

[0350] **主动免疫**:50 μ g 重组蛋白质进行皮下注射,用完全弗氏佐剂 (CFA)、氢氧化铝或 **IC31**[®] 进行辅助。在第 14 和 28 天时,动物用相同量的蛋白质和佐剂加强 2 次 (除 CFA 外,使用不完全弗氏佐剂 (IFA))。公开的保护性抗原 PspA (SP0117) 用作阳性对照,而仅用佐剂免疫的小鼠充当阴性对照。使用分别的重组蛋白质通过 ELISA 在第 35 天时测量抗体滴度,以便证实免疫已诱导适当的免疫应答。

[0351] **细菌攻击**:制备肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259、菌株 EF3030 或菌株 TIGR4_DB 的冷冻甘油原种,并且用于包括这些菌株的所有实验。对于其他肺炎链球菌菌株 (例如 6301),使用新鲜生长的细菌。为了测定细菌接种物中存在的活细胞数目,经由在血琼脂平板上铺平板测定 cfus。作为攻击将 10^2 - 10^8 cfu 腹膜内、静脉内或鼻内应用到个别小鼠内。对于鼻内应用,在处理前使小鼠麻醉。对于脓毒症和肺炎模型,测量通过免疫的保护。在脓毒症模型中,跟踪存活率以攻击后约 2 周,并且存活以动物总数目的百分率表达 (10 只小鼠 / 组)。对于肺炎模型,在攻击后第 3 天时,在无菌条件下取出肺,匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每只个别小鼠测定 cfus/ 器官 (5-10 只小鼠 / 组)。

[0352] **结果**

[0353] 鉴定在小鼠脓毒症 / 致死率模型中显示比单独的个别蛋白质更大的保护水平的不同肺炎球菌抗原组合 (图 6)。通过用 3 种重组蛋白质 SP2216-1、SP1732-3 和 PsaA 的组合的免疫实现最佳的保护水平,而用仅 2 种蛋白质的组合观察到较低的保护水平 (SP2216-1+SP1732-3 优于 SP2216-1+PsaA 优于 SP1732-3+PsaA)。单独的 PsaA 未显示显著的保护水平,但与其他 2 种蛋白质组合显著增加保护水平。对于所测试的任何蛋白质未观察到对保护水平的负面影响。保护水平中的增加不依赖于所使用的佐剂,因为通过使用氢氧化铝或 **IC31**[®] 佐剂 (InterCell AG, Vienna, Austria) 未看出保护中的差异。

[0354] SP2216-1 和 SP1732-3 不仅显示针对肺炎链球菌 6B 是保护性的 (图 6),还可以证实它们提供针对肺炎链球菌的不同血清型的保护。在鼻内应用后可以显示针对关于肺炎链球菌菌株 6301 (血清型 1) 的脓毒症的保护,与腹膜内途径形成对比,这代表更生理学方式的攻击。SP2216-1 证实在这个模型中针对脓毒症的显著保护水平,这高于阳性对照蛋白质 PspA 的保护能力。SP1732-3 显示与 PspA 可比较的显著保护水平,并且良好地超过阴性对照 (图 7)。

[0355] CBA/N 小鼠具有 xid 基因中的自发突变,并且因此缺乏产生针对多糖的抗体的能力且缺乏针对肺炎球菌磷壁酸的磷酸胆碱决定簇的血清抗体。用 SP2216-1 和 SP1732-3 的免疫在 CBA/N 小鼠中提供针对肺炎链球菌 TIGR4_DB 菌株 (血清型 4) 攻击的保护。由于针对经免疫的蛋白质而不是针对细菌多糖的抗体,保护效应因此是显然的。尽管众所周知 TIGR4_DB 菌株是肺炎链球菌的高毒力株,但小鼠在用 2 种蛋白质免疫接种后受到部分保护。保护水平良好地超过阴性对照,尽管不如关于 PspA 的那些一样高 (图 8)。

[0356] 在用 2 种蛋白质 SP2216-1 和 SP1732-3 免疫后,用肺炎链球菌的多种血清型在另外的脓毒症模型中也观察到显著保护 (数据未显示)。

[0357] 除脓毒症外,肺炎是患者中的肺炎球菌死亡的主因。因此,显示通过疫苗候选物 SP1732-3 和 SP2216-1 可以诱导保护或细菌建群的减少是有关的。此处我们证实肺炎球菌抗原针对肺炎的保护效应。在用肺炎链球菌菌株 EF3030 (血清型 19F) 攻击后 6 天,当肺匀浆物就建群进行测试时,用 SP2216-1 免疫的小鼠显示减少的建群水平 (图 9)。SP2216-1

免疫接种的动物明显促进肺中减少的细菌负荷（减少 2-3 个对数）。

[0358] 实施例 2.3 :3 种另外的肺炎球菌抗原关于保护性的进一步评估

[0359] 实验操作

[0360] 重组肺炎球菌蛋白质的表达和纯化：如实施例 1 中所述。

[0361] 动物保护研究

[0362] 动物：使用 C3H/HeN、CD-1 和 NMRI 雌性小鼠。

[0363] 主动免疫：50 μ g 重组蛋白质进行皮下或肌肉注射，用氢氧化铝 (ALUM) 进行辅助。在第 14 和 28 天时，动物用相同量的蛋白质和佐剂加强 2 次。公开的保护性抗原 PspA (SP0117)、Pneumovax 或分别的裂解物用作阳性对照，而仅用佐剂免疫接种的小鼠充当阴性对照。使用分别的重组蛋白质通过 ELISA 在第 35 天时测量抗体滴度。

[0364] 细菌攻击：制备肺炎链球菌血清型 6B 菌株 Pj-1259、菌株 WU2 (血清型 3) 或菌株 EF3030 (血清型 19F) 的冷冻甘油原种，并且用于包括这些菌株的所有实验。对于其他肺炎链球菌血清型（例如肺炎链球菌 6301-血清型 1），使用新鲜生长的细菌用于所有实验。为了测定细菌接种物中存在的活细胞数目，经由在血琼脂平板上铺平板测定 cfus。作为攻击将 10^4 - 10^8 cfu 腹膜内或鼻内应用到个别小鼠内。对于鼻内应用，在处理前使小鼠麻醉。对于脓毒症和肺炎模型，测量通过免疫的保护。在脓毒症模型中，跟踪存活率以攻击后 2 周，并且存活以动物总数目的百分率表达（10 只小鼠 / 组）。对于肺炎模型，在攻击后第 3 天时，在无菌条件下取出肺，匀浆化并且将肺匀浆的培养物定量铺平板到血琼脂平板上。对于每个个别小鼠测定 cfus / 器官（10 只小鼠 / 组）。

[0365] 结果

[0366] 鉴定在小鼠肺炎模型中与单独的个别蛋白质相比较，显示相似或更大的保护水平的不同肺炎球菌抗原组合（图 10）。在用 ALUM 免疫后，除裂解物对照外，通过用 2 或 3 种重组蛋白质 SP2216-1、SP1732-3（和 SP1650 (PsaA)）的组合免疫实现由 WU2 (血清型 3) 建群中的最高减少，而用单一蛋白质以及第二种阳性对照 PspA 观察到较低的保护水平（图 10A）。单独的 SP1650 (PsaA) 未显示显著的保护水平，但对使用包括 SP2216-1 和 SP1732-3 的组合的保护没有负面影响。

[0367] 使用 EF3030 肺炎模型（血清型 19F）与 ALUM 佐剂组合的免疫和攻击实验显示，特别地 SP1732-3、SP2216-1+SP1732-3、SP2216-1+SP1732-3+SP1650 以及 Pneumovax 到第 3 天时基本上降低肺建群（3-5 个对数）（图 10B）。PspA 对建群的减少也具有有利作用（1-4 个对数）。SP1650 完全未减少肺建群。与 SP1732-3 和 SP2216-1 组合，SP1650 一般基本上不改变结果。

[0368] 到目前为止，所有实验已使用皮下免疫途径执行。为了限定这是否是小鼠中的最有效途径，在 6B 脓毒症 / 致死率模型中执行比较皮下与肌肉途径相比的实验。使包括所有 3 种蛋白质（SP2216-1、SP1732-3 和 SP1650）的组合与 SP2216-1 和 SP1732-3 的组合相比较。如图 11 中可见，对于所有 3 种蛋白质的组合未观察到显著差异。对于用 2 种蛋白质的组合，皮下途径显示略微更佳的保护。

[0369] 蛋白质 SP2216-1、SP1732-3 和 SP1650 (PsaA) 的组合不仅显示针对肺炎链球菌 6B、WU2 和 EF3030 是保护性的（图 10、11），还可以证实它们提供针对肺炎链球菌的进一步血清型的保护。在鼻内应用后可以获得针对关于肺炎链球菌菌株 6301 (血清型 1) 的脓毒症的

保护,与腹膜内途径形成对比,这代表更生理学方式的攻击。对于包括所有 3 种蛋白质的组合或仅 SP1732-3 和 SP2216-1 的组合可见最佳保护(图 12)。

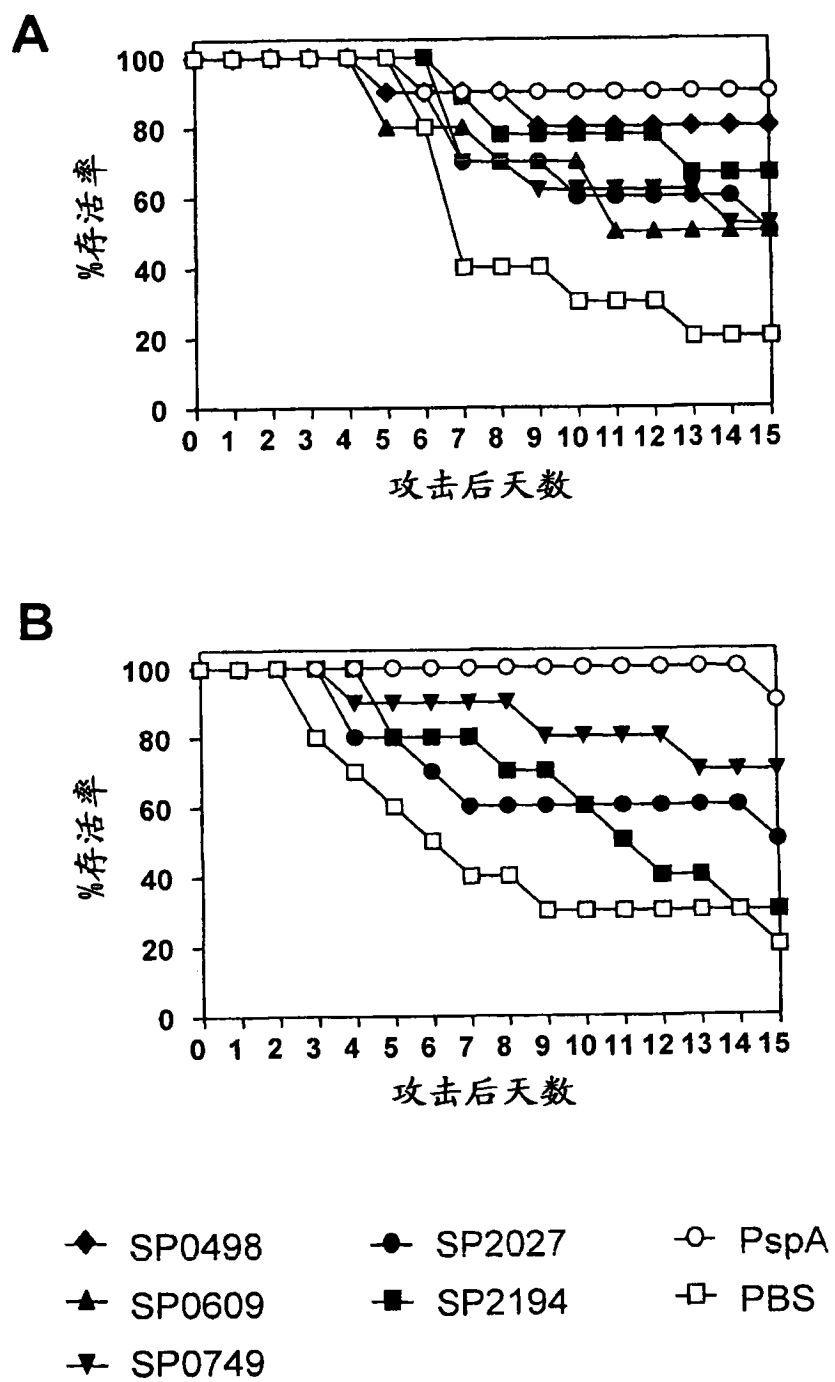


图 1

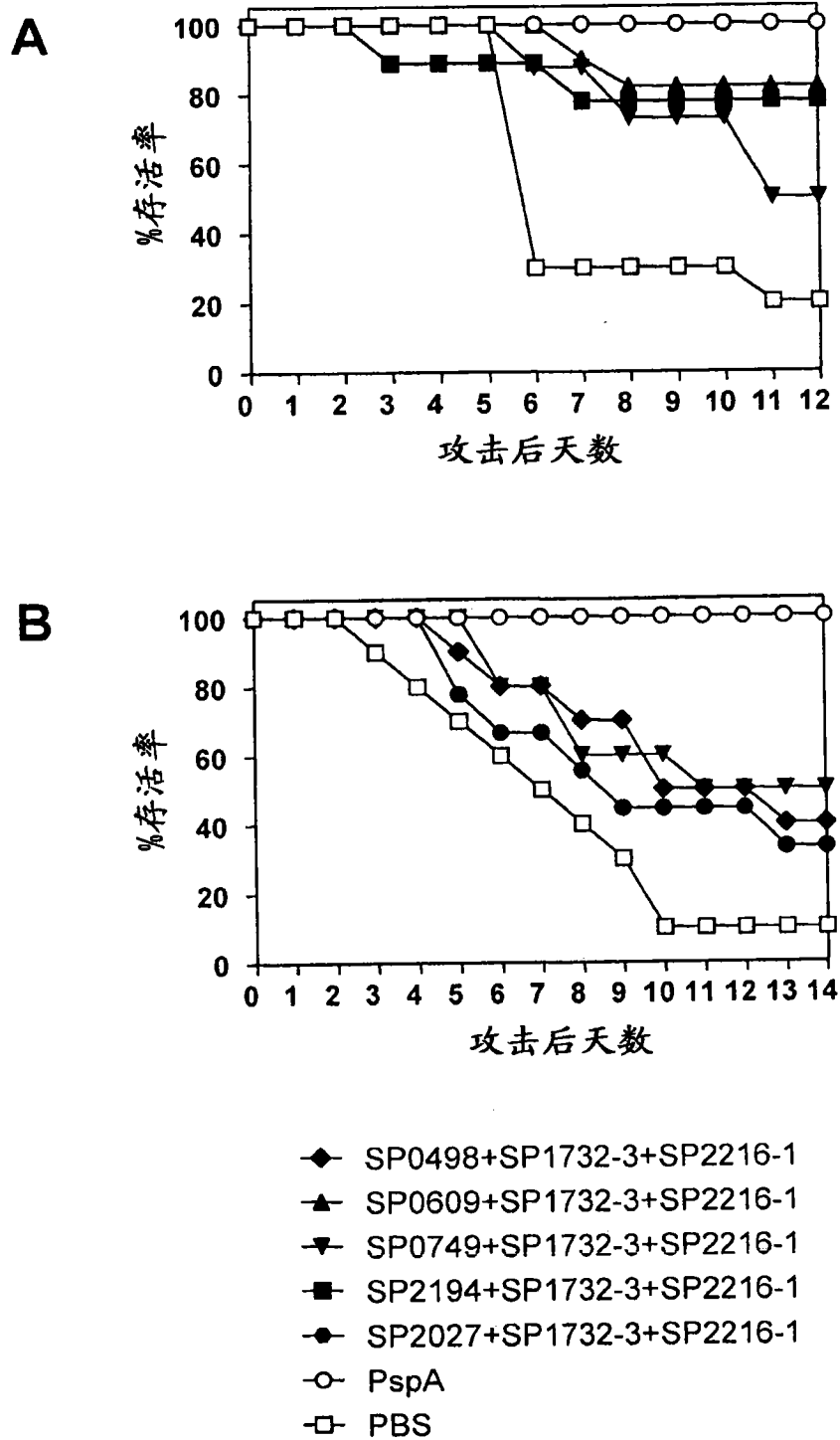


图 2

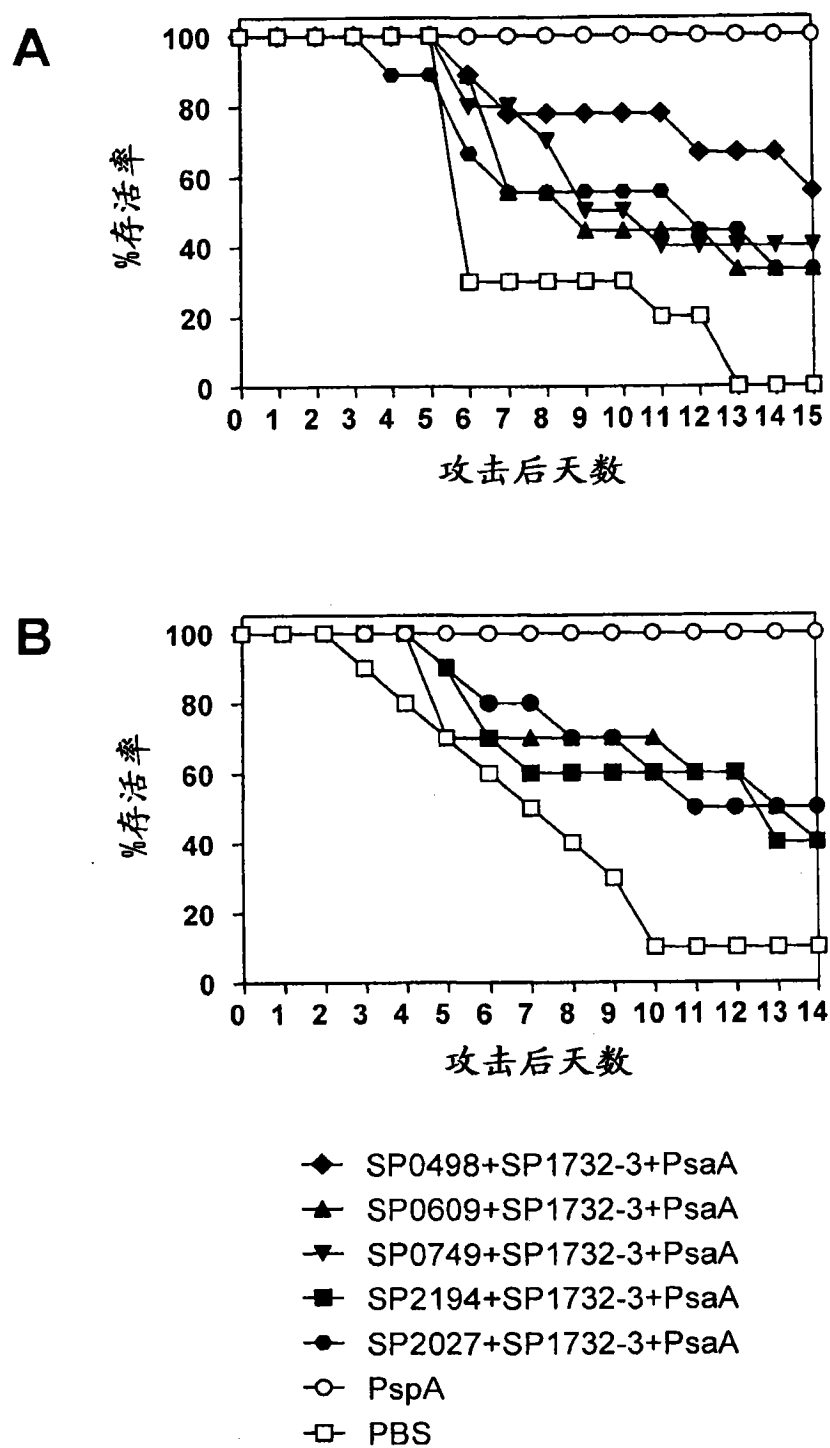


图 3

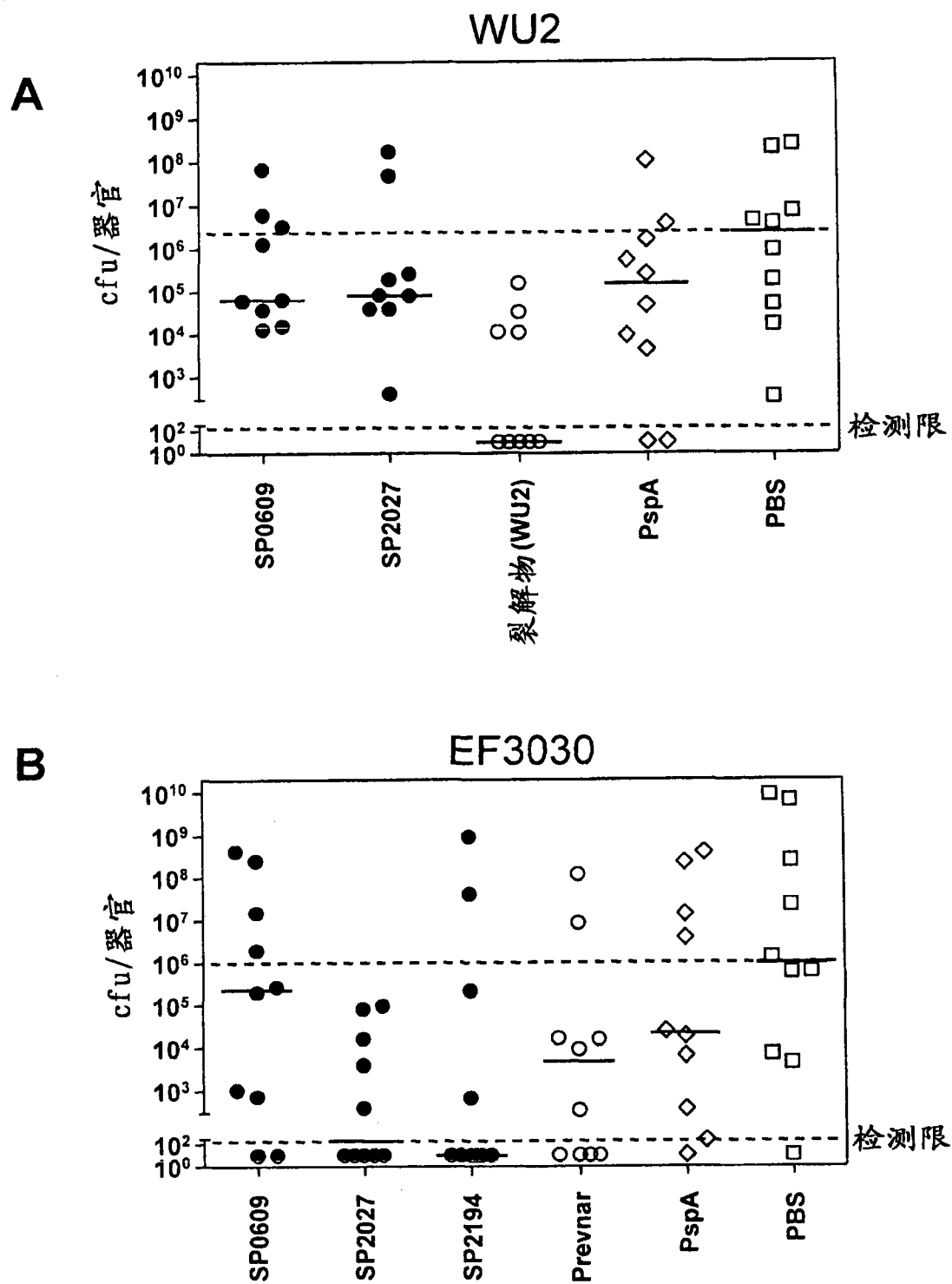


图 4

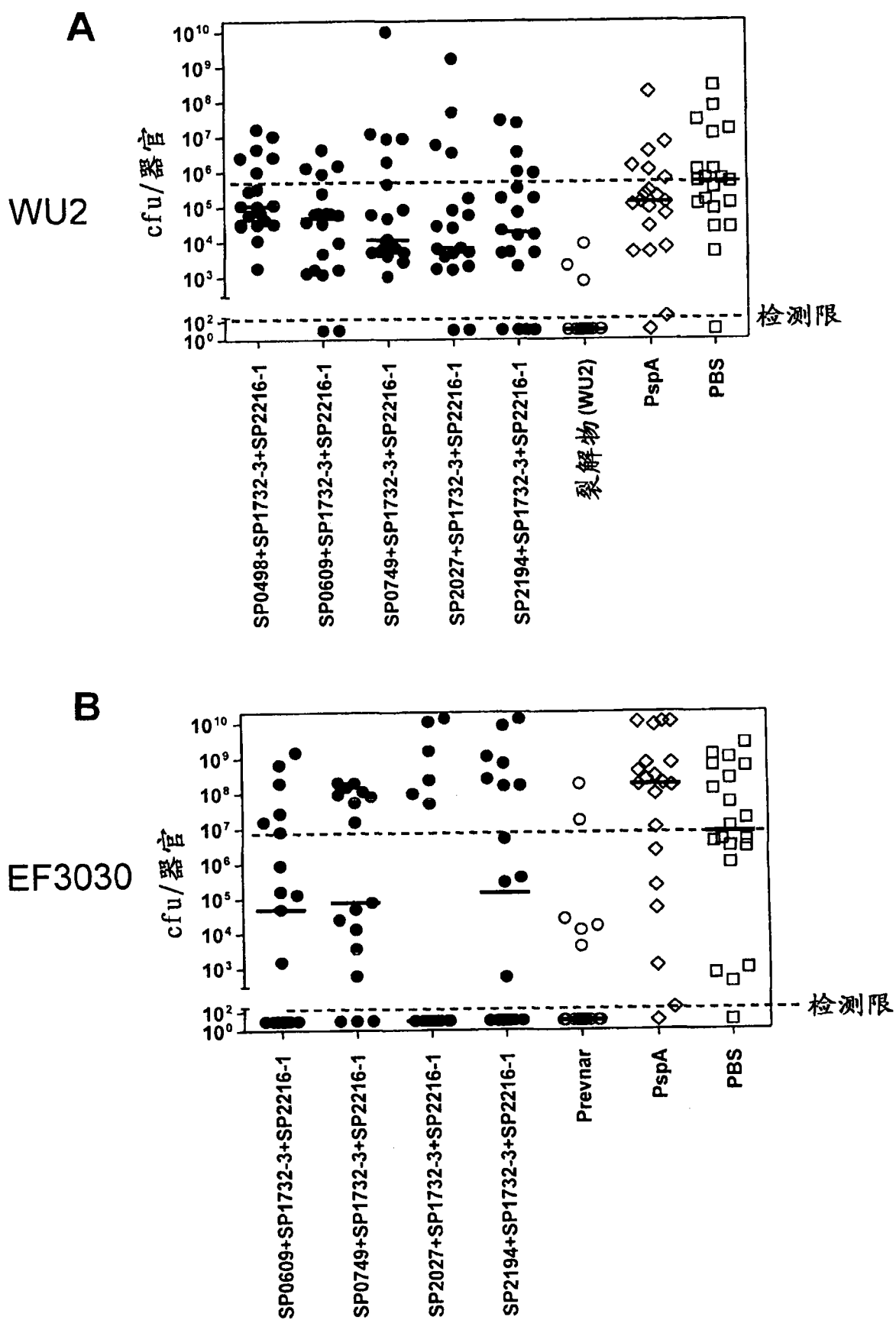


图 5

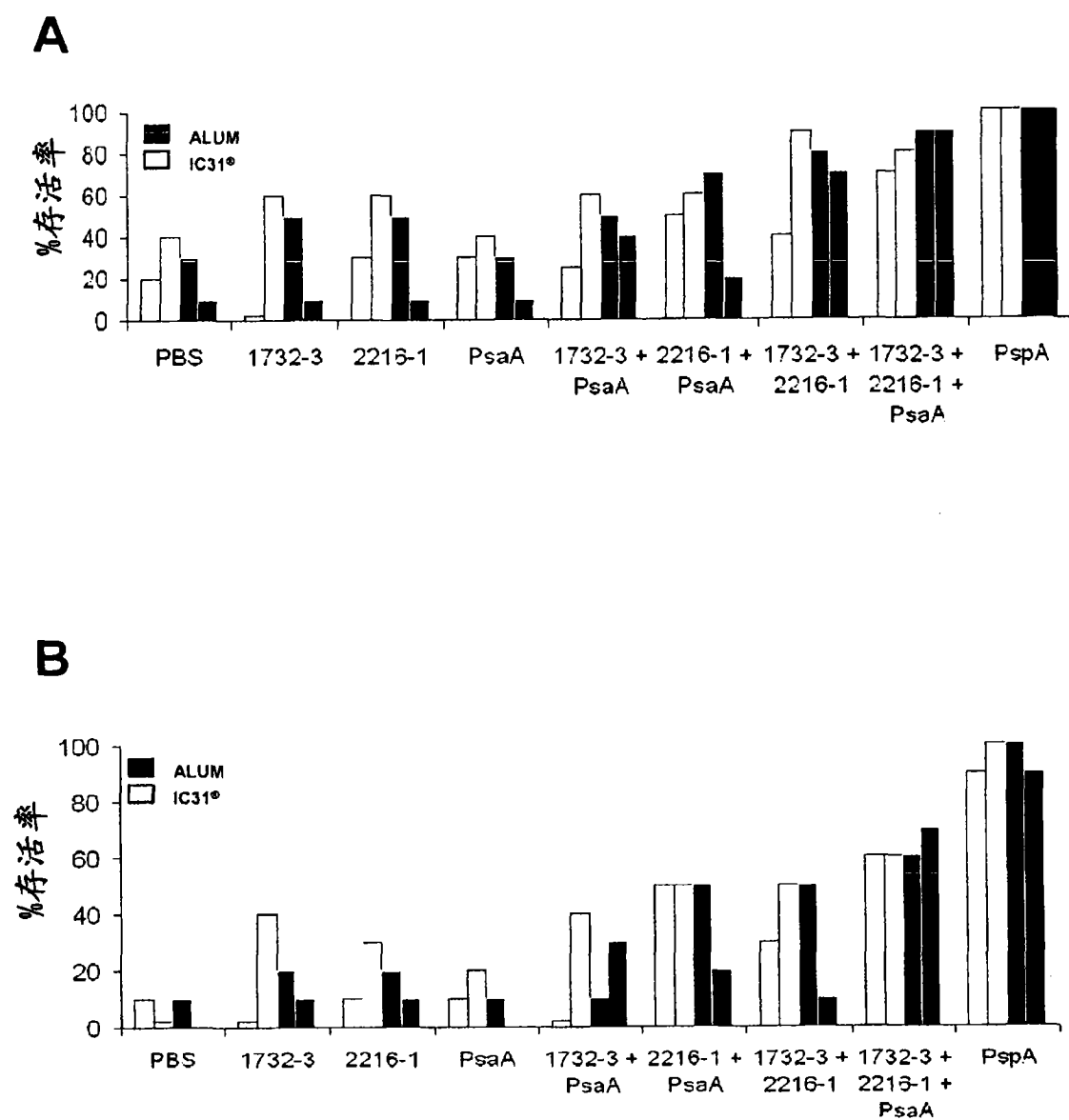


图 6

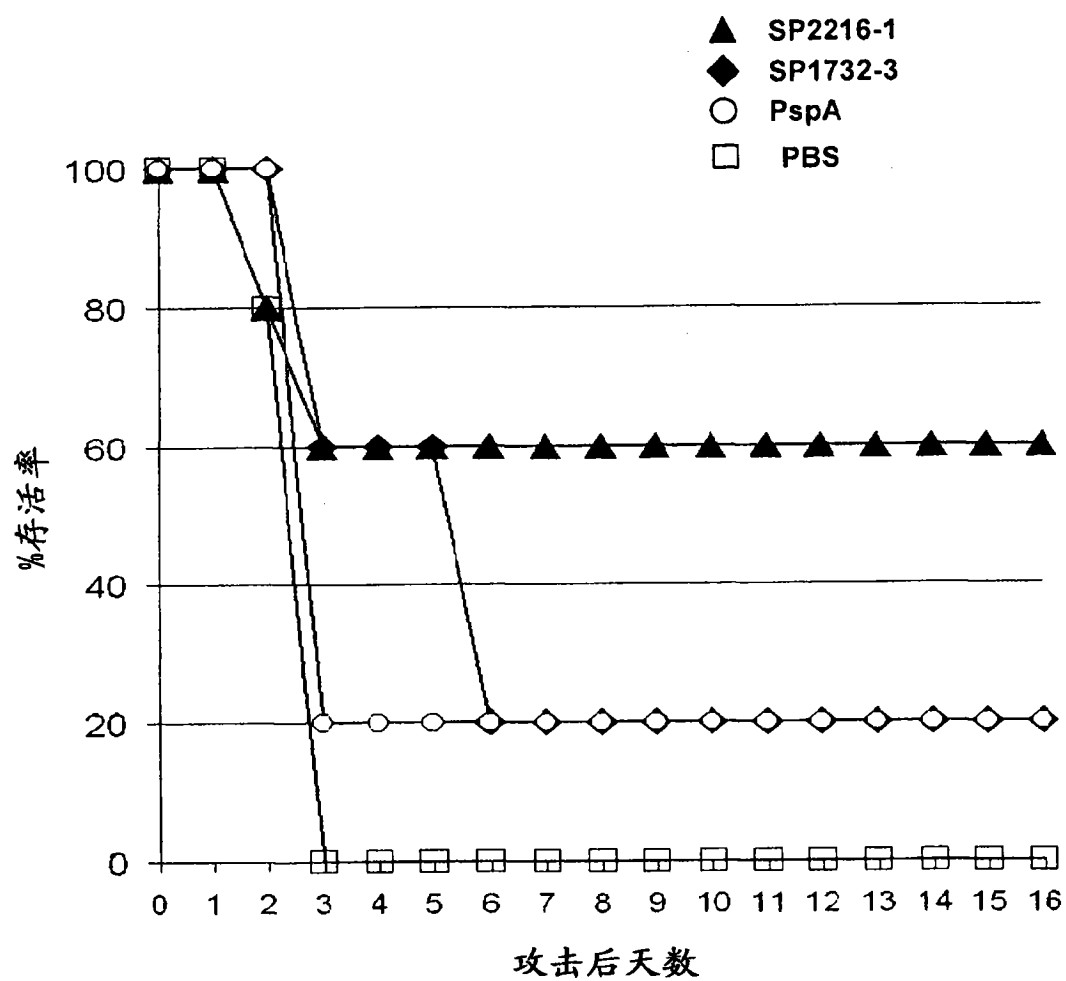


图 7

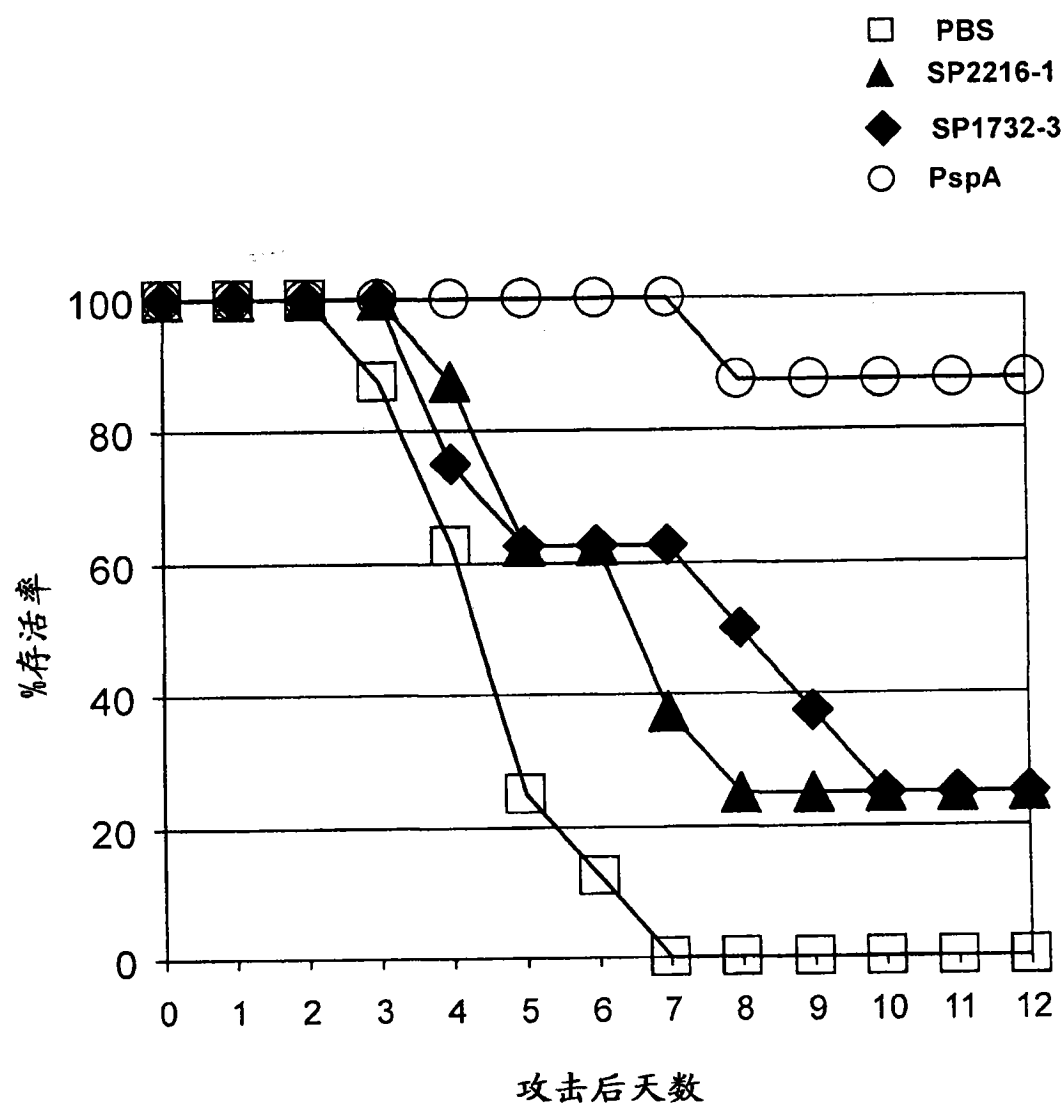


图 8

EF3030

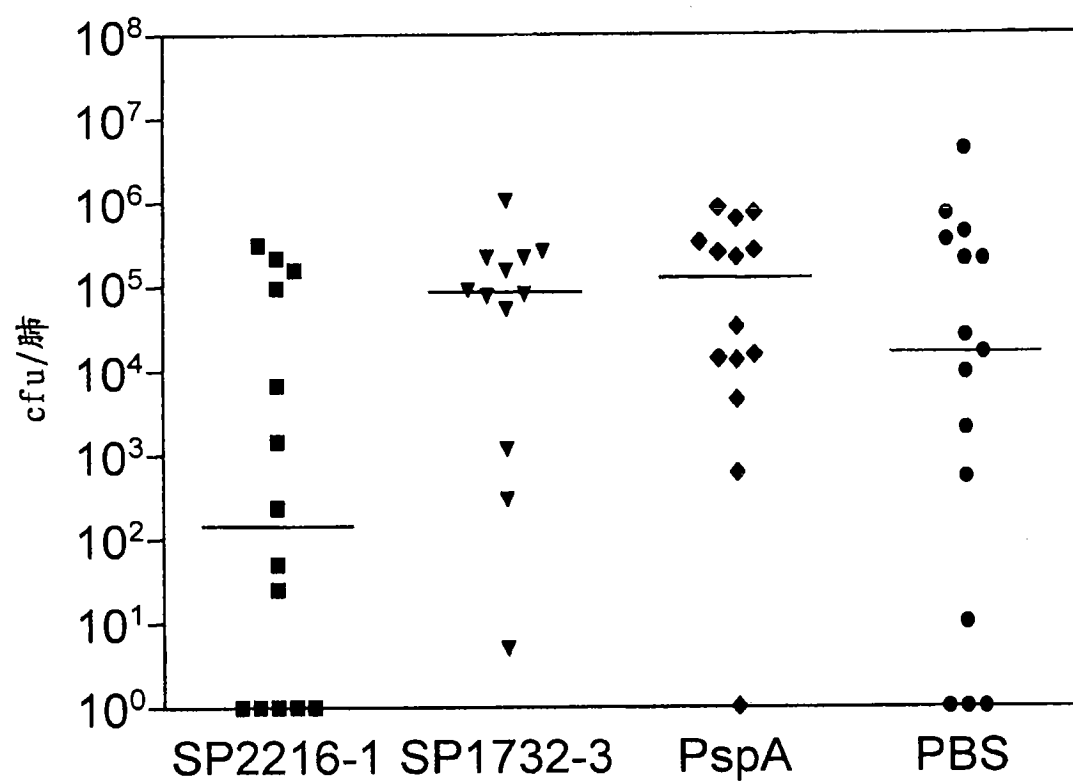


图 9

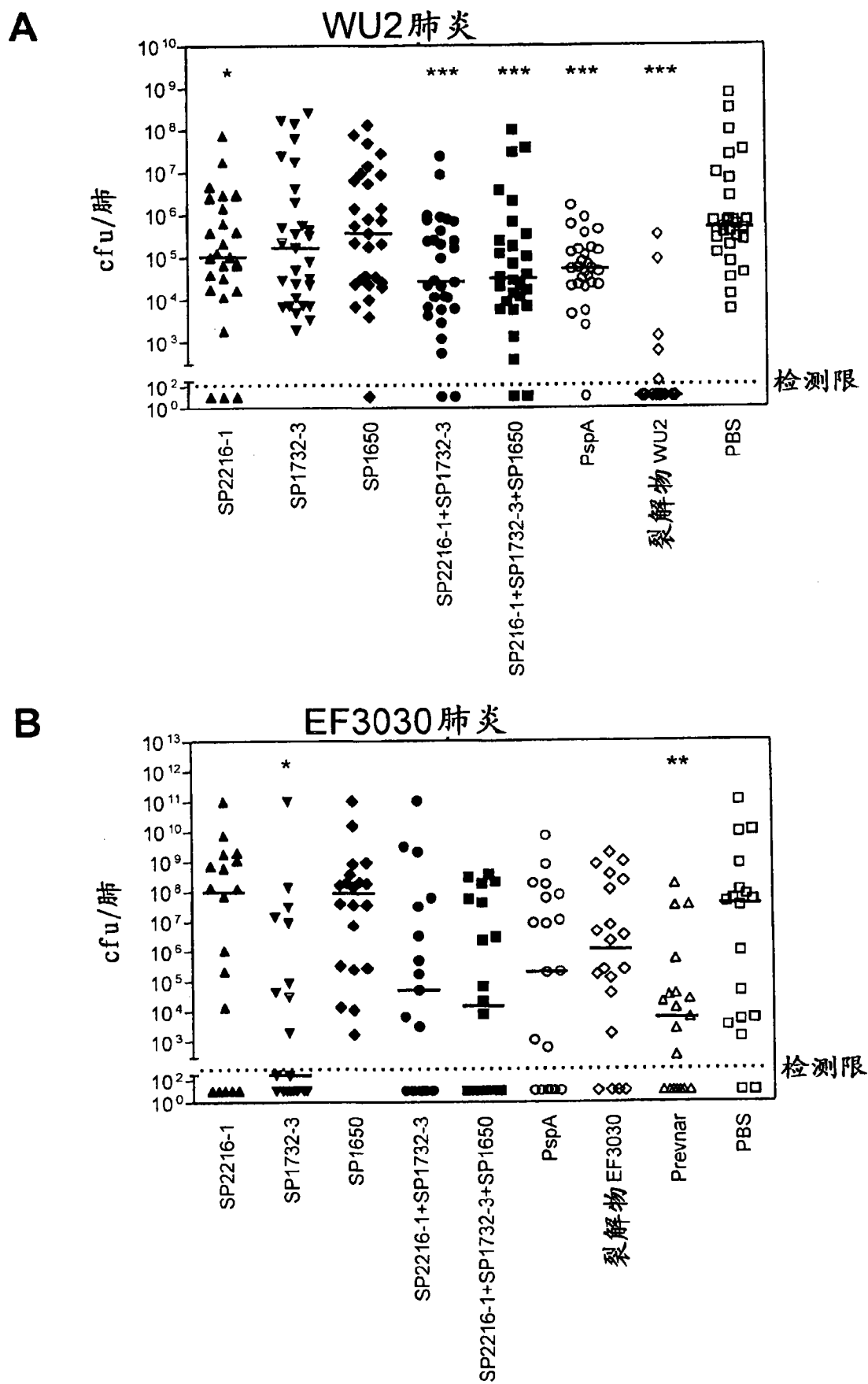


图 10

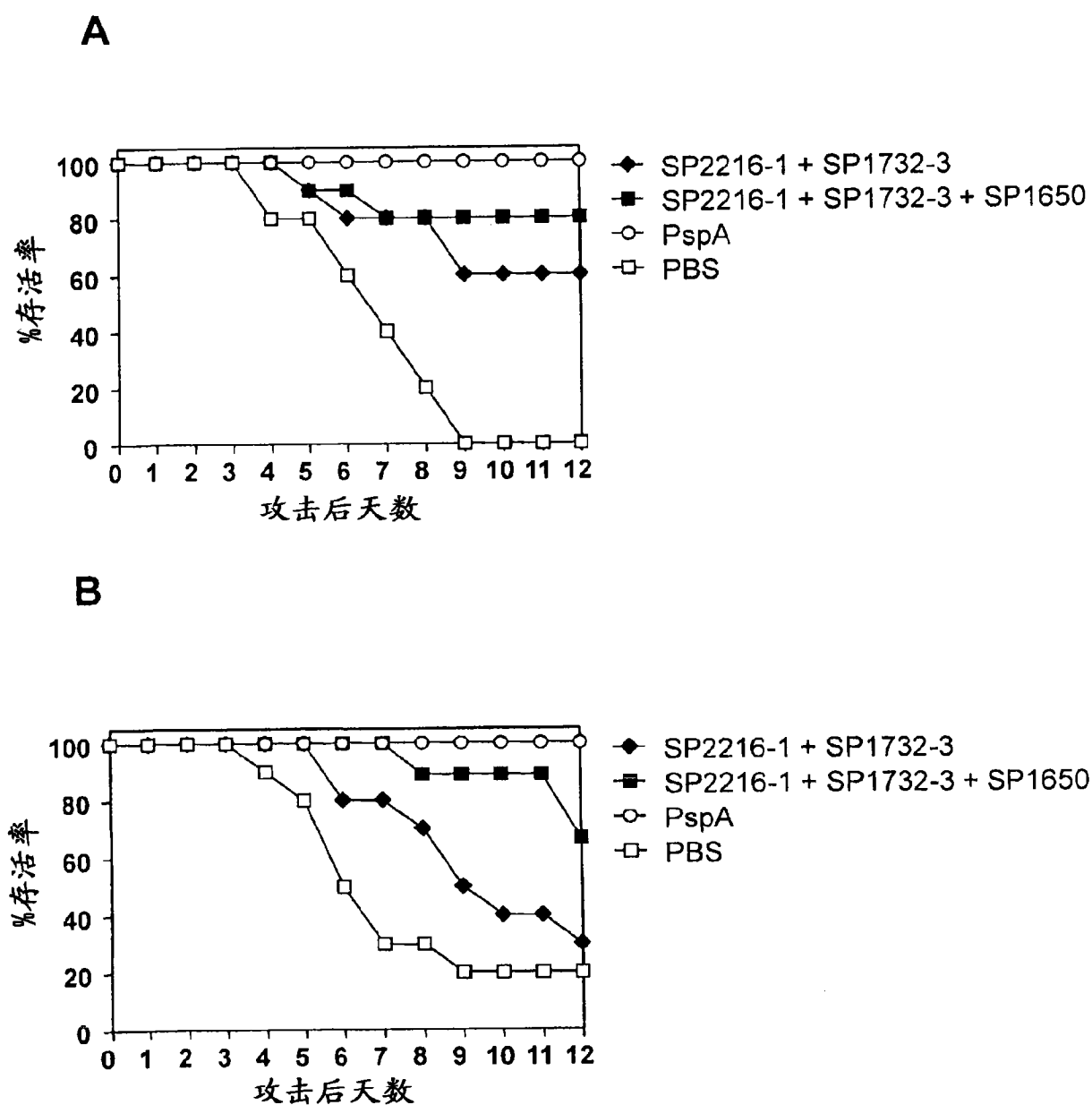


图 11

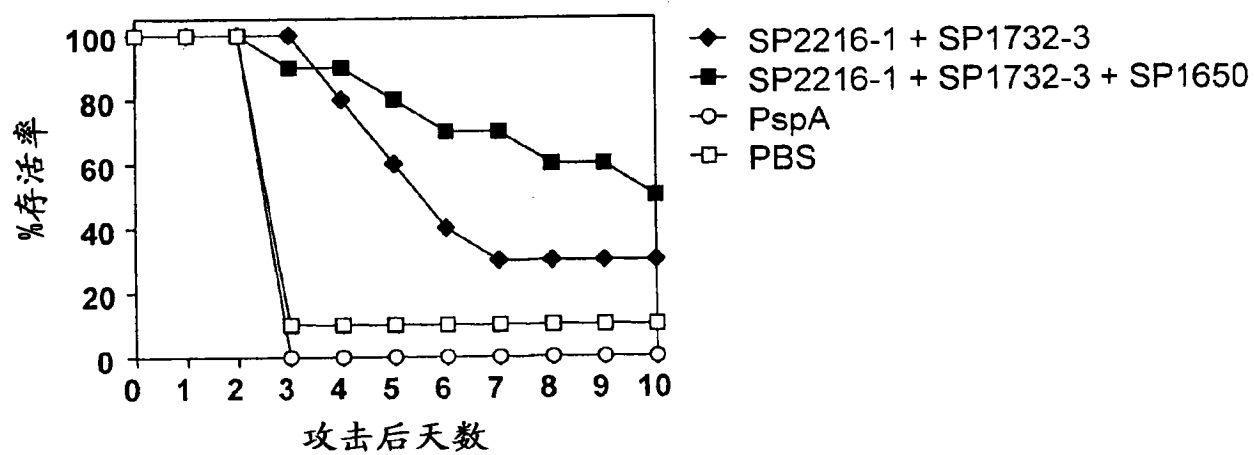


图 12