



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110913883 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880046208.3

(22)申请日 2018.06.13

(30)优先权数据

62/518,641 2017.06.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/037376 2018.06.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/232014 EN 2018.12.20

(71)申请人 综合生物治疗疫苗公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 托马斯·科尔特

尼尔斯·威利斯顿

施韦塔·凯拉桑 哈迪斯·卡鲁祖

拉詹·P·阿迪卡里

穆罕默德·贾瓦德·阿曼

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/085(2006.01)

C07K 14/31(2006.01)

C07K 16/12(2006.01)

权利要求书6页 说明书44页 附图27页

(54)发明名称

包含金黄色葡萄球菌杀白细胞素LUKA和LUKB来源的多肽的免疫原性组合物

(57)摘要

本公开提供了用于预防和治疗金黄色葡萄球菌感染的免疫原性组合物。特别地,本公开提供了诱导针对表达LukAB的金黄色葡萄球菌的免疫应答的方法、预防或治疗金黄色葡萄球菌感染的方法以及用于预防或治疗金黄色葡萄球菌感染的组合物。



1. 一种分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽,所述分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽包含野生型葡萄球菌LukA亚基、野生型葡萄球菌LukB亚基或野生型葡萄球菌LukAB二聚体,除了在所述LukA亚基、所述LukB亚基或在所述LukAB二聚体中的保守残基处具有一个或多个氨基酸取代、缺失或其组合外,

其中所述氨基酸取代、缺失或其组合位于LukAB启动子/启动子界面区、LukAB二聚体/二聚体界面区、LukB膜结合裂隙区、LukB成孔区或其任何组合中的保守残基处,使得所述杀白细胞素亚基形成二聚体、低聚化、在真核细胞的表面上形成孔或其任何组合的能力被破坏,从而相对于相应的野生型杀白细胞素亚基或LukAB二聚体,降低所述突变型杀白细胞素亚基或所述突变型LukAB二聚体的毒性。

2. 如权利要求1所述的突变型亚基,其中所述突变型是免疫原性的,并且引发能够中和野生型毒素的作用的抗体,任选地其中所述突变型相对于所述相应的野生型杀白细胞素亚基引发能够更有效地中和所述野生型毒素的作用的抗体。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的突变型亚基,所述突变型亚基在所述LukAB启动子/启动子界面区中包含突变。

4. 如权利要求3所述的突变型亚基,其中所述突变导致不完整的较大杀白细胞素八聚体环的形成、降低或消除所述毒素的溶血活性或其组合。

5. 如权利要求3或权利要求4所述的突变型亚基,其中所述突变位于对应于SEQ ID NO: 28的R49的LukA位置、对应于SEQ ID NO: 28的L61的LukA位置、对应于SEQ ID NO: 29的D49的LukB位置处或其组合。

6. 如权利要求5所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO: 28的R49的LukA位置被谷氨酸(E)取代。

7. 如权利要求5或权利要求6所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO: 28的R49的LukA R49与对应于SEQ ID NO: 29的D49的LukB D49之间的所述盐桥。

8. 如权利要求5所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO: 28的L61的LukA位置被天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)或精氨酸(R)取代。

9. 如权利要求5或权利要求8所述的突变型亚基,其中所述突变能够破坏在所述LukAB启动子/启动子界面内发现的疏水口袋。

10. 如权利要求5所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO: 29的D49的LukB位置被丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代。

11. 如权利要求10所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO: 29的D49的LukB D49与对应于SEQ ID NO: 28的R49的LukA R49之间的所述盐桥。

12. 如权利要求1或权利要求2所述的突变型亚基,所述突变型亚基在所述LukAB二聚体/二聚体界面区中包含突变。

13. 如权利要求12所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏LukAB二聚体形成、能够破坏真核细胞表面上的LukAB低聚化、能够破坏真核细胞表面上的LukAB孔形成或其组合。

14. 如权利要求12或权利要求13所述的突变型亚基,其中所述突变位于对应于SEQ ID NO: 28的D39的LukA位置、对应于SEQ ID NO: 28的D75的LukA位置、对应于SEQ ID NO: 28的K138的LukA位置、对应于SEQ ID NO: 28的D197的LukA位置、对应于SEQ ID NO: 29的K12的

LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的K19的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB位置处或其任何组合。

15. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA位置被丙氨酸(A)或精氨酸(R)取代。

16. 如权利要求15所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA位置被丙氨酸(A)取代。

17. 如权利要求15或权利要求16所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA D39与对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB K58之间的所述盐桥。

18. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA位置被丙氨酸(A)取代。

19. 如权利要求18所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75与对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23之间的所述盐桥。

20. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA位置被丙氨酸(A)取代。

21. 如权利要求20所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA K138与对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB E112之间的所述盐桥。

22. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA位置被丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代。

23. 如权利要求22所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA D197与对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB K218之间的所述盐桥。

24. 如权利要求14所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23与对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75之间的所述盐桥。

25. 如权利要求14或权利要求24所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的K12的LukB位置被丙氨酸(A)取代,和/或所述对应于SEQ ID NO:29的K19的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

26. 如权利要求14或权利要求24所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代。

27. 如权利要求26所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置被谷氨酸(E)取代。

28. 如权利要求14或权利要求24所述的突变型亚基,所述突变型亚基包含三重突变型LukB,其中所述对应于SEQ ID NO:29的K12的LukB位置被丙氨酸(A)取代,所述对应于SEQ ID NO:29的K19的LukB位置被丙氨酸(A)取代,并且所述对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代。

29. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代。

30. 如权利要求29所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB K58与对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA D39之间的所述盐桥。

31. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB位

置被丙氨酸(A)取代。

32. 如权利要求31所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB E112与对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA K138之间的所述盐桥。

33. 如权利要求14所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

34. 如权利要求33所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB K218与对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA D197之间的所述盐桥。

35. 如权利要求1或权利要求2所述的突变型亚基,所述突变型亚基在所述LukB膜结合裂隙区中包含突变。

36. 如权利要求35所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够破坏LukB与真核细胞的脂质双层的极性头基的相互作用。

37. 如权利要求35或权利要求36所述的突变型亚基,其中所述突变位于对应于SEQ ID NO:29的H180的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的E197的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的R203的LukB位置处或其任何组合。

38. 如权利要求37所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的H180的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

39. 如权利要求37所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的E197的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

40. 如权利要求37所述的突变型亚基,其中所述对应于SEQ ID NO:29的R203的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

41. 如权利要求1或权利要求2所述的突变型亚基,所述突变型亚基在所述LukB成孔区中包含突变。

42. 如权利要求41所述的突变型亚基,所述突变型亚基能够阻碍在真核细胞中形成的LukAB孔的细胞质边缘,从而阻碍孔形成。

43. 如权利要求41或权利要求42所述的突变型亚基,所述突变型亚基包含对应于SEQ ID NO:29的F125至T133的氨基酸的缺失。

44. 如权利要求43所述的突变型亚基,所述突变型亚基还包含在对应于SEQ ID NO:29的D124的氨基酸之后一个、两个、三个、四个或五个甘氨酸(G)残基的插入。

45. 如权利要求1至44中任一项所述的突变型亚基,所述突变型亚基与所述相应的野生型杀白细胞素亚基相比在嗜中性粒细胞毒性测定中的毒性较低。

46. 如权利要求1至45中任一项所述的突变型亚基,其中所述野生型LukA亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43以及SEQ ID NO:44。

47. 如权利要求1至45中任一项所述的突变型亚基,其中所述野生型LukB亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID

NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54以及SEQ ID NO:55。

48. 一种分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽, 所述分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽包含野生型LukB亚基, 除了其中对应于SEQ ID NO:29的氨基酸残基1至29的LukB位置被SEQ ID No:58的氨基酸残基1至29或HlgB的氨基酸残基1至29取代之外。

49. 如权利要求48所述的突变型亚基, 所述突变型亚基还包含如权利要求1至47中任一项所述的氨基酸取代、缺失或其组合。

50. 如权利要求48或权利要求49所述的突变型亚基, 所述突变型亚基能够降低LukAB毒性、产生对HlgB的N-末端残基的抗体应答或其组合。

51. 一种多肽复合物, 所述多肽复合物包含如权利要求1至47中任一项所述的突变型LukA亚基、如权利要求1至50中任一项所述的突变型LukB亚基、如权利要求1至50中任一项所述的突变型LukAB二聚体或其任何组合。

52. 如权利要求51所述的多肽复合物, 所述多肽复合物包含LukAB二聚体, 其中所述LukAB二聚体包含突变型LukA亚基和突变型LukB亚基两者。

53. 如权利要求52所述的多肽复合物, 其中所述LukAB二聚体包含:

- (a) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB D49K;
- (b) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB R23A;
- (c) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB R23E;
- (d) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB E112A;
- (e) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB R203A;
- (f) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB K218A;
- (g) SEQ ID NO:28的LukA L61R, SEQ ID NO:29的LukB K12A/K19A/R23A;
- (h) SEQ ID NO:28的LukA L61R和SEQ ID NO:29的LukB-HlgB;
- (i) SEQ ID NO:28的LukA D39A和SEQ ID NO:29的LukB E112A;
- (j) SEQ ID NO:28的LukA D39A, SEQ ID NO:29的LukB K12A/K19A/R23A;
- (k) SEQ ID NO:28的LukA D39A, SEQ ID NO:29的LukB K12A/K19A/R23E;
- (l) SEQ ID NO:28的LukA D39A和SEQ ID NO:29的LukB R23E;
- (m) SEQ ID NO:28的LukA D39A和SEQ ID NO:29的LukB K218A;
- (n) SEQ ID NO:28的LukA D39R和SEQ ID NO:29的LukB E112A;
- (o) SEQ ID NO:28的LukA D39R和SEQ ID NO:29的LukB R23E;
- (p) SEQ ID NO:28的LukA D39R和SEQ ID NO:29的LukB K218A;
- (q) SEQ ID NO:28的LukA D39R, SEQ ID NO:29的LukB K12A/K19A/R23A;
- (r) SEQ ID NO:28的LukA D39R, SEQ ID NO:29的LukB K12A/K19A/R23E;
- (s) SEQ ID NO:28的LukA D197K和SEQ ID NO:29的LukB R23A;
- (t) SEQ ID NO:28的LukA D197K和SEQ ID NO:29的LukB R23E; 或
- (u) SEQ ID NO:28的LukA K138A和SEQ ID NO:29的LukB K218A。

54. 如权利要求52或权利要求53所述的多肽复合物, 所述多肽复合物包含LukA D39A和LukB R23E。

55. 如权利要求51至54中任一项所述的多肽复合物,所述多肽复合物还包含另外的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽,其中所述另外的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽比所述相应的野生型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽毒性低。

56. 如权利要求55所述的多肽复合物,其中所述另外的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽是突变型LukA亚基、突变型LukB亚基、突变型LukS-PV亚基、突变型LukF-PV亚基、突变型LukE亚基、突变型LukD亚基、突变型 γ 溶血素A、突变型 γ 溶血素B、突变型 γ 溶血素C或其任何组合。

57. 如权利要求51至56中任一项所述的多肽复合物,其中所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽经由肽键或化学缀合连接。

58. 如权利要求1至50中任一项所述的突变型亚基或如权利要求51至57中任一项所述的多肽复合物,所述突变型亚基或所述多肽复合物还包含异源氨基酸序列。

59. 如权利要求58所述的突变型亚基或多肽复合物,其中所述异源氨基酸序列编码选自自由以下组成的组的肽:His-标签、泛素标签、NusA标签、几丁质结合结构域、B-标签、HSB-标签、绿色荧光蛋白(GFP)、钙调素结合蛋白(CBP)、半乳糖结合蛋白、麦芽糖结合蛋白(MBP)、纤维素结合结构域(CBD)、抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白/Strep-标签、trpE、氯霉素乙酰转移酶、lacZ(β -半乳糖苷酶)、FLAGTM肽、S-标签、T7-标签、所述异源肽中任一者的片段以及所述异源肽中的两者或更多者的组合。

60. 如权利要求58所述的突变型亚基或多肽复合物,其中所述异源氨基酸序列编码选自自由以下组成的组的肽:免疫原、T细胞表位、B细胞表位、专职性APC呈递表位、MHC I类或MHC II类呈递表位、所述异源肽中任一者的片段以及所述异源肽中的两者或更多者的组合。

61. 一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸包含编码如权利要求1至50中任一项所述的突变型亚基或如权利要求51至57中任一项所述的多肽复合物的核酸。

62. 如权利要求61所述的多核苷酸,所述多核苷酸还包含异源核酸。

63. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中所述异源核酸包含与所述编码所述多肽的核酸可操作地缔合的启动子。

64. 一种载体,所述载体包含如权利要求61至63中任一项所述的多核苷酸。

65. 如权利要求64所述的载体,所述载体是质粒。

66. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求64或权利要求65所述的载体。

67. 如权利要求66所述的宿主细胞,所述宿主细胞是细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞、酵母或植物细胞。

68. 如权利要求67所述的宿主细胞,其中所述细菌是大肠杆菌。

69. 一种产生突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽的方法,所述方法包括培养如权利要求66至68中任一项所述的宿主细胞,以及回收所述多肽。

70. 一种组合物,所述组合物包含如权利要求1至50中任一项所述的突变型亚基或如权利要求51至57所述的多肽复合物以及载剂。

71. 如权利要求70所述的组合物,所述组合物还包含佐剂。

72. 如权利要求70或权利要求71所述的组合物,所述组合物还包含另外的葡萄球菌抗原。

73. 如权利要求72所述的组合物,其中所述另外的葡萄球菌抗原是 α -溶血素亚基多肽。
74. 一种诱导针对金黄色葡萄球菌菌株的宿主免疫应答的方法,所述方法包括向需要所述免疫应答的受试者施用有效量的如权利要求70至73中任一项所述的组合物。
75. 如权利要求74所述的方法,其中所述免疫应答是抗体应答。
76. 如权利要求74所述的方法,其中所述免疫应答选自由以下组成的组:先天性应答、适应性应答、体液应答、抗体应答、细胞介导的应答、B细胞应答、T细胞应答、细胞因子上调或下调、免疫系统串扰以及所述免疫应答中的两种或更多种的组合。
77. 如权利要求76所述的方法,其中所述免疫应答选自由以下组成的组:先天性应答、体液应答、抗体应答、T细胞应答以及所述免疫应答中的两种或更多种的组合。
78. 如权利要求74至77中任一项所述的方法,其中所述免疫应答导致野生型葡萄球菌杀白细胞素毒素的至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%中和。
79. 一种预防或治疗受试者的葡萄球菌疾病和/或感染的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如权利要求70至73中任一项所述的组合物。
80. 如权利要求79所述的方法,所述方法还包括施用包含抗杀白细胞素亚基抗体和/或抗 α -溶血素亚基抗体的组合物。
81. 如权利要求79或权利要求80所述的方法,其中所述感染是皮肤、软组织、血液或器官的局部或全身性感染,或者本质上是自身免疫的。
82. 如权利要求79至81中任一项所述的方法,其中所述疾病是呼吸系统疾病。
83. 如权利要求80所述的方法,其中所述呼吸系统疾病是肺炎。
84. 如权利要求79至81中任一项所述的方法,其中所述感染是全身性感染和/或血液感染。
85. 如权利要求74至84中任一项所述的方法,其中所述受试者是脊椎动物。
86. 如权利要求85所述的方法,其中所述脊椎动物是哺乳动物。
87. 如权利要求86所述的方法,其中所述哺乳动物是灵长类动物。
88. 如权利要求87所述的方法,其中所述灵长类动物是人。
89. 如权利要求74至88中任一项所述的方法,其中所述组合物经由肌肉注射、皮内注射、腹膜内注射、皮下注射、静脉内注射、口服施用、粘膜施用、鼻内施用或肺部施用来施用。
90. 一种产生针对金黄色葡萄球菌感染的疫苗的方法,所述方法包括:
- (a) 分离如权利要求1至50中任一项所述的突变型杀白细胞素亚基或如权利要求51至57所述的多肽复合物;以及
- (b) 将所述突变型杀白细胞素亚基或所述多肽复合物与佐剂组合。
91. 如权利要求90所述的方法,所述方法还包括将所述突变型杀白细胞素亚基或所述多肽复合物与另外的葡萄球菌抗原组合。
92. 如权利要求91所述的方法,其中所述另外的葡萄球菌抗原是 α -溶血素亚基多肽。

包含金黄色葡萄球菌杀白细胞素LUKA和LUKB来源的多肽的免疫原性组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是要求2017年6月13日提交的美国临时申请号62/518,641的权益的国际专利申请,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 政府权利

[0004] 本发明是在政府支持下根据美国国立卫生研究院授予的R01AI111205进行。政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 本公开涉及治疗和预防金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*/S.aureus) 感染。特别地,本公开提供了用于预防金黄色葡萄球菌感染和治疗由杀白细胞素 (例如LukAB、LukED、Panton-Valentine杀白细胞素 (PVL)) 引起的疾病或表达 γ -溶血素的金黄色葡萄球菌感染的组合物和方法。

[0006] 金黄色葡萄球菌 (SA) 是与从皮肤和软组织感染至危及生命的全身性感染 (例如,皮肤感染如丘疹、脓疱病、疖 (疔疮)、蜂窝组织炎毛囊炎、疔、烫伤样皮肤综合征和脓肿)、至危及生命的深部感染如肺炎、败血症、心内膜炎、脑膜炎、术后伤口感染、败血症和中毒性休克综合征范围内的各种各样的病理相关或引起所述各种各样的病理的革兰氏阳性人病原体 (Nizet,V.,J Allergy Clin Immunol,2007.120 (1):第13-22页;Kotzin,等人,Adv Immunol,1993.54:第99-166页;Meyer等人,Int J Infect Dis,2001.5 (3):第163-6页;Schuberth等人,Vet Microbiol,2001.82 (2):第187-99页;以及Silverstein等人,于Microbiology,Davis等人,编 (Lippincott,Philadelphia,1990),第485-506页中)。

[0007] 肺炎是金黄色葡萄球菌感染的最严重和突出的并发症之一,仅在美国每年就导致50,000例病例 (Kuehnert,等人,Emerg.Infect.Dis.11:868-872,2005)。金黄色葡萄球菌肺炎传统上一直与呼吸机相关,但近年来它也被认为是主要在本来健康儿童和年轻个体中的社区获得性肺炎的主要原因。

[0008] SA相关病理的范围反映这种微生物使用多种毒力因子 (包括凝固酶、荚膜多糖、粘附素、蛋白酶、使补体系统失活的胞外蛋白、成孔毒素和其它先天性应答介质) 逃避先天性和适应性免疫应答的多种能力 (Nizet,V.,J Allergy Clin Immunol,2007.120 (1):第13-22页;Tristan等人,J Hosp Infect,2007.65增刊2:第105-9页)。耐甲氧西林的SA (MRSA) 的迅速传播强调了开发用于预防MRSA感染或降低MRSA感染的严重程度的疫苗的重要性。用于疫苗开发的大多数先前方法都忽略了包括减毒毒素组分以解除SA的免疫逃避策略的重要性。

[0009] 在世界各地的医院中,已经观察到对目前可用于治疗感染的大多数抗生素表现出耐药性的金黄色葡萄球菌分离株的显著增加。尽管MRSA菌株最初仅限于医疗机构,但据报告,社区相关的金黄色葡萄球菌 (CA-MRSA) 的最近流行病在本来健康的群体中引起严重疾病。迄今为止,五种CA-MRSA克隆谱系与这些爆发相关:中西部克隆 (USA400,CC1)、欧洲克隆

(CC80)、西南太平洋大洋洲克隆(CC30)、太平洋克隆(CC59)和大流行性克隆(USA300,CC8)。除SCCmec IV外,这些主要CA-MRSA谱系的特征性特征还在于它们具有编码Panton Valentine杀白细胞毒素(PVL)的lukPV操纵子(Diep,B.A.和M.Otto,Trends Microbiol, 2008.16(8):第361-9页),由溶原性噬菌体 ϕ SLT、 ϕ PVL、 ϕ SA2MW和 ϕ SA2usa携带(Diep等人,Lancet,2006.367(9512):第731-9页;Kaneko等人,Gene,1998.215(1):第57-67页;Narita等人,Gene,2001.268(1-2):第195-206页)。对抗金黄色葡萄球菌的青霉素的开发是感染控制和治疗的重大进展。不幸的是,耐青霉素的生物体快速出现,并且对新的抗生素的需求至关重要。随着每种新的抗生素的引入,金黄色葡萄球菌已经能够对抗 β -内酰胺酶、改变的青霉素结合蛋白和突变的细胞膜蛋白,从而允许细菌持久。因此,耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)和多重耐药性生物体已经出现,并且在世界各地的医院和疗养院确立了主要立足点。(Chambers,H.F.,Clin Microbiol Rev.,1:173,1988;和Mulligan,M.E.,等人,Am J Med.,94:313,1993)。如今,几乎一半的引起医院感染的葡萄球菌菌株对所有抗生素(除万古霉素和利奈唑胺外)都具有耐药性。由于在文献中已报告了MRSA中许多耐万古霉素中间体的金黄色葡萄球菌(VISA)和一些耐万古霉素的金黄色葡萄球菌,因此万古霉素也将变得无效似乎只是时间问题。(Appelbaum PC.,Clin Microbiol Infect.,12增刊1:16-23,2006)。

[0010] 对金黄色葡萄球菌感染的天然免疫性仍然了解甚少。通常,健康人和动物对金黄色葡萄球菌感染表现出高度的先天抗性。保护归因于完整的上皮和粘膜屏障以及正常的细胞和体液应答。在严重感染后,针对金黄色葡萄球菌组分的抗体的滴度升高(Ryding等人,J Med Microbiol,43(5):328-334,1995),然而迄今为止,尚无这些获得的抗体滴度与人免疫性之间的相关性的血清学证据。

[0011] 由金黄色葡萄球菌分泌的成孔毒素对其免疫逃避至关重要。这些毒素可通过在靶细胞膜上形成孔、诱导细胞死亡并在感染的第一阶段使宿主虚弱而为细菌创造存活优势。由于金黄色葡萄球菌感染的治疗方式有限,耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的出现构成了巨大的公共健康威胁。尽管疾病的分子基础尚不清楚,但社区相关的MRSA感染与白细胞毒素密切相关。白细胞毒素由五种有效的双组分毒素组成:PVL、HlgAB、HlgCB、LukED和LukAB。白细胞毒素杀死嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞,并且一些(主要是PVL)也诱导非常强烈的炎症应答,所述炎症应答可能具有病理生理影响。PVL是USA300和若干其它大流行性克隆的关键毒力因子。HlgAB和HlgCB促进血液中的SA存活,并且Hlg-/-突变型在小鼠菌血症模型中显示出降低的死亡率。类似地,在各种动物模型中,LukED和LukAB一直显示在SA毒力中起关键作用。最近的报告表明,LukAB和Hlg在体内促进巨噬细胞功能障碍和有助于SA生物膜形成中起协同作用。

[0012] LukAB(在本领域中也称为LukGH)已显示在儿童金黄色葡萄球菌侵袭性疾病的急性期期间高度表达(Thomsen等人,Infect Immun.82(3):1234-42,2014)。LukAB在USA300中也高度表达,所述菌株目前在美国造成>60%的SA侵袭性疾病病例。

[0013] 因此,在本领域中仍然需要能够安全地赋予对表达白细胞毒素的金黄色葡萄球菌的免疫性的组合物和方法。

发明内容

[0014] 本公开提供了诱导针对表达LukAB的金黄色葡萄球菌的免疫应答的方法、预防或治疗表达LukAB的金黄色葡萄球菌感染的方法以及用于预防或治疗表达LukAB的金黄色葡萄球菌感染的组合物。在某些方面,本公开提供了作为针对金黄色葡萄球菌感染的疫苗的LukA和LukB的减毒突变型。

[0015] 本文提供了一种分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽,所述分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽包含野生型葡萄球菌LukA亚基、野生型葡萄球菌LukB亚基或野生型葡萄球菌LukAB二聚体,除了在所述LukA亚基、所述LukB亚基或在所述LukAB二聚体中的保守残基处具有一个或多个氨基酸取代、缺失或其组合外。在某些方面,所述氨基酸取代、缺失或其组合位于LukAB启动子/启动子界面区、LukAB二聚体/二聚体界面区、LukB膜结合裂隙区、LukB成孔区或其任何组合中的保守残基处,使得杀白细胞素亚基形成二聚体、低聚化、在真核细胞的表面上形成孔或其任何组合的能力被破坏。在某些方面,这导致相对于相应的野生型杀白细胞素亚基或LukAB二聚体,突变型杀白细胞素亚基或突变型LukAB二聚体的毒性降低。在某些方面,相对于所述相应的野生型杀白细胞素亚基,所述取代并未显著降低所述突变型杀白细胞素亚基的免疫原性。在某些方面,所述突变型是免疫原性的,并且引发能够中和野生型毒素的作用的抗体。在某些方面,所述突变型是免疫原性的,并且相对于相应的野生型杀白细胞素亚基引发能够更有效地中和野生型毒素的作用的抗体。

[0016] 本文提供了一种突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基,所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基在LukAB启动子/启动子界面区中包含突变。在某些方面,这种突变导致不完整的较大杀白细胞素八聚体环的形成、降低或消除毒素的溶血活性或其组合。在某些方面,所述突变位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸L61的LukA位置、对应于SEQ ID NO:29的D49的LukB位置处或其组合。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:28的L61的LukA位置被天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)或精氨酸(R)取代。在某些方面,这种突变可破坏在LukAB启动子/启动子界面内发现的疏水口袋。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的D49的LukB位置被丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:29的D49的LukB位置处用丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代可破坏对应于SEQ ID NO:29的D49的LukB D49与对应于SEQ ID NO:28的R49的LukA R49之间的盐桥。

[0017] 本文提供了一种突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基,所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基在LukAB二聚体/二聚体界面区中包含突变。在某些方面,这种突变可破坏LukAB二聚体的形成、可破坏真核细胞表面上的LukAB低聚化、可破坏真核细胞表面上的LukAB孔形成或其组合。在某些方面,所述突变位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D39的LukA位置、对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D75的LukA位置、对应于SEQ ID NO:28的氨基酸K138的LukA位置、对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D197的LukA位置、对应于SEQ ID NO:29的K12的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的K19的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB位置处或其任何组合。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA位置被丙氨酸(A)或精氨酸(R)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA位置处用丙氨酸(A)或精氨酸(R)取代可破坏对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA D39与对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB K58之间的盐桥。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA

位置处用丙氨酸(A)取代可破坏对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75与对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23之间的盐桥。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA位置处用丙氨酸(A)取代可破坏对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA K138与对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB E112之间的盐桥。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA位置被丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA位置处用丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代可破坏对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA D197与对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB K218之间的盐桥。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的K12的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的K19的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置处用丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代可破坏对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23与对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75之间的盐桥。在某些方面,在对应于K12的LukB位置处用丙氨酸(A)取代、在SEQ ID NO:29的LukB位置K19处用丙氨酸(A)取代以及在对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB位置处用丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代(LukB K12A/K19A/R23A或LukB K12A/K19A/R23E三重突变型)可至少破坏对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23与对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75之间的盐桥。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB位置处用丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代可破坏对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB K58与对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA D39之间的盐桥。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB位置处用丙氨酸(A)取代可破坏对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB E112与对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA K138之间的盐桥。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,在对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB位置处用丙氨酸(A)取代可破坏对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB K218与对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA D197之间的盐桥。

[0018] 本文提供了一种突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基,所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基在LukB膜结合裂隙区中包含突变。在某些方面,这种突变可破坏LukB与真核细胞的脂质双层的极性头基的相互作用。在某些方面,所述突变位于对应于SEQ ID NO:29的H180的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的E197的LukB位置、对应于SEQ ID NO:29的R203的LukB位置处或其任何组合。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的H180的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的E197的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的R203的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

[0019] 本文提供了一种突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基,所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基在LukB成孔区中包含突变。在某些方面,这种突变可阻碍在真核细胞中形成的LukAB孔的细胞质边缘,从而阻碍孔形成。在某些方面,孔形成区中的所述突变包括对应于SEQ ID NO:29的F125至T133的氨基酸的缺失,并且在一些方面还包括在对应于SEQ ID NO:29的D124的氨基酸之后一个、两个、三个、四个或五个甘氨酸(G)残基的插入。

[0020] 在某些方面,任何上述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基与相应的野生型杀白细胞素亚基相比在嗜中性粒细胞毒性测定中的毒性较低。

[0021] 在某些方面,所述野生型LukA亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43以及SEQ ID NO:44。

[0022] 在某些方面,所述野生型LukB亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54以及SEQ ID NO:55。

[0023] 某些方面提供了一种多肽复合物,所述多肽复合物包含本文任何地方所述的突变型LukA亚基、本文任何地方所述的突变型LukB亚基、本文任何地方所述的突变型LukAB二聚体或其任何组合。在某些方面,所述多肽复合物还包含另外的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽,其中所述另外的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽比相应的野生型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽毒性低。在某些方面,所述另外的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽是突变型LukA亚基、突变型LukB亚基、突变型LukS-PV亚基、突变型LukF-PV亚基、突变型LukE亚基、突变型LukD亚基、突变型 γ 溶血素A、突变型 γ 溶血素B、突变型 γ 溶血素C或其任何组合。在本公开的多肽复合物的某些方面,所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽经由肽键或化学缀合连接。

[0024] 在某些方面,如本文任何地方所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基或如本文任何地方所述的多肽复合物还包含异源氨基酸序列。在某些方面,所述异源氨基酸序列编码选自由以下组成的组的肽:His-标签、泛素标签、NusA标签、几丁质结合结构域、B-标签、HSB-标签、绿色荧光蛋白(GFP)、钙调素结合蛋白(CBP)、半乳糖结合蛋白、麦芽糖结合蛋白(MBP)、纤维素结合结构域(CBD)、抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白/Strep-标签、trpE、氯霉素乙酰转移酶、lacZ(β -半乳糖苷酶)、FLAGTM肽、S-标签、T7-标签、所述异源肽中任一者的片段以及所述异源肽中的两者或更多者的组合。在某些方面,所述异源氨基酸序列编码免疫原、T细胞表位、B细胞表位、所述异源肽中任一者的片段以及所述异源肽中的两者或更多这的组合。

[0025] 某些方面提供了一种核酸,所述核酸编码如本文任何地方所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基或如本文任何地方所述的多肽复合物。在某些方面,所述编码突变型亚基或多肽复合物的多核苷酸还包含异源核酸。在某些方面,所述异源核酸包含与所述编码多肽的核酸可操作地缔合的启动子。

[0026] 某些方面提供了一种载体,所述载体包含前述多核苷酸。在某些方面,所述载体是质粒。此外,某些方面提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包含这种载体。在某些方面,所述宿主细胞是细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞、酵母或植物细胞。在某些方面,所述宿主细胞是大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

[0027] 某些方面提供了一种产生突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽的方法,所述方法包括培养本文任何地方公开的宿主细胞,以及回收所述多肽。

[0028] 某些方面提供了一种组合物,所述组合物包含如本文任何地方公开的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基或如本文任何地方公开的多肽复合物以及载体。在某些方面,所述组合物还包含佐剂。在某些方面,所述组合物还包含另外的葡萄球菌抗原,并且在某些方面,所述另外的葡萄球菌抗原是 α -溶血素亚基多肽。

[0029] 某些方面提供了一种诱导针对金黄色葡萄球菌菌株的宿主免疫应答的方法,所述方法包括向需要所述免疫应答的受试者施用有效量的任何上述组合物。在某些方面,所述免疫应答是抗体应答。在某些方面,所述免疫应答选自由以下组成的组:先天性应答、体液应答、抗体应答、T细胞应答以及所述免疫应答中的两种或更多种的组合。在某些方面,所述免疫应答导致野生型葡萄球菌杀白细胞素毒素的至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%中和。

[0030] 某些方面提供了一种预防或治疗受试者中的葡萄球菌疾病或感染的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含突变型亚基或多肽复合物的任何前述组合物。在某些方面,所述方法还包括施用包含抗杀白细胞素亚基抗体和/或抗 α -溶血素亚基抗体的组合物。在某些方面,所述葡萄球菌感染是皮肤、软组织、血液或器官的局部或全身性感染,或者本质上是自身免疫的。在某些方面,所述葡萄球菌疾病是呼吸系统疾病。在某些方面,所述呼吸系统疾病是肺炎。在某些方面,所述感染是血液的全身性感染。在某些方面,所述受试者是脊椎动物。在某些方面,所述脊椎动物是哺乳动物。在某些方面,所述哺乳动物是人。在某些方面,所述组合物经由肌肉注射、皮内注射、腹膜内注射、皮下注射、静脉内注射、口服施用、粘膜施用、鼻内施用或肺部施用来施用。

[0031] 某些方面提供了一种产生针对金黄色葡萄球菌感染的疫苗的方法。所述方法包括首先分离如本文任何地方公开的突变型杀白细胞素亚基或如本文任何地方公开的多肽复合物,以及将所述突变型杀白细胞素亚基或多肽复合物与佐剂组合。在某些方面,所述方法还包括将所述突变型杀白细胞素亚基或多肽复合物与另外的葡萄球菌抗原组合,并且在某些方面,所述另外的葡萄球菌抗原是 α -溶血素亚基多肽。

附图说明

[0032] 图1.图1示出LukAB八聚体的一部分,其示出启动子/启动子界面(界面1)、二聚体/二聚体界面(界面2)、膜结合裂隙区和成孔区。示出界面1、界面2和膜结合裂隙区中的保守氨基酸残基的取代的说明性实例。还示出所述成孔区的一部分的缺失。插图A示出LukB R23与LukA D75之间的二聚体/二聚体界面相互作用。插图B示出LukB K58与LukA D39之间的二聚体/二聚体界面相互作用。插图C示出LukB K218与LukA D197之间的二聚体/二聚体界面相互作用。插图D示出LukB E112与LukA K138之间的二聚体/二聚体界面相互作用。插图E示出LukB成孔区中LukB残基F125至T133的缺失。插图F示出LukB膜结合裂隙区中的LukB氨基酸残基LukB H180、LukB E197和LukB R203。插图G示出启动子/启动子界面区中的氨基酸残基LukA L61。插图H示出LukB D49与LukA R49之间的启动子/启动子界面相互作用。图1底部的表格列出LukA和/或LukB的突变的代表性实例。

[0033] 图2.图2是含有共有多数LukA序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和来自其所对应的十三(13)种不同金黄色葡萄球菌菌株的野生型LukA多肽(SEQ ID NO:2-14)的比对。SEQ ID NO:28是SEQ ID NO:1的成熟肽型式,即不存在27个氨基酸信号序列。

[0034] 图3.图3是含有共有多数LukB序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:15)和来自其所对应的十二(12)种不同金黄色葡萄球菌菌株的野生型LukB多肽(SEQ ID NO:16-27)的比对。SEQ ID NO:29是SEQ ID NO:15的成熟肽型式,即不存在29个氨基酸信号序列。

[0035] 图4.图4示出如在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定的在启动子-启动子相互作用界面内含有LukA L61的突变的LukAB突变型的毒性。所述突变型的数据是2-8次实验的平均值。野生型数据是多个实验中37次重复的平均值。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0036] 图5.图5示出如在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定的在启动子-启动子相互作用界面内含有盐桥中涉及的LukB D49的突变的LukAB突变型的毒性。数据是所述突变型的重复实验的平均值。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0037] 图6.图6示出盐桥A中的LukB突变。在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定在二聚体-二聚体相互作用界面内含有盐桥中涉及的LukB R23或LukB K12/K19/R23的突变的LukAB突变型的毒性。wt LukB和突变型的重复数量分别是37和4。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0038] 图7.图7示出盐桥B中的LukB突变。在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定在二聚体-二聚体相互作用界面内含有盐桥中涉及的LukB K58(A)或LukA D39(B)的突变的LukAB突变型的毒性。wt LukAB、K58A、K58E、D39A和D39R突变型的重复数量分别是37、2、6、6和4。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0039] 图8.图8示出盐桥C中的LukA突变。在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定在二聚体-二聚体相互作用界面内含有盐桥中涉及的LukA(D197)的丙氨酸取代的LukAB突变型的毒性。wt LukAB和突变型的重复数量分别是37和4。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0040] 图9.图9示出盐桥D中的LukB突变。在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定在二聚体-二聚体相互作用界面内含有盐桥中涉及的LukB(E112)的丙氨酸取代的LukAB突变型的毒性。wt LukAB和突变型的重复数量分别是37和4。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0041] 图10.图10示出膜结合裂隙中的LukB突变。在分化为嗜中性粒细胞的HL60细胞中测定含有有可能在磷酸胆碱结合中涉及的LukB H180、E197和R203的丙氨酸取代的LukAB突变型的毒性。wt LukAB和突变型的重复数量分别是37和4。使用非线性4参数逻辑(4PL)曲线拟合回归来拟合数据。

[0042] 图11.图11示出选择类毒素的免疫原性:用ALHYDROGEL®配制所指示的组合突变型类毒素(每个亚基中至少一个突变),并用于免疫5只小鼠的组。测定血清ELISA结合(A)和中和(B)滴度。

具体实施方式

[0043] 本文公开了突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽,例如突变型LukA亚基多肽、突变型LukB亚基多肽或突变型LukAB二聚体;包含如本文公开的一种或多种突变型杀白细胞素亚基的组合物;以及在受试者中引发针对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)的免疫应答或者治疗或预防葡萄球菌感染的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的突

变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽。

[0044] 在本公开中,提及LukAB二聚体,并且单独地提及LukA亚基和LukB亚基。本领域普通技术人员将了解,在本公开的领域中,LukA也被称为LukH并且LukB也被称为LukG,例如参见美国专利号8,431,687 (LukAB);Badarau A.等人,J.Biol.Chem.290 (1):142-56 (2015) (LukGH) 以及Badarau A.等人MABS 9 (7):1347-60 (2016) (LukGH)。

[0045] 应注意,术语“一个/种(a/an)”实体是指一个或多个所述实体;例如,“一种多肽”被理解为表示一种或多种多肽。因此,术语“一个/种(a)”(或“一个/种(an)”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0046] 术语“核酸”或“核酸序列”是指存在于多核苷酸或构建体中的任何一个或多个核酸区段,例如DNA或RNA片段。本公开的两种或更多种核酸可存在于单一多核苷酸构建体中,例如在单一质粒上,或存在于单独的(不同的)多核苷酸构建体中,例如,在单独的质粒上。此外,任何核酸或核酸片段可编码单一多肽,例如单一抗原、细胞因子或调控性多肽;或者可编码多于一种多肽,例如,核酸可编码两种或更多种多肽。此外,核酸可编码调控元件,如启动子或转录终止子,或者可编码多肽或蛋白质的特化的元件或基序,如分泌信号肽或功能结构域。

[0047] 术语“多核苷酸”意图涵盖单数核酸或核酸片段以及复数核酸或核酸片段,并且是指分离的分子或构建体,例如病毒基因组(例如,非感染性病毒基因组)、信使RNA(mRNA)、质粒DNA(pDNA)或pDNA的衍生物(例如,如在(Darquet,A-M等人,Gene Therapy 4:1341-1349,1997)中描述的包含多核苷酸的小环)。可以线性(例如,mRNA)、环状(例如,质粒)或分支形式以及双链或单链形式提供多核苷酸。多核苷酸可包含常规磷酸二酯键或非常规键(例如,酰胺键,如在肽核酸(PNA)中所发现)。

[0048] 如本文所用,术语“多肽”意图涵盖单数“多肽”以及复数“多肽”,并且包含两个或更多个氨基酸的任何一个或多个链。因此,如本文所用,“肽”、“寡肽”、“二肽”、“三肽”、“蛋白质”、“氨基酸链”、“氨基酸序列”或用于指具有两个或更多个氨基酸的一个或多个链的任何其它术语包括在“多肽”的定义中(即使这些术语中的每个可具有更具体的含义),并且术语“多肽”也可用来代替这些术语中的任一者,或与这些术语中的任一者互换使用。所述术语还包括已经历翻译后修饰的肽,所述翻译后修饰例如,糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团进行的衍生化、蛋白水解裂解或通过非天然存在的氨基酸进行的修饰。

[0049] 如本文所用的术语“葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽”、“葡萄球菌杀白细胞素亚基”、“LukA亚基”、“LukA多肽”、“LukB亚基”、“LukB多肽”等涵盖成熟或全长葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如LukA或LukB),以及成熟或全长葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如LukA和LukB)的片段、变体或衍生物,以及包含成熟或全长葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如LukA和LukB)的嵌合和融合多肽或成熟或全长葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如LukA和LukB)的一个或多个片段。在某些方面,如本文公开的葡萄球菌杀白细胞素亚基是突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基,其相对于相应的野生型杀白细胞素亚基的毒性降低和/或相对于相应的野生型杀白细胞素亚基的免疫原性未显著降低。“相应的野生型杀白细胞素亚基”是指突变型杀白细胞素亚基所来源于的天然杀白细胞素亚基。

[0050] 成孔毒素(例如单组分 α -溶血素和双组分溶血素以及白细胞毒素)在葡萄球菌免

疫逃避中起重要作用。这些毒素杀死关键的免疫细胞并导致组织破坏,从而经常在感染的第一阶段使宿主虚弱并促进细菌散播和转移性生长。包含LukA和LukB亚基的双组分毒素LukAB是独特的,因为它以二聚体形式分泌,然后在细胞表面上八聚化以形成孔。相比之下,例如,两种PVL组分LukS-PV和LukF-PV分别分泌并在LukS-PV与其受体结合以及LukF-PV与LukS-PV的随后结合时形成成孔八聚体复合物(Miles等人,Protein Sci,2002.11(4):第894-902页;Pedelacq等人,Int J Med Microbiol,2000.290(4-5):第395-401页)。PVL的靶标包括例如多形核嗜中性粒细胞(PMN)、单核细胞和巨噬细胞。

[0051] 其它双组分毒素已在金黄色葡萄球菌中表征: γ -溶血素的S组分HlgA和HlgC以及F组分HlgB;LukS-PV、LukF-PV、LukE(S)和LukD(F);以及LukM(S)和LukF-PV样(F)(PCT公布号W02011/112570,其以引用的方式并入本文)。由于它们的密切相似性,这些S组分可与F成分组合并形成具有不同靶标特异性的活性毒素(Ferrerias等人,Biochim Biophys Acta,1998.1414(1-2):第108-26页;Prevost等人,Infect Immun,1995.63(10):第4121-9页)。 γ -溶血素具有强溶血性,并且白细胞毒性比PVL低90%,而PVL为非溶血性。然而,与LukF-PV配对的HlgA或HlgC促进白细胞毒性活性(Prevost等人,Infect Immun,1995.63(10):p.4121-9)。PVL和其它白细胞毒素溶解嗜中性粒细胞,并且Hlg为溶血性(Kaneko等人,Biosci Biotechnol Biochem,2004.68(5):第981-1003页),并且据报告也溶解嗜中性粒细胞(Malachowa等人,PLoS One,2011.6(4):第e18617页)。PVL亚基是噬菌体来源的(F&S杀白细胞素),而Hlg蛋白源自Hlg基因座(hlg),并且在99%的临床分离株中发现(Kaleko等人)。Hlg亚基在血液中的金黄色葡萄球菌生长期间强烈上调(Malachowa等人),并且Hlg显示与血液中的金黄色葡萄球菌的存活有关(Malachowa等人,Virulence,2011.2(6))。突变型USA300 Δ -hlgABC在小鼠菌血症模型中引起死亡的能力降低(Malachowa等人,PLoS One,2011.6(4):第e18617页)。Alonzo等人已表明,LukED毒素对于小鼠的血流感染至关重要(Alonzo等人,Mol Microbiol,2012.83(2):第423-35页)。已经描述了LukAB与PVL协同作用以增强人PMN溶解(Ventura等人,PLoS One,2010.5(7):第e11634页;LukAB在其中被称为LukGH)。

[0052] 当提及本公开的葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB)时,术语“片段”、“类似物”、“衍生物”或“变体”包括保留源蛋白的至少一些免疫原性或抗原性的任何多肽。如本文所述的葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB)的片段包括在表达、纯化或施用至动物期间表现出增加的溶解度的蛋白水解片段、缺失片段,并且特别是葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB)的片段。如本文所述的葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如LukA或LukB)的片段还包括在递送至受试者时表现出降低的致病性或毒性的蛋白水解片段或缺失片段。多肽片段还包括多肽的包含源多肽的抗原或免疫原性表位,包括线性以及三维表位的任何部分。

[0053] 多肽抗原的“表位片段”是含有表位的抗原的一部分。“表位片段”除了一个或多个表位外,还可但不必含有氨基酸序列。

[0054] 如本文所用,术语“变体”是指由于氨基酸取代、缺失、插入和/或修饰而不同于所列举多肽的多肽。非天然存在的变体可使用本领域已知的诱变技术来产生。在一些方面,变体多肽因三个氨基酸或更少氨基酸的取代、缺失或添加而不同于鉴定的序列。通常可通过修饰多肽序列并使用例如本文所述的代表性程序评价修饰的多肽的抗原性或致病性性质

来鉴定此类变体。在一些方面,野生型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA、LukB或两者)的变体形成蛋白质复合物,所述蛋白质复合物的毒性低于野生型复合物。

[0055] 本文公开的多肽变体表现出与鉴定的多肽至少约85%、90%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%的序列同一性。变体多肽可包含保守或非保守氨基酸取代、缺失或插入。除了具有一个或多个取代、缺失或其组合外,变体可包含与野生型杀白细胞素亚基相同的葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者),其中所述取代、缺失或其组合使包含变体杀白细胞素亚基的杀白细胞素复合物的毒性比相应的野生型蛋白复合物低和/或相对于相应的野生型蛋白复合物,所述取代不显著降低包含变体杀白细胞素亚基的杀白细胞素复合物的免疫原性。在某些方面,所述突变型是免疫原性的,并且引发能够中和野生型毒素的作用的抗体。在某些方面,所述突变型是免疫原性的,并且相对于相应的野生型杀白细胞素亚基引发能够更有效地中和野生型毒素的作用的抗体。在某些方面,除了具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸取代、缺失或其组合外,所述变体可包含与野生型杀白细胞素亚基相同的葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)。如本文所述的葡萄球菌杀白细胞素亚基的衍生物(例如,LukA和LukB)是已被改变以便表现出在天然多肽上未发现的另外特征的多肽。实例包括融合蛋白。类似物是本文所述的葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA和LukB)的另一种形式。一个实例是可通过裂解原蛋白而活化以产生活性成熟多肽的原蛋白。

[0056] 变体也可以或可替代地含有其它修饰,由此,例如多肽可缀合或偶联,例如融合至异源氨基酸序列,例如在共同翻译或翻译后引导蛋白质转移的蛋白质的N-末端的信号(或前导)序列。多肽也可缀合或偶联至接头或其它序列以易于合成、纯化或鉴定多肽(例如6-His),或增强多肽与固体载体的结合。例如,多肽可缀合或偶联至免疫球蛋白Fc区。多肽也可缀合或偶联至赋予或调节对所述多肽的免疫应答的序列(例如,T细胞表位、B细胞表位、细胞因子、趋化因子等)和/或增强多肽的摄取和/或抗原呈递细胞或其它免疫系统细胞对多肽的加工。所述多肽也可缀合或偶联至来自葡萄球菌属物种和/或来自其它细菌和/或其它病毒的其它多肽/表位以产生杂合免疫原性蛋白,所述杂合免疫原性蛋白单独或与各种佐剂组合可引发对其它病原生物体的保护性免疫。多肽也可缀合或偶联至赋予更大稳定性或改善半衰期的部分,如但不限于白蛋白、免疫球蛋白Fc区、聚乙二醇(PEG)等。所述多肽也可缀合或偶联至来自葡萄球菌属物种和/或来自其它细菌和/或其它病毒的部分(例如,免疫原性碳水化合物,例如荚膜多糖或表面多糖)以产生修饰的免疫原性蛋白,所述修饰的免疫原性蛋白单独或与一种或多种佐剂组合可增强和/或协同保护性免疫。在某些方面,本文所述的多肽还包含免疫原性碳水化合物。在一个实施方案中,所述免疫原性碳水化合物是糖。

[0057] 在整个说明书中,术语“糖”可表示多糖或寡糖,并且包括两者。如本文提供的多糖可从细菌中分离并且可通过已知方法确定大小。例如,可确定全长多糖的“大小”(例如,可通过各种方法减小它们的大小,所述方法如酸水解处理、过氧化氢处理、通过EMULSIFLEX®、随后过氧化氢处理确定大小以产生寡糖片段或微流化)。可确定多糖的大小以降低多糖样品中的粘度和/或改善缀合产物的过滤性。寡糖具有少量重复单元(例如,5-30个重复单元),并且通常是水解的多糖。如本文提供的多糖可重组产生。

[0058] 金黄色葡萄球菌荚膜抗原是表面相关的、抗原特异性有限的并且在临床分离株中

高度保守的。在一个实施方案中,如本公开提供的免疫原性碳水化合物是金黄色葡萄球菌的荚膜多糖(CP)。在一个实施方案中,荚膜糖可以是全长多糖,然而在其它方面,它可以是一个寡糖单元,或者比重寡糖单元的天然长度的糖链短。葡萄球菌分离株的血清分型研究揭示了若干推定荚膜血清型,其中5型和8型(CP5和CP8)在来自临床感染的分离株中最普遍,分别占从人回收的分离株的约25%和50%(O' Riordan和Lee, *Clinical Microbiology Reviews*, 2004年1月,第218-234页,第17卷,第1期;Poutrel和Sutra, *J Clin Microbiol.* 1993年2月;31(2):467-9)。还从家禽、牛、马和猪回收了相同的分离株(Tollersrud等人, *J Clin Microbiol.* 2000年8月;38(8):2998-3003;Cunnion KM等人, *Infect Immun.* 2001年11月;69(11):6796-803)。分别从原型菌株Reynolds和Becker纯化的5型和8型荚膜多糖在结构上彼此非常相似,并且与由菌株T制得的胶囊非常相似,如Wu和Park先前所描述(Wu和Park. 1971. *J. Bacteriol.* 108:874-884)。5型具有结构 $(\rightarrow 4)-3-0-Ac-\beta-D-ManNAcA-(1\rightarrow 4)-\alpha-L-FucNAc-(1\rightarrow 3)-\beta-D-FucNAc-(1\rightarrow)_n$ (Fournier, J.M., 等人, 1987. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138:561-567;Moreau, M., 等人, 1990. *Carbohydr. Res.* 201:285-297), 并且8型具有结构 $(\rightarrow 3)-4-0-Ac-\beta-D-ManNAcA-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-FucNAc-(1\rightarrow 3)-\beta-D-FucNAc-(1\rightarrow)_n$ (Fournier, J.M., 等人, 1984. *Infect. Immun.* 45:87-93)。5型和8型多糖的不同之处仅在于糖之间的键联以及氨基甘露醇醛酸残基的O-乙酰化的位点,但它们在血清学上是不同的。

[0059] 与去毒的重组铜绿假单胞菌外毒素A载剂缀合的5型和8型CP在小鼠模型中显示出高度免疫原性和保护性(A Fattom等人, *Infect Immun.* 1993年3月;61(3):1023-1032;A Fattom等人, *Infect Immun.* 1996年5月;64(5):1659-1665), 并且CP5特异性抗体从免疫的动物的被动转移诱导针对小鼠的全身性感染(Lee等人, *Infect Immun.* 1997年10月;65(10):4146-4151)和针对用血清型5金黄色葡萄球菌激发的大鼠的心内膜炎(Shinefield H等人, *N Engl J Med.* 2002Feb14;346(7):491-6)的保护。开发了在小鼠中提供针对金黄色葡萄球菌激发的75%保护的二价CP5和CP8缀合物疫苗(**StaphVAX®**, Nabi Biopharmaceutical)。疫苗已在人体上进行了测试(Fattom AI等人, *Vaccine.* 2004年2月17日;22(7):880-7;Maira-Litrán T等人, *Infect Immun.* 2005年10月;73(10):6752-62)。在某些方面,本发明的寡肽与免疫原性碳水化合物(例如,CP5、CP8、CP片段或其组合)组合或缀合。

[0060] 用聚-N-乙酰葡糖胺(PNAG)(McKenney D. 等人, *Science.* 1999年5月28日;284(5419):1523-7)或聚-N-琥珀酰乙酰葡糖胺(PNSG)(Tuchscher LP. 等人, *Infect Immun.* 2008年12月;76(12):5738-44. Epub 2008年9月22日)(两者均是金黄色葡萄球菌表面碳水化合物)免疫在实验动物模型中显示出针对金黄色葡萄球菌激发的至少部分保护。PNSG被鉴定为表皮葡萄球菌荚膜多糖/粘附素(PS/A)的化学形式,其介导凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS)与生物材料的粘附,充当表达PS/A的CoNS菌株的胶囊,并且是保护性抗体的靶标。PNSG也由金黄色葡萄球菌制成,其中它是环境调控的、体内表达的表面多糖并且类似地充当保护性免疫的靶标(McKenney D. 等人, *J. Biotechnol.* 2000年9月29日;83(1-2):37-44)。在某些方面,免疫原性碳水化合物可以是表面多糖,例如聚-N-乙酰葡糖胺(PNAG)、聚-N-琥珀酰葡糖胺(PNSG)、表面多糖片段或其组合。

[0061] 壁磷壁酸(WTA)是在金黄色葡萄球菌菌株上广泛表达的重要多糖(Neuhaus, F.C.

和J.Baddiley, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003.67 (4) :686-723), 并且WTA的抗血清已显示出单独和在补体存在下诱导调理吞噬杀伤 (Thakker, M., 等人, *Infect Immun*, 1998.66 (11) :5183-9) 和Fattom等人, 美国专利7,754,225)。WTA与肽聚糖连接, 并且突出穿过细胞壁, 从而在非胶囊化菌株 (如USA300) 上变得显著暴露, 所述菌株是美国的大多数社区获得性MRSA (CA MRSA) 病例的原因 (Hidron, A.I., 等人, *Lancet Infect Dis*, 2009.9 (6) :384-92)。

[0062] 脂磷壁酸 (LTA) 是革兰氏阳性细菌例如金黄色葡萄球菌的细胞壁的成分。LTA可通过膜磷脂非特异性地结合至靶细胞, 或者特异性地结合至CD14和Toll样受体。靶标结合的LTA可与循环抗体相互作用并活化补体级联, 以诱导被动免疫杀伤现象。它还触发从嗜中性粒细胞和巨噬细胞释放活性氧和氮物质、酸性水解酶、高度阳离子性的蛋白酶、杀菌阳离子肽、生长因子和细胞毒性细胞因子, 它们可协同作用来增强细胞损伤。

[0063] 在某些方面, 表面多糖与本公开的多肽组合或缀合。在某些方面, 表面多糖是例如聚-N-乙酰葡萄糖胺 (PNAG)、聚-N-琥珀酰葡萄糖胺 (PNSG)、壁磷壁酸 (WTA)、脂磷壁酸 (LPA)、任何所述表面多糖的片段、或两种或更多种所述表面多糖的组合。

[0064] 如本文所用的术语“序列同一性”是指两个或更多个多核苷酸序列之间或两个或更多个多肽序列之间的关系。当一个序列中的位置被比较器序列的相应位置中相同核酸碱基或氨基酸占据时, 所述序列在所述位置被称为“相同”。百分比“序列同一性”是通过确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸的位置的数量以产生“相同”位置的数量来计算。然后将“相同”位置的数量除以比较窗口中的位置总数并且乘以100以产生“序列同一性”的百分比。“序列同一性”的百分比是通过比较在窗口上的两个最佳比对的序列和来自另一种分离株的同源多肽来确定。为了最佳比对序列以进行比较, 比较窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分可包含称为空位的添加或缺失, 而参考序列保持恒定。最佳比对是即使具有空位也能在参考序列与比较物序列之间产生最大可能数量的“相同”位置的比对。可使用程序“BLAST 2Sequences”的版本来确定两个序列之间的“序列同一性”百分比, 所述程序可自2004年9月1日起从美国国家生物技术信息中心获得, 所述程序结合程序BLASTN (用于核苷酸序列比较) 和BLASTP (用于多肽序列比较), 所述程序BLASTN和BLASTP是基于Karlin和Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (12) :5873-5877, 1993) 的算法。使用“BLAST 2序列”时, 自2004年9月1日起作为默认参数的参数可用于字长 (3)、空位罚分 (11)、空位延伸罚分 (1)、空位下降 (50)、期望值 (10) 和任何其它所需的参数, 包括但不限于矩阵选项。

[0065] 如本文所用, 术语“表位”是指在动物, 例如哺乳动物, 例如人中具有抗原或免疫原性活性的多肽的部分。如本文所用, “免疫原性表位”被定义为如通过本领域已知的任何方法确定的在动物中引发免疫应答的蛋白质的一部分。如本文所用, 术语“抗原表位”被定义为如通过本领域熟知的任何方法确定的抗体或T细胞受体可免疫特异性地结合其抗原的蛋白质的一部分。免疫特异性结合不包括非特异性结合, 但不一定排除与其它抗原的交叉反应性。尽管所有的免疫原性表位都是抗原性的, 但是抗原表位不需要是免疫原性的。

[0066] 如本文所用, “编码区”是核酸中由翻译成氨基酸的密码子组成的一部分。虽然“终止密码子” (TAG、TGA或TAA) 未被翻译成氨基酸, 但它可被认为是编码区的一部分, 但任何侧翼序列 (例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子等) 在编码区之外。

[0067] 术语“密码子优化”在本文中被定义为通过用在目标宿主的基因中更常或最常使

用的密码子置换天然序列的至少一个、多于一个或大量密码子来修饰核酸序列以增强所述宿主的细胞中的表达。不同的物种对于具有特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。

[0068] 术语“组合物”或“药物组合物”可包括含有本公开的免疫原性多肽以及例如佐剂或药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂的组合物,所述组合物被施用至已经患有金黄色葡萄球菌感染的个体或需要针对金黄色葡萄球菌感染的免疫的个体。

[0069] 术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合于与人和动物的组织接触而无过度毒性或其它并发症、与合理的利益/风险比相称的组合物。在一些方面,本文所述的多肽、多核苷酸、组合物和疫苗是药学上可接受的。

[0070] “有效量”是以单剂量或作为一系列剂量的一部分向个体施用对于治疗或预防而言有效的量。量例如在其施用使得相对于未治疗的个体金黄色葡萄球菌感染的发生率降低时是有效的,如例如用感染性金黄色葡萄球菌感染或激发之后所确定,包括但不限于菌血症减轻、毒血症减轻、败血症减轻、症状减轻、免疫应答增强、免疫应答调节或恢复所需的时间减少。这种量取决于待治疗个体的健康和身体状况、待治疗个体的分类组(例如,人、非人灵长类、灵长类等)、个体免疫系统的应答能力、所需治疗或保护的程 度、疫苗的配制、医学情况的专业评估以及其它相关因素而变化。预期所述有效量将属于可通过常规试验确定的相对宽泛范围。通常,单剂量是约10 μ g至10mg/kg体重的纯化的多肽或一定量的修饰的载剂生物体或病毒、或其片段或残余物,足以提供相当数量的重组表达的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者),如本文所述。术语“肽疫苗”或“亚单位疫苗”是指包含一种或多种本文所述的多肽的组合物,当将其施用至动物时可用于刺激针对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)感染的免疫应答。

[0071] 术语“受试者”是指需要诊断、预后、免疫或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括但不限于人、家养动物、农场动物、动物园动物如熊、运动动物、宠物动物如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、熊、奶牛;灵长类动物,如猿、猴、猩猩和黑猩猩;犬科动物,如狗和狼;猫科动物,如猫、狮子和老虎;马科动物,如马、驴和斑马;食用动物,如牛、猪和绵羊;有蹄类动物,如鹿和长颈鹿;啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;等。在一个实施方案中,受试者是人受试者。

[0072] 如本文所用,“有需要的受试者”是指期望治疗,即预防、治愈、延缓葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)疾病症状或降低其严重程度或者使得在指定时间段内没有由金黄色葡萄球菌引起的疾病的恶化或两者的个体。

[0073] 如本文所用的术语“初免(priming)”或“初免(primary)”和“加强(boost)”或“加强(boosting)”分别是指初始免疫和随后免疫,即根据这些术语在免疫学中通常具有的定义。然而,在某些方面,例如,在初免组分和加强组分在单一制剂的情况下,由于同时施用“初免”和“加强”组合物,因此可能不需要进行初始免疫和随后免疫。

[0074] 突变型多肽

[0075] 本文公开了一种分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽,所述分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽包含野生型葡萄球菌LukA亚基、野生型葡萄球菌LukB亚基或野生型葡萄球菌LukAB二聚体、由所述亚基或二聚体组成或基本上由所述亚基或二聚体组成,除了在所述LukA亚基、所述LukB亚基或在所述LukAB二聚体中的保守残基处具有一种或多种突变(例如氨基酸取代、缺失或其组合)外。在某些方面,所述一种或多种突变包含1、2、

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸取代、缺失、插入或其组合。在某些方面,所述氨基酸取代、缺失、插入或其组合位于LukAB启动子/启动子界面区(在本文中也称为界面1;图1)、二聚体/二聚体界面区(在本文中也称为界面2;图1)、LukB膜结合裂隙区(图1)、LukB成孔区(PORE;图1)或其任何组合中的保守残基处。在某些方面,杀白细胞素亚基形成二聚体、低聚化、在真核细胞的表面上形成孔或其任何组合的能力被破坏。因此,在某些方面,相对于相应的野生型LukA亚基、野生型LukB亚基或LukAB二聚体,突变型杀白细胞素亚基或突变型LukAB二聚体的毒性降低。在某些方面,相对于相应的野生型杀白细胞素亚基或二聚体,所述取代、缺失或其组合不显著降低突变型LukA亚基、突变型LukB亚基或突变型LukAB二聚体的免疫原性。

[0076] 如本文所提及,“保守氨基酸”或“保守残基”是分别在图2和图3的比对中所示的野生型LukA亚基和LukB亚基多肽序列中的那些残基,所述残基跨所有或大多数LukA或LukB序列,例如比对中的序列在相应位置处相同。LukA和LukB在各种金黄色葡萄球菌菌株中都是保守的。图2和图3分别示出代表性LukA(SEQ ID No.2-14)和LukB(SEQ ID No.16-27)氨基酸序列的比对。SEQ ID NO.1和28描绘共有多数LukA氨基酸序列的全长和成熟型式,其中代表了每个位置处最频繁使用的氨基酸。SEQ ID NO.15和29描绘共有多数LukB氨基酸序列的全长和成熟型式,其中代表了每个位置处最频繁使用的氨基酸。保守残基处的取代不应与“保守氨基酸取代”相混淆,本领域普通技术人员将其理解为用具有相似性质的另一氨基酸取代具有某些物理和/或化学性质的氨基酸,尽管保守残基处的取代可包括保守和非保守型取代。

[0077] 除非另有说明,否则以下LukA亚基和LukB取代、缺失和插入(以及贯穿本公开和所附权利要求书所提及的那些)是参考对应于SEQ ID NO:28的位置进行的,SEQ ID NO:28是SEQ ID NO:1的共有多数LukA序列的成熟形式;或者是参考对应于SEQ ID NO:29的位置进行的,SEQ ID NO:29是SEQ ID NO:15的共有多数LukB序列的成熟形式。

[0078] 启动子/启动子界面:

[0079] 在某些方面,突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽在LukAB启动子/启动子界面区(图1;界面1)中包含突变。在某些方面,这种突变导致不完整的较大杀白细胞素八聚体环的形成、降低或消除毒素的溶血活性或其任何组合。在某些方面,启动子/启动子界面区中的突变位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸L61的LukA位置(图1,插图G和图2)、对应于SEQ ID NO:29的氨基酸D49的LukB位置处(图1,插图H和图3;盐桥E)或其组合。对应于SEQ ID NO:28的L61的LukA L61位置与 α -毒素的H35和LukS-PV的T28同源。在 α -毒素的H35处的突变减少启动子-启动子相互作用,从而导致当通过EM观察时不完整的更大八聚体环,并且消除了所述毒素的溶血活性。在LukS-PV的位置T28处的突变也降低了毒性(PCT公布号W02011/112570,其以引用的方式并入本文)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸L61的LukA位置被天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)或精氨酸(R)取代,其可破坏在LukAB启动子/启动子界面内发现的疏水口袋。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸L61的LukA位置被天冬酰胺(N)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸L61的LukA位置被谷氨酰胺(Q)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸L61的LukA位置被精氨酸(R)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸D49的LukB位置被丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:29的氨基酸D49的LukB D49与对应于SEQ ID NO:28的氨基酸R49的LukA

R49之间的盐桥(图1,插图H;盐桥E)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸D49的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸D49的LukB位置被赖氨酸(K)取代。

[0080] 二聚体/二聚体界面:

[0081] 在某些方面,突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽在LukAB二聚体/二聚体界面区(图1;界面2)中包含突变。在某些方面,这种突变可破坏LukAB二聚体的形成、可破坏真核细胞表面上的LukAB低聚化、可破坏真核细胞表面上的LukAB孔形成或其组合。在某些方面,LukAB二聚体/二聚体界面区中的突变位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D39的LukA位置处(图1,插图B和图2;盐桥B)、位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D75的LukA位置处(图1,插图A和图2;盐桥A)、位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸K138的LukA位置处(图1,插图D和图2;盐桥D)、位于对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D197的LukA位置处(图1,插图C和图2;盐桥C);位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K12的LukB位置处(图3)、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K19的LukB位置处(图3)、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸R23的LukB位置处(图1,插图A和图3;盐桥A)、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K58的LukB位置处(图1,插图B和图3;盐桥B);位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸E112的LukB位置处(图1,插图D和图3;盐桥D)、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K218的LukB位置处(图1,插图C和图3;盐桥C)、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸1-29的LukB位置处(图3),并且进行比对以用HlgB的氨基酸1-29或其任何组合取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D39的LukA位置被丙氨酸(A)或精氨酸(R)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA D39与对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB K58之间的盐桥(图1,插图B;盐桥B)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D39的LukA位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D39的LukA位置被精氨酸(R)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D75的LukA位置被丙氨酸(A)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75与对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23之间的盐桥(图1,插图A;盐桥A)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸K138的LukA位置被丙氨酸(A)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA K138与对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB E112之间的盐桥(图1,插图D;盐桥D)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D197的LukA位置被丙氨酸(A)或赖氨酸(K)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA D197与对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB K218之间的盐桥(图1,插图C;盐桥C)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D197的LukA位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:28的氨基酸D197的LukA位置被赖氨酸(K)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K12的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K19的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸R23的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23与对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75之间的盐桥(图1,插图A;盐桥A)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸R23的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸R23的LukB位置被谷氨酸(E)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K58的LukB位置被丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:29的K58的LukB K58与对应于SEQ ID NO:28的D39的LukA D39之间的盐桥(图1,插图B;盐桥B)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K58的LukB位置被丙氨酸(A)

取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K58的LukB位置被谷氨酸(E)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸E112的LukB位置被丙氨酸(A)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:29的E112的LukB E112与对应于SEQ ID NO:28的K138的LukA K138之间的盐桥(图1,插图D;盐桥D)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K218的LukB位置被丙氨酸(A)取代,其可破坏对应于SEQ ID NO:29的K218的LukB K218与对应于SEQ ID NO:28的D197的LukA D197之间的盐桥(图1,插图C;盐桥C)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K12、K19和R23的LukB位置分别被丙氨酸(A)、丙氨酸(A)和丙氨酸(A)或谷氨酸(E)取代,其可至少破坏对应于SEQ ID NO:29的R23的LukB R23与对应于SEQ ID NO:28的D75的LukA D75之间的盐桥(图1,插图A;盐桥A)。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K12、K19和R23的LukB位置分别被丙氨酸(A)、丙氨酸(A)和丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸K12、K19和R23的LukB位置分别被丙氨酸(A)、丙氨酸(A)和谷氨酸(E)取代。在某些方面,如本文更全面描述的,对应于SEQ ID NO:29的氨基酸1-29的LukB位置被HlgB的氨基酸1-29取代,并且被称为“LukB-HlgB”,其可降低LukAB毒性并产生对HlgB的N末端残基的抗体应答。

[0082] 膜结合裂隙区:

[0083] 在某些方面,突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽在LukB膜结合裂隙区中包含突变(图1)。在某些方面,这种突变可破坏LukB亚基与真核细胞的脂质双层的极性头基的相互作用。在某些方面,LukB膜结合裂隙区中的突变位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸H180的LukB位置处、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸E197的LukB位置处、位于对应于SEQ ID NO:29的氨基酸R203的LukB位置处或其任何组合(图1,插图F)。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的H180的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的E197的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,所述对应于SEQ ID NO:29的R203的LukB位置被丙氨酸(A)取代。在某些方面,对应于SEQ ID NO:29的H180、E197和R203的LukB位置被丙氨酸(A)取代。

[0084] 成孔区:

[0085] 在某些方面,突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽在LukB成孔区中包含突变(图1)。在某些方面,这种突变可阻碍在真核细胞的表面上形成的LukAB孔的细胞质边缘,从而阻碍孔形成。在某些方面,LukB成孔区中的突变包含对应于SEQ ID NO:29的F125至T133的氨基酸的缺失(图1,插图E)。在某些方面,可在对应于SEQ ID NO:29的D124的位置处的氨基酸后插入柔性氨基酸插入例如一个、两个、三个、四个、五个或更多个甘氨酸(G)残基。

[0086] 在某些方面,与相应的野生型杀白细胞素亚基相比,本文中任何地方公开的突变型LukA亚基、突变型LukB亚基或突变型LukAB二聚体在嗜中性粒细胞毒性测定中的毒性更低。在某些方面,本文任何地方公开的突变型LukA亚基、突变型LukB亚基或突变型LukAB二聚体表现出>50%、>60%、>70%、>80%、>90%或>95%的活性损失。在一些方面,实现了毒性/活性的损失而未负面地影响免疫原性。

[0087] LukA多肽

[0088] 本文公开了一种分离的突变型葡萄球菌LukA亚基多肽,所述分离的突变型葡萄球菌LukA亚基多肽包含野生型葡萄球菌LukA亚基、由所述亚基组成或基本上由所述亚基组成,除了在所述LukA亚基中的保守残基处具有一种或多种突变(例如氨基酸取代、缺失或其

组合)外。在某些方面,所述一种或多种突变包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸取代、缺失、插入或其组合。在某些方面,所述氨基酸取代、缺失、插入或其组合位于LukAB启动子/启动子界面区(在本文中也称为界面1;图1)、二聚体/二聚体界面区(在本文中也称为界面2;图1)或其任何组合中的保守残基处。在某些方面,LukA亚基形成二聚体、低聚化、在真核细胞的表面上形成孔或其任何组合的能力被破坏。因此,在某些方面,相对于相应的野生型LukA亚基,突变型LukA亚基的毒性降低。在某些方面,相对于相应的野生型杀白细胞素亚基或二聚体,所述取代、缺失、插入或其组合不显著降低突变型LukA亚基或突变型LukAB二聚体的免疫原性。

[0089] 图2中所示的比对含有共有多数LukA序列的多肽氨基酸序列(SEQ ID NO:1,顶部)和来自所述多数序列所对应的13种不同的代表性金黄色葡萄球菌菌株的野生型LukA多肽氨基酸序列(SEQ ID NO:2-14)。

[0090] SEQ ID NO:1-14中的每个中的N-末端27个氨基酸残基代表天然的分泌/信号序列。本领域普通技术人员将了解如何通过省略前27个氨基酸残基来确定成熟形式LukA的序列而没有来自SEQ ID NO:1-14中未成熟形式的信号序列。SEQ ID NO:28(在图2中所示的比对的底部示出)是源自SEQ ID NO:1的共有多数LukA序列的成熟LukA序列。SEQ ID NO:32-44是分别对应于SEQ ID NO:2-14的成熟LukA序列。例如,在某些方面,野生型LukA序列是SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:32的成熟形式,其对金黄色葡萄球菌的Newman菌株而言天然的LukA多肽:

[0091] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNK
KEHVDKSSQKDKRNVTKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTET
VYDEKTNILQNLQFDFIDDPYDKNVLLVKKQGSIHNLKF
ESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDVFQVKRNRKTEILDQLPKNKI
STAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNY
DTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDLLFYR
NTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSN
EKTQFEVTTYTRNQDILKNRPGIHYAPPILKKNKDGQRLIVTY
EVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0092] (SEQ ID NO:2;27个氨基酸的信号序列呈粗体加下划线;剩余序列是SEQ ID NO:32)。

[0093] 在某些方面,突变型多肽所来源于的野生型LukA亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43以及SEQ ID NO:44。

[0094] LukB多肽

[0095] 还公开了一种分离的突变型葡萄球菌LukB亚基多肽,所述分离的突变型葡萄球菌LukB亚基多肽包含野生型葡萄球菌LukB亚基、由所述亚基组成或基本上由所述亚基组成,除了在所述LukB亚基中的保守残基处具有一种或多种突变(例如氨基酸取代、缺失、插入或其组合)外。在某些方面,所述一种或多种突变包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个氨基酸取代、缺失、插入或其组合。在某些方面,所述氨基酸取代、缺失、插入或其组合位于LukAB启动子/启动子界面区(在本文中也称为界面1;图1)、二聚体/二聚体界面

区(在本文中也称为界面2;图1)、LukB膜结合裂隙区(图1)、LukB成孔区(图1)或其任何组合中的保守残基处。在某些方面,LukB亚基形成二聚体、低聚化、在真核细胞的表面上形成孔或其任何组合的能力被破坏。因此,在某些方面,相对于相应的野生型LukB亚基,突变型LukB亚基的毒性降低。在某些方面,相对于相应的野生型杀白细胞素亚基或二聚体,所述取代、缺失、插入或其组合不显著降低突变型LukB亚基或突变型LukAB二聚体的免疫原性。

[0096] 图3中所示的比对含有共有多数LukB序列的多肽氨基酸序列(SEQ ID NO:15)和来自所述多数序列所对应的12种不同的代表性金黄色葡萄球菌菌株的野生型LukB多肽氨基酸序列(SEQ ID NO:16-27)。

[0097] SEQ ID NO:15、16和18-27中的每个中的N-末端29个氨基酸残基代表天然的分泌/信号序列(SEQ ID NO:17LukB COL不包含信号序列)。本领域普通技术人员将了解如何通过省略前29个氨基酸残基来确定成熟形式LukB的序列而没有来自SEQ ID NO:16和18-27中未成熟形式的信号序列。SEQ ID NO:29(在图3中所示的比对的底部示出)是源自SEQ ID NO:15的多数LukB序列的成熟LukB序列。SEQ ID NO:45-55是分别对应于SEQ ID NO:16和18-27的成熟LukB序列。例如,在某些方面,野生型LukB序列是SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:55的成熟形式,其是对金黄色葡萄球菌的Newman菌株而言天然的LukB多肽:

[0098] MIKQLCKNITICTLALSTTFTVLPATSEAKINSEIKQVSEK
NLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETV
FIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDN
NNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTG
NITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLIN
NMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPK
DKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSM
DEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDWKT
HNVKFVKVLNDNEKK

[0099] (SEQ ID NO:27;29个氨基酸的信号序列呈粗体加下划线;剩余序列是SEQ ID NO:55)。

[0100] 在某些方面,突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽包含用HlgB取代LukB的前29个残基(LukB-HlgB)(SEQ ID NO:58)。

[0101] 在某些实施方案中,所述野生型LukB亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54以及SEQ ID NO:55。

[0102] 还公开了一种多肽复合物,所述多肽复合物包含如本文所述的任何突变型杀白细胞素亚基。所述一个或多个取代、缺失或其组合可以是维持突变型杀白细胞素亚基复合物的结构和构象的任何氨基酸。

[0103] 在另一方面,本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)可连接至异源多肽。可使用各种异源多肽,包括但不限于赋予稳定、分泌或简化纯化的N-或C-末端肽,如六组氨酸-标签、泛素标签、NusA标签、几丁质结合结构域、ompT、ompA、pelB、DsbA、DsbC、c-myc、KSI、聚天冬氨酸、(Ala-Trp-Trp-Pro)_n、聚苯丙氨酸、聚半胱氨酸、聚精氨酸、B-标签、HSB-标签、绿色荧光蛋白(GFP)、流感病毒血凝素(HAI)、钙调素结合蛋白

(CBP)、半乳糖结合蛋白、麦芽糖结合蛋白(MBP)、纤维素结合结构域(CBD)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、链球菌蛋白G、葡萄球菌蛋白A、噬菌体T7基因10前导序列、抗生物素蛋白/抗生物素蛋白/**STREP-TAG®**复合物、trpE、氯霉素乙酰转移酶、lacZ(β -半乳糖苷酶)、His-patch硫氧还蛋白、硫氧还蛋白、FLAG™肽(Sigma-Aldrich)、S-标签或T7标签。参见例如,Stevens,R.C.,Structure,8:R177-R185(2000)。异源多肽还可包括有助于从宿主细胞进行如本文所述的LukA和/或LukB多肽的转运、易位、加工和/或纯化的任何前序列和/或原序列或任何有用的免疫原性序列,包括但不限于编码微生物病原体的T细胞表位或其它免疫原性蛋白质和/或表位的序列。

[0104] 在一些方面,如本文所述,连接至异源多肽的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)可包含肽接头序列,所述肽接头序列连接包含两个或更多个肽区的序列。可基于它们采用柔性、延伸构象、或可与连接的表位相互作用的二级结构的能力、或基于它们增加融合多肽的总体溶解性的能力、或基于它们缺乏影响连接的肽区的静电或水相互作用效应而选择合适的肽接头序列。

[0105] 在一些方面,分离了如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)。“分离”的多肽是已从其天然环境除去的多肽。术语“分离的”并不意味着纯化的任何特定水平。出于本公开的目的,在非天然宿主细胞中表达的如本文所述的重组产生的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)被认为是分离的,已通过任何合适的技术(包括通过过滤、色谱法、离心等)分离、分级分离或部分或基本上纯化的多肽也被认为是分离的。

[0106] 如本文所述,突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的产生可通过培养包含可操作地编码本公开多肽的多核苷酸的宿主细胞并回收所述多肽来实现。确定用于培养这种宿主细胞并表达所述多核苷酸的条件通常对所述宿主细胞和表达系统具有特异性,并且在本领域技术人员知识范围内。同样,用于回收本公开的多肽的合适方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于色谱法、过滤、沉淀或离心。

[0107] 多核苷酸

[0108] 本公开还涉及一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽亚基的核酸,所述分离的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽亚基包含野生型葡萄球菌LukA亚基、野生型葡萄球菌LukB亚基或野生型葡萄球菌LukAB二聚体、由所述亚基或二聚体组成或基本上由所述亚基或二聚体组成,除了具有如本文所述的一种或多种突变外,所述一种或多种突变相对于相应的野生型杀白细胞素亚基降低突变型杀白细胞素亚基的毒性。在某些方面,相对于相应的野生型杀白细胞素亚基或二聚体,所述取代、缺失或其组合不显著降低突变型LukA亚基、突变型LukB亚基或突变型LukAB二聚体的免疫原性。

[0109] 例如,核苷酸序列SEQ ID NO:30编码SEQ ID NO:2的金黄色葡萄球菌(Newman)的LukA多肽,并且核苷酸序列SEQ ID NO:31编码SEQ ID NO:27的金黄色葡萄球菌(Newman)的LukB多肽。

[0110] 在某些方面,如本文所述的分离的多核苷酸还包含非编码区,诸如本文其它地方所述的启动子、操纵子或转录终止子。在一些方面,本公开涉及如本文所述并且还包含异源核酸的多核苷酸。在一些方面,所述异源核酸可编码与如本文所述的多肽融合的异源多肽。

例如,如本文所述的分离的多核苷酸可包含编码例如与如本文所述的多肽融合的异源多肽的另外编码区,或编码与如本文所述的多肽分离的异源多肽的编码区,如但不限于选择性标记、另外的免疫原、免疫增强子等。

[0111] 还提供了包含本文所述的多核苷酸的表达构建体、载体和/或宿主细胞。

[0112] 分离的多核苷酸的实例是在载体中包含的重组多核苷酸。分离的多核苷酸的其它实例包括维持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中的(部分或基本上)纯化的多核苷酸。在本公开的某些方面,多核苷酸是“重组的”。根据本公开的分离的多核苷酸或核酸还包括以合成方式产生的此类分子。本文所述的多核苷酸或多肽的相对纯度可通过熟知的方法容易地确定。

[0113] 密码子优化

[0114] 编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的遗传工程化的多核苷酸也包括在本公开的范围。编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的核酸的修饰可由本领域技术人员容易地实现,例如通过寡核苷酸定向的位点特异性诱变或从头核酸合成来实现。

[0115] 一些方面公开了一种包含核酸片段的分离的多核苷酸,所述核酸片段编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者),其中编码所述多肽的编码区已进行密码子优化。如本领域普通技术人员所了解的,由于遗传密码的冗余,各种核酸编码区将编码同一多肽。包含编码任何多肽链的氨基酸的密码子的核苷酸序列的偏差允许编码区序列的差异。由于每个密码子由三个核苷酸组成,并且包含DNA的核苷酸被限制为四个特定碱基,因此存在64种可能的核苷酸组合,其中61种编码氨基酸(剩余三个密码子编码终止翻译的信号)。显示哪些密码子编码哪些氨基酸的“遗传密码”在本文中如表1所重现。结果,许多氨基酸由多于一个密码子指定。例如,氨基酸丙氨酸和脯氨酸由四个三联体编码,丝氨酸和精氨酸由六个三联体编码,而色氨酸和蛋氨酸仅由一个三联体编码。这种简并性允许DNA碱基组成在广泛范围内变化,而不会改变由DNA编码的多肽的氨基酸序列。

[0116] 表1:标准遗传密码

[0117]

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC “ TTA Leu (L) TTG “	TCT Ser (S) TCC “ TCA “ TCG “	TAT Tyr (Y) TAC “ TAA Ter TAG Ter	TGT Cys (C) TGC TGA Ter TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC “ CTA “ CTG “	CCT Pro (P) CCC “ CCA “ CCG “	CAT His (H) CAC “ CAA Gln (Q) CAG “	CGT Arg (R) CGC “ CGA “ CGG “
A	ATT Ile (I) ATC “ ATA “ ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC “ ACA “ ACG “	AAT Asn (N) AAC “ AAA Lys (K) AAG “	AGT Ser (S) AGC “ AGA Arg (R) AGG “
G	GTT Val (V) GTC “ GTA “ GTG “	GCT Ala (A) GCC “ GCA “ GCG “	GAT Asp (D) GAC “ GAA Glu (E) GAG “	GGT Gly (G) GGC “ GGA “ GGG “

[0118] 应了解,根据本公开的编码多肽的任何多核苷酸均在本公开的范围,而与所使用的密码子无关。

[0119] 许多生物体显示出对使用特定密码子编码在生长多肽链中特定氨基酸的插入的偏倚。密码子偏好或密码子偏倚(生物体之间密码子使用的差异)由遗传密码的简并性提供,并且在许多生物体中都有据可查。

[0120] 已经提出了不同的因素来促进密码子使用偏好,包括翻译选择、GC组成、链特异性突变偏倚、氨基酸保守性、蛋白质亲水性、转录选择以及甚至RNA稳定性。决定密码子使用的一种因素是形成基因组GC组成的突变偏倚。这种因素在具有极端碱基组成的基因组中最显著:具有高GC含量的物种(例如革兰氏阳性细菌)。突变偏倚不仅是密码子使用的基因间差异的原因,而且是同一基因组内的密码子使用的基因间差异的原因(Ermolaeva M, Curr. Issues Mol. Biol. 3(4):91-97, 2001)。

[0121] 密码子偏倚经常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,所述翻译效率进而被认为依赖于(除其它之外)所翻译的密码子的性质和特定转移RNA(tRNA)分子的可用性。所选tRNA在细胞中的优势通常反映肽合成中最常使用的密码子。因此,可基于密码子优化来定制基因以在给定生物体中最佳基因表达。

[0122] 本公开涉及一种包含密码子优化的编码区的多核苷酸,所述密码子优化的编码区编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽(例如,LukA或LukB或两者)。密码子使用适于在给定原核或真核宿主细胞中的优化表达。

[0123] 通过将优选用于给定物种的基因的密码子并入DNA序列中来制备密码子优化的多核苷酸。例如,SEQ ID NO:56是大肠杆菌密码子优化的核苷酸序列,其编码来自金黄色葡萄球菌的Newman菌株的LukA多肽亚基。SEQ ID NO:57是大肠杆菌密码子优化的核苷酸序列,其编码来自金黄色葡萄球菌Newman菌株的LukB多肽亚基。还提供了包含多核苷酸的多核苷

酸表达构建体、载体、宿主细胞,所述多核苷酸包含密码子优化的编码区,所述密码子优化的编码区编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基多肽(例如,LukA或LukB或两者)。

[0124] 鉴于可用于多种动物、植物和微生物物种的大量基因序列,有可能计算出密码子使用的相对频率。密码子使用表可容易地例如在<http://www.kazusa.or.jp/codon/> (2011年10月12日访问)的“密码子使用数据库”获得,并且可以多种方式对这些表进行修改。(Nakamura,Y.,等人,“Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases:status for the year 2000”Nucl.Acids Res.28:292,2000)。

[0125] 通过利用可用的表,本领域普通技术人员可将频率应用于任何给定的多肽序列,并且产生密码子优化的编码区的核酸片段,所述编码区编码所需的多肽、但是使用对于给定物种而言最佳的密码子。例如,在本公开的一些方面,对编码区进行密码子优化以在大肠杆菌中表达。

[0126] DNA合成

[0127] 使用本领域普通技术人员熟知的标准和常规分子生物学操作,许多选项可用于合成通过任何上述方法设计的密码子优化的编码区。此外,基因合成可容易地商购获得。

[0128] 载体和表达系统

[0129] 还公开了一种包含如本文所述的多核苷酸的载体。如本文所用,术语“载体”是指例如可例如通过限制性和连接将所需序列插入其中以便在不同遗传环境之间转运或在宿主细胞中表达的许多核酸中的任一种。核酸载体可以是DNA或RNA。载体包括但不限于质粒、噬菌体、噬菌粒、细菌基因组和病毒基因组。克隆载体是能够在宿主细胞中复制的载体,并且其特征还在于一个或多个核酸内切酶限制性位点,在所述位点可以可确定的方式裂解所述载体,并且可将所需的DNA序列连接至其中,使得新的重组载体保留其在宿主细胞中复制的能力。就质粒而言,当质粒在宿主细菌内的拷贝数增加时,所需序列的复制可发生多次,或者在宿主通过有丝分裂繁殖之前每个宿主仅复制一次。在噬菌体的情况下,复制可在裂解阶段主动发生,或在溶菌阶段被动发生。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制。其它载体在引入宿主细胞中后整合至所述宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。

[0130] 可与适当的宿主一起使用的多种合适的克隆载体中的任一种是本领域已知并且可商购的。如本文所用,术语“质粒”是指由遗传物质(即,核酸)组成的环状双链构建体,其中所述遗传物质是染色体外的并且在一些情况下自主复制。本文所述的多核苷酸可在环状或线性化质粒中或在任何其它种类的载体中。用于将核苷酸序列插入载体(例如表达载体)并转化或转染至适当宿主细胞中且在适合表达的条件下培养的程序通常是本领域已知的。

[0131] 根据本公开的一个方面,提供了一种载体,所述载体包含编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的核酸序列。在某些方面,所述载体是能够在合适的宿主细胞中表达如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的表达载体。术语“表达载体”是指能够表达本文描述的多肽的载体,即载体序列含有多肽的转录和翻译所需的调控序列,包括但不限于启动子、操纵子、转录终止位点、核糖体结合位点等。术语“表达”是指由编码序列编码的产物的生物产生。在大多数情况下,DNA序列(包括编码序列)被转录以形成信使RNA(mRNA)。然后,所述信使RNA被翻译以

形成具有相关生物活性的多肽产物。此外,表达过程可涉及进一步加工步骤至RNA产物的转录,如剪接以除去内含子和/或多肽产物的转录后加工。

[0132] 载体-宿主系统包括但不限于在体内(例如在动物中)或在体外(例如在细菌或细胞培养物中)的系统诸如细菌、哺乳动物、酵母、昆虫或植物细胞系统。根据本文的教义,适当宿主的选择应在本领域技术人员的范围内。在某些方面,宿主细胞是细菌,例如大肠杆菌。

[0133] 用本公开的载体对宿主细胞进行遗传工程化(感染、转导、转化或转染)。因此,本公开的一个方面涉及一种包含载体的宿主细胞,所述载体包含如本文所述的多核苷酸。工程化的宿主细胞可在被改良为适合用于活化启动子、选择转化子或扩增多核苷酸常规培养基中培养。培养条件,如温度、pH等是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对普通技术人员将是显而易见的。如本文所用,术语“转染”是指诱导真核细胞接受分离的DNA(包括但不限于呈质粒形式的DNA)并将分离的DNA并入其基因组中的任何程序。如本文所用,术语“转化”是指诱导细菌细胞接受分离的DNA(包括但不限于呈质粒形式的DNA)并将分离的DNA并入其基因组中的任何程序。

[0134] 细菌宿主表达载体系统包括但不限于用重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA转化的原核生物(例如大肠杆菌)。在一些方面,与大肠杆菌一起使用的质粒使用由LacI蛋白经由IPTG诱导调控的T7启动子驱动的系统。大量合适的载体是本领域技术人员已知的,并且可商购获得。通过举例提供以下细菌载体:pET(Novagen)、pET28、pBAD、pTrcHIS、pBR322、pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、phagescript、psiX174、pBluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK243-3、pDR540、pBR322、pPS10、RSF1010、pRIT5(Pharmacia);pCR(Invitrogen);pLex(Invitrogen)以及pUC质粒衍生物。

[0135] 合适的表达载体含有调控序列,所述调控序列可以可操作地连接至编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或二者)的插入核苷酸序列。如本文所用,术语“调控序列”是指对宿主细胞转录编码如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的插入序列而言必需或有利和/或对宿主细胞将所得转录物翻译成所需的突变型杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)而言必需或有利的核苷酸序列。调控序列包括但不限于5'序列,如操纵子、启动子和核糖体结合序列;和3'序列,如聚腺苷酸化信号或转录终止子。调控序列也可包括增强子序列或上游活化子序列。

[0136] 一般来说,细菌载体将包括复制起点和选择性标记,例如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、大肠杆菌的抗性基因,从而允许宿主细胞转化;以及源自高度表达基因的启动子以直接转录下游结构序列。合适的启动子包括但不限于T7启动子、 λ (λ)启动子、T5启动子和lac启动子,或源自编码糖酵解酶如3-磷酸甘油酸激酶(PGK)、酸性磷酸酶或热休克蛋白的操纵子的启动子,或诱导型启动子如镅(pcad)和 β -内酰胺酶(pbla)。

[0137] 一旦选择了表达载体,就可将如本文所述的多核苷酸克隆在启动子的下游,例如在多接头区中。将所述载体转化至适当的大肠杆菌菌株中,并且使用标准技术制备DNA。使用限制性酶切作图、DNA序列分析和/或PCR分析确认多核苷酸的取向和DNA序列以及包括在载体中的所有其它元件。带有正确质粒的细菌细胞可作为细胞库储存。

[0138] 免疫原性组合物和药物组合物

[0139] 还公开了含有有效量的如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如, LukA或LukB或两者)或编码本公开的多肽的多核苷酸的组合物,例如免疫原性组合物或药物组合物。如本文所述的组合物还可包含另外的免疫原性组分(例如作为多价疫苗)以及载剂、赋形剂或佐剂。

[0140] 可根据已知的方法配制如本文所述的组合物。适合的制备方法描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,第19版,A.R.Gennaro,编辑,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1995)中,所述文献以引用的方式整体并入本文。组合物可呈多种形式,包括但不限于,水溶液、乳液、凝胶、悬浮液、冻干形式或本领域已知的任何其它形式。此外,所述组合物可含有药学上可接受的添加剂,包括例如稀释剂、粘合剂、稳定剂和防腐剂。一旦配制,本公开的组合物即可直接施用至受试者。待治疗的受试者可以是动物;特别地,可治疗人受试者。

[0141] 可与本公开的组合物一起使用的载剂是本领域熟知的,并且包括但不限于,例如甲状腺球蛋白、白蛋白(如人血清白蛋白)、破伤风类毒素和聚氨基酸(如聚L-赖氨酸、聚L-谷氨酸)、流感病毒、乙型肝炎病毒病毒核心蛋白等。可使用多种水性载剂,例如水、缓冲水、0.8%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。可通过常规的、熟知的灭菌技术将组合物灭菌,或者可将其过滤灭菌。可将得到的组合物包装为原样使用、或冻干,所述冻干制剂在施用之前与无菌溶液组合。根据需要,组合物可含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,如PH调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨糖醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。

[0142] 如本文所述的某些组合物还包含一种或多种佐剂,佐剂是添加至免疫原性组合物以例如增强、维持、定位或调节对免疫原的免疫应答的物质。术语“佐剂”是指具有(1)改变或增加对特定抗原的免疫应答或(2)增加或有助于药剂的作用的能力的任何材料。可增加多肽的表达、抗原性或免疫原性的任何化合物都是潜在佐剂。如本文所用,术语“免疫原性载剂”是指增强第二多肽或其片段、变体或衍生物的免疫原性的第一部分,例如多肽或其片段、变体或衍生物。

[0143] 多种材料已显示出通过多种机制具有佐剂活性。例如,体液免疫的增加典型地通过针对抗原产生的抗体的效价的显著升高来表现,并且T细胞活性的增加典型地在细胞增殖或细胞毒性或细胞因子分泌方面的增加中来表现。佐剂还可例如通过将初次体液或Th2应答改变为初次细胞或Th1应答而改变或调节免疫应答。对给定抗原的免疫应答可通过本领域普通技术人员熟知和/或本文其它地方描述的各种免疫测定来进行测试。

[0144] 多种佐剂是本领域普通技术人员熟悉的,并且在许多参考文献中进行了描述。可用于本文所述的组合物中的佐剂包括但不限于:惰性载剂,如明矾、膨润土、胶乳和丙烯酸类颗粒;不完全弗氏佐剂、完全弗氏佐剂;基于铝的盐,如氢氧化铝;ALHYDROGEL®(Al(OH)₃);磷酸铝(AlPO₄);基于钙的盐;二氧化硅;任何TLR生物配体;IDC-1001(也称为GLA-SE;吡喃葡萄糖基脂质佐剂稳定乳液)(Coler等人,PLoS One,2010.5(10):第e13677页;Coler等人,PLoS One,2011.6(1):第e16333页);CpG(Mullen等人,PLoS One,2008.3(8):第e2940页)或其任何组合。佐剂的量、如何配制以及如何施用的所有参数完全在本领域普通技术人员的能力范围内。

[0145] 在一些方面,本公开的组合物还包含脂质体或其它微粒载剂,所述脂质体或其它

颗粒载剂可例如用于稳定制剂、使制剂靶向特定组织如淋巴组织、或增加多肽组合物的半衰期。此类微粒载剂包括乳液、泡沫、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散物、板状层(lamellar layer)、iscoms等。在这些制剂中,本文描述的多肽可作为脂质体或其它颗粒的一部分并入,或者可与脂质体缀合递送。根据本公开使用的脂质体可由标准的形成囊泡的脂质形成,所述脂质通常包括中性或带负电荷的磷脂和固醇,如胆固醇。包含脂质体或其它微粒悬浮液以及如本文所述的多肽的组合物可按一定剂量静脉内、局部、局部施用,所述剂量尤其根据施用方式、所递送的多肽和所治疗疾病的阶段而变化。

[0146] 对于固体组合物,可使用常规无毒固体载剂,其包括例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。对于口服施用,通过并入任何通常使用的赋形剂(如先前列出的那些载剂)和通常10%-95%的活性成分(即,如本文所述肽,通常处于25%-75%的浓度)而形成药学上可接受的无毒组合物。

[0147] 对于气雾剂或粘膜施用,如本文所述的多肽可以细分形式提供,任选地与表面活性剂和推进剂和/或粘膜粘附剂(例如壳聚糖)一起提供。表面活性剂当然必须是药学上可接受的,并且在一些方面可溶于推进剂中。此类剂的代表是含有6至22个碳原子的脂肪酸与脂肪族多元醇或其环酐的酯或偏酯,所述脂肪酸如己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、油硬脂酸以及油酸。可使用混合酯,如混合的或天然的甘油酯。表面活性剂可占组合物的0.1重量%-20重量%,在一些方面0.25重量%-5重量%。组合物的余量通常是推进剂,尽管可使用不需要推进剂的雾化器并且相应地调整其它百分比。在一些方面,可将免疫原性多肽并入空气动力学轻颗粒(如美国专利号6,942,868或美国专利公布号2005/0008633中所述的那些颗粒)内。也可包括载剂,例如用于鼻内递送的卵磷脂。

[0148] 本公开还涉及一种产生根据本公开的组合物的方法。在一些方面,所述产生所述组合物的方法包括:(a)分离根据本公开的多肽;以及(b)向所述分离的多肽添加佐剂、载剂和/或赋形剂。一些方面公开了将多肽与其它葡萄球菌抗原进一步组合。

[0149] 一些方面包括多价疫苗。本公开的多价疫苗包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)、或编码一个或两个亚基的多核苷酸以及一种或多种其它免疫原性组分。此类组分可以是同一传染因子(例如金黄色葡萄球菌)或来自其它葡萄球菌的另外免疫原,或者可以是源自其它传染因子的可有效、方便或经济地一起施用的免疫原。在某些方面,如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)可与其它毒素或其它基于毒性组分的疫苗组合以制备能够靶向多个细菌毒力决定簇的基于广泛毒素的多价疫苗。在其它方面,如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)可与含有其它免疫原性、生物学上重要或保护性表位的多肽融合,以在单链中产生多价疫苗并诱导针对多种抗原的免疫应答。在又一个实施方案中,如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)可与一种或多种T细胞表位融合,以与抗杀白细胞素抗体一起诱导T细胞免疫。

[0150] 治疗/预防方法和方案

[0151] 还提供了一种在受试者中治疗或预防葡萄球菌(例如,金黄色葡萄球菌)感染或治疗或预防由葡萄球菌(例如,金黄色葡萄球菌)引起的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如本文所述的包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载

体或宿主细胞。在某些方面,受试者是动物,例如脊椎动物,例如哺乳动物,例如人。一些方面包括一种诱导针对金黄色葡萄球菌菌株的免疫应答的方法,所述方法包括向需要所述免疫应答的受试者施用有效量的如本文所述的包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载体或宿主细胞。

[0152] 在一些方面,向受试者预防性地施用如本文所述的包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载体或宿主细胞,例如作为预防性疫苗,以在潜在或实际暴露于葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)或罹患葡萄球菌相关症状之前在健康动物中建立或增强针对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)的免疫,从而预防疾病、缓解症状、减轻症状或降低疾病症状的严重程度。在一个实施方案中,所述疾病是呼吸系统疾病,例如肺炎。待治疗或预防的其它疾病或疾患包括但不限于菌血症、败血症、皮肤感染、伤口感染、心内膜炎、骨骼和关节感染、骨髓炎和/或脑膜炎。如本文所述的一种或多种组合物、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞也可用于治疗已经暴露于葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)或已经患有葡萄球菌相关症状的受试者以进一步刺激动物的免疫系统,从而减轻或消除与所述暴露相关的症状。如本文所定义,“动物的治疗”是指使用本公开的一种或多种组合物、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞来在动物中预防、治愈、延缓金黄色葡萄球菌症状或降低金黄色葡萄球菌症状的严重程度,和/或使得在指定时间段内没有金黄色葡萄球菌症状的恶化。不需要如本文所述的任何组合物、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞提供针对葡萄球菌感染的全面保护或完全治愈或消除与葡萄球菌有关的所有症状。

[0153] 如本文所用,“需要治疗性和/或预防性免疫的受试者”是指期望治疗,即预防、治愈、延缓葡萄球菌相关症状或降低葡萄球菌相关症状的严重程度或使得在指定时间内没有葡萄球菌相关症状的恶化的受试者。如本文所用,“需要免疫应答的受试者”是指需要针对任何表达LukAB的葡萄球菌菌株的免疫应答的受试者。

[0154] 在适当的情况下,用包含如本文所述的免疫原性组合物、多肽或多核苷酸的药物组合物治疗可单独发生或与其它治疗结合发生。

[0155] 在治疗性应用中,将本公开的组合物、多肽或多核苷酸以足以引发针对金黄色葡萄球菌LukAB来源的多肽的有效先天性体液或细胞应答或两者以治愈或至少部分地阻止症状或并发症的量施用至患者。

[0156] 足以实现此目标的量被定义为“治疗有效剂量”或“单位剂量”。对于这种用途有效的量将取决于例如多肽或多核苷酸组成、施用方式、所治疗疾病的阶段和严重程度、患者的体重和总体健康状况以及开处方医生的判断,但一般来说多肽疫苗的初始免疫的范围是(用于治疗性或预防性施用)约例如0.1 μ g至约5000 μ g的多肽,这取决于通过测量例如患者的血液中的抗体水平确定的患者的应答和状况。在一些方面,在一段时间内,初免剂量之后是加强剂量。

[0157] 在本公开的非限制性方面,如本文公开的有效量的组合物使抗体滴度升高至施用前抗体滴度的至少2、5、10、50、100、500、1000、5000、10⁴、5x 10⁴或10⁵倍。

[0158] 在替代方面,通常对于人,施用初始免疫(用于治疗性或预防性施用),然后取决于通过测量患者血液中的抗体或T淋巴细胞应答确定的患者的应答和状况在数周至数月内根

据加强方案在相同剂量范围内施用加强剂量。

[0159] 必须记住,如本文所述的多肽和组合物通常可用于严重的疾病状态,即危及生命或潜在危及生命的情况。在此类情况下,鉴于外来物质的最小化和多肽的相对无毒性,治疗医师有可能并且感觉到需要施用显著过量的这些多肽组合物。

[0160] 对于治疗性用途,应从金黄色葡萄球菌感染或风险因素的第一个迹象开始施用。在某些方面,初始剂量之后是加强剂量,直到例如症状基本减轻并且持续此后一段时间。在频繁感染中,可能需要负载剂量,然后是加强剂量。

[0161] 在某些方面,通过本文所述的方法将如本文所述的组合物递送至受试者,从而实现有效的免疫应答和/或有效的治疗性或预防性免疫应答。可使用任何施用方式,只要所述方式以足以产生对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)的免疫应答和/或在需要这种应答的动物中产生针对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)的预防或治疗上有效的免疫应答的量产生所需多肽在所需组织中的递送和/或表达。根据所公开的方法,本文所述的组合物可通过粘膜递送、透皮递送、皮下注射、静脉内注射、口服施用、肺部施用、肌肉(i.m.)施用或经由腹膜内注射来施用。其它合适的施用途径包括但不限于气管内、透皮、眼内、鼻内、吸入、腔内、导管内(例如,进入胰腺)和实质内(即进入任何组织)施用。透皮递送包括但不限于皮内(例如进入真皮或表皮)、透皮(例如经皮)和经粘膜施用(即进入或通过皮肤或粘膜组织)。腔内施用包括但不限于施用至口腔、阴道、直肠、鼻、腹膜或肠腔内以及鞘内(即进入椎管)、脑室内(即进入脑室或心室)、动脉内(即进入心房)和蛛网膜下(即进入脑的蛛网膜下腔)施用。

[0162] 可使用任何施用方式,只要所述方式以足以产生对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)的免疫应答和/或在需要这种应答的动物中产生针对葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)的预防或治疗上有效的免疫应答的量产生所需多肽的递送和/或表达。如本文所述的施用可通过例如针注射或本领域已知的其它递送或装置进行。

[0163] 在一些方面,包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载体或宿主细胞刺激抗体应答或细胞介导的免疫应答以足以用于保护动物免受葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)感染。在其它方面,包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载体或宿主细胞刺激体液和细胞介导的应答两者,其组合足以用于保护动物免受葡萄球菌(例如金黄色葡萄球菌)感染。在一些方面,包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载体或宿主细胞进一步刺激先天性、抗体和/或细胞免疫应答。

[0164] 在一些方面,包含如本文所述的突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基(例如,LukA或LukB或两者)的组合物或编码所述突变型葡萄球菌杀白细胞素亚基的多核苷酸、载体或宿主细胞诱导针对金黄色葡萄球菌白细胞毒素的抗体应答。在某些方面,将诱导T细胞应答的组分(例如,T细胞表位)与诸如本文所述的主要诱导抗体应答的多肽的组分组合。

[0165] 还公开了一种用于在受试者中产生、增强或调节针对金黄色葡萄球菌感染的保护性和/或治疗性免疫应答的方法,所述方法包括向需要治疗性和/或预防性免疫的受试者施用一种或多种如本文所述的组合物。

[0166] 如本文所述的组合物可在其所施用至的动物的生命周期中的任何时间施用至动

物。在人中,如本文所述的组合物的施用可以并且通常有利地在施用其它疫苗的同时发生,例如作为如本文其它地方所述的多价疫苗。

[0167] 此外,如本文所述的组合物可用于任何所需的免疫或给药方案;例如,在单次施用中或者可替代地作为定期疫苗接种方案(如年度疫苗接种)的一部分、或在初免-加强方案中,其中本公开的组合物或多肽或多核苷酸在施用相同或不同的多肽或多核苷酸之前或之后施用。最近的研究已表明,初免-加强方案通常是施用疫苗的合适方法。在初免-加强方案中,如本文所述的一种或多种组合物可用于“初免加强”方案。“初免加强”方案的实例可在Yang,Z.等人J.Virol.77:799-803,2002中找到,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0168] 待治疗的感染包括但不限于皮肤、软组织、血液或器官的局部或全身性感染或自身免疫性疾病。待治疗或预防的特定疾病或疾患包括但不限于呼吸系统疾病,例如肺炎、败血症、皮肤感染、伤口感染、心内膜炎、骨骼和关节感染、骨髓炎和/或脑膜炎。

[0169] 免疫相关

[0170] 用于金黄色葡萄球菌感染的许多动物模型是本领域已知的,并且可与本文公开的方法一起使用而无需过度实验。例如,已经描述了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)肺炎的仓鼠模型用于测试抗微生物剂。(Verghese A.等人,Chemotherapy.34:497-503(1988);Kephart PA.等人J Antimicrob Chemother.21:33-9,(1988))。此外,描述了成年免疫活性C57BL/6J小鼠中金黄色葡萄球菌诱导的肺炎的模型,其紧密模拟人患者中肺炎的临床和病理特征。(Bubeck-Wardenburg J.等人,Infect Immun.75:1040-4(2007))。另外,如McElroy等人(McElroy MC.等人,Infect Immun.67:5541-4(1999))所述,已经在金黄色葡萄球菌肺炎的大鼠模型中测试了毒力。最后,在绵羊中建立了MRSA诱导的败血性肺炎的标准化和可再现模型以评价新疗法。(Enkhbaatar P.等人,Shock.29(5):642-9(2008))。

[0171] 除非另外指出,否则本公开的实践将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA以及免疫学的常规技术,所述技术处于本领域的技能之内。此类技术在文献中被充分解释。参见,例如Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press:(1989);Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人编辑,Cold Springs Harbor Laboratory, New York(1992),DNA Cloning,D.N.Glover编辑,第I和II卷(1985);Oligonucleotide Synthesis,M.J.Gait编辑,(1984);Mullis等人美国专利号:4,683,195;Nucleic Acid Hybridization,B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1984);Transcription And Translation,B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1984);Culture Of Animal Cells,R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,(1987);Immobilized Cells And Enzymes,IRL Press,(1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the treatise,Methods In Enzymology,Academic Press,Inc.,N.Y.;Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells,J.H.Miller和M.P.Calos编辑,Cold Spring Harbor Laboratory(1987);Methods In Enzymology,第154和155期(Wu等人编辑);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology,Mayer和Walker编辑,Academic Press,London(1987);Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷,D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,(1986);Manipulating the Mouse Embryo,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,(1986);以及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,

John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) 中。

[0172] 阐述免疫学的一般原则的标准参考著作包括Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley&Sons, New York (1982); Roitt, I., Brostoff, J. 和 Male D., Immunology, 第6版 London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. 和 Lichtman, A., Cellular and Molecular Immunology, 第5版, Elsevier Health Sciences Division (2005); 以及 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)。

[0173] 实施例

[0174] 实施例1: 用于诱变的候选位点的结构分析和确定:

[0175] 分泌的LukAB二聚体的八聚体化以在靶细胞的表面上形成孔对它的功能至关重要。因此, 设计了将破坏异二聚体界面并选择减毒但高度免疫原性的LukAB类毒素的突变。为此, 使盐桥分别在称为界面1和2的LukAB原体(启动子-启动子)和异二聚体(二聚体-二聚体)界面处突变(图1)。在界面1处, 使所述盐桥中的LukB D49和LukA R49残基突变为LukB D49A和LukA R49E, 以引入排斥性静电相互作用。类似地, 在界面2处, 在LukA上进行K138A、D197A、D75A、D39A突变以分别破坏与LukB残基E112、K218、R23和K58A的盐桥相互作用。编号是基于如在Badarau A. 等人, J. Biol. Chem. 290 (1): 142-56 (2015) 中所公开并且可在[https 互联网网站“rcsb.org/structure/4TW1”](https://rcsb.org/structure/4TW1)上找到的4tw1结构。此外, 设计了LukAD197K以及LukB R23E和K58E突变以引入排斥性静电相互作用。除盐桥以外, 还基于与 α 毒素的H35和LukS PV的T28的同源性设计了突变来影响毒性(LukA L61N/Q/R)。还靶向 α 毒素和LukF的边缘结构域的裂隙内的同源残基, 即LukB H180A、E197A和R203A, 因为它们已显示与脂质双层的极性头基结合。另外, 还设计了置换LukB残基125-133(FSINRGGLT)的突变以干扰孔的细胞质边缘上的接触位点。

[0176] 实施例2: LukA和LukB突变型的产生

[0177] 如本文其它地方所述, 基于结构分析选择了LukA和LukB突变型。将突变引入LukA和LukB的cDNA构建体中, 出于纯化目的所述构建体可携带N-末端6xHis标签。通过PCR合成编码相应成熟蛋白序列的野生型LukA和LukB DNA片段(来自Newman金黄色葡萄球菌), 将其用限制酶处理以产生粘性末端, 并且克隆至表达载体例如pET24a(+)和AmpR P15a起点LukB pET24a(+)中, 如实施例3所述, 通过相容的限制酶消化。使用可商购的诱变试剂盒, 例如通过使用**QUIKCHANGE® II**定点诱变试剂盒(Stratagene), 将突变引入DNA中。

[0178] 实施例3: 质粒信息和蛋白质表达

[0179] 与其它白细胞毒素不同, LukAB蛋白在表达为独立的亚基时不稳定。DuMont等人(2014) Identification of a crucial residue required for Staphylococcus aureus LukAB cytotoxicity and receptor recognition. Infect. Immun. 82, 1268-1276。因此, LukA和LukB是从同一大肠杆菌细胞内的两个不同质粒表达的。为了表达两种蛋白质, 通过使用具有现有卡那霉素抗性标记物的NdeI-XhoI限制性位点将LukA(野生型或突变型)克隆到pET24a(+)中。为了表达LukB wt和蛋白质的突变型, 用氨苄青霉素置换pET24a(+)卡那霉素抗性标记物, 并且通过p15a置换复制起点, 从而得到质粒: AmpR P15a起点LukB pET24a(+)。使用NdeI-XhoI限制性位点克隆了LukB型式的蛋白质(野生型和突变型)。通过在含有

两种(卡那霉素50和氨苄青霉素100)抗生素的LB板上进行转化选择,将这些LukB型式的质粒移动至含有pET24a(+)LukA(野生型或突变型)质粒的BL21(DE3)中。

[0180] 以下是用于构建P15a起点LukB pET24a(+)的p15a起点的序列:GCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCACTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCGTTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCTGCCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTCACTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAGTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAGACATGCAAAAGCACCAGTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGAAGTGCCTCTCCAAGCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGTTTTTTTCGTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTCTAGATTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGT (SEQ ID NO:59)

[0181] 实施例4:LukAB突变型的纯化

[0182] 将LukAB序列克隆至pETDuet中或单独pET24a+表达质粒中。当使用双质粒表达时,使用标准pET24a+质粒表达LukA,使用具有取代的ori(p15a)和抗生素抗性盒(AmpR)序列的修饰的质粒表达LukB。将质粒单独转化(pETDuet-1)或共转化(双质粒系统)至BL21-DE3细胞中。通过向对数中期的细胞培养物中添加IPTG来诱导蛋白质表达,然后在25℃振荡孵育过夜(大约16小时)。通过离心使细胞沉淀,重悬于细胞溶解缓冲液中,用溶菌酶处理并通过超声处理溶解。通过用聚乙烯亚胺(PEI)沉淀除去核酸,并且通过添加硫酸铵粉末将蛋白质从PEI上清液中盐析出来。将硫酸铵沉淀重悬,在脱盐柱上进行缓冲液交换并通过离心澄清。接下来通过阳离子交换和混合模式色谱法的组合纯化澄清的缓冲液交换的材料,并且然后透析至最终制剂缓冲液中。

[0183] 实施例5:LukA和LukB突变型的减弱

[0184] 通过以下方法,在嗜中性粒细胞毒性测定中分别与野生型LukA或LukB组合测试了LukA和LukB突变型。使用96孔圆底组织培养板,将野生型或突变型LukA或LukB蛋白一式两份在测定培养基(例如,RPMI,2%FBS,5mM谷氨酰胺)中沿板向下稀释,随后添加 5×10^5 个DMSO诱导的HL-60细胞。通过用DMSO处理,使HL-60细胞分化为嗜中性粒细胞。轻轻敲击悬浮液,并将板在37℃与5%CO₂和95%湿度下孵育48小时。为了确定细胞活力,向每个孔中添加20μL的2mg/mL稀释的XTT(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),在37℃与5%CO₂和95%湿度下孵育6小时,离心并将上清液转移至ELISA板并读取至470nm。如下确定存活百分比(%): $\text{存活}\% = (\text{实验样品孔的OD值} / \text{无PVL毒素的HL-60细胞的OD值}) \times 100$ 。

[0185] 实施例6:使用临床相关佐剂的小鼠中的免疫原性研究

[0186] 免疫原性和佐剂研究:使用临床相关的佐剂对小鼠进行了免疫原性研究。

[0187] 将雌性BALB/c小鼠的组用5μg的突变型LukA、突变型LukB或突变型LukA和LukB的组合与佐剂以2周的间隔进行肌肉内(IM)疫苗接种三次。作为对照,将小鼠用与等效佐剂组合的野生型(wt)LukA或LukB以及无关抗原(例如,STEBVax;葡萄球菌肠毒素B疫苗)以相同

的方案疫苗接种。将小鼠在第21天和第35天时取血。使用HL-60来源的嗜中性粒细胞,通过将LukA或LukB蛋白与血清一起预孵育、然后添加至HL-60细胞中来确定中和抗体滴度,如以上嗜中性粒细胞毒性测定中所述。将针对LukA和/或LukB的抗体应答与针对野生型LukA或LukB的应答进行比较。

[0188] 实施例7:针对启动子-启动子界面(界面1)进行并测试的突变和结果

[0189] LukA的L61(图1)与 α 毒素的H35和LukS PV的T28比对。在 α -毒素的H35处的突变减少启动子-启动子相互作用,从而导致当通过EM观察时不完整的更大八聚体环,并且消除了所述毒素的溶血活性(Jursch等人, *Infect Immun.* 1994 Jun; 62 (6) :2249-56)。类似地,已经显示LukF T28突变干扰LukS-PV和LukF-PV的缔合(Guillet等人, 2004, *J Biol Chemistry*, 279 (39) :41028-37)。在单独构建体中使LukA中的L61突变为N、Q或R,并且对相应LukA_{mut}B_{wt}二聚体复合物进行了纯化并测试了毒性。

[0190] 如图4所示,将L61诱变为N或Q不会减弱LukAB,其中L61Q突变型似乎显著增加毒性,特别是在较低浓度下。LukA_{L61N}B_{wt}和LukA_{L61Q}B_{wt}的50%毒性浓度(EC₅₀)低于野生型LukAB。相比之下,LukA的L61R突变型被显著减弱。尽管用LukA_{L61R}B_{wt}达到的最大平均毒性不超过70%,但在低至1nM的浓度下仍观察到毒性。无法计算LukA_{L61R}B_{wt}的EC₅₀。

[0191] 启动子-启动子相互作用通过许多盐桥得以稳定(Baradau等人, 2015, *J Biol Chem.* 290 (1) :142-56)。Baradau等人已经证明,LukAB的边缘结构域中盐桥的破坏不稳定,从而产生不能纯化的不溶性分子(Baradau等人, 2015, *J Biol Chem.* 290 (1) :142-56)。启动子-启动子界面中的另一个盐桥涉及LukA R49与LukB D49的相互作用(图1,盐桥E)。产生了LukB突变型D49A和D49K以破坏这种静电相互作用。

[0192] 与野生型LukAB相比,LukA_{wt}B_{D49A}和LukA_{wt}B_{D49K}仅表现出轻微的减弱,其中D49A和D49K突变的EC₅₀值仅略有增加(图5)。这些数据表明仅使此盐桥突变不显著减弱LukAB。

[0193] 实施例8:针对二聚体-二聚体界面(界面2)进行并测试的突变和结果

[0194] LukAB二聚体的八聚化是其细胞毒性所必需的(Baradau等人, 2015, *J Biol Chem.* 290 (1) :142-56)。二聚体-二聚体界面中的四个盐桥可使八聚体结构稳定(图1;界面2;盐桥A-D)。Baradau等人证明当与野生型LukB组合时LukA D75和D197的组合丙氨酸取代(图1中的盐桥A和C),或者当与野生型LukA组合时LukB中R23和K218的相互丙氨酸取代在HL-60细胞来源的人嗜中性粒细胞种在高达约50nM的浓度下无毒性。未测试更高的浓度。在此,产生了若干突变型,所述突变型破坏一个或多个盐桥以鉴定潜在疫苗候选物。

[0195] 产生了在K12、K19、R23、K58、K218、E112或其组合中携带突变的LukB突变型,所述突变型各自单独与LukA_{wt}复合。产生了在D39、D75、K138、D197或其组合中携带突变的LukA突变型,所述突变型各自单独与LukB_{wt}复合。所有蛋白质都是可溶的并且可以合理的产率纯化。

[0196] 盐桥A的破坏。当与野生型LukA组合时,R23突变为丙氨酸和谷氨酸显著减弱LukAB的毒性(图6)。两种突变型都可容易地产生并纯化为二聚体。LukA_{wt}B_{R23A}显示1.62nM的EC₅₀,代表约12倍的减弱,而LukA_{wt}B_{R23E}突变型表现出22.29nM的EC₅₀,代表约150倍减弱。目视检查晶体结构突出显示在R23附近的两个另外带正电的LukB残基(K12和K19),所述残基也可促成带正电的口袋并与LukA D75相互作用。因此,在LukB中产生了具有三个取代的第三突变型:LukA_{wt}B_{K12A/K19A/R23A}。这种三重突变型比LukA_{wt}B_{R23A}更弱,但远不及LukA_{wt}B_{R23E}。尽管减

弱,但在较高浓度下,两种突变型均显示出65%-75%的残余毒性(图6)。这些数据表明,靶向盐桥A在使毒素减弱中非常有效,然而,在高浓度的突变型中仍有残余毒性。

[0197] H1gB和LukB的序列比对表明H1gB缺乏在N末端处的关键带正电的残基,所述带正电的残基对于减弱LukAB毒性是重要的。因此,作为替代方法,将LukB的前29个残基与H1gB交换以降低LukAB毒性并产生对H1gB的N末端残基的抗体应答。当与LukA_{wt}和LukA_{L61R}配对时,这种LukB_{H1gB}突变型在高达20 μ M的浓度下未显示毒性。

[0198] H1gB-LukB融合体的序列如下。粗体带下划线的部分是LukB的N末端交换的H1gB的N末端:

[0199] **AEGKITPVSVKKVDDKVTLTKTTATADSDQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKG**
TIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYG
YKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNM
GHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMS
HDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKLSALYEVDW
KTHNVKFVKVLNDNEKK (SEQ ID NO: 58)

[0200] 盐桥B的破坏。盐桥B涉及LukA D39与LukB K58之间的静电相互作用。产生了四种突变型来破坏这一盐桥:LukA_{wt}B_{K58A}、LukA_{wt}B_{K58E}、LukA_{D39A}B_{wt}和LukA_{D39R}B_{wt}。所有蛋白质都可产生并纯化为二聚体。与野生型LukA复合的LukB突变型显示约30倍的减弱,残余毒性>80%(图7A)。还产生了LukA D39至丙氨酸或精氨酸的相互突变,并纯化且与野生型LukB复合。如图7B所示,这些突变型具有类似于野生型LukAB的毒性概况,其中在LukA_{D39A}情况下观察到轻微减弱。

[0201] 盐桥C的破坏。盐桥C涉及LukA D197与LukB K218之间的静电相互作用。产生了LukA_{D197A}LukB_{wt}突变型并测试了毒性。所述蛋白质表达良好并纯化为二聚体。然而,所述突变型并未显著减弱(图8),从而表明盐桥C中的单一突变在此实验中不会影响毒性。

[0202] 盐桥D的破坏。通过PDB PISA进行的结构界面分析表明LukA K138与LukB E112之间的潜在盐桥(盐桥D)。在此实验中,纯化的突变型LukA_{wt}LukB_{E112A}仅适度减弱(图9)。

[0203] 实施例9:针对膜结合裂隙进行并测试的突变和结果

[0204] 与磷酸胆碱结合的LukF-PV的膜结合裂隙已被鉴定为包括残基W176、E191和R197(Guillet等人,2004,J Biol Chemistry,279(39):41028-37)。使LukB分子中的同源残基(分别H180、E197和R203)突变以研究对LukAB毒性的影响。尽管H180的丙氨酸取代对LukAB毒性没有影响,但其它突变型LukA_{wt}LukB_{E197A}和LukA_{wt}LukB_{R203A}表现出适度减弱,其中与野生型相比EC₅₀值分别增加4.3和5.2倍(图10)。

[0205] 实施例10:针对孔进行并测试的突变和结果

[0206] 使LukB上的柔性表面环内的残基,残基125-133(FSINRGGLT)缺失以封闭孔的细胞质边缘。连同所述缺失,这些残基在D124之后被短的甘氨酸接头(1-5个甘氨酸)置换,以在D124与G134之间提供柔性环并维持蛋白质结构稳定性。此环内的残基与来自H1gB中的同源区的那些残基(SNGLS)交替地交换。当与LukA_{wt}配对时,所有这些LukB突变型均导致非常差的产率,且毒性适度减弱。

[0207] 实施例11:组合的突变、结果和候选疫苗的选择

[0208] 进一步的努力集中于组合单独突变以实现最大减弱。此外,评价突变型蛋白在小

鼠中的免疫原性。

[0209] 包括LukAL_{61R}的组合突变。将LukAL_{61R}与在盐桥A (R23)、C (K218)、D (E112) 和E (D49) 中具有单个氨基酸取代的LukB突变型组合。此外,LukA的L61R突变也与破坏盐桥A的H1gB-LukB融合体和LukB K12/K19/R23突变型组合。此外,L61R与膜结合裂隙中的R203A突变组合。

[0210] 如表2所示,总体上,含有L61R的突变型高度减弱,其中一些在10-12μM的最高浓度下基本上不显示毒性活性。所述突变型中的一些如LukAL_{61R}LukBE_{112A}、LukAL_{61R}LukBR_{203A}和LukAL_{61R}LukBK_{218A}在较高浓度下表现出残余毒性(表2)。测试了若干类毒素的免疫原性,并且表现出野生型抗原的约20%-30%的抗体应答范围(表2)。

[0211] 影响盐桥的组合突变。将本身具有适度减弱作用的LukA D39(盐桥B)突变与盐桥A中的其它LukB突变(R23和K12/K19/R23的三重突变)、C (K218) 和D (E112) 组合。如表2所示,减弱水平变化较大,其中LukAD_{39A}LukBE_{112A}、LukAD_{39R}LukBE_{112A}和LukAD_{39A}LukBK_{218A}仅减弱两倍,而LukAD_{39A}LukBR_{23E}和LukAD_{39R}LukBR_{23E}分别减弱696倍和419倍。与LukAD_{39R}LukBR_{23E}相比,LukAD_{39A}LukBR_{23E}表现出更低的残余毒性和更高的免疫原性(表2)。

[0212] LukAD_{197K}(盐桥C)也与LukB盐桥A突变型组合。如表2所示,与LukAD_{39R}LukBR_{23E}相比,LukAD_{197K}LukBR_{23E}显示出较高水平的减弱(588倍)、但较低水平的免疫原性。此外,还产生了LukAK_{138A}LukBK_{218A}突变型。然而,与野生型LukAB相比,这种突变型未减弱(表2)。

[0213] 再次测试了一组显示出良好减弱的选定类毒素的免疫原性。将5只小鼠的组用全部在ALHYDROGEL®中配制的LukA_{wt}LukBR_{23E}、LukAD_{39A}LukBR_{23E}、LukAL_{61R}LukBH_{1gB}和LukAL_{61R}LukBK_{12A/K19A/R23A}或野生型LukAB进行免疫。测试来自单独小鼠的血清的ELISA结合和毒素中和。如图11所示,所有类毒素均显示出相似的ELISA IgG滴度。然而,组合的突变型(高度减毒的类毒素;每个亚基中至少一个突变)之中的中和滴度在LukAD_{39A}LukBR_{23E}情况下最高。

[0214] 表2:共纯化的LukA和LukB类毒素的组合突变的毒性和免疫原性。减弱倍数被计算为类毒素EC₅₀相对于野生型的比率(HL60测定)。在五只小鼠的组中进行免疫原性,并且测试来自每组的汇集血清的与野生型LukAB的ELISA结合或野生型LukAB的中和。

[0215] 表2:

[0216]

LukA	LukB	EC50 (nM)	减弱 (倍数)	残余毒性	TNA (NT50) (血清稀释)	ELISA (EC50) (血清稀释)
wt	wt	0.145	1	100%	2950	5535
L61R	D49K	199	1372	100%	NT	1220
L61R	R23A	>10,000	>68,000	0%	165	863
L61R	R23E	11000	75862	0%	219	1560
L61R	E112A	>50	>345	96%	598	NT
L61R	R203A	40	275	55%	NT	NT
L61R	K218A	236	1628	54%	NT	2640
L61R	K12A/K19A/R23A	12430	85724	0%	613	2310
L61R	LukB-HlgB	>8,000	>55,000	0%	728	67222
D39A	E112A	0.26	2	100%	NT	4770
D39A	K12A/K19A/R23A	2.56	18	96%	1030	965
D39R	K12A/K19A/R23A	0.58	4	94%	NT	942
D39A	R23E	101	696	60%	784	1560
D39A	K218A	0.35	2	100%	NT	3615
D39R	E112A	0.263	2	100%	NT	1560
D39R	R23E	60.8	419	77%	334	682
D39R	K218A	<7	<48	100%	2170	NT
D197K	R23A	<12	<82	100%	NT	1610
D197K	R23E	85	588	76%	NT	855
K138A	K218A	0.15	1	100%	NT	2320

[0217] *****

[0218] 本公开不限于所描述的具体方面或实施方案的范围,所述具体方面或实施方案意图作为本公开的单独方面的单个说明,并且功能上等效的任何组合物或方法处于本公开的范围之内。确实,除了本文示出和描述的那些之外,根据以上描述和所附附图,本公开的各种修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。此类修改意图落在所附权利要求书的范围之内。

[0219] 在本说明书中提及的所有出版物和专利申请都以引用的方式并入本文,其程度如同具体地和单独地指出每个单独的出版物或专利申请以引用的方式并入。

[0220] 序列

[0221] LukA序列

[0222] SEQ ID NO:1

[0223] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKEKRNVTNKDKNSTXPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHSLNKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKKNKDGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0224] SEQ ID NO:2

[0225] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVTNKDKNSTAPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHSLNKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVTTYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKKNKDGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0226] SEQ ID NO:3

[0227] MKNKKRVFIASSLSCALLLLSAANTEANSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGK
NGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHNRNETNASWLKYPSEYHVDQVQR
NPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSVIAN
DLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKSNEKTRFEVITYTRNQDIL
KNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSDQNKPYKEG

[0228] SEQ ID NO:4

[0229] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKEKRVNTNKDNSTVPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKNKEGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDNKSFREG

[0230] SEQ ID NO:5

[0231] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTAPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKNKEGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYTDNKSFREG

[0232] SEQ ID NO:6

[0233] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKEKRVNTNKDNSTVPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEFKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKNKEGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDNKSFREG

[0234] SEQ ID NO:7

[0235] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTVPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0236] SEQ ID NO:8

[0237] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTVPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQKYDTIAIGKNNNWHVHWSVIAN
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0238] SEQ ID NO:9

[0239] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTAPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYTDKNVLLVKKQGSIHNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVQR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIAN

DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPPILEKKNKGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0240] SEQ ID NO:10

[0241] MKNKKRVFIASSLSCALLLLSAANTEANSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGK
NGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQR
NPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSV
DLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTRFEVITYTRNQDIL
KNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSDQNKPYKEG

[0242] SEQ ID NO:11

[0243] MKNKKRVFIASSLSCALLLLSAANTEANSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGK
NGKVTKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEENNSSLKYPSEYHVDQVKS
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYNSGGKFDSTKGVGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSV
DLKYGGEVKNRNDDFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDVL
KNKPGIHYAPPILEKKNKGQRLIVTYEVDWKNKTVKVIDKYSDENKPYKEG

[0244] SEQ ID NO:12

[0245] MKNKKRVFIASSLSCVLLLLSAANTEANSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGK
NGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFIDDPYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQR
NPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSLGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSV
DLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKSNEKTRFEVITYTRNQDIL
KNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSDQNKPYKEG

[0246] SEQ ID NO:13

[0247] MKNKKRVFIASSLSCALLLLSAANTEANSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGK
NGKVTKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYDKNILVKKQGSIHSLKFESHKEENNSSLKYPSEYHVDQVKNR
RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYNSGGKFDSTKGVGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSV
LKYGGEVKNRNDEFLFYRTTTLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILK
NKPPIHYAPPILEKKNKGQRLIVTYEVDWKNKTVKVIDKYSDDNKPYKEG

[0248] SEQ ID NO:14

[0249] MKNKKRVLIASSLSCAILLLSAATTQANSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTVPDDIGK
NGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFIDDPYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVKNR
NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSV
DLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDIL
KNRPGIHYAPSILEKKNKGQRLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0250] SEQ ID NO:28

[0251] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKEKRVNTNKDNSTXPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDQVKNRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSY
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTIYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKKNKGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0252] SEQ ID NO:30 (编码SEQ ID NO:2)

[0253] ATGAAAAATA AAAAACGTGT TTTAATAGCG TCATCATTAT CATGTGCAAT TTTATTGTTA
TCAGCAGCAA CGACTCAAGC AAATTCAGCT CATAAAGACT CTCAAGACCA AAATAAGAAA GAACATGTTG
ATAAGTCTCA ACAAAAAGAC AAACGTAATG TTTACTAATAA AGATAAAAAAT TCAACAGCAC CGGATGATAT
TGGGAAAAAC GGTAAAATCA CAAAACGAAC TGAAACAGTA TATGATGAGA AAACAAATAT ACTCCAAAAT
TTACAATTCG ACTTTATCGA TGATCCAACT TATGACAAGA ATGTATTACT TGTAAAAAAA CAAGGCTCAA
TTCATTCAAA TTTAAAGTTT GAATCTCATA AAGAAGAAAA AAATTCAAAT TGGTTAAAGT ATCCAAGTGA
GTACCATGTA GATTTTCAAG TAAAAAGAAA TCGTAAAAC TAAATATTAG ACCAATTGCC GAAAAATAAA
ATTTCAACTG CAAAAGTAGA CAGTACATTT TCATATAGCT CAGGTGGTAA ATTCGATTCA ACAAAGGTA
TTGGACGAAC TTCATCAAAT AGCTACTCCA AAACGATTAG TTATAATCAG CAAAATTATG ACACAATTGC
CAGCGGTAAA AATAATAACT GGCATGTACA CTGGTCAGTT ATTGCGAATG ACTTGAAGTA TGGTGGAGAA
GTGAAAAATA GAAATGATGA ATTATTATTC TATAGAAATA CGAGAATTGC TACTGTAGAA AACCTGAAC
TAAGCTTTGC TTCAAAATAT AGATACCCAG CATTAGTAAG AAGTGGCTTT AATCCAGAAT TTTAACTTA
TTTATCTAAT GAAAAGTCAA ATGAGAAAAC GCAATTTGAA GTAACATACA CACGAAATCA AGATATTTTG
AAAAACAGAC CTGGAATACA TTATGCACCT CCAATTTTAG AAAAAATAA AGATGGTCAA AGATTAATTG
TCACTTATGA AGTTGATTGG AAAAAATAAA CAGTTAAAGT CGTTGATAAA TATTCTGATG ACAATAAACC
TTATAAGAA GGATAA

[0254] SEQ ID NO:32

[0255] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVNKNKSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKNRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDPELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0256] SEQ ID NO:33

[0257] NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQDFI
IDDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHNRNETNASWLKYPSEYHVDFQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFS
YSLGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSI SYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSVIVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRL
TVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFI
VVEVDWKNKTVKVVEKYSDQNKPYKEG

[0258] SEQ ID NO:34

[0259] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKEKRNVTNKNKSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKNRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDPELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKEGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDNKSFRG

[0260] SEQ ID NO:35

[0261] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRNVNKNKSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKNRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDPELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKFGQRLIVTYE

VDWKNKTVKVVDKYTDNKSFREG

[0262] SEQ ID NO:36

[0263] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKEKRVNTNKDNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKRNPKEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKEGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDNKSFREG

[0264] SEQ ID NO:37

[0265] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0266] SEQ ID NO:38

[0267] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTVPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQKYDTIAIGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0268] SEQ ID NO:39

[0269] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTNKDNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0270] SEQ ID NO:40

[0271] NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDFQVQRNPKEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
LGGKFDSTKGIGRTSSNSYSKSI SYNQQNYDTIASGKNNNRHVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTRLSTVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKTNDKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVYE
VDWKNKTVKVVEKYSDQNKPYKEG

[0272] SEQ ID NO:41

[0273] NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTETVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEENNSSWLKYPSEYHVDFQVKS NRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYN
SGGKFDSVKGVGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVANDLKYGGEVKNRNDDFLFYRNTRLSTVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDVLKNKPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVIDKYSDENKPYKEG

[0274] SEQ ID NO:42

[0275] NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQFDFI

DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHNETNASWLKYPSEYHVDQVQRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
LGGKFSTKGIGRTSSNSYSKSI SYNQQNYDTIASGKNNRHVHWSVANDLKYGNEIKNRNDEFLFYRNTLSTVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKSNEKTRFEVITYTRNQDILKNKPGIHYGQPILEQNKDGQRFIVVYE
VDWKNKTVKVVEKYSDQNKPYKEG

[0276] SEQ ID NO:43

[0277] NSANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRVNDKDKNTPGPDIGKNGKVTKRTEITVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNILLVKKQGSIHSLKFESHKEENSSWLKYPSEYHVDQVQRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYN
SGGKFDSVKGVGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNWHVHWSVANDLKYGGEVKNRNDEFLFYRTTLSTVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNKPGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVIDKYSDDNKPYKEG

[0278] SEQ ID NO:44

[0279] NSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKDKRVNTKDKNSTVPDDIGKNGKITKRTEITVYDEKTNILQNLQFDFI
DDPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFESHKEEKSNWLKYPSEYHVDQVQRNRKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYS
SGGKFSTKGIGRTSSNSYSKTI SYNQQNYDTIASGKNNWHVHWSVANDLKYGGEVKNRNDELLFYRNTRIATVE
NPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVITYTRNQDILKNRPGIHYAPSILEKNKDGQRLIVTYE
VDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG

[0280] SEQ ID NO:56

[0281] CATATGGACTCACAAGACCAGAACAAAAAAGAACACGTCGATAAATCCCAACAAAAAGATAAACGCAAT
GTCACCAATAAAGATAAAAAATAGCACCGCACCGGATGACATTGGCAAAACGGTAAATACCAAACGTACCGAAAC
GGTGTATGATGAAAAACGAATATTCTGCAGAACCTGCAATTTGATTTCATCGATGACCCGACCTACGACAAAAATG
TCCTGCTGGTGAAAAACAGGGCAGCATTCATTCTAACCTGAAATTCGAAAGTCACAAAGAAGAGAAAAACTCCAAC
TGGCTGAAATATCCGTCAGAATACCATGTTGATTTCAGGTCAAACGTAATCGCAAACCGAAATTCTGGACCAACT
GCCGAAAAACAAAATCAGTACCGCCAAAGTCGATAGTACGTTTTCTATAGCTCTGGCGGTAAATTCGACTCTACCA
AAGGCATCGGTCTGACGAGTTCCAACCTCATACTCGAAAACCATCTCGTACAACCAGCAAACTACGATACGATCGCA
AGCGGCAAAAAACAATACTGGCATGTGCACTGGTCTGTTATTGCTAACGATCTGAAATATGGCGGTGAAGTTAAAA
TCGCAACGACGAACTGCTGTTTTACCGTAATACCCGCATCGCGACGGTTGAAAACCCGGAAGTTCATTCGCGTCGA
AATATCGTTACCCGGCCCTGGTCCGACGCGTTTAAATCCGGAATTCCTGACCTACCTGAGCAACGAAAAATCTAAC
GAAAAACGCAGTTGGAAGTGACCTATACGCGTAATCAAGATATTCTGAAAAACCGCCCGGCATTCACTACGCACC
GCCGATCCTGGAGAAAAACAAAGATGGTCAGCGCCTGATCGTCACCTATGAAGTGGATTGGAAAAACAAACGGTTA
AAGTGGTTGACAAATATTCCGATGACAACAAACCGTACAAAGAAGGTTAATGACTCGAG

[0282] LukB序列

[0283] SEQ ID NO:15

[0284] MIKQLCKNITICSLALSTALTVFPATSYAKINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQF
NFLTEPNYDKETVFIKAGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTY
GYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINMGMHDHTRQLTNDSDNRT
KSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYW
SGENHVDKKEEKLALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0285] SEQ ID NO:16

[0286] MIKQVCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQF

NFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKL SALYEVDWKTHDVKLIKTFNDKEKK

[0287] SEQ ID NO:17

[0288] MYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSELFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0289] SEQ ID NO:18

[0290] MIKQVCKNITICSLALSTALTIFPASSYAKINSEIKQVSEKNLDGETKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEKNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILEPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINQGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNKHGFWGYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0291] SEQ ID NO:19

[0292] MIKQVCKNITICSLALSTALTVPASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNSTLTWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKL SALYEVDWKTHDVKLIKTFNDKEQK

[0293] SEQ ID NO:20

[0294] MIKQLCKNITICTLALSTTFTVLPATSF AKINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSE6FNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0295] SEQ ID NO:21

[0296] MIKQVCKNITICSLALSTALTVPASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSETISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKL SALYEVDWKTHDVKLIKTFNDKEQK

[0297] SEQ ID NO:22

[0298] MIKQLYKNITICSLAISTALTVPATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPFLLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHDVKFVKVLNDNEKK

[0299] SEQ ID NO:23

[0300] MIKQLYKNITICTLALSTTFTVLPATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQF
NFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTY
GYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRT
KSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYW
SGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0301] SEQ ID NO:24

[0302] MIKQLYKNITICSLTISTALTVPATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQF
NFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTY
GYKTGGDFSINRGGLPGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRT
KSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYW
SGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHDVKFVKVLNDNEKK

[0303] SEQ ID NO:25

[0304] MIKQLCKNITICTLALSTTFTVLPATSF AKINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQF
NFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTY
GYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRT
KSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYW
SGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0305] SEQ ID NO:26

[0306] MIKQLCKNITICTLALSTTFTVLPATSF AKINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQF
NFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTY
GYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRT
KSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYW
SGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0307] SEQ ID NO:27

[0308] MIKQLCKNITICTLALSTTFTVLPATSF AKINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQF
NFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTY
GYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRT
KSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYW
SGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDNEKK

[0309] SEQ ID NO:29

[0310] KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVTV
SEGFNPEFLAVMSH

[0311] DKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFVKVLNDN
EKK

[0312] SEQ ID NO:31 (编码SEQ ID NO:27) ATGATTAAAC AACTATGTAA AAATATCACA
ATTGTACGT TAGCACTATC GACTACTTTC ACTGTATTAC CAGCTACTTC ATTTGCAAAG ATTAATTCTG

AAATCAAACA AGTTTCTGAG AAGAATCTTG ATGGTGATAC TAAAATGTAT ACACGTACAG CTACAACAAG
TGATAGTCAA AAAAATATTA CTCAAAGCTT ACAATTTAAT TTCTTAACTG AACCTAATTA TGATAAAGAA
ACAGTATTTA TTAAAGCAAA AGGTACAATT GGTAGTGGTT TGAGAATTTT AGACCCAAAT GGTTATTGGA
ATAGTACATT AAGATGGCCT GGATCTTATT CAGTTTCAAT TCAAAATGTT GATGACAACA ACAATACAAA
TGTGACTGAC TTTGCACCAA AAAATCAGGA TGAATCAAGA GAAGTTAAAT ATACGTATGG TTATAAAACA
GGTGGAGATT TTTTCGATTAA TCGTGGAGGC TTAAGTGGAA ATATTACAAA AGAGAGTAAT TATTACAGAGA
CGATTAGTTA TCAACAACCA TCATATCGTA CATTACTTGA TCAATCTACG TCACATAAAG GTGTAGGTTG
GAAAGTAGAA GCACATTTGATAAATAATAT GGGACATGAC CATACGAGAC AATTAAGTAA
TGATAGTGATAATAGAACTA AAAGTGAAAT TTTTCTTTA ACACGAAATG GAAATTTATG GGCGAAAGAT
AATTTACAC CTAAAGACAA AATGCCTGTA ACTGTGTCTG AAGGGTTTAA TCCAGAATTT TTAGCTGTTA
TGTCACATGA TAAAAAAGAC AAAGGTAAAT CACAATTTGT TGTTCAATTAT AAAAGATCAA TGGATGAGTT
TAAAATAGAT TGAATCGCC ATGGTTTCTG GGGCTATTGG TCTGGTGAAA ACCATGTAGA TAAAAAAGAA
GAAAAATTAT CAGCATTATA TGAAGTTGAT TGGAAGACAC ATAATGTGAA GTTGTGAAAA GTACTTAATG
ATAATGAAAA GAAATAA

[0313] SEQ ID NO:45

[0314] EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILN
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNNSTNVTDFAFKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSET
ISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMGHDHTRQLTNSDDRKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKL SALYEVDWKTHDVKL
IKTFNDKEKK

[0315] SEQ ID NO:46

[0316] KINSEIKQVSEKNLDGETKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEKNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILE
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNNSTNVTDFAFKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQPTTNKGVAWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNSDDRKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
SEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNKHGFWGYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFI
KVLNDKEKK

[0317] SEQ ID NO:47

[0318] EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILN
PNGYWNSTLTWPGSYSVSIQNVDNNNSTNVTDFAFKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSET
ISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMGHDHTRQLTNSDDRKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKNDKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWSGENHVDQKEEKL SALYEVDWKTHDVKL
IKTINDKEQK

[0319] SEQ ID NO:48

[0320] KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDNNNSTNVTDFAFKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVT
SEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKEEKL SALYEVDWKTHNVKFI
KVLNDNEKK

[0321] SEQ ID NO:49

[0322] EIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILN
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKEKNYSET
ISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAWKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKNKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWGYWGENHVDQKEEKL SALYEVDWKTHDVKL
IKTINDKEQK

[0323] SEQ ID NO:50

[0324] KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHDVKFV
KVLNDNEKK

[0325] SEQ ID NO:51

[0326] KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFV
KVLNDNFKK

[0327] SEQ ID NO:52

[0328] KINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLPGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHDVKFV
KVLNDNEKK

[0329] SEQ ID NO:53

[0330] KTNSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKNKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKKDEGKSKFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFV
KVLNDNEKK

[0331] SEQ ID NO:54

[0332] KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVT
VSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVKFV
KVLNDNEKK

[0333] SEQ ID NO:55

[0334] KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILD
PNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETI
SYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPVT

SEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVK FV
KVLNDNEKK

[0335] SEQ ID NO:57

[0336] CATATGAAAATCAACTCAGAAATCAAACAAGTCTCCGAAAAAACCTGGATGGCGACACCAAAATGTAT
ACCCGCACGGCGACCACGAGCGACTCGCAGAAAAACATCACGCAGAGCCTGCAATTTAATTTCTGACCGAACCGAA
CTACGATAAAGAAACGGTGTTTCATCAAAGCAAAAGGCACCATCGGCTCAGGTCTGCGTATTCTGGACCCGAATGGCT
ACTGGAACCTCGACCCTGCGCTGGCCGGGTAGCTATTCTGTCTAGTATTGAGAATGTGGATGACAACAATAACACCAAC
GTGACGGATTTTGTCTCCGAAAAATCAAGACGAAAGTCGTGAAGTTAAATATACCTACGGCTATAAAACGGGCGGTGA
TTTCTCTATCAATCGCGGCGGTCTGACCGGTAATATTACGAAAGAATCGAACTATAGCGAAACCATCTCCTACCAGC
AACCGTCATATCGTACCCTGCTGGATCAGTCCACGTCACATAAAGGCGTGGGTGGAAAGTTGAAGCGCACCTGATC
AATAACATGGGCCATGATCACACCCGTCAACTGACGAATGATAGCGACAACCGCACGAAATCTGAAATTTTTAGTCT
CACCCGCAATGGTAACCTGTGGGCGAAAGATAACTTCACGCCGAAAGACAAAATGCCGGTCACCGTGTCCGAAGGCT
TTAATCCGGAATTCCTGGCCGTCATGTCTCATGATAAAAAAGACAAAGTAAAAGTCAGTTTGTGGTTCACTACAAA
CGTTCCATGGATGAATTCAAATCGACTGGAACCGCCATGGCTTCTGGGGTACTGGAGCGGTGAAAACCACGTTGA
TAAAAAGAAGAAAAACTGTCTGCACTGTATGAAGTTGACTGGAAAACCCATAACGTCAAATTCGTTAAAGTCCTGA
ACGATAACGAGAAAAATAATGACTCGAG

[0337] HlgB-LukB融合序列

[0338] SEQ ID NO:58

[0339] AEGKITPVSVKKVDDKVTLYKTTATADSDQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDP
NGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLTGNITKESNYSETIS
YQQPSYRTLDDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRKSEIFSLTRGNLWAKDNFTPKDKMPVTVS
EGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEEKL SALYEVDWKTHNVK FVK
VLNDNEKK

[0340] 用于构建P15a起点LukB pET24a (+) 的p15a起点的序列

[0341] SEQ ID NO:59

[0342] GCGCTAGCGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCTAGTGAAGTGCTTCATGTG
GCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC
TCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGCCAG
GAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCA
CGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCT
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCC
ACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTTCAGTCCGACC
GCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAAGACATGCAAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACT
GGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACT
GCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCG
GTTTTTTCGTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAA
TATTTCTAGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGT

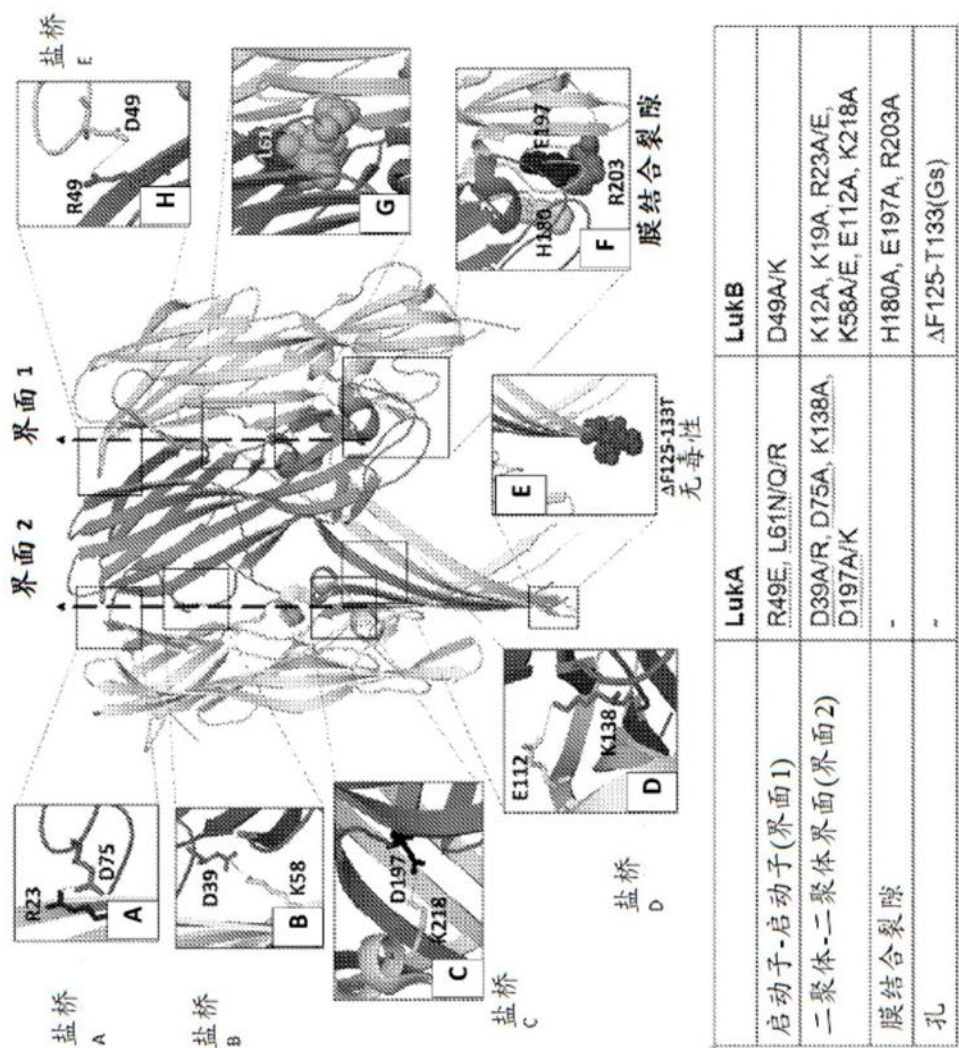


图1

SEQ ID NO_1_US8431687_luka_多数	10	20	30	40
	MKKKKRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			
SEQ ID NO_2_luka_Newman	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_3_luka_HSPREF0772_0044_TCH60	MKKKKRRVFIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_4_luka_HSPREF0774_2356_TCH130	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_5_luka_HSPREF0776_0173_USA300	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_6_luka_M01942_M02	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_7_luka_541813_H315	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_8_luka_5481076c_RF122	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_9_luka_54C012006	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_10_luka_SALG_02329_A9635	MKKKKRRVFIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_11_luka_SAP152061_5T398	MKKKKRRVFIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_12_luka_S482108_M054252	MKKKKRRVFIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_13_luka_SATG_01930_D139	MKKKKRRVFIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_14_luka_SAV2003_M050	MKKKKRRVLIASSLSCAIIILSAAITQANSAHKKDSQDQNRKK			40
SEQ ID NO_28_luka_无信号序列_M0				13

图2

SEQ ID NO. 1 US2431687_Luka_多数	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T X P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 2 Luka_Newman	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T A P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 3 Luka_H09REF0772_0044_TCH60	E H V D K A Q Q K E K R H V T H K D K H S T P G P D	D I G K N G K I T K	R T V S E	80
SEQ ID NO. 4 Luka_H09REF0774_2356_TCH130	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T V P P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 5 Luka_H09REF0776_0173_USA300	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T V A P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 6 Luka_M01943_P02	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T V P P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 7 Luka_SA1013_H015	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T V P P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 8 Luka_SA81076c_RF122	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T V P P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 9 Luka_SAC012006	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T A P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 10 Luka_SA16_02329_A9635	E H V D K A Q Q K E K R H V T H K D K H S T P G P D	D I G K N G K I T K	R T V S E	80
SEQ ID NO. 11 Luka_SAP162061_S7398	E H V D K A Q Q K E K R H V T H K D K H S T P G P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 12 Luka_SAR2108_MPSA252	E H V D K A Q Q K E K R H V T H K D K H S T P G P D	D I G K N G K I T K	R T V S E	80
SEQ ID NO. 13 Luka_SA16_01930_D139	E H V D K A Q Q K E K R H V T H K D K H S T V P P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 14 Luka_SAV2005_P050	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T V P P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	80
SEQ ID NO. 28 Luka_无信号序列 ₁	E H V D K S Q Q K E K R H V T H K D K H S T X P D	D I G K N G K I T K	R T E T V	53

图2续

SEQ ID NO. 1_US8431687_Luka_多数	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F	90	100	110	120
SEQ ID NO. 2_Luka_Newman	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 3_Luka_MPREF0771_0044_TCH60	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 4_Luka_MPREF0774_2356_TCH120	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 5_Luka_MPREF0776_0173_USA300_	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 6_Luka_MP0942_462	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 7_Luka_SA01013_N515	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 8_Luka_SA01876c_RF122	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 9_Luka_SACOL2006	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 10_Luka_SAL5_02329_A9635	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 11_Luka_SAPIG2061_S1398	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 12_Luka_SAR2108_MSA252	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 13_Luka_SATG_01930_D135	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 14_Luka_SAV2005_F050	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				
SEQ ID NO. 26_Luka_..无信号序列..No	Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D O P T Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F				

图2续

SEQ ID NO	1	US8431687	Luka	多 数
SEQ ID NO 1	US8431687	Luka	多 数	
SEQ ID NO 2	Luka	Newman		
SEQ ID NO 3	Luka	H00PREF0772_0044	YCH60	
SEQ ID NO 4	Luka	H00PREF0774_2356	YCH130	
SEQ ID NO 5	Luka	H00PREF0776_0173	USA300	
SEQ ID NO 6	Luka	H011942	H62	
SEQ ID NO 7	Luka	SA1813	H315	
SEQ ID NO 8	Luka	SA31876c	RF122	
SEQ ID NO 9	Luka	SA1012086		
SEQ ID NO 10	Luka	SA1G_02329	A9635	
SEQ ID NO 11	Luka	SAP1G2051	ST398	
SEQ ID NO 12	Luka	SAR2168	WRS252	
SEQ ID NO 13	Luka	SATG_01930	O139	
SEQ ID NO 14	Luka	SAV2005	Hu50	
SEQ ID NO 2B	Luka	无信号序列	Ma	

图2续

SEQ	ID	NO.	1	US8431687	Luka	多数	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	2	Luka	Newman		ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	3	Luka	H0PRFE0772	0044..TCN60	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	4	Luka	H0PRFE0774	2356..TCN130	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	5	Luka	H0PRFE0776	0173..USA300	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	6	Luka	H01942	H042	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	7	Luka	SA1813	N315	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	8	Luka	SAB1876c	RF122	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	9	Luka	SACOL2006		ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	10	Luka	SALG	02329	A9635	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000
SEQ	ID	NO.	11	Luka	SAPIC2061	51398	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	12	Luka	SAR2188	N05A252	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	13	Luka	SARQ	01930	N139	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000
SEQ	ID	NO.	14	Luka	SAV2005	N050	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	2000	
SEQ	ID	NO.	20	Luka	无信号序列	Ph	ISTAKVDSYTFSSGGKFDOSTKGI	GR	TS	SS	HS	YS	SK	TI	SY	HQ	173	

图2续

SEQ ID NO. 1_US6431687_Luka_多数	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 2_Luka_Newman	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 3_Luka_H9PREF0772_0044_TCH60	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 4_Luka_H9PREF0774_2356_TCH130	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 5_Luka_H9PREF0776_0173_USA380	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 6_Luka_M021942_M02	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 7_Luka_SA1813_N315	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 8_Luka_SA81376c_RE122	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 9_Luka_SACOL2006	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 10_Luka_SAL5_02329_AG635	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 11_Luka_S4PI62061_ST398	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 12_Luka_S4R2108_M0SA252	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 13_Luka_S4TG_01930_D139	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 14_Luka_S4V2005_M0508	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	240
SEQ ID NO. 28_Luka_无信号序列_No	Q N Y D T I A S G K H N W H V H W S V I A N D L K Y G G E V K H R H D E L L F	210	220	230	213

D197

图2续

SEQ ID NO_1_US8431687_luka_多数	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N	250	260	270	280
SEQ ID NO_2_luka_Newman	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_3_luka_H08REF0772_0044_TCH60	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_4_luka_H08REF0774_2356_TCH130	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_5_luka_H08REF0776_0173_USA300_	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_6_luka_H01942_M02	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_7_luka_S41813_H315	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_8_luka_S481976c_RF122	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_9_luka_SAC012006	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_10_luka_S4LG_01329_A0635	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_11_luka_S4PIG2061_S7298	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_12_luka_S4R21008_M05A352	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_13_luka_S4TG_01930_0139	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_14_luka_S4V2005_M050	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				
SEQ ID NO_28_luka_无信号序列_No	Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N				

图2续

SEQ ID NO. 1_US8431687_Luka_多数	290	300	310	320
	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			
SEQ ID NO. 2_Luka_Newman	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 3_Luka_HPRRF0772_004A_TC460	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 4_Luka_HPRRF0774_2356_TC4130	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 5_Luka_HPRRF0776_0173_USA300	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 6_Luka_M01942_M02	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 7_Luka_SA1813_N315	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 8_Luka_SA61876c_RF122	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 9_Luka_SAC012006	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 10_Luka_SAL6_02329_A9675	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 11_Luka_SAP1G2067_57398	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 12_Luka_SAR2108_M0SA252	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 13_Luka_SAT6_01930_D139	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 14_Luka_SAV2005_M050	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			320
SEQ ID NO. 20_Luka_无信号序列_M0	E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L K N R P G I H V A P P I L E K N K D G Q			293

图2续

SEQ ID NO. 1_US8431687_Luka_多数	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G	330	340	350
SEQ ID NO. 2_Luka_Newman	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			
SEQ ID NO. 3_Luka_HPPREF0772_0044_YCH50	R F I V V Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 4_Luka_HPPREF0774_2356_YCH130	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 5_Luka_HPPREF0776_0173_USA360	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			350
SEQ ID NO. 6_Luka_MM1942_M62	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			350
SEQ ID NO. 7_Luka_SA1813_H315	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 8_Luka_SA81676c_R122	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 9_Luka_SACOL2086	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 10_Luka_SA16_02329_A9635	R F I V V Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 11_Luka_SAPIG2061_ST998	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 12_Luka_SAR2100_M8SA252	R F I V V Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 13_Luka_SAT6_01930_O139	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 14_Luka_SAV2005_M650	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			351
SEQ ID NO. 28_Luka_无信号序列_M6	R L I V T Y E V D W K K K T V K V V D K Y S D D H K P Y K E G			324

图2续

SEQ ID NO_15_J58431687_LukB_多数	10	20	30	40
	M I K Q L C K H I T T I C S L A L S T A L T V F P A T S Y A K I H S E I K Q V S E			
SEQ ID NO_16_LukB_A9535	M I K Q V C K H I T T I C S L A L S T A L T V F P A S S Y A E I K S K I T T V S E			40
SEQ ID NO_17_LukB_COL	- - - - -	- - - - -	- - - - -	0
SEQ ID NO_18_LukB_D139	M I K Q V C K H I T T I C S L A L S T A L T I F P A S S Y A K I H S E I K Q V S E			40
SEQ ID NO_19_LukB_E1410	M I K Q V C K H I T T I C S L A L S T A L T V F P A S S Y A E I K S K I T T V S E			40
SEQ ID NO_20_LukB_JKD6008	M I K Q L C K H I T T I C S L A L S T A L T I F P A T S F A K I H S E I K Q V S E			40
SEQ ID NO_21_LukB_WRS4252	M I K Q V C K H I T T I C S L A L S T A L T V F P A S S Y A E I K S K I T T V S E			40
SEQ ID NO_22_LukB_M450	M I K Q L Y K H I T T I C S L A L S T A L T I F P A T S Y A K I H S E I K A V S E			40
SEQ ID NO_23_LukB_M42	M I K Q L Y K H I T T I C T L A L S T T F T V L P A T S Y A K I H S E I K A V S E			40
SEQ ID NO_24_LukB_RF122	M I K Q L Y K H I T T I C S L T T S T A L T V F P A T S Y A K I H S E I K A V S E			40
SEQ ID NO_25_LukB_TCH130	M I K Q L C K H I T T I C T L A L S T T F T V L P A T S F A K I H S E I K Q V S E			40
SEQ ID NO_26_LukB_J5A300_FPR3757	M I K Q L C K H I T T I C T L A L S T T F T V L P A T S F A K I H S E I K Q V S E			40
SEQ ID NO_27_LukB_Newman	M I K Q L C K H I T T I C T L A L S T T F T V L P A T S F A K I H S E I K Q V S E			40
SEQ ID NO_29_LukB_无信号序列_2%	- - - - -	- - - - -	- - - - -	11

图3

SEQ ID NO. 15_ US8471687_ Luk8_ 多数	K12	K19	R23	D49	
SEQ ID NO. 16_ Luk8_ A9635	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 17_ Luk8_ COL	- - - - -	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 18_ Luk8_ D139	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 19_ Luk8_ F1410	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 20_ Luk8_ JKD6008	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 21_ Luk8_ M854252	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 22_ Luk8_ M650	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 23_ Luk8_ M62	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 24_ Luk8_ RF122	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 25_ Luk8_ TCH130	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 26_ Luk8_ USA300_ fPR3757	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 27_ Luk8_ Newman	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	80
SEQ ID NO. 29_ Luk8_ 无信号序列_Maj	K N L D G D T	K M Y T R	T A T T S D S Q K N I T Y Q S L Q F N F L T E P H Y	D K E	51

图3续

SEQ ID NO_15_158431687_luk8_多数	90	100	110	120
SEQ ID NO_16_luk8_A9635	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_17_luk8_C01	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			72
SEQ ID NO_18_luk8_D139	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_19_luk8_E3418	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_20_luk8_K06080	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_21_luk8_M85A252	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_22_luk8_M058	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_23_luk8_M82	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_24_luk8_R122	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_25_luk8_T0130	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_26_luk8_USA300_FPR3757	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_27_luk8_Nemen	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			120
SEQ ID NO_28_luk8_无信号序列_M03	T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q H V			91

K58

图3续

SEQ ID NO_15_US0431607_Luk8_多数	130	140	150	160
SEQ ID NO_16_Luk8_A9635	O D N N N · T H V T O F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		160
SEQ ID NO_17_Luk8_C01	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		161
SEQ ID NO_18_Luk8_D139	O D N N N · T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_19_Luk8_E1410	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		160
SEQ ID NO_20_Luk8_JN06008	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_21_Luk8_P854252	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		160
SEQ ID NO_22_Luk8_P050	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_23_Luk8_P02	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_24_Luk8_R5122	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_25_Luk8_TCH130	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_26_Luk8_USA300_FPR3757	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_27_Luk8_Hewman	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		159
SEQ ID NO_29_Luk8_无信号序列 ₁₀₀	O D N N N S T N V T D F A P K N Q D E S R E	V K Y T Y G Y K T G G D F S I H R G		130

孔形成

E112

图3续

SEQ ID NO. 15	US8431687_Luk8_多数	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V	170	180	190	200	200
SEQ ID NO. 16	Luk8_49635	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V A W K V					200
SEQ ID NO. 17	Luk8_COI	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					151
SEQ ID NO. 18	Luk8_P139	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V A W K V					199
SEQ ID NO. 19	Luk8_E1410	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V A W K V					200
SEQ ID NO. 20	Luk8_DK06008	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 21	Luk8_PMSA252	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V A W K V					200
SEQ ID NO. 22	Luk8_P450	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 23	Luk8_P462	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 24	Luk8_RF122	G L P G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 25	Luk8_TCH130	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 26	Luk8_USA300_FPR3757	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 27	Luk8_Bewman	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					199
SEQ ID NO. 29	Luk8_无信号序列 _{Phaj}	G L T G H I T K E S H Y S E T I S Y Q Q P S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V					170

孔形成
(续)

图3续

SEQ ID NO. 15_ US0431607_ Luk8_ 多数	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R T K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 16_ Luk8_ A9635	E A H S I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 17_ Luk8_ COL	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 18_ Luk8_ D139	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 19_ Luk8_ E1410	E A H S I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 20_ Luk8_ 3KD6008	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 21_ Luk8_ MRS4252	E A H S I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 22_ Luk8_ Mj50	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 23_ Luk8_ Mj2	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 24_ Luk8_ RF122	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 25_ Luk8_ TCH100	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 26_ Luk8_ USA300_ FPR3757	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 27_ Luk8_ Newman	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240
SEQ ID NO. 29_ Luk8_ 无信号序列_Maj	E A H L I N M G H	D H T R Q	L T N D S	O H R V K S	E T F S L T R	N G H L W A K	240

图3续

SEQ ID NO_15_US0431687_luk8_多数	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_16_luk8_A9635	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_17_luk8_C01	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_18_luk8_D139	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_19_luk8_E1410	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_20_luk8_KD6008	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_21_luk8_M85A252	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_22_luk8_Mu940	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_23_luk8_Mu2	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_24_luk8_RF122	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_25_luk8_TCH130	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_26_luk8_USA300_FPR3757	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_27_luk8_Newman	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280
SEQ ID NO_29_luk8_无信号序列_80j	D N F T P K N K M P V T V S E G F N P E F L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H	250	260	270	280

K218

图3续

SEQ ID NO_15_“US8431687_”luk8_“多教	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_16_luk8_49635	Y K R S M D D F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_17_luk8_“COL	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_18_luk8_“0139	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_19_luk8_“E1410	Y K R S M D D F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_20_luk8_“J006008	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_21_luk8_“NR5A252	Y K R S M D D F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_22_luk8_“No548	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_23_luk8_“NW2	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_24_luk8_“RF122	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_25_luk8_“TCH138	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_26_luk8_“USA3080_FPR3757	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_27_luk8_“Newman	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320
SEQ ID NO_29_luk8_“无信号序列_”No3	Y K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V	290	300	310	320

图3续

SEQ ID NO_15_HIS431587_LukB_多数	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	339
	A A V V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	
		
SEQ ID NO_16_LukB_A9635	D N K T H D V K L I K T F H D K E K K	339
SEQ ID NO_17_LukB_CQ1	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	290
SEQ ID NO_18_LukB_D139	D N K T H H V K F I K V L H D K E K K	338
SEQ ID NO_19_LukB_E1410	D N K T H D V K L I K T I H D K E Q K	339
SEQ ID NO_20_LukB_JRP6008	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_21_LukB_PPSA252	D N K T H D V K L I K T I H D K E Q K	339
SEQ ID NO_22_LukB_Pu508	D N K T H D V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_23_LukB_Pu2	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_24_LukB_RF122	D N K T H D V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_25_LukB_TCH130	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_26_LukB_USA300_FPR3757	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_27_LukB_Mewman	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	338
SEQ ID NO_29_LukB_无信号序列_Moj	D N K T H H V K F V K V L H D H E K K	309

图3续

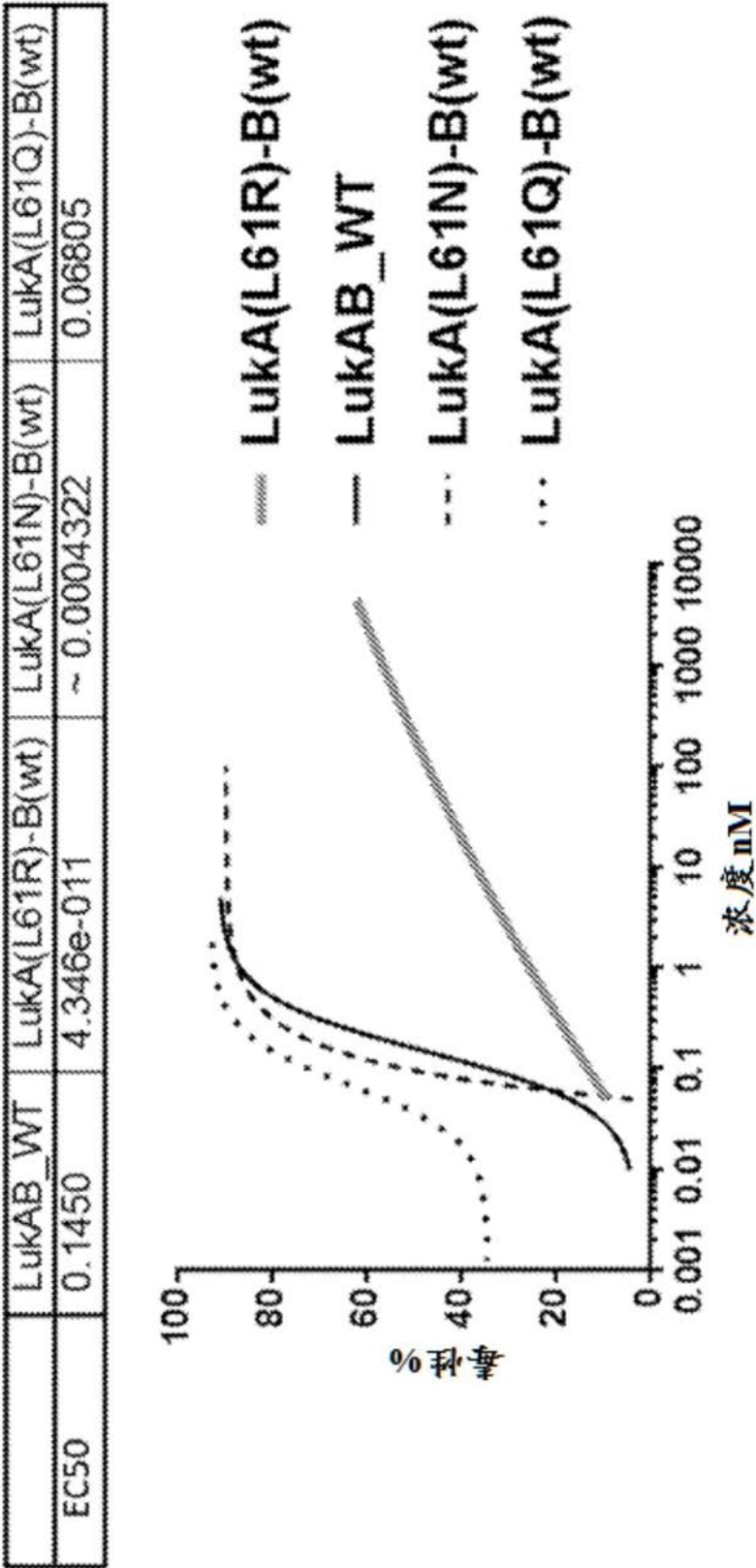


图4

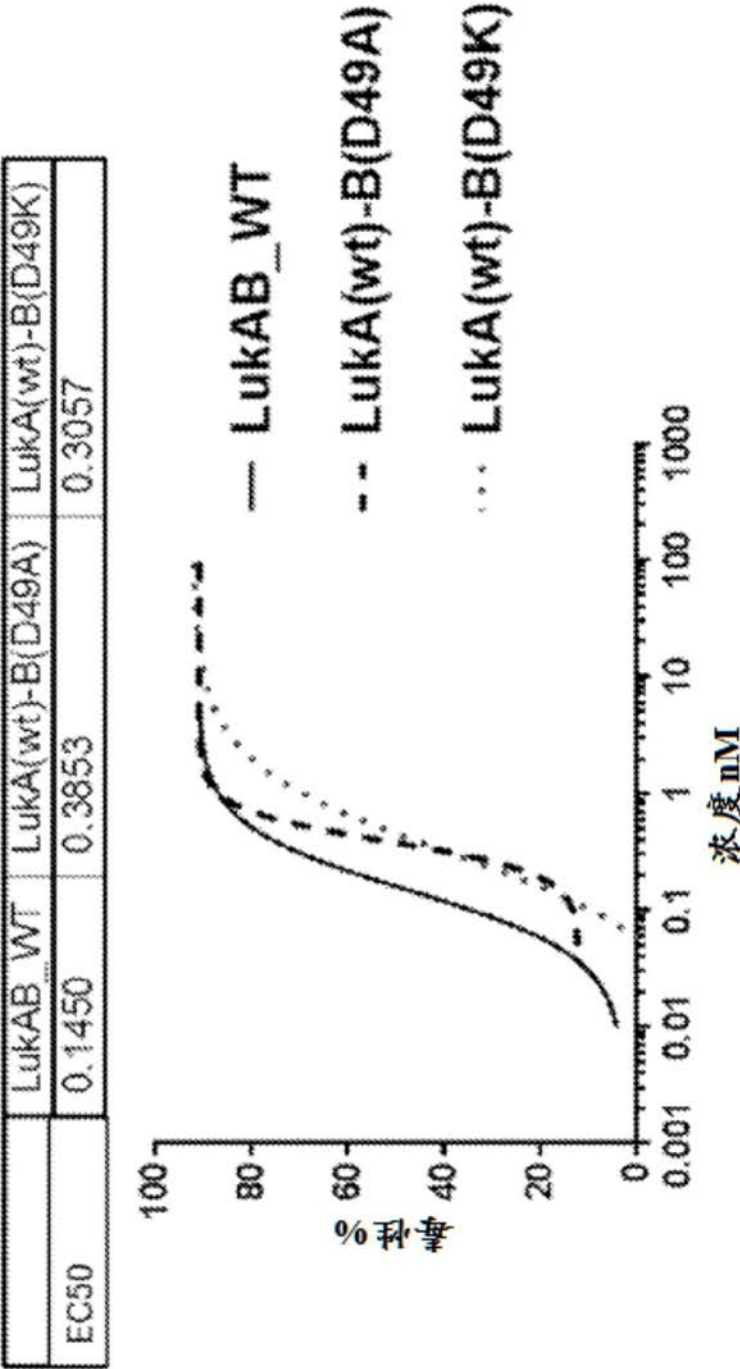


图5

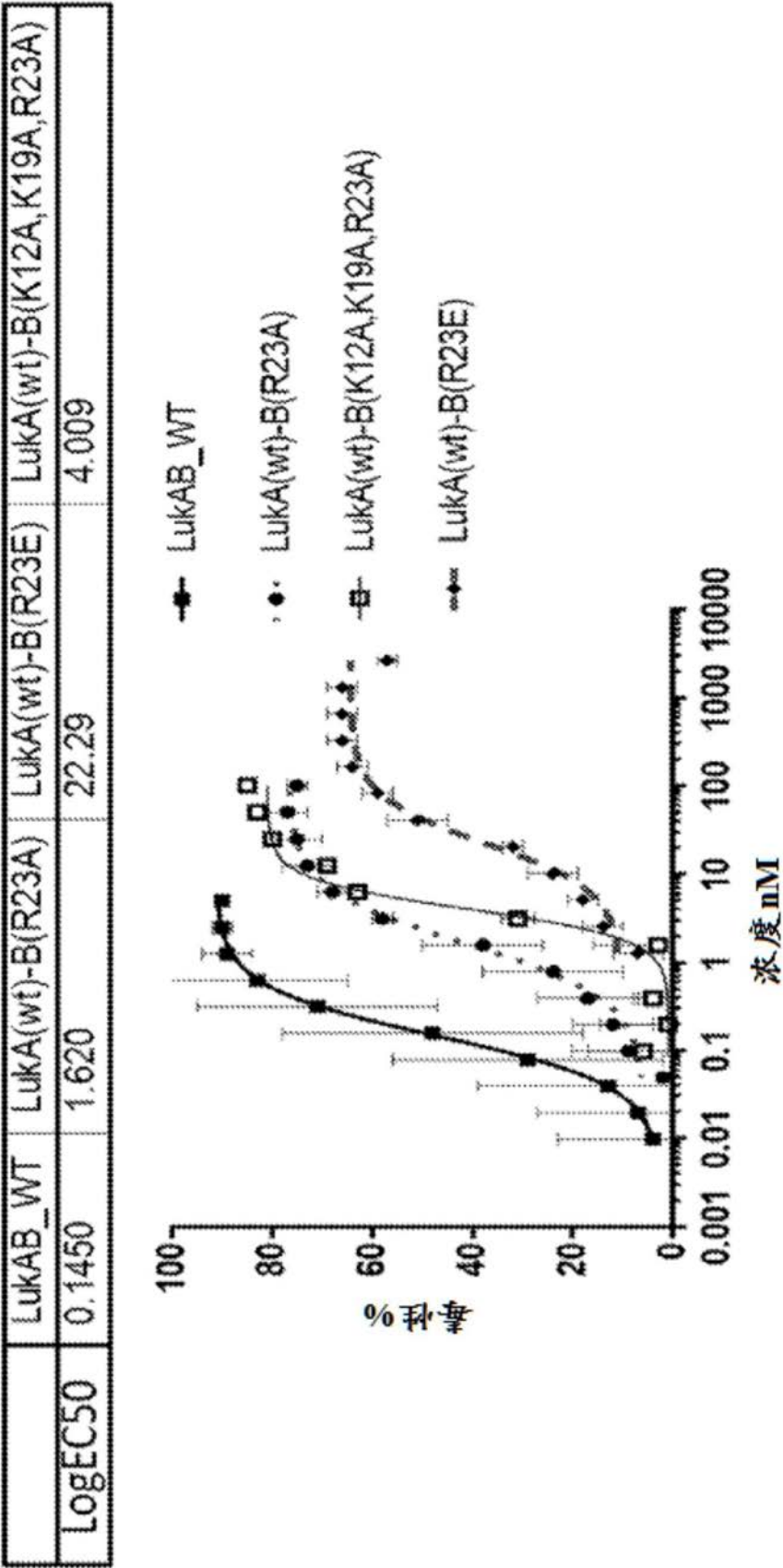
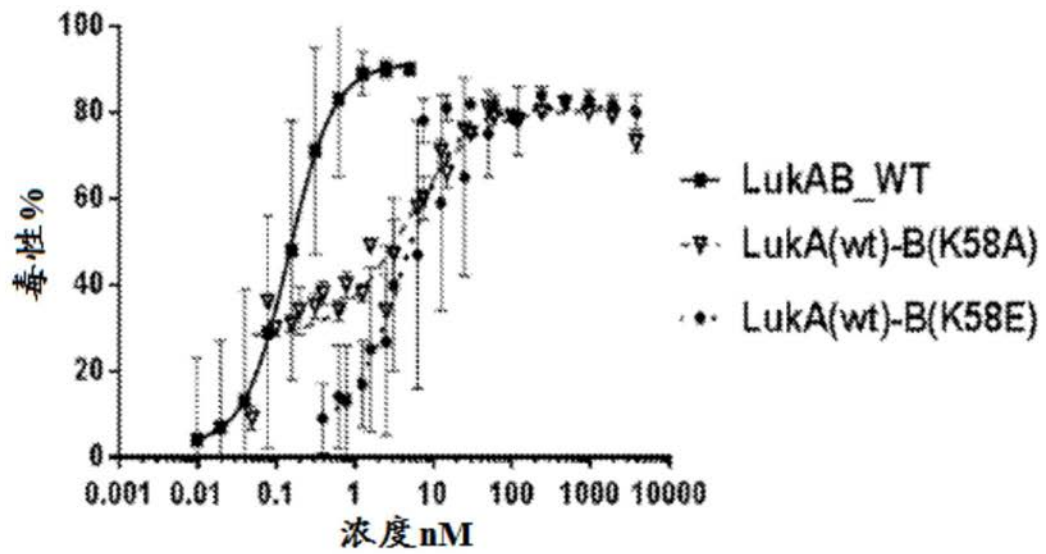


图6

A

	LukAB_WT	LukA(wt)-B(K58A)	LukA(wt)-B(K58E)
EC50	0.1450	4.484	4.020

**B**

	LukAB_WT	LukA(D39A)-B(wt)	LukA(D39R)-B(wt)
EC50	0.1450	0.2133	0.1276

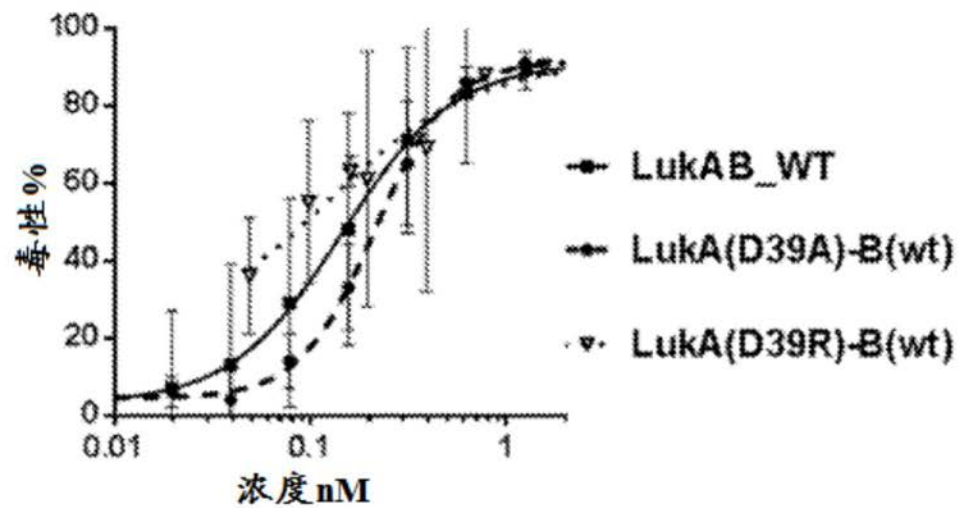


图7A、B

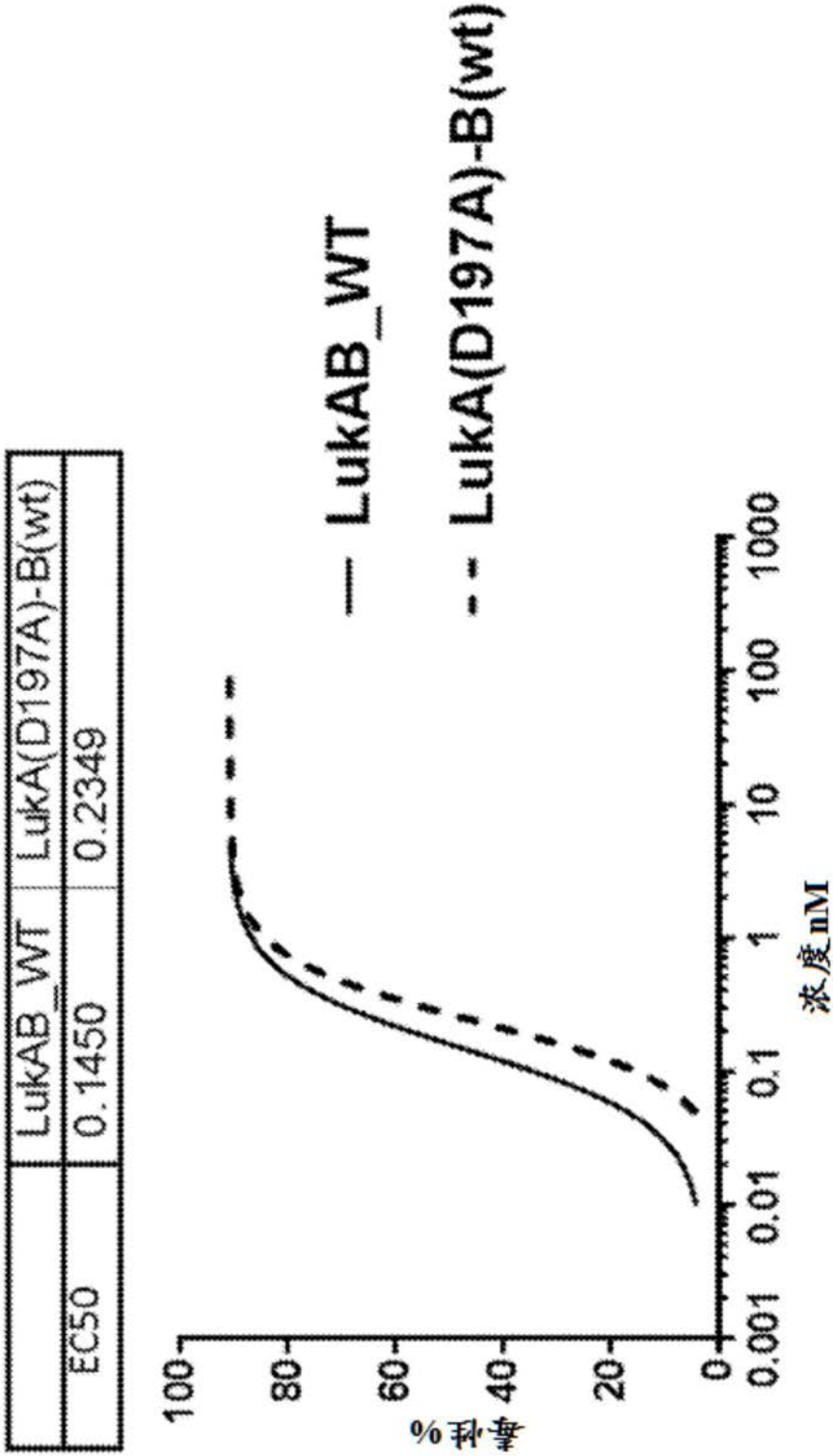


图8

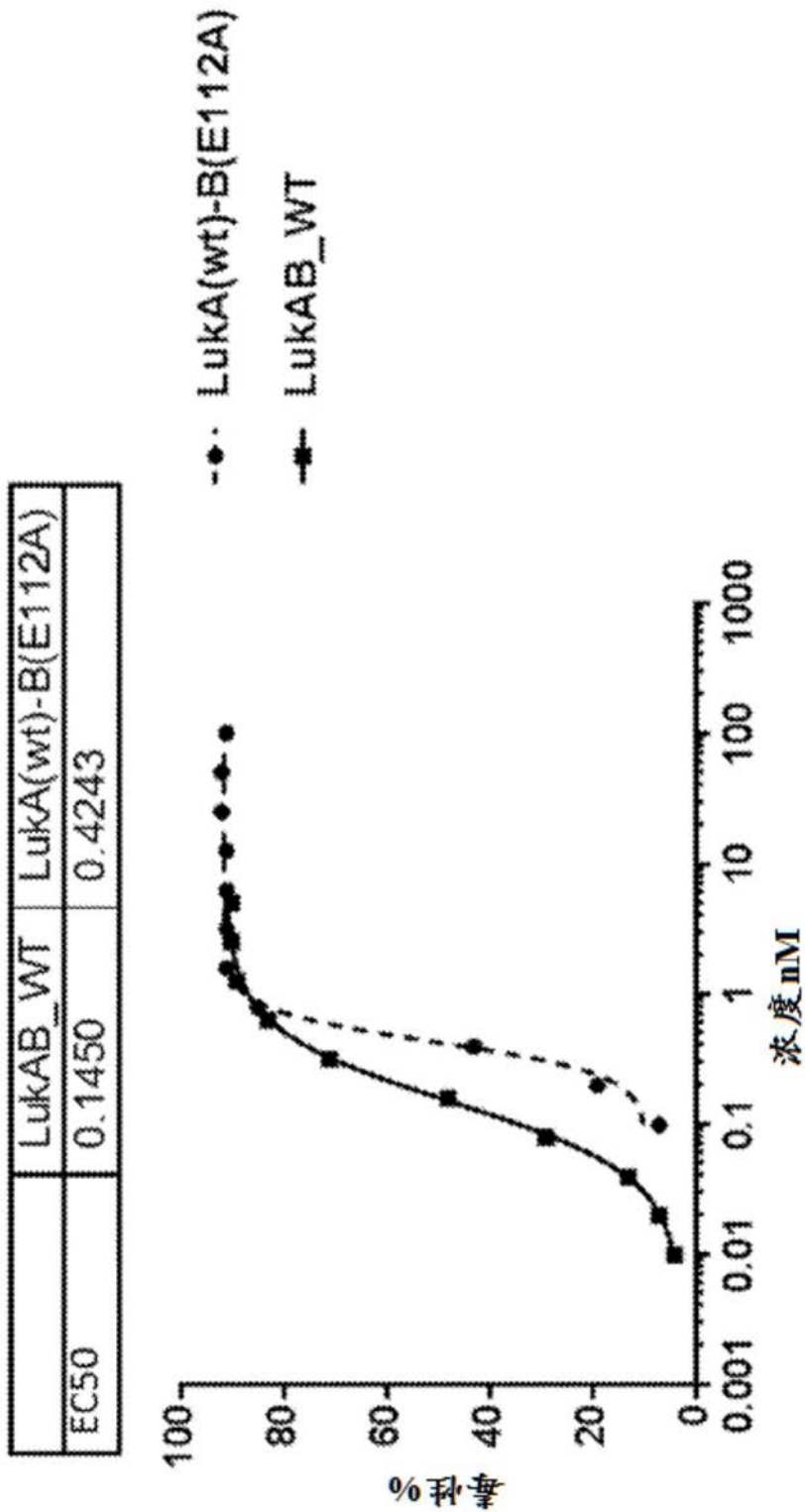


图9

	LukAB_WT	LukA(wt)-B(E197A)	LukA(wt)-B(H180A)	LukA(wt)-B(R203A)
EC50	0.1450	0.6192	0.2444	0.7545

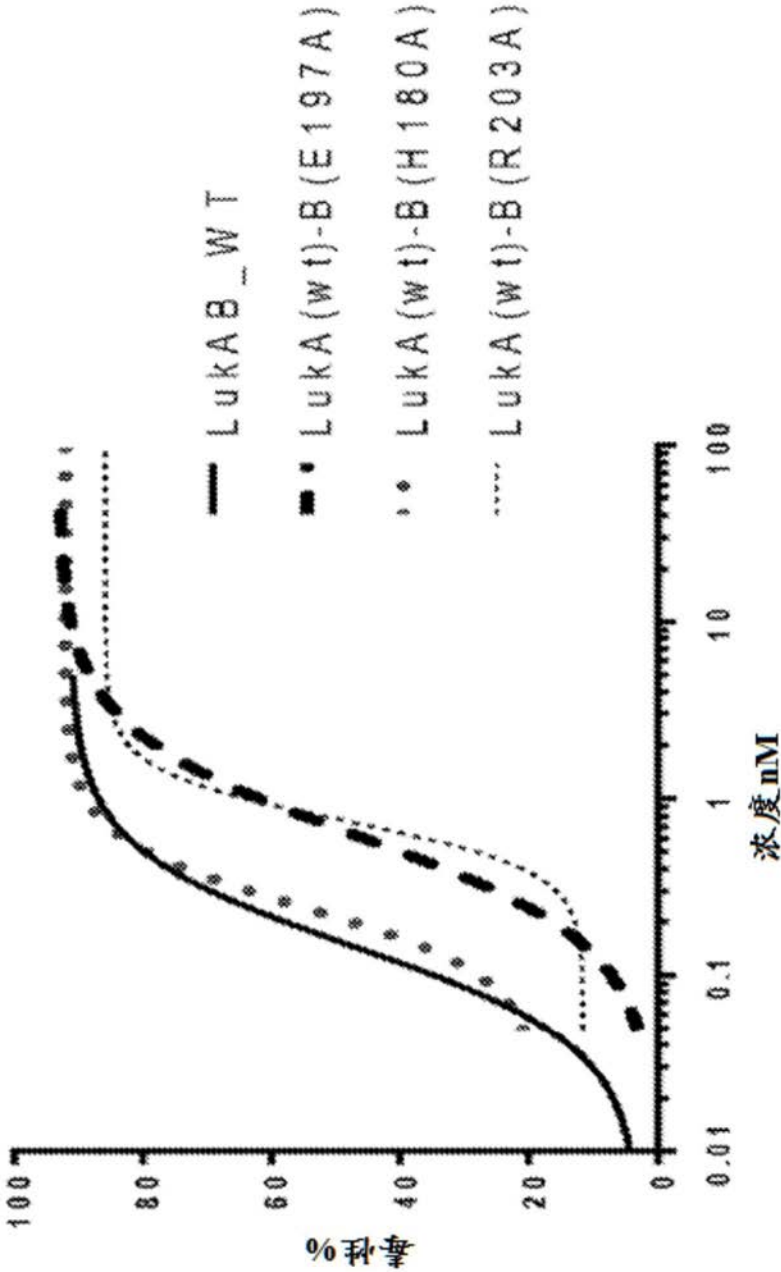


图10

