



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105367656 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201510736991. 4

(22) 申请日 2008. 08. 29

(30) 优先权数据

60/969, 514 2007. 08. 31 US

(62) 分案原申请数据

200880113312. 6 2008. 08. 29

(71) 申请人 芝加哥大学

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 朱利安娜·布贝克-沃登伯格

奥拉夫·施内温德 布鲁克·拉格莱

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

C07K 16/12(2006. 01)

权利要求书1页 说明书41页

序列表7页 附图13页

(54) 发明名称

与针对葡萄球菌性肺部疾病和病症进行免疫相关的方法和组合物

(57) 摘要

本申请涉及与针对葡萄球菌性肺部疾病和病症进行免疫相关的方法和组合物。特别地, 本发明的实施方案包括可用于疫苗接种策略的方法和组合物, 所述疫苗接种策略能够中和 H1a 以提供针对金黄色葡萄球菌性肺炎的免疫保护。在某些方面中, 本发明包括以重组突变体形式 H1a(H1aH35L, 其中 35 位组氨酸变为亮氨酸) 为代表的毒性降低的 H1a, 其可用于阻止该毒素的生产性组装并为受试者提供针对葡萄球菌性肺炎的保护。

	Gst	H1aH35L	A1-K50	Y40-L88	L78-D127	T117-G166	I156-K205	L195-K244	M234-I1293
α -H1a	●	●	●	●	●	●	●	●	●
IgG2a									
7B8.35		●	●						
IgG2b									
1A9.4F9		●	●						

1. 特异性结合成熟 H1a 毒素中前 50 个氨基酸之内所含表位的分离抗体。
2. 权利要求 1 的分离抗体,其中所述 H1a 毒素来自金黄色葡萄球菌。
3. 权利要求 1 的分离抗体,其中所述成熟 H1a 毒素是 H35L 变体。
4. 权利要求 1 的分离抗体,其中所述分离抗体与下列 H1a 毒素片段之一相比对 A1-K50 H1a 毒素片段的结合增加,所述 H1a 毒素片段为 Y40-L88、L78-D127、T117-G166、I156-K205、L195-N244 或 M234-N293。
5. 权利要求 4 的分离抗体,其中所述分离抗体与下列 H1a 毒素片段相比对 A1-K50 H1a 毒素片段的结合增加,所述 H1a 毒素片段为 Y40-L88、L78-D127、T117-G166、I156-K205、L195-N244 和 M234-N293。
6. 权利要求 1 的分离抗体,其中基于 ELISA 测定,所述分离抗体与 Y40-L88 H1a 毒素片段无可检测的结合。
7. 权利要求 1 的分离抗体,其中基于 ELISA 测定,所述分离抗体与 L78-D127 毒素片段无可检测的结合。
8. 权利要求 1 的分离抗体,其中基于 ELISA 测定,所述分离抗体与 T117-G166 毒素片段无可检测的结合。
9. 权利要求 1 的分离抗体,其中基于 ELISA 测定,所述分离抗体与 I156-K205 毒素片段无可检测的结合。
10. 权利要求 1 的分离抗体,其中基于 ELISA 测定,所述分离抗体与 L195-N244 毒素片段无可检测的结合。
11. 权利要求 1 的分离抗体,其中基于 ELISA 测定,所述分离抗体与 M234-N293 毒素片段无可检测的结合。
12. 权利要求 1 的分离抗体,其中所述分离抗体包含来自鼠抗体的互补决定区。

与针对葡萄球菌性肺部疾病和病症进行免疫相关的方法和组合物

[0001] 本申请是申请号为 200880113312.6 的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请 PCT/US2008/074849 的中国国家阶段申请。

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 31 日提交的序列号为 60/969,514 的美国临时申请的优先权,所述申请通过引用整体并入本文。

[0003] 本发明在政府资助(由美国国立卫生研究院给予的 AI38897 和 AI52474,以及由美国国立儿童健康及人类发展研究院给予的 HD00850)下完成。政府享有本发明的某些权益。

[0004] 发明背景

I. 技术领域

[0005] 本发明总体而言涉及免疫学、微生物学、传染病学和医学领域。在一个更具体的实施方案中,它涉及含有外毒素蛋白(如 α -溶血素)的用于产生针对细菌之免疫应答的方法和组合物。

II. 背景技术

[0006] 治疗金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 性肺炎的现有方法依赖于抗微生物药物,生物有获得针对所述药物之抗性的明显倾向。葡萄球菌感染的发病机制依赖于多种不同的毒力因子如分泌的外毒素。以前的研究表明,缺失编码这些因子的单基因未导致缺陷,或者仅导致轻度的毒力降低。但是,本发明人在鼠模型系统中进行的金黄色葡萄球菌性肺炎研究意外地将 α -溶血素(也称作 α 毒素)确定为该疾病发病机制中的关键毒力因子,因为缺乏这种外毒素的突变菌株是无毒的。 α -溶血素是由金黄色葡萄球菌所分泌的细菌细胞毒素家族的成员,它能够插入到大量真核细胞的细胞膜中。该蛋白质以单体形式分泌,但它在真核细胞表面上组装成七聚体环状结构。组装后的毒素插入宿主细胞膜,形成由于破坏膜的完整性而导致细胞损伤或死亡的孔洞。一些生物化学研究已经确定了 α -溶血素单体中促进与宿主细胞结合、七聚体形成和宿主细胞裂解的氨基酸残基。

[0007] 葡萄球菌侵染策略的多样性阻碍了葡萄球菌疫苗的开发。公认的是,活的减毒微生物是高效的疫苗,向受试者的免疫系统呈递多种抗原。与非复制型或多组分免疫原产生的免疫应答相比,由这些疫苗引发的免疫应答常常程度更高且持续时间更长。对该现象的一种解释可能是,活的减毒菌株造成宿主中的局限性感染,模拟天然感染的早期阶段,并且向免疫系统呈递多种抗原。

[0008] 大量参考文献描述了在疫苗中包含 α -溶血素 (H1a) 组分,其中一些文献描述了化学减毒或热减毒的 H1a 类毒素。参见例如美国专利 4,327,082。另一些参考文献描述了用多组分类毒素疫苗免疫人体以及分离 H1a 中和抗体用于被动免疫。参见美国专利 4,027,010。Adlam 等 (1977) 测试了纯化的 H1a 对避免乳房感染的有效性。Adlam 等观察到乳腺炎的“蓝胸形式”(“blue breast form”)减少,但是未观察到针对局部慢性溃疡形式葡萄球菌病的保护作用。Adlam 等将这一观察结果归因于仅有 H1a 不足以提供针对多因

素疾病状态（如葡萄球菌感染的局部慢性溃疡形式）的保护。

[0009] Bhakdi 等 (1994) 描述了具有第 35 位残基突变之 H1a 的毒性降低, 而且描述了向兔施用该突变体未导致兔死亡。Menzies 和 Kernode (1996) 描述了相似的 H1a 突变体 H35L 及其用于在兔中产生抗体的用途, 该抗体可进一步纯化用于被动免疫实验。Menzies 和 Kernode 还描述了使用单一组分的疫苗产生保护作用的困难和预期的失败。他们说: “金黄色葡萄球菌作为病原体的巨大多样性及其产生的多种毒力因子, 使得不太可能使单一免疫靶标如 α 毒素成为有效的候选疫苗。” 本发明人注意到, 这些参考文献都未指出任何组合物对预防或治疗葡萄球菌性肺炎的有效性。

[0010] 本领域的现状使得本领域技术人员不会将单独的或基本上单独的重组 H1a 认为是预防葡萄球菌感染（特别是葡萄球菌呼吸系统感染或葡萄球菌呼吸系统感染的间接效应）的有效抗原。因此, 在没有或者基本没有其他葡萄球菌抗原时, 本领域的技术人员不会期望把 H1a 作为主要疫苗组分施用来引起足以预防或治疗受试者呼吸道感染或葡萄球菌相关肺炎的免疫应答。

[0011] 本领域仍需要另外的组合物和方法来预防和 / 或治疗肺部的葡萄球菌感染, 以及减弱或改善这种感染的继发效应。

发明内容

[0012] 本发明基于这样的数据, 其表明向人葡萄球菌性肺炎的动物模型施用来源于金黄色葡萄球菌的减毒 α -溶血素 (H1a) 毒素可防止动物死亡, 减少从动物肺中回收的细菌数量, 而且将病理性损伤局限在感染的病灶部位。此外, 本发明还基于这样的数据, 其表明可对小鼠施用在兔中产生的针对 α -溶血素（也称作 α 毒素）的抗体, 以赋予其针对葡萄球菌性肺炎的保护效应。因此, 本发明涉及在受试者中使用 H1a 毒素作为单一治疗进行针对葡萄球菌性肺炎之主动免疫的方法和组合物（其中特别排除了其他葡萄球菌蛋白质和抗体）, 以及使用 α -溶血素特异性抗体进行被动免疫的方法和组合物。

[0013] 某些实施方案包括含有分离多肽的免疫原性组合物, 所述多肽含有 SEQ ID NO :2 的至少或至多 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 个或更多个氨基酸, 包括其间的所有值和范围。在某些方面中, 分离多肽包含 SEQ ID NO :2 的至少、至多或约 1-50 位氨基酸。在另一方面中, 分离多肽为融合蛋白。所述组合物可含有佐剂。在某些方面中, 分离多肽为融合蛋白和 / 或脂肽。

[0014] 在本发明的一些实施方案中, 有对患者提供针对葡萄球菌性肺部疾病或病症（例如与葡萄球菌存在相关的疾病或病症, 包括由葡萄球菌感染导致的疾病, 或者葡萄球菌感染是之前疾病或病症的后遗症）之保护的方法, 该方法包括对患者施用有效量的含有重组和减毒的葡萄球菌 α -溶血素 (H1a) 毒素的组合物, 其中所述组合物包含不多于污染量的其他任何葡萄球菌蛋白质。污染量是指, 除了含有 H1a 全部或片段的肽以外的蛋白质、多肽或肽的重量百分比低于 10、5、1、0.1、0.05 或更低。

[0015] 本发明上下文中的短语“保护患者”是指预防、治疗、改善人类患者的葡萄球菌性肺部疾病或病症和 / 或降低其严重程度。除非另有说明, 它还指防止或延迟由疾病或病症导致的死亡, 减少从肺部回收的葡萄球菌数量, 将病理性损伤局限在病灶部位, 缩小疾病或

病症导致的损伤程度,缩短疾病或病症的持续时间,和 / 或降低与疾病或病症相关的症状的数量、程度或持续时间。对人患者实施的本发明实施方案也可实施于任何哺乳动物受试者。在另一些方面中,可引导所述方法来引发对葡萄球菌的免疫应答。在另一方面中,患者患有或有风险发生与葡萄球菌相关的肺部疾病。

[0016] 本发明的另一些实施方案涉及预防患者中葡萄球菌性肺部疾病或病症的方法,该方法包括对患者施用有效量的含有重组和减毒的葡萄球菌 α -溶血素 (H1a) 毒素的组合物,其中所述组合物不引发针对任何其他葡萄球菌蛋白质的可检测免疫应答。

[0017] 本发明还涉及对患者提供针对葡萄球菌性肺部疾病或病症之保护的方法,该方法包括对患者施用有效量的基本由重组和减毒的葡萄球菌 α -溶血素 (H1a) 毒素组成的组合物。术语“基本由 组成”意思是所述组合物不含有可实质性影响本发明基本特性和新特性 (即在组合物中使用重组减毒 H1a 毒素作为葡萄球菌抗原以在患者中引发针对葡萄球菌之免疫应答) 的其他成分。

[0018] 在本发明的另一些实施方案中,有对患者提供针对葡萄球菌性肺部疾病或病症之保护的方法,该方法包括对患者施用有效量的含有对金黄色葡萄球菌 α -溶血素 (H1a) 有免疫反应性之人源化抗体的组合物。

[0019] 术语“人源化抗体”是指经遗传工程改造而使移植到人类抗体中的非人抗体量尽可能小的抗体。含有非人序列的抗体部分通常为抗体的可变部分,而非可变部分是人序列。通常地,人源化抗体具有 90-95% 的人序列和 5-10% 的非人序列。术语“有免疫反应性”意思是所述抗体特异性识别特定抗原并产生针对该抗原的免疫应答。

[0020] 术语“葡萄球菌性肺部疾病或病症”是指葡萄球菌感染引发、促成、加重和 / 或帮助持续的肺部疾病或病症。在一些具体实施方案中,葡萄球菌性肺部疾病或病症为肺炎。

[0021] 本发明的方法包括以有效实现预期目的 (如本发明所指出的) 的量来提供抗原、表位或抗体。更具体地,在一些实施方案中,有效量是指有效刺激或引发免疫应答、或提供对感染的抗性 or 改善感染的活性成分的量。在更具体的方面中,有效量预防、减轻或改善疾病或感染的症状,或延长被治疗受试者的存活期。有效量的测定完全在本领域技术人员的能力之内,特别是借助于本文提供的已详细公开的内容。对本发明方法中使用的任何制备物,有效量或剂量均可以首先从体外、细胞培养物、和 / 或动物模型测定中估算。例如,可以在动物模型中得出获得期望的免疫应答或循环抗体浓度或效价的剂量。这些信息可以用于更为准确地确定人体中的有用剂量。

[0022] 在一些实施方案中,本发明方法中涉及的患者被认为有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症的风险。这些患者包括但不限于已住院或将住院的患者、已进入或将进入重症监护室的患者、将进行手术的患者、将被麻醉或处于全身麻醉中的患者、年龄超过 65 岁的患者、免疫系统受损的患者、儿童患者、佩戴或可能佩戴呼吸机或其他机械通气机的患者、即将或已经植入气管内导管的患者、已经或即将无法移动的患者,即将、正在或已经进行化学治疗或骨髓治疗的患者,以及即将、正在或已经服用一种或多种免疫抑制剂特别是持续很长时间 (长于一个月) 的患者。此外,本发明涉及的是,所述患者还可表现为健康个体,或者可从本发明方法和组合物中获益的病人可以无已知或明显的肺炎风险因子。

[0023] 在本发明的另一些实施方案中,方法还可包括鉴定具有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症之风险的患者。此外,方法还可包括评估患者罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症的风

险因子,评估患者的葡萄球菌性肺部疾病或病症的症状,或诊断患者的葡萄球菌性肺部疾病或病症。在某些实施方案中,方法可包括所述葡萄球菌性肺部疾病或病症为肺炎的实施步骤。

[0024] 在本发明的一些方面中, α -溶血素(HIa)毒素是减毒的,意思是通过改造使所述毒素比未改造毒素功能更弱或毒力更低。在本发明的某些实施方案中,通过一个或多个氨基酸改变产生HIa突变体,从而对所述毒素进行减毒。氨基酸改变可以是缺失、插入和/或替换1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282和283个氨基酸或其中可得出的任何范围。在一些实施方案中,所述改变涉及SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。在具体实施方案中,所述改变位于SEQ ID NO:2的第24、35、66、70、110和/或152位。在具体实施方案中,所述改变为D24C、H35C、H35K、R66C、E70C或K110C,或其任何组合(使用单字母代码指代氨基酸)。此外,在具体实施方案中,减毒的HIa毒素为H35L(文献中使用的名字),它是指在多肽35位具有代替组氨酸之亮氨酸的毒素。可预期的是,35位可替换成位于该位置的其他任何氨基酸,包括其他19种天然氨基酸中的任一种。因此,在本发明的一些实施方案中,减毒的HIa毒素是重组的,意思是使用通过重组工程改造的DNA来产生所述毒素。

[0025] 在某些实施方案中,HIa毒素具有与SEQ ID NOs:1或2相同或相似的序列。在某些方面中,HIa毒素是成熟的HIa毒素(SEQ ID NO:2),其中去除了SEQ ID NO:1的前26个氨基酸。在具体实施方案中,HIa毒素具有来源于金黄色葡萄球菌HIa毒素的蛋白质序列。相似性或同一性(优选同一性)为本领域所知,可使用许多不同程序来确定蛋白质(或核酸)是否具有相对于已知序列的序列同一性或相似性。序列同一性和/或相似性可使用本领域的标准方法来确定,包括但不限于Smith和Waterman(1981)的局部序列同一性算法,通过Needleman和Wunsch(1970)的序列同一性比对算法,通过Pearson和Lipman(1988)的相似性检索方法,通过这些算法的计算机工具(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),Devereux等(1984)描述的Best Fit序列程序,优选使用默认设置,或者通过观察。优选地,使用本领域技术人员已知的或可获得的比对工具来计算同一性百分比。

[0026] 在本发明的某些实施方案中,减毒HIa毒素在膜结合、细胞裂解(可具体为红细胞

的细胞裂解或溶血作用或抗原呈递细胞的裂解)和/或七聚体形成方面的活性降低或消失。在对这些活性的测定中(如以引用方式并入本文的 Walker 和 Bailey(1995) 等所描述的方法和本文的方法),任一或所有这些活性相对于未减毒 H1a 毒素可降低约、至少约或至多约 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%。在某些实施方案中,减毒的 H1a 毒素缺少可检测的溶血活性或致死活性。

[0027] 此外,本发明涉及的是,在一些实施方案中 H1a 毒素是变性或未变性的,如通过化学变性(如使用甲酰胺和甲醛)或热变性。术语“基本未变性”是指在毒素中可能检测到一定的变性,但免疫活性或者与构象特异性结合物(与多肽的三级或二级结构相关)的结合能力也是可检测的。在具体实施方案中,H1a 毒素是纯化的,可采用或不采用轻度变性来获得。在本发明的一些方面中,H1a 毒素是有活性的,意思是毒素保留一定的可检测水平的功能或活性,如前面所描述的那些,包括结合能力。本发明涉及的是,可将 H1a 毒素纯化到约、至少约或至多约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100% 的纯度或均一性(相对于其他蛋白质分子和/或细胞大分子),或其中可得出的任何范围。在另一些实施方案中,重组 H1a 毒素可以是分离的。术语“分离的”可指核酸或多肽,其基本不含其所来源的细胞材料、细菌材料、病毒材料或培养基(当用重组 DNA 技术生产时)或者化学前体或其他化学品(当化学合成时)。此外,分离的化合物是指能够以分离化合物的形式施用于受试者的化合物;也就是说,如果化合物被吸附于柱中或包埋于琼脂糖凝胶中,则不可简单地认为它是“分离的”。此外,“分离的核酸片段”或“分离的肽”是不以片段形式天然存在和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白质片段。

[0028] 本发明的方法包括对患者施用 H1a 毒素来刺激患者中针对 H1a 的免疫应答。在某些实施方案中,方法包括对患者检测针对 H1a 毒素的抗体。这些方法为本领域技术人员所熟知,它们包括但不仅限于以下分析方法: Western 印迹、ELISA、斑点印迹、夹心测定、免疫组织化学和流式细胞术如 FACS。

[0029] 本发明涉及的是,可单次或多次施用本发明组合物。在本发明某些实施方案中,将组合物施用 1、2、3、4、5、6 或更多次或其中可得出的任何范围。本发明涉及的是,预防或治疗方案可包含在 1、2、3、4、5、6 和/或 7 天或者 1、2、3、4 或 5 周和/或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和/或 12 个月或其中可得出的任何范围中多次施用。此外,任何这种方案均可在经过一定长度的时间之后、或当受试者重新表现出罹患葡萄球菌性疾病或病症的风险或罹患疾病或病症时重复实施。

[0030] 可通过用于将疫苗或抗体引入患者的任何途径对患者施用本发明组合物。这些途径包括但不局限于粘膜或肌内递送。在具体实施方案中,通过鼻内或吸入对患者施用组合物。在另一些实施方案中,通过静脉或静脉注射施用组合物。在另外的实施方案中,组合物的施用方式包括但不局限于口服、肠胃外、皮下、肌肉、静脉施用,或它们的多种组合。

[0031] 可将所述组合物配制成药学上可接受的组合物。在本发明的某些方面中,所述葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。

[0032] 此外,在本发明实施方案中,方法可包括含有约、至少约或至多约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、

17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、21、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 μg 或 mg 蛋白质（或其中可引出的任何范围）的组合物。所述蛋白质可以在约、至少约或至多约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、10、11、12、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 μl 或 ml （或其中可引出的任何范围）中。在某些方面中，可按照每 kg 体重 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、21、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 mg 的剂量施用一种或多种抗 H1a 抗体。

[0033] 在一些实施方案中，还给予患者一种或多种用于治疗金黄色葡萄球菌肺部感染的抗生素。所述抗生素可以被包括或不包括在含 H1a 毒素或 H1a 毒素特异性抗体的组合物之内。

[0034] 在本发明的另一些实施方案中，组合物含有一种或多种佐剂。佐剂可共价地或非

共价地连接到本发明多肽或肽上。在某些方面中,所述佐剂以化学方法缀合到蛋白质、多肽或肽上。

[0035] 本发明的部分(如抗原或免疫原)可共价地或非共价地缀合或连接至其他部分如佐剂、蛋白质、肽、支持物、荧光部分或标记。术语“缀合”或“免疫缀合”用于宽泛地定义一部分与另一制剂的有效联合,而非意图单指任一类型的有效联合,特别是不局限于化学“缀合”。重组的融合蛋白是特别涉及的。基于其他污染物的量,核酸或多肽组合物可至少具有60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或100%的纯度。

[0036] 在另一些实施方案中,组合物含有编码H1a毒素的重组核酸分子。重组核酸分子通常包含异源的启动子。在某些方面中,本发明的重组核酸分子是载体,在另一些方面中,所述载体为质粒。在某些实施方案中,所述载体为病毒载体。通常向人受试者施用组合物,但也涉及向能够引发免疫应答的其他动物施用,特别是牛、马、山羊、绵羊和其他驯养的动物。在另一些方面中,所述葡萄球菌为金黄色葡萄球菌。在另一些实施方案中,所述免疫应答为保护性免疫应答。在另一些方面中,本发明的方法和组合物可用于预防、减轻、降低或治疗肺部感染,特别是肺炎和其他肺部感染。其他方法包括但不局限于,预防性降低未表现出感染迹象之受试者体内的细菌含量,特别是疑似有目标细菌定殖的受试者或具有此风险的受试者,例如在住院、治疗和/或恢复期间有或会有感染风险和易受感染的患者。

[0037] 本文使用的术语“抗原”是能够与抗体或T细胞受体结合的分子。抗原还能够诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答,导致B和/或T淋巴细胞产生。引起生物学应答的抗原结构方面在本文中被称作“抗原决定簇”。B淋巴细胞通过产生抗体来应答外来抗原决定簇,而T淋巴细胞则是细胞免疫的介导者。除了作为细胞免疫的介导者,T淋巴细胞还可通过进一步刺激B淋巴细胞对抗原的应答来促进抗体产生。因此,抗原决定簇或表位是为抗体或T细胞受体(在MHC的情况下)所识别的抗原部分。抗原决定簇不需要是蛋白质的连续序列或片段,而是可包含不相互邻近的多个序列。

[0038] 在本申请全文中还讨论了本发明的其他实施方案。与本发明某一方面相关的任一实施方案均适用于本发明的其他方面,反之亦然。在实施例章节中的实施方案应理解为适用于本发明所有方面的本发明实施方案。

[0039] 本发明特别涉及的是可在要保护的发明中具体纳入或排除列表中的各个成分或要素。

[0040] 当在权利要求和/或说明书中使用术语“抑制”、“降低”或“预防”或这些术语的任何变异词包括用于实现期望结果的任何可测量的降低或完全抑制。

[0041] 当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”、“包括”等联合使用时,无数量词修饰的词语可指“一个”,但也可与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或多个”的意思一致。

[0042] 本发明涉及的是,本文中所讨论的任一实施方案均可应用于本发明的任何方法或组合物,反之亦然。此外,本发明的组合物和试剂盒可用于实现本发明的方法。

[0043] 在本申请全文中,使用术语“约”来指示数值,所述数值包含测定该值所用仪器或方法的标准误差。

[0044] 权利要求中的术语“或”用于表示“和/或”,除非明确指出仅表示选择,或者选择之间是互斥的,但本公开内容支持仅表示选择和“和/或”的定义。

[0045] 本说明书和权利要求中所使用的词语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是包容性的或开放式的,而不排斥另外的未提及的要素或方法步骤。

[0046] 通过下文的详细描述,本发明的其他目标、特征和优点将是很明显的。但是,应当理解的是,仅仅通过举例说明的方式给出了详细描述和具体实例(即本发明的具体实施方案),因为通过这一详细描述,在本发明精神和范围内的许多改变和修改对本领域技术人员而言将是很明显。

附图说明

[0047] 以下附图是本说明书的一部分,并用于进一步说明本发明的某些方面。通过参考一个或多个图并结合本文给出的具体实施方案的详述,可以更好地理解本发明。

[0048] 图 1A-1C α -溶血素(H1a)是 CA-MRSA(社区型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, community associated-methicillin resistant *S. aureus*)肺部感染的毒力因子。(图 1A) CA-MRSA 菌株金黄色葡萄球菌 LAC(野生型)与同基因型 *hla::erm* 突变体在鼠肺部感染模型中的毒力比较,通过测定感染后 24、48 和 72 小时的动物死亡率而得到。每组感染 10 只动物 ($p < 0.0007$)。(图 1B)在 CA-MRSA 菌株 LAC 或 MW2 中缺失编码 Pantone-Valentine 杀白细胞素(Pantone-Valentine leukocidin, PVL)毒素的 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* 基因,不影响在葡萄球菌性肺炎鼠模型中的毒力。用 2×10^8 CFU 的金黄色葡萄球菌 LAC 野生型(wt)或同基因型 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* 缺失突变体(Δ pv1) ($p = 0.22$)和 $3-4 \times 10^8$ CFU 的金黄色葡萄球菌 MW2(wt)及其同基因型 pv1 缺失突变体(Δ pv1) ($p = 0.41$)来感染小鼠。在感染后 24、48 和 72 小时测定每种菌株 15 只动物一组的死亡率。(图 1C)通过苏木精-伊红染色,切片肺组织的组织病理学分析显示相似的肺部损伤模式,与 PVL 在 LAC 和 MW2 分离群中的表达无关。

[0049] 图 2A-2B α -溶血素(H1a)是 CA-MRSA(社区型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)肺部感染的毒力因子。(图 2A)用 2×10^8 CFU 的金黄色葡萄球菌 LAC 野生型(wt)或同基因型 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* 缺失突变体(Δ pv1) ($p = 0.22$)和 $3-4 \times 10^8$ CFU 的金黄色葡萄球菌 MW2(wt)及其同基因型 pv1 缺失突变体(Δ pv1) ($p = 0.41$)来感染小鼠。被葡萄球菌感染 24 小时后之动物右肺的细菌回收显示,缺失 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* 不影响葡萄球菌在肺部组织中的复制(每种菌株 10 只动物一组)。采用 Student's *t* 检验的统计学分析得到,与 LAC 菌株比较为 $p = 0.46$, MW2 菌株为 $p = 0.23$ 。(图 2B)用针对 *LukS-PV* 和 *LukF-PV* 之抗体进行的免疫印迹证实, pv1 突变体菌株中无相应毒素分泌,而 α -溶血素(H1a)的分泌不受同基因型 pv1 缺失的影响。用星号(*)标记的交叉反应种类迁移略快于 *LukF-PV*。

[0050] 图 3A-3E 表达 Pantone-Valentine 杀白细胞素(PVL)的 ϕ Sa2mw 噬菌体的溶原性不影响金黄色葡萄球菌 Newman 在葡萄球菌性肺炎鼠模型中的毒力。(图 3A)图示金黄色葡萄球菌 Newman 的基因组、其复制起点(ori)和终点(ter)、以及四个原噬菌体插入位点(ϕ NM1、 ϕ NM2、 ϕ NM3、 ϕ NM4)。标出了 ϕ Sa2mw 在金黄色葡萄球菌 Newman 中的插入位点。(图 3B)菌株 Newman 的 ϕ Sa2mw 溶原性引起 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* 的表达,因为通过培养物上清液样品中用兔抗血清进行的免疫印迹分析可检测到这两种 PVL 毒素组分(*LukS-PV* 和 *LukF-PV*)。用星号(*)标记的交叉反应种类迁移略快于 *LukF-PV*。(图 3C)用 $3-4 \times 10^8$ 集落形成单位(CFU)的金黄色葡萄球菌 Newman(wt)或由 ϕ Sa2mw 溶原化的同基因型变体

(Newman ϕ Sa2mw) 鼻内接种 24 小时后之小鼠右肺的细菌回收, 未显示葡萄球菌复制存在显著差异 (Student t 检验 $p = 0.74$, 每组 15 只动物)。细菌回收的平均值用横线指示。(图 3D) 通过鼻内接种用金黄色葡萄球菌 Newman(wt) 或用 ϕ Sa2mw 溶原化的同基因型突变体 (Newman ϕ Sa2mw) 感染的动物在观察 24、48 或 72 小时之后表现出相似的致死性 ($p = 0.58$)。(图 3E) 将 $hla::erm$ 等位基因转入金黄色葡萄球菌 Newman ϕ Sa2mw 消除了小鼠肺部感染模型中的毒力 ($p < 0.00004$)。

[0051] 图 4A-4B 表达 Panton-Valentine 杀白细胞素 (PVL) 的 ϕ Sa2mw 噬菌体的溶原性不影响金黄色葡萄球菌 Newman 在葡萄球菌性肺炎鼠模型中的毒力。(图 4A) 经由鼻内途径用 $3-4 \times 10^8$ CFU 带有空载体或 ppv1 的金黄色葡萄球菌 Newman 感染的动物表明, 质粒介导的 PVL 过表达不影响动物死亡率 ($p = 0.27$)。 α -溶血素缺陷型菌株 ($hla::erm$) 在肺部感染中无毒力, 并分析了用空载体、ppv1 或 ph1a 转化的 $hla::erm$ 突变体在鼠肺部感染模型中毒力特征。每种菌株检测 10 到 15 只动物, 记录感染后 24、48 和 72 小时的死亡率。用金黄色葡萄球菌 h1a 突变体 (ph1a) 感染的动物的死亡率明显高于用带有空载体或 ppv1 的金黄色葡萄球菌 h1a 突变体 (ph1a) 感染的动物的死亡率 ($p = 0.00004$)。(图 4B) 来源于用质粒转化的金黄色葡萄球菌 Newman 及其同基因型 $hla::erm$ 突变体的 18 小时培养物上清液的免疫印迹分析, 所述质粒促进 PVL (ppv1、lukS-PV 和 lukF-PV)、 α -溶血素 (ph1a) 或空载体表达。特异性抗体指示 LukS-PV、LukF-PV、 α -溶血素 (H1a) 和核酸酶的存在和/或缺乏。用星号 (*) 标记的交叉反应种类迁移略快于 LukF-PV。

[0052] 图 5A-5E 用突变 α -溶血素进行免疫提供了针对葡萄球菌性肺炎的保护。(图 5A) 将 C57BL/6J 小鼠用 PBS 或 $20 \mu g$ H1a_{H35L} (具有阻止毒素活性和孔洞形成之单氨基酸替换的突变 α -溶血素) 进行免疫, 然后用金黄色葡萄球菌 Newman 攻击。记录感染后 24、48 和 72 小时的死亡率 ($p < 0.001$)。(图 5B) 用 H1a_{H35L} 免疫小鼠减少了感染的鼠肺部组织中金黄色葡萄球菌 Newman 的生长。(图 5C) 来自用 PBS 或 H1a_{H35L} 免疫之小鼠的金黄色葡萄球菌 Newman 感染肺部组织的总体病理学。(图 5D) 来自用 PBS 或 H1a_{H35L} 免疫之小鼠的金黄色葡萄球菌 Newman 感染肺部组织的组织病理学。(图 5E) 将 C57BL/6J 小鼠用 PBS 或 $20 \mu g$ H1a_{H35L} 进行免疫, 然后用金黄色葡萄球菌 CA-MRSA 菌株 LAC 或 MW2 攻击。记录感染后 24、48 和 72 小时的死亡率。用金黄色葡萄球菌菌株 LAC ($p = 0.00001$) 或 MW2 ($p = 0.018$) 攻击时, H1a_{H35L} 免疫动物的死亡率明显低于假 (PBS) 免疫动物的死亡率。

[0053] 图 6A-6C α -溶血素介导葡萄球菌性人肺泡细胞损伤。(图 6A) 用金黄色葡萄球菌 (菌株 LAC、MW2 或 Newman) 感染人 A549 肺泡细胞。在 $37^\circ C$ 共培养 4 小时后, 对每个孔进行裂解细胞的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放测定。一式三份进行感染, 用 Student t 检验评价统计学显著性。(图 6B) 未感染的或者用带有质粒载体或 ph1a 之 α -溶血素突变体金黄色葡萄球菌菌株 ($hla::erm$) 感染的 A549 细胞的相差显微图像。感染 3 小时后采集图像。(图 6C) 通过用抗 H1a 兔血清处理或与纯化的 H1a_{H35L} 预孵育, 降低了 α -溶血素介导的葡萄球菌性人肺细胞损伤, 而无反应性的兔血清 (non-reactive rabbit serum, NRS) 没有效果。

[0054] 图 7A-7F 用抗 H1a 血清进行的小鼠被动免疫产生了针对葡萄球菌性肺部感染的保护作用。(图 7A) 通过腹膜内注射用无反应性 (NRS)、或带有抗 H1a 抗体的兔血清对小鼠进行被动免疫, 然后用金黄色葡萄球菌 Newman 攻击 ($p < 0.0007$)。记录感染后 24、48 和 72

小时的死亡率。(图 7B) 用抗 H1a 进行的小鼠被动免疫降低了金黄色葡萄球菌 Newman 在鼠肺部组织中生长的能力(图 7C), 还降低了感染后的总体病理学(图 7D) 和组织病理学损伤。(图 7E) 抗 H1a 抗血清还在通过鼻内接种用金黄色葡萄球菌菌株 LAC ($p < 0.025$) 或 MW2 ($p < 0.009$) 攻击时保护动物。(图 7F) 根据感染后 24、48 和 72 小时的记录, 抗 PVL 免疫球蛋白不能提供针对金黄色葡萄球菌 LAC 感染的保护作用 ($p = 0.55$)。

[0055] 图 8 用针对 α -溶血素之抗体进行的被动免疫影响了葡萄球菌性肺部感染期间的细胞因子应答。将无反应性或带有抗 H1a 抗体的兔血清注射入小鼠的腹腔内。通过检测 IL-1 β 和 IFN- γ 浓度的多元珠细胞因子测定 (multiplex bead-based cytokine assay) 来测定血清细胞因子水平。用 Student t 检验 (每组 9 只动物) 计算细胞因子水平差异的统计学显著性, 并记录下来。

[0056] 图 9 针对 α -溶血素之小鼠单克隆抗体对 A549 细胞提供针对金黄色葡萄球菌所诱导裂解的保护。在无反应性 (NRS) 或带有抗 H1a 的兔血清存在下, 将 A549 细胞与活的金黄色葡萄球菌共培养。将另外的 A549 细胞孔与活的金黄色葡萄球菌以及两种独立的抗 H1a 单克隆抗体 (7B8.35 和 1A9) 或其同种型匹配的对照抗体 (分别是 IgG2a 和 IgG2b) 共培养, 证实多克隆兔抗血清和小鼠单克隆抗体都能对 A549 细胞提供针对 H1a 所诱导损伤的保护。

[0057] 图 10 在 A549 细胞 LDH 释放测定中的小鼠单克隆抗体滴定。在金黄色葡萄球菌 Newman 存在下, 将同种型对照抗体 (IgG2a 或 IgG2b) 或抗 α -溶血素的单克隆抗体 7B8.35/1A9.4F9 加入 A549 细胞共培养物中。按照以下浓度在测定中滴定单克隆抗体: 从左至右为 2.5mg/ml、2mg/ml、1.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml 和 0.001mg/ml。在共培养 4 小时之后测定 LDH 释放。

[0058] 图 11A-11B 抗 α -溶血素的单克隆抗体 7B8.35 和 1A9.4F9 对实验动物提供针对金黄色葡萄球菌性肺炎相关死亡的保护。用金黄色葡萄球菌 Newman 感染之前 24 小时, 15 只小鼠一组接受同种型对照抗体 (IgG2a, 图 A 或 IgG2b, 图 B) 或相应抗 H1a 单克隆抗体 (7B8.35, 图 A 或 1A9.4F9, 图 B) 的腹膜内注射。每种抗体以 5mg/kg 的剂量递送。经由鼻内途径的金黄色葡萄球菌感染后, 观察动物的急性致死疾病, 表现出由任一单克隆抗体处理所提供的显著保护作用。

[0059] 图 12 抗 H1a 的单克隆抗体对实验动物提供针对 USA300/LAC 所致肺炎的保护。动物接受同种型对照抗体 (IgG2a 或 IgG2b) 或相应抗 H1a 单克隆抗体 (7B8.35 或 1A9.4F9) 的腹膜内给药。每种抗体以 5mg/kg 的剂量施用。经由鼻内途径的金黄色葡萄球菌菌株 USA300/LAC 感染后, 观察动物的急性致死疾病, 表现出由任一单克隆抗体处理所提供的显著保护作用。

[0060] 图 13 H1aH35L 截短产物的图示。全长 H1aH35L 和示于全长蛋白质下方的 7 个截短产物。

[0061] 图 14 抗 H1a 单克隆抗体与成熟毒素的单个 N 端区域结合。用单克隆抗体 7B8.35 和 1A9.4F9 进行的 H1aH35L 截短产物的点印迹分析证实, 为两种单克隆抗体所识别的表位位于所述蛋白质的前 50 个氨基酸之内。

具体实施方式

[0062] 鼠模型系统中金黄色葡萄球菌性肺炎的研究将 α -溶血素 (H1a) 确定为疾病致病

过程的关键毒力因子,因为缺少这一外毒素的突变菌株是无毒力的。Hla 是由金黄色葡萄球菌所分泌的细菌外毒素家族的成员,能够插入多种真核细胞的细胞膜。该蛋白质以单体的形式分泌,在真核细胞表面组装成七聚体环状结构。组装后的外毒素插入宿主细胞膜,形成通过破坏膜完整性而导致细胞损伤和死亡的孔洞。一些生物化学研究确定了 Hla 单体中促进与宿主细胞结合、七聚体形成和宿主细胞裂解的氨基酸残基。已知成熟毒素中 35 位的组氨酸残基是有效的七聚体形成和细胞裂解所需要的,但是对结合真核细胞靶标不是必要的。本发明人考虑到,能够中和 Hla 的疫苗接种策略应该提供针对金黄色葡萄球菌性肺炎的免疫保护。为此,本发明人制备了以将 35 位组氨酸转变为亮氨酸的 Hla 突变体或变体形式 (HlaH35L) 为代表的重组的减毒或毒力降低的 Hla,因而阻止了该外毒素的有效组装。

[0063] 用上述突变毒素免疫实验动物提供了针对金黄色葡萄球菌攻击后肺炎的保护作用。该保护作用表现为死亡率降低、从肺部回收的细菌更少以及将病理损伤局限在病灶区域中。相似地,使用以重组 HlaH35L 免疫的兔血清进行的被动免疫对小鼠提供针对金黄色葡萄球菌性肺炎的保护,证实了与主动免疫后所见相同的益处。

[0064] 本发明的实施方案涉及用于缓解或免除感染和 / 或预防或治疗葡萄球菌性肺炎的免疫原性蛋白质、多肽和肽 (例如 Hla 和 HlaH35L) 及其片段。抗原性蛋白质、多肽或肽包括但不限于来自葡萄球菌特别是金黄色葡萄球菌的 Hla 蛋白的全部或部分。这些菌株的非限制性实例包括属于 Lindsay 等 (2006) 鉴定的 10 个克隆类群 (CC1、CC5、CC8、CC12、CC15、CC22、CC25、CC30、CC45 和 CC51) 中之一的那些。更具体地,抗原性蛋白质、多肽或肽包括但不限于来自金黄色葡萄球菌 MRSA 菌株以及与医院和社区获得性感染相关的分化体 (clade) (包括但不限于金黄色葡萄球菌菌株 8325、Barnum、Berlin、Brazilian Iberian、COL、EMRSA-15、EMRSA-16、Hanover、LAC、N315、MRSA 252、MW2、Mu50、Pediatric NY、Japan 和归类于 CDC 分化体 USA 100、USA 200、USA 300、USA 500、USA 600 和 USA 800 中的金黄色葡萄球菌菌株) 的 Hla 蛋白的全部或部分。

[0065] I. 葡萄球菌 HLA

[0066] 葡萄球菌 α -溶血素 (Hla 或 α 毒素) 是细菌成孔 β -桶毒素家族的基本成员 (Bhakdi 和 Tranum-Jensen, 1991; Song 等, 1996)。它的结构基因 hla 位于所有被检测到分泌 293 个残基水溶性单体的金黄色葡萄球菌菌株的染色体上 (O' Reilly 等, 1990; O' Reilly 等, 1986)。Hla 被认为与敏感性宿主细胞的表面受体结合,从而促进其自身聚合成七聚体孔洞前体、并将具有 2nm 孔径的 β -桶结构插入质膜 (Gouaux 等, 1997)。Hla 孔洞形成于淋巴细胞、巨噬细胞、肺泡上皮细胞、肺内皮细胞和红细胞中,但是粒细胞和成纤维细胞看来对裂解有抗性 (Bhakdi 和 Tranum-Jensen, 1991; McElroy 等, 1999)。向兔或大鼠肺组织中滴注纯化的 Hla, 引发了血管渗漏和肺动脉高血压,其原因在于释放了几种信号分子,如磷脂酰肌醇、一氧化氮、前列腺素类 (PGE2、PGI2) 和血栓烷 A2 (McElroy 等, 1999; Seeger 等, 1984; Seeger 等, 1990; Rose 等, 2002; Suttorp 和 Habben, 1988)。与 Hla 的生物化学特性一致,消除金黄色葡萄球菌 Newman 中 Hla 表达的突变体严重减弱了在鼠肺炎模型中的毒力 (Bubeck-Wardenburg 等, 2007)。本文中本发明人以 Hla 作为靶标,用于开发针对金黄色葡萄球菌肺部感染之疫苗或免疫治疗的策略。

[0067] 本发明的某些方面包括涉及 Hla 蛋白之蛋白质组合物 (包含多肽、肽或编码它们的核酸) 的方法和组合物。可以通过缺失、插入和 / 或替换来修饰这些蛋白质。在具体实

施方案中,这些蛋白质的修饰能够在受试者中引发免疫应答。

[0068] Hla 多肽包含来自葡萄球菌属中细菌的 Hla 蛋白质的氨基酸序列。Hla 序列可以来自特定葡萄球菌物种如金黄色葡萄球菌,也可以来自特定菌株如 Newman。在某些实施方案中,Hla 序列可包含这样的序列,该序列具有金黄色葡萄球菌共有前体序列:

[0069] MKTRIVSSVTTTLLLSILMNPVANAADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMHKKVYFYSFI
DDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTYGF
NGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFM
KTRNGSMKAA (E/D)NFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNT
KDKW (I/T)DRSSERYKIDWEKEEMTN (以 SEQ ID NO :1 表示)

[0070] 和成熟金黄色葡萄球菌共有序列:

[0071] ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTDGLVTDKENGMHKKVYFYSFI DDKNHNKLLVIRTKGTIAGQY
RVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGA
NVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAA (E/
D)NFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKW (I/T)
DRSSERYKIDWEKEEMTN (以 SEQ ID NO :2 表示)

[0072] 在某些方面中,Hla 序列基本如 Genbank 登记号 AAA26498 (gi152953)、Mu50 (NP_371687.1) (gi15924153)、COL (YP_186036.1) (gi57650272)、N315 (NP_374279.1) (gi15926746)、JH9 (YP_001246598.1) (gi148267655)、JH1 (YP_001316387.1) (gi150393712)、USA300 (YP_493756.1) (gi87160380)、NCTC8325 (YP_499665.1) (gi88194865)、Newman (YP_001332107.1) (gi151221285)、MW2 (NP_645861.1) (gi21282773) 和 MSSA476 (YP_043222.1) (gi49486001) (在本申请的最早优先日期时通过引用并入本文) 所示,或者为其变体。

[0073] 在另一些实施方案中,可以使用其他 Hla 多肽,其序列可由本领域技术人员利用数据库和网络可访问资源来确定。

[0074] 本文所用的“蛋白质”或“多肽”是指含有至少十个氨基酸残基的分子。在一些实施方案中使用蛋白质或多肽的野生型形式,但是在本发明的许多实施方案中,使用修饰的蛋白质或多肽来产生免疫应答。上述术语可在本文中互换使用。“修饰的蛋白质”或“修饰的多肽”是指其化学结构特别是氨基酸序列与野生型蛋白质或多肽相比发生变化的蛋白质或多肽。在一些实施方案中,修饰的蛋白质或多肽具有至少一种改变的活性或功能(认为蛋白质或多肽可能具有多种活性或功能)。本发明特别涉及的是,可针对某一活性或功能来改变修饰的蛋白质或多肽,而在其他方面保留野生型活性或功能,如免疫原性。

[0075] 在某些实施方案中,蛋白质或多肽(野生型或修饰的)的大小可以包括但不限于 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、

950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500 个氨基分子或更多、以及其中可得出的任何范围,或其衍生物。本发明还涉及的是,可通过截短(使其短于相应的野生型形式)来突变多肽,也可通过融合或缀合具有特定功能(例如用于靶向或定位、用于增强免疫原性、用于纯化目的等等)的异源蛋白质序列来改变多肽。

[0076] 在此“氨基分子”是指本领域所知的任何氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物。在某些实施方案中,蛋白性分子的残基是连续的,没有任何非氨基分子中断氨基酸残基的序列。在另一些实施方案中,所述序列可包含一个或多个非氨基分子部分。在具体实施方案中,蛋白性分子的残基序列可以作为一个或多个非氨基分子部分所中断。

[0077] 因此,术语“蛋白性组合物”包括氨基分子序列,所述序列含有至少一种天然合成蛋白质中的 20 种常见氨基酸或者至少一种修饰的或非常见氨基酸。

[0078] 可采用本领域技术人员所知的任何技术来制造蛋白性组合物,所述技术包括 (i) 通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,(ii) 从天然或重组来源(例如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母等)中分离蛋白性化合物,或 (iii) 化学合成蛋白性材料。以前已经公开了多种基因的核苷酸及蛋白质、多肽和肽的序列,还可以在公认的计算机管理数据库中找到上述序列。其中一个数据库是国立生物技术信息中心的 Genbank 和 GenPept 数据库(万维网网址为 ncbi.nlm.nih.gov/)。可以用本文公开的或为本领域普通技术人员所知的技术来扩增和/或表达这些基因的编码区。

[0079] 考虑了 H1a 的氨基酸序列变体,所述变体可以为替换、插入、或缺失的变体。与野生型相比,对本发明多肽的修饰可影响多肽中 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293 个或更多个非连续的或连续的氨基酸。来源于任何葡萄球菌物种和菌株的 H1a 多肽均考虑用于本发明的方法中。

[0080] 变体通常缺少天然或野生型蛋白质中的一个或多个残基。可以缺失单个残基,或者可以缺失许多连续的氨基酸。可将终止密码子(通过替换或插入)引入编码的核酸序列中,以产生截短的蛋白质。插入突变通常包括在多肽非末端位点处加入材料。这可包括插入一个或多个残基。还可产生末端添加,称作融合蛋白。

[0081] 替换变体通常包含在蛋白质一个或多个位点处将一个氨基酸替换为另一个,并可被设计成调节多肽的一个或多个特性,同时丢失或不丢失其他功能或特性。替换可以是保守的,即将一个氨基酸替换成形状和电荷相似的氨基酸。保守性替换为本领域所熟知,包括如以下改变:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸变为谷氨酸;半胱氨酸变为丝氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸变为天冬氨酸;甘氨酸变为脯氨酸;组氨酸变为天冬酰胺或谷酰胺;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸;甲硫氨酸变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为酪氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸。或者,替换可以是非保守的,从而影响多肽的功能或活性。非保守性变化通常包括将残基替换成化学不相似的,如极性 or 带电氨基酸代替非极性或不带电氨基酸,反之亦然。

[0082] 本发明的蛋白质可以是重组的或体外合成的。或者,可以从细菌中分离非重组或重组的蛋白质。还考虑可将含有上述变体的细菌应用于本发明的组合物和方法中。因此,不需要分离蛋白质。

[0083] 术语“功能等价密码子”在本文中用于指代编码相同氨基酸的密码子(如精氨酸或丝氨酸的六个密码子),也指编码生物学上等价的氨基酸的密码子(见下面的表1)。

[0084] 表1 密码子表

[0085]

氨基酸			密码子
丙氨酸	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
半胱氨酸	Cys	C	UGC UGU
天冬氨酸	Asp	D	GAC GAU
谷氨酸	Glu	E	GAA GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUC UUU
甘氨酸	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His	H	CAC CAU
异亮氨酸	Ile	I	AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys	K	AAA AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
甲硫氨酸	Met	M	AUG
天冬酰胺	Asn	N	AAC AAU
脯氨酸	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG
精氨酸	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
缬氨酸	Val	V	GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAC UAU

[0086] 还应当理解的是,氨基酸和核酸序列可包含额外的残基,如分别为额外的N端或C端氨基酸、或5'或3'序列,但仍然基本如本文公开的序列所示,只要该序列满足上文设定的标准(包括保持与蛋白质表达相关的蛋白质生物活性)。末端序列的添加特别适用于核酸序列(例如可包含位于编码区5'或3'部分之侧翼的多种非编码序列)。

[0087] 下文是基于改变蛋白质的氨基酸来产生等价或改进的第二代分子的讨论。例如,

蛋白质结构中的某些氨基酸可以替换为其他氨基酸,而没有相互结合能力(同例如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点之结构结合)的可感知损失。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了蛋白质的生物学功能活性,因此可在氨基酸序列(及其背后的 DNA 编码序列)中进行某些氨基酸替换,而仍产生具有相似特性的蛋白质。因而,本发明人考虑可在基因或核酸的 DNA 序列中进行多种变化,而不导致其生物学应用和活性的可感知缺失。

[0088] 进行这种变化时,应考虑氨基酸的亲水性指数。氨基酸亲水性指数在赋予蛋白质以相互作用生物学功能中的重要性为本领域所广泛了解(Kyte 和 Doolittle,1982)。为人们所接受的是,氨基酸的相对亲水性决定了产物蛋白质的二级结构,其二级结构进而决定了该蛋白质与其它分子(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。

[0089] 还为本领域所了解的是,可以根据亲水性有效地进行相似氨基酸的替换。通过引用并入本文的美国专利 4,554,101 陈述了蛋白质的最大局部平均亲水性(由其邻近氨基酸亲水性决定)与蛋白质的生物学特性相关。应理解的是,氨基酸可以被替换为具有相似亲水值的其他氨基酸,而仍产生生物学等价或免疫学等价的蛋白质。

[0090] 如上所述,氨基酸替换一般是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。将多种前述性质考虑在内的示例性替换是众所周知的,包括:精氨酸和赖氨酸,谷酰胺和天冬酰胺,丝氨酸和苏氨酸,谷氨酸和天冬氨酸,以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0091] 本发明涉及的是,在每 ml 本发明组合物中有约 0.001mg 到约 10mg 的总蛋白质。因此,组合物中的蛋白质浓度可以是约、至少约或至多约 0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 μ g/ml、mg/ml 或者更多(或其中可得出的任何范围)。在这当中,约、至少约或至多约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%可为 H1a 蛋白。

[0092] 本发明涉及施用 H1a 多肽或肽来改变针对与葡萄球菌病原菌感染相关的疾病或病症(在特定方面为肺炎)发展之预防性疗法。本发明还涉及施用针对 H1a 多肽或肽而产生的抗体,用来预防或治疗与葡萄球菌病原菌感染相关的疾病或病症(在特定方面为肺炎)。

[0093] 此外,通过引用并入本文的美国专利 4,554,101(Hopp)教导根据亲水性从一级氨基酸序列中鉴定和制备表位。通过在 Hopp 中公开的方法,本领域技术人员将能够鉴定来自氨基酸序列中的可能表位,并确认它们的免疫原性。大量科学文献也致力于从氨基酸序列分析中预测二级结构和鉴定表位(Chou 和 Fasman,1974a,b,1978a,b,1979)。如果需要,可以使用这些当中的任一个来补充美国专利 4,554,101 中 Hopp 的教导。

[0094] 本发明描述了用于本发明多个实施方案的多肽、肽和蛋白质。例如,对特定多肽测定了其引发免疫应答的能力。在具体实施方案中,也可根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成本发明蛋白质的全部或一部分。多种自动合成仪是可买到的,且可以根据已知的方案加以使用。参见例如 Stewart 和 Young(1984)、Tam 等(1983)、Merrifield(1986)、

Barany 和 Merrifield(1979),均通过引用并入本文。或者,可使用重组 DNA 技术,其中将编码本发明肽的核苷酸序列插入表达载体,转化或转染入合适的宿主细胞并在适于表达的条件下培养细胞。

[0095] 本发明的一个实施方案包括利用转移至细胞(包括微生物)中的基因来产生和/或呈递蛋白质。可将目的蛋白质的基因转移到合适的宿主细胞中,接着在合适条件下培养细胞。基本上编码任何本文所述多肽的核酸均可使用。本文讨论了重组表达载体的产生及其包含的元件。或者,要生产的蛋白质可以是由用于蛋白质生产的细胞所正常合成的内源蛋白质。

[0096] 本发明的另一实施方案使用了自体 B 淋巴细胞细胞系,所述细胞系转染有表达免疫原产物(更具体地为具有免疫原活性的蛋白质)的病毒载体。哺乳动物宿主细胞系的其他实例包括但不限于 Vero 和 HeLa 细胞、其他 B 和 T 细胞系(如 CEM、721. 221、H9、Jurkat、Raji)、以及中国仓鼠卵巢、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、3T3、RIN 和 MDCK 细胞的细胞系。此外,可选择调节插入序列表达的或以需要方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这种修饰(例如糖基化)和加工(例如剪切)可能对蛋白质的功能是重要的。不同宿主细胞对蛋白质的翻译后加工和修饰具有特征性的和特定的机制。可选择合适的细胞系或宿主系统来保证所表达外源蛋白质的正确修饰和加工。

[0097] 可使用多种选择系统,包括但不限于分别位于 tk、hgprt 或 aprt 细胞中的 HSV 胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶、腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因。此外,还可使用抗代谢物抗性作为选择基础:dhfr,赋予对甲氧苄氨嘧啶和氨甲蝶呤的抗性;gpt,赋予对霉酚酸的抗性;neo,赋予对氨基糖苷 G418 的抗性;hygro,赋予对潮霉素的抗性。

[0098] 可以两种方式在体外繁殖动物细胞:在整个培养物体积中悬浮生长的非锚着依赖性细胞,或者需要附着在固体基底上进行生长的锚着依赖性细胞(即单层类型的细胞生长)。

[0099] 来源于连续的已建立细胞系的非锚着依赖性或非锚着依赖性悬浮培养物是大规模生产细胞和细胞产物的最常用方法。但是,悬浮培养的细胞具有局限性,例如致癌潜力和低于附着细胞的蛋白质产量。

[0100] A. 宿主细胞

[0101] 本文所用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语还包括其任何或所有后续世代的后代。应当了解的是,由于故意的或偶然的突变,所有后代未必相同。在表达异源核酸序列的语境中,“宿主细胞”是指原核或真核细胞,它包括任何能够复制载体或表达由载体编码之异源基因的可转化生物。宿主细胞可以(并已经)用作载体或病毒的接受者。宿主细胞可以被“转染”或“转化”,这是指将外源核酸(如重组蛋白编码序列)转到或引入宿主细胞的过程。转化细胞包括原代受体细胞及其后代。

[0102] 宿主细胞可来源于原核生物或真核生物,包括用于复制载体或表达部分或全部核酸序列的细菌、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳细胞。许多细胞系和培养物可用作宿主细胞,它们可以通过美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)获得,ATCC 是作为活培养物和遗传材料的存档中心的组织(www.atcc.org)。本领域的技术人员可根据载体骨架和期望的结果来确定合适的宿主。例如,可将质粒或粘粒引入原核宿主细胞,以复制许多载体或表达编码的蛋白质。用作宿主细胞(用于载体复制和/或表达)的

细菌细胞包括葡萄球菌菌株、DH5 α 、JM109 和 KC8, 以及许多可买到的细菌宿主如 **SURE®** 感受态细胞和 SOLOPACK™Gold 细胞 (**STRATAGENE®**, La Jolla, CA)。或者, 细菌细胞如大肠杆菌 LE392 可以用作噬菌体病毒的宿主细胞。合适的酵母细胞包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。

[0103] 用于载体或多肽复制和 / 或表达的真核宿主细胞的实例包括 HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos 和 PC12。来自多种细胞类型和生物的许多宿主细胞是可用的, 且为本领域技术人员所知。类似地, 病毒载体可与真核或者原核宿主细胞 (特别是允许复制或表达该载体的细胞) 结合使用。

[0104] 一些载体可使用控制序列, 所述控制序列能使所述载体同时在原核和真核细胞中复制和 / 或表达。本领域技术人员还会了解培养所有上述宿主细胞以维持它们并允许载体复制的条件。能够大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸及其相应多肽、蛋白质或肽的技术和条件也是已了解和已知的。

[0105] B. 表达系统

[0106] 已有许多表达系统包含至少部分的或全部上述组合物。可将基于原核和 / 或真核的系统与本发明一起使用, 以产生核酸序列或其相应多肽、蛋白质和肽。许多这样的系统是商品化并易于获得的。

[0107] 昆虫细胞 / 杆状病毒系统可产生异源核酸片段的高水平蛋白表达, 如通过引用并入本文的美国专利 5, 871, 986 和 4, 879, 236 中所描述, 可以购买这些系统, 例如, 来自 **INVITROGEN®** 的名为 **MAXBAC®** 2.0 和来自 **CLONTECH®** 的名为 BACPACK™杆状病毒表达系统。

[0108] 除了本发明公开的表达系统, 表达系统的其他实例包括 **STRATAGENE®** 的 COMPLETE CONTROL™诱导型哺乳动物表达系统 (该系统含有合成的蜕皮激素诱导型受体), 或其 pET 表达系统 (一种大肠杆菌表达系统)。诱导型表达系统的另一实例是可购自 **INVITROGEN®** 的使用全长 CMV 启动子的诱导型哺乳动物表达系统, 其带有 T-REX™ (四环素调节的表达) 系统。**INVITROGEN®** 还提供了称作毕赤酵母表达系统 (*Pichia methanolica* Expression System) 的酵母表达系统, 该系统被设计用于在甲醇营养酵母毕赤酵母 *Pichia methanolica* 中高水平产生重组蛋白。本领域技术人员会理解如何表达载体 (如表达构建体) 来产生核酸序列或其相应多肽、蛋白质或肽。

[0109] II. 核酸

[0110] 本发明涉及编码本发明蛋白质、多肽、肽的重组多核苷酸。包括野生型 H1a 或其任何其他多肽变体的核酸序列, 所有序列都通过引用并入本文。

[0111] 在本申请中, 术语“多核苷酸”是指重组的或者分离成不含基因组总核酸的核酸分子。包含在术语“多核苷酸”中的有寡核苷酸 (长度为 100 个或更少残基的核酸)、重组载体 (包括例如质粒、粘粒、噬菌体、病毒等)。在某些方面中, 多核苷酸包括从其天然基因或蛋白质编码序列中基本分离出来的调节序列。多核苷酸可以是 RNA、DNA、它们的类似物或它们的组合。

[0112] 在这方面, 术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用于指编码蛋白质、多肽或肽的核酸

(包括正确转录、翻译后修饰或定位所需的任何序列)。应为本领域技术人员所理解的是,这一术语包含表达或适于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白或突变体的基因组序列、表达盒、cDNA 序列和小的工程化核酸片段。编码全部或部分多肽的核酸可含有编码该多肽全部或一部分的连续核酸序列,所述核酸序列长度如下:10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000 个或多个核苷酸、核苷或碱基对。还涉及的是,来自给定物种的特定多肽可以由含有天然变异的核酸所编码,所述核酸具有略微不同的核酸序列但是仍编码相同或基本相似的蛋白质(见上文表 1)。

[0113] 在具体实施方案中,本发明涉及整合了编码 H1a 或其任何突变体或片段之核酸序列的分离核酸片段和重组载体。因此,含有核酸片段的分离核酸片段或载体可编码例如具有免疫原性的 H1a 或 H1a(H35L) 蛋白。可将术语“重组”与多肽或特定多肽的名称连起来使用,这一般是指由体外操作的核酸分子或该分子的复制产物所产生的多肽。

[0114] 在另一些实施方案中,本发明涉及整合了编码 H1a 或 H1a 变体多肽或肽之核酸序列的分离核酸片段和重组载体,所述多肽或肽可用于在受试者中产生免疫应答。在多个实施方案中,本发明的核酸可用于基因疫苗中。

[0115] 不论编码序列本身多长,本发明中所用的核酸片段均可与其他核酸序列(如启动子、多腺苷酸化信号、额外的限制性酶切位点、多克隆位点、其他编码片段等)组合,使得它们的总长度可能变化非常大。因此,本发明还涉及的是,可以使用几乎任何长度的核酸片段,其总长度优选受限于预期使用的重组核酸方法中制备和使用的便利程度。在一些情况下,核酸序列可编码具有额外异源编码序列的多肽序列,例如允许进行多肽纯化、运输、分泌、翻译后修饰,或用于治疗益处,如靶向或效力。如上文所讨论的,可将标签或其他异源多肽加到经修饰的多肽编码序列上,其中“异源”是指与所修饰多肽不相同的多肽。

[0116] 本发明中所用的核酸编码 H1a 或任何 H1a 变体或片段。该序列可以是密码子冗余和功能等价的结果,密码子冗余和功能等价已知在核酸序列及其编码蛋白质中天然存在。或者,可通过应用重组 DNA 技术制造功能等价的蛋白质或肽,其中可基于所改变氨基酸性质的考虑来设计蛋白质结构的改变。可通过应用定点突变技术引入人为设计的改变,例如引入蛋白质抗原性的改进。

[0117] 在另一些实施方案中,本发明涉及分离的核酸片段和重组载体,在其序列中包含来自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或上述通过引用并入的其他氨基酸序列的相应核酸序列。

[0118] 用于递送核酸以实现本发明组合物表达的合适方法被认为包括几乎任何可将核酸(例如 DNA,包括病毒和非病毒载体)引入细胞、组织或生物体的方法,如本文所述或为本领域普通技术人员所知。这些方法包括但不限于直接递送 DNA 如通过注射(美国专利 5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、

5, 589, 466 和 5, 580, 859, 均通过引用并入本文), 包括显微注射 (Harland 和 Weintraub, 1985 ;通过引用并入本文的美国专利 5, 789, 215) ;通过电穿孔 (通过引用并入本文的美国专利 5, 384, 253) ;通过磷酸钙沉淀 (Graham 和 Van Der Eb, 1973 ;Chen 和 Okayama, 1987 ;Rippe 等, 1990) ;通过使用 DEAE 葡聚糖之后用聚乙二醇 (Gopal, 1985) ;通过直接超声载荷 (Fechheimer 等, 1987) ;通过脂质体介导转染 (Nicolau 和 Sene, 1982 ;Fraley 等, 1979 ;Nicolau 等, 1987 ;Wong 等, 1980 ;Kaneda 等, 1989 ;Kato 等, 1991) ;通过微射弹轰击 (PCT 申请号 W094/09699 和 95/06128 ;美国专利 5, 610, 042、5, 322, 783、5, 563, 055、5, 550, 318、5, 538, 877 和 5, 538, 880, 均通过引用并入本文) ;通过碳化硅纤维搅拌 (Kaeppler 等, 1990 ;美国专利 5, 302, 523 和 5, 464, 765, 均通过引用并入本文) ;通过农杆菌介导转化 (美国专利 5, 591, 616 和 5, 563, 055, 均通过引用并入本文) ;通过 PEG 介导的原生质体转化 (Omirulleh 等, 1993 ;美国专利 4, 684, 611 和 4, 952, 500, 均通过引用并入本文) ;或通过干燥 / 抑制介导的 DNA 吸入 (Potrykus 等, 1985)。通过应用诸如此类的技术, 可以稳定或暂时转化器官、细胞、组织或生物体。

[0119] III. 免疫应答和治疗

[0120] 如上文所讨论的, 本发明涉及引发受试者中针对 H1a 或其变体或片段之免疫应答。在一个实施方案中, 所述免疫应答可保护或治疗患有、疑似患有或有风险发生感染或相关疾病 (特别是那些与葡萄球菌性肺炎相关的) 的受试者。

[0121] A. 保护性免疫

[0122] 在本发明的一些实施方案中, 蛋白性组合物赋予受试者保护性免疫。保护性免疫是指身体发动保护受试者免于发生特定疾病或病症的特异性免疫应答的能力, 所述疾病或病症与免疫应答所针对的物质相关。免疫原性有效量能够赋予受试者保护性免疫。

[0123] 如本文的说明书和后续的权利要求书部分中所用的, 术语“多肽”是指通过肽键或其类似物共价相连的一段氨基酸。根据本发明, 不同多肽具有不同的功能。根据一个方面, 多肽来源于设计成在受者中诱导主动免疫应答的免疫原; 而根据本发明的另一方面, 多肽来源于在例如动物中引发主动免疫应答后产生的抗体, 所述抗体能在受者中诱导被动免疫应答。但在两种情况下都可根据任何可能密码子使用的多核苷酸编码所述多肽。

[0124] 本文所用的术语“免疫应答”或其等价的“免疫学应答”是指在受试患者中发生直接针对本发明蛋白质、肽或多肽的体液应答 (抗体介导的)、细胞应答 (由抗原特异性 T 细胞或其分泌产物介导) 或者体液及细胞的应答。这种应答可以通过施用免疫原诱导的主动应答, 或通过施用抗体、含抗体的材料或已触发 T 细胞而诱导的被动应答。呈递与 I 类或 II 类 MHC 分子结合的多肽表位引发细胞免疫应答, 以活化抗原特异性 CD4 (+) T 辅助细胞和 / 或 CD8 (+) 细胞毒 T 细胞。所述应答还可包括活化单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞、嗜碱性粒细胞、树突细胞、星形胶质细胞、小神经胶质细胞、嗜酸性粒细胞或先天免疫的其他组分。

[0125] 本文所用的“主动免疫”是指通过施用抗原而赋予受试者的任何免疫。

[0126] 本文所用的“被动免疫”是指不向受试者施用抗原而赋予受试者的任何免疫。因此, “被动免疫”包括但不局限于施用已活化的免疫效应因子, 包括免疫应答的细胞介质或蛋白质介质 (例如单克隆和 / 或多克隆抗体)。可在被动免疫中使用单克隆或多克隆抗体组合物, 来预防或治疗由带有该抗体所识别抗原之生物体所引发的感染。抗体组合物可包含结合多种抗原的抗体, 所述抗原又可与多种生物相关。抗体组合物可以是多克隆抗血清。

在某些方面中,抗体是从经抗原攻击的动物或第二受试者中亲和纯化的。或者,可使用抗体混合物,其为针对在相同、相关或不同微生物或生物体(如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌,包括但不限于葡萄球菌)中所存在抗原的单克隆和/或多克隆抗体的混合物。

[0127] 可通过对患者施用得自己知有免疫反应性之供体或其他非患者来源的免疫球蛋白(Ig)和/或其他免疫因子,向患者或受试者传递被动免疫。在另一些方面中,本发明的抗原性组合物可施用于受试者,之后所述受试者可作为应答于该组合物攻击而产生的球蛋白(“超免疫球蛋白”)的来源或供体,其包括针对 H1a 或其任何变体或片段的抗体。经此处理的受试者可捐献血浆,其后通过常规血浆分级法从所述血浆中可获得超免疫球蛋白,并将其施用于其他受试者,以传递对葡萄球菌感染的抗性 or 治疗葡萄球菌感染。本发明的超免疫球蛋白对免疫力受损的个体、正经受侵入性治疗或时间不允许其产生应答于疫苗的自身抗体的个体特别有用。与被动免疫相关的示例性方法和组合物参见美国专利 6,936,258、6,770,278、6,756,361、5,548,066、5,512,282、4,338,298 和 4,748,018,均通过引用以其整体并入本文。

[0128] 对本说明书及所附权利要求书而言,术语“表位”和“抗原决定簇”可互换使用,是指抗原上被 B 细胞和/或 T 细胞应答或识别的位点。B 细胞表位可由连续氨基酸形成,或由通过蛋白质三级折叠而接近的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后可被保留,而通过三级折叠形成的表位用变性溶剂处理时一般会丢失。表位通常包括至少 3 个、更通常为至少 5 或 8-10 个处于独特空间构象的氨基酸。测定表位空间构象的方法包括例如 X 射线晶体学和 2 维核磁共振。参见例如 Epitope Mapping Protocols, 1996。识别相同表位的抗体可用简单的免疫测定加以鉴定,所述测定能够显示一种抗体阻碍另一种抗体结合目标抗原的能力。T 细胞识别含连续表位,对 CD8 细胞而言约为 9 个氨基酸,对 CD4 细胞而言约为 13-15 个氨基酸。识别表位的 T 细胞可通过测量抗原依赖性增殖的体外测定加以鉴定,这通过由应答表位的已触发 T 细胞中的 ³H- 胸苷掺入 (Burke 等 1994)、通过抗原依赖性杀伤(细胞毒 T 淋巴细胞测定, Tigges 等 1996) 或通过细胞因子分泌来测定。

[0129] 可通过增殖测定(CD4(+)T 细胞)或 CTL(细胞毒 T 淋巴细胞)测定来鉴定细胞介导的免疫应答。可通过从被免疫的同基因动物中分别分离 IgG 和 T 细胞并在另一受试者中测量预防或治疗效果,从而区分体液和细胞应答对免疫原的预防或治疗效果的相对贡献。

[0130] 本文和权利要求中所用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”可互换使用,是指几类结构相关的蛋白质中的任一种,所述蛋白质作为动物或受试者的免疫应答的一部分来发挥作用,所述蛋白包括 IgG、IgD、IgE、IgA、IgM 和相关蛋白。

[0131] 本发明还涉及“人源化”抗体,如带有人的恒定区和/或可变区结构域的来自小鼠、大鼠、兔或其他物种的嵌合抗体、双特异性抗体、重组和工程化抗体及其片段。“人源化”技术通常包括使用重组 DNA 技术来操作编码抗体分子多肽链的 DNA 序列。使单克隆抗体(MAb)人源化的早期方法包括产生嵌合抗体,在该方法中将含有某一抗体完整可变结构域的抗原结合位点连接到来自另一抗体的恒定结构域上。进行这种嵌合过程的方法描述于 EP0120694(Celltech Limited)、EP0125023(Genentech Inc. 和 City of Hope)、EP-A-0 171496(Rev. Dev. Corp. Japan)、EP-A-0 173 494(Stanford University) 和 WO 86/01533(Celltech Limited) 中,每篇文献都通过引用整体并入本文。这些申请一般公开

了制备具有小鼠 MA b 可变结构域和人免疫球蛋白恒定结构域的抗体分子的方法。

[0132] 替代方法描述于 EP-A-0239400 (Winter), 其中通过使用长寡核苷酸的定点突变, 将小鼠 MA b 的互补性决定区 (CDR) 嫁接到人免疫球蛋白可变结构域的构架区上。这种方法的实例参见美国专利 7, 262, 050, 所述专利通过引用整体并入本文。

[0133] 还可从转基因动物中得到人源化抗体。例如, 文献 (参见例如 Jakobovits 等, 1993 ; Jakobovits 等, 1993 ; Bruggermann 等, 1993, 至少对其人类抗体制备的通过引用并入本文) 中已描述了能应答于免疫而产生完整的人类抗体库的转基因突变小鼠。特别地, 在这些嵌合的种系突变小鼠中抗体重链连接区 (J(H)) 基因的纯合缺失导致对内源抗体产生的完全抑制, 而且向该种系突变小鼠中成功转入人类种系抗体基因阵列导致在抗原攻击时产生人类抗体。

[0134] 在正常生理条件下, 抗体可见于血浆和其他体液中以及某些细胞的膜上, 通常由称为 B 细胞的淋巴细胞类型或其功能等价物产生。IgG 类抗体由通过二硫键相连的 4 条多肽链组成。完整 IgG 分子的 4 条链是被称为 H 链的两条相同的重链和被称为 L 链的两条相同的轻链。

[0135] 为了产生多克隆抗体, 用抗原或抗原片段 (一般和佐剂一起, 如有必要则结合载体) 免疫宿主如兔或山羊。其后从宿主的血清中收集针对抗原的抗体。可针对抗原亲和纯化多克隆抗体, 使其具有单一特异性。

[0136] 为了产生单克隆抗体, 用抗原对合适的供体 (一般为小鼠) 进行超免疫。然后分离产生抗体的脾细胞。将这些细胞与有永生特性的细胞 (如骨髓瘤细胞) 融合, 产生能够被持续培养且分泌所需单克隆抗体的融合细胞杂交物 (杂交瘤)。其后大量培养上述细胞, 并且从细胞培养物中收获单克隆抗体以供使用。按照定义, 单克隆抗体对单个表位具有特异性。由于这种原因, 针对相似抗原, 单克隆抗体通常具有比多克隆抗体更低的亲和常数。

[0137] 也可通过使用脾细胞或来自脾的细胞系的原代培养物来体外产生 单克隆抗体 (Anavi, 1998)。为了产生重组抗体 (一般参见 Huston 等, 1991 ; Johnson 等, 1991 ; Mernaugh 等, 1995), 将来自生产抗体的动物 B 淋巴细胞或杂交瘤细胞的信使 RNA 反转录以获得互补 DNA (cDNA)。扩增抗体 cDNA (可为全长的或部分长度的), 并克隆到噬菌体或质粒上。cDNA 可以是分开的或通过接头连接的部分长度的重链和轻链 cDNA。使用合适的表达系统表达抗体、抗体片段或者抗体的免疫性部分或片段, 以获得重组抗体。还可通过筛选合适的表达文库来获得抗体 cDNA。

[0138] 如上文所讨论, 本发明方法中所用的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体或它们的片段。但是, 就某些治疗目的而言, 将所述抗体人源化, 从而使它们不会引起针对所施用抗体的显著免疫应答。还可根据本发明使用这种人源化抗体, 产生这些抗体的方法为本领域技术人员所熟知 (Jones 等, 1986 ; Riechmann 等, 1988 ; Verhoeyen 等, 1988)。

[0139] 如本领域所熟知的, 抗体可与固体支持基质结合, 或者与可检测部分缀合, 或者结合并缀合。对缀合荧光或酶部分的总体讨论参见 Johnstone 等 (1982)。抗体与固体支持底物的结合也为本领域所熟知 (Harlow 等, 1988 ; Borrebaeck, 1992)。

[0140] 本文和权利要求中所用的短语“抗体的免疫性部分”包括抗体 Fab 片段、抗体 Fv 片段、抗体重链、抗体轻链、抗体重链与轻链的未关联的混合物、抗体重链和轻链组成的异二聚体、抗体重链的催化结构域、抗体轻链的催化结构域、抗体轻链的可变片段、抗体重链的

可变片段和抗体的单链变体（也称作 scFv）。此外，该术语包括嵌合免疫球蛋白，它是来源于不同物种的融合基因的表达产物，所述物种之一可以是人，在这种情况下称嵌合免疫球蛋白为人源化的。

[0141] 任选地，抗体（或优选抗体的免疫性部分）可以与其他蛋白质化学缀合，或表达为融合蛋白。就本说明书和所附权利要求书而言，所有这些融合蛋白质都包含在抗体或抗体免疫性部分的定义中。

[0142] 本文所用的术语“免疫原性物质”或“免疫原”或“抗原”可互换使用，用于描述在单独、与佐剂结合、或在展示载体上呈递后施用于受试者时能够诱导针对其自身的免疫应答的分子。

[0143] 单链抗体（SCA）一般为遗传工程化的蛋白质，其设计用于扩展采用单克隆抗体的可能的治疗和诊断应用。SCA 具有单克隆抗体的结合特异性和亲和力，在天然状态下约为单克隆抗体大小的五分之一到六分之一，一般导致其半衰期很短。与大多数单克隆抗体相比，SCA 提供了一些益处，包括它们能直接与可用于检测的多肽（例如荧光素酶或荧光蛋白）融合。除了这些益处之外，可直接从人 SCA 文库中直接分离全人 SCA，而不需要昂贵又费时的“人源化”过程。

[0144] 单链重组抗体（scFv）由通过设计的柔性肽链连接的抗体 VL 和 VH 结构域组成（Atwell 等，1999）。与完整 IgG 相比，在有相当的抗原结合亲和力时，scFv 具有体积更小和结构简单的优点，而且它们可以比类似的双链 Fab 片段更为稳定（Colcher 等，1998；Adams 和 Schier，1999）。

[0145] 来自重链和轻链（VH 和 VL）的可变区的长度均为约 110 个氨基酸。它们可以通过 15 个氨基酸的接头或更长的序列（例如，具有足够柔性而使两个结构域组装成有功能的抗原结合口袋的序列）连接。在具体实施方案中，加入不同的信号序列能使 scFv 被靶向到细胞内部的不同细胞器或者被分泌。加入轻链恒定区（Ck）允许经由二硫键发生二聚化，获得提高的稳定性和亲和力。因此，对单链 Fv（scFv）SCA 而言，尽管 Fv 片段的两个结构域由独立的基因编码，但已经证实可通过重组方法制造能使他们成为单一蛋白链 scFv 的人工接头（Bird 等，1988；Huston 等，1988）。此外，它们由于容易从噬菌体展示文库中分离且能够识别保守的抗原而经常被使用（综述参见 Adams 和 Schier，1999）。因此，在本发明的一些方面中，抗体可为从噬菌体展示文库中分离的 SCA，而不是如上所述的更为传统的生产技术所产生的。

[0146] B. 治疗和预防方法

[0147] 本发明的方法包括治疗由葡萄球菌病原体引起的疾病或病症，以及预防或减轻感染，以使病原体的感染程度被组织或尽可能小。可在被葡萄球菌感染的、疑似接触葡萄球菌的或有接触葡萄球菌风险的人中给予本发明的免疫原性多肽，以诱导免疫应答。此外，可施用对本发明免疫原性多肽或肽有特异性的抗体，以对被葡萄球菌感染的、疑似接触葡萄球菌的或有接触葡萄球菌风险的人进行被动免疫。可对葡萄球菌感染 检测为阳性的或由于可能接触而被认为具有感染风险的个体使用方法。

[0148] 本发明涉及的是，可在患者被诊断为患有葡萄球菌性疾病或病症、被诊断为患有葡萄球菌感染、被鉴定为有葡萄球菌感染或葡萄球菌性疾病或病症的症状、处于葡萄球菌感染的风险中、处于葡萄球菌性疾病或病症的风险中、或处于重症特别护理和 / 或住院后

约 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 分钟、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时、1、2、3、4、5、6、7 天、1、2、3、4、5 周和 / 或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个月之内施用本发明组合物。

[0149] 可施用组合物 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多次, 和 / 或每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时、或 1、2、3、4、5、6、7 天、或 1、2、3、4、5 周、或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个月或其中的任何范围或组合来施用所述组合物。

[0150] 在一些实施方案中, 在存在佐剂或载体而不存在或基本不存在其他葡萄球菌抗原和 / 或蛋白质的条件下实施治疗。此外, 在一些实例中, 治疗包括施用针对细菌感染所常用的其他制剂, 如一种或更多抗生素。

[0151] 使用肽进行疫苗接种一般需要将肽缀合至免疫原性载体蛋白, 如乙肝表面抗原、匙孔瓣血蓝蛋白或牛血清白蛋白。进行这种缀合的方法为本领域所熟知。

[0152] IV. 疫苗和药物组合物

[0153] A. 疫苗

[0154] 本发明包括预防或减轻葡萄球菌感染的方法。本发明的实施方案包括预防或减轻葡萄球菌性肺炎。这样, 本发明涉及在主动和被动免疫的实施方案中使用的疫苗。被认为适合用作疫苗的免疫原性组合物可非常容易地直接从以本文公开的方法制备的 H1a 肽或蛋白质中制备。优选地, 将抗原性材料充分透析, 以去除不需要的小分子量分子, 和 / 或冻干以更容易配制成想要的剂型。本发明包括组合物, 所述组合物可用于诱导针对来源于 H1a 肽或蛋白质之多肽或肽的免疫应答, 从而预防葡萄球菌引发的感染及其引起的病症或疾病的发生。在某些方面中, 将组合物配制成施用于粘膜表面的剂型, 例如气雾剂剂型。

[0155] 或者, 对基于蛋白质 / 肽的疫苗而言其他可行且重要的选项包括引入编码抗原的核酸作为 DNA 疫苗。就这一点而言, 近期的报导描述了构建重组痘苗病毒, 并成功使用这些构建体免疫小鼠, 以引发保护性免疫应答, 所述重组痘苗病毒表达 10 个连续最小 CTL 表位 (Thomson, 1996) 或者来自几种微生物的 B 细胞、CTL 和 TH 表位的组合 (An, 1997)。因此, 对成功利用肽、肽脉冲刺激 APC 和肽编码构建体在体内有效引发保护性免疫在文献中有充分的证据。美国专利 5, 958, 895 和 5, 620, 896 中示范了使用核酸序列作为疫苗。

[0156] 包含多肽或肽序列作为活性成分的疫苗的制备一般为本领域所充分理解, 如美国专利 4, 608, 251、4, 601, 903、4, 599, 231、4, 599, 230、4, 596, 792 和 4, 578, 770 所示例, 所述专利都通过引用并入本文。这种疫苗通常以注射剂如液体溶液或悬浮液的形式制备; 还可制备适于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。制剂也可以是乳化的。活性免疫原性成分通常与可药用并与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂例如水、盐溶液、葡聚糖、甘油、乙醇等, 以及它们的组合。此外, 如有需要, 疫苗可含有一定量的辅助物质, 如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂或者增强疫苗效力的佐剂。在具体实施方案中, 用多种物质的组合来配制疫苗, 如通过引用并入本文的美国专利 6, 793, 923 和 6, 733, 754 中所描述。

[0157] 疫苗可常规地肠胃外、经粘膜、经鼻、通过吸入和 / 或注射 (例如皮下注射或肌肉注射) 施用。适用于其他施用方式的附加制剂包括栓剂, 在某些情况下为口服制剂。对于栓剂, 传统粘合剂和载体可包括例如聚亚烷基二醇 (polyalkylene glycol) 或甘油三脂; 这些栓剂可由含有活性成分 (范围约为 0.5% 到约 10%, 优选约 1% 到约 2%) 的混合物形

成。口服制剂包含常用的赋形剂,例如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物表现为溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放剂或散剂的形式,包含约 10%到约 95%的活性成分,优选约 25%到约 70%。

[0158] 多肽和编码多肽的 DNA 构建体可以中性或盐形式配制成疫苗。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由肽的游离氨基形成)和与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、杏仁酸等)形成的盐。由游离羧基形成的盐也可来自无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(例如异丙胺、三甲胺、2-乙胺基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0159] 疫苗一般以与药剂剂型相匹配的方式、以能够有效治疗和产生免疫的用量来施用。施用量取决于受治疗的对象,包括个体免疫系统合成抗体的能力和所需要的保护程度。要施用的活性成分的精确剂量取决于医生的判断。但是,合适的剂量范围为每份疫苗中几百微克活性成分的级别。首次施用和加强注射的合适方案也是可变的,但一般为首次施用之后再后续接种或其他施用。

[0160] 应用的方式可以是多种多样的。任何的常规疫苗施用方法都是可应用的。这些方法应包括通过生理学可接受的固体基质口服应用,或者作为生理学可接受的分散剂以肠胃外、经粘膜、经鼻、通过吸入、通过注射等施用。疫苗的剂量取决于给药途径,且根据受试者的体形和健康状况而变化。

[0161] 在许多实例中,期望多次施用疫苗,通常不超过六次疫苗接种,更通常不超过四次疫苗接种,优选一次或多次,通常至少大概三次疫苗接种。疫苗接种一般间隔 2 到 12 周,更通常为间隔 3 到 5 周。间隔 1-5 年(通常为 3 年)的定期加强注射可满足保持保护性抗体水平的要求。在免疫接种过程之后,如例如美国专利 3,791,932、4,174,384 和 3,949,064(通过引用并入本文)所述测定针对该抗原的抗体。

[0162] 1. 载体

[0163] 给定组合物其免疫原性可能不同。因此通常必需增强宿主的免疫系统,这可通过将肽或多肽偶联到载体上来实现。示例性及优选的载体为匙孔瓣血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可用作载体。将多肽缀合到载体蛋白的方法为本领域所熟知,包括戊二醛、间马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和双重氮联苯胺。

[0164] 2. 佐剂

[0165] 可通过使用免疫应答的非特异性刺激剂(称为佐剂)来增强多肽或肽组合物的免疫原性。合适的佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物,如细胞因子、毒素或合成组合物。

[0166] 可使用许多佐剂来增强抗体针对 H1a 肽或蛋白的应答。佐剂可(1)滞留体内的抗原而引起其缓慢释放;(2)把涉及免疫应答的细胞吸引到施用部位;(3)诱导免疫系统细胞的增殖或活化;或(4)促进抗原在受试者整个身体的传播。

[0167] 佐剂包括但不局限于水包油乳剂、油包水乳剂、矿物盐、多核苷酸和天然物质。可使用的具体佐剂包括 IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -干扰素、GMCSF、BCG、氢氧化铝或其他铝化合物、MDP 化合物(如 thur-MDP 和 nor-MDP)、CGP(MTP-PE)、脂质 A 和单磷酰脂质 A(MPL)。其他可使用的佐剂包括 RIBI,它包含在 2%角鲨烯/吐温 80 乳剂中的三种从细菌中提取的组分,MPL、海藻糖二分枝酸酯(trehalose dimycolate,TDM)和细胞壁骨架(cell

wall skeleton, CWS)。还可使用 MHC 抗原。其他佐剂或方法示例于美国专利 6,814,971、5,084,269、6,656,462,均通过引用并入本文。

[0168] 对疫苗实现佐剂效应的多种方法包括使用制剂如氢氧化铝或磷酸铝(明矾),通常以磷酸盐缓冲液约 0.05%到约 0.1%的溶液使用,与以约 0.25%溶解的人造多聚糖(**Carbopol®**)混合,分别通过以约 70°C到约 101°C的温度热处理 30 秒到 2 分钟来聚集疫苗中的蛋白质。还可采用以下方法来产生佐剂效应:通过用胃蛋白酶处理的(Fab)白蛋白抗体的重激活进行聚集;与革兰氏阴性菌的细菌细胞(例如短小棒状杆菌(*C. parvum*))、外毒素或脂多糖成分的混合物;在生理学可接受的油介质(例如二缩甘露醇一油酸(Aracela))中的乳剂;或用作模块代用品的 20%全氟化碳(**Fluosol-DA®**)乳剂。

[0169] 例如,通常优选的佐剂包括弗氏完全佐剂(包含灭活的结核分枝杆菌的免疫应答非特异性刺激物)、弗氏不完全佐剂和氢氧化铝。

[0170] 除了佐剂之外,还可能期望共施用生物应答调节剂(biologic response modifier, BRM)来增强免疫应答。BRM 已显示能够上调 T 细胞免疫或下调抑制细胞的活性。这些 BRM 包括但不局限于西咪替丁(CIM;1200mg/d)(Smith/Kline, PA)、低剂量的环磷酰胺(CYP;300mg/m²)(Johnson/Mead, NJ)和细胞因子如 γ -干扰素、IL-2 或 IL-12,或编码涉及免疫帮助功能的蛋白质(如 B-7)的基因。

[0171] B. 脂质组分和部分

[0172] 在某些实施方案中,本发明涉及包含一种或多种与核酸或多肽/肽相关联的脂质的组合物。脂质是不溶于水而能用有机溶剂提取的物质。除本文具体描述那些以外的化合物为本领域技术人员理解为脂质,并包括在本发明组合物和方法中。脂质组分和非脂质可共价地或者非共价地互相附着。

[0173] 脂质可以是天然脂质或人工脂质。但是,脂质通常为生物物质。生物脂质为本领域所熟知,包括例如中性脂肪、磷脂、甘油磷脂、类固醇、萜烯、溶血脂质、鞘糖脂、糖脂、硫脂、含有醚基和酯基连接的脂肪酸的脂质和多聚脂质,以及它们的组合。

[0174] 与脂质相关联的核酸分子或多肽/肽可分散在含有脂质的溶液中、用脂质溶解、用脂质乳化、与脂质混合、与脂质组合、与脂质共价键合、作为悬液包含于脂质中或以其他方式与脂质相关联。本发明的脂质或脂质-H1a 关联组合物不局限于任何特定结构。例如,它们还可简单地分散于溶液中,可以形成大小或形状不一的聚集体。在另一实例中,它们可以双层结构存在(如胶束)或具有“塌陷”结构。在另一非限制性实例中,还涉及 lipofectamine(Gibco BRL)-痘病毒或 Superfect(Qiagen)-痘病毒复合体。

[0175] 在某些实施方案中,组合物可包含约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、约 21%、约 22%、约 23%、约 24%、约 25%、约 26%、约 27%、约 28%、约 29%、约 30%、约 31%、约 32%、约 33%、约 34%、约 35%、约 36%、约 37%、约 38%、约 39%、约 40%、约 41%、约 42%、约 43%、约 44%、约 45%、约 46%、约 47%、约 48%、约 49%、约 50%、约 51%、约 52%、约 53%、约 54%、约 55%、约 56%、约 57%、约 58%、约 59%、约 60%、约 61%、约 62%、约 63%、约 64%、约 65%、约 66%、约 67%、约 68%、约 69%、约 70%、约 71%、约 72%、约 73%、约 74%、约 75%、约 76%、约 77%、

约 78%、约 79%、约 80%、约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或其间任何范围的特定脂质、脂质类型或非脂质成分，如佐剂、抗原、肽、多肽、糖、核酸或本文所公开的或为本领域技术人员所知的其他材料。在非限制性实例中，组合物可含有约 10% 到约 20% 的中性脂质、约 33% 到约 34% 的脑苷脂和约 1% 的胆固醇。在另一非限制性实例中，脂质体可包含约 4% 到约 12% 的萜烯（其中胶束中约 1% 具体为番茄红素，脂质体的其余约 3% 到约 11% 含有其他萜烯）、约 10% 到约 35% 的卵磷脂和约 1% 的非脂质成分。因此本发明涉及的是，本发明组合物可含有以任何组合或百分比范围的任何脂质、脂质类型或其他组分。

[0176] C. 组合疗法

[0177] 本发明的组合物和相关方法（特别是对患者 / 受试者施用 H1a 蛋白和 / 或抗 H1a 抗体）也可与施用传统疗法组合使用。这些疗法包括但不限于施用抗生素，如链霉素、环丙沙星、强力霉素、庆大霉素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺甲噁唑、氨苄青霉素、四环素、苯唑西林、万古霉素或多种抗生素的组合。此外，对患者 / 受试者施用 H1a 蛋白或抗 H1a 抗体也可与施用抗病毒剂（如 RIP）组合使用。

[0178] 在一方面，本发明涉及的是，多肽疫苗和 / 或疗法与抗菌和 / 或抗病毒治疗联合使用。或者，所述疗法可在其他制剂治疗之前或之后，间隔数分钟至数周。在分别施用其他制剂和 / 或蛋白质或多核苷酸的实施方案中，一般应确保每次递送之间的时间不会过长，以便本发明的制剂和组合物仍能对受试者发挥有利的组合疗效。在这些例子中，本发明涉及的是，可在约 12-24 小时之内（优选在约 6-12 小时之内）施用两种疗法。然而，在一些情况下，期望显著延长施用的时限，这时在各次施用之间经过几天（2、3、4、5、6 或 7）到几周（1、2、3、4、5、6、7 或 8）。

[0179] 可采用不同组合，例如抗生素疗法为“A”，分别作为免疫或被动免疫疗法一部分的给定免疫原性分子或抗体（如 H1a 抗体）为“B”：

[0180] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0181] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0182] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0183] 对患者 / 或受试者施用本发明组合物应遵从施用这些化合物的一般方案，其中考虑 H1a 多肽或抗 H1a 抗体组合物的毒性（如果有的话）。预计可根据需要重复治疗周期。还涉及的是，多种标准疗法如水疗（hydration）可与所述疗法组合应用。

[0184] D. 一般药物组合物

[0185] 在一些实施方案中，对受试者施用药物组合物。本发明的不同方面包含向受试者施用有效量的组合物。在本发明的一些实施方案中，可对患者施用 H1a 多肽或肽，来保护其免受一种或多种葡萄球菌病原体的感染。在本发明的另一些实施方案中，可对患者施用针对 H1a 多肽或肽的特异性抗体，来治疗或预防一种或多种葡萄球菌病原菌的感染。或者，可将编码一种或多种这种多肽或肽的表达载体给予患者，作为预防性处理。此外，这些化合物可与抗生素和 / 或抗病毒剂组合施用。这些组合物一般可溶解或分散在药学上可接受的载体或含水介质中。

[0186] 短语“药学上可接受的”或“药物上可接受的”是指，分子实体和组合物在施用于动

物或人时不产生有害的、过敏的或其他不想要的反应。本文所用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这些介质和制剂用于药物活性物质的用途为本领域所熟知。考虑在免疫原性和治疗性组合物中使用任何常规介质或制剂,除非其与活性成分不相容。还可将补充性活性成分(如抗病毒剂或抗感染剂)掺入组合物中。

[0187] 除了配制成肠胃外施用的化合物(如用于静脉注射或肌肉注射的那些),其他药学上可接受的形式包括例如用于口服施用的片剂或其他固体;缓释胶囊;以及目前所用的其他任何形式,包括吸入剂等。

[0188] 可将本发明的活性化合物配制成用于肠胃外施用,例如配制成用于静脉内、肌肉、皮下甚至腹膜内途径的注射。根据本公开内容,含有本发明组合物的水性组合物的制备方法会为本领域技术人员所知。通常可将这些组合物制备成注射剂(液体溶液或悬液);还可制备适于在注射前加入液体后制备成溶液或悬液的固体剂型;还可以将制剂乳化。

[0189] 可在与表面活性剂(如羟丙基纤维素)适当混合的水中,制备以游离碱或药学上可接受盐的形式存在的活性化合物的溶液。也可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物以及在油中制备分散剂。在普通的储藏和使用条件下,这些制备物含有防止微生物生长的防腐剂。

[0190] 适于注射使用的药物剂型包括无菌水溶液或分散系;包括芝麻油、花生油或水溶丙二醇的制剂;用于即时制备无菌注射溶液或分散系的无菌散剂。在所有情况下,剂型必须是无菌的,而且必须达到容易被注射的流动程度。它还应当在加工和储藏条件下是稳定的,而且应当免受微生物(如细菌和真菌)的污染作用。

[0191] 可将蛋白性组合物配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由蛋白质的游离氨基形成)和由无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成的盐。由游离羧基形成的盐也可来自无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0192] 载体也可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物以及植物油。可通过例如使用包衣(如卵磷脂)、通过维持所需的粒径(对于分散系的情况)以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。可通过多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来实现对微生物作用的预防。在许多情况下,可优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现对注射组合物的延长吸收。

[0193] 通过将所需量的活性化合物掺入具有上面所列举的多种其他成分的合适溶剂中,来制备无菌注射液,其后根据需要进行过滤除菌。一般地,通过将多种无菌活性成分混合入无菌载体(含有基本分散介质和所需的其他上面所列举的成分)来制备分散系。对用于制备无菌注射液的无菌散剂而言,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥技术,由预先经过过滤除菌的溶液产生活性成分和所有其他所需成分的散剂。

[0194] 本发明组合物的施用通常可以经由任何常见的途径。这包括但不局限于口服、鼻内或含服施用。或者,可通过正位、皮内、皮下、肌肉、腹膜内、鼻内、粘膜或静脉内注射来施用。在某些实施方案中,可吸入疫苗组合物(例如美国专利 6,651,655,特别通过引用并入)。这些组合物通常作为药学上可接受的组合物(含有生理学上可接受的载体、缓冲剂或其他赋形剂)施用。药学上可接受的材料、组合物或介质可包括但不局限于涉及携带或运

送化学制剂的液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。

[0195] 就水溶液的肠胃外施用而言,例如,必要时可适当地缓冲溶液,而且液体稀释剂应首先用足够的盐或葡萄糖进行等渗处理。这些特殊的水溶液特别适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这一点上,根据本公开内容,可采用的无菌水介质可为本领域技术人员所知。例如,可将一剂药物溶于等渗 NaCl 溶液中,并且加入到皮下输液中或注射到建议的输注位点(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,1990)。根据受试者的身体状况,必然会导致一些用量改变。无论如何,负责施用的人会决定个体受试者的合适剂量。

[0196] 治疗或预防组合物的有效量基于预期目标来确定。术语“单位用药”或“剂量”是指适于用于受试者的物理分离的单位,每个单位包含为产生上面所讨论的与其施用(即适当途径和方案)相关的预期应答而计算得到的预定量组合物。所要施用的量(治疗次数和单位剂量)取决于预期得到的保护作用。

[0197] 组合物的精确剂量也取决于医生的判断,且为每个个体所特有的。影响用药的因素包括受试者的身体和临床状态、施用途径、治疗的预期目标(减轻症状还是治愈)以及特定组合物的效价、稳定性和毒性。

[0198] 制备后,会以与给药剂型相匹配的方式、以有效治疗或预防的剂量来施用溶液。可容易地以多种剂型(如上文所描述的注射液的类型)来施用制剂。

[0199] E. 体外、离体或体内施用

[0200] 本文所用的术语体外施用是指对从动物中取出的或在动物体外的细胞(包括但不限于培养的细胞)进行操作。术语离体施用是指将已在体外进行了操作的细胞随后施用于活的动物。术语体内施用包括在动物体内进行的所有操作。

[0201] 在本发明的某些方面中,可通过体外、离体或体内施用组合物。在某些体外实施方案中,通常将自体 B 淋巴细胞细胞系与本发明的病毒载体孵育 24 至 48 小时,或与 H1a 多肽孵育 2 小时。转导的细胞接着可用于体外分析,或用于离体施用。

[0202] 通过引用并入本文的美国专利 4,690,915 和 5,199,942 公开了离体操作血液单核细胞和骨髓细胞用于治疗应用的方法。

[0203] V. 实施例

[0204] 给出以下实施例来阐明本发明的多种实施方案,并非以任何方式限制本发明。本领域技术人员很容易领会到,本发明非常适于完成目标并获得所提及的结果和优点,以及本文固有的那些目标、结果和优点。本文的实施例和本文所描述的方法是现有优选实施方案的代表,是示例性的,并非意图限制本发明的范围。本领域技术人员会想到其中的改变以及权利要求范围所定义的本发明精神所涵盖的其他用途。

[0205] 实施例 1

[0206] 疫苗介导的针对金黄色葡萄球菌的保护

[0207] A. 方法

[0208] 细菌菌株和培养物。在胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)或胰蛋白大豆琼脂培养基(TSA)中繁殖金黄色葡萄球菌 Newman、LAC 和 MW2。为获得 PVL 转化噬菌体,用 $1 \mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 诱导 ϕSa2mw 在金黄色葡萄球菌 MW2 培养物中的裂解性复制。用 $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤溶菌产物,滤液用于在金黄色葡萄球菌 RN4220 上的噬菌斑形成(Bae 等 2006)。将噬菌体悬液与 1ml 菌株 RN4220 的对数中期培养物(生长于添加了 5mM CaCl_2 的心浸液肉汤(HIBCa5))

中)混合,然后通过37°C过夜孵育来进行扩增。通过酚/氯仿提取法从扩增的噬菌体颗粒中纯化DNA。使用引物 cctcctgttgatggaccact (SEQ ID NO :3) 和 ggcgctgaggtagtcaaaag (SEQ ID NO :4), 通过 lukS-PV DNA 的 PCR 扩增来检测 ϕ Sa2mw。将 ϕ Sa2mw 噬菌体溶液与生长于 HIBCa5 中的菌株 Newman 的对数中期培养物混合,37°C 振荡 (150rpm) 孵育过夜,然后涂板在 TSA 上。在 TSA 上繁殖菌落以除掉污染的噬菌体颗粒。在 5ml TSB 中 37°C 过夜培养 ϕ Sa2mw 溶素原,纯化染色体 DNA,并扩增 lukS-PV DNA。通过转导来自菌株 Φ NE 11568 的 bursa aurealis 插入突变产生突变体 Newman ϕ Sa2mw hla::erm、Newman hla::erm 和 LAC hla::erm,然后通过 PCR 和 DNA 测序进行筛选以确定 hla 位点的破坏 (Bae 等 2004)。在含有 10 μ g/ml 红霉素的 TSA 上维持转导子,除了 LAC hla::erm (在 100 μ g/ml 红霉素培养基上繁殖)。为进行回补研究,将葡萄球菌用质粒 pOS1 (载体)、phla 或 ppv1 进行转化,并在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 TSA 上进行培养。为了实现小鼠肺部感染,将细菌的过夜培养物以 1 : 100 稀释到新鲜 TSB 中,并 37°C 旋转培养至 OD₆₆₀ 为 0.5。将 50ml 培养物等分试样中的葡萄球菌通过离心进行沉淀,用 PBS 洗涤,并用 750 μ l PBS 重悬以进行致死率研究 (每 30 μ l 含 3-4 \times 10⁸CFU)、或用 1250 μ l PBS 重悬 (每 30 μ l 含 2 \times 10⁸CFU) 以进行细菌载荷和组织病理学实验。为进行细胞毒性研究,培养葡萄球菌菌株至 OD₆₆₀ 0.5。将每份 5ml 培养基中的葡萄球菌通过离心进行沉淀,用 PBS 洗涤,并用 10ml F12 培养基 (Gibco) 重悬。

[0209] 质粒。用引物 gcgggatccccctttcttgaattaaca (SEQ ID NO :5) 和 gcggaattcacat taatttgatcatttcttc (SEQ ID NO :6), 以金黄色葡萄球菌 Newman DNA 作为模板对 hla 基因和启动子进行 PCR 扩增。用引物 gcgggatccgtatatgatgaatcttaggca (SEQ ID NO :7) 和 gcgga attctgttttagctcataggatttttttc (SEQ ID NO :8) 对 pv1 基因座和启动子进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用 BamHI 和 EcoRI 消化,并克隆入 pOS1 的相应位点。

[0210] 兔抗血清的制备。使用 pOS1-HIa_{H35L} 模板 DNA 和引物 gccggatccgcagattctgatatt aatattaaaacc (SEQ ID NO :9) 和 gcggaattcacattaatttgatcatttcttc (SEQ ID NO :10) 产生编码成熟 HIa_{H35L} 的 PCR 产物。使用 USA300 基因组模板 DNA 及引物 gccggatccgctcaacatat cacacctgtaagttag (SEQ ID NO :11) 和 gcggaattctgttttagctcataggatttttttc (SEQ ID NO :12) (LukF-PV) 以及 gccggatccgataacaatattgagaatattggtgat (SEQ ID NO :13) 和 gccgaa ttctcaattatgtcctttcactttaatttc (SEQ ID NO :14) (LukS-PV) 产生编码成熟 LukS-PV 和 LukF-PV 的 PCR 产物。将 PCR 产物用 BamHI 和 EcoRI 消化,并克隆入 pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) 的相应位点,转化入大肠杆菌。通过亲和层析纯化 GST-HIa_{H35L}、GST-LukF-PV 和 GST-LukS-PV 融合蛋白。将纯化的蛋白质 (0.5mg) 用弗氏完全佐剂 (CFA) 或者弗氏不完全佐剂 (IFA) 乳化,并肩胛下 (subscapularly) 注射入雌性新西兰白兔进行初次免疫,接下来进行两次间隔为 21 天的加强免疫。

[0211] 主动和被动免疫研究。对主动免疫,根据厂商说明书 (Amersham Biosciences) 对 GST-HIa_{H35L} 融合蛋白进行 Precision 蛋白酶切割。在通过 Triton X-114 提取去除了污染的内毒素之后,将 HIa_{H35L} 蛋白在 CFA 或 IFA 中乳化。4 周大的 C57Bl/6J 小鼠 (Jackson Laboratories) 在第 0 天接受 20 μ g 在 CFA 中的 HIa_{H35L} 蛋白,之后在第 10 天用 20 μ g 在 IFA 中的 HIa_{H35L} 蛋白进行加强。然后在第 21 天用金黄色葡萄球菌对动物进行攻击。从在第 0 天免疫前和在第 20 天的动物中获得血清以评估特异性血清抗体的产生。

[0212] 对被动免疫研究,在用金黄色葡萄球菌攻击之前 24 小时,7 周大的 C57Bl/6J 小鼠

通过腹膜下 (IP) 注射接受 100 μ l 正常兔血清 (NRS, Sigma) 或抗 H1a 兔抗血清。用 LukF-PV 和 LukS-PV 被动免疫的动物接受在总 IP 注射体积 200 μ l 中 1 : 1 混合的每种特异性抗血清 100 μ l。用于 LukF/S-PV 免疫研究的对照组动物接受 200 μ l NRS。在在攻击时收集血清以评估特异性兔抗体效价。

[0213] 小鼠感染模型。感染前在芝加哥大学动物中心饲养六周大的雌性 C57B1/6J 小鼠 (Jackson Laboratories) 一周。用氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉动物。证实已正确麻醉后, 向左鼻孔中接种 30 μ l 葡萄球菌悬液。将动物接种后直立一分钟, 然后以仰卧位放入笼中以利于恢复。向所有动物提供自由采食的食物和水, 并继续观察 72 小时。一小部分动物常规性地死于接种后六小时内, 很可能由于呼吸和麻醉的共同作用。这些动物不纳入后续分析中。

[0214] 细菌载荷和组织病理学。按照芝加哥大学动物关怀和使用协会 (University of Chicago Institute of Animal Care 和 Use Committee) 指导方针, 通过强制性二氧化碳吸入处死感染的动物, 然后摘除双侧肺。将右肺置于 1ml 无菌 PBS 中并匀浆, 之后在琼脂糖平板上进行连续稀释和菌落形成。为进行组织病理学研究, 将左肺解剖并置于 1% 的甲醛中。将甲醛固定的组织进行包埋和切片, 之后用苏木精和伊红染色, 并于光学显微镜下观察。

[0215] ELISA。使用包被有 1 μ g/ml 重组 H1a_{135L}、LukF-PV 或 LukS-PV 的 Nunc MaxiSorp Immuno 平板进行小鼠血清抗体效价的分析。将血清稀释液在相应平板中孵育, 并用 HRP 缀合的二抗和 Opti-EIA (BD Biosciences) 在 Tecan GENios 分光光度计上显色。

[0216] 蛋白质分析。将在 TSB 中培养的葡萄球菌培养物调整到相等的光密度, 将培养物上清液中的蛋白质用三氯乙酸沉淀, 用丙酮洗涤并溶解在上样缓冲液中。通过采用特异性抗血清 (α -LukS-PV、 α -LukF-PV 或 α -核酸酶) 和具有加强化学发光检测的 HRP 缀合山羊抗兔二抗的免疫印记, 来分析在 15% SDS-PAGE 上分离的蛋白质。从 Toxin Technology 公司 (Sarasota, FL) 购买辣根过氧化物酶缀合的抗 H1a 抗体。

[0217] 细胞毒性测定。在添加了 10% 胎牛血清和 normocin (100 μ g/ml, InvivoGen, San Diego, CA) 的 F12 培养基中维持 A549 细胞。洗涤 A549 细胞, 并在 96 孔板上将其以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度置于 F12 完全培养基中。用无添加物的 F12 培养基洗涤 A549 细胞一遍, 之后每孔加入 100 μ l 葡萄球菌悬液。在加湿的 37°C 温箱中孵育 4 小时后, 一式三份测定 LDH 活性 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)。为进行细胞损伤的显微镜评价, 使用 Nikon Eclipse TE2000U 显微镜获取感染后 3 个小时的细胞图像。

[0218] 细胞因子测定。将感染 24 小时后从实验动物收集的血清以 1 : 4 的比例稀释, 并使用 Bioplex Mouse 8-Plex A assay (Bio-Rad) 测定细胞因子的含量。在带有 Bio-Plex 管理软件的 Bio-Plex 工作站上定量细胞因子的浓度。

[0219] 统计学分析。使用 Fisher 精确检验进行死亡率研究的统计学显著性分析。使用双尾 Student t 检验计算细菌回收研究和 A549 LDH 释放的统计学显著性。

[0220] B. 结果

[0221] 葡萄球菌 α -溶血素 (H1a 或 α 毒素) 是细菌成孔 β -桶毒素 (Bhakdi 和 Tranum-Jensen, 1991 ; Song 等, 1996) 的初始成员。它的结构基因 h1a 位于所有被检测到分泌 293 个残基的水溶单体的金黄色葡萄球菌菌株的染色体上 (O' Reilly 等, 1990 ; O' Reilly 等, 1986)。H1a 被认为与敏感性宿主细胞的表面载体结合, 从而促进其自身寡聚成七聚体孔洞前体, 并将具有 2nm 孔径的 β -桶结构插入质膜 (Gouaux 等, 1997)。H1a

孔洞形成于淋巴细胞、巨噬细胞、肺泡上皮细胞、肺内皮细胞和红细胞,但是粒细胞和成纤维细胞表现出裂解抗性 (Bhakdi 和 Tranum-Jensen, 1991 ;McElroy 等, 1999)。向兔或大鼠肺部组织中滴入纯化的 Hla 引发了血管渗漏和肺动脉高血压,其原因在于释放了几种信号分子,如磷脂酰肌醇、一氧化氮、前列腺素类 (PGE₂、PGI₂) 和血栓烷 A₂ (McElroy 等, 1999 ; Seeger 等, 1984 ;Seeger 等, 1990 ;Rose 等, 2002 ;Suttorp 和 Habben, 1988)。与 Hla 的生物化学特性一致,消除金黄色葡萄球菌 Newman 中 Hla 表达的突变严重减弱了在鼠肺炎模型中的毒力 (Bubeck-Wardenburg 等, 2007)。本文中,本发明人研究了以 α -溶血素作为靶标开发针对金黄色葡萄球菌肺部感染之疫苗或免疫治疗的策略。

[0222] 为检测在近期临床金黄色葡萄球菌分离群中 hla 是否作为一个毒力因子发挥功能,本发明人选择了社区型 MRSA 菌株 LAC (Los Angeles Clone, CDC clade USA300) (Voyich 等, 2006 ;Miller 等, 2005)。用 hla::erm 等位基因取代 hla, 完全消除了金黄色葡萄球菌 LAC 引起肺部感染的能力 (图 1A)。近期报道描述了分泌编码 Panton-Valentine 杀白细胞素 (PVL) 之噬菌体的金黄色葡萄球菌分离群的出现 (Miller 等, 2005 ;Chambers, 2005 ;Vandenesch 等, 2003 ;Fridkin 等, 2005)。PVL 是另一七聚体 β -桶毒素, 该毒素由两个插入选择性靶细胞膜的亚基 (LukS-PV 和 LukF-PV) 组成 (Panton 和 Valentine, 1932 ;Menestrina 等, 2001)。利用实验室菌株金黄色葡萄球菌 RN6390 及其 PVL+ 衍生物, Labandeira-Rey 和同事指出, PVL 可能作为鼠肺炎发病过程中必要的毒力因子而发挥功能 (Labandeira-Rey 等, 2007)。当在菌株 RN6390 中从多拷贝质粒上表达 PVL 时, 观察到肺炎的显著动物致死率和组织病理学迹象 (Labandeira-Rey 等, 2007)。与之相反, 使用败血症和皮肤感染的鼠科动物模型, Voyich 等发现 PVL 在葡萄球菌毒力中没有直接作用 (Voyich 等, 2006)。在美国流行的 CA-MRSA 分离群的同基因 lukS-PV 和 lukF-PV 突变衍生物、菌株 LAC (USA300) 和 MW2 (USA400), 同样未显示 PVL 在嗜中性粒细胞裂解、溃疡形成、表皮坏死或败血病诱导死亡中发挥作用 (Voyich 等, 2006)。

[0223] PVL 及其对肺部感染发病机制的贡献。为测试在目前临床分离群中表达的 PVL 是否对肺部感染的发病机制有所贡献, 在鼠肺炎模型中分析了金黄色葡萄球菌菌株 LAC 和 MW2 及其缺少 PVL 基因的同基因突变株。在对由野生型和同基因 Δ pv1 突变体菌株引发的感染进行配对分析后发现, 两者之间在患有金黄色葡萄球菌性肺炎的动物总体死亡率上无显著差异 (图 1B)。在两种 CA-MRSA 菌株的任一种中缺失 lukS/F-PV (Δ pv1) 均不影响细菌在小鼠肺中的生长。来自感染动物的苏木精-伊红染色的切片样品显示了肺炎的病理学证据, 其表现为免疫细胞浸润、肺泡结构缺失以及肺实质固结和细菌渗入 ;这些特征在用分泌或不分泌 PVL 的菌株感染的动物中无法区分 (图 1C)。

[0224] 发明者考虑到, PVL 对葡萄球菌性肺炎的贡献是否被在肺部感染发病机制中发挥重要作用的 α -溶血素所掩盖。用噬菌体 ϕ Sa2mw (从金黄色葡萄球菌 MW2 中分离) 来产生金黄色葡萄球菌 Newman 的 lukS/F-PV 溶素原 (Baba 等, 2002) (图 3A)。将 ϕ Sa2mw 插入到金黄色葡萄球菌 Newman 染色体的 1565379 位核苷酸处, 导致 LukS-PV 和 LukF-PV 的分泌 (Kaneko 等, 1998) (图 3B)。对 C57B1/6J 小鼠进行攻击之后, ϕ Sa2mw 溶素原以相同效率在肺部组织中复制, 这通过右肺匀浆组织中的菌落形成单位 (CFU) 来判断 (图 3C)。患由金黄色葡萄球菌 Newman 野生型或 Newman ϕ Sa2mw 诱导的肺炎的小鼠的整体死亡率未观察到显著差异 (图 3D), 表明通过噬菌体溶原性而分泌的 PVL 未增加金黄色葡萄球菌在

鼠肺部感染过程中的毒力。尽管存在 PVL 噬菌体,但 h1a 的插入破坏导致金黄色葡萄球菌 Newman ϕ Sa2mw (h1a::erm) 对鼠肺部感染失去毒力 (图 3E)。

[0225] 用编码 lukS/F-PV(ppv1) 的质粒转化金黄色葡萄球菌 Newman, 促进了高水平的 PVL 表达 (图 4B)。然而,在用带有空载体或 ppv1 的金黄色葡萄球菌 Newman 进行的感染中,没有观察到实验动物的肺炎相关死亡率的改变 (图 4A)。相似地,PVL 表达未改变感染动物肺部的金黄色葡萄球菌回收或者疾病的组织病理学迹象 (数据未显示)。如以前所报道,金黄色葡萄球菌 Newman (h1a::erm) 中 h1a 表达的缺失使金黄色葡萄球菌在肺部感染模型中的毒力和致死性完全丧失 (Bubeck-Wardenburg 等,2007),该缺陷不能为 ppv1 转化所回复。与之相反,使用促进 H1a 表达的质粒 ph1a 进行的转化导致毒力表型的完全和过度恢复,100%的动物在 24 小时的时间点时死于肺炎 (图 4A)。免疫印迹分析提供了在每一这些菌株中 LukS-PV、LukF-PV 和 α -溶血素的存在水平,同时证明所示的遗传缺陷导致相应目的蛋白的缺失 (图 4B)。因此,H1a 是在小鼠中建立葡萄球菌性肺部疾病的关键毒力因子,而非 PVL。

[0226] H1a 特异性免疫应答。为测试 H1a 特异性免疫应答是否影响葡萄球菌性肺炎的发病机制,通过使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 或 20 μ g 纯化 H1a_{H35L} 的肌肉注射来免疫小鼠,所述 H1a_{H35L} 为具有单个氨基酸替换的 α -溶血素变体,可阻止孔洞而不影响毒素结合宿主靶细胞 (Gouaux 等,1997)。通过免疫获得平均 H1a_{H35L} 特异性抗体效价为 1 : 5601 (\pm 2789)。在金黄色葡萄球菌 Newman 攻击后,在经 H1a_{H35L} 免疫的动物中观察到动物死亡率的显著下降 (图 5A)。这种下降与感染 24 小时后从肺部回收的金黄色葡萄球菌菌落形成单位减少相关 (图 5B)。被感染肺部组织的总体病理学分析显示,在经 H1a_{H35L} 免疫的动物中只有局灶性区域固结,与在模拟免疫的动物中的弥散性固结相反 (图 5C)。在 α -溶血素免疫的动物中疾病的局灶性质在感染肺部组织的组织病理学切片中也很明显。在 H1a_{H35L} 免疫的动物中病变是不连续的,更重要的是,为肺部的正常区域所包围 (图 5D)。相反地,在模拟免疫的动物中肺泡腔的大部分被栓塞。为检验接种 α -溶血素疫苗在由临床相关金黄色葡萄球菌分离群所致肺部感染发病机制中的作用,用金黄色葡萄球菌 LAC 或金黄色葡萄球菌 MW2 感染经 H1a_{H35L} 免疫的动物。尽管由这些菌株引起的绝对死亡率各不相同,但是用 H1a_{H35L} 免疫的所有组别的动物都获得了显著的死亡保护 (图 5E)。

[0227] 本发明人认识到鼠肺部葡萄球菌感染与人不同的可能性。事实上,两种金黄色葡萄球菌噬菌体编码的蛋白质 CHIPS 和 SCIN 看来以物种特异性的方式调节人类免疫系统 (Rooijackers 等,2005 ;Rooijackers 等,2006)。为阐明 PVL 在人类肺部组织损伤中的可能作用,本发明人分析了金黄色葡萄球菌临床分离群对人 A549 肺泡上皮细胞的细胞毒效应,所述 A549 细胞以前曾被用来检测纯化的葡萄球菌 α -溶血素或 B 族链球菌 β -溶血素对人肺部上皮的作用 (Rooijackers 等,2005 ;Rooijackers 等,2006) (图 6)。用金黄色葡萄球菌 LAC 和 MW2 感染后,A549 细胞的损伤可容易地通过乳酸脱氢酶的释放来进行检测 (图 6A)。破坏 pv1 位点并未减弱任一这些分离群中金黄色葡萄球菌的细胞毒效应,这一发现与已报导的 PVL 对于粒细胞和单核细胞的特异性相一致 (Woodin,1970 ;Meunier 等,1995)。与之相反,缺乏 α -溶血素的金黄色葡萄球菌 Newman 变体不能破坏 A549 细胞,该缺陷能通过 ph1a 进行回补,并可容易地通过感染细胞的显微镜检查来观察 (图 6B)。 α -溶血素在直接肺泡细胞损伤中的重要作用提示,中和该毒素能阻止细胞损伤。向同时被金黄色葡萄

球菌感染的 A549 细胞中加入 H1a 抗血清提供了防止毒素损伤的保护作用 (图 6C), 而对照血清没有效果 (图 6C)。用纯化的 H1a_{H35L} 处理也能保护 A549 细胞, 这与 H1a_{H35L} 占据肺细胞表面的 α -溶血素结合位点的假说一致 (图 6C)。感染后 4 小时通过荧光显微术采集人 A549 细胞的活动 / 静止影像, 评估未感染或与金黄色葡萄球菌 Newman 在培养基中共培养的 A549 细胞, 所述培养基用磷酸盐缓冲液 (PBS, 1 : 1000)、正常兔血清 (NRS, 1 : 1000)、抗 H1a 兔血清 (α -H1a, 1 : 1000) 或纯化的 H1a_{H35L} (10g/ml) 进行了处理。还用转化有含有 h1a 基因的载体或质粒 (ph1a) 的 Newman 同基因 h1a 插入突变体 h1a::erm 进行了感染。结果表明 α -溶血素拮抗作用能够减少金黄色葡萄球菌对人肺泡表皮细胞的损伤。

[0228] α -溶血素特异性抗体可提供针对葡萄球菌性肺部疾病的保护。为了测试 α -溶血素特异性抗体是否能够提供针对葡萄球菌性肺部疾病的保护, 在用金黄色葡萄球菌 Newman 攻击前 24 小时, 通过腹膜内注射用正常兔血清或抗 H1a 血清被动免疫实验动物 [平均 H1a_{H35L} 特异性抗体效价 1 : 480 (\pm 179)] (图 7)。肺炎引发的死亡率检测显示了用抗 H1a 血清被动免疫的保护作用, 对照血清则不然 (图 7A)。该保护作用与疾病的总体 (图 7C) 和组织病理学 (图 7D) 特征的改善相关。此外, 观察到从抗 H1a 免疫的动物肺部回收的菌落形成单位显著减少 (图 7B)。不仅在用金黄色葡萄球菌 Newman 攻击的动物中, 而且在用金黄色葡萄球菌 LAC 或 MW2 感染的动物中被动免疫保护都是有效的 (图 7E)。与之相反, 用抗 PVL 血清 [特异性抗体平均效价 LukS-PV = 1 : 894 (\pm 80) 和 LukF-PV = 1 : 3689 (\pm 186)] 进行的被动免疫对葡萄球菌性肺炎的结局没有影响 (图 7F)。

[0229] 多种感染性或非感染性刺激诱发的肺炎会导致 IL-1 β 分泌的增加, 这不仅促进免疫细胞募集至感染位点, 而且参与全身性炎性应答和急性肺损伤 (Goodman 等, 2003)。在过量发生时, IL-1 β 分泌必定对宿主是有害的 (Goodman 等, 2003)。肺部感染葡萄球菌的动物血清中的细胞因子谱揭示, 使用抗 H1a 被动免疫导致血清 IL-1 β 的显著减少 (图 8)。此外, 经抗 H1a 免疫的动物释放促进先天免疫细胞 (如巨噬细胞和嗜中性粒细胞) 吞噬并杀死葡萄球菌的细胞因子 IFN- γ (图 8) (Zhao 等, 1998)。

[0230] 针对金黄色葡萄球菌 α -溶血素产生的抗体能够对培养的人肺泡表皮细胞提供针对细胞裂解损伤的保护, 并在鼠模型系统中提供对侵袭性疾病的保护能力, 这提示, 针对这种毒素的单克隆抗体可以是有效的治疗手段。为促成对该系列的研究, 本发明人用重组 H1a_{H35L} 蛋白免疫小鼠, 产生了一系列分泌抗 H1a 的骨髓瘤细胞。在基于 ELISA 的筛选中, 有 6 个应答于 H1a_{H35L} 免疫而产生的杂交瘤细胞系检测为阳性; 将其中两个扩大培养, 并经证实能够功能性阻断 H1a 的活性 (图 9)。与之前的观察一致, 在未免疫兔血清 (NRS) 存在下金黄色葡萄球菌与 A549 细胞的共培养并未产生细胞保护; 与之相反, 用兔抗 H1a 的共培养能提供针对裂解的保护。相似地, 从克隆 7B8.35 和 1A9.4F9 中纯化的单克隆抗体提供了统计学显著程度的针对 H1a 诱导 A549 损伤的保护作用。与之相反, 同种型对照小鼠抗体未提供保护。还通过 A549 细胞的 LIVE-DEAD 染色的显示出了这些结果, 所述 A549 细胞是未感染的, 或者用抗 H1a 单克隆抗体或其同种型匹配对照进行了处理。为检测这两种单克隆抗体所提供的相对保护, 在 LDH 释放测定中对从 2.5mg/ml 到 0.001mg/ml 的一系列抗体浓度进行了保护 A549 细胞 (与金黄色葡萄球菌 Newman 共培养) 能力的评估 (图 10)。单克隆抗体 1A9.4F9 明显地提供了针对细胞损伤的保护, 但该抗体产生的保护作用不如 7B8.35 单克隆抗体所提供的显著, 可能提示这些单克隆抗体所识别的表位或其对 α -溶血素的亲和能

力不同。这些体外保护研究的结果表明, H1a 特异性单克隆抗体可在金黄色葡萄球菌性肺炎的病程中在体内提供对 H1a 溶胞效应的保护。

[0231] 为对此进行研究, 本发明人检测了这些纯化的小鼠单克隆抗体对小鼠提供针对金黄色葡萄球菌性肺炎之保护的能力。每组 15 只小鼠在感染前 24 小时通过腹膜内途径接受总体积 100 μ l 中 5mg/kg 剂量的纯化单克隆抗体 7B8.35(图 11A) 或 1A9.4F9(图 11B)。假处理小鼠接受 100 μ l PBS。根据上文实验中所用的方案, 用金黄色葡萄球菌 Newman 感染动物, 并记录感染后 72 小时的死亡率。在该测定中, 用每种单克隆抗体进行的被动免疫均提供了统计学显著程度的死亡保护, 这与感染后动物的总体临床表现改善相关。相似地, 7B8.35 和 1A9.4F9 都能对动物提供针对 USA300/LAC 所引发的肺炎相关性死亡的保护, USA300/LAC 是目前美国最流行的甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌分离群(图 12)。与本发明人在 A549 测定中观察到的结果相一致, 单克隆抗体 7B8.35 在保护实验动物方面比 1A9.4F9 更为有效, 因为后者仅提供在感染后第 24 小时提供统计学显著程度的保护作用。以前的研究已经证明, USA300/LAC 分离群在动物模型中有很高的毒力, 它比 Newman 分离群分泌多得多的 H1a, 因此导致比用金黄色葡萄球菌 Newman 感染表现出更高的实验动物死亡率。结合上述体外和体内的数据, 这两种小鼠单克隆抗体以 H1a 功能为靶标, 来拮抗该毒素从而提供针对该疾病的保护。

[0232] 由于单克隆抗体在体外肺部损伤细胞培养模型中表现出保护作用, 并对动物提供针对金黄色葡萄球菌性肺炎的保护, 因此本发明人有志于确定 H1a 分子中被抗体靶向的区域。本发明人考虑到, 对这些表位的了解可有助于从结构角度理解可如何抑制该毒素, 还可有益于未来对治疗性化合物、其他单克隆抗体的设计, 还可为该毒素中可掺入主动免疫方法所用疫苗制剂的独立区域提供启示。单克隆抗体在体内阻断 H1a 活性可能有许多机制。第一, 抗体可结合到蛋白质上遮掩真核受体结合位点的区域(这个目前尚不清楚), 因此阻止单体与宿主细胞的功能性相互作用。第二, 抗体可通过削弱分子间相互作用的发生来阻止已结合单体在细胞表面装配成七聚体形式。第三, 抗体可使装配的七聚体不能发生为将茎干插入真核脂双分子层并形成稳定孔洞所必需的构象变化。对 H1a 细致的生化和结构分析已提供了对宿主细胞结合、七聚体形成和细胞裂解有贡献之氨基酸残基的认识。因此, 确定每种单克隆抗体的精确结合位点很可能会加深对拮抗毒素之机制的理解。此外, 这种定位可最终指导将单克隆抗体的有效组合(其中每种抗体结合不同的表位) 组装成被动免疫治疗剂。为了能够快速确定每种人源化单克隆抗体对 H1a 片段的表位特异性, 制备了一系列七种谷胱甘肽 S-转移酶(GST) 融合蛋白, 其中每一个代表毒素中约 50 个氨基酸长度的重叠片段。

[0233] 每种截短蛋白与前一个和后一个蛋白片段都有 10 个氨基酸重叠(图 13)。用点印迹分析技术检测这些融合蛋白与 7B8 和 1A9 单克隆抗体的反应性。简单地说, 将 1 μ g 每种融合蛋白点至硝酸纤维素膜上并晾干。为两种单克隆抗体分别准备一张膜。其后将膜封闭, 并按照标准方案使用浓度 0.2 μ g/ml 的每种单克隆抗体分别进行 Western 印迹。洗涤印迹, 并将其与二抗孵育, 通过化学荧光显色技术检测与融合蛋白结合的单克隆抗体。有趣的是, 7B8 和 1A9 均不仅结合全长融合蛋白(H1a_{H35L}), 而且专门结合含有充分加工后之毒素中 1-50 位氨基酸的融合蛋白(H1aA1-K50)(图 14)。7B8 和 1A9 的同种型匹配对照抗体(分别为 IgG2a 和 IgG2b) 未表现出与任一融合蛋白结合, 而针对毒素(α -H1a) 所产生的多克

隆兔血清识别所述蛋白质的每个片段以及单独的 GST(兔抗血清针对全长 GST-H1aH35L 融合蛋白产生)。两个独立产生的保护性抗 H1a 单克隆抗体识别包含在成熟的已加工毒素的前 50 个氨基酸中的表位,这一发现强烈提示,这些抗体可具有通过阻止稳定七聚体孔洞的装配来破坏毒素功能的能力。

[0234] 总之,采用 H1a_{H35L} 疫苗进行的主动免疫以及采用 H1a 特异抗体进行的被动免疫都在相关动物模型中产生了针对葡萄球菌肺部感染的显著保护。因此,针对 α -溶血素(所有金黄色葡萄球菌菌株分泌的毒力因子)的抗体应该在人中也能够提供针对葡萄球菌性肺部疾病的保护作用。

[0235] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0236] 1. 为患者提供针对葡萄球菌性肺部疾病或病症之保护和/或在患者中引发针对葡萄球菌之免疫应答的方法,其包括对患者施用有效量的含有纯化的重组和减毒的葡萄球菌 α -溶血素(H1a)毒素的组合物,其中所述组合物包含不多于污染量的任何其他葡萄球菌蛋白。

[0237] 2. 项 1 的方法,其中所述患者有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症的风险。

[0238] 3. 项 2 的方法,其中所述患者已住院或即将住院。

[0239] 4. 项 2 的方法,其中所述患者将进行手术和/或将被麻醉。

[0240] 5. 项 1 的方法,还包括鉴定有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症之风险的患者。

[0241] 6. 项 1 的方法,其中所述减毒 H1a 毒素缺乏可检测的溶血活性。

[0242] 7. 项 1 的方法,其中所述减毒 H1a 毒素缺乏可检测的致死活性。

[0243] 8. 项 1 的方法,其中所述 H1a 毒素在 35 位氨基酸处具有用于替代组氨酸的亮氨酸。

[0244] 9. 项 1 的方法,其中所述 H1a 毒素基本未变性。

[0245] 10. 项 1 的方法,其中所述 H1a 毒素是纯化的或分离的。

[0246] 11. 项 1 的方法,其中所述 H1a 毒素包含成熟 H1a 毒素中的不多于 1-50 位氨基酸。

[0247] 12. 项 1 的方法,还包括对所述患者测试针对 H1a 毒素的抗体。

[0248] 13. 项 1 的方法,其中对所述患者多次施用所述组合物。

[0249] 14. 项 1 的方法,其中所述组合物还包含至少一种佐剂。

[0250] 15. 项 14 的方法,其中所述佐剂与所述 H1a 毒素缀合。

[0251] 16. 项 1 的方法,其中所述组合物经粘膜或肌肉施用。

[0252] 17. 项 1 的方法,其中所述组合物经鼻内施用或被吸入。

[0253] 18. 项 1 的方法,其中所述葡萄球菌性肺部疾病或病症为肺炎。

[0254] 19. 在患者中预防葡萄球菌性肺部疾病或病症的方法,其包括:对该患者施用有效量的含有重组和减毒的葡萄球菌 α -溶血素(H1a)毒素的组合物,其中所述组合物不引发针对任何其他葡萄球菌蛋白的可检测免疫应答。

[0255] 20. 项 19 的方法,其中所述患者有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症的风险。

[0256] 21. 项 20 的方法,其中所述患者已住院或即将住院。

[0257] 22. 项 20 的方法,其中所述患者将进行手术和/或将被麻醉。

[0258] 23. 项 19 的方法,还包括鉴定有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症之风险的患者。

- [0259] 24. 项 19 的方法,其中所述减毒 H1a 毒素缺乏可检测的溶血活性。
- [0260] 25. 项 19 的方法,其中所述减毒 H1a 毒素缺乏可检测的致死活性。
- [0261] 26. 项 19 的方法,其中所述 H1a 毒素在 35 位氨基酸处具有用于替代组氨酸的亮氨酸。
- [0262] 27. 项 19 的方法,其中所述 H1a 毒素包含成熟 H1a 毒素中的不多于 1-50 位氨基酸。
- [0263] 28. 项 19 的方法,其中所述 H1a 毒素基本未变性。
- [0264] 29. 项 19 的方法,其中所述 H1a 毒素是纯化的或分离的。
- [0265] 30. 项 19 的方法,其中对所述患者多次施用所述组合物。
- [0266] 31. 项 19 的方法,其中所述组合物还包含至少一种佐剂。
- [0267] 32. 项 31 的方法,其中所述佐剂与所述 H1a 毒素缀合。
- [0268] 33. 项 19 的方法,还包括对所述患者检测针对 H1a 毒素的抗体。
- [0269] 34. 项 19 的方法,其中所述组合物经粘膜或肌内施用。
- [0270] 35. 项 19 的方法,其中所述组合物经鼻内施用或被吸入。
- [0271] 36. 项 19 的方法,其中所述葡萄球菌性肺部疾病或病症为肺炎。
- [0272] 37. 为患者提供针对葡萄球菌性肺部疾病或病症之保护的方法,其包括对患者施用有效量的基本由重组和减毒的葡萄球菌 α -溶血素 (H1a) 毒素组成的组合物。
- [0273] 38. 项 37 的方法,其中所述患者有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症的风险。
- [0274] 39. 项 38 的方法,其中所述患者已住院或即将住院。
- [0275] 40. 项 38 的方法,其中所述患者将进行手术和 / 或将被麻醉。
- [0276] 41. 项 37 的方法,还包括鉴定具有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症之风险的患者。
- [0277] 42. 项 37 的方法,其中所述减毒 H1a 毒素缺乏可检测的溶血活性。
- [0278] 43. 项 37 的方法,其中所述减毒 H1a 毒素缺乏可检测的致死活性。
- [0279] 44. 项 37 的方法,其中所述 H1a 毒素在 35 位氨基酸处具有用于替代组氨酸的亮氨酸。
- [0280] 45. 项 37 的方法,其中所述 H1a 毒素包含成熟 H1a 毒素中的不多于 1-50 位氨基酸。
- [0281] 46. 项 37 的方法,其中所述 H1a 毒素是基本未变性。
- [0282] 47. 项 37 的方法,其中所述 H1a 毒素为纯化的或分离的。
- [0283] 48. 项 37 的方法,还包括对所述患者检测针对 H1a 毒素的抗体。
- [0284] 49. 项 37 的方法,其中对所述患者多次施用所述组合物。
- [0285] 50. 项 37 的方法,其中所述组合物还包含至少一种佐剂。
- [0286] 51. 项 50 的方法,其中所述佐剂与所述 H1a 毒素缀合。
- [0287] 52. 项 37 的方法,其中所述组合物经粘膜或肌内施用。
- [0288] 53. 项 37 的方法,其中所述组合物经鼻内施用或被吸入。
- [0289] 54. 项 37 的方法,其中所述葡萄球菌性肺部疾病或病症为肺炎。
- [0290] 55. 为患者提供针对葡萄球菌性肺部疾病或病症之保护的方法,其包括对患者施用有效量的包含对金黄色葡萄球菌 α -溶血素 (H1a) 有免疫反应性之抗体的组合物。

- [0291] 56. 项 55 的方法,其中所述抗体为人源化抗体。
- [0292] 57. 项 55 的方法,其中所述抗体为人抗体。
- [0293] 58. 项 55 的方法,其中所述抗体为单克隆抗体或为抗体的免疫性部分。
- [0294] 59. 项 55 的方法,其中所述患者有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症的风险。
- [0295] 60. 项 59 的方法,其中所述患者已住院或即将住院。
- [0296] 61. 项 59 的方法,其中所述患者将进行手术和 / 或将被麻醉。
- [0297] 62. 项 55 的方法,其中所述患者有葡萄球菌性肺部疾病或病症的症状,或已被诊断为患有葡萄球菌性肺部疾病或病症。
- [0298] 63. 项 62 的方法,还包括对患者施用用于治疗金黄色葡萄球菌肺部感染的抗生素。
- [0299] 64. 项 55 的方法,还包括鉴定有罹患葡萄球菌性肺部疾病或病症之风险的患者。
- [0300] 65. 项 55 的方法,其中所述组合物经静脉内施用。
- [0301] 66. 项 55 的方法,其中对所述患者多次施用所述组合物。
- [0302] 67. 项 55 的方法,其中所述葡萄球菌性肺部疾病或病症为肺炎。
- [0303] 68. 特异性结合成熟 H1a 毒素中 1-50 位氨基酸的抗体。
- [0304] 69. 项 68 的抗体,其中所述成熟 H1a 毒素具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。
- [0305] 70. 含有分离多肽的免疫原性组合物,所述分离多肽包含 SEQ ID NO :2 的 1-50 位氨基酸。
- [0306] 71. 项 70 的组合物,其中所述分离多肽包含 SEQ ID NO :2 的不多于 1-50 位氨基酸。
- [0307] 72. 项 71 的组合物,其中所述分离多肽为融合蛋白。
- [0308] 73. 项 70 的组合物,还含有佐剂。
- [0309] 74. 项 70 的组合物,其中所述分离多肽为融合蛋白。
- [0310] 75. 项 70 的组合物,其中所述分离多肽为脂多肽。
- [0311] 76. 项 70 的组合物,其中所述组合物包含于药学上可接受的制剂中,特别是气雾剂制剂。
- [0312] 参考文献
- [0313] 下面的文献明确地以引用方式并入本文,其程度为它们提供作为本文所述方法之补充的示例性方法或其他细节。
- [0314] 美国专利 3,791,932
- [0315] 美国专利 3,949,064
- [0316] 美国专利 4,027,010
- [0317] 美国专利 4,174,384
- [0318] 美国专利 4,327,082
- [0319] 美国专利 4,338,298
- [0320] 美国专利 4,554,101
- [0321] 美国专利 4,578,770
- [0322] 美国专利 4,596,792
- [0323] 美国专利 4,599,230

- [0324] 美国专利 4, 599, 231
- [0325] 美国专利 4, 601, 903
- [0326] 美国专利 4, 608, 251
- [0327] 美国专利 4, 684, 611
- [0328] 美国专利 4, 690, 915
- [0329] 美国专利 4, 748, 018
- [0330] 美国专利 4, 879, 236
- [0331] 美国专利 4, 952, 500
- [0332] 美国专利 5, 084, 269
- [0333] 美国专利 5, 199, 942
- [0334] 美国专利 5, 302, 523
- [0335] 美国专利 5, 322, 783
- [0336] 美国专利 5, 384, 253
- [0337] 美国专利 5, 464, 765
- [0338] 美国专利 5, 512, 282
- [0339] 美国专利 5, 538, 877
- [0340] 美国专利 5, 538, 880
- [0341] 美国专利 5, 548, 066
- [0342] 美国专利 5, 550, 318
- [0343] 美国专利 5, 563, 055
- [0344] 美国专利 5, 580, 859
- [0345] 美国专利 5, 589, 466
- [0346] 美国专利 5, 591, 616
- [0347] 美国专利 5, 610, 042
- [0348] 美国专利 5, 620, 896
- [0349] 美国专利 5, 656, 610
- [0350] 美国专利 5, 702, 932
- [0351] 美国专利 5, 736, 524
- [0352] 美国专利 5, 780, 448
- [0353] 美国专利 5, 789, 215
- [0354] 美国专利 5, 871, 986
- [0355] 美国专利 5, 945, 100
- [0356] 美国专利 5, 958, 895
- [0357] 美国专利 5, 981, 274
- [0358] 美国专利 5, 994, 624
- [0359] 美国专利 6, 651, 655
- [0360] 美国专利 6, 656, 462
- [0361] 美国专利 6, 733, 754
- [0362] 美国专利 6, 756, 361

- [0363] 美国专利 6, 770, 278
- [0364] 美国专利 6, 793, 923
- [0365] 美国专利 6, 814, 971
- [0366] 美国专利 6, 936, 258
- [0367] 美国专利 7, 262, 050
- [0368] Adams 和 Schier, *J. Immunol. Methods*, 231 :249-260, 1999.
- [0369] Adlam 等, *Infect. Immun.* ,17 (2) :250-6, 1977.
- [0370] An, *J. Virol.* ,71 (3) 2292-2302, 1997.
- [0371] Anavi, M.Sc.thesis from the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv University 1998.
- [0372] Atwell 等, *Protein Eng.* ,12 :597-604, 1999.
- [0373] Baba 等, *Lancet.* ,359 :1819-1827, 2002.
- [0374] Bae 等, *Mol. Microbiol.* ,62 :1035-47, 2006.
- [0375] Bae 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :12312-12317, 2004.
- [0376] Barany 和 Merrifield, In :*The Peptides*, Gross 和 Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
- [0377] Bhakdi 和 Tranum-Jensen, *Microbiol. Rev.* ,55 :733-751, 1991.
- [0378] Bhakdi 等, *Behring Inst. Mitt.* ,95) :80-4, 1994.
- [0379] Bird 等, *Science*, 242 :423-426, 1988.
- [0380] Borrebaeck, In :*Antibody Engineering—A Practical Guide*, W. H. Freeman 和 Co. , 1992.
- [0381] Bruggermann, 等, *Immunol.* ,7 :33, 1993.
- [0382] Bubeck-Wardenburg 和 Schneewind, *J Exp Med* ;205 (2) ;287-294, 2008.
- [0383] Bubeck-Wardenburg 等, *Nature Medicine*, 13 (12) :1405-1406, 2007.
- [0384] Bubeck-Wardenburg 等, *Infect. Immun.* ,74 :1040-1044, 2007.
- [0385] Burke 等, *J. Inf. Dis.* ,170 :1110-1119, 1994.
- [0386] Chambers, *N. Engl. J. Med.* ,352 :1485-1487, 2005.
- [0387] Chen 和 Okayama, *Mol. Cell Biol.* ,7 (8) :2745-2752, 1987.
- [0388] Chou 和 Fasman, *Adv. Enzymol.* ,47 :45-148, 1978a.
- [0389] Chou 和 Fasman, *Annu. Rev. Biochem.* ,47 :251-276, 1978b.
- [0390] Chou 和 Fasman, *Biochemistry*, 13 (2) :211-222, 1974a.
- [0391] Chou 和 Fasman, *Biochemistry*, 13 (2) :222-245, 1974b.
- [0392] Chou 和 Fasman, *Biophys. J.* ,26 (3) :385-399, 1979.
- [0393] Colcher 等, *J. Nucl. Med.* ,42 :225-241, 1998.
- [0394] Devereux 等, *Nucl. Acid Res.* ,12 (1) :387-395, 1984.
- [0395] EP 0120694
- [0396] EP 0125023
- [0397] EP-A-0 171496
- [0398] EP-A-0 173494

- [0399] EP-A-0239400
- [0400] Epitope Mapping Protocols,1996
- [0401] Fechheimer,等,Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84 :8463-8467,1987.
- [0402] Fraley 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 :3348-3352,1979.
- [0403] Fridkin 等,N. Engl. J. Med. , 352 :1436-1444,2005.
- [0404] Goodman 等,Cytokine Growth Factor Rev. ,14 :523-535,2003.
- [0405] Gopal, Mol. Cell Biol. ,5 :1188-1190,1985.
- [0406] Gouaux 等,Protein Sci. , 6 :2631-2635,1997.
- [0407] Graham 和 Van Der Eb, Virology, 52 :456-467,1973.
- [0408] Harland 和 Weintraub, J. Cell Biol. , 101 (3) :1094-1099,1985.
- [0409] Harlow 和 Lane, In :Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,1988.
- [0410] Huston 等,Biochemistry, 27 (25) :8945-8952,1988.
- [0411] Huston 等,In :Methods in Enzymology, Langone (Ed.), Academic Press, NY, 203 : 46-88,1991.
- [0412] Jakobovits 等,Nature, 362 :255-8,1993.
- [0413] Jakobovits,等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551-5,1993.
- [0414] Johnson 等,Methods in Enzymol. , 203 :88-99,1991.
- [0415] Johnstone 等, In :Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, Oxford,1982.
- [0416] Jones 等,Nature, 321 :522-525,1986.
- [0417] Kaeppler 等,Plant Cell Reports, 9 :415-418,1990.
- [0418] Kaneda 等,Science, 243 :375-378,1989.
- [0419] Kaneko 等,Gene, 215 :57-67,1998.
- [0420] Kato 等, J. Biol. Chem. , 266 :3361-3364,1991.
- [0421] Kyte 和 Doolittle, J. Mol. Biol. , 157 (1) :105-132,1982.
- [0422] Labandeira-Rey 等,Science, 315 :1130-1133,2007.
- [0423] Lindsay 等, J. Bacteriol. , 188 :669-676,2006.
- [0424] McElroy 等, Infect. Immun. , 67 :5541-5544,1999.
- [0425] Menestrina 等,Toxicon. , 39 :1661-1672,2001.
- [0426] Menzies 和 Kernodle, Infect. Immun. , 64 (5) :1839-41,1996.
- [0427] Mernaugh 等,In :Molecular Methods in Plant Pathology, Singh 等, (Eds.), CRC Press Inc. , Boca Raton, FL, 359-365,1995.
- [0428] Merrifield, Science, 232 (4748) :341-347,1986.
- [0429] Meunier 等, Cytometry, 21 :241-247,1995.
- [0430] Miller 等, N. Engl. J. Med. , 352 :1445-53,2005.
- [0431] Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. , 48 :443,1970.
- [0432] Nicolau 和 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721 :185-190,1982.
- [0433] Nicolau 等, Methods Enzymol. , 149 :157-176,1987.

- [0434] Omirulleh 等, *Plant Mol. Biol.*, 21(3) :415-428, 1993.
- [0435] O' Reilly 等, *Microb. Pathog.*, 1 :125-138, 1986.
- [0436] O' Reilly 等, *Mol. Microbiol.*, 4 :1947-1955, 1990.
- [0437] Panton 和 Valentine, *Lancet*, 222 :506-508, 1932.
- [0438] PCT Appln. WO 86/01533
- [0439] PCT Appln. WO 94/09699
- [0440] PCT Appln. WO 95/06128
- [0441] Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(8) :2444-2448, 1988.
- [0442] Potrykus 等, *Mol. Gen. Genet.*, 199 :183-188, 1985.
- [0443] Remington' s *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. Mack Printing Company, pp. 1289-1329, 1990.
- [0444] Riechmann 等, *Nature*, 332(6162) :323-327, 1988.
- [0445] Rippe, 等, *Mol. Cell Biol.*, 10 :689-695, 1990.
- [0446] Rooijackers 等, *Cell. Microbiol.*, 8 :1282-1293, 2006.
- [0447] Rooijackers 等, *Nat. Immunol.*, 6, 920-927, 2005.
- [0448] Rose 等, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 282 :L207-L214, 2002.
- [0449] Seeger 等, *J. Clin. Invest.*, 74, 849-858, 1984.
- [0450] Seeger 等, *Lab. Invest.*, 63 :341-349, 1990.
- [0451] Smith&Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2 :482, 1981.
- [0452] Song 等, *Science*, 274 :1859-1866, 1996.
- [0453] Stewart 和 Young, In :*Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- [0454] Suttorp 和 Habben, *Infect. Immun.*, 56 :2228-34, 1988.
- [0455] Tam 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 :6442, 1983.
- [0456] Thomson, *J. Immunol.* 157822-61996)
- [0457] Tigges 等, *J. Immunol.*, 156(10) :3901-3910, 1996.
- [0458] Vandenesch 等, *Emerg. Infect. Dis.*, 9 :978-984, 2003.
- [0459] Verhoeyen 等, *Science*, 239(4847) :1534-1536, 1988.
- [0460] Voyich 等, *J. Infect. Dis.*, 194 :1761-1770, 2006.
- [0461] Walker 和 Bailey, *JBC*, 270 :23065-23071, 1995.
- [0462] Wong 等, *Gene*, 10 :87-94, 1980.
- [0463] Woodin In :*Microbial Toxins*, Montje 等, (Eds.), 327, Academic Press Inc., NY, 1970.
- [0464] Zhao 等, *Immunology*, 93 :80-85, 1998.

[0001]

序列表

<110> BUBEK-WARDENBURG, JULIANE
 SCHNEEWIND, OLAF

<120> 与针对葡萄球菌性肺部疾病和病症进行免疫相关的方法和组合物

<130> ARCD:458W0

<140> PCT/US08/74849
 <141> 2008-08-29

<150> 60/969,514
 <151> 2007-08-31

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (234)..(234)
 <223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (301)..(301)
 <223> Xaa 可以是 Ile 或 Thr

<400> 1

Met Lys Thr Arg Ile Val Ser Ser Val Thr Thr Thr Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Ser Ile Leu Met Asn Pro Val Ala Asn Ala Ala Asp Ser Asp Ile Asn
 20 25 30

Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr
 35 40 45

Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val
 50 55 60

Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val
 65 70 75 80

[0002]

Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu
 85 90 95

Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val
 100 105 110

Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr
 115 120 125

Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr
 130 135 140

Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln
 165 170 175

Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly
 180 185 190

Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr
 195 200 205

Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys
 210 215 220

Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Xaa Asn Phe Leu Asp Pro Asn
 225 230 235 240

Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr
 245 250 255

Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp
 260 265 270

Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser
 275 280 285

Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Xaa Asp Arg Ser
 290 295 300

[0003]

Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn
305 310 315

<210> 2
<211> 293
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<220>
<221> misc_feature
<222> (208)..(208)
<223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (275)..(275)
<223> Xaa 可以是 Ile 或 Thr

<400> 2

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
35 40 45

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
50 55 60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
65 70 75 80

Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala
85 90 95

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr
100 105 110

Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp
115 120 125

[0004]

Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His
 130 135 140

Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro
 145 150 155 160

Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn
 165 170 175

Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly
 180 185 190

Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Xaa
 195 200 205

Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe
 210 215 220

Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys
 225 230 235 240

Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr
 245 250 255

Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp
 260 265 270

Lys Trp Xaa Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys
 275 280 285

Glu Glu Met Thr Asn
 290

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成引物

<400> 3

cctcctgttg atggaccct

20

[0005]

<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 4	
ggcgctgagg tagtcnnaag	20
<210> 5	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 5	
gcgggaiccc ccctttcttg aattaaca	28
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 6	
gcgggaicca cattaatttg tcatttcttc	30
<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 7	
gcgggatccg tatalgatga atcclaggca	30
<210> 8	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	

[0006]

<400> 8	
gcggaattct gtttagctca taggattttt ttc	33
<210> 9	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 9	
gccggatccg cagattctga tattaatatt aaaacc	36
<210> 10	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 10	
gcggaattca cattaatttg tcatttcttc	30
<210> 11	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 11	
gccggatccg ctcaacatat cacacctgta agtgag	36
<210> 12	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 12	
gcggaattct gtttagctca taggattttt ttc	33
<210> 13	
<211> 36	
<212> DNA	

[0007]

<213> 人工的

<220>

<223> 合成引物

<400> 13

gccggatecg ataacaatat tgagaatatt ggtgat

36

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成引物

<400> 14

gccgaattct caattatgtc cttcacitt aatttc

36

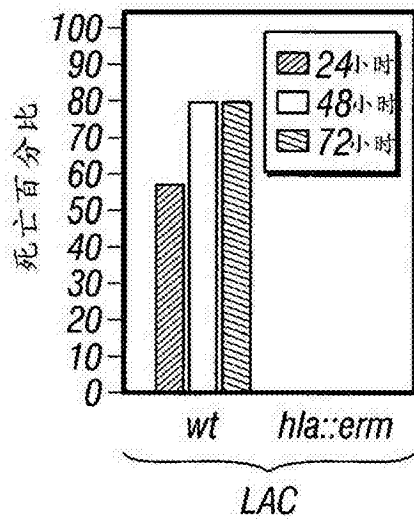


图 1A

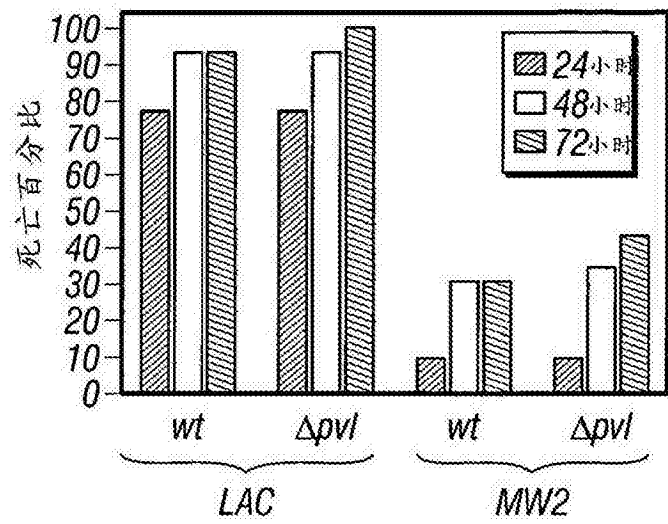


图 1B

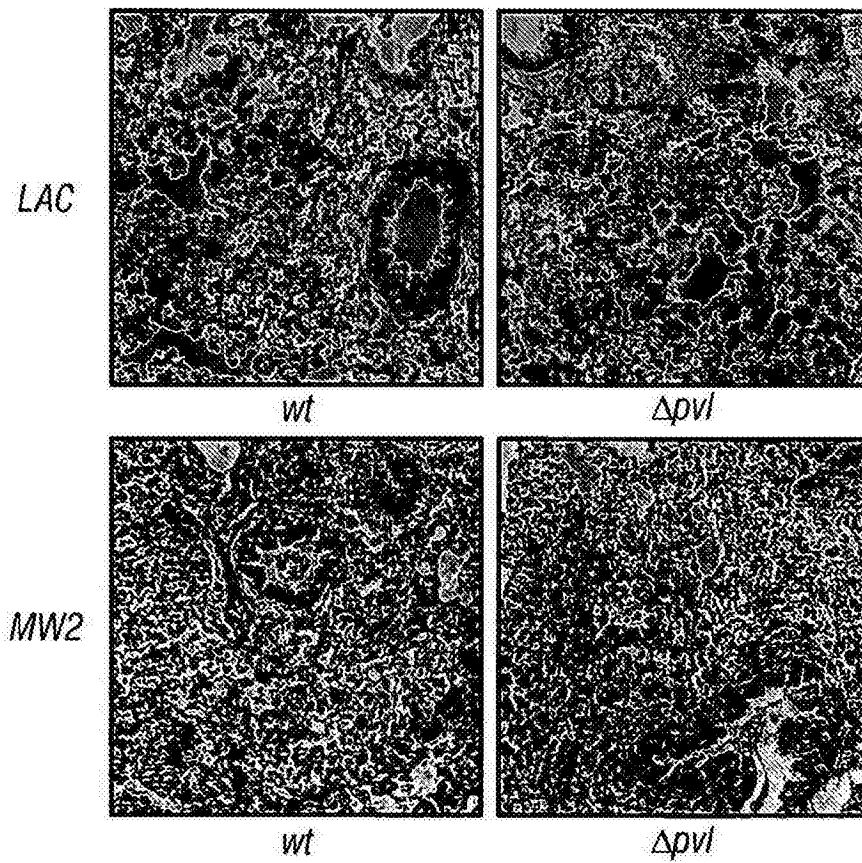


图 1C

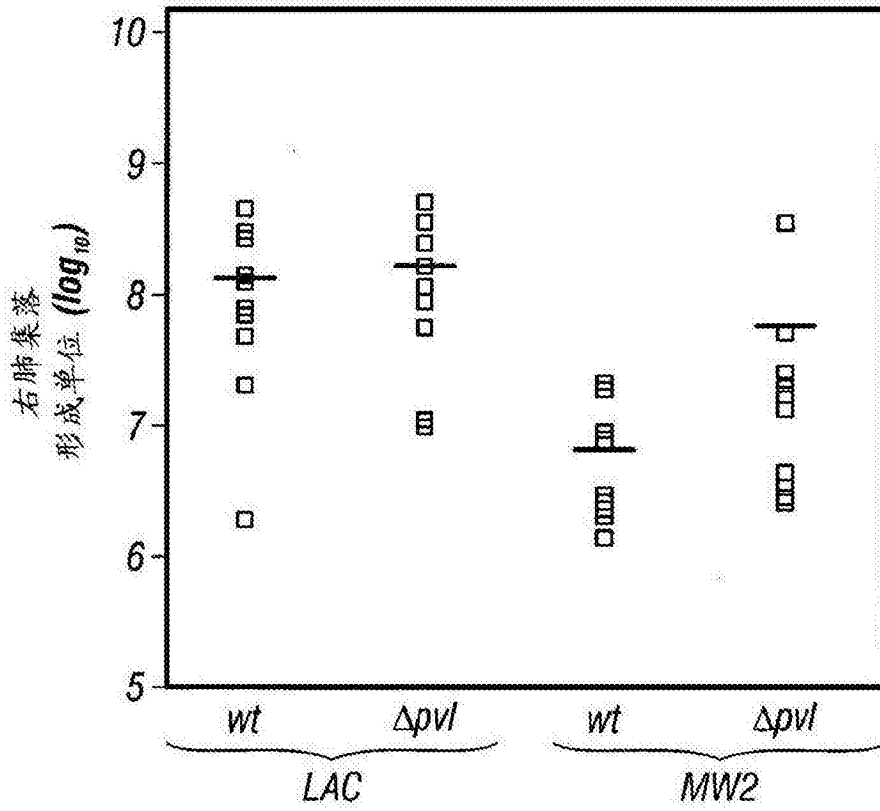


图 2A

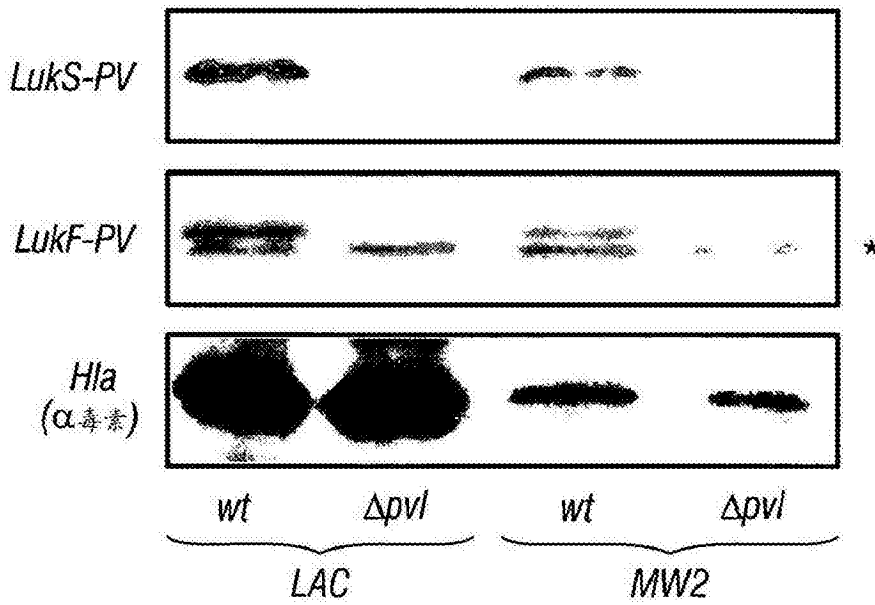


图 2B

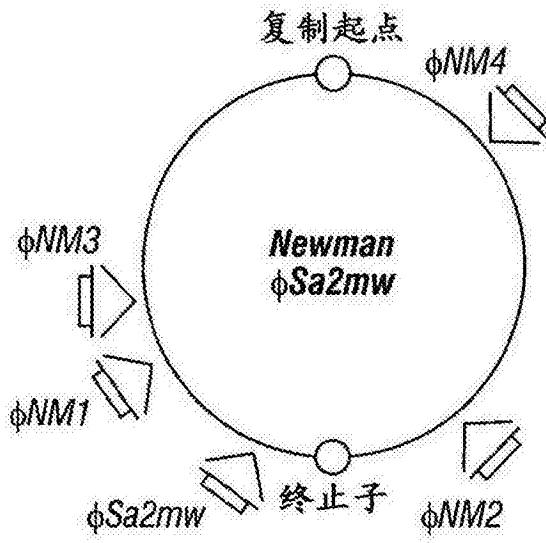


图 3A

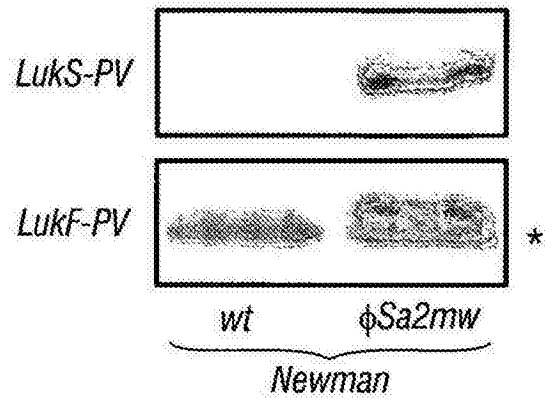


图 3B

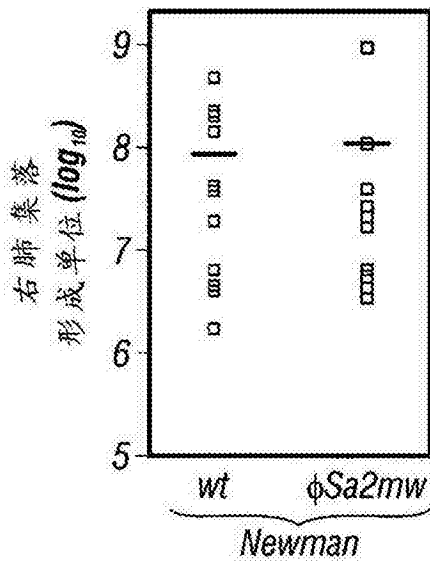


图 3C

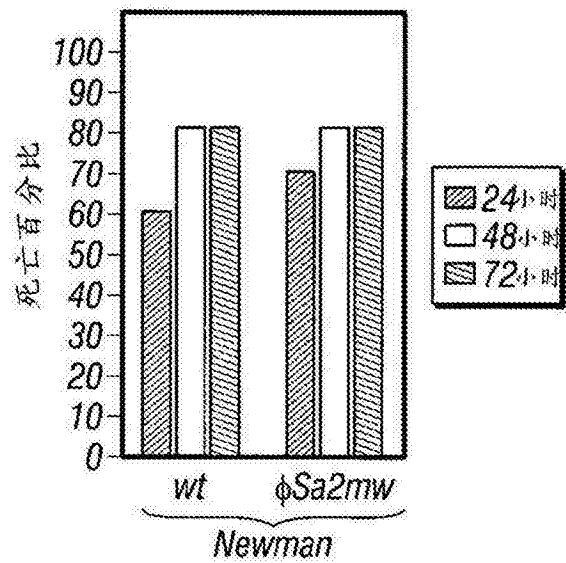


图 3D

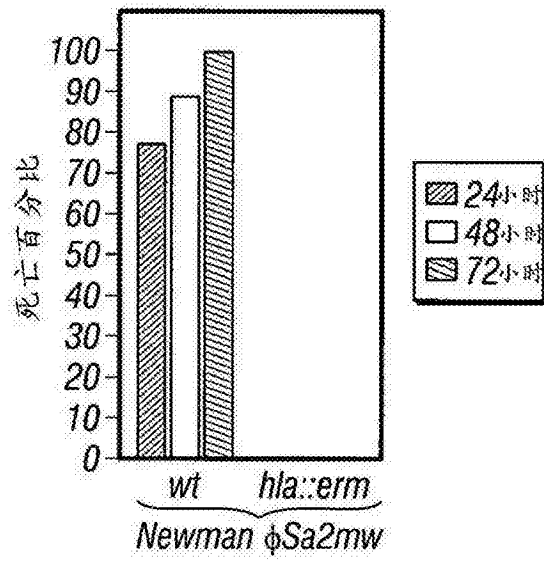


图 3E

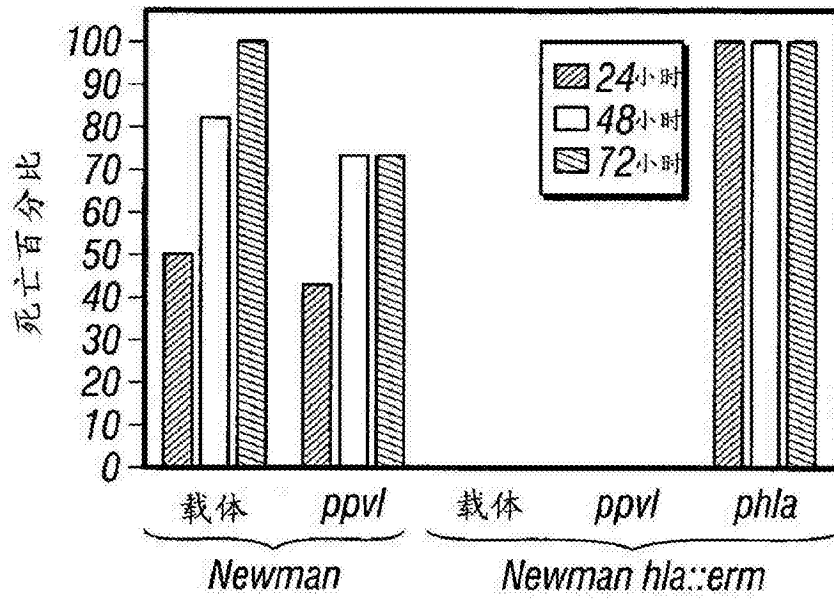


图 4A

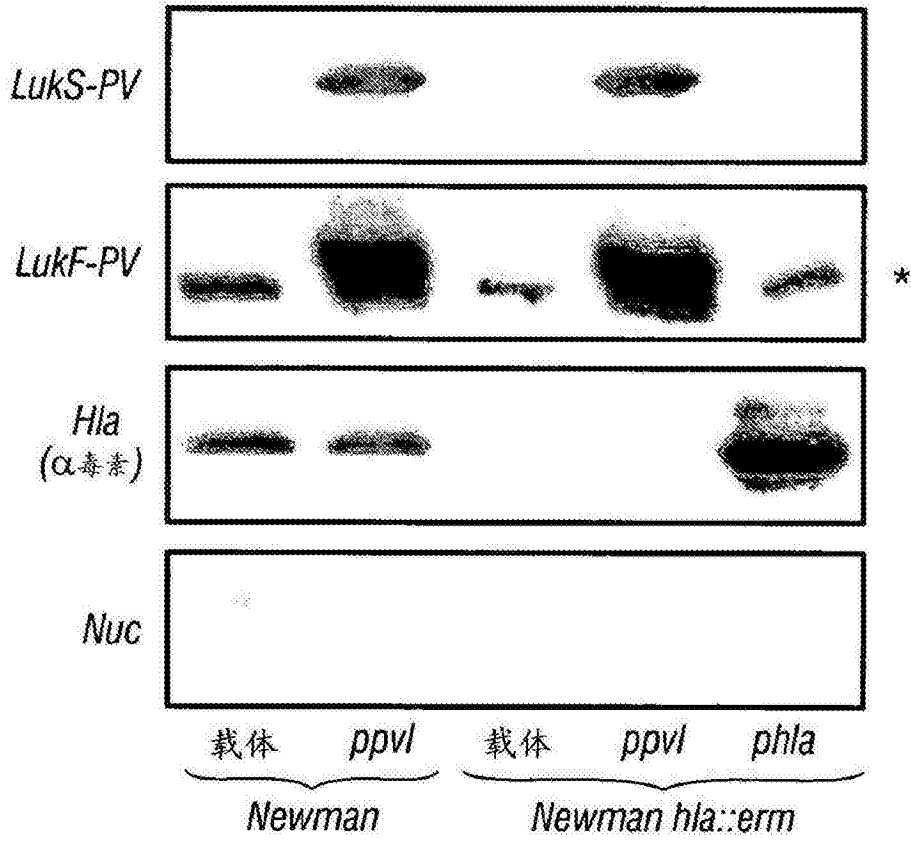


图 4B

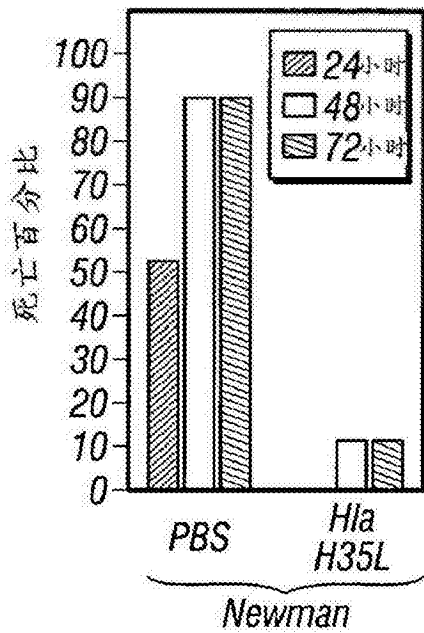


图 5A

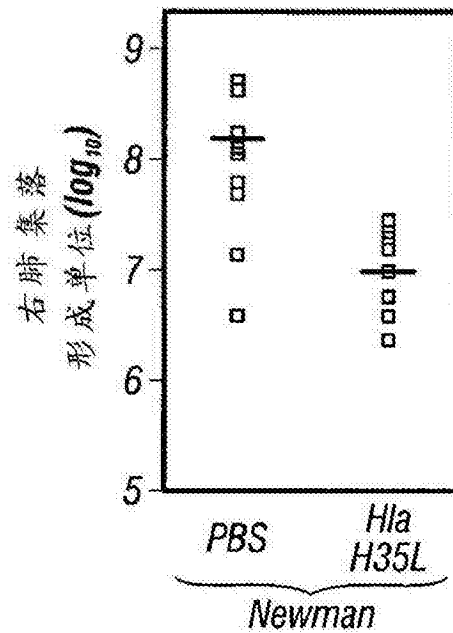


图 5B

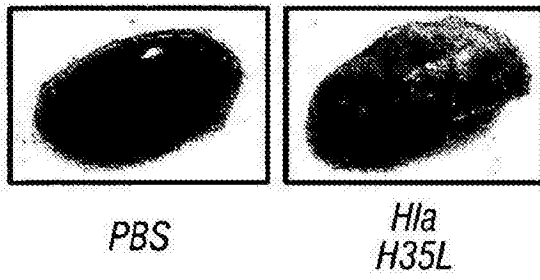


图 5C

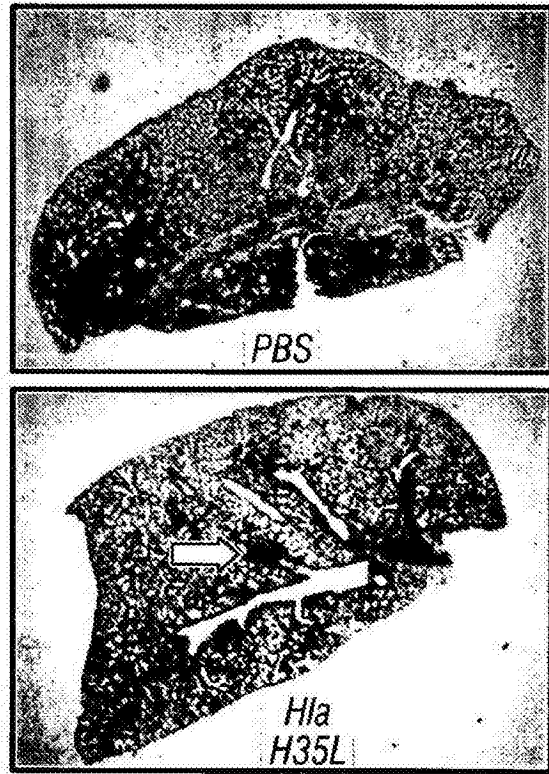


图 5D

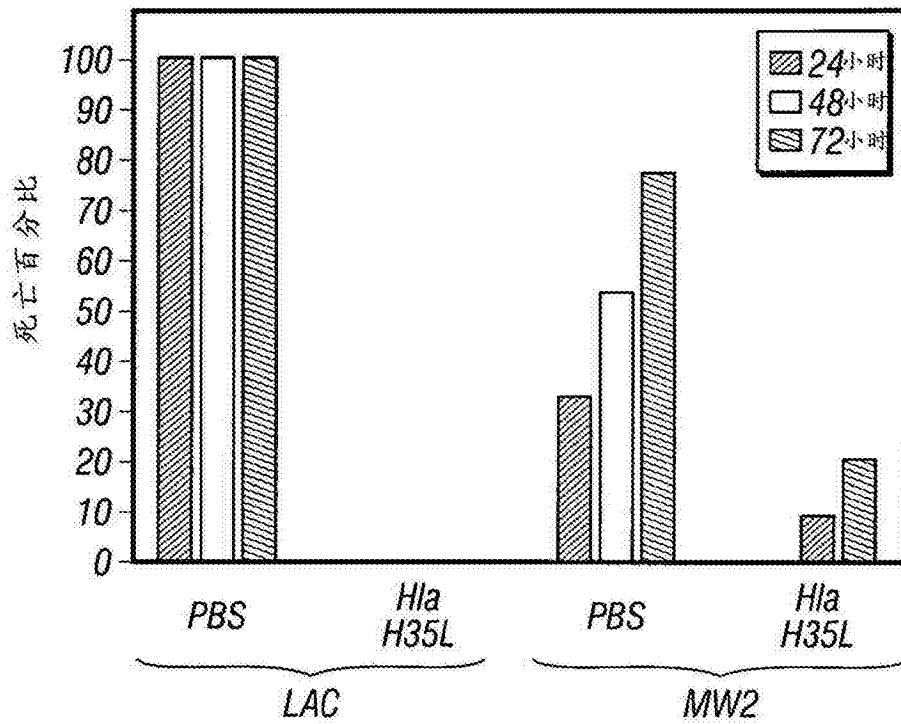


图 5E

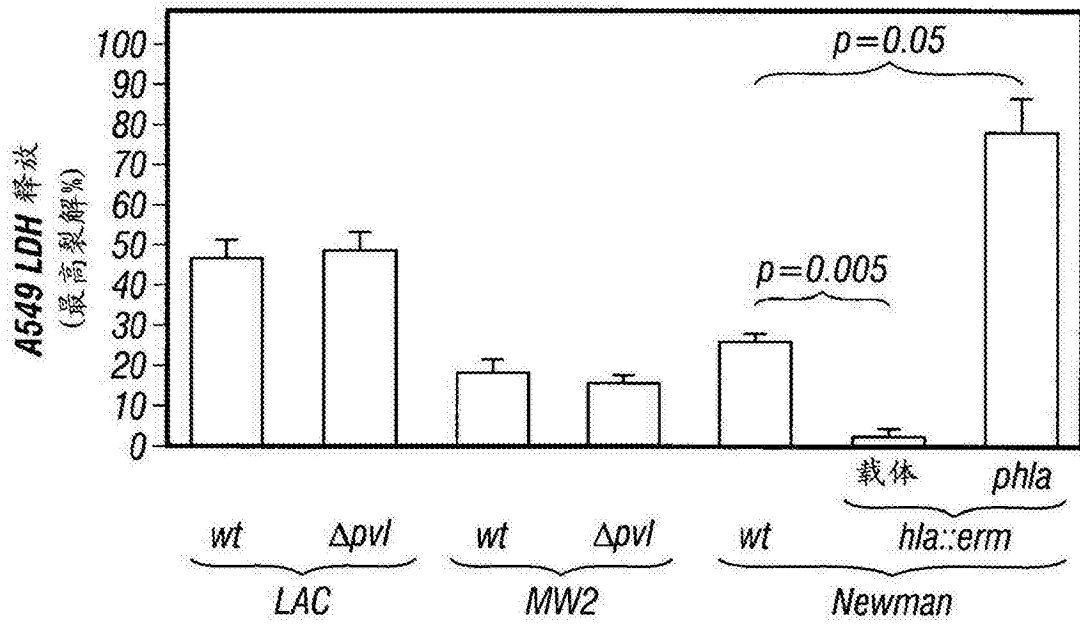


图 6A

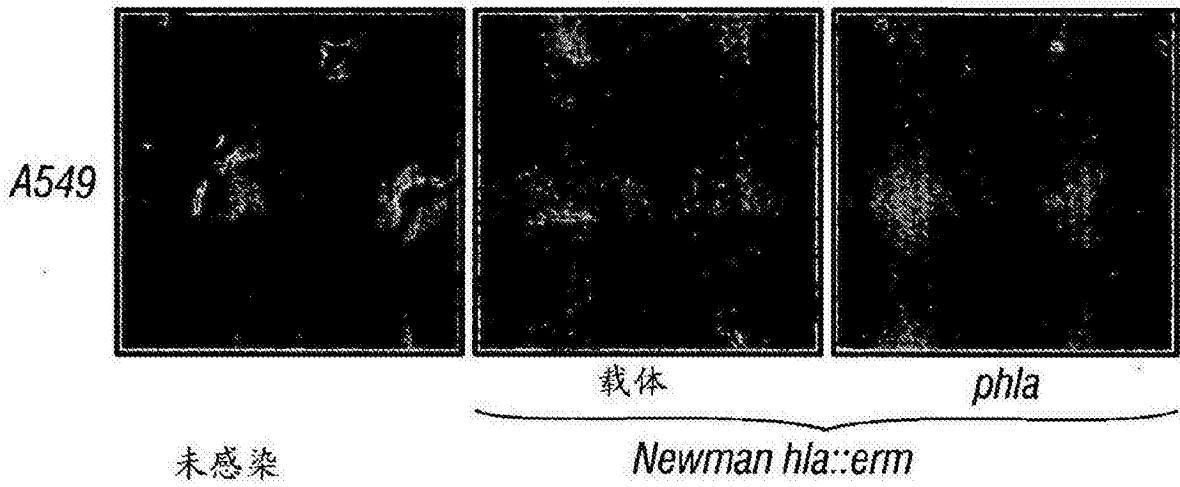


图 6B

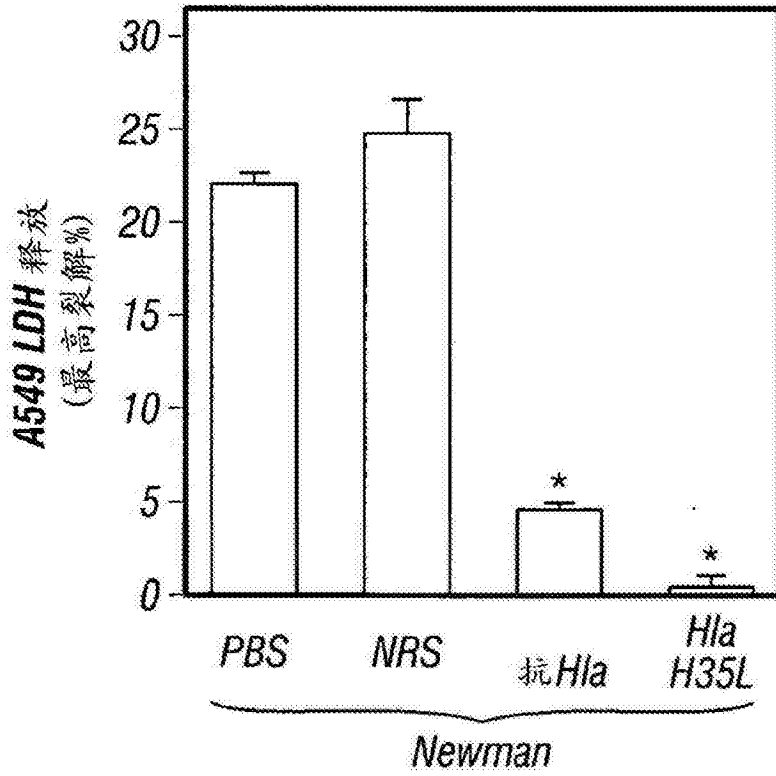


图 6C

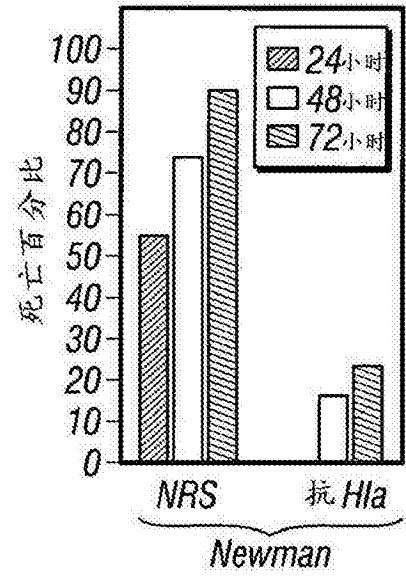


图 7A

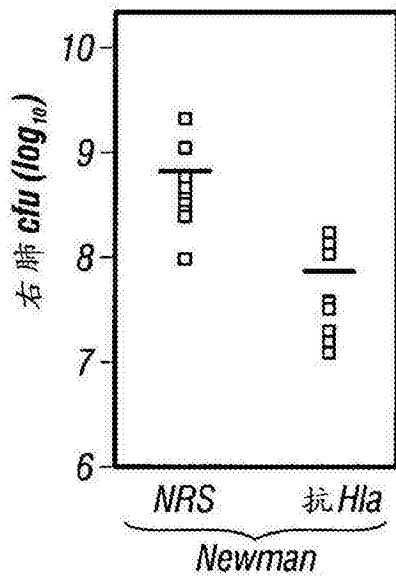


图 7B

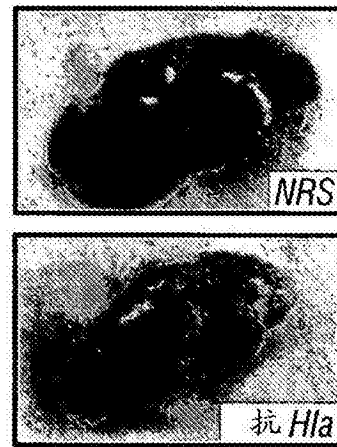


图 7C

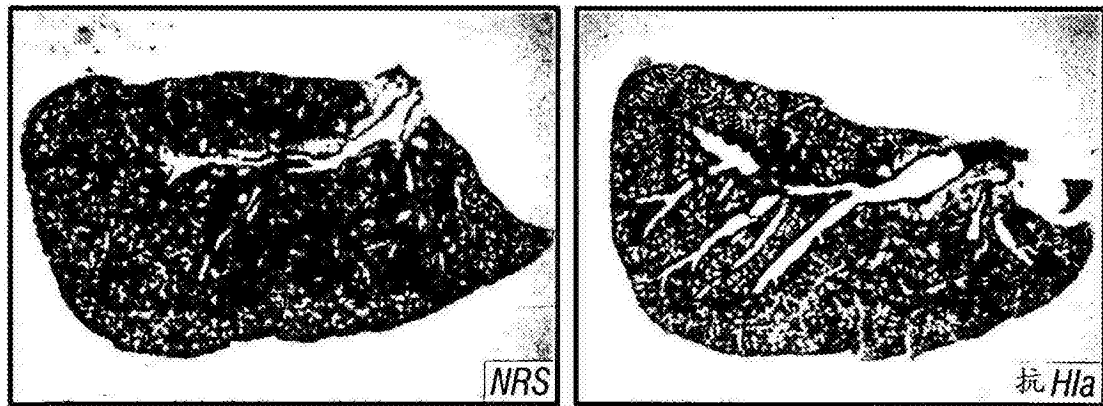


图 7D

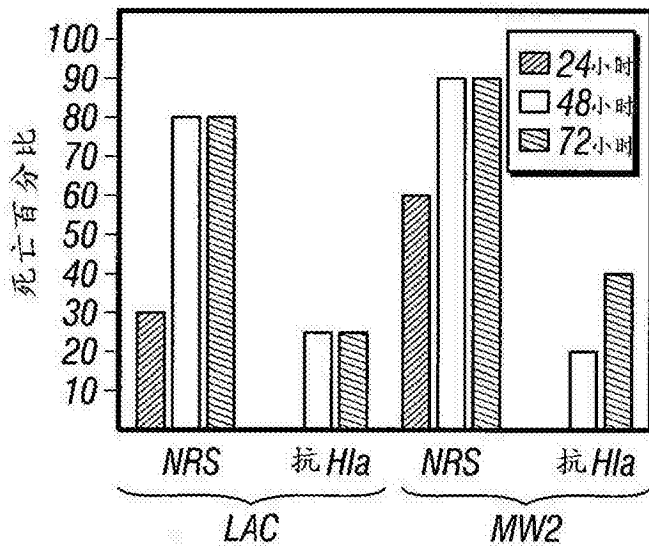


图 7E

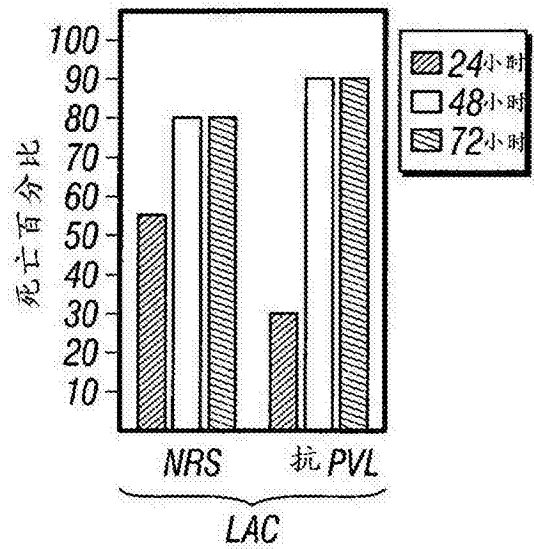


图 7F

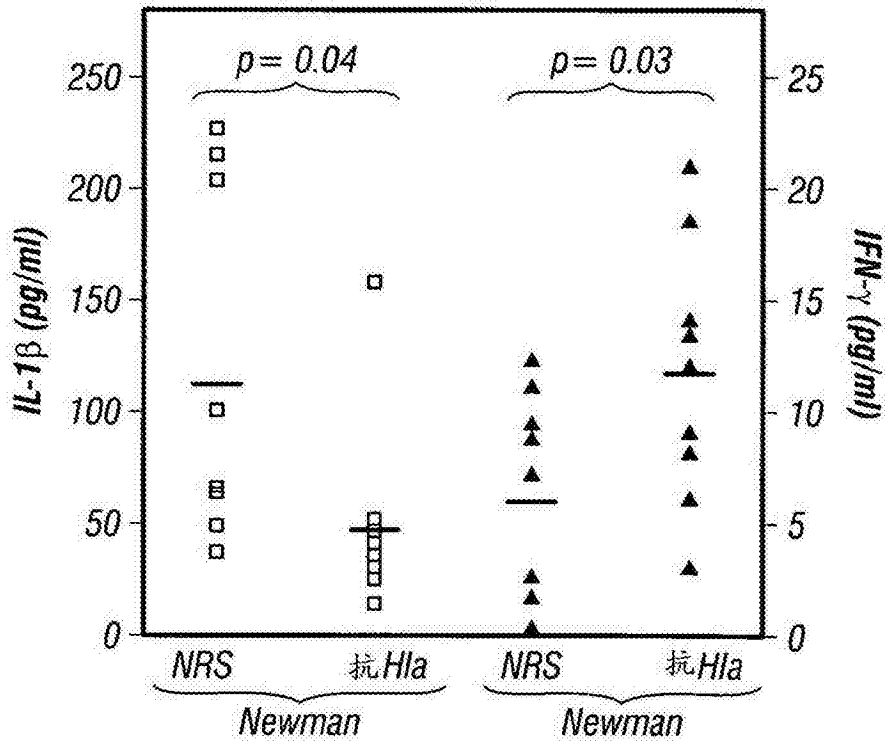


图 8

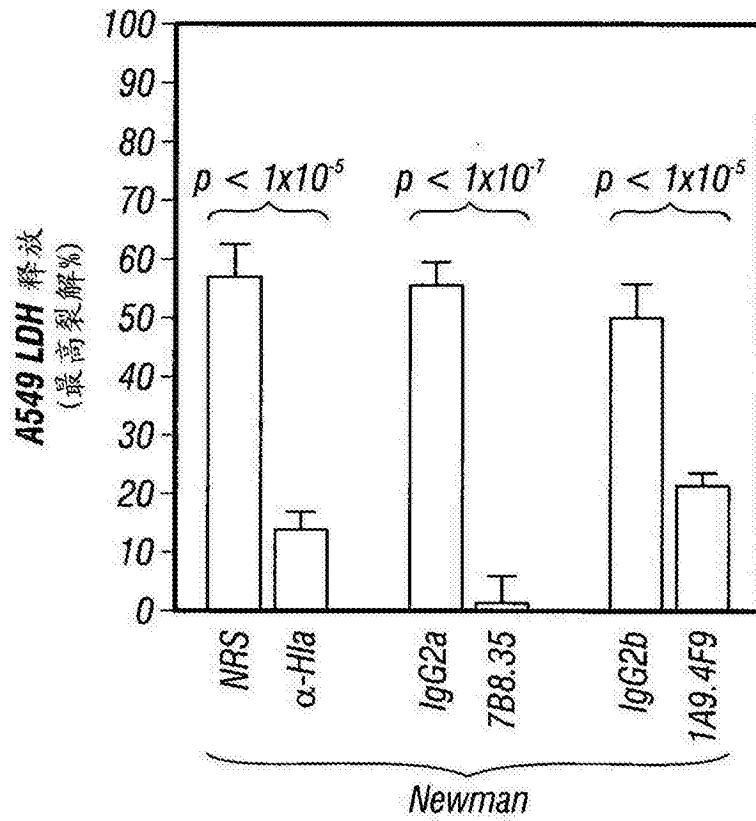


图 9

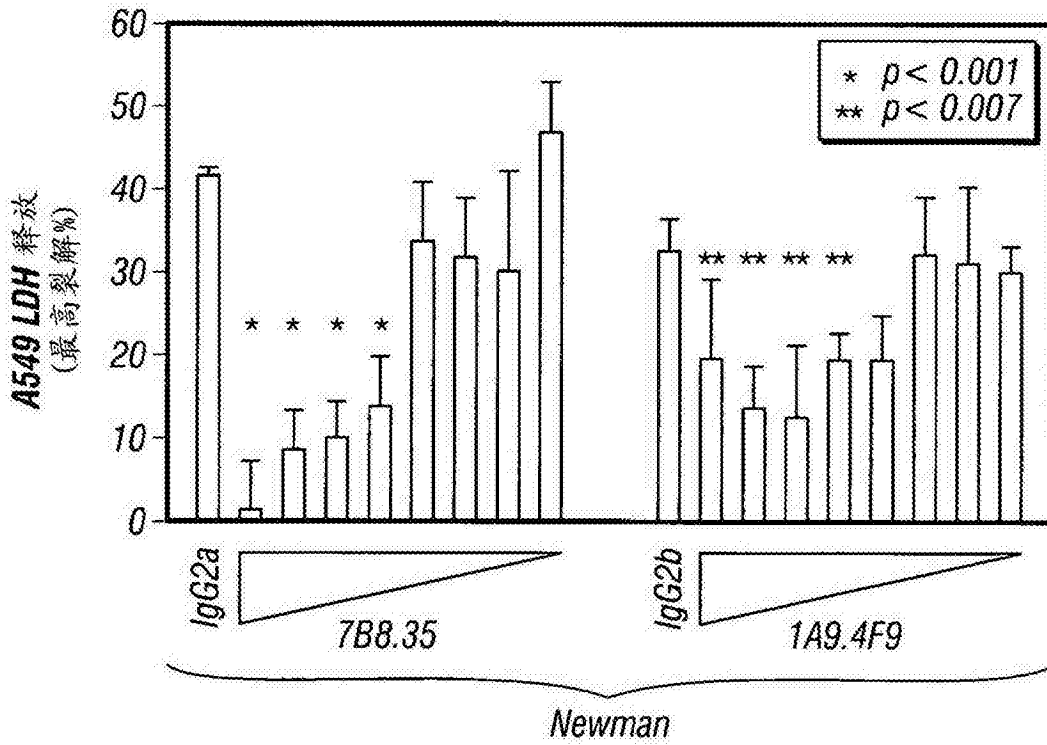


图 10

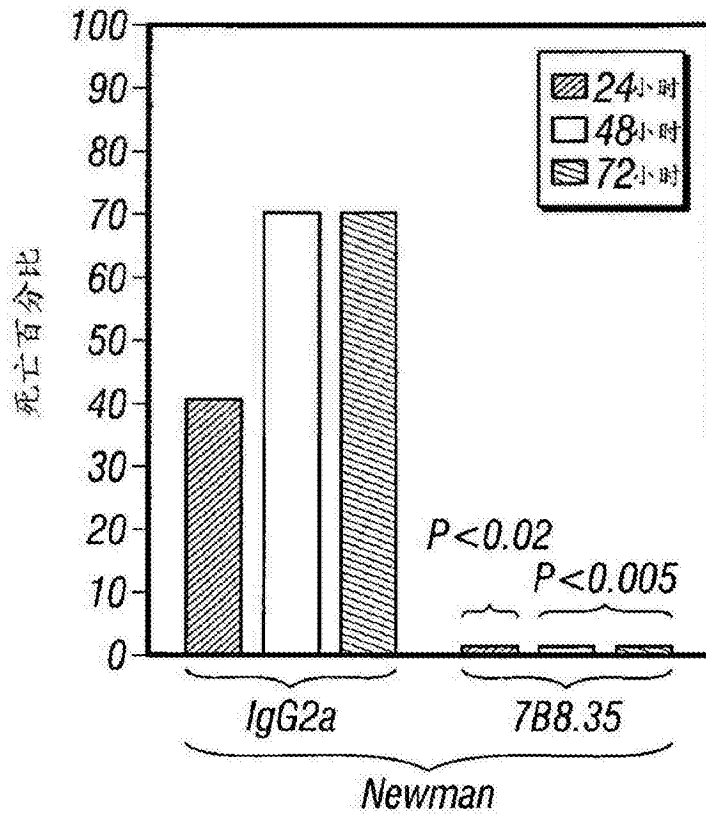


图 11A

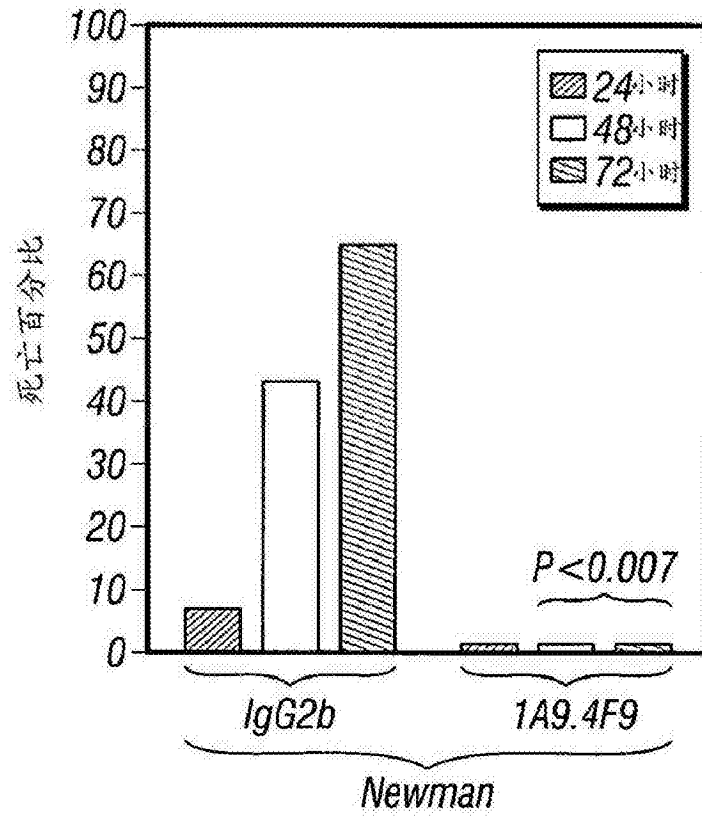


图 11B

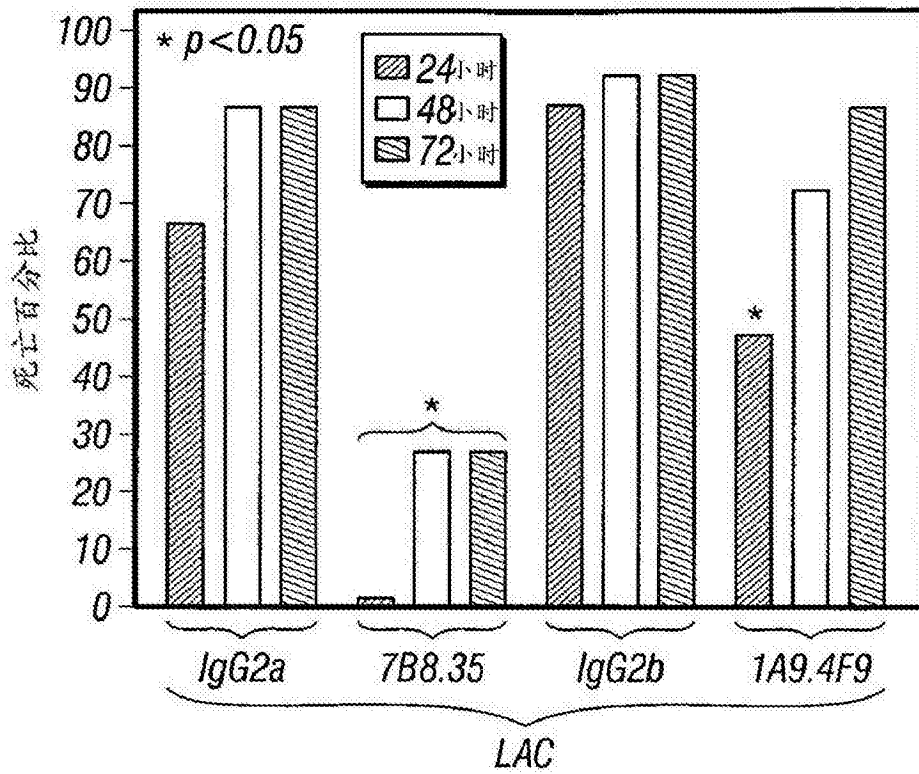


图 12

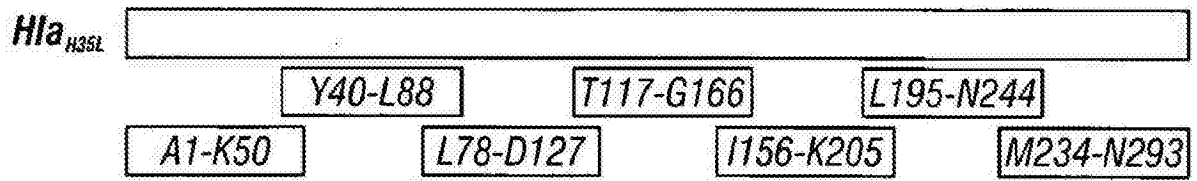


图 13

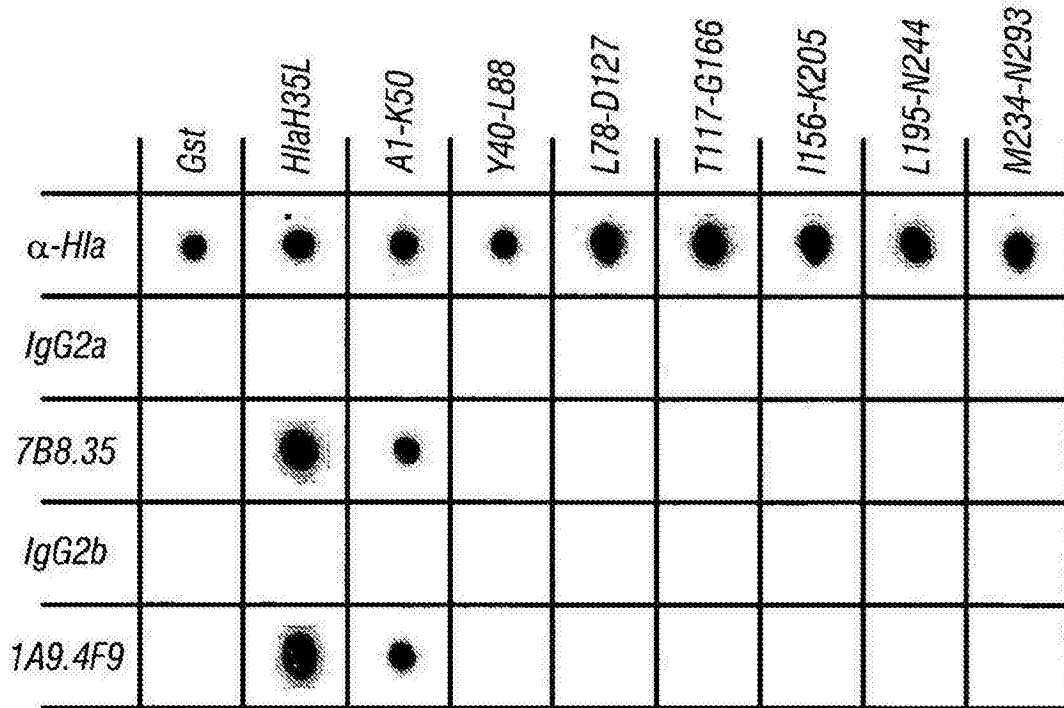


图 14