



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112771074 A

(43) 申请公布日 2021.05.07

(21) 申请号 201980064002.8

(22) 申请日 2019.10.04

(30) 优先权数据

62/742,158 2018.10.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/054868 2019.10.04

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/073004 EN 2020.04.09

(71) 申请人 国家儿童医院研究所

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 史蒂文·大卫·古德曼

劳伦·奥普雷马克·巴卡莱茨

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理  
事务所(普通合伙) 44348

代理人 倪申文 何锦标

(51) Int.Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G12N 15/115 (2006.01)

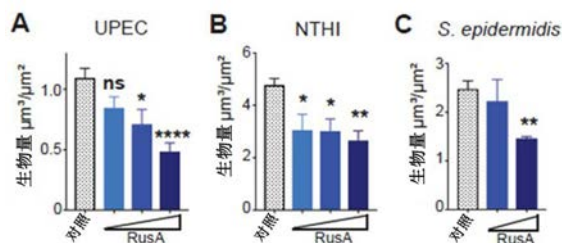
权利要求书3页 说明书46页 附图5页

(54) 发明名称

用于酶促破坏细菌生物膜的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了抑制或破坏生物膜的方法,所述方法包括使生物膜与切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂接触。



1. 一种抑制或破坏生物膜的方法,所述方法包括使生物膜与切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂接触。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述接触是体外或体内的。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述试剂是HJ特异性核酸内切酶。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述HJ特异性核酸内切酶是RuvABC多肽和/或RusA多肽。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述RusA多肽包含以下序列:

MVNTYSITLPWPPSNNRYRHNRRGRTHVSAEGQAYRDNVARI IKNAMLDIGLAMPVKIRIECHMPDRRRRDL  
DNLQKAAFDALTKAGFWLDDAQVVDYRVVVKMPVTKGGRLELTITEMGNEA,及其等效物。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述RuvABC多肽包含以下多肽序列:

MIGRLRGI I IIEKQPPLVLIIEVGGVGYEVHMPMTCFYELPEAGQEAI VFTHFVVREDAQLLYGFNNKQERTLF  
KELIKTNGVGPKLALAILSGMSAQQFVNAVEREEVGALVKLPGIGKKAERLIVEMKDRFKGLHGDLFTPAADLV  
TSPASPATDDAEQEAVAALVALGYKQEQASRMVSKIARPDASSETLIREALRAAL;MIEADRLISAGTTLPEADVAD  
RAIRPKLLEEYVGGPQVRSQMEIFIKAALKRGDALDHLIFGPPGLGKTTLANIVANEMGVNLRRTTSGPVLEKAGD  
LAAMLTNLEPHDVLFI DEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGEGPAARSIKIDLPPFTLIGATTRAGSLTSPLR  
DRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTPRIANRLLRRVRDFAEVKHDGTISADIAA  
QALDMLNVDAEGFDYMDRKL LLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERETIEDVLEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRA  
WNHFGITPEMPA;以及

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGGSGCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAIEQVF  
MAKNADSALKLGGARGVAI VAAVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQHMVRTLLKLPANPQADAADALAI  
AITHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA,及其等效物,其中等效物包含此处所示(粗体字)的突变氨基酸。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述生物膜是由以下引起的感染中的一种或多种引起的:UPEC、NTHI、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)或类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、或ESKAPE病原体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,进一步包括使所述生物膜与抗微生物剂或DNA酶接触。

9. 一种在有需要的对象中抑制或破坏生物膜或治疗与生物膜感染有关的疾病或病症的方法,该方法包括向该对象施用有效量的切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述施用是局部或全身的。

11. 根据权利要求9或10所述的方法,其中所述试剂是HJ特异性核酸内切酶。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述HJ特异性核酸内切酶是RuvABC多肽和/或

RusA多肽。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述RusA多肽包含以下序列:

MVNTYSITLPWPPSNRYRHNRRGRTHVSAEGQAYRDNVARI IKNAMLDIGLAMPVKIRIECHMPDRRRRDL  
DNLQKAAFDALTKAGFWLDDAQVVDYRVVVKMPVTKGGRLELTITEMGNEA,及其等效物。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述RuvABC 多肽包含以下多肽序列:

MIGRLRGIIIEKQPPLVLIIEVGGVGYEVHMPMTCFYELPEAGQEAI VFTHFVVREDAQLLYGFNNKQERTLF  
KELIKTNGVGPKLALAILSGMSAQQFVNAVEREEVGALVKLPGIGKKAERLIVEMKDRFKGLHGDLFTPAADLVL  
TSPASPATDDAEQEAVALVALGYKQEQASRMVSKIARPDASSETLIREALRAAL;

MIEADRLISAGTTLPEADVADRAIRPKLLEEYVGGPQVRSQMEIFIKAAKLRGDALDHLIFGPPGLGKTTLA  
NIVANEMGVNLRRTTSGPVLEKAGDLAAML TNLEPHDVLFI DEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGEGPAARSI  
KIDLPFFTIGATTRAGSLTSPLRDRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTPRIAN  
RLLRRVRDFAEVKHDGTISADIAAQALDMLNVDAEGFDYMDRKL LLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERETIEDV  
LEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRAHNHFGITPPEMPA;以及

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGGCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAIEQVF  
MAKNADSALKLGQARGVAIVAAVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQHVMVRTLLKLPANQADAADALAI  
AITHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA,及其等效物,其中等效物包含此处所示(粗体字)的突变  
氨基酸。

15. 根据权利要求 9-14中任一项所述的方法,进一步包括向所述对象施用有效量的抗  
微生物剂。

16. 根据权利要求9-15中任一项所述的方法,其中所述对象是哺乳动物。

17. 根据权利要求9-15中任一项所述的方法,其中所述对象是人类患者或儿科人类患  
者。

18. 根据权利要求 9-17中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症是选自以下的感  
染:ESKAPE病原体、UPEC、NTHI、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳链球菌  
(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺  
旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌  
(*Burkholderia cepacia*)或类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、流感  
嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、  
肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、铜  
绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、  
上、中和下气道(耳炎、鼻窦炎、支气管炎、以及慢性阻塞性肺病(COPD)的加重)、慢性咳嗽、  
囊性纤维化(CF)或社区获得性肺炎(CAP)的并发症和/或主要病因。

19. 根据权利要求9-18中任一项所述的方法,其进一步包括使所述生物膜与抗微生物  
剂或DNA酶接触。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述疾病是囊性纤维化,并且所述施用是通过吸  
入进行的。

21. 根据权利要求20所述的方法,其进一步包括使所述生物膜与抗微生物剂或DNA酶接  
触。

22. 一种试剂盒,其包含切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂和用于权利要

求9-21中任一项所述的方法的说明书。

## 用于酶促破坏细菌生物膜的组合物和方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

本申请根据35 U.S.C. § 119 (e) 要求于2018年10月5日提交的美国临时申请序列号62/742,158的优先权,其全部内容通过引用合并于此。

### [0002] 政府支持声明

本发明是在美国国立卫生研究院 (NIH) 授予的批准号 R01DC011818的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

### 背景技术

[0003] 细菌采用生物膜状态,其代表彼此粘附以及粘附于非生物或生物表面的多细胞微生物群落。生物膜中的细菌被细胞外聚合物包围,其主要由胞外多糖、细胞外DNA (eDNA) 和蛋白质组成。eDNA无处不在,并且是维持细菌生物膜结构完整性的关键组成部分。

[0004] 细菌在人体内的生物膜中的持久性引起所有慢性/复发性疾病的约三分之二。这些生物膜由受外部“粘液 (slime)”保护的细菌组成,外部“粘液”通常主要由阻止先天性和适应性免疫系统、抗生素和其他抗菌剂接触生物膜内部的细菌的DNA组成,使其极其难以清除来自身体的感染。此外,生物膜可以充当未来急性感染的储存库,通常会带来致命的后果。生物膜也存在于工业环境中。例如,从生产现场到加油站储罐,生物膜都涉及广泛的石油加工问题。在该领域中,减少硫酸盐的生物膜细菌会产生硫化氢(酸油)。在工艺流程中,生物膜的活动会形成粘液,这些粘液会阻碍过滤器和孔口。生物膜和生物膜生物还会引起管道和石油加工设备的腐蚀。这些问题可以在整个石油或天然气生产设施中表现出来,甚至可以在最终产品储罐的表面上发现积垢和腐蚀性生物膜生物。

[0005] 在家庭中,在支持微生物生长的任何表面中或表面上存在生物膜,例如在下水道中、在食物制备表面上、在厕所中以及在游泳池和温泉中。

[0006] 生物膜与家庭和工业的各种水处理有关。它们会在加工设备的表面上生长并阻碍设备的性能,例如传热的降低或过滤器和膜的堵塞。在冷却塔填料上生长的生物膜会增加足以导致填料塌陷的重量。生物膜甚至会腐蚀高度专业化的不锈钢。水处理过程中的生物膜会降低最终产品的价值,例如造纸过程中的生物膜污染或甚至单个电池在硅芯片上的附着。在饮用水分配系统中生长的生物膜可能会隐藏潜在的病原生物、腐蚀性生物或细菌,从而降低水的美观质量。

### [0007] 概述

细菌采用生物膜状态,其代表彼此粘附以及粘附于非生物或生物表面的多细胞微生物群落。生物膜中的细菌被细胞外聚合物包围,主要由胞外多糖、细胞外DNA (eDNA) 和蛋白质组成。eDNA无处不在,并且是维持细菌生物膜结构完整性的关键组成部分。申请人先前已经表明,由多种细菌物种形成的生物膜中的eDNA被组织成由DNABII蛋白稳定的晶格状结构。DNABII蛋白是一类DNA结合蛋白,对预弯曲 (pre-bent) 的DNA具有很高的亲和力。

[0008] 因此,在一个方面,本文提供了一种抑制或破坏生物膜的方法,该方法包括以下步骤,或基本上由其组成,或由其组成:使生物膜与切割生物膜中的霍利迪连接体 (Holliday

junction,HJ)结构的试剂接触。此类试剂的非限制性实例包括RusA多肽或RuvABC肽复合物。一方面,所述接触是在试管中体外或离体的。在另一方面,所述接触是体内的,并且该接触是通过将试剂施用至需要其的对象来实现的。可以通过这些方法治疗的与生物膜感染有关的生物膜或疾病可以是由细菌感染引起的,例如由以下引起的感染:ESKAPE病原体、UPEC、NTHI、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)或类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*),

在一方面,用于所述方法的试剂包括HJ特异性核酸内切酶,例如RuvABC或RusA,或基本上由其组成,或由其组成。

[0009] 还提供了一种在有需要的对象中抑制或破坏生物膜或治疗与生物膜感染有关(incident to)的疾病或病症的方法,该方法包括以下步骤,或基本上由其组成,或由其组成:向该对象施用有效量的切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂。该药剂可以局部或全身施用。一方面,用于该方法的试剂包括HJ特异性核酸内切酶,例如RuvABC或RusA,或基本上由其组成,或由其组成。

[0010] 在一方面,该方法用于治疗哺乳动物、人类患者或儿科哺乳动物或人类患者。

[0011] 可以通过这些方法治疗的生物膜或与生物膜感染有关的疾病可以由细菌感染引起,例如由以下引起的感染:UPEC、NTHI、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)或类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、上、中和下气道(耳炎、鼻窦炎、支气管炎、以及慢性阻塞性肺病(COPD)的加重)、慢性咳嗽、囊性纤维化(CF)或社区获得性肺炎(CAP)的并发症和/或主要病因。

[0012] 本文还提供了一种RusA蛋白序列,其包含以下序列,或基本上由其组成,或由其组成:

MVNTYSITLPWPPSNRYRHNRRTHVSAEGQAYRDNVARI IKNAMLDIGLAMPVKIRIECHMPDRR  
RRDLNLQKAALFDALTKAGFWLDDAQVVDYRVVVKMPVTKGGRLELTITEMGNEA,及其等效物,其中等效物包含此处所示(粗体字)的突变氨基酸。

[0013] 本文还提供了一种RuvB蛋白序列,其包含以下序列,或基本上由其组成,或由其组成:

MIEADRLISAGTTLPEDVADRAIRPKLLEEYVGPQVRSQMEIFIKAAKLRGDALDHLLIFGPPGLGK  
TTLANIVANEMGVNLRRTSGPVLEKAGDLAAMLTNLEPHDVLFIIDEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGGPA  
ARSIKIDLPPFTLIGATTRAGSLTSPLRDRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTP

RIANRLLRRVRDFAEVKHDGTISADIAAQALDMLNVDAEGFDYMDRKLKLLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERET IEDVLEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRAWNHFGITPEMPA,及其等效物,其中等效物包含此处所示(粗体字)的突变氨基酸。

[0014] 本文还提供了一种RuvC蛋白序列,其包含以下序列,或基本上由其组成,或由其组成:

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGS GCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAI EQVFMKNADSALKLGGQARGVAIVA AVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQH MVRTLLKLPANPQADAAD ALAIAITHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA,及其等效物,其中等效物包含此处所示(粗体字)的突变氨基酸。

[0015] 本文还提供了一种RuvA、B 和C蛋白复合物,其包含以下序列组合,或基本上由其组成,或由其组成:

RuvA:

MIGRLRGI I IEKQPPLV LIEVGGVGYEVHMPMTCFYELPEAGQEAI VFTHFVVREDAQLLYGFNNKQE RTLFKELIKTNGVGPKLALAILSGMSAQQFVNAVEREEVGALVKLPGIGKKAERLIVEMKDRFKGLHGD LFTPAADLVLTSPASPATDDAEQEAVAALVALGYK PQEASRMVSKIARPDASSETLIREALRAAL,以及

RuvB:

MIEADRLISAGTTLPEDVADRAIRPKLLEEYVGPQVRSQMEIFIKAAKLRGDALDHLLIFGPPGLGK TTLANIVANEMGVNLRRTSGPVLEKAGDLAAML TNLEPHDVLFI DEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGEGPA ARSIKIDLP PFTLIGATTRAGSLT SPLRDRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTP RIANRLLRRVRDFAEVKHDGTISADIAAQALDMLNVDAEGFDYMDRKLKLLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERET IEDVLEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRAWNHFGITPEMPA,以及

RuvC:

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGS GCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAI EQVFMKNADSALKLGGQARGVAIVA AVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQH MVRTLLKLPANPQADAAD ALAIAITHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA,及其等效物,其中等效物包含此处所示(粗体字)的突变氨基酸。

[0016] 本文还提供了一种重组多肽,其包含一个或多个如本文所述的分离的多肽、或基本上由其组成、或由其组成,还包含位于一个或两个末端的至少一个另外的氨基酸。

[0017] 本发明还提供了结合本文所述的突变多肽或针对其产生的抗体。该抗体可用作诊断剂和预后剂。进一步提供了本文所述的一种或多种分离的多肽和/或抗体以及载体,例如药学上可接受的载体。

[0018] 本发明还提供了编码如本文所述的分离的多肽或抗体及其互补序列的多核苷酸。一方面,多核苷酸被可检测地标记。多核苷酸可以任选地与启动子和/或增强子可操作地连接以表达多核苷酸。还提供了一种重组产生多肽的方法,其通过在合适的表达系统(例如宿主细胞)中表达多核苷酸,然后产生并分离重组产生的多肽。

[0019] 进一步提供了一种载体,其包含本文所述的多核苷酸,或基本上由其组成,或由其组成。

[0020] 在另一方面,本文提供一种分离的宿主细胞,其包含本文所述的多肽、多核苷酸、或载体中的一种或多种。还提供了包含载体和本文所述的多肽、多核苷酸或载体中的一种

或多种的组合物。一方面,载体是药学上可接受的载体。

[0021] 还提供了一种试剂盒,其包含切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂和用于本文所述方法的说明。

### 附图说明

[0022] 图1A-1C:通过霍利迪连接体(HJ)特异性DNA结合蛋白RuvA稳定细菌生物膜结构。将预先形成的(图1A)UPEC和(图1B)NTHI生物膜与所示的蛋白质和/或抗体孵育24小时。(图1C)将预先形成的表皮葡萄球菌生物膜与所示的蛋白质和/或抗体孵育16小时。生物膜用LIVE/DEAD®染色剂染色,并通过CLSM可视化。通过COMSTAT分析图像以计算平均厚度和生物量。绘制了与对照相比生物质的变化百分比,平均厚度(未显示)显示出相同的趋势。条形代表平均值的标准误差(SEM)。与对照组相比的统计学显著性通过未配对t检验评估,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p > 0.001$ 。注意到,RuvA可以防止 $\alpha$ -IHF介导的UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌的生物膜结构的破坏。

[0023] 图2A-2F:RuvA弥补了生物膜结构稳定中DNABII蛋白的缺乏。将UPEC生物膜预先形成16小时,然后与所示的蛋白质和/或抗体孵育24小时。将未固定的生物膜与 $\alpha$ -IHF(图2A-2D)或 $\alpha$ -RuvA(图2E、图2F)孵育,然后与缀合至AlexaFluor® 594的山羊抗兔IgG孵育。UPEC用DAPI染色(灰色)。生物膜通过共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)可视化。图像代表生物膜的俯视图和侧视图。注意到,当DNABII蛋白质耗尽时,RuvA稳定了生物膜基质,这与HJ样DNA是UPEC中的关键结构eDNA元件一致。

[0024] 图3A-3C:霍利迪连接体(HJ)特异性核酸内切酶RuvC破坏细菌生物膜结构。(图3A)UPEC和(图3B)NTHI生物膜预先形成16小时,然后与所示的抗体和RuvA温育24小时(总共40小时)。在最后的16小时内,将生物膜与RuvB和RuvC一起孵育。(图3C)将表皮葡萄球菌生物膜预先形成24小时,然后与所示的蛋白质和/或抗体一起温育16小时。生物膜用LIVE/DEAD®染色剂染色,并通过CLSM可视化。通过COMSTAT分析图像以计算生物量。条形代表SEM。与对照组相比的统计学显著性通过未配对t检验评估,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\*\* $p < 0.0001$ 。注意到,在生物膜基质内用RuvA替换DNABII蛋白后,生物膜对HJ特异性核酸内切酶RuvC敏感,从而导致UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌生物膜结构崩溃。

[0025] 图4A-4C:霍利迪连接体特异性解离酶RusA对细菌生物膜的破坏。将预先形成的(图4A)UPEC、(图4B)NTHI和(图4C)表皮葡萄球菌与不同浓度的RusA(对于UPEC和NTHI为1、5和10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;对于表皮葡萄球菌为10和20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )孵育16小时。生物膜用LIVE/DEAD®染色剂染色,并通过CLSM可视化。通过COMSTAT分析图像以计算生物量和平均厚度(未显示)。平均厚度显示出相同的趋势。条形代表SEM。与对照组相比的统计学显著性通过未配对t检验评估,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。注意到,RusA以剂量依赖性方式破坏UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌生物膜。

[0026] 图5A-5C:霍利迪连接体特异性核酸内切酶破坏NTHI生物膜中eDNA的晶格状网络。在不存在RusA或RuvABC(图5A)或存在RusA(图5B)或存在RuvABC(图5C)的情况下,开始NTHI生物膜生长16小时。将未固定的生物膜与 $\alpha$ -DNA单克隆抗体孵育,然后与缀合至AlexaFluor® 488的山羊抗小鼠IgG孵育。通过CLSM观察生物膜。注意到在对照中eDNA的复杂网状结构以及在RusA或RuvABC存在下该eDNA结构的丧失。

[0027] 图6A-6D: RusA靶向HJ样结构。在不存在RusA(图6A、图6B)或存在RusA(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (图6C)的情况下,开始NTHI生物膜生长16小时。将未固定的生物膜与 $\alpha$ -十字形DNA单克隆抗体孵育,然后与缀合至AlexaFluor<sup>®</sup> 488(浅灰色)的山羊抗小鼠IgG孵育。NTHI用FilmTracer<sup>™</sup> FM<sup>®</sup> 4-64(灰色)染色。生物膜通过CLSM可视化。(图6D)通过十字形DNA(浅灰色)与NTHI(灰色)的比例确定十字形DNA的相对强度。条形代表SEM。注意到在NTHI生物膜内HJ DNA的均匀分布(图6B)和在RusA存在下十字形DNA的丧失(图6C)。

[0028] 图7A-7B:  $\alpha$ -IHF和 $\alpha$ -RuvA抗体的特异性。使用所示抗体(图7A)  $\alpha$ -IHF(图7B)  $\alpha$ -RuvA对DNABII蛋白(IHF和HU)和RuvA进行蛋白质印迹分析。注意到, $\alpha$ -IHF和 $\alpha$ -RuvA抗体对它们各自的靶蛋白具有特异性。

[0029] 图8: 通过RuvABC复合物切割HJ DNA。将游离HJ DNA(20 nM)或预先与所示浓度的大肠杆菌HU结合的HJ DNA与RuvA(160 nM)孵育,然后在存在或不存在 $\text{Mg}^{2+}$ (10 mM)的情况下用RuvB(240 nM)和RuvC(160 nM)裂解。裂解产物的位置用箭头指示。注意到,RuvABC以 $\text{Mg}^{2+}$ 依赖性方式切割游离的HJ DNA和与大肠杆菌HU预结合的HJ DNA。

[0030] 图9: RusA切割HJ DNA。在存在或不存在 $\text{Mg}^{2+}$ (10 mM)的情况下,将游离HJ DNA(20 nM)或预先与所示浓度的大肠杆菌HU结合的HJ DNA与RusA(100 nM)孵育。裂解产物的位置用箭头指示。注意到,RusA以 $\text{Mg}^{2+}$ 依赖性方式切割游离的HJ DNA和与大肠杆菌HU预先结合的HJ DNA。

[0031] 详细说明

#### 定义

除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学的术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管类似于或等同于本文描述的方法和材料的任何方法和材料都可以用于本公开的实践或测试中,但是现在描述优选的方法、装置和材料。本文引用的所有技术和专利出版物均通过引用全文并入本文。本文中的任何内容均不得解释为承认本公开无权先于现有公开而早于该公开。

[0032] 除非另有说明,否则本公开的实践将采用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术,它们在本领域技术范围内。参见例如Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition; Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*系列; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.) 系列; MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5<sup>th</sup> edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; 美国专利号4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and*

Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); and Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*.

[0033] 所有数字值(包括范围),例如pH、温度、时间、浓度、以及分子质量,都是变化(+)或(-)0.1的增值的近似值,适当地或以+/- 15%、或10%或5%或2%变化。应当理解的是,尽管并非总是明确地说明,但所有数字值前面都有术语“约”。还应当理解的是,尽管并非总是明确说明,但本文所述的试剂仅是示例性的,并且其等效物在本领域中是已知的。

[0034] 如说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该/所述”包括复数引用,除非上下文另外明确指出。例如,术语“一个多肽”包括多个多肽,包括其混合物。

[0035] 如本文所用,术语“包含”或“包括”旨在表示包括所列举的要素但不排除其他要素的组合物和方法。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”应表示排除对于所述目的而言对组合具有任何实质意义的其他元素。因此,基本上由本文所定义的元素组成的组合物将不会从分离和纯化方法以及药学上可接受的载体(例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等)中排除痕量污染物。“由……组成”是指排除其他成分和用于施用本文公开的组合物的实质性方法步骤的痕量元素。由这些过渡术语中的每一个限定的实施方案在本公开的范围内。

[0036] “生物膜”意指有时附着于可以是有机或无机的结构表面的微生物的有组织的群落,与它们分泌和/或释放的诸如DNA的聚合物一起。生物膜对微生物和抗菌剂具有很高的抵抗力。它们生活在牙龈组织、牙齿和修复体上,引起龋齿和牙周疾病(也称为牙周斑块病)。它们还会引起慢性中耳感染。生物膜也可以在牙科植入物、支架、导管和隐形眼镜的表面形成。它们在起搏器、心脏瓣膜替代物、人工关节和其他外科植入物上生长。疾病控制中心估计,超过65%的医院(医院获得性)感染是由生物膜引起的。真菌生物膜也经常污染医疗器械。它们会导致慢性阴道感染,并导致免疫系统低下的人危及生命的全身感染。生物膜也参与多种疾病。例如,囊性纤维化患者患有假单胞菌感染,通常导致抗生素耐药性生物膜形成。

[0037] 术语“抑制、竞争或滴定”旨在减少作为微生物生物膜成分的DNA/蛋白质基质的形成。

[0038] “DNA BII多肽或蛋白质”意指由DNA结合结构域组成并因此对微生物DNA具有特异性或一般性亲和力的DNA结合蛋白质或多肽。在一方面,它们在小沟中结合DNA。DNA BII蛋白的非限制性实例是整合宿主因子(IHF)蛋白。可能与生物膜相关的其他DNA结合蛋白包括DPS(Genbank登录号:CAA49169)、H-NS(Genbank登录号:CAA47740)、Hfq(Genbank登录号:ACE63256)、CbpA(Genbank登录号:BAA03950)和CbpB(Genbank登录号:NP\_418813)。

[0039] DNABII家族是被称为核苷相关蛋白(NAP)的一类蛋白质的成员,NAP是部分地塑造细胞内细菌核苷的细菌蛋白(Browning et al. (2010) *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 773-780)。另外,该家族无处不在,几乎所有真细菌都表达这个家族。迄今为止,所有特征性的家族成员均充当亚基的同二聚体或异二聚体。该家族分为两种类型,HU(组蛋白样蛋白)和IHF(整合宿主因子)。这些家族成员之间的主要区别是,HU以序列独立的方式结合DNA,而IHF结合共有序列(WATCAANNNTTR,其中W为A或T,R为嘌呤,N为跨属保守的任何碱基(Swinger et al. (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:28-35))。所有DNABII蛋白都

结合并显著弯曲DNA,例如,大肠杆菌IHF可将DNA弯曲成虚拟的U型弯头(Rice et al. (1996) Cell 87:1295-1306)。此外,所有家族成员都偏爱预先弯曲或折弯的DNA结构,例如霍利迪连接体,这是DNA重组的关键十字形状结构。实际上,DNABII蛋白起辅助作用促进所有细胞内DNA功能的因子,包括基因表达、重组、修复和复制(Swinger et al. (2004) Curr. Opin. Struct. Biol. 14:28-35)。

[0040] “IHF”蛋白的“整合宿主因子”是这样的细菌蛋白,其被噬菌体用于将其DNA掺入宿主细菌中。它们还结合细胞外微生物DNA。编码大肠杆菌中IHF蛋白亚基的基因是himA (Genbank登录号:POA6X7.1)和himD (POA6Y1.1)基因。这些基因的同源物在其他生物中发现。

[0041] “HMGB1”是高迁移率族盒(high mobility group box, HMGB)1蛋白,其据报道可结合并扭曲DNA的小沟,是干扰剂的一个例子。重组或分离的蛋白质和多肽可从Atgenglobal、ProSpecBio、Protein1和Abnova商购。

[0042] “HU”是指通常与大肠杆菌结合的一类异二聚体蛋白。已知HU蛋白会结合DNA汇合点。相关蛋白已从其他微生物中分离出来。Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem 103 (3) 447-481报道了大肠杆菌HU的完整氨基酸序列。HU蛋白的抗体可从Abeam商购。

[0043] 如本文所用,ESKAPE病原体包括粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和肠杆菌(*Enterobacter*)属。这些病原体是全世界医院感染的主要原因。

[0044] 术语“流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)”是指可以引起许多不同感染(例如耳部感染、眼部感染和鼻窦炎)的病原细菌。已分离出许多不同的流感嗜血杆菌菌株,并具有IhfA基因或蛋白质。不同流感嗜血杆菌菌株的一些非限制性实例包括Rd KW20、86-028NP、R2866、PittGG、PittEE、R2846和2019。

[0045] RuvABC是三种蛋白质的复合物,介导分支迁移并解离细菌同源重组过程中产生的霍利迪连接体。RuvA和RuvB结合在霍利迪接合中间体中形成的四链DNA结构,并使用推定的假脱机机制使链彼此迁移。RuvAB复合物可以进行DNA解旋酶活性,从而有助于解开双链体DNA。RuvC蛋白与RuvAB复合物的结合被认为可以切割DNA链,从而解离霍利迪连接体。

[0046] RuvA是DNA结合蛋白,其以高亲和力结合霍利迪连接体。据认为,该复合物由一个或两个RuvA四聚体组成,带有带电荷的沟,通过该沟引导进入的DNA。该结构还显示在四聚体的中心存在所谓的“酸性针(acidic pin)”,其用于分离DNA双链体。

[0047] RuvB是仅在DNA存在下才有活性的ATP酶,与RuvA相比,RuvB对DNA的亲和力低。据认为,RuvB蛋白在新形成的DNA双链体的出口点上形成六聚体环,因此提出它们通过RuvA四聚体“缓冲(spool)”新出现的DNA。

[0048] RuvC是解离酶,其切割霍利迪连接体。RuvC蛋白已显示在溶液中形成二聚体,其结构已被以2.5Å解析。据认为,它可以结合在单个RuvA四聚体的开放的、暴露于DNA的面上,或替换两个四聚体之一。提出结合是由RuvC上的非结构化环来介导的,该结构在结合RuvA时变成结构化的。RuvC可以在任一方向上与复合物结合,因此可以水平或垂直方式解离霍利迪连接体。

[0049] RusA是一种核酸内切酶,其解离在同源基因重组和DNA修复过程中产生的霍利迪

连接中间体。它表现出四向DNA连接的序列和结构选择性切割,其中在CC二核苷酸的5'侧在两条极性相同的两条链中引入对称的切口。它还可以纠正与ruvAB或ruvC失活有关的基因重组和DNA修复缺陷。该蛋白的序列和突变分析已在[www.uniprot.org/uniprot/P0AG74](http://www.uniprot.org/uniprot/P0AG74)上披露,最新访问时间为2019年9月22日。

[0050] “微生物DNA”意指来自产生生物膜的微生物的单链或双链DNA。

[0051] “抑制、预防或破坏”生物膜旨在预防性减少或治疗性减少生物膜的结构。在一方面,排除了预防,仅减少了生物膜的结构。

[0052] “干扰剂”是指任何一种或多种竞争、抑制、防止生物膜结构的试剂。

[0053] “弯曲的多核苷酸”意指这样的双链多核苷酸,其在一个链上包含小环,该环不与另一条链配对。在一些实施方案中,所述环的长度为1个碱基至约20个碱基,或替代地为2个碱基至约15个碱基长,或替代地为约3个碱基至约12个碱基长,或替代地为约4个碱基至约10个碱基长、或替代地具有约4、5、或6、或7、或8、9、或10个碱基。

[0054] 霍利迪连接体(HJ)是在基因重组过程中当两个双链DNA分子变得分开为四条链以交换遗传信息片段时形成的十字形结构。同源重组发生在减数分裂期间,其特征在于同源染色体对的母本染色单体和父本染色单体之间的基因交换。具有相似碱基序列的长片段的两个亲本DNA分子被分成单链,导致碱基配对,从而形成四链DNA结构。霍利迪连接体通过“解开”一条链并在第二条链上重新形成氢键,沿着DNA双链体移动。

[0055] 诊断或治疗的“对象”是细胞或动物,例如哺乳动物或人类。接受诊断或治疗的非人类动物是经受感染或动物模型的动物,例如猿猴、鼠类(例如大鼠、小鼠、毛丝鼠)、犬类(例如狗)、类脂动物(例如兔子)、家畜、运动动物和宠物。一方面,该对象是儿科或婴儿对象。

[0056] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用,并且在其最广义上是指两个或更多个亚氨基酸、氨基酸类似物或拟肽的化合物。亚基可以通过肽键连接。在另一个实施方案中,亚基可以通过其他键连接,例如酯、醚等。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽序列的最大氨基酸数没有限制。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L旋光异构体、氨基酸类似物和拟肽。

[0057] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,所述核苷酸是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性示例:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、RNAi、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则可以在多核苷酸组装之前或之后赋予核苷酸结构修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分打断。多核苷酸可在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。该术语还指双链和单链分子。除非另有说明或要求,否则本文公开的为多核苷酸的任何实施方案既包括双链形式,也包括已知或预测组成双链形式的两个互补单链形式的每一个。

[0058] 多核苷酸由四个核苷酸碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);胸腺嘧啶(T);当多核苷酸为RNA时,胸腺嘧啶为尿嘧啶(U)。因此,术语“多核苷酸序列”是多

核苷酸分子的字母表示。可以将该字母表示形式输入到具有中央处理单元的计算机中的数据库中,并用于生物信息学应用,例如功能基因组学和同源性搜索。

[0059] 如本文关于核酸(例如DNA或RNA)所用,术语“分离的”或“重组的”是指分别与其他DNA或RNA分离的分子,其存在于大分子以及多肽的天然来源中。术语“分离的或重组的核酸”是指包括并非天然存在为片段并且不会以天然状态发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白分离的多核苷酸、多肽和蛋白,并且意在包括纯化的和重组的多肽。在其他实施方案中,术语“分离的或重组的”是指与成分、细胞或其他分离,其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段通常在自然界中是相关联的。例如,分离的细胞是与具有不同表型或基因型的组织或细胞分离的细胞。分离的多核苷酸与3'和5'连续核苷酸分离,在其天然或天然环境(例如在染色体上)通常与其是相关联的。对本领域技术人员显而易见的是,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”即可将其与天然存在的对应物区分开。

[0060] 可以推断出,没有明确的叙述,除非另有说明,否则当本公开内容涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,其等效物或生物学等效物应在本公开内容的范围内。如本文所用,术语“其生物等效物”在指代参考蛋白、抗体、片段、多肽或核酸时旨在与“其等效物”同义,意指具有最小同源性而仍保持所需结构或功能的那些。除非本文具体叙述,否则预期本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白质也包括其等效物。例如,等效物意指至少约80%的同源性或同一性,并且替代地至少约85%,或替代地至少约90%,或替代地至少约95%,或98%的百分比同源性或同一性并表现出与参照蛋白、多肽或核酸基本相等的生物学活性。

[0061] 多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”是指,当比对时,在比较两个序列时该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。可以使用本领域已知的软件程序来确定比对和同源性或序列同一性百分数,例如在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1中描述的那些程序。优选地,使用默认参数进行比对。优选的比对程序是BLAST,使用默认参数。特别是,示例性的程序包括BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序= HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详情可以在以下网址找到:[ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)。

[0062] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可以通过比较每个序列中的位置来确定,所述位置可以为了比较的目的而被比对。当比较序列中的一个位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是序列共享的匹配或同源位置数目的函数。“无关”或“非同源”序列与本公开的序列之一共享小于40%的同一性、或替代地小于25%的同一性。

[0063] 如本文所用,术语“可检测的标记”意指直接或间接可检测的化合物或组合物直接或间接缀合至待检测的组合物,例如N-末端组氨酸标签(N-His)、磁活性同位素(例如<sup>115</sup>Sn、<sup>117</sup>Sn和<sup>119</sup>Sn)、非放射性同位素(例如<sup>13</sup>C和<sup>15</sup>N)、多核苷酸或蛋白质(例如抗体),以生成“标记的”成分。该术语还包括与多核苷酸缀合的序列,该序列将在插入序列表达时提供信号,例如绿色荧光蛋白(GFP)等。标记本身可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光

标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。标签可适合于小规模检测,或更适合于高通量筛选。这样,合适的标记包括但不限于磁活性同位素、非放射性同位素、放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料和蛋白质(包括酶)。标记可以被简单地检测或可以被量化。被简单检测到的响应通常包括仅被确认存在的响应,而被量化的响应通常包括具有诸如强度、极化和/或其他性质的可量化(例如可数字报告)值的响应。在发光或荧光测定中,可直接使用与实际参与结合的测定组分相关的发光体或荧光团直接产生可检测的反应,或间接使用与另一(例如报道分子或指示剂)组分相关的发光体或荧光团间接产生可检测的响应。产生信号的发光标记的例子包括但不限于生物发光和化学发光。可检测的发光响应通常包括发光信号的改变或出现。用于发光标记测定组分的合适方法和发光体是本领域已知的,例如在Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(第六版)中进行了描述。发光探针的实例包括但不限于水母发光蛋白和萤光素酶。

[0064] 如本文所用,“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸衍生自基因组DNA,则表达可包括在真核细胞中剪接mRNA。

[0065] 当应用于多核苷酸时,术语“编码”是指被说成“编码”多肽的多核苷酸在其天然状态或通过本领域技术人员公知的方法操作时,可以被转录和/或翻译以产生多肽和/或其片段的mRNA。反义链是这种核酸的互补物,并且可以从其推导编码序列。

[0066] 如本文所用,术语“治疗”等在本文中用于意指获得期望的药理和/或生理作用。就完全或部分预防疾病或其迹象或症状而言,该作用可以是预防性的,和/或对于疾病的部分或完全治愈和/或归因于该疾病的不利影响而言,该作用可以是治疗性的。

[0067] 预防旨在预防易患疾病或效应的系统或对象体内或体外的疾病或效应。这样的例子是防止在被已知会产生生物膜的微生物感染的系统中形成生物膜。

[0068] “组合物”意指活性剂与另一种化合物或组合物的组合,该另一种化合物或组合物是惰性的,例如可检测的试剂或标记,或是活性的,例如佐剂。

[0069] “药物组合物”旨在包括活性剂与惰性或活性载体的组合,使得该组合物适合于体外、体内或离体的诊断或治疗用途。

[0070] “药学上可接受的载体”是指可以在本文公开的组合物中使用的任何稀释剂、赋形剂或载体。药学上可接受的载体包括:离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾)、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白)、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮,纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。合适的药物载体在该领域的标准参考书Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company中有描述。可以根据预期的给药形式,即口服片剂、胶囊剂、酏剂、糖浆剂等来选择它们,并且与常规药学实践一致。

[0071] 适用于注射用途的药物组合物可包括无菌水溶液(其中组分是水溶性的)或分散体以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.)、或磷酸盐缓冲盐水

(PBS)。在所有情况下,用于肠胃外给药的组合物必须是无菌的,并且应该以易于注射的程度流动。它在生产和储存条件下应该是稳定的,并且必须进行防腐以防微生物(例如细菌和真菌)的污染。

[0072] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。为了口服治疗给药的目的,可以将活性化合物与赋形剂结合并以片剂、锭剂或胶囊(例如明胶胶囊)的形式使用。口服组合物也可以使用流体载体制备以用作漱口水。药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可包含以下任何成分或类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如藻酸,Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或橙色调味剂。

[0073] 为了通过吸入给药,化合物可以以气雾喷雾的形式从加压容器或分配器中递送,该容器包含适当的推进剂,例如诸如二氧化碳的气体、或喷雾器。

[0074] 本文公开的“生物活性剂”或活性剂旨在表示以下中的一种或多种:分离的或重组的多肽、分离的或重组的多核苷酸、载体、分离的宿主细胞、或抗体、以及包含其一种或多种的组合物。

[0075] “施用/给药”可以在整个治疗过程中以一剂连续或间歇地进行。确定最有效的给药方式和剂量的方法是本领域技术人员已知的,并且将根据用于治疗的组合物、治疗的目的、所治疗的靶细胞和所治疗的对象而变化。可以通过治疗医师选择剂量水平和方式进行单次或多次给药。合适的剂型和施用试剂的方法是本领域已知的。也可以确定给药途径,并且确定最有效给药途径的方法是本领域技术人员已知的,并且将根据用于治疗的组合物、治疗目的、被治疗的对象的健康状况或疾病阶段、以及靶细胞或组织而变化。施用途径的非限制性实例包括口服施用、鼻腔施用、注射和局部施用。

[0076] 本发明的试剂/药剂可以通过任何合适的施用途径施用以进行治疗。还应当理解,最佳途径将随着对象的状况和年龄以及所治疗的疾病而变化。

[0077] 术语“有效量”是指足以实现期望效果的量。在治疗或预防应用的情况下,有效量将取决于所讨论病症的类型和严重性以及个体对象的特征,例如总体健康、年龄、性别、体重和对药物组合物的耐受性。在免疫原性组合物的情况下,在一些实施方案中,有效量是足以引起针对病原体的保护性应答的量。在其他实施方案中,免疫原性组合物的有效量是足以导致产生针对抗原的抗体的量。在一些实施方案中,有效量是赋予有需要的对象被动免疫所需的量。关于免疫原性组合物,在一些实施方案中,除了上述因素之外,有效量将取决于预期用途、特定抗原性化合物的免疫原性程度和对象免疫系统的健康/应答性。技术人员将能够根据这些和其他因素确定适当的量。

[0078] 在体外应用的情况下,在一些实施方案中,有效量将取决于所讨论的应用的大小和性质。它还将取决于体外靶标的性质和敏感性以及所使用的方法。本领域技术人员将能够基于这些和其他考虑因素确定有效量。根据实施方案,有效量可以包括组合物的一次或多次施用。

[0079] 术语“缀合部分”是指可以通过与嵌合多肽的残基形成共价键而添加到分离的嵌合多肽中的部分。该部分可以直接键合至嵌合多肽的残基或可以与接头形成共价键,该接头又与嵌合多肽的残基形成共价键。

[0080] “肽缀合物”是指通过一个或多个多肽与另一种化学或生物化合物的共价或非共价键结合。在非限制性实例中，多肽与化合物的“缀合”导致多肽出于其预期目的的改善的稳定性或功效。在一个实施方案中，将肽缀合至载体，其中所述载体是脂质体、胶束或药学上可接受的聚合物。

[0081] “脂质体”是由同心脂质双层构成的微观囊泡。从结构上讲，脂质体的大小和形状范围从长管到球形，尺寸范围从几百埃到几分之一毫米。选择形成囊泡的脂质以实现最终复合物的指定程度的流动性或刚性，从而提供外层的脂质组合物。这些是中性的(胆固醇)或双极性的，包括磷脂，例如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM)和其他类型的双极性脂质，包括但不限于二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)，其烃链长度在14-22范围内，且是饱和的或具有一个或多个双C=C键。能够单独或与其他脂质组分组合产生稳定脂质体的脂质的实例是磷脂，例如氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPE)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、棕榈酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)和4-(N-马来酰亚胺基-三乙基)环己烷-1-羧酸二油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE-mal)。可以掺入脂质体的其他非磷脂质包括硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、肉豆蔻酸异丙酯、三乙醇胺-十二烷基硫酸盐、烷基芳基硫酸盐、乙酰棕榈酸酯、甘油蓖麻油酸酯、十六烷基硬脂酸酯、两性丙烯酸聚合物、聚乙氧基化脂肪酸酰胺、以及上面提到的阳离子脂质(DDAB、DODAC、DMRIE、DMTAP、DOGS、DOTAP(DOTMA)、DOSPA、DPTAP、DSTAP、DC-Chol)。带负电荷的脂质包括能够形成囊泡的磷脂酸(PA)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油和(DOPG)、鲸蜡二磷酸酯。通常，脂质体可根据其整体大小和层状结构的性质分为三类。1977年12月，由纽约科学院科学会议制定的“脂质体及其在生物学和医学中的用途”中这三个分类是多层囊泡(MLV)、小型单层囊泡(SUV)和大型单层囊泡(LUV)。可以将生物活性剂封装在其中以根据本文所述的方法施用。

[0082] “胶束”是分散在液体胶体中的表面活性剂分子的聚集体。水溶液中的典型胶束形成与周围溶剂接触的亲水性“头部”区域的聚集体，将胶束中心的疏水性尾部区域隔离。这种胶束称为正相胶束(水包油胶束)。反胶束的头组在中心，而尾巴则伸出(油包水胶束)。胶束可用于附着本文所述的多核苷酸、多肽、抗体或组合物，以促进有效递送至靶细胞或组织。

[0083] 短语“药学上可接受的聚合物”是指可以与本文所述的一种或多种多肽缀合的一组化合物。预期聚合物与多肽的缀合能够在体内和体外延长多肽的半衰期。非限制性实例包括聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、纤维素衍生物、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、糖、多元醇及其混合物。可以根据本文描述的方法将生物活性剂缀合至药学上可接受的聚合物以进行施用。

[0084] “基因递送载体”定义为可以将插入的多核苷酸携带到宿主细胞中的任何分子。基因传递载体的例子是：脂质体，胶束生物相容性聚合物，包括天然聚合物和合成聚合物；脂蛋白；多肽；多糖；脂多糖；人工病毒包膜；金属颗粒；以及细菌或病毒，例如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体和本领域通常使用的其他重组载体，其已被描述用于在各种真核和原核宿主中表达，并可以用于基因治疗以及简单的蛋白质表达。

[0085] 可使用基因递送载体将本文公开的多核苷酸递送至细胞或组织。如本文所用,“基因递送”、“基因转移”、“转导”等是指将外源多核苷酸(有时称为“转基因”)引入宿主细胞中的术语,而与引入的方法无关。此类方法包括多种众所周知的技术,例如载体介导的基因转移(例如,通过病毒感染/转染,或各种其他基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物),以及促进“裸”多核苷酸递送的技术(例如电穿孔,“基因枪”递送以及用于引入多核苷酸的各种其他技术)。所引入的多核苷酸可以在宿主细胞中稳定或瞬时保持。稳定的保持通常要求引入的多核苷酸包含与宿主细胞相容的复制起点或整合到宿主细胞的复制子中,例如染色体外复制子(例如质粒)或核或线粒体染色体。如本领域已知和本文所述,已知许多载体能够介导基因向哺乳动物细胞的转移。

[0086] “质粒”是与染色体DNA分离的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA复制。在许多情况下,它是圆形的和双链的。质粒提供了在微生物种群内水平基因转移的机制,并且通常在给定的环境状态下提供选择优势。质粒可以携带在竞争性环境中对天然存在的抗生素具有抗性的基因,或者在相似情况下,产生的蛋白质可以充当毒素。

[0087] 基因工程中使用的“质粒”被称为“质粒载体”。许多质粒可用商业地于此类用途。将要复制的基因插入质粒的拷贝中,该质粒含有使细胞对特定抗生素具有抗性的基因和多个克隆位点(MCS或多接头),其是一个短区域,包含几个常用的限制性酶切位点,可轻松插入DNA片段在此位置。质粒的另一主要用途是制备大量蛋白质。在这种情况下,研究人员可以使细菌生长,该细菌含有带有目的基因的质粒。正如细菌产生赋予其抗生素抗性的蛋白质一样,它也可以被诱导从插入的基因中产生大量蛋白质。这是大量生产一种基因或其随后编码的蛋白质的廉价而简便的方法。

[0088] “酵母人工染色体”或“YAC”是指用于克隆大DNA片段(大于100 kb且最大3000 kb)的载体。它是人工构建的染色体,包含在酵母细胞中复制和保存所需的端粒、着丝粒和复制起点序列。使用最初的环状质粒构建,然后使用限制酶将它们线性化,然后DNA连接酶可以通过使用粘性末端在线性分子内添加目标序列或基因。酵母表达载体,例如YAC、YIp(酵母整合质粒)和YEp(酵母游离质粒),非常有用,因为可以得到具有翻译后修饰的真核蛋白产物,因为酵母本身就是真核细胞,但是已经发现YAC是比BAC更不稳定,产生嵌合效应。

[0089] “病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒颗粒,其包含待体内、离体或体外递送至宿主细胞的多核苷酸。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、 $\alpha$ 病毒载体等。基于传染性烟草花叶病毒(TMV)的载体可用于制造蛋白质,并且据报道在烟草叶中表达Griffithsin (O'Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106 (15):6099-6104)。 $\alpha$ 病毒载体,例如基于Semliki Forest病毒的载体和基于Sindbis病毒的载体,也已被开发用于基因治疗和免疫治疗。参见Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439以及Ying et al. (1999) Nat. Med. 5(7):823-827。在逆转录病毒载体介导基因转移的方面,载体构建体是指包含逆转录病毒基因组或其一部分和治疗基因的多核苷酸。

[0090] 如本文所用,“逆转录病毒介导的基因转移”或“逆转录病毒转导”具有相同的含义,并且是指借助于病毒进入细胞并将其基因组整合到宿主细胞基因组中而将基因或核酸序列稳定地转移到宿主细胞中的过程。病毒可以通过其正常的感染机制进入宿主细胞,也可以对其进行修饰,使其与不同的宿主细胞表面受体或配体结合以进入细胞。如本文所用,

逆转录病毒载体是指能够通过病毒或类病毒进入机制将外源核酸引入细胞的病毒颗粒。

[0091] 逆转录病毒以RNA形式携带其遗传信息;但是,一旦病毒感染细胞,RNA就会逆转录为DNA形式,其整合到被感染细胞的基因组DNA中。整合的DNA形式称为原病毒。

[0092] 在通过DNA病毒载体(例如腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV))介导基因转移的方面,载体构建体是指包含病毒基因组或其一部分和转基因的多核苷酸。腺病毒(Ad)是表征相对较完善的同质病毒,包括超过50种血清型。参见例如PCT国际申请公开号W0 95/27071。Ad不需要整合到宿主细胞基因组中。还构建了重组Ad衍生载体,特别是减少重组可能性和产生野生型病毒的载体。参见PCT国际申请公开号W0 95/00655和W0 95/11984,野生型AAV具有整合到宿主细胞基因组中的高感染性和特异性。参见Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 和Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996。

[0093] 既包含启动子又包含可将多核苷酸可操作地连接至的克隆位点的载体是本领域众所周知的。这样的载体能够在体外或体内转录RNA,并且可以从诸如Stratagene (La Jolla, CA)和Promega Biotech (Madison, WI)的来源商购获得。为了优化表达和/或体外转录,可能有必要去除、添加或改变克隆的5' 和/或3' 非翻译部分,以消除可能干扰的额外的、潜在的不适当的替代翻译起始密码子或在转录或翻译水平干扰或减少表达的其他序列。或者,可以在起始密码子的5' 处紧接着插入共有核糖体结合位点以增强表达。

[0094] 基因递送载体还包括DNA/脂质体复合物、胶束和靶向病毒蛋白-DNA复合物。同样包含靶向抗体或其片段的脂质体可用于本文公开的方法中。除了将多核苷酸递送至细胞或细胞群外,本文所述的蛋白质直接导入细胞或细胞群中还可以通过蛋白质转染的非限制性技术来完成,或者通过培养条件来增强表达和/或或促进本文公开的蛋白质的活性是其他非限制性技术。

[0095] 如本文所用,术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白、保留抗原特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、scFv、dsFv、Fd片段、dAb、VH、VL、VhH和V-NAR域;小体、双体、三体、四体和κ体;由抗体片段和一个或多个分离的CDR或功能性互补位形成的多特异性抗体片段;嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体以及包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体(Ab)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织的结合。

[0096] 本文中术语“抗体”以最广义使用,并且具体包括全长单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性即可。

[0097] 如本文所用,“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体。单克隆抗体具有高度特异性,因为每种单克隆抗体都针对抗原上的单个决定簇。可以用例如放射性同位素、产生可检测产物的酶、荧光蛋白等可检测地标记抗体。抗体可以进一步与其他部分偶联,例如特异性结合对的成员,例如生物素(生物素-亲和素特异性结合对的成员)等。抗体也可以结合到固相支持物上,包括但不限于聚苯乙烯板或珠等。

[0098] 单克隆抗体可以使用本领域已知的杂交瘤技术或重组DNA方法产生。产生或选择抗体的替代技术包括将淋巴细胞体外暴露于目标抗原,以及在细胞、噬菌体或类似系统中筛选抗体展示文库。

[0099] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和

恒定区的抗体。本文公开的人抗体可包括未由人种系免疫球蛋白序列(例如,由体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)编码的氨基酸残基。然而,本文所用的术语“人抗体”不意图包括其中衍生自另一哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已嫁接到人框架序列上的抗体。因此,如本文所用,术语“人抗体”是指这样的蛋白质,其中基本上每个蛋白质部分(例如CDR、构架、 $C_L$ 、 $C_H$  结构域(例如 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ )、铰链(VL、VH)在人类中基本上是非免疫原性的,只有很小的序列变化或变异。同样,指定为灵长类动物(猴子、狒狒、黑猩猩等)、啮齿动物(小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、仓鼠等)和其他哺乳动物的抗体则指定此类物种、亚类、属、亚科、家庭特异性抗体。此外,嵌合抗体包括以上的任何组合。相对于未修饰的抗体,这样的改变或变化任选地保留或降低人或其他物种的免疫原性。因此,人抗体不同于嵌合或人源化抗体。应当指出,人抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(例如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可以包含在天然人抗体中未发现的接头肽。例如,Fv可包含接头肽,例如两个至约八个甘氨酸或其他氨基酸残基,其连接重链的可变区和轻链的可变区。这样的接头肽被认为是人类来源的。

[0100] 如本文所用,如果抗体是从使用人免疫球蛋白序列的系统获得的,例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或通过筛选人免疫球蛋白基因文库,则人抗体是“衍生自”特定种系序列。可以通过将人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较来鉴定“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体。所选择的人抗体通常在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%的同一性,并且含有与其他物种(例如鼠种系序列)的种系免疫球蛋白的氨基酸序列相比鉴定该人抗体为人源的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可以在氨基酸序列上至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%相同。通常,衍生自特定人种系序列的人抗体与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列所显示的氨基酸差异不超过10个氨基酸。在某些情况下,人抗体与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的氨基酸差异不超过5个、甚至不超过4、3、2或1个氨基酸。

[0101] “人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。该术语还意指重组人抗体。本文描述了制备这些抗体的方法。

[0102] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如:从用于人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)分离的抗体或由其制备的杂交瘤,从被转化以表达抗体(例如从转染瘤中表达)的宿主细胞分离的抗体,从重组的组合人抗体文库分离的抗体,以及通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,可以对此类重组人抗体进行体外诱变(或,当使用针对人Ig序列转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),并因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,尽管这些序列衍生自人类种系VH和VL并与之相关,但在体内人类抗体种系库中可能不自然存在。本文描述了制备这些抗体的方法。

[0103] 如本文所用,嵌合抗体是通常通过遗传工程从属于不同物种的抗体可变区和恒定区基因构建的轻链和重链基因的抗体。

[0104] 如本文所用,术语“人源化抗体”或“人源化免疫球蛋白”是指含有源自非人免疫球

蛋白的最小序列的人/非人嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体可变区的残基被来自非人类物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、兔、或具有所需特异性、亲和力和能力的非人灵长类动物)的残基取代。人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中找不到的残基。人源化抗体还可任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白、在构架区(恒定区或CDR)中包含已经被来自人抗体的相应定位的氨基酸取代的一个或多个氨基酸的非人抗体的至少一部分。通常,与相同抗体的非人源化形式相比,预期人源化抗体在人宿主中产生降低的免疫反应。人源化抗体可以具有保守的氨基酸取代,其对抗原结合或其他抗体功能基本上没有影响。保守取代组合包括:甘氨酸-丙氨酸,缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸,赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,丝氨酸-苏氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0105] 如本文所用,术语“抗体衍生物”包括全长抗体或抗体的片段,其中一个或多个氨基酸通过烷基化、聚乙二醇化、酰化、酯形成或酰胺形成等等(例如用于将抗体连接至第二分子)而被化学修饰。这包括但不限于聚乙二醇化抗体、半胱氨酸聚乙二醇化抗体及其变体。

[0106] 如本文所用,术语“免疫缀合物”包括与第二试剂结合或连接的抗体或抗体衍生物,所述第二试剂例如是细胞毒性试剂、可检测试剂、放射性试剂、靶向试剂、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、半合成抗体或多特异性抗体。

[0107] 合适的荧光标记的实例包括但不限于荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、曙红、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、苝、孔雀石绿、二苯乙烯、荧光素黄、级联蓝™和得克萨斯红。其他合适的光学染料在Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(第6版)中进行了描述。

[0108] 在另一方面,对荧光标记进行功能化以促进共价附接到细胞或组织的表面中或表面上存在的细胞成分(例如细胞表面标记)。合适的官能团包括但不限于异硫氰酸酯基、氨基、卤代乙酰基、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺酯和磺酰卤,所有这些均可以用于将荧光标记附着于第二分子。荧光标记的官能团的选择将取决于与接头、试剂、标记或第二标记试剂的连接位点。

[0109] “真核细胞”包括除原核生物外的所有生命。通过膜结合核可以轻松地区分它们。动物、植物、真菌和原生生物是真核生物或生物,其细胞通过内膜和细胞骨架组织成复杂的结构。最有特色的膜结合结构是细胞核。除非特别叙述,否则术语“宿主”包括真核宿主,包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。真核细胞或宿主的非限制性实例包括猿猴、牛、猪、鼠、大鼠、禽、爬行动物和人。

[0110] “原核细胞”通常缺乏细胞核或任何其他膜结合的细胞器,并且分为两个域,细菌和古细菌。除了染色体DNA,这些细胞还可以在称为附加体的环状环中包含遗传信息。细菌细胞非常小,大约相当于动物线粒体的大小(直径约1-2 μm,长10 μm)。原核细胞具有三种主要形状:杆状、球形和螺旋形。细菌细胞没有经历像真核生物这样复杂的复制过程,而是通过二元裂变分裂。实例包括但不限于芽孢杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌。

[0111] “天然”或“原生”抗原是包含表位的多肽、蛋白质或片段,其已从天然生物学来源分离,并且可以特异性结合对象中的抗原受体,特别是T细胞抗原受体(TCR)。

[0112] 术语“抗原”和“抗原性”是指具有能够被抗体识别或以其他方式充当抗体-配体对

的成员的能力的分子。“特异性结合”是指抗原与免疫球蛋白重链和轻链的可变区的相互作用。抗体-抗原结合可以在体内或体外发生。技术人员将理解,包括蛋白质、核酸、脂肪酸、脂质、脂多糖和多糖的大分子具有充当抗原的潜力。本领域技术人员将进一步理解,编码具有作为抗体配体的潜能的蛋白质的核酸必然编码抗原。本领域技术人员将进一步理解,抗原不仅限于全长分子,还可以包括部分分子。术语“抗原性”是形容词指具有抗原特性的分子。该术语包括具有免疫原性的物质(即免疫原)以及诱导免疫无反应性或无变应性的物质(即无能物质(anergen))。

[0113] “改变的抗原”是具有不同于相应的野生型抗原的一级序列的一级抗原。改变的抗原可以通过合成或重组方法来制备,并且包括但不限于在翻译过程中或之后例如通过磷酸化、糖基化、交联、酰化、蛋白水解切割、与抗体分子、膜分子或其他配体连接而被差异修饰的抗原肽。(Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320)。本文公开的合成或改变的抗原旨在结合作为天然表位的相同的TCR。

[0114] 在本文中也称为天然或野生型抗原的“自身抗原”是由于对抗原的自身耐受性而在对象中几乎不引起免疫应答或不引起免疫应答的抗原性肽。自身抗原的一个例子是黑色素瘤特异性抗原gp100。

[0115] 如本文所用,可互换使用的“固相支持物/载体”或“固体支持物/载体”不限于特定类型的支持物。相反,大量的载体是可用的,并且是本领域普通技术人员已知的。固相支持物包括硅胶、树脂、衍生的塑料薄膜、玻璃珠、棉、塑料珠、氧化铝凝胶。如本文所用,“固体支持物”还包括合成的抗原呈递基质、细胞和脂质体。可以基于期望的最终用途和对各种方案的适用性来选择合适的固相支持物。例如,对于肽合成,固相支持物可以指的是树脂,例如聚苯乙烯(例如从Bachem Inc., Peninsula Laboratories等获得的PAM树脂)、POLYHIPE.RTM.树脂(从加拿大的Aminotech获得)、聚酰胺树脂(购自Peninsula Laboratories)、接枝了聚乙二醇的聚苯乙烯树脂(TentaGel.RTM., Rapp Polymere, Tubingen, Germany)或聚二甲基丙烯酸酰胺树脂(获自 Milligen/Biosearch, Calif.)。

[0116] 固相支持物的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁矿。载体的性质可以在某种程度上可溶或不可溶。载体材料实际上可以具有任何可能的结构构型,只要偶联的分子能够结合多核苷酸、多肽或抗体即可。因此,载体结构可以是球形的,例如珠状的,或者是圆柱形的,例如在试管的内表面或杆的外表面。替代地,表面可以是平坦的,诸如片、测试条等,或者替代地聚苯乙烯珠。本领域技术人员将知道许多用于结合抗体或抗原的其他合适的载体,或者将能够通过使用常规实验来确定它们。

[0117] 用于执行本发明的方式  
组合物

本文提供用于本发明的方法的组合物,其是切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂。一方面,所述试剂是HJ特异性核酸内切酶,例如RuvABC肽复合物和/或RusA多肽。这样的氨基酸序列包括例如如下所述的野生型和突变的,以及其等效物,其中所述等效物保持如本文所述的氨基酸突变。还提供了编码肽和多肽的分离的多核苷酸、载体和包含肽、多核苷酸和/或载体的宿主细胞。

[0118] 在一方面,本文提供了一种RusA蛋白序列,其包含以下序列,或基本上由其组成,

或由其组成:

MVNTYSITLPWPPSNRYRHNHGRTHVSAEGQAYRDNVARI IKNAMLDIGLAMPVKIRIECHMPDRR  
RRDLNLQKAADFALTKAGFWLDDAQVVDYRVVVKMPVTKGGRLELTITEMGNEA, 及其等效物, 其中等效物  
包含此处所示(粗体字)的突变氨基酸。

[0119] 在另一方面, 本文提供了一种RuvB蛋白序列, 其包含以下序列, 或基本上由其组  
成, 或由其组成:

MIEADRLISAGTTLPEDVADRAIRPKLLEEYVGGPQVRSQMEIFIKAAKLRGDALDHLLIFGPPGLGK  
TTLANIVANEMGVNLRRTSGPVLEKAGDLAAMLTNLEPHDVLFI DEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGEGPA  
ARSIKIDLPFFTLIGATTRAGSLTSPLRDRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTP  
RIANRLLRRVRDFAEVKHDGTISADIAAQALDMLNVDAEGFDYMDRKL LLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERET  
IEDVLEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRAHNHFGITPEMPA, 及其等效物, 其中等效物包含此处所示  
(粗体字)的突变氨基酸。

[0120] 在另一方面, 本文提供了一种RuvC蛋白序列, 其包含以下序列, 或基本上由其组  
成, 或由其组成:

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGGCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAI  
EQVFMKNADSALKLGQARGVAI VAAVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQHVMVRTLLKLPANPQADAAD  
ALAIATHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA, 及其等效物, 其中等效物包含此处所示(粗体字)的  
突变氨基酸。

[0121] 在另一方面, 本文提供了一种RuvA、B 和C蛋白复合物, 其包含以下序列组合, 或基  
本上由其组成, 或由其组成:

RuvA:

MIGRLRGI IIEKQPPLVLIIEVGGVGYEVHMPMTCFYELPEAGQEAI VFTHFVVREDAQLLYGFNNKQE  
RTLFKELIKTNGVGPKLALAILSGMSAQQFVNAVEREEV GALVKLPGIGKKAERLIVEMKDRFKLHGLDFTPA  
DLVLTSPASPATDDAEQEAVAALVALGYKQPEASRMVSKIARPDASSETLIREALRAAL, 以及

RuvB:

MIEADRLISAGTTLPEDVADRAIRPKLLEEYVGGPQVRSQMEIFIKAAKLRGDALDHLLIFGPPGLGK  
TTLANIVANEMGVNLRRTSGPVLEKAGDLAAMLTNLEPHDVLFI DEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGEGPA  
ARSIKIDLPFFTLIGATTRAGSLTSPLRDRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTP  
RIANRLLRRVRDFAEVKHDGTISADIAAQALDMLNVDAEGFDYMDRKL LLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERET  
IEDVLEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRAHNHFGITPEMPA, 以及

RuvC:

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGGCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAI  
EQVFMKNADSALKLGQARGVAI VAAVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQHVMVRTLLKLPANPQADAAD  
ALAIATHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA, 及其等效物, 其中等效物包含此处所示(粗体字)的  
突变氨基酸。

[0122] 本文还提供了一种重组多肽, 其包含一个或多个如本文所述的分离的多肽、或基  
本上由其组成、或由其组成, 还包含位于一个或两个末端的至少一个另外的氨基酸。

[0123] 应当理解, 野生型多肽或蛋白质的功能性等效物或变体也在本发明的范围内, 例  
如, 具有氨基酸的保守氨基酸取代的那些, 其等效物保持本文所述的氨基酸突变。

[0124] 在另一方面,将多肽缀合或连接至可检测标记。合适的标记是本领域已知的并且在本文中描述。

[0125] 在另一方面,具有或不具有可检测标记的多肽可以被包含或表达在宿主原核或真核宿主细胞的表面上。

[0126] 蛋白质和多肽可通过本领域技术人员已知的许多方法获得,包括纯化、化学合成和重组方法。可以通过诸如用抗体免疫沉淀之类的方法以及诸如凝胶过滤、离子交换、反相和亲和层析之类的标准技术从诸如宿主细胞系统之类的制品中分离多肽。对于这种方法,请参见例如Deutscher et al. (1999) *Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology* (Vol. 182, Academic Press)。因此,本发明还提供了获得这些多肽的方法以及通过这些方法可获得和获得的产物。

[0127] 多肽还可以使用可商购的自动肽合成仪通过化学合成获得,所述肽合成仪例如由Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430A或431A, Foster City, Calif., USA.生产的。合成的多肽可以例如通过高效液相色谱法(HPLC)沉淀并进一步纯化。因此,本发明还提供了一种化学合成本发明蛋白质的方法,其方法是提供蛋白质和试剂(例如氨基酸和酶)的序列,并以正确的方向和线性序列将氨基酸连接在一起。

[0128] 替代地,可以通过例如在Sambrook et al. (1989) (同上)中描述的众所周知的重组方法,使用本文所述的宿主细胞和载体系统,获得蛋白质和多肽。

[0129] 本申请还提供了缀合至可检测试剂以用于诊断方法的本文所述多肽。例如,可检测地标记的多肽可以与柱结合并用于抗体的检测和纯化。它们也可用作产生如下所述的抗体的免疫原。本发明的多肽可用于体外测定系统中以筛选调节细胞过程的试剂或药物。

[0130] 本领域技术人员众所周知,可以对本发明的肽进行修饰以使其具有改变的性质。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L旋光异构体、氨基酸类似物和拟肽。如果肽链短,则三个或三个以上氨基酸的肽通常称为寡肽。如果肽链长,则该肽通常称为多肽或蛋白质。

[0131] 本发明的肽可以被修饰以包括非天然氨基酸。因此,肽可包含D-氨基酸、L-氨基酸的组合、以及各种“设计”氨基酸(例如 $\beta$ -甲基氨基酸、C- $\alpha$ -甲基氨基酸和N- $\alpha$ -甲基氨基酸等)来传达肽的特殊性质。另外,通过在特定的偶联步骤中分配特定的氨基酸,可以产生具有 $\alpha$ -螺旋 $\beta$ 转角、 $\beta$ 折叠、 $\gamma$ -转角的肽和环状的肽。通常,认为 $\alpha$ -螺旋二级结构或无规二级结构是优选的。

[0132] 本发明的多肽还可以与各种固相载体(例如植入物、支架、糊剂、凝胶、牙科植入物、或医学植入物)或液相载体(例如珠、无菌或水溶液、药学上可接受的载体、药学上可接受的聚合物、脂质体、胶束、悬浮液和乳液)组合。非水溶剂的实例包括丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。当用于在体内制备抗体或诱导免疫应答时,载体还可以包括可用于非特异性地增强特异性免疫应答的佐剂。技术人员可以容易地确定是否需要佐剂并选择一种。然而,仅出于说明的目的,合适的佐剂包括但不限于弗氏完全和不完全溶液矿物盐和多核苷酸。其他合适的佐剂包括单磷酸基脂质A(MPL)、大肠杆菌的热不稳定肠毒素的突变体衍生物、霍乱毒素的突变体衍生物、CPG寡核苷酸和衍生自角鲨烯的佐剂。

[0133] 抗体及其衍生物

本公开还提供了结合和/或特异性识别和结合分离的多肽的抗体,用于本公开

的方法。抗体可以是本文所述的各种抗体中的任何一种,这样的非限制性实例包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、贴面化抗体(veneered antibody)、双抗体、人源化抗体、抗体衍生物、重组人源化抗体或其各自的衍生物或片段。在一方面,该片段包含抗体的CDR,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,抗体被可检测地标记或进一步包含与其偶联的可检测标记。还提供了产生本文公开的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。本文进一步提供了组合物,其包含一种或多种上述实施方案,或基本上由其组成,或由其组成。还提供了编码抗体和片段的氨基酸序列的多核苷酸,以及产生重组或化学合成抗体多肽及其片段的方法。抗体多肽可以在真核或原核细胞中产生,或通过本领域已知的和本文描述的其他方法产生。一方面,选择抗体以选择性地识别和结合本文所述的突变蛋白的能力。

[0134] 抗体可以使用本领域已知的常规技术产生,并且在文献中有充分描述。存在几种产生多克隆抗体的方法。例如,多克隆抗体通常通过免疫合适的哺乳动物来产生,例如但不限于鸡、山羊、豚鼠、仓鼠、马、小鼠、大鼠和兔子。将抗原注射到哺乳动物中,诱导B淋巴细胞产生对该抗原具有特异性的免疫球蛋白。免疫球蛋白可以从哺乳动物的血清中纯化。

[0135] 单克隆抗体可以使用本领域已知的和文献中充分描述的常规杂交瘤技术来产生。例如,通过以下来产生杂交瘤:融合合适的永生细胞系(例如,骨髓瘤细胞系,例如但不限于Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1, L.5、P3X63Ag8、653、Sp2、SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U397、MIA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI, K-562, COS, RAJI、NIH 313、HL-60、MLA 144、NAMAIWA, NEURO 2A、CHO, PerC.6, YB2/0)等、或杂种骨髓瘤、其融合产物、或衍生自其的任何细胞或融合细胞、或本领域已知的任何其他合适的细胞系(参见以下网址的技术,例如atcc.org, lifetech.com,最新访问时间为2007年11月26日),其具有产生抗体的细胞,例如但不限于:分离的或克隆的脾脏、外周血、淋巴、扁桃体、或其他免疫或包含B细胞的细胞、或表达重链或轻链恒定或可变或构架或CDR序列(内源或异源核酸)(重组或内源)的任何其他细胞、病毒、细菌、藻类、原核、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿动物、马、绵羊、山羊、绵羊、灵长类动物、真核生物、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等或其任何组合。产生抗体的细胞也可以从已经用目的抗原免疫然后筛选目的活性的人或其他合适动物的外周血或脾或淋巴结中获得。任何其他合适的宿主细胞也可以用于表达编码本发明的抗体、其指定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他合适的已知方法分离,并通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法克隆。

[0136] 可以使用产生或分离具有必要特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于使用本领域已知的方法从肽或蛋白质文库中选择重组抗体的方法(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、cDNA等展示文库;例如可从各种商业供应商获得的,例如MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.)、BioInvent (Lund, Sweden)、Affitech (Oslo, Norway))。专利文献中描述了本领域已知的方法,其中一些包括美国专利号4,704,692、5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514和5,976,862。替代方法依赖于如本领域已知的和/或如本文所述能够产生人类抗体库的转基因动物(例如SCID小鼠,Nguyen et al. (1977) Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al. (1998) Mamma 93:154-161)的免疫。此类技术包括但不限于:核糖体展示 Wanes et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-

4942; Hanes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14130-14135);单细胞抗体产生技术(例如,选择的淋巴细胞抗体方法(“SLAM”) (美国专利号5,627,052;Wen et al. (1987) J. Immunol 17:887-892; Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848);凝胶微滴和流式细胞术(Powell et al. (1990) Biotechnol. 8:333-337;One Cell Systems, (Cambridge, Mass.);Gray et al. (1995) J. Imm. Meth. 182:155-163;以及Kenny et al. (1995) Bio. Technol. 13:787-790);B细胞选择(Steenbakkers et al. (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134)。

[0137] 本公开的抗体衍生物也可以通过以下方法来制备:将编码本文公开的抗体的多核苷酸递送至合适的宿主以提供转基因动物或哺乳动物(例如山羊、牛、马、绵羊等在),其在奶中产生这种抗体。这些方法是本领域已知的,并且例如描述于美国专利号5,827,690、5,849,992、4,873,316、5,849,992、5,994,616、5,565,362和5,304,489。

[0138] 术语“抗体衍生物”包括对抗体或片段的线性多肽序列的翻译后修饰。例如,美国专利号6,602,684 B1描述了一种用于产生修饰的乙二醇形式的抗体的方法,包括完整的抗体分子、抗体片段或融合蛋白,其包含与免疫球蛋白的Fc区等效的区域,具有增强的铁介导的细胞毒性,并因此产生糖蛋白。

[0139] 本文公开的抗体还包括这样的衍生物,其通过任何类型的分子共价附接至抗体而修饰,使得共价附接不会阻止抗体产生抗独特型应答。抗体衍生物包括但不限于已经通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质的连接等修饰的抗体。此外,衍生物可包含一种或多种非经典氨基酸。

[0140] 抗体衍生物也可以通过以下方法来制备:递送本文公开的多核苷酸以提供在植物部分中或在从中培养的细胞中产生此类抗体、特定部分或变体的转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草、玉米和浮萍)。例如Cramer et al. (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118和其中引用的参考文献描述了表达大量重组蛋白的转基因烟草叶的生产,例如使用诱导型启动子。转基因玉米已用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白,其生物学活性等同于其他重组系统中产生的或从天然来源纯化的生物活性。参见例如Hood et al. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147及其中引用的参考文献。还已经从包括抗体片段的转基因植物种子中大量生产抗体衍生物,例如单链抗体(scFv),包括烟草种子和马铃薯块茎。参见,例如Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109 及其中引用的参考文献。因此,根据已知方法,也可以使用转基因植物产生抗体。

[0141] 抗体衍生物也可以通过以下方法来产生:例如添加外源序列以修饰免疫原性或减少、增强或修饰结合、亲和力、开启速率、关闭速率、活动性、特异性、半衰期或任何其他合适的特性。通常,部分或全部非人或人CDR序列得以保留,而可变区和恒定区的非人序列被入或其他氨基酸或来自其他同种型的可变区或恒定区代替。

[0142] 通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。可以使用任何已知方法来进行抗体的人源化或工程改造,例如但不限于美国专利号5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539和4,816,567中所述的方法。

[0143] 可基于使用标准分子生物学技术制备的参考单克隆抗体的序列来制备本公开的

嵌合、人源化或灵长类化的抗体。可以从感兴趣的杂交瘤中获得编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA,并使用标准分子生物学技术对其进行改造,使其包含非参考(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法(美国专利号4,816,567)将鼠类可变区连接至人恒定区。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法(美国专利号5,225,539和美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)将鼠CDR区插入人框架。类似地,为了产生灵长类化的抗体,可以使用本领域已知的方法(WO 93/02108和WO 99/55369)将鼠的CDR区插入灵长类框架中。

[0144] 制备部分至完全人抗体的技术是本领域已知的,并且可以使用任何此类技术。根据一个实施方案,在转基因小鼠中制备完全人抗体序列,该转基因小鼠已被工程化以表达人重链和轻链抗体基因。已经制备了可以产生不同类别的抗体的这种转基因小鼠的多种菌株。可以融合产生所需抗体的转基因小鼠的B细胞,以制备杂交瘤细胞系,以连续产生所需抗体。(参见例如,Russel et al. (2000) *Infection and Immunity* April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) *European J. of Immun.* 30:534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231:11-23; Yang et al. (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66:401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) *Advanced Drug Reviews* 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3):483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) *Genomics* 42:413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Jakobovits (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV*, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566; Mendez et al. (1995) *Genomics* 26:294-307; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8):761-763; Arbones et al. (1994) *Immunity* 1(4):247-260; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417):255-258; Jakobovits et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(6):2551-2555;以及美国专利号6,075,181)。

[0145] 本文公开的抗体也可以被修饰以产生嵌合抗体。嵌合抗体是指抗体重链和轻链的各个域都被一种以上的DNA编码的抗体。参见例如美国专利号4,816,567。

[0146] 替代地,本文公开的抗体也可以被修饰以产生贴面化抗体。贴面化抗体是这样的抗体,其中一个物种的抗体的外部氨基酸残基被明智地替换或“贴面”为第二物种的抗体,以使第一个物种的抗体在第二个物种中不具有免疫原性,从而降低免疫原性抗体。由于蛋白质的抗原性主要取决于其表面的性质,因此可以通过替换暴露的残基来降低抗体的免疫原性,所述残基不同于另一种哺乳动物物种抗体中通常发现的残基。明智地替换外部残留物应该对内部域或域间接触几乎没有或没有影响。因此,由于限于可变区框架残基的改变,配体结合性质应不受影响。该过程被称为“贴面”,因为仅抗体的外表面或皮肤被改变,支持残基保持不受干扰。

[0147] “贴面”的过程利用了人类抗体可变域的可用序列数据,其由Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health编译(此数据库的更新),以及其他可访问的美国和外国数据库(核酸和蛋白质)。用于产生贴面化抗体的方法的非限制性实例包括EP

519596、美国专利号6,797,492,并且描述于Padlan et al. (1991) Mol. Immunol. 28(4-5):489-498。

[0148] 术语“抗体衍生物”还包括“双抗体”,其是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中片段在同一多肽链中包含连接至轻链可变域(VL)的重链可变域(VH)。(参见例如EP 404,097、WO 93/11161、以及Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。通过使用太短以至于不允许同一条链上两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。(还参见Chen等人的美国专利号6,632,926,其公开了这样的抗体变体,其具有一个或多个氨基酸插入亲本抗体的高变区中,并且对靶抗原的结合亲和力比亲本抗体对抗原的结合亲和力强至少约两倍)。

[0149] 术语“抗体衍生物”还包括工程化的抗体分子、片段和单个结构域,例如scFv、dAb、纳米抗体、微型抗体、单一体和Affibodies & Hudson (2005) Nature Biotech 23(9):1126-36、美国专利申请公开号2006/0211088、PCT国际申请公开号WO 2007/059782、美国专利 5,831,012。

[0150] 术语“抗体衍生物”还包括“线性抗体”。制备线性抗体的方法在本领域中是已知的,并在Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062中描述。简而言之,这些抗体包含一对串联的Ed区段( $V_H-C_H1-VH-C_H1$ ),其形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0151] 可通过已知方法从重组细胞培养物中回收和纯化本文公开的抗体,所述方法包括但不限于蛋白A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱法(“HPLC”)也可用于纯化。

[0152] 本公开内容的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物以及通过重组技术从真核宿主(包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)或可替代地从如上所述的原核生物宿主产生的产物。许多抗体生产系统描述于Birch & Radner (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 671-685。

[0153] 如果被测试的抗体与蛋白质或多肽结合,则被测试的抗体和本公开内容提供的抗体是等效的。还可以通过确定被测试的抗体是否阻止本文公开的抗体结合与该抗体正常反应的蛋白质或多肽,而无需过多实验就可以确定抗体是否具有与本文公开的抗体相同的特异性。如果所测试的抗体与本文公开的抗体竞争,如本文公开的单克隆抗体的结合减少所显示,则这两种抗体很可能与相同或密切相关的表位结合。或者,可以将本文公开的抗体与通常与之反应的蛋白质预孵育,并确定所测试的抗体结合抗原的能力是否受到抑制。如果所测试的抗体被抑制,则极有可能具有与本文公开的抗体相同或密切相关的表位特异性。

[0154] 术语“抗体”还意图包括所有免疫球蛋白同种型和亚类的抗体。单克隆抗体的特定同种型可以通过从初始融合中选择直接制备,或者通过使用sib选择技术来使用Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653 or Spira et al. (1984) J. Immunol. Methods 74:307中描述的方法分离类别转换变体,以从分泌不同同种型单克隆抗体的亲本杂交瘤中进行间接制备。或者,可以使用重组DNA技术。

[0155] 具有本文所述单克隆抗体特异性的其他单克隆抗体的分离也可以由本领域普通技术人员通过产生抗独特型抗体来完成。Herlyn et al. (1986) Science 232:100。抗独

特型抗体是识别存在于感兴趣的单克隆抗体上的独特决定簇的抗体。

[0156] 在本文公开的一些方面,对抗体进行可检测或治疗性标记是有用的。合适的标签如上所述。偶联针对这些试剂的抗体的方法是本领域已知的。仅出于举例说明的目的,可以用可检测的部分(例如放射性原子、发色团、荧光团)等标记抗体。这样的标记抗体可以用于体内或分离的测试样品中的诊断技术。

[0157] 抗体与低分子量半抗原的偶联可以增加测定中抗体的敏感性。然后可以通过第二反应特异性地检测半抗原。例如,通常使用半抗原,例如生物素(其可与抗生物素蛋白反应)或二硝基苯酚、吡哆醛和荧光素(其可与特定的抗半抗原抗体反应)。参见上文的Harlow和Lane(1988)。

[0158] 本发明的抗体的可变区可以通过突变VH和/或VL CDR 1、CDR 2和/或CDR 3区域内的氨基酸残基来修饰以改善抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以通过定点诱变或PCR介导的诱变引入突变,并且可以在适当的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他目的功能特性的影响。在某些实施方案中,引入保守修饰并且通常改变CDR区内不超过1、2、3、4或5个残基。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。

[0159] 可以对抗体进行框架修饰以降低免疫原性,例如,通过将个或多个框架残基“突变回”相应的种系序列。

[0160] 另外,本文公开的抗体可以被工程化以包括Fc区内的修饰,以改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半定量、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此类修饰包括但不限于铰链区中半胱氨酸残基的数目的改变,以促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性(美国专利号5,677,425),或者Fc铰链区中的氨基酸突变以降低抗体的生物学半衰期(美国专利号6,165,745)。

[0161] 另外,本文公开的抗体可以被化学修饰。可以例如通过修饰抗体序列内一个或多个糖基化位点以增加抗体对抗原的亲和力来改变抗体的糖基化(美国专利号5,714,350和6,350,861)。或者,为了增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,可以通过在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来获得具有减少的岩藻糖基残基量的次岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。(Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180)。

[0162] 本文公开的抗体可以被聚乙二醇化以增加生物学半衰期,其通过在一个或多个PEG基团变得连接至抗体或抗体片段的条件下使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)或PEG的反应性酯或醛衍生物反应。可以通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行抗体聚乙二醇化。如本文所用,术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。待聚乙二醇化的抗体可以是无糖基化的抗体。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且可以应用于本文公开的抗体(EP 0154316和EP 0401384)。

[0163] 另外,可以通过将抗体的抗原结合区与血清蛋白(例如人血清白蛋白)缀合或融合来化学修饰抗体,以增加所得分子的半衰期。例如在EP 0322094和EP 0486525中描述了这种方法。

[0164] 本公开的抗体或其片段可以与诊断剂缀合并可以诊断地用于例如监测疾病的发展或进程并确定给定治疗方案的功效。诊断剂的实例包括酶、辅基、荧光材料、发光材料、

生物发光材料、放射性材料、使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属、以及非放射性顺磁性金属离子。可以使用本领域已知的技术,将可检测物质直接偶联或偶联至抗体或其片段,或通过接头间接偶联或偶联。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶。合适的修复基团复合物的例子包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。合适的荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。发光材料的实例包括鲁米诺。生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白。合适的放射性物质的例子包括  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、铟111、镓171、铋212、铋213、碲211、铜62、铜64、铜67、钇90、碘125、碘131、磷32、磷33、钷47、银111、镓67、镓142、钷153、铯161、镱166、钷166、铈186、铈188、铈189、铅212、镭223、锕225、铁59、硒75、砷77、铈89、钷99、铈1105、钷109、镓143、铈149、钷169、铈194、金198、金199和铅211。通过使用与抗体共价连接的双功能螯合剂,可以将单克隆抗体与放射性金属离子间接偶联。螯合剂可通过友好性结合 (Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142: 68-78)、氨基酸残基的巯基 (Koyama (1994) Chem. Abstr. 120:217-262) 和碳水化合物基团 (Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83:2632-2636; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:559-570) 来连接。

[0165] 此外,本发明的抗体或其片段可以与治疗剂缀合。合适的治疗剂包括:紫杉醇,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,依米丁,丝裂霉素,依托泊苷,替诺泊苷,长春新碱,长春碱,秋水仙碱,阿霉素,柔红霉素,二羟基蒽醌二酮,米托蒽醌,光神霉素(mithramycin),放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔和嘌呤霉素,抗代谢药(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨),烷化剂(例如氮芥、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其他铂衍生物(例如卡铂)),抗生素(例如放线菌素、博来霉素、柔红霉素(旧称道诺霉素)、阿霉素、伊达比星、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、氨基霉素(AMC)),白喉毒素和相关分子(例如白喉A链及其活性片段和杂种分子),蓖麻毒蛋白毒素(例如蓖麻毒蛋白A或去糖基化的蓖麻毒蛋白A链毒素),霍乱毒素,志贺样毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV),LT毒素,C3毒素,志贺毒素,百日咳毒素,破伤风毒素,大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂,假单胞菌外毒素,芦荟素,皂苷,蒴莲根毒素(modeccin), gelatin,相思豆毒素A链,蒴莲根毒素A链, $\alpha$ -八叠球菌素(sarcin),Aleurites fordii蛋白,香石竹毒素(dianthin)蛋白,美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S),苦瓜抑制因子,泻果素(curcun),巴豆素(crotin),石碱花(sapaonaria officinalis)抑制因子,白树毒素(gelonin),米托格林(mitogellin),restrietocin,酚霉素(phenomycin),伊诺霉素毒素和混合毒素。

[0166] 其他合适的共轭分子包括核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、反义核酸、抑制性RNA分子(例如siRNA分子)、免疫刺激性核酸、适体、核酶、三链体形成分子和外部指导序列。适体是长度为15-50个碱基的小核酸,其折叠成限定的二级和三级结构,例如茎环或G四联体,并且可以结合小分子(例如ATP(美国专利号5,631,146)和茶碱(美国专利号5,580,737))以及大分子(例如逆转录酶(美国专利号5,786,462)和凝血酶(美国专利号5,543,293))。核酶是能够在分子内或分子间催化化学反应的核酸分子。核酶通常通过靶底物的识别和结合以及随

后的切割来切割核酸底物。具有三链体形成功能的核酸分子可以通过形成三链体与双链或单链核酸相互作用,其中三链DNA形成依赖于Watson-Crick和Hoogsteen碱基配对的复合物。三链体分子可以高亲和力和特异性结合靶区域。

[0167] 功能性核酸分子可以充当靶分子具有的特定活性的效应子、抑制剂、调节剂和刺激剂,或者功能性核酸分子可以具有独立于任何其他分子的de novo 活性。

[0168] 治疗剂可以使用多种可用方法中的任何一种直接或间接地与抗体连接。例如,通过二硫键形成、使用交联剂(例如N-琥珀酰3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP))、或通过抗体的Fc区中的糖部分,将试剂附着在还原抗体成分的铰链区。(Yu et al. 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995))。

[0169] 将治疗剂与抗体缀合的技术是众所周知的(Amon et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy; Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.); Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 以及 Thorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," (1982) Immunol. Rev. 62:119-58)。

[0170] 本文公开的抗体或其抗原结合区可与另一种功能分子(例如另一种抗体或受体的配体)连接,以产生与至少两种或更多种不同结合位点或目标分子结合的双特异性或多特异性分子。抗体与一个或多个其他结合分子(例如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物)的连接可以例如通过化学偶联、遗传融合或非共价结合来完成。除了第一和第二靶表位之外,多特异性分子还可包括第三结合特异性。

[0171] 可以使用本领域已知的方法制备双特异性和多特异性分子。例如,高特异性分子的每个结合单元可以分开产生,然后彼此缀合。当结合分子是蛋白质或肽时,多种偶联剂或交联剂可用于共价结合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基小苯甲酸)(DTNB)、邻苯二甲酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。当结合分子是抗体

时,它们可以通过两条重链的C末端铰链区的巯基键结合。

[0172] 本公开的抗体或其片段可以与对结合有抗体的细胞有毒的部分连接以形成“耗竭”抗体。这些抗体在需要消耗NK细胞的应用中特别有用。

[0173] 本文公开的抗体也可以附着于固体支持物,其对于免疫测定或靶抗原的纯化特别有用。这样的固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0174] 抗体也可以与许多不同的载体结合。因此,本发明还提供了包含抗体和另一种活性或惰性物质的组合物。众所周知的载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁。为了本文公开的目的,载体的性质可以是可溶的或不溶的。本领域技术人员将知道用于结合单克隆抗体的其他合适的载体,或者将能够使用常规实验确定这种载体。

[0175] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是全长抗体。

[0176] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是单克隆抗体。

[0177] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是嵌合的或人源化的。

[0178] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体选自Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fab'、scF<sub>v</sub>和F<sub>v</sub>。

[0179] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体包含Fc结构域。在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是非人类动物(例如大鼠、绵羊、牛、犬、猫或兔)抗体。在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是人或人源化抗体或在人中是非免疫原性的。

[0180] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体包含人抗体框架区。

[0181] 在其他方面,本文提供的抗体的CDR中的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸取代。就相同氨基酸家族内的取代而言,该取代可以是“保守的”。天然存在的氨基酸可分为以下四个家族,并且在这些家族中将进行保守取代。

[0182] 1) 具有碱性侧链的氨基酸:赖氨酸,精氨酸,组氨酸。

[0183] 2) 具有酸性侧链的氨基酸:天冬氨酸,谷氨酸。

[0184] 3) 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸:天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸。

[0185] 4) 具有非极性侧链的氨基酸:甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸,色氨酸,半胱氨酸。

[0186] 在另一方面,一个或多个氨基酸残基被添加至抗体的一个或多个CDR或从抗体的一个或多个CDR中缺失。这样的添加或缺失发生在CDR的N或C末端或CDR内的位置。

[0187] 通过通过氨基酸的添加、缺失或取代来改变抗体的CDR的氨基酸序列,可以获得各种效果,例如对靶抗原的增加的结合亲和力。

[0188] 多核苷酸、载体和宿主细胞

本发明还提供了编码一种或多种上述鉴定的多肽或抗体及其各自的互补链的分离或重组多核苷酸。还提供了包含分离的或重组的多核苷酸的载体,其实例是本领域已知的并且在本文中进行了简要描述。在一个以上的分离的或重组的多核苷酸将被表达为单个单元的一方面,分离的或重组的多核苷酸可以包含在多顺反子载体内。多核苷酸可以是DNA、RNA、mRNA或干扰RNA,例如siRNA、miRNA或dsRNA。

[0189] 本发明进一步提供了与RNA转录的启动子以及用于DNA和/或DNA的复制和/或瞬时

或稳定表达的其他调控序列可操作地连接的分离的或重组的多核苷酸。如本文所用,术语“可操作地连接”是指以这样的方式定位:启动子将会指导RNA从DNA分子转录。这种启动子的例子是SP6、T4和T7。在某些实施方案中,细胞特异性启动子用于插入的多核苷酸的细胞特异性表达。含有启动子或启动子/增强子、带有终止密码子和选择标记序列、以及可将插入的DNA片段可操作地连接到该启动子的克隆位点的载体是本领域已知的并且可商购。对于一般方法和克隆策略,请参见Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) 及其中引用的参考文献和Vectors: Essential Data Series (Gacsa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), 其中包含图谱、功能特性、商业供应商以及对各种合适载体的GenEMBL登录号的参考。

[0190] 在一个实施方案中,衍生自本发明的多核苷酸的多核苷酸编码具有如本文所述的诊断和治疗效用的多肽、蛋白质、抗体或其片段,以及鉴定可能存在或可能不存在的蛋白质转录物的探针。这些核酸片段可以例如通过较大的多核苷酸的限制酶消化来制备,然后用可检测的标记物标记。或者,可以使用分子的切口翻译来产生随机片段。有关制备和标记此类片段的方法,请参见Sambrook, et al. (1989) (同上)。

[0191] 包含这些核酸的表达载体可用于获得宿主载体系统以产生蛋白质和多肽。暗示这些表达载体作为附加体或作为染色体DNA的组成部分在宿主生物中必须是可复制的。合适的表达载体的非限制性实例包括质粒、酵母载体、病毒载体和脂质体。腺病毒载体因其在体外和体内的高水平表达和有效转化细胞而特别适用于在体内将基因引入组织。当将核酸插入合适的宿主细胞(例如原核或真核细胞)中并且宿主细胞复制时,可以重组产生蛋白质。合适的宿主细胞将取决于载体,并且可以包括原核和真核细胞,例如哺乳动物细胞、动物细胞、人细胞、猿猴细胞、昆虫细胞、酵母细胞和使用已知方法构建的细菌细胞。参见Sambrook, et al. (1989), 同上。除了使用病毒载体将外源核酸插入细胞外,还可以通过本领域已知的方法将核酸插入宿主细胞,例如:转化细菌细胞;使用磷酸钙沉淀转染哺乳动物细胞;或DEAE葡聚糖;电穿孔;或显微注射。参见,Sambrook et al. (1989) (同上) 其中描述的方法。因此,本发明还提供了宿主细胞,例如哺乳动物细胞、动物细胞(大鼠或小鼠),人类细胞、或原核细胞(例如细菌细胞),其包含编码蛋白质或多肽或抗体或其片段的多核苷酸。

[0192] 多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则可以在多核苷酸组装之前或之后赋予核苷酸结构修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分打断。多核苷酸可在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。该术语还指双链和单链分子。除非另有说明或要求,否则本文公开的为多核苷酸的任何实施方案既包括双链形式,也包括已知或预测组成双链形式的两个互补单链形式的每一个。

[0193] 当载体用于体内或离体的基因治疗时,药学上可接受的载体是优选的,例如无复制能力的逆转录病毒或腺病毒载体。包含本发明的核酸的药学上可接受的载体可以被进一步修饰以瞬时或稳定表达所插入的多核苷酸。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括但不限于具有选择性靶向核酸并将核酸引入分裂细胞的能力的载体或递送载体。这种载体的一个例子是“复制能力不强”的载体,其定义为无法产生病毒蛋白,从而阻止了该载体在感染宿主细胞中的传播。复制能力不强的逆转录病毒载体的实例是LNL6 (Miller et al. (1989) BioTechniques7:980-990)。已经建立了使用复制能力不强的逆转录病毒进行

逆转录病毒介导的基因标记基因转移的方法。(Bordignon (1989) PNAS USA 86:8912-8952; Culver (1991) PNASUSA88:3155; 以及Rill (1991) Blood79 (10):2694-2700)。

[0194] 本发明还提供了包含和/或表达本发明的多核苷酸的经遗传修饰的细胞。可以通过插入上游调控序列(例如启动子或基因激活剂)来产生经遗传修饰的细胞(参见,美国专利号5,733,761)。

[0195] 可将多核苷酸缀合至可检测的标记,例如酶标记或放射性同位素,以检测核酸和/或基因在细胞中的表达。多种合适的可检测标记是本领域已知的,包括能够给出可检测信号的荧光、放射性、酶促或其他配体,例如抗生物素蛋白/生物素。一方面,人们可能希望使用荧光标记或酶标记,例如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶,以代替放射性或其他对环境不利的试剂。在酶标签的情况下,可以使用量热指示剂底物来提供人眼可见或分光光度法的手段,以鉴定与含有互补核酸的样品的特异性杂交。因此,本发明进一步提供了用于检测单链多核苷酸或其互补序列的方法,该方法通过在允许互补单链多核苷酸杂交的条件下(优选中等严格杂交条件),或更优选在高度严格杂交条件下,使靶标单链多核苷酸与作为本发明的多核苷酸的一部分的经标记的单链多核苷酸(探针)接触。杂交的多核苷酸对与未杂交的单链多核苷酸分离。使用本领域技术人员已知的方法检测杂交的多核苷酸对,例如在 Sambrook et al. (1989) (同上)中描述的方法。

[0196] 本发明中体现的多核苷酸可以使用化学合成、重组克隆方法、PCR、或其任何组合获得。化学多核苷酸合成的方法在本领域中是已知的,并且在此不需要详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列数据以通过采用DNA合成仪或从商业服务处获得所需的多核苷酸。

[0197] 本公开的多核苷酸可以使用PCR分离或复制。PCR技术是美国专利号4,683,195、4,800,159、4,754,065和4,683,202的主题,并且描述于PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al. eds., Birkhauser Press, Boston (1994))或MacPherson et al. (1991) and (1995),以及其中引用的参考文献。或者,本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业DNA合成仪来复制DNA。因此,本发明还提供了用于获得本发明的多核苷酸的方法,该方法提供多核苷酸的线性序列、核苷酸、合适的引物分子、化学物质(例如酶)及其复制说明,并且以适当的方向化学复制或连接核苷酸以获得多核苷酸。在一个单独的实施方案中,进一步分离这些多核苷酸。更进一步,本领域技术人员可以将多核苷酸插入合适的复制载体中,并将载体插入合适的宿主细胞(原核或真核)中以进行复制和扩增。可以通过本领域技术人员已知的方法从细胞分离如此扩增的DNA。本文进一步提供了通过该方法获得多核苷酸的方法以及如此获得的多核苷酸。

[0198] 可以通过首先将DNA多核苷酸插入合适的宿主细胞中获得RNA。可以通过任何适当的方法,例如通过使用适当的基因递送载体(例如脂质体、质粒或载体)或通过电穿孔来递送DNA。当细胞复制并且DNA被转录成RNA时;然后可以使用本领域技术人员已知的方法分离RNA,例如如Sambrook et al. (1989) (同上)所述。例如,可以根据Sambrook et al. (1989) (同上)所述方法使用各种裂解酶或化学溶液分离mRNA,或按照制造商提供的随附说明通过核酸结合树脂提取。

[0199] 与本发明的多核苷酸表现出序列互补性或同源性的多核苷酸可用作杂交探针或作为本文鉴定的特定多核苷酸的等效物。由于转录物的完整编码序列是已知的,因此该序

列或同源序列的任何部分都可以用于本发明的方法中。

[0200] 本领域已知特异性杂交不需要“完全匹配”的探针。通过少量碱基的取代、缺失或插入实现的探针序列的微小变化不影响杂交特异性。通常，可以容忍多达20%的碱基对不匹配(最佳对齐时)。优选地，用于检测上述mRNA的探针与同源区域至少约80%相同。更优选地，在同源区域比对后，探针与相应的基因序列具有85%的同一性；甚至更优选地，其表现出90%的同一性。

[0201] 这些探针可以用于放射分析(例如Southern和Northern印迹分析)中，以检测、预后、诊断或监测各种细胞或包含这些细胞的组织。探针还可以连接到固体支持物或阵列(例如芯片)上，以用于高通量筛选测定中，以检测对应于本发明的多核苷酸的基因的表达。因此，本发明还提供了探针，其包含或对应于本发明的多核苷酸或其等效物或其互补序列或其片段，其连接至固体支持物以用于高通量筛选。

[0202] 片段的总大小以及互补片段的大小将取决于特定核酸片段的预期用途或应用。较小的片段通常可用于杂交实施方案，其中互补区的长度可以变化，例如根据希望检测的互补序列为至少5至10至约100个核苷酸，或甚至全长。

[0203] 通常优选具有在长度上大于5至10个核苷酸的延伸序列上的互补序列的核苷酸探针，以增加杂交体的稳定性和选择性，从而提高获得的特定杂交分子的特异性。更优选地，可以设计具有长度为10个或更多或大于50个核苷酸、或在需要时甚至更长的基因互补序列的多核苷酸。这样的片段可以通过以下方式容易地制备：例如通过化学方法直接合成该片段，通过应用核酸复制技术，例如如美国专利4,603,102中所述具有两个引物寡核苷酸的PCR技术，或者通过将选择的序列引入到重组载体中用于重组生产。一方面，探针的长度为约50-75个或更多个核苷酸，替代地50-100个核苷酸。

[0204] 本发明的多核苷酸可以用作用于检测在本文所述的细胞中表达的基因或基因转录物的引物。在本文中，扩增是指采用能够以合理的保真度复制靶序列的引物依赖性聚合酶的任何方法。扩增可以通过天然或重组DNA聚合酶来进行，例如T7 DNA聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶的Klenow片段、以及逆转录酶。仅出于说明目的，引物的长度与为探针鉴定的长度相同。

[0205] 一种扩增多核苷酸的方法是PCR，并且用于PCR扩增的试剂盒是可商购的。扩增后，可以通过本领域已知的任何适当方法来检测所得的DNA片段，例如通过琼脂糖凝胶电泳，然后用溴化乙锭染色和紫外线照射进行显像。

[0206] 已经开发了向细胞施用有效量的基因递送载体或运载体的方法，并且是本领域技术人员已知的，并且在本文中进行了描述。检测细胞中基因表达的方法是本领域已知的，并且包括诸如与DNA微阵列杂交、原位杂交、PCR、RNase保护测定和Northern印迹分析的技术。此类方法可用于检测和定量基因在细胞中的表达。或者，可以通过多种方法检测编码的多肽的表达。特别地，制备与靶多肽特异性反应的多克隆或单克隆抗体是有用的。此类抗体可用于使用免疫组织学、ELISA和Western印迹等技术可视化表达多肽的细胞。这些技术可用于确定表达的多核苷酸的表达水平。

[0207] 在一方面，包含HMG-box结构域的多肽包括野生型和重组产生的来自原核和真核宿主细胞的多肽和蛋白质。

[0208] 蛋白质和多肽可通过本领域技术人员已知的许多方法获得，包括纯化、化学合成

和重组方法。可以通过诸如用抗体免疫沉淀之类的方法以及诸如凝胶过滤、离子交换、反相和亲和层析之类的标准技术从诸如宿主细胞系统之类的制品中分离多肽。对于这种方法，请参见例如Deutscher et al. (1999) Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology (Vol. 182, Academic Press)。因此，本发明还提供了获得这些多肽的方法以及通过这些方法可获得和获得的产物。

[0209] 多肽还可以使用可商购的自动肽合成仪通过化学合成获得，所述肽合成仪例如由Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430A或431A, Foster City, Calif., USA.生产的。合成的多肽可以例如通过高效液相色谱法(HPLC)沉淀并进一步纯化。因此，本发明还提供了一种化学合成本发明蛋白质的方法，其方法是提供蛋白质和试剂(例如氨基酸和酶)的序列，并以正确的方向和线性序列将氨基酸连接在一起。

[0210] 替代地，可以通过例如在Sambrook et al. (1989) (同上)中描述的众所周知的重组方法，使用本文所述的宿主细胞和载体系统，获得蛋白质和多肽。

[0211] 本发明的多肽还可以与各种固相载体(例如植入物、支架、糊剂、凝胶、牙科植入物、或医学植入物)或液相载体(例如珠、无菌或水溶液、药学上可接受的载体、药学上可接受的聚合物、脂质体、胶束、悬浮液和乳液)组合。非水溶剂的实例包括丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。当用于在体内制备抗体或诱导免疫应答时，载体还可以包括可用于非特异性地增强特异性免疫应答的佐剂。技术人员可以容易地确定是否需要佐剂并选择一种。然而，仅出于说明的目的，合适的佐剂包括但不限于弗氏完全和不完全溶液矿物盐和多核苷酸。其他合适的佐剂包括单磷酸基脂质A(MPL)、大肠杆菌的热不稳定肠毒素的突变体衍生物、霍乱毒素的突变体衍生物、CPG寡核苷酸和衍生自角鲨烯的佐剂。

#### [0212] 组合物

本发明还提供了一种药物组合物，其包含单独存在或彼此组合或与其他试剂(例如抗生素和可接受的载体或固体支持物)组合的本发明的任何多肽、类似物、突变蛋白、或片段，或基本上由其组成，或由其组成。这些组合物可用于本文所述的各种诊断和治疗方法。

[0213] 所述试剂可以与载体(例如药学上可接受的载体)组合，并且配制用于局部或全身递送，例如通过吸入或直接注射。

#### [0214] 使用方法

在一个方面，本发明提供了抑制或破坏生物膜的方法，该方法包括使生物膜与切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂接触。接触是体外或体内的。一方面，该试剂是HJ特异性核酸内切酶，例如RuvABC或RusA。一方面，生物膜由尿路致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*) (UPEC)、不可分型流感嗜血杆菌(NTHI)、或表皮葡萄球菌中的一种或多种形成。

[0215] 还提供了一种在有需要的对象中抑制或破坏生物膜或治疗与生物膜感染有关的疾病或病症的方法，该方法包括向该对象施用有效量的切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂。一方面，所述试剂是HJ特异性核酸内切酶，例如RuvABC或RusA。

[0216] 对象可以是哺乳动物，例如人类患者或儿科人类患者。施用可以是局部或全身的。

[0217] 在一方面，该疾病或病症是由以下引起的感染：UPEC、NTHI、或表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria*

*meningitidis*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)或类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、上、中和下气道(耳炎、鼻窦炎、支气管炎、以及慢性阻塞性肺病(COPD)的加重)、慢性咳嗽、囊性纤维化(CF)或社区获得性肺炎(CAP)的并发症和/或主要病因。

[0218] 在一方面,所述疾病或病症是囊性纤维化,并且所述施用是通过吸入疗法或局部进行的。在另一方面,在不进行DNA酶治疗的情况下进行试剂的施用或接触。一方面,从治疗中排除的DNA酶治疗包括催化DNA主链中磷酸二酯键裂解的酶。已知不仅靶向十字形结构而且靶向DNA的各种二级结构的DNA酶的三个非限制性实例包括DNase I、T4 EndoVII和T7 EndoI。一方面,被排除在疗法之外的DNA酶治疗包括Pulmozyme® (dornase alpha; Genentech, Inc.),或基本上由其组成,或由其组成。

[0219] 在另一方面,将另外的试剂(例如抗微生物剂)体外接触或施用于对象。施用可以是同时的或按顺序的。

[0220] 因此,适用于本文公开的方法的施用途径包括鼻内、肌内、气管内、皮下、真皮内、局部施用、静脉内、直肠、鼻、口服和其他肠内和肠胃外施用途径。如果需要,可以组合给药途径,或者根据药剂和/或期望的效果进行调整。活性剂可以单剂量或多剂量施用。这些方法和适合于递送的途径的实施方案包括全身性或局部性途径。通常,适用于本文公开的方法的给药途径包括但不限于肠内、肠胃外或吸入途径。

[0221] 除吸入给药以外的肠胃外给药途径包括但不限于局部、透皮、皮下、肌内、眶内、包膜内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径,即除通过消化道以外的任何给药途径。可以进行肠胃外给药以实现抑制剂的全身或局部递送。在需要全身递送的情况下,给药通常涉及药物制剂的侵入性或全身吸收的局部或粘膜给药。

[0222] 本文公开的药剂也可以通过肠内给药递送给对象。肠内给药途径包括但不限于口服和直肠给药(例如使用栓剂)。

[0223] 通过皮肤或粘膜施用活性物质的方法包括但不限于合适药物制剂的局部施用、经皮传输、透皮传输、注射和表皮施用。对于透皮传输,吸收促进剂或离子电渗疗法是合适的方法。离子电渗疗法可以使用可商购的“贴剂”来实现,该贴剂通过电脉冲连续不断地将其产品连续几天或几天以上地递送。

[0224] 在本文公开的方法的各种实施方案中,通过吸入、注射或口服连续地以天为基础每天至少一次(QD)(在各种实施方案中每天两次(BID)、三次(TID)、甚至四次)施用试剂。通常,治疗有效日剂量可以为至少约1 mg、或至少约10 mg、或至少约100 mg、或约200至约500 mg,有时取决于化合物,高达约1 g至约2.5 g。

[0225] 可以根据本文公开的方法,使用胶囊、片剂、口服混悬剂、用于肌内注射的混悬剂、用于静脉内输注的混悬剂、用于局部施用的软膏或乳膏、或用于关节内注射的混悬剂来完成给药。

[0226] 本文所述的组合物的剂量、毒性和治疗功效可以通过细胞培养或实验动物中的标

准药学方法来确定,例如,以确定LD50(致死人群的50%的剂量)和ED50(在50%的人群中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,可以表示为LD50/ED50之比。在某些实施方案中,组合物表现出高治疗指数。尽管可以使用表现出毒副作用的化合物,但应注意设计一种将这类化合物靶向受影响组织部位的递送系统,以最大程度地减少对未感染细胞的潜在损害,从而减少副作用。

[0227] 从细胞培养测定法和动物研究中获得的数据可用于配制用于人类的剂量范围。在某些实施方案中,此类化合物的剂量在循环浓度范围内,其包括几乎没有毒性或无毒性的ED50。取决于所用剂型和所用给药途径,剂量可以在此范围内变化。对于在该方法中使用的任何化合物,可以从细胞培养测定中初步估算出治疗有效剂量。可以在动物模型中制定剂量,以达到包括在细胞培养物中确定的IC50(即,达到症状最大抑制一半的试验化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。这些信息可用于更准确地确定对人体有用的剂量。血浆水平可通过例如高效液相色谱法进行测量。

[0228] 在一些实施方案中,足以实现治疗或预防作用的组合物的有效量为每次施用每千克体重约0.000001 mg至每次施用每千克体重约10,000 mg。合适地,剂量范围是从每次施用每公斤体重约0.0001 mg到每次施用每公斤体重约100 mg。可以以初始剂量提供给药,然后以一个或多个“加强”剂量提供。初始剂量后一天、两天、三天、一周、两周、三周、一、二、三、六或十二个月可以提供加强剂量。在一些实施方案中,在评估对象对先前施用的反应之后施用加强剂量。

[0229] 本领域技术人员将理解,某些因素可影响有效治疗对象所需的剂量和时机,包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、患者的总体健康和/或年龄、以及其他疾病。此外,用治疗有效量的本文所述的治疗组合物治疗对象可以包括单一治疗或一系列治疗。在一方面,术语“治疗”不包括预防。

[0230] 本发明的组合物和相关方法可以与其他疗法的施用组合使用,或者在不存在此类疗法的情况下使用。这些包括但不限于DNase酶、抗生素、抗微生物剂或其他抗体的施用。一方面,该多肽与DNase酶一起施用以治疗微生物感染和与囊性纤维化有关的生物膜。

[0231] 在一些实施方案中,所述方法和组合物包括与本发明的组合物协同作用的脱氧核糖核酸酶(DNase)酶,例如DNA酶。DNA酶是任何催化DNA骨架中磷酸二酯键断裂的酶。已知不仅靶向十字形结构而且靶向DNA的多种二级结构的DNA酶的三个非限制性实例包括DNase I、T4 EndoVII和T7 EndoI。在某些实施方案中,当与DNA酶组合使用时,降低了破坏生物膜稳定性所需的抗DNABII抗体的有效量。当在体外给药时,可以将DNA酶直接添加到测定中或在已知会稳定酶的合适缓冲液中。DNA酶的有效单位剂量和测定条件可以变化,并且可以根据本领域已知的方法进行优化。

[0232] 在其他实施方案中,所述方法和组合物可以与抗生素和/或抗微生物剂组合。抗菌剂是杀死或抑制微生物(例如细菌、真菌或原生动物)生长的物质。尽管生物膜通常对抗生素的作用具有抗性,但是本文所述的组合物和方法可用于使涉及生物膜的感染对用于治疗感染的传统治疗方法敏感。在其他实施方案中,将抗生素或抗微生物剂与本文所述的方法和组合物结合使用可减少抗微生物和/或生物膜还原剂的有效量。与本发明的方法组合使用的抗微生物剂和抗生素的一些非限制性实例包括米诺环素、阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸盐、头孢地尼、阿奇霉素和磺胺甲恶唑-甲氧苄啶。可以通过传统方法容易地确定抗微生

物剂和/或抗生素与生物膜还原剂的治疗有效剂量。在一些实施方案中,抗微生物剂与生物膜减少剂组合的剂量是平均有效剂量,该平均有效剂量已被证明对其他细菌感染是有效的,例如其中感染的病因学不包括生物膜的细菌感染。在其他实施方案中,剂量是平均有效剂量的0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0或5倍。可以在添加抗DNABII抗体之前、同时或之后添加抗生素或抗微生物剂。

[0233] 在其他实施方案中,所述方法和组合物可以与治疗细菌感染的抗体组合。与本文所述的方法和组合物结合使用的抗体的一个实例是针对不相关的外膜蛋白(即OMP P5)的抗体。单独使用该抗体进行治疗不会在体外使生物膜减薄。与该抗体和生物膜还原剂的联合治疗所产生的效果要大于单独使用相同浓度的任何一种试剂所能达到的效果。当与生物膜还原剂或减少生物膜的方法结合使用时可能产生协同作用的其他抗体包括抗rsPilA、抗OMP26、抗OMP P2和抗全OMP制剂。

[0234] 本文所述的组合物和方法可用于使涉及生物膜的细菌感染对有效治疗无生物膜的细菌感染有效的普通治疗方式敏感,否则在治疗涉及生物膜的细菌感染方面无效。在其他实施方案中,本文描述的组合物和方法可以与有效治疗涉及生物膜的细菌感染的治疗方式组合使用,但是这种另外的疗法和生物膜减少剂或方法的组合产生协同作用,使得可以减少生物膜还原剂或其他治疗剂的有效剂量。在其他情况下,这种另外的疗法和生物膜减少剂或方法的组合产生协同作用,从而增强了治疗。可以通过治疗感染所需的更短时间来证明治疗的增强。

[0235] 可以在用于减少生物膜的方法或组合物之前、同时或之后添加额外的治疗,并且可以包含在相同的结构中或作为单独的制剂。

#### [0236] 试剂盒

还请求保护试剂盒,该试剂盒包含进行本文所述的体外和体内方法所必需的试剂和说明书。因此,本发明提供了用于执行这些方法的试剂盒,其可以包括本发明的生物试剂以及用于执行本发明的方法的说明书,例如收集组织和/或进行筛选和/或分析结果和/或施用有效量的本文定义的生物试剂。这些可以单独使用或与其他合适的抗菌剂结合使用。

[0237] 在一个实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包含如本文所述的多肽和用于分解生物膜或抑制、预防或治疗产生生物膜的微生物感染的说明书。在一个实施方案中,试剂盒进一步包含佐剂、抗原肽或抗微生物剂中的一种或多种。在又一个实施方案中,试剂盒进一步包含载体,其选自液体载体、药学上可接受的载体、固相载体、药学上可接受的载体、植入物、支架、糊剂、凝胶、牙科植入物或医疗植入物。

[0238] 还提供了一种试剂盒,其包含切割生物膜中的霍利迪连接体(HJ)结构的试剂和用于本文所述方法的说明书。

#### [0239] 实验

##### 实验1

为了掺入RuvA,申请人在存在 $\alpha$ -DNABII的情况下在16h和24h将RuvA(450 nM)添加到预先形成的生物膜中。在24小时添加HJ特异性核酸内切酶RuvC(100 nM)或RusA(350 nM)。在40小时,将生物膜用LIVE/DEAD<sup>®</sup>染色或用适当的抗体标记以进行免疫荧光,并使用共聚焦激光扫描显微镜进行分析。

[0240] 原型HJ特异性DNA结合蛋白RuvA的添加,既易于掺入生物膜基质中,又防止了由 $\alpha$ -DNABII介导的对由尿路致病性大肠杆菌、不可分型流感嗜血杆菌(NTHI)和表皮葡萄球菌形成的细菌生物膜的破坏。接下来,申请人在与RuvA结合的HJ DNA位点组装了HJ特异性核酸内切酶复合物RuvABC,这导致生物膜结构崩溃。此外,用另一种HJ特异性核酸内切酶RusA处理细菌生物膜也导致多种细菌物种的生物膜结构完全崩溃。RusA的添加还阻止了NTHI形成的生物膜中复杂的网状eDNA晶格结构的形成。为了最终确认生物膜基质中是否存在HJ DNA结构,申请人用识别HJ DNA的针对十字形DNA的单克隆抗体标记了细菌生物膜,并观察到HJ DNA在整个生物膜基质中的均匀分布。在播种时向生物膜中添加RusA还显著减少了生物膜基质内的十字形DNA。

[0241] 这些数据一起表明,细菌生物膜的eDNA晶格在结构上与HJ重组中间体有关,并且对细菌生物膜的结构完整性至关重要。

[0242] 原型HJ DNA结合蛋白RuvA弥补了UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌的生物膜结构稳定中DNABII蛋白的缺乏

申请人先前已经证明由多个单一(Jurcisek et al. (2007), 见下文; Goodman, et al. (2011) 见下文; 以及Novotny, et al. (2013), 见下文)和混合细菌物种(Gustave, et al. (2013) 见下文, Idicula, et al. (2016) et al. 见下文)形成的生物膜基质内的eDNA被组织成交织的网状结构,该结构通过DNABII蛋白得以稳定。由于细菌生物膜中eDNA的这种组织在视觉上与HJ DNA相似,因此本申请人进行了测试,以确认其与HJ重组中间体在结构上相关。为了证实这一点,申请人用大肠杆菌RuvA(细菌中的原型HJ结合蛋白)取代了由UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌形成的生物膜细胞外基质中稳定eDNA晶格结构的DNABII蛋白。将预先形成的UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌生物膜与针对大肠杆菌IHF的超免疫多克隆抗体( $\alpha$ -IHF)一起孵育,以耗尽细胞外基质中的DNABII蛋白,而RuvA与 $\alpha$ -IHF结合添加,使得其可以在功能上替代生物膜基质内的DNABII蛋白。 $\alpha$ -IHF与IHF和HU发生交叉反应(图7),因此耗尽了DNABII家族的蛋白质,这些蛋白质对于细菌生物膜基质的结构稳定性至关重要。明显的是,通过加入RuvA可以防止由 $\alpha$ -IHF介导的由包括UPEC(图1A)、NTHI(图1B)和表皮葡萄球菌(图1C)在内的多种细菌形成的生物膜的破坏。非特异性DNA结合蛋白H-NS的添加不能补偿生物膜基质内DNABII蛋白的损失,因此用作阴性对照(图1)。另外,申请人还进行了免疫荧光检查,并证实了在用 $\alpha$ -IHF处理后(图2A、2B)或在存在RuvA的情况下用 $\alpha$ -IHF处理后(图2C、2D),UPEC形成的生物膜的细胞膜外基质中DNABII蛋白的消耗,以及在生物膜基质内伴随的RuvA的掺入(图2E、2F)。通过蛋白质印迹分析确定了 $\alpha$ -IHF和 $\alpha$ -RuvA的特异性,发现它们对它们的靶蛋白具有高度特异性(图7)。申请人和其他人已经表明,RuvA以高亲和力排他地结合HJ DNA(Lloyd and Sharples 1993, Rice, Rafferty et al. 1997)。鉴于RuvA对HJ DNA的高度亲和力和特异性,该结果表明RuvA补充了DNABII蛋白的损失,并因此通过选择性结合由于 $\alpha$ -IHF耗尽DNABII蛋白而空出DNABII蛋白的HJ DNA从而稳定了eDNA结构。

[0243] 经HJ特异性核酸内切酶复合物RuvABC处理后,被RuvA稳定的细菌生物膜基质被破坏

由于RuvA容易且有效地替代了DNABII蛋白以维持由UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌形成的生物膜的结构稳定性,因此申请人假设被RuvA稳定的生物膜基质易受HJ特异性核酸内

切酶复合物RuvABC的破坏。RuvC是HJ特异性核酸内切酶,可将HJ DNA解离为有切口的线性双链DNA。显示RuvABC复合物将合成的HJ DNA切割成双链体DNA(图8)。接下来,申请人预先形成了UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌生物膜,其中如上所述用RuvA代替DNABII蛋白,然后将生物膜与RuvABC复合物孵育。令人惊讶的是,从图3可以明显看出,在UPEC(图3A)、NTHI(图3B)和表皮葡萄球菌(图3C)中,与对照生物膜(其中通过DNABII蛋白来稳定基质)(在图3中由幼稚(Naive) IgG + RuvABC表示)相比,用RuvABC复合物处理生物膜(其中基质中耗尽了DNABII蛋白并被RuvA稳定)(在图3中由 $\alpha$ -IHF IgG + RuvABC表示)引起生物膜生物量的显著减少。在不存在核酸内切酶RuvC的情况下(在图3中由幼稚IgG + RuvAB和 $\alpha$ -IHF IgG + RuvAB表示),在由UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌形成的生物膜中未观察到明显的破坏。这些数据一起表明,由UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌形成的生物膜内的eDNA晶格结构包含HJ DNA结构,该结构在细菌生物膜细胞外基质的稳定性中起着至关重要的结构作用。

[0244] 细菌生物膜在用另一种HJ特异性解离酶RusA处理后被破坏

为了进一步验证细菌生物膜细胞外基质中HJ DNA结构的存在,申请人与不同浓度的RusA(一种HJ特异性核酸内切酶)孵育了预先形成的UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌生物膜。如图4所示,通过将合成的HJ DNA切割成双链体DNA,验证了RusA的活性。与通过UPEC(图4A)、NTHI(图4B)和表皮葡萄球菌(图4C)形成的生物膜中的对照相比,用RusA处理使生物膜基质不稳定,并导致了生物膜生物量的剂量依赖性降低。RusA与HJ和Y-DNA具有很高的亲和力(Chan, Vincent et al. 1998),并且只选择性地切割HJ-DNA。考虑到RusA的切割特异性,这些数据表明RusA结合并切割了细菌生物膜细胞外基质内的HJ DNA,因此破坏了UPEC、NTHI和表皮葡萄球菌生物膜。

[0245] RusA和RuvABC靶向生物膜细胞外基质内的HJ DNA并介导了NTHI生物膜内eDNA晶格状网络的破坏

由于用HJ特异性核酸内切酶处理由多种细菌形成的生物膜破坏了生物膜,因此申请人认为这些核酸内切酶特异性地靶向生物膜细胞外基质内的HJ DNA结构以介导生物膜破坏。为了可视化eDNA的结构并评估RusA和RuvABC对eDNA晶格结构的影响,申请人在不存在或存在RusA或RuvABC的情况下,在pH 9.0下形成NTHI生物膜16小时。然后,申请人用针对双链DNA的单克隆抗体标记未固定的NTHI生物膜,以可视化eDNA。在不存在RusA的情况下eDNA被组织成复杂的网状结构(在图5中由对照表示),然而在RusA或RuvABC的存在下eDNA的晶格结构被完全消除(图5)。申请人还用抗十字形DNA(其特异性结合HJ DNA结构的肘部区域(Frappier, Price et al. 1987))的单克隆抗体标记了这些生物膜,以直接观察由NTHI形成的生物膜的细胞外基质内的霍利迪连接体(HJ)。幼稚IgG用作阴性对照(图6A)。在不存在RusA的情况下,HJ分布在整個生物膜基质中,这从绿色荧光在生物膜基质中的均匀分布可以明显看出(图6B)。在播种时向生物膜中添加RusA大大降低了观察到的绿色荧光(图6C)。此外,在存在RusA的情况下,由HJ DNA( $\alpha$ 十字形标记)与细菌(FilmTracer™)的比例确定的HJ DNA相对丰度表明,与不存在RusA的情况(图6D)相比,生物膜基质内HJ DNA的数量有统计学上的显著减少。这些数据一起证实了HJ DNA的存在和对于细菌生物膜细胞外基质的稳定性至关重要的意义。

[0246] 方法

细菌菌株

在这项研究中使用了从全国儿童医院的一名患有慢性中耳炎的儿童的鼻咽中分离出的NTHI菌株86-028NP。该菌株已被测序(Harrison, Dyer et al. 2005)和充分表征(Bakaletz, Tallan et al. 1988, Bakaletz, Leake et al. 1997, Holmes and Bakaletz 1997, Mason, et al. 2003)。UPEC菌株UTI89从患有膀胱炎患者分离(Mulvey, Schilling et al. 2001)。表皮葡萄球菌菌株#1618从患有浆液性渗出的中耳炎患者中分离。

#### [0247] 蛋白质纯化

将RuvA基因克隆到pAM159中,描述于(Sedelnikova, et al. (1997) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53(Pt 1): 122-124)。无标签重组RuvA在HiTrap DEAE-Sepharose树脂柱(GE Healthcare)上纯化,该柱在40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA中平衡。用30倍柱体积的线性梯度洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质,该洗脱缓冲液包含40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA和1M NaCl。合并含有RuvA的馏分,并在HiTrap Butyl FF树脂柱(GE Healthcare)上进一步纯化,该柱在40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA、100 mM NaCl和1M 硫酸铵中平衡。用含有Tris pH 8.5 2 mM EDTA、100 mM NaCl和0 mM - 1 M硫酸铵的洗脱缓冲液,使用逐步梯度洗脱结合的蛋白。合并含有RuvA的馏分,并在于40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA中平衡的HiTrap QFF阴离子交换柱(GE Healthcare)上进一步纯化。用30倍柱体积的线性梯度洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质,该洗脱缓冲液包含40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA和1M NaCl。如前所述(Devaraj, Buzzo et al. (2017), 见下文),在HiTrap® Heparin HP柱(GE Healthcare)上进一步纯化RuvA。如前所述(Novotny et al. (2016), 见下文),使用IMPACT试剂盒(New England Biolabs)生成无标签的重组RuvB、RuvC和RusA。使用以下寡核苷酸从UPEC菌株UTI89基因组DNA中PCR扩增这些基因中的每一个。RuvB: 5' - GCGTGCATATGATTGAAGCAGACCGTCTGAT - 3' 和5' - GCGTGGCTCTCCGCACGCCGCATTCTGGCG GCGTTA - 3'。RuvC: 5' - GCGTGCATATGGCTATTATTCTCGGCATTGA - 3' 和5' -GCGTGGCTCTT CCGCACGCACGCAGTCGCCCTCTCGC - 3'。RusA: 5' - GCGTGCATATGGTGAATACCTACAGCATCACAT TACCCTG - 3' 和5' - GCGTGGCTCTTCCGCACGCTTCATTCCCCATTTCCGGTG - 3'。如(Novotny, et al. (2016), 见下文)中所述,将PCR产物克隆到pTXB1载体中。将构建体转化到大肠杆菌表达菌株ER2566(New England Biolabs)中,并在含有100 µg氨苄青霉素/ml的LB琼脂上进行选择。如所述(Novotny, et al. (2016) *EBIoMedicine* 10:33-44),每种蛋白质均过表达并在甲壳质树脂柱上纯化。RuvB在于40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA平衡的DEAE-琼脂糖树脂柱(GE Healthcare)上进一步纯化。用30倍柱体积的线性梯度洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质,该洗脱缓冲液包含40 mM Tris pH 8.5 2 mM EDTA和1M NaCl。如前所述(Devaraj, Buzzo et al. (2017) *MicrobiologyOpen*),在HiTrap® Heparin HP柱(GE Healthcare)上进一步纯化RuvC和RusA。将蛋白质在离心过滤器(3000 MWCO)中浓缩,并在存储缓冲液(50 mM Tris pH 7.4,600 mM KCl,1 mM EDTA,10%甘油)中透析,以在-80°C下长期存储。所有蛋白质均使用AKTA纯系统(GE Healthcare)纯化。通过Pierce BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific)测定蛋白质浓度。

#### [0248] 从血清中纯化IgG

如(Devaraj, Buzzo et al. 2017)中所述,申请人用HiTrap Protein G HP柱(GE Healthcare)从针对大肠杆菌IHF (α-IHF)的兔幼稚血清或兔多克隆抗血清中纯化IgG。

[0249] 由RuvA引起的细菌生物膜结构的稳定化和由RuvABC复合物引起的破坏

将NTHI菌株86-028NP在巧克力琼脂上于37°C在含有5% CO<sub>2</sub>的潮湿气氛中培养18-20小时,然后悬浮于补充有血红素(2 μg/ml)和β-NAD(2 μg/ml)的脑心浸液(BHI) (sBHI)中至在490 nm处的OD值为0.65。将培养物在sBHI培养基中稀释(1:6),然后在37°C 5% CO<sub>2</sub>下静态孵育3小时。将培养物在sBHI培养基中稀释至含有2.5\*10<sup>5</sup> CFU/ml,并将200μl该悬浮液接种到八孔室盖玻片(Fisher Scientific)的每个孔中。将UPEC菌株UTI89在LB琼脂上于37°C在含有5% CO<sub>2</sub>的潮湿环境中培养18-20小时,然后将其悬浮在LB培养基中至在490 nm处的OD值为0.65。将培养物在LB培养基中稀释(1:12),然后在37°C 5% CO<sub>2</sub>下静态孵育2.5小时。将培养物在LB培养基中稀释至含有2.5\*10<sup>5</sup> CFU/ml,并将200μl该悬浮液接种到八孔室盖玻片的每个孔中。表皮葡萄球菌在巧克力琼脂上于37°C在含有5% CO<sub>2</sub>的潮湿气氛中培养18-20小时,然后悬浮在胰蛋白酶大豆培养基(TSB)中至在490 nm的OD为0.65。将培养物在TSB中稀释(1:6),然后在37°C 5% CO<sub>2</sub>下静态孵育3小时。将培养物在TSB中稀释至含有2.5\*10<sup>5</sup> CFU/ml,并将200μl该悬浮液接种到八孔室盖玻片的每个孔中。将每种细菌在37°C 5% CO<sub>2</sub>下孵育16小时后,将培养基替换为新鲜培养基(对照)或含有以下其中一种的新鲜培养基:幼稚IgG(150 μg/ml),α-IHF IgG(150 μg/ml),RuvA(450 nM),H-NS(450 nM),幼稚IgG + RuvA,α-IHF+ RuvA,幼稚IgG + H-NS,或α-IHF+ H-NS。在表皮葡萄球菌的情况中,则使用300 μg/ml的幼稚和α-IHF IgG。再经过8小时的温育期后,如上所述再次更换培养基,然后将带室盖玻片再温育16小时。为了评估RuvABC复合物对生物膜的破坏,在24小时时,将生物膜与RuvB(1130 nM)和RuvC(90 nM)结合幼稚IgG + RuvA或α-IHF + RuvA一起孵育16小时。在40小时时,准备生物膜进行免疫荧光检查(见下文),或用盐水(0.9%NaCl)洗涤两次,并根据制造商的说明用LIVE/DEAD®染色剂(Molecular probes, Eugene, OR)染色。如(Devaraj, Buzzo et al. 2017)中所述固定生物膜,对其进行成像和分析。在单独的几天中,所有体外生物膜测定均重复至少3次。数据表示为平均值±SEM。

[0250] 免疫荧光法检测细菌生物膜内的DNABII蛋白和RuvA

如上文“细菌生物膜结构的稳定化”部分所述,将由NTHI菌株86-028NP、UPEC菌株UTI89和表皮葡萄球菌形成的生物膜建立在8孔室盖玻片上24小时。如(Devaraj, Buzzo et al. 2017)中所述进行免疫荧光。简而言之,将未固定的40小时生物膜在磷酸盐缓冲液(PBS)中与α-IHF (1:200)或针对大肠杆菌RuvA (α-RuvA; Abcam)的抗血清(1:200)在室温下孵育1小时。将生物膜用PBS洗涤一次,然后与在PBS中与AlexaFluor® 594 (Molecular Probes)缀合的山羊抗兔IgG在室温下孵育1小时。用PBS清洗生物膜一次,然后用PBS中的DAPI(200 μg/ml)染色10分钟。将生物膜用PBS洗涤一次,然后使用x63物镜在Zeiss 510 Meta-laser扫描共聚焦显微镜(Zeiss)上成像。使用AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss)重建三维图像。

[0251] *RusA*破坏细菌生物膜

如上文“细菌生物膜结构的稳定化”部分所述,将由NTHI菌株86-028NP、UPEC菌株UTI89和表皮葡萄球菌形成的生物膜建立在8孔室盖玻片上24小时。如(Devaraj, Buzzo et al. 2017)中所述进行生物膜破坏测定。在24小时时,将生物膜与不同浓度的RusA(1-20 μg/ml)一起孵育额外的16小时。如(Devaraj, Buzzo et al. 2017)中所述对生物膜进行染色、固定、成像和分析。在单独的几天中,所有体外生物膜测定均重复至少3次。数据表示为

平均值±SEM。

[0252] *NTHI* 菌株86-028NP形成的生物膜内eDNA晶格结构和十字形DNA的可视化

在存在或不存在RusA (10 μg/ml)的条件下,在调节为pH 9.0的sBHI中形成*NTHI*菌株86-028NP生物膜16小时。在16小时时,用PBS冲洗生物膜一次,并与1:200稀释的小鼠α-dsDNA单克隆抗体 (Abcam) 孵育以标记eDNA或与1:200稀释的小鼠α-十字形DNA单克隆抗体 (Novus Biologicals) 孵育以标记十字形DNA,在室温下孵育1小时。将生物膜用PBS洗涤一次,然后与PBS中的1:200稀释的缀合至AlexaFluor® 488 (Molecular Probes) 和 FilmTracer™ FM® 4-64 (Molecular Probes) 的山羊抗小鼠IgG在室温下孵育1小时。将生物膜用PBS洗涤一次,然后使用x63物镜在Zeiss 510 Meta-laser扫描共聚焦显微镜 (Zeiss) 上成像。使用Zen 2012 (Zeiss) 重建三维图像,以可视化eDNA晶格结构,或使用AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss) 以可视化十字形DNA。如 (Devaraj, Buzzo et al. 2017) 中所述量化十字形DNA的相对丰度。

[0253] 电泳迁移率变动分析 (EMSA)

HJ DNA由以下寡核苷酸产生:

5' -GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGACCC - 3'、

5' - 6-羧基荧光素 (FAM) - TGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCTA  
TGACGTT

- 3'、5' -CAACGTCATAGACGATTACATTGCTAGGACATGCTGTCTAGAGACTATCGA - 3' 以及  
5' - ATCGATAGTCTCTAGACAGCATGTCCTAGCAAGCCAGAATTCGGCAGCGT - 3'。Y-DNA由以下寡核苷酸产生: 5' -GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGACCC - 3'、

5' FAM - TGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCTATGACGTT

- 3'。双链DNA由以下寡核苷酸产生: 5' FAM - TGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGC  
AATGTAATCGTCTATGACGTT

- 3' 以及5' - AACGTCATAGACGATTACATTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGACCCA - 3'。

[0254] 将等摩尔浓度的各个寡核苷酸混合,并加热至95℃持续10分钟,然后缓慢冷却至室温以制备HJ DNA、Y DNA和双链体DNA。使用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在200V电压下于0.5X TBE运行缓冲液中解离HJ、Y和双链DNA 2.5小时,并通过压榨和浸泡方法从凝胶中纯化(参考)。在反应缓冲液(50 mM Tris pH 7.8、60 mM KCl, 100μg/ml BSA, 200 μM EDTA)中,将RuvA(浓缩)与20 nM霍利迪连接体(HJ)DNA、双链体或Y-DNA一起在37℃下孵育30分钟。然后使用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在0.5X TBE运行缓冲液中在200伏下分离反应混合物2.5小时。解离的DNA用Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare) 成像。

[0255] 裂解测定

在37℃下在反应缓冲液(请在此填入缓冲液组分)中进行RusA和RuvABC对FAM标记的HJ DNA的切割。使用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在0.5X TBE运行缓冲液中在200伏特下分离DNA产物2.5小时。解离的DNA用Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare) 成像。

[0256] 统计评估

通过不成对的t检验(GraphPad Prism 6.0版)评估统计学显著性。 $p \leq 0.05$ 表示为\*, $p \leq 0.01$ 表示为\*\*, $p \leq 0.001$ 表示为\*\*\*。

[0257] 实验2

许多口腔细菌（例如放线共生放线杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)）与炎性疾病（例如牙周炎和种植体周围炎）的发病机理有关，所述炎性疾病破坏了牙槽骨和牙龈。缺乏有效的动物模型阻碍了对这些细菌的发病机理的研究。研究特定细菌的致病性的挑战之一是当将外源细菌引入动物口腔时难以建立生物膜。尽管已经开发出牙周炎的动物模型，但很少能从被接种动物的口腔中回收可培养细菌。建立可以评估特定细菌的致病性的有效动物模型将极大地帮助阐明其致病机制。该实施例提供了在治疗口腔疾病中测试所公开的多肽和组合物及其功效的模型。

[0258] 通过用A103 (100 μm) 喷砂和HCl蚀刻(在80°C下pH 7.8 20分钟)来修饰机器加工的钛牙科植入物的表面(1.2 × 4.5mm)。将经过机械加工和具有纳米纹理的植入物在接种了放线共生放线杆菌(Aa)的D7S临床菌株的TSB培养基中于37°C孵育1至3天。使用LIVE/DEAD® BacLight®染色后,通过SEM以及共聚焦激光扫描显微镜对植入物上的细菌生物膜进行分析。将有或没有建立Aa生物膜的植入物经粘膜放置在雌性大鼠上颌前磨牙和切牙区之间的牙槽骨中。为了检测体内放置的植入物上Aa生物膜的存在,在2天后从唾液和植入物的口腔表面收集细菌样品。可以通过培养以及PCR分析来检测Aa。植入后六周可进行植入物周围骨和粘膜组织的显微CT和组织学分析。如本文所述,测定多肽和组合物以及与表面连接以及生物膜和细菌生长。

#### [0259] 实验3

该实验提供了用于临床前测试干扰素治疗莱姆病的小鼠模型。参见Dresser et al. *Pathogens* 5(12) e1000680, Epub 2009年12月4日。莱姆病是美国最常见的蜱传播疾病。根据定义,随着人口继续从城市转移到郊区和农村地区和白尾鹿(其携带蜱种类 *Ixodes*) 越来越多地在这些地区漫游,这些流行地区正在扩大。莱姆病是由微生物伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) (一种螺旋体) 引起的。伯氏疏螺旋体通过 *Ixodes* 蜱叮咬传播,然后通过血液传播到其他组织和器官。

[0260] 在该动物模型中,通过背侧皮下和腹膜内注射,或通过静脉内注射,向C3H/HeN小鼠注射螺旋体。感染后约7天,回收血液和活检标本,以评估微生物负荷并评估组织和器官的病理状况。预期本发明的方法和组合物将开发用于减少和/或消除在攻击后形成的并被认为对疾病的发病机理和慢性性质都有贡献的所得到的伯氏疏螺旋体生物膜的治疗和预防策略。

#### [0261] 实验4

该实验提供了用于临床前测试所公开的多肽和组合物以治疗肺部疾病(例如COPD和囊性纤维化)的猪模型。参见Stoltz et al. (2010) *Science Translational Medicine* 2(29): 29ra31。囊性纤维化是一种常染色体隐性遗传疾病,归因于编码CF跨膜电导调节剂(称为CFTR)阴离子通道的基因突变。在该模型中,经过专门繁殖来携带被称为“CFTR”的基因的缺陷的猪被称为CF猪,其自然发展出CF肺部疾病的标志性特征,其中包括多种细菌形成的下呼吸道感染。可以给猪施用组合物,以通过雾化将多肽递送至这些动物的肺部,以评估疾病迹象和相关病理的改善。或者,可通过雾化将多肽递送至适当动物模型的肺部,以评估疾病迹象和相关病理的改善。

#### [0262] 实验5

申请人还提供了结核病(TB)的临床前模型。参见Ordway et al. (2010) *Anti. Agents and Chemotherapy* 54:1820。在该动物模型中,将SPF豚鼠饲养在屏障菌落中,并通过雾化喷雾进行感染,以将约20 cfu的结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)菌株Erdman K01细菌运送到它们的肺中。在攻击后第25、50、75、100、125和150天,处死动物并测定细菌负荷并恢复组织以进行组织病理学评估。与不产生经典TB症状的小鼠不同,以这种方式攻击的豚鼠会形成组织良好的肉芽肿,并伴有中央坏死,这是人类疾病的标志。此外,豚鼠与人类一样,会发展为引流性淋巴结的严重脓性肉芽肿和坏死性淋巴结炎,这是原发性病变复合物的一部分。该模型的使用将提供临床前筛查,以确认和鉴定减少和/或消除所产生的结核分枝杆菌生物膜的治疗及预防策略,已观察到在攻击后这些动物的肺部形成生物膜。据认为,其有助于该疾病的发病机理和慢性病。

#### [0263] 实验6

导管/留置装置生物膜感染的多种动物模型是已知的。参见Otto (2009) *Nature Reviews Microbiology*, 7:555。尽管通常被认为是正常的皮肤菌群,但微生物表皮葡萄球菌已成为许多人认为是关键的机会病原体,在医院感染的病原体中排名第一。首先,这种细菌导致在留置医疗器械上发生的大多数感染,这些感染在器械插入过程中被该常见的皮肤定植器污染。虽然通常不会危及生命,但与这些生物膜感染的治疗相关的困难及其发生频率使它们成为严重的公共卫生负担。有几种与导管有关的表皮葡萄球菌感染的动物模型,包括兔子、小鼠、豚鼠和大鼠,所有这些模型均用于研究发病机理的分子机制,并有助于进行预防和/或治疗。大鼠颈静脉导管已用于评估干扰粪肠球菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌生物膜形成的疗法。生物膜的减少通常通过以下三种方法进行测量:(i)对导管进行超声处理并计算CFU,(ii)切下导管的切片或简单地放在板上并刻划,或者(iii)生物膜可以用结晶紫或另一种染料染色,并进行洗脱和测量OD(作为CFU的替代指标)。

#### [0264] 等效物

除非另有定义,否则本文所用的所有的技术和科学的术语都具有如本发明的所属领域中的普通技术人员中的一个通常所理解的相同的含义。

[0265] 可以在缺少在本文没有具体公开的任何元素或限制的情况下,适当地实施本文说明性地描述的本技术。因此,例如,术语“包括”、“包含”、“含有”等应该被广泛且没有限制地理解。此外,本文采用的术语和表达已经被用作描述而非限制,在这些术语和表达的使用中,没有意图排除所示和所述特征或其部分的任何等效物,但是应该认识到,在本发明技术的范围之内各种变化都是可能的。

[0266] 因此,应该理解,这里提供的材料、方法和示例代表优选的方面,是示例性的,并且不意图限制本技术的范围。

[0267] 本文广泛地和一般地描述了本技术。落入一般性公开之内的较窄的种类和亚属分组中的每一个也都形成本公开的一部分。这包括了具有从该属中移除任何主题的附带条件或负面限制的本技术的一般性描述,无论被删除的材料是否在本文中被具体描述。

[0268] 此外,在以马库什组描述本技术的特征或方面的情况中,本领域技术人员将认识到,还借此以该马库什组中的任何单独成员或成员的亚组描述了本公开的实施方案。

[0269] 在本文中提及的所有公开文献、专利申请、专利和其他参考文献,其整体都以引用的方式明确地合并入本文中,至如同每个都单独地以引用的方式合并的相同程度。如发生

冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0270] 其他方面在所附权利要求书中提出。

[0271] 序列表

多核苷酸序列

RusA:

ATGGTGAATACCTACAGCATCACATTACCCTGGCCTCCGAGCAATAATCGCTATTACCGCCATAATCGC  
GGGCGCACGCACGTCAGCGCAGAGGGGCAGGCATACCGCGATAACGTCGCCCCGAATCATTA AAAACGCAATGCTGGA  
TATCGGCCTGGCTATGCCTGTGAAAATCCGCATTGAGTGCCACATGCCGGATCGCCGTCGCCGTGACCTGGATAATC  
TGCAAAAAGCCGCTTTTGACGCACTCACTAAAGCAGGTTTCTGGCTGGATGATGCTCAGGTCGTTGATTACCGCGTT  
GTGAAGATGCCTGTTACCAAAGGTGGGAGGCTGAACTGACCATCACCGAAATGGGGAATGAAGCGTGCATCACGGG  
AGATGCACTAGTTGCCCTACCCGAGGGCGAGTCGGTACGCATCGCCGACATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAACAGTG  
ACAACGCCATCGACCTGAAAGTCCTTGACCGGCATGGCAATCCCGTGCTCGCCGACCGGCTGTTCCACTCCGGCGAG  
CATCCGGTGTACACGGTGCCTACGGTCGAAGGTCTGCGTGTGACGGGCACCGGAACCCCGTTGTTGTGTTTGGT  
CGACGTCGCCGGGGTGCCGACCCTGCTGTGGAAGCTGATCGACGAAATCAAGCCGGGCGATTACGCGGTGATTCAAC  
GCAGCGCATTACAGCGTCGACTGTGCAGGTTTTGCCCGGGAAACCCGAATTTGCGCCACAACCTACACAGTCGGC  
GTCCCTGGACTGGTGCGTTTTCTTGAAGCACACCACCGAGACCCGGACGCCAAGCTATCGCCGACGAGCTGACCGA  
CGGGCGGTTCTACTACGCGAAAGTCGCCAGTGTACCCGACGCCGGCGTGCAGCCGGTGTATAGCCTTCGTGTCGACA  
CGGCAGACCACGCGTTTATCACGAACGGGTTTCGTCAGCCACGCTACTGGCCTCACCGGTCTGAACTCAGGCCTCACG  
ACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCGGGACAATTGGTCACATATAACGGCAAGAC  
GTATAAATGTTTGCAGCCCCACACCTCCTTGGCAGGATGGGAACCATCCAACGTTTCTGCCTGTGGCAGCTTCAAT  
GA

RuvA:

GTGATAGGCAGACTCAGAGGCATCATCATTGAAAAACAACCCCGCTGGTGTAAATTGAAGTGGGCGGC  
GTAGGCTATGAAGTCATATGCCGATGACCTGTTTTTATGAACTCCCTGAAGCGGGTCAGGAAGCGATCGTTTTTAC  
CCACTTTGTGGTGCCTGAAGACGCGCAACTGCTGTACGGTTTTAACAAATAACAAGAGCGCACATTGTTCAAAGAGT  
TGATCAAAACCAACGGCGTCGCCCGAAGTTGGCGCTGGCGATCCTCTCCGGAATGTCAGCGCAGCAGTTCGTTAAT  
GCCGTTGAGCGTGAAGAAGTGGGGGCACTGGTGAAACTGCCGGGTATTGGCAAAAAACCGCCGAACGCTTGATTGT  
TGAAATGAAAGACCGATTTAAAGTTTTGCATGGCGATCTCTTTACGCCAGCCGCCGACCTGGTACTCACGTCTCCTG  
CCAGCCCGGCGACCGACGATGCTGAACAAGAAGCGGTTGCCGCGCTGGTGGCGCTGGGCTATAAACCACAAGAAGCA  
AGCCGCATGGTGAAGCAAAATCGCTCGCCCTGACGCCAGCAGTAACTTTAATTCGCGAAGCCCTACGCGCCGCGTT  
ATGA

RuvB:

ATGATTGAAGCAGACCGTCTGATTTCTGCCGGTACCACTTTGCCGGAAGATGTAGCAGATCGCGCCATT  
CGCCCCAAATTACTGGAAGAGTATGTTGGTCAGCCGAGGTTTCGTTACAGATGGAGATTTTCATCAAAGCAGCGAA  
ACTGCGCGGCGATGCCCTCGATCATTTGTTGATTTTTGGTCCCGGGTTGGGTA AA ACTACGCTTGCCAACATTG  
TCGCCAATGAAATGGGCGTTAATTTACGCACGACTTCTGGTCCGGTGTGAAAAGGCGGGCGATTTGGCTGCGATG  
CTACTAACCTTGAACCGCATGACGTGCTGTTTATTGATGAGATCCACCGTCTATCGCCAGTTGTTGAAGAAGTGT  
GTACCCGGCAATGGAAGACTACCAACTGGATATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCACGCTCCATTA AA ATTGATT  
TGCCGCGGTTTACCCTGATTGGTGAACCACGCGCGCAGGTTTCGCTGACATCACCGTTGCGCGACCGTTTTGGTATT

GTGCAACGTCTGGAGTTTTATCAGGTGCCGGATCTGCAATATATCGTCAGTCGCAGCGCACGCTTTATGGGGCTTGA  
GATGAGTGATGACGGCGCTGGAAGTTGCTCGTCGCGCTCGCGGTACGCCGCGCATTGCCAACCGTCTGCTGCGTC  
GAGTGCCTGATTTCCGCCAAGTGAAGCACGATGGCACCATCTCGGCAGATATCGCTGCTCAGGCGCTGGATATGTTG  
AATGTCGATGCTGAAGGTTTCGATTATATGGACCGCAAATTGTTGCTGGCGGTAATCGATAAGTTCTTTGGTGGACC  
TGTAGGTCTGGATAACCTGGCGGCAGCCATTGGCGAAGAACGTGAAACCATTGAGGATGTGCTGGAACCTTATTTGA  
TTCAGCAAGGCTTTTTGCAGCGTACACCGCTGGGCGTATGGCGACGACGCGGGCGTGAATCACTTTGGCATAACG  
CCGCCAGAAATGCCGGCGTGCATCACGGGAGATGCACTAGTTGCCCTACCCGAGGGCGAGTCGGTACGCATCGCCGA  
CATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAACAGTGACAACGCCATCGACCTGAAAGTCCTTGACCGGCATGGCAATCCCGTGC  
TCGCCGACCGGCTGTTCCACTCCGGCGAGCATCCGGTGTACACGGTGCCTACGGTGAAGGTCTGCGTGTGACGGGC  
ACCGCGAACCACCCGTTGTTGTGTTTGGTTCGACGTCGCCGGGGTGCCGACCCTGCTGTGGAAGCTGATCGACGAAAT  
CAAGCCGGGCGATTACGCGGTGATTCAACGCAGCGCATTACGCGTCGACTGTGCAGTTTTGCCCGGGAAACCCG  
AATTTGCGCCACAACCTACACAGTCGGCGTCCCTGGACTGGTGCCTTTCTTGAAGCACACCACCGAGACCCGGAC  
GCCAAGCTATCGCCGACGAGCTGACCGACGGGCGGTTCTACTACGCGAAAGTCGCCAGTGTACCGACGCGGGCGT  
GCAGCCGGTGTATAGCCTTCGTGTGACACGGCAGACCACGCGTTTATCACGAACGGGTTTCGTCAGCCACGCTACTG  
GCCTACCGGTCTGAACTCAGGCCTCACGACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCG  
GGACAATTGGTCACATATAACGGCAAGACGTATAAATGTTTGCAGCCCCACACCTCCTTGGCAGGATGGGAACCATC  
CAACGTTCTGCCTTGTGGCAGCTTCAATGA

RuvC

ATGGCTAGCGCTATTATTCTCGGCATTGATCCGGGTTGCGCGTGACCGGCTACGGCGTCATCCGCCAG  
GTAGGTAGGCAACTGTCTACCTGGGTAGCGGATGCATCCGCACCAAAGTGGATGATTTACCGTCTCGTCTGAAACT  
CATCTATGCGGGCGTGACGGAAATCATCACCCAGTTCACGCTGATTATTTGCCATTGAACAAGTCTTTATGGCAA  
AGAACGCTGACTCAGCCCTGAAACTGGGCCAGGCGCGGGCGTGGCGATTGTGGCGGCGTGAATCAGGAGTTGCCA  
GTATTTGAATACGCGGCACGTCAGGTAAAGCAAACGGTGGTAGGTATTGGCAGTGCCGAAAAAGCCAGGTGCAGCA  
TATGGTCCGCACCTTGTGAAACTGCCCGCTAATCCACAGGCGGATGCCGCCGATGCGCTGGCGATTGCTATCACCC  
ACTGCCACGTTAGTCAGAATGCGATGCAGATGAGCGAATCGCGGCTGAACCTGGCGAGAGGGCGACTGCGTGCATCA  
CGGGAGATGCACTAGTTGCCCTACCCGAGGGCGAGTCGGTACGCATCGCCGACATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAAC  
AGTGACAACGCCATCGACCTGAAAGTCCTTGACCGGCATGGCAATCCCGTGCCTCGCCGACCGGCTGTTCCACTCCGG  
CGAGCATCCGGTGTACACGGTGCCTACGGTGAAGGTCTGCGTGTGACGGGCACCGCGAACCACCCGTTGTTGTGTT  
TGGTTCGACGTCGCCGGGGTGCCGACCCTGCTGTGGAAGCTGATCGACGAAATCAAGCCGGGCGATTACGCGGTGATT  
CAACGCAGCGCATTACGCGTCGACTGTGCAGTTTTGCCCGGGAAACCCGAATTTGCGCCACAACCTACACAGT  
CGGCGTCCCTGGACTGGTGCCTTTCTTGAAGCACACCACCGAGACCCGGACGCCAAGCTATCGCCGACGAGCTGA  
CCGACGGGCGGTTCTACTACGCGAAAGTCGCCAGTGTACCGACGCGGGCGTGCAGCCGGTGTATAGCCTTCGTGTC  
GACACGGCAGACCACGCGTTTATCACGAACGGGTTTCGTCAGCCACGCTACTGGCCTACCGGTCTGAACTCAGGCCT  
CACGACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCGGGACAATTGGTCACATATAACGGCA  
AGACGTATAAATGTTTGCAGCCCCACACCTCCTTGGCAGGATGGGAACCATCCAACGTTCTGCCTTGTGGCAGCTT  
CAATGA

蛋白质序列(粗体氨基酸是相对于野生型序列的突变)

野生型RusA蛋白:

```

      10          20          30          40          50
MNTYSITLPW PPSNNRYRHR NGRTHVSAE GQAYRDNVAR IIKNAMLDIG
      60          70          80          90         100
LAMPVKIRIE CHMPDRRRRD LDNLQKAAFD ALTKAGFWLD DAQVVDYRVV
      110         120
KMPVTKGGRL ELTITEMGNE

```

突变RusA:

MVNTYSITLPWPPSNNRYRHRNGRTHVSAEGQAYRDNVARI IKNAMLDIGLAMPVKIRIECHMPDRRR  
RDLDNLQKAAFDALTKAGFWLDDAQVVDYRVVKMPVTKGGRLELTITEMGNEA

野生型RuvA:

MIGRLRGIIEKQPPLVLEI VGGVGYEVHMPMTCFYELPEAGQEAI VTFHFVVREDAQLLYGFNNKQER  
TLFKELIKTNGVGPKLALAILSGMSAQQFVNAVEREEVGALVKLPGIGKKAERLIVEMKDRFKLHGDLFTPAADL  
VLTSPASPATDDAEQEAVALVALGYKPKQEASRMVSKIARPDASSETLIREALRAAL

突变RuvB:

MIEADRLISAGTTLPEDVADRAIRPKLLEEYVGGPQVRSQMEIF IKAALKRGDALDHLLIFGPPGLGKT  
TLANIVANEMGVNLRRTTSGPVLEKAGDLAAML TNLEPHDVLFI DEIHRLSPVVEEVLYPAMEDYQLDIMIGEGPAAR  
SIKIDLPFFTLLIGATTRAGSLTSPLRDRFGIVQRLEFYQVPDLQYIVSRSARFMGLEMSDDGALEVARRARGTPRIA  
NRLRRVRDFAEVKHDGTISADIAAQALDMLNVDAEGFDYMDRKL LLAVIDKFFGGPVGLDNLAAAIGEERETIEDV  
LEPYLIQQGFLQRTPRGRMATTRAHNHFGITPPEMPA

突变RuvC:

MASAIILGIDPGSRVTGYGVIRQVGRQLSYLGS GCIRTKVDDLPSRLKLIYAGVTEIITQFQPDYFAI  
EQVFMKNADSALKLGQARGVAI VAAVNQELPVFEYAARQVKQTVVVGIGSAEKSQVQHVMVRTLLKLPANQADAAD  
ALAIATHCHVSQNAMQMSERLNLARGRLRA。

#### [0272] 参考文献

1. Bakaletz, L. O., E. R. Leake, J. M. Billy and P. T. Kaumaya (1997). "Relative immunogenicity and efficacy of two synthetic chimeric peptides of fimbriae as vaccinogens against nasopharyngeal colonization by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla." *Vaccine* 15(9): 955-961.

2. Bakaletz, L. O., B. M. Tallan, T. Hoepf, T. F. DeMaria, H. G. Birck and D. J. Lim (1988). "Frequency of fimbriation of nontypable *Haemophilus influenzae* and its ability to adhere to chinchilla and human respiratory epithelium." *Infect Immun* 56(2): 331-335.

3. Chan, S. N., S. D. Vincent and R. G. Lloyd (1998). "Recognition and manipulation of branched DNA by the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* 26(7): 1560-1566.

4. Devaraj, A., J. Buzzo, C. J. Rocco, L. O. Bakaletz and S. D. Goodman (2017). "The DNABII family of proteins is comprised of the only nucleoid associated proteins required for nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm structure." *Microbiologyopen*.

5. Frappier, L., G. B. Price, R. G. Martin and M. Zannis-Hadjopoulos

(1987). "Monoclonal antibodies to cruciform DNA structures." *J Mol Biol* 193 (4): 751-758.

6. Goodman, S. D., K. P. Obergefell, J. A. Jurcisek, L. A. Novotny, J. S. Downey, E. A. Ayala, N. Tjokro, B. Li, S. S. Justice and L. O. Bakaletz (2011). "Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins." *Mucosal Immunol* 4(6): 625-637.

7. Gustave, J. E., J. A. Jurcisek, K. S. McCoy, S. D. Goodman and L. O. Bakaletz (2013). "Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis." *J Cyst Fibros* 12(4): 384-389.

8. Harrison, A., D. W. Dyer, A. Gillaspay, W. C. Ray, R. Mungur, M. B. Carson, H. Zhong, J. Gipson, M. Gipson, L. S. Johnson, L. Lewis, L. O. Bakaletz and R. S. Munson, Jr. (2005). "Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20." *J Bacteriol* 187(13): 4627-4636.

9. Holmes, K. A. and L. O. Bakaletz (1997). "Adherence of non-typeable *Haemophilus influenzae* promotes reorganization of the actin cytoskeleton in human or chinchilla epithelial cells in vitro." *Microb Pathog* 23(3): 157-166.

10. Idicula, W. A., J. A. Jursicek, N. D. Cass, S. Ali, S. D. Goodman, C. A. Elmaraghy, K. R. Jatana and L. O. Bakaletz (2016). "Identification of biofilms in post-tympanostomy tube otorrhea." *Laryngoscope* In Press.

11. Jurcisek, J. A. and L. O. Bakaletz (2007). "Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein." *J Bacteriol* 189(10): 3868-3875.

12. Lloyd, R. G. and G. J. Sharples (1993). "Processing of recombination intermediates by the RecG and RuvAB proteins of *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* 21(8): 1719-1725.

13. Mason, K. M., R. S. Munson, Jr. and L. O. Bakaletz (2003). "Nontypeable *Haemophilus influenzae* gene expression induced in vivo in a chinchilla model of otitis media." *Infect Immun* 71(6): 3454-3462.

14. Mulvey, M. A., J. D. Schilling and S. J. Hultgren (2001). "Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection." *Infect Immun* 69(7): 4572-4579.

15. Novotny, L. A., A. O. Amer, M. E. Brockson, S. D. Goodman and L. O. Bakaletz (2013). "Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacterial nucleic acid binding protein." *PLoS One* 8(6): e67629.

16. Novotny, L. A., J. A. Jurcisek, S. D. Goodman and L. O. Bakaletz (2016). "Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins

disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo." EBioMedicine 10: 33-44.

17. Rice, D. W., J. B. Rafferty, P. J. Artymiuk and R. G. Lloyd (1997). "Insights into the mechanisms of homologous recombination from the structure of RuvA." *Curr Opin Struct Biol* 7(6): 798-803.

18. Sedelnikova, S. E., J. B. Rafferty, D. Hargreaves, A. A. Mahdi, R. G. Lloyd and D. W. Rice (1997). "Crystallization of E. coli RuvA gives insights into the symmetry of a Holliday junction/protein complex." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53(Pt 1): 122-124.

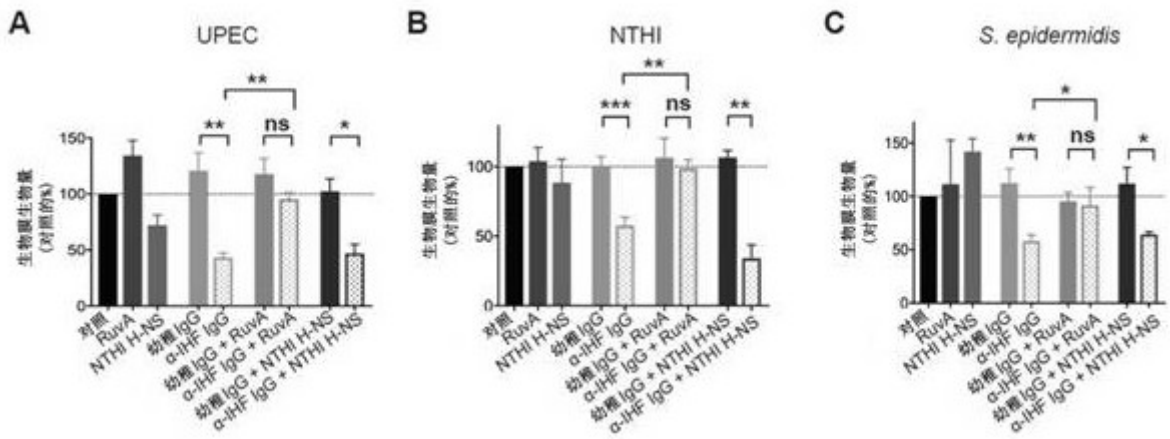


图1A-1C

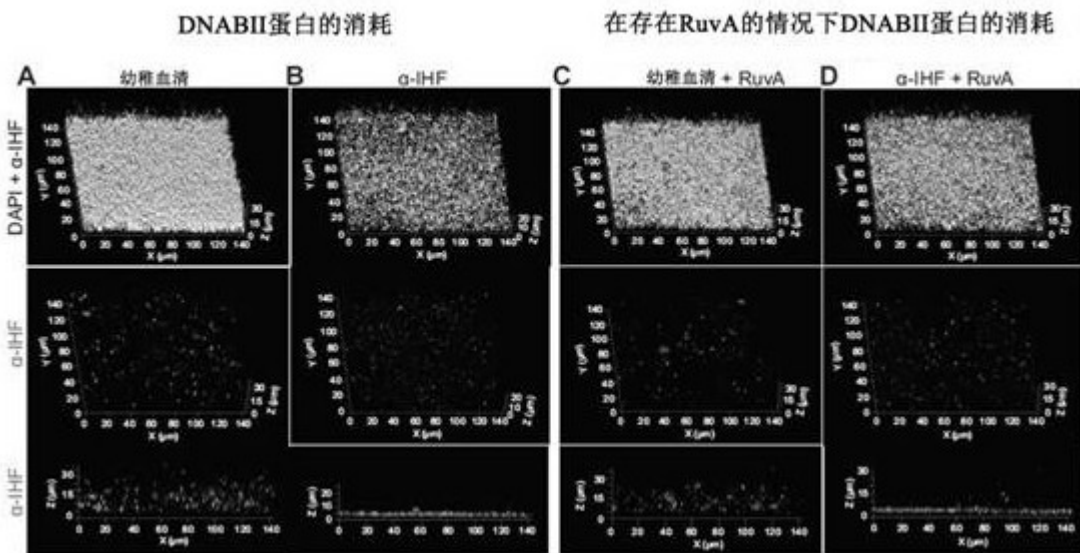


图2A-2D

消耗DNABII蛋白后掺入RuvA

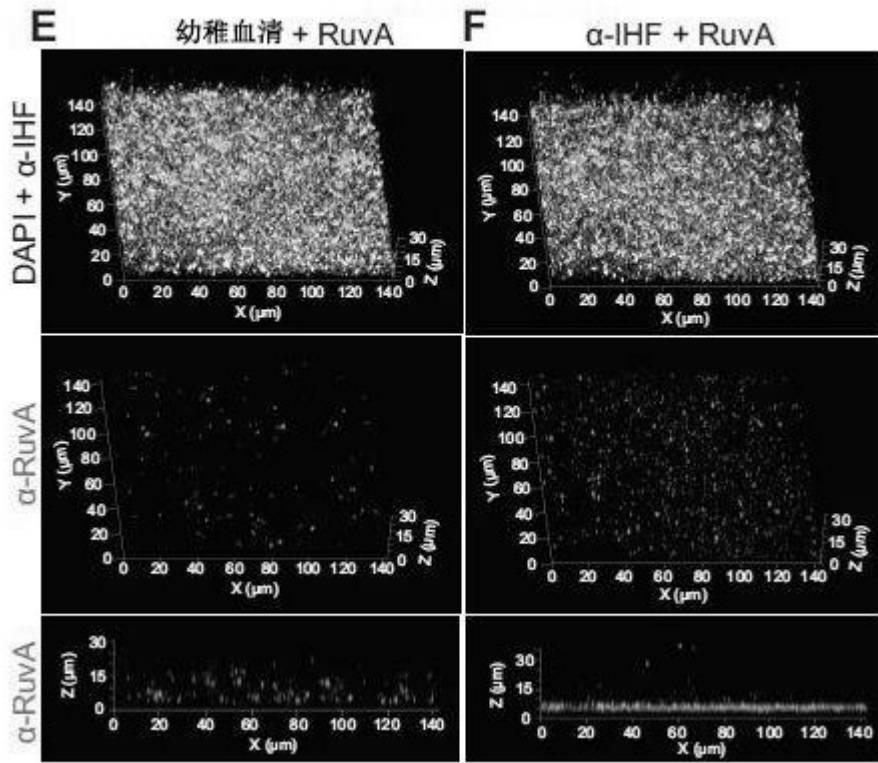


图2E-2F

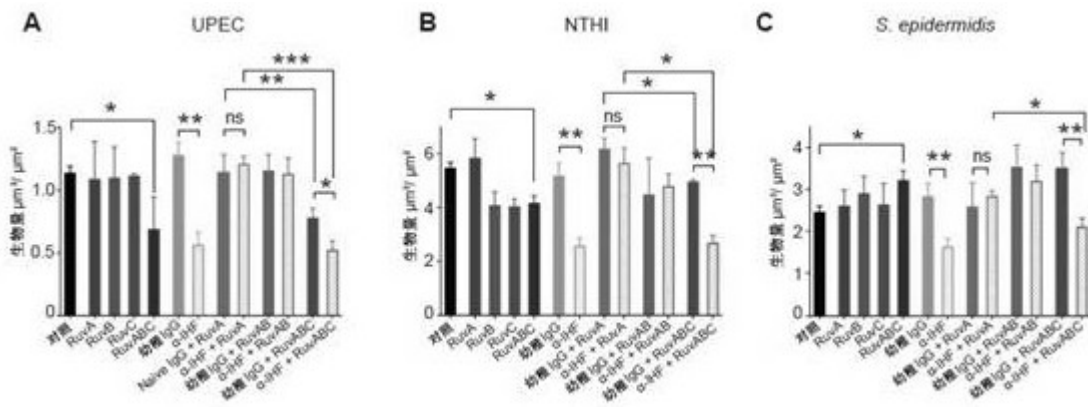


图3A-3C

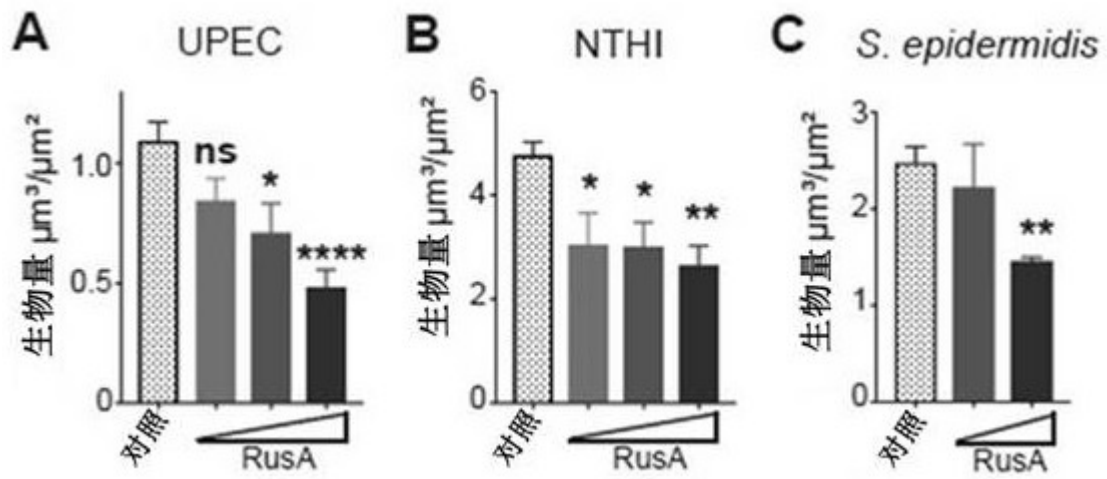


图4A-4C

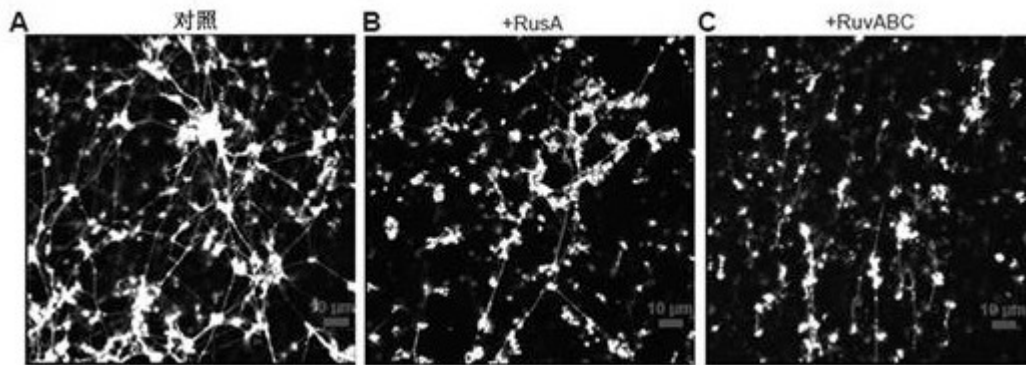


图5A-5C

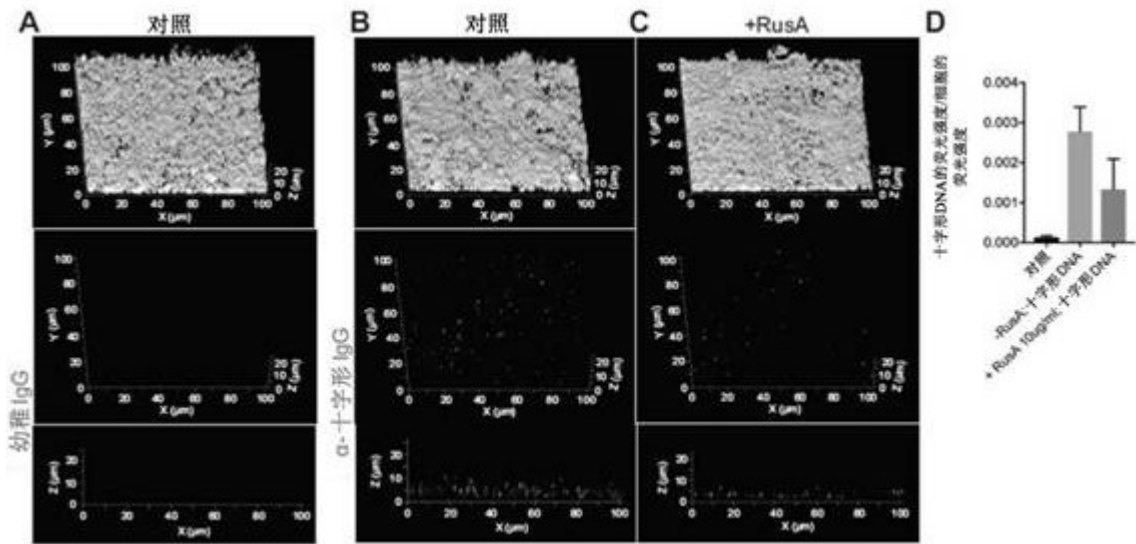


图6A-6D

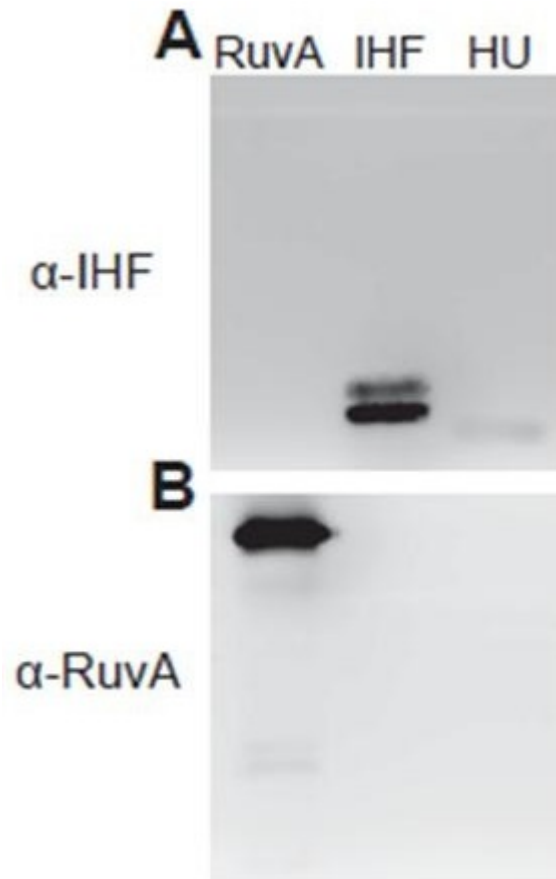


图7A-7B

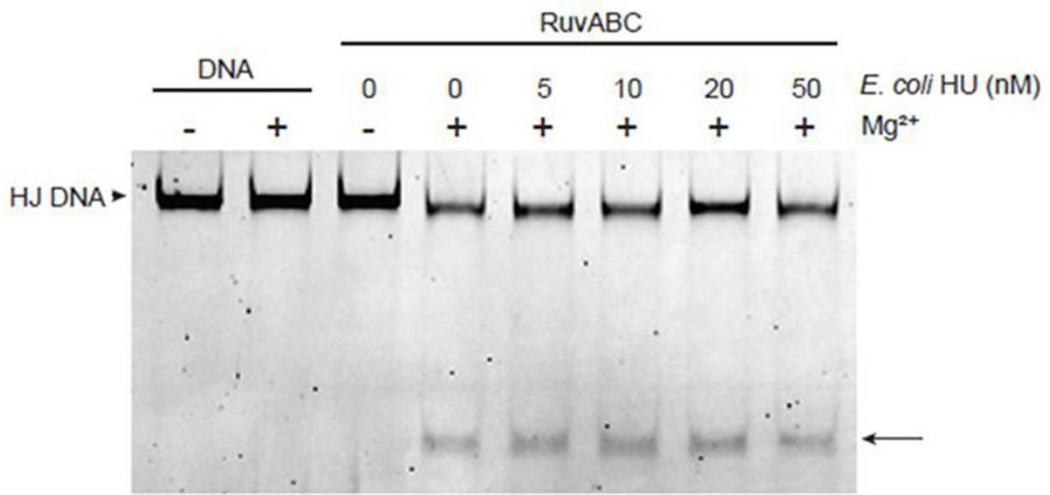


图8

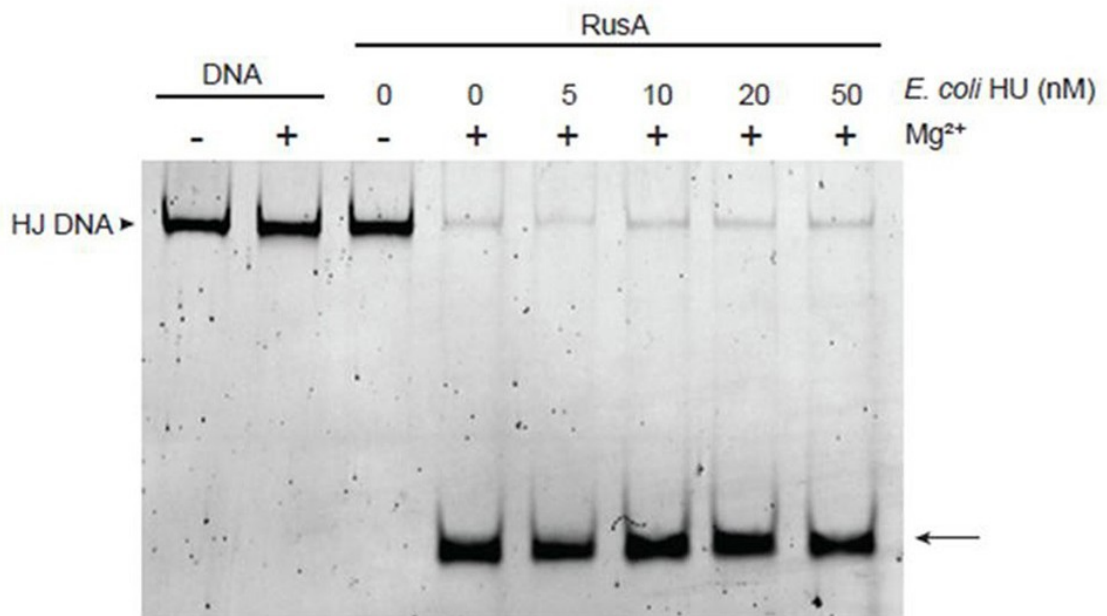


图9