



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104428000 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201380034208. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 03. 15

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 31/04(2006. 01)

61/641, 543 2012. 05. 02 US

C07K 14/705(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/032436 2013. 03. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/165613 EN 2013. 11. 07

(71) 申请人 纽约大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 V·J·托雷斯 A·L·杜蒙特

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

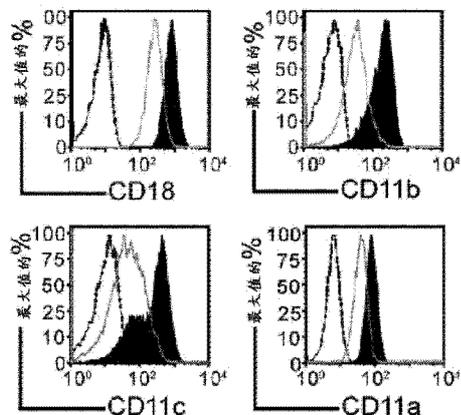
权利要求书4页 说明书43页 附图10页

(54) 发明名称

治疗和预防金黄色葡萄球菌感染和相关病状的方法

(57) 摘要

本发明涉及治疗和预防受试者的金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的方法,其包括施用CD11b抑制剂。本发明还涉及表达人CD11b的非人转基因动物及其在鉴定用于治疗 and 预防金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的新颖治疗剂的方法中的用途。



1. 一种预防或治疗受试者中的金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的方法,其包括:

选择具有金黄色葡萄球菌感染或处于具有金黄色葡萄球菌感染的危险中的受试者;和在有效预防或治疗所述受试者中的金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的条件向下向所述受试者施用 CD11b 抑制剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述金黄色葡萄球菌感染为甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 感染或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA) 感染。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 CD11b 抑制剂包含蛋白或肽抑制剂。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 CD11b 抑制剂为重组嗜中性白细胞抑制因子 (rNIF)。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 CD11b 抑制剂为包含 LukAB 受体结合域的重组可溶性蛋白或肽。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述重组可溶性蛋白或肽包含对应于 SEQ ID NO:2 的残基 147-337 的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 CD11b 抑制剂为 CD11b- 特异性抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述 CD11b- 特异性抗体与 CD11b 的 I- 域结合。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 CD11b 抑制剂为小分子抑制剂。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 CD11b 抑制剂选自氯化 2-[4-(3,4-二氢-2H-喹啉-1-基)-丁-1,3-二烯基]-1-乙基萘 [1,2-d] 噻唑-1-鎓、碘化 1-乙基-2-/3-/1-乙基苯并噻唑啉-2-亚基 / 丙烯基 /- 噻唑鎓及衍生物。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括:

结合所述 CD11b 抑制剂向所述选择的受试者施用选自抗感染剂、抗生素剂和抗微生物剂的试剂。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中治疗或预防由金黄色葡萄球菌感染引起的病状,所述病状选自皮肤创伤和感染、组织脓肿、毛囊炎、骨髓炎、肺炎、烫伤样皮肤综合征、败血症、脓毒性关节炎、心肌炎、心内膜炎和中毒性休克综合征。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述施用经口、通过吸入、通过鼻内滴注、经局部、经皮、肠胃外、皮下、静脉内注射、动脉内注射、肌肉注射、腹膜内、腹腔内或通过施用到粘膜来进行。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括:

重复所述施用。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者为婴儿、青少年或成人。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者为免疫低下的婴儿、青少年或成人。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中预防所述金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的所述病状。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中治疗所述金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的所述病状。

19. 一种其基因组包含稳定整合的表达构建体的转基因非人动物,其中所述表达构建体包含编码人 CD11b 的多核苷酸序列。

20. 根据权利要求 19 所述的转基因非人动物,其中所述表达构建体还包含操作性连接编码人 CD11b 的所述多核苷酸序列的白细胞特异性启动子。

21. 根据权利要求 19 所述的转基因非人动物,其中所述动物为啮齿动物。

22. 根据权利要求 19 所述的转基因非人动物,其中所述动物为小鼠。

23. 一种鉴定适合预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法,其包括:

提供候选化合物的集合;

将根据权利要求 19 所述的转基因非人动物暴露于能够诱发 LukAB 介导的白细胞死亡的试剂;

将来自所述集合的一种或多种候选化合物施用到所述转基因动物;

测量在施用了所述一种或多种候选化合物的所述转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡水平;

比较在施用了所述一种或多种候选化合物的所述转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡的水平与在未施用所述一种或多种候选化合物的转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡的对照水平;和

基于所述比较将与所述对照水平相比较降低在所述转基因动物中 LukAB 介导的白细胞死亡的水平所述集合的候选化合物鉴定为适合预防或治疗金黄色葡萄球菌和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述试剂为金黄色葡萄球菌。

25. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述试剂包含分离的金黄色葡萄球菌 LukAB 蛋白。

26. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述试剂包含重组生成的 LukAB 蛋白。

27. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述施用在所述暴露之前进行。

28. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述施用在所述暴露之后进行。

29. 一种鉴定适合预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法,其包括:

提供候选化合物的集合;

将根据权利要求 19 所述的转基因非人动物暴露于金黄色葡萄球菌;

将来自所述集合的一种或多种候选化合物施用到所述转基因动物;

测量在施用了所述一种或多种候选化合物的所述转基因动物中的金黄色葡萄球菌感染水平;

比较在施用了所述一种或多种候选化合物的所述转基因动物中的金黄色葡萄球菌感染水平与在未施用所述一种或多种候选化合物的转基因动物中的对照金黄色葡萄球菌感染水平;和

基于所述比较鉴定与所述对照金黄色葡萄球菌感染水平相比较降低在所述转基因动物中的金黄色葡萄球菌感染水平的候选化合物为适合预防或治疗金黄色葡萄球菌和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述施用在所述暴露之前进行。

31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述施用在所述暴露之后进行。

32. 一种鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物的方法,所述方法包括:

提供候选化合物的集合;

提供表达人 CD11b 的细胞的群体;

用能够诱发 LukAB 介导的细胞毒性处理所述细胞群体;

使所述处理过的细胞的群体与来自所述候选化合物集合的一种或多种候选化合物接触;

在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下测量在所述处理过的细胞的群体中的 LukAB 介导的细胞毒性水平;

比较在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下 LukAB 介导的细胞毒性的测量水平;和

基于所述比较鉴定候选化合物,其中与缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下相比较,在存在所述一种或多种候选化合物的情况下 LukAB 介导的细胞毒性的水平降低鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的一种或多种化合物。

33. 根据权利要求 32 所述的方法,其还包括:

提供细胞毒性的标记标示物;

在所述处理期间将表达人 CD11b 的细胞的群体暴露于细胞毒性的所述标记标示物;和

检测细胞毒性的所述标记标示物,其中基于所述检测测量在所述细胞群体中 LukAB 介导的细胞毒性水平。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述细胞毒性的标记标示物包含细胞生存染料、细胞不可渗透的染料和 / 或细胞溶胞的标示物。

35. 根据权利要求 32 所述的方法,其中表达人 CD11b 的所述细胞为白细胞。

36. 根据权利要求 32 所述的方法,其中表达人 CD11b 的所述细胞为设计加工成表达人 CD11b 和 / 或 CD11b/CD18 的人或非人有核细胞。

37. 一种鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法,所述方法包括:

提供候选化合物的集合;

提供包含 LukAB 结合域的分离的 CD11b 受体或其片段;

用包含标记的 LukA、LukB 和 / 或标记的 LukAB 蛋白的试剂处理所述分离的 CD11b 受体或其片段;

使所述处理过的分离的 CD11b 受体或其片段与来自所述集合的一种或多种候选化合物接触;

测量在存在和缺乏一种或多种候选化合物的情况下所述标记的 LukA、LukB 和 / 或标记的 LukAB 与所述分离的 CD11b 受体或其片段的结合水平;

比较在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下 LukA、LukB 和 / 或 LukAB 与所述分离的 CD11b 受体或其片段的结合水平;和

基于所述比较鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的一种或多种候选化合物。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中与在缺乏所述一种或多种候选化合物的情况相比较,在存在所述一种或多种候选化合物的情况下 LukA、LukB 和 / 或 LukAB 与所述分离的 CD11b 受体或其片段的结合减少鉴定所述一种或多种候选化合物能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状。

## 治疗和预防金黄色葡萄球菌感染和相关病状的方法

[0001] 本申请要求 2012 年 5 月 2 日提交的美国临时专利申请序列号 61/641, 543 的权益，该申请在此通过引用整体并入。

[0002] 本发明在美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的合同号 1R56AI091856-01A1 下通过政府的支持来完成。政府享有本发明的某些权利。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及治疗和预防金黄色葡萄球菌感染的方法，且涉及鉴定治疗和预防金黄色葡萄球菌感染的新颖治疗剂的方法。

### [0004] 发明背景

[0005] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是在超过 25% 的人群中共生繁殖的细菌。重要的是，该生物能够突破它繁殖起始部位，导致细菌散播和疾病。金黄色葡萄球菌是医院感染的主要原因，是传染性心内膜炎以及皮肤和软组织感染的最常见病原体，并且是食物传播疾病的四大主要原因之一。总之，在美国医院中金黄色葡萄球菌每年感染超过 120 万患者。金黄色葡萄球菌对人健康的危害通过抗生素抗性菌株（即，甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 菌株）的出现得到进一步凸显，该抗生素抗性菌株包括对万古霉素具有抗性的菌株，万古霉素被认为是针对金黄色葡萄球菌感染防御的最后一道防线。这些事实凸显研发针对该重要病原体的新颖治疗剂的重要性。

[0006] 金黄色葡萄球菌产生大量致病因子和毒素，这些使得该细菌可以中和并抵抗不同种类的免疫细胞的攻击，特别是构成人体的主要防御体系的白细胞的亚群的攻击。这些致病因子和毒素的产生使得金黄色葡萄球菌可以维持感染状态 (Nizet, "Understanding How Leading Bacterial Pathogens Subvert Innate Immunity to Reveal Novel Therapeutic Targets," *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(1):1322(2007))。在这些致病因子中，金黄色葡萄球菌产生多种双组分白细胞毒素，其通过两种不相关的蛋白或亚单位的协同作用破损宿主防御细胞和红细胞的细胞膜（参见 Menestrina 等, "Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family," *Toxicol.* 39(11):1661-1672(2001))。在这些双组分白细胞毒素中， $\gamma$ -溶血素 (HlgAB 和 HlgCB) 和 Pantone-Valentine 杀白细胞素 (PVL) 是最有特色的。

[0007] 杀白细胞素对哺乳动物细胞的毒性包括两种组分的作用。第一亚单位称为 S 类-亚单位（即，“缓慢洗脱”），且第二亚单位称为 F 类-亚单位（即，“快速洗脱”）。S-亚单位和 F-亚单位协同作用以在包括单核细胞、巨噬细胞、树状细胞和嗜中性白细胞的白细胞（统称为吞噬细胞）上形成孔 (Menestrina 等, "Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family," *Toxicol.* 39(11):1661-1672(2001))。双组分毒素在靶细胞膜中形成孔的机制尚未被完全了解。所提出的这些毒素的作用机制包括 S-亚单位与靶细胞膜结合，最可能通过受体结合，随后是 F-亚单位与 S-亚单位结合，由此形成低聚体，其又形成插入靶细胞膜中的前孔 (Jayasinghe 等, "The Leukocidin Pore: Evidence for an Octamer With Four LukF

Subunits and Four LukS Subunits Alternating Around a Central Axis,” *Protein. Sci.* 14(10):25502561(2005))。通过双组分白细胞毒素形成的孔通常具有阳离子选择性。孔形成导致细胞通过溶胞死亡,据报道,在靶白细胞的情况下,这是由于阳离子的流入所致的渗透压不平衡引起 (Miles等,“The Staphylococcal Leukocidin Bicomponent Toxin Forms Large Ionic Channels,” *Biochemistry* 40(29):85148522(2001))。

[0008] 设计治疗 MRSA 感染的有效疗法特别具有挑战性。除了对甲氧西林和相关抗生素的抗性之外,还发现 MRSA 对大环内酯类 (例如,红霉素)、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂组合 (例如,优立新 (Unasyn)、力百汀 (Augmentin)) 和氟喹诺酮类 (fluoroquinolones) (例如,环丙沙星 (ciprofloxacin)) 以及克林霉素、三甲氧苄二氨嘧啶 / 磺胺甲噁唑 (sulfamethoxisol) (复方新诺明 (Bactrim)) 和利福平 (rifampin) 具有显著的抗性水平。在严重金黄色葡萄球菌感染的情况下,临床医师求助于静脉内万古霉素。然而,如上所提到,已经有金黄色葡萄球菌对万古霉素的抗性的报道。因此,需要研发有效抗击金黄色葡萄球菌感染的新抗生素药物。

[0009] 本发明涉及解决在本领域中的这些和其它局限性。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的第一方面涉及预防或治疗受试者中的金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的方法。该方法包括选择处于具有金黄色葡萄球菌感染的危险中或具有金黄色葡萄球菌感染的受试者和在有效预防或治疗所述受试者中的金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的条件向所述受试者施用 CD11b 抑制剂。

[0012] 本发明的另一方面涉及转基因非人动物,所述转基因非人动物的基因组包含包含编码人 CD11b 的多核苷酸序列的稳定整合的表达构建体。本发明的其它方面涉及使用本发明的转基因非人动物鉴定适合预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法。

[0013] 本发明的另一方面涉及鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物的方法。该方法包括提供候选化合物的集合和提供表达人 CD11b 的细胞群体。所述方法还包括用能够诱发 LukAB 介导的细胞毒性的试剂处理所述细胞群体和使所述处理过的细胞群体与来自所述集合的一种或多种候选化合物接触。所述方法还包括测量在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下在所述处理过的细胞群体中 LukAB 介导的细胞毒性水平和比较在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下 LukAB 介导的细胞毒性的测量水平。与在缺乏所述一种或多种候选化合物的情况相比较,在存在所述一种或多种候选化合物的情况下 LukAB 介导的细胞毒性水平减小鉴定出能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

[0014] 本发明的另一方面涉及鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法。该方法包括提供候选化合物的集合和提供包含 LukAB 结合域的分离的 CD11b 受体或其片段。所述方法还包括用包含标记的 LukA、LukB 和 / 或标记的 LukAB 蛋白的试剂处理所述分离的 CD11b 受体或其片段和使所述处理过的分离的 CD11b 受体或其片段与来自所述集合的一种或多种候选化合物接触。测量在存在和缺乏一种或多种候选化合物的情况下所述标记的 LukA、LukB 和 / 或标记的 LukAB 与上述

分离的 CD11b 受体或其片段的结合水平,和比较在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下 LukA、LukB 和 / 或 LukAB 与所述分离的 CD11b 受体或其片段的结合水平。基于该比较鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的一种或多种候选化合物。

[0015] 在美国医院中金黄色葡萄球菌每年感染超过 120 万患者,其中美国每年死亡约 40,000 人。该细菌是医院和社区获得性感染的主要原因,是传染性心内膜炎、皮肤和软组织感染的最常见病原体,并且是食物传播疾病的四大主要原因之一。金黄色葡萄球菌对人健康的危害通过包括甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的抗生素抗性菌株的出现而进一步增强。这些事实凸显鉴定新目标以便研发新颖治疗剂的重要性。本发明涉及如下发现,CD11b 是金黄色葡萄球菌致病因子白细胞毒素 AB(LukAB) 的人细胞受体。LukAB 对于人嗜中性白细胞造成甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌和甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌两者的细胞毒素性质,且鉴定其在人细胞上的细胞受体能够获得免受金黄色葡萄球菌感染的新治疗方法。另外,该致病受体的发现允许产生改善的细胞模型和筛选用于研究金黄色葡萄球菌感染和鉴定新颖治疗剂的测定。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1A-1C 显示 LukAB 和金黄色葡萄球菌细胞毒性。图 1A 为在用从等基因野生型 (WT) 和  $\Delta$  lukAB 突变体 MSSA 及 MRSA 菌株分离的分泌蛋白染毒后人多形核白血球 (PMN) 生存率的图形。在用来自  $\Delta$  lukAB 突变菌株的分泌蛋白处理的细胞中观察到的增加的生存率通过用质体 ( $\Delta$  lukAB/plukAB) 反式表达 lukAB 逆转。宿主细胞生存率用 CellTiter 监测,CellTiter 为监测细胞代谢活性的试剂。图 1B 为显示在人全血和原代人 PMN 中金黄色葡萄球菌存活率的图形。将集落形成单位对于输入 CFU 标准化。图 1C 为显示在用所指示的菌株感染 96 小时后在受感染小鼠的肾中的载菌量的图形。结果代表来自超过 6 种不同供体 (图 1A 和图 1B) 和每组 20 只小鼠 (图 1C) 的 PMN/ 全血的平均值  $\pm$  S. E. M.。\* 表示与 WT 相比较的统计上显著的差异 (ANOVA  $p < 0.05$ )。

[0018] 图 2 为 LukAB 诱发的细胞毒性在不同人细胞中的剂量反应。该图形显示所指示的细胞在用纯化的 LukAB 染毒后的生存率。宿主细胞生存率用 CellTiter 监测,CellTiter 为监测细胞代谢活性的试剂。结果代表三份样品的平均值  $\pm$  S. E. M.。

[0019] 图 3 显示 LukAB 和金黄色葡萄球菌对于原代嗜中性白细胞的细胞毒性。该图形显示人嗜中性白细胞 (hPMN) 和原代鼠嗜中性白细胞 (mPMN) 在用从等基因野生型 (WT) 和  $\Delta$  lukAB 突变体 MSSA 菌株中分离的分泌蛋白染毒后的生存率。宿主细胞生存率用 CellTiter 监测,CellTiter 为监测细胞代谢活性的试剂。结果代表至少六个独立样品的平均值  $\pm$  S. E. M.。

[0020] 图 4A-4D 显示 LukAB 与人整合素 Mac-1 (CD11b/CD18) 直接相互作用。图 4A 为使用 Ni-NTA 珠粒捕获 (pull-down) 具有 his- 标签的 LukAB 的生物素化 PMN-HL60 溶胞产物,其中将样品转移到硝化纤维膜且用 DyLight 抗生蛋白链菌素探测。图 4B 为使用抗 -CD11b 抗体如上所述捕获具有 his- 标签的白细胞毒素的 PMN HL60 溶胞产物的免疫印迹。图 4C 为如上所述捕获具有 his- 标签的白细胞毒素的纯化的 Mac-1 的 Sypro Ruby 蛋白染色,且图 4D 显示用抗 -CD11b 抗体的相应免疫印迹。

[0021] 图 5A-5F 证明 CD11b 对于 LukAB- 介导的宿主细胞杀死是必需且足够的。图 5A 为

显示在用  $10 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 染毒 HL60 或 PMN-HL60 细胞 1 小时之后细胞生存率的条形图。细胞生存率用新陈代谢染料 CellTiter 测量。图 5B 为与非靶向 (NT) shRNA 病毒相比较在用 CD18shRNA 病毒转导的 PMN-HL60 细胞中的 CD18 和 CD11b 表面水平的流式细胞绘图。图 5C 为量化在用  $10 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 或 PVL 染毒 NT 和 CD18shRNA PMN-HL60 细胞 1 小时的情况下的孔形成的条形图。孔形成用荧光染料溴化乙锭 (Ethidium bromide, EtBr) 测量。图 5D 显示在用 CD11b shRNA 病毒或如对于图 5B 所述测量的非靶向 (NT) shRNA 病毒转导的 HL60 细胞和 PMN-HL60 细胞中的 CD18 和 CD11b 表面水平。图 5E 为量化在用  $10 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 或 PVL 染毒 NT 和 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞 1 小时的情况下的孔形成的条形图。孔形成用 EtBr 测量。图 5F 显示 CD11b 转染的 293T 细胞用  $40 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 或 PVL 染毒 2 小时。CD11b<sup>+</sup> 细胞的消耗百分比通过在染毒后用抗 -CD11b 抗体将细胞染色并进行流式细胞分析来确定。图 5F 的条形图描绘两个独立实验的平均值。FACS 绘图得自代表性实验。除非另有陈述, 否则所有其它数据都表示为三份样品的平均值  $\pm$  标准偏差 (SD)。\*\*\* 指示通过单因素方差分析  $P < 0.0001$ 。

[0022] 图 6 显示敲低 CD18 引起在 PMN-HL60 细胞表面上消耗多种  $\beta 2$  整合素。与同种型对照抗体 (黑线) 相比较, 在 PMN-HL60 细胞中在 NT (实心黑色) 和 CD18shRNA (灰线) 中用特异性抗体实现的如通过流式细胞术确定的 CD18、CD11b、CD11c 和 CD11a 细胞表面水平。

[0023] 图 7A-7E 证明 LukAB 靶向 CD11b 的 I- 域以杀死细胞。图 7A 为显示用  $10 \mu\text{g/ml}$  整合素特异性抗体 ( $\alpha$ -CD11a、 $\alpha$ -CD11c 和  $\alpha$ -CD18), 包括三种不同抗 -CD11b 克隆 ( $\alpha$ -CD11b), 处理或不用抗体 (无抗体) 处理、接着用  $2.5 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 染毒 1 小时后 PMN 的生存率的条形图。膜破损用荧光染料 SYTOX 绿测量。结果代表来自从 8 种供体中分离的 PMN 的平均值  $\pm$  SEM。图 7B 显示用  $10 \mu\text{g/ml}$  的 LM2/1 或同种型对照物处理、随后如上所述将其染毒并评价的 PMN 的生存率。结果代表来自从 4 种供体中分离的 PMN 的平均值  $\pm$  SEM。图 7C 显示如通过用抗 -CD11b 抗体的流式细胞分析确定, 与 PMN-HL60s 相比较, 在用空载体 (EV)、WT CD11b 或 I- 缺少 CD11b 病毒稳定转导的 HL60 细胞上的 CD11b 表面水平。在用  $10 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 染毒 1 小时之后, 将在图 7C 中描述的稳定转导的 HL60 细胞系的生存率与 PMN-HL60s 相比较, 其中膜破损 (图 7D) 和细胞新陈代谢 (图 7E) 分别如在图 7A 和图 5A 中所述来评价。数据代表三份样品的平均值  $\pm$  SD。\* 指示通过单因素方差分析  $P < 0.05$ , \*\* 指示  $P < 0.01$  且 \*\*\* 指示  $P < 0.0001$ 。

[0024] 图 8A-8E 显示与鼠 CD11b I- 域相比较 LukAB 优先结合人 CD11b I- 域。图 8A 为显示如用 EtBr 所测量在用  $20 \mu\text{g/ml}$  的 LukAB 或  $10 \mu\text{g/ml}$  的 LukED 染毒 1 小时后在腹腔渗出细胞 (PECs) 中的孔形成的条形图。数据代表三份样品的平均值  $\pm$  SD。图 8B 为显示使用抗 -Ly6G 和抗 -CD11b 抗体在 PECs 上的 Ly6G 和 CD11b 表面水平的流式细胞分析。图 8C 为使用 CLUSTALW 法用 DNASTAR MegAlign 软件构建的人、大猩猩、兔和小鼠 I- 域的氨基酸序列比对的种系树。图 8D 显示竞争斑点印迹测定的结果, 其中将纯化的重组人 CD11b I- 域用  $5 \mu\text{g/ml}$  荧光标记的 LukAB (FITC-LukAB) 和 10 倍过量 ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) 的未标记的 LukAB 或未标记的 PVL 孵化。FITC-LukAB 结合通过密度测定法量化。图 8E 为用  $5 \mu\text{g/ml}$  FITC-LukAB 孵化的纯化的重组人或鼠 CD11b I- 域的斑点印迹。FITC-LukAB 结合通过密度测定法量化。

[0025] 图 9A-9B 证明 CD11b 通过胞外金黄色葡萄球菌离体感染致使细胞对 LukAB- 介导的杀死敏感。图 9A 为显示在用未受调理的野生型 (WT) CA-MRSA USA300 或等基因 lukAB 突

变体 ( $\Delta$  lukAB) 以所指示的多重感染 (MOI) 感染 2 小时后在图 5B 中描述的非靶向 (NT) 或 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞的生存率的图形。膜破损用 SYTOX 绿测量。数据代表三份样品的平均值  $\pm$  SD。图 9B 为显示用  $10 \mu\text{g/ml}$  的 CD11b- 特异性抗体 (三种不同克隆) 处理、接着用所指示的 MOI 的未受调理的 WT USA300 感染 1 小时后 PMN 的生存率的图形。膜破损用 SYTOX 绿测量。结果代表来自 8 种供体中分离的 PMN 的平均值  $\pm$  SEM。\* 指示通过单因素方差分析  $P < 0.05$  且 \*\*\* 指示  $P < 0.0001$ 。

[0026] 图 10A-10B 显示 CD11b 的敲低不影响由 PMN-HL60 细胞引起的调理介导的金黄色葡萄球菌的吞噬作用。在具有调理作用 (图 10B) 或没有调理作用 (图 10A) 的情况下在用各种 MOI 的 GFP-USA300 感染的 NT 和 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞中吞噬细菌的量通过流式细胞术确定。感染在存在溶葡萄球菌素的情况下进行以消除来自胞外细菌的 GFP 信号。

[0027] 图 11A-11E 证明吞噬的金黄色葡萄球菌的 LukAB- 介导的细胞破损和生长回弹取决于 CD11b。图 11A 为显示在用各种 MOI 的受调理的 WT 或  $\Delta$  lukAB USA300 感染 90 分钟之后在图 5D 中描述的非靶向 (NT) 或 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞的生存率的图形。膜破损用 SYTOX 绿测量。数据代表三份样品的平均值  $\pm$  SD。图 11B 为显示在 NT 或 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞以 MOI 10 感染后受调理的 WT 或  $\Delta$  lukAB USA300 的生长的图形。细菌菌落形成单位通过在同步化 1、2 或 3 小时后将 PMN-HL60 细胞溶胞之后稀释涂板来确定。为了确定生长%，将细菌计数对于在时间 0 下的输入值标准化，在时间 0 下的输入值设定为 100%。结果代表来自两次独立感染的三份样品的平均值  $\pm$  SD。图 11C 的显微照片显示在用受调理的 GFP-USA300 以 MOI 10 感染后的 PMN 中或在感染之前通过用荧光结合的抗 -CD11b 抗体或同种型对照物染色确定的未被感染的 PMN 中 CD11b 的定位。在同步化之后将细胞固定且使用 Applied Precision Personal DV 活细胞成像系统捕集图像。显示各种情况的代表性图像。图 11D 显示用 GFP-USA300 以 MOI 10 感染用 LM2/1 抗 -CD11b 抗体或同种型对照物预处理的 PMN。红色的 EtBr 染色指示孔形成。在同步化后的 0 分钟和 30 分钟使用荧光显微镜捕集图像且显示来自 30 分钟的代表性图像。图 11E 为显示从在图 11D 中所示的图像中获得的每个视野中溴化乙锭阳性 PMN 的量化的图形。结果代表来自在感染后 (T0) 和 30 (T30) 分钟从供体中分离的 PMN 的感染的三次独立计数的平均值。\*\* 指示通过单因素方差分析  $P < 0.001$  且 \*\*\* 指示  $P < 0.0001$ 。

[0028] 图 12 显示用抗 -CD11b LM2/1 抗体处理 PMN 没有抑制金黄色葡萄球菌的吞噬作用。在用  $\alpha$  -CD11b LM2/1 抗体或同位素对照抗体预处理之后在用受调理的 GFP-USA300 感染的 PMN 中的细菌定位。在同步化之后马上 (T0) 捕集荧光图像。对于该时间点也显示红色的背景 EtBr 染色。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明的第一方面涉及预防或治疗受试者中的金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的方法。该方法包括选择处于具有金黄色葡萄球菌感染的危险中或具有金黄色葡萄球菌感染的受试者和在有效预防或治疗所述受试者中的金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的条件向所述受试者施用 CD11b 抑制剂。

[0031] 迄今为止，大多数金黄色葡萄球菌感染起因于 MRSA (Moran 等，“Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections Among Patients in the Emergency

Department,” *The New England Journal of Medicine* 355:666-674(2006), 其在此通过引用整体并入)。先前,认为大多数 MR SA 感染来自医院 (HA-MRSA), 然而, 感染现在在没有暴露于保健设施的另外健康个体中出现, 即社区相关的 MRSA (CA-MRSA) (Klevens 等, “Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States,” *Jama* 298:1763-1771(2007) 和 Klevens 等, “Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003,” *Clin. Infect. Dis.* 42:389-391(2006), 它们在此通过引用整体并入)。这些 CA-MRSA 相关感染更加严重且与 HA-MRSA 感染相比, 引起更高的死亡率 (Deleo 等, “Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*,” *Lancet* 375:1557-1568(2010), 其在此通过引用整体并入)。最新报道提出, 与 HA-MRSA 感染相关的那些菌株相比, 与 CA-MRSA 感染相关的菌株的致病力增加主要归因于 CA-MRSA-相关菌株逃避嗜中性白细胞 (PMN) 介导的杀死的能力增强 (Voyich 等, “Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils,” *J. Immunol.* 175:3907-3919(2005); Wang 等, “Identification of Novel Cytolytic Peptides as Key Virulence Determinants for Community-Associated MRSA,” *Nat. Med.* 13:1510-1514(2007); Li 等, “Evolution of Virulence in Epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*,” *Proc. Nat’l Acad. Sci. U. S. A.* 106:5883-5888(2009); Dumont 等, “Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis,” *Mol. Microbiol.* 79:814-825(2011); 和 Alonzo III 等, “*Staphylococcus aureus* Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo,” *Mol. Microbiol.* 83:423-435(2012), 它们在此通过引用整体并入)。金黄色葡萄球菌通过用细胞毒素和溶细胞素的集合靶向并杀死 PMN 而避开 PMN-介导的杀死 (Wang 等, “Identification of Novel Cytolytic Peptides as Key Virulence Determinants for Community-Associated MRSA,” *Nat. Med.* 13:1510-1514(2007); Dumont 等, “Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis,” *Mol. Microbiol.* 79:814-825(2011); Alonzo III 等, “*Staphylococcus aureus* Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo,” *Mol. Microbiol.* 83:423-435(2012); Loffler 等, “*Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine Leukocidin is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils,” *PLoS Pathog.* 6:e1000715(2010); 和 Ventura 等, “Identification of a Novel *Staphylococcus aureus* Two-Component Leukotoxin Using Cell Surface Proteomics,” *PLoS One* 5:e11634(2010), 它们在此通过引用整体并入)。在这方面, 与人感染相关的金黄色葡萄球菌菌株可生成多达 4 种不同的双组分白细胞毒素。这些双组分白细胞毒素为对于宿主吞噬细胞展示出明显选择性的毒素的  $\beta$ -桶状孔形成家族的成员。葡萄球菌白细胞毒素的细胞毒素性质归因于在靶细胞膜中体外形成八聚合体 (octameric) 孔, 这引起细胞肿胀, 最终导致细胞死亡 (Ferreras 等, “The Interaction of *Staphylococcus aureus* Bi-Component Gamma-Hemolysins and Leucocidins With Cells and Lipid Membranes,” *Biochim.*

Biophys. Acta 1414:108-126(1998); Jayasinghe&Bayley, "The Leukocidin Pore: Evidence for an Octamer With Four LukF Subunits and Four LukS Subunits Alternating Around a Central Axis," Protein Sci. 14:2550-2561(2005); Sugawara-Tomita 等, "Stochastic Assembly of Two-Component Staphylococcal Gamma-Hemolysin into Heteroheptameric Transmembrane Pores With Alternate Subunit Arrangements in Ratios of 3:4 and 4:3," J. Bacteriol. 184:4747-4756(2002); Menestrina 等, "Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family," Toxicon 39:1661-1672(2001), 它们在此通过引用整体并入)。在这四种不同的双组分白细胞毒素中, 对于人嗜中性白细胞, 白细胞毒素 AB(LukAB) 主要负责分别 MSSA 和 MRSA 两者的细胞毒素性质(参见下文的实施例和 Torres 的美国专利公告 2011/0274693 号, 其在此通过引用整体并入)。

[0032] 假设每年有大量个体感染 MRSA, 很可能相当大比例的这些感染将难以通过传统过程的抗生素治疗控制。治疗所述感染的创新方法是抑制诸如 LukAB 的金黄色葡萄球菌致病因子, 这些金黄色葡萄球菌致病因子造成杀死在防御金黄色葡萄球菌感染中所包括的最关键的先天免疫细胞 PMN。如在本文中所述, 申请人已经鉴定 CD11b 为对于在人 PMN 上的 LukAB 的细胞受体。LukAB 与 CD11b 结合是在 LukAB 细胞毒性中的第一步骤, 接着是 LukAB 低聚和孔形成, 导致细胞死亡。因此, 诸如 CD11b 抑制剂的抑制 LukAB/CD11b 相互作用的试剂在临床上可用于阻断 LukAB 细胞毒性, 又预防 PMN 的消耗, 且促进通过先天免疫系统自然廓清金黄色葡萄球菌。在本发明的一个优选实施方式中, 所述 CD11b 抑制剂选择性地抑制 CD11b/LukAB 相互作用, 而不干扰 CD11b 与其生理学配体的结合。

[0033] 根据本发明的该方面, 合适的 CD11b 抑制剂包括而限于蛋白或肽抑制剂、抗体和小分子, 如下所述, 其中的许多为本领域所知。

[0034] CD11b 的例示性肽抑制剂包括重组嗜中性白细胞抑制因子 (rNIF), 也称作 UK-279276。NIF 为从犬钩虫 (*Ancylostoma caninum*) 中分离并克隆的 41-kDa 糖蛋白 (Moyle 等, "A Hookworm Glycoprotein That Inhibits Neutrophil Function is a Ligand for the Integrin CD11b/CD18," J. Biol. Chem. 209(13):10008-10015(1994), 其在此通过引用整体并入)。NIF 以高亲和性与 CD11b/CD18 受体复合物(也称作 Mac-1、Mo1、 $\alpha$ M $\beta$ 2 和 CR3) 结合, 由此阻断 CD11b/CD18 受体在内皮细胞上与其生理学配体结合。根据本发明, 包含 rNIF(UK-279276) 的治疗组合物将容易地抑制 LukAB 与 CD11b 的相互作用且预防其随后诱发的细胞毒性。

[0035] 适合在本发明的方法中使用的另一例示性蛋白或肽抑制剂为包含 LukAB 受体结合域的重组可溶性蛋白。在本发明的该方面的一个优选的实施方式中, 所述可溶性蛋白包含重组人 CD11b 蛋白或 CD11b-LukAB 结合域。包含所述 LukAB 结合域的例示性可溶性蛋白为包含 CD11b 的 I-域或其片段的可溶性蛋白。CD11b 的 I-域跨越 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 147-337 (NCBI 登录号 NP\_000632) 和 SEQ ID NO:4 的残基 147-337 (NCBI 登录号 NP\_001139280)。包含 CD11b 蛋白的另一例示性可溶性蛋白为由 Dana 等, "Expression of a Soluble and Functional Form of the Human  $\beta$ 2 Integrin CD11b/CD18," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3106-3110(1991) 描述的可溶性人 CD11b/CD18 受体, 其在此通过引用整体并入。根据本发明的该方面, 包含所述可溶性 LukAB 受体结合蛋白的本发明治疗组合物

将结合金黄色葡萄球菌 LukAB 致病因子,防止其与 CD11b 表达靶细胞(例如,吞噬细胞)的相互作用及其随后诱发的细胞毒性。

[0036] 在本发明的该方面的另一实施方式中,所述 CD11b 抑制剂为 CD11b 或 CD11b/CD18 特异性抗体。如在本文中使用的术语“抗体”意欲包括来源于天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白以及完整免疫球蛋白的免疫活性部分(即,抗原结合部分)。本发明的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段、双体抗体、三体抗体、五体抗体、纳米抗体、抗体的基因工程化形式及其组合。合适的抗体包括全长(即,天然存在的或常规免疫球蛋白基因片段重组方法形成的)免疫球蛋白分子(例如, IgG 抗体)及其免疫活性片段(即,包括全长免疫球蛋白分子的特异性结合部分),同样其在本质上可为天然存在的或合成的。因此,术语“抗体片段”包括抗体的一部分,例如  $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、Fab'、Fab、Fv、scFv 等。不论结构如何,抗体片段都与由全长抗体识别的相同抗原结合,且在本发明的情况下,特异性结合 CD11b 或 CD11b/CD18 并防止 LukAB 结合。在一个优选的实施方式中,本发明的抗体结合 CD11b 的 LukAB 结合域,即 CD11b 的 I-域,但不结合 CD11b 的其它域,从而允许 CD11b/CD18 受体的其它生理学配体与该受体结合,同时特异性地阻断金黄色葡萄球菌 LukAB 结合。制备和筛选抗体和抗体片段的方法在本领域中是熟知的。

[0037] 本发明的单克隆抗体可来源于任何哺乳动物,例如但不限于啮齿动物、兔、狗、山羊、马、骆驼、美洲驼、鸡、人。

[0038] 生成单克隆抗体的方法可使用本领域熟知的技术进行 ( $M_{ONOCLO\ NAL\ A_{NTIBODIES-}P_{RODUCTION,}\ E_{NGINEERING\ AND}\ C_{LINICAL\ A_{PPPLICATI}\ ONS}$  (Mary A. Ritter 和 Heather M. Ladyman 编,1995),其在此通过引用整体并入)。通常,所述方法包括从先前已经用目标抗原(即, Cd11b 或其片段)体内或体外免疫的哺乳动物的脾中获得免疫细胞(淋巴细胞)。

[0039] 分泌抗体的淋巴细胞随后与骨髓瘤细胞或转化的细胞融合,这能够在细胞培养物中无限地重复,由此生成永生的分泌免疫球蛋白的细胞系。能够在细胞培养物中无限地重复的与哺乳动物骨髓瘤细胞或其它融合搭配物融合通过标准且熟知的技术,例如通过使用聚乙二醇(PEG)或其它融合剂实现 (Milstein 和 Kohler, “Derivation of Specific Antibody-Producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell Fusion,” *Eur J Immunol* 6:511 (1976),其在此通过引用整体并入)。选择优选为鼠、但也可来源于其它哺乳动物物种的细胞的永生细胞系,以缺乏利用某些营养素所必需的酶、能够迅速生长且具有良好的融合能力。将所产生的融合细胞或杂交瘤培养,且筛选所产生的菌落以生成所要的单克隆抗体。将生成所述抗体的菌落克隆并使其体内或体外生长以生成大量的抗体。

[0040] 在本发明的另一实施方式中,单克隆 CD11b 抗体或抗体片段可从使用在 McCafferty 等,“Phage Antibodies:Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains,” *Nature* 348:552-554 (1990) 中描述的技术产生的抗体噬菌体库中分离,其在此通过引用整体并入。Clackson 等,“Making Antibody Fragments using Phage Display Libraries,” *Nature* 352:624-628 (1991); 和 Marks 等,“By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage,” *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991),其在此通过引用整体并入,描述使用噬菌体库分别分离鼠抗体和人抗体。随后的公告描述通过链替换(chain shuffling) (Marks 等, *BioTechnology* 10:779-783 (1992),其在此通过引用整体并入)以及组合感染和体内重组作为构建非常大

的噬菌体库的策略 (Waterhouse 等, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993), 其在此通过引用整体并入) 生成高亲和性 (nM 范围) 的人抗体。因此, 这些技术为用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的适宜供选方案。

[0041] 或者, 单克隆抗体可使用如在 Cabilly 等的美国专利 4, 816, 567 中所述的重组 DNA 方法制造, 该专利在此通过引用整体并入。编码单克隆抗体的多核苷酸例如通过 RT-PCR 使用特异性扩增编码抗体的重链和轻链的基因的低聚核苷酸引物从成熟的 B 细胞或杂交瘤细胞中分离。随后将编码所述重链和轻链的分离的多核苷酸克隆成合适的表达载体, 在转染到诸如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞的宿主细胞或不另外生成免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中时, 其产生单克隆抗体。

[0042] 所述 CD11b 抗体也可为人源化或嵌合抗体。“人源化”形式的非人 (例如, 啮齿动物) 抗体为含有来源于非人抗体的最小序列的嵌合抗体。在很大程度上, 人源化抗体为人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中来自所述抗体的超突变区的残基被来自具有所要抗体特异性、亲和性和能力的诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的非人物种 (供体抗体) 的超突变区的残基替代。在有些情况下, 所述人免疫球蛋白的构架区 (FR) 残基由相应非人残基替代。另外, 人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有见到的残基。进行这些改性以进一步精制抗体性能。通常, 所述人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变域的基本全部, 其中全部或基本全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环且全部或基本全部的 FR 为人免疫球蛋白序列的那些 FR。所述人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分。对于进一步的细节, 参见 Jones 等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-329 (1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992), 它们在此通过引用整体并入。

[0043] 嵌合抗体优选具有基本或专门来源于人抗体恒定区的恒定区和基本或专门来源于来自除人外的哺乳动物的可变区的序列的可变区。嵌合过程可通过还用相应人序列替代鼠 (或其它非人哺乳动物) 抗体的可变区 (除高变区或 CDR 外) 而更有效地进行。除 CDR 外的可变区也称作可变框架区 (FRs)。本发明的又一单克隆抗体为双特异性单克隆抗体, 因为它们对于 LukA 和 / 或 LukB 和 CD11b 两者具有特异性。双特异性抗体优选为人或人源化抗体。

[0044] 如在本文中的实施例中所所述, CD11b 特异性抗体在本领域中已知 (也参见 Dana 等, “Two Functional Domains in the Phagocyte Membrane Glycoprotein Mol1 identified with Monoclonal Antibodies,” *J. Immunol.* 137:3259-3263 (1986) 和 Jaeschke 等, “Functional Inactivation of Neutrophils with Mac-1 (CD11b/CD18) Monoclonal Antibody Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Liver,” *Hepatology* 17(5)915-923 (1993), 它们在此通过引用整体并入)。特别合适的抗体为结合 CD11b 的人 I- 域的鼠 LM2/1CD11b 抗体 (Santa Cruz)。具有与 LM2/1CD11b 抗体相同的抗原结合域的类型抗体, 即人或人源化抗体, 也适合在本发明的方法中使用。许多其它人 CD11b 和 CD11b/CD18 抗体也是市售的, 参见例如得自 DAKO (Carpinteria, CA) 的抗 -CR3 (CD11b/CD18) 抗体和 2LPM19c (抗 -CD11b 抗体) 及得自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 的  $\alpha$  M-44 抗体 (CD11b)。

[0045] 在本发明的该方面的另一实施方式中,合适的 CD11b 抑制剂为小分子抑制剂。合适的小分子 CD11b 抑制剂在本领域中已知且包括氯化 2-[4-(3,4-二氢-2H-喹啉-1-基)-丁-1,3-二烯基]-1-乙基萘 [1,2-d] 噻唑-1-鎓 (化合物 1) 及其衍生物,和碘化 1-乙基-2-/3-/1-乙基苯并噻唑啉-2-亚基/丙烯基/-噻唑鎓 (化合物 2) 及其衍生物 (Bansal 等,“Small Molecule Antagonists of Complement Receptor Type 3Bock Adhesion and Adhesion-Dependent Oxidative Burst in Human Polymorphonuclear Leukocytes,” J. Pharm. Exp. Therap. 304(3):1016-1024(2003), 其在此通过引用整体并入)。使用体外配体结合测定或细胞粘附测定测量,这些小分子抑制剂 (即,化合物 1 和 2) 的合适衍生物包括维持阻断配体与 CD11b/CD18 受体复合物结合的能力的任何衍生化合物。也适合在本发明的方法中使用的例示性衍生物小分子抑制剂由 Bansal 等,“Small Molecule Antagonists of Complement Receptor Type 3Bock Adhesion and Adhesion-Dependent Oxidative Burst in Human Polymorphonuclear Leukocytes,” J. Pharm. Exp. Therap. 304(3):1016-1024(2003) 描述,该文献在此通过引用整体并入。

[0046] 适合在本发明的方法中使用的 CD11b 的另一小分子抑制剂包含 N-[9H-(2,7-二甲基芴基-9-甲氧基)羰基]-L-亮氨酸 (NPC 15669) (参见 Bator 等,“N-[9H-(2,7-dimethylfluorenyl-9-methoxy) carbonyl]-L-leucine, NPC 15669, Prevents Neutrophil Adherence to Endothelium and Inhibits CD11b/CD18Upregulation,” Immunopharmacology 23(2):139-49(1992), 其在此通过引用整体并入)。

[0047] 根据本发明的方法治疗的合适受试者包括而不限于任何动物,优选哺乳动物,更优选人。合适的受试者包括免疫低下或非免疫低下的婴儿、青少年和成人。在本发明的一个实施方式中,所述受试者具有甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 感染或处于具有甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 感染的危险中。在本发明的另一实施方式中,所述受试者具有甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA) 感染或处于具有甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA) 感染的危险中。其它合适的受试者包括可能具有发展由金黄色葡萄球菌感染引起的病状或处于发展由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的危险中的那些受试者,所述病状为金黄色葡萄球菌相关病状,诸如皮肤创伤和感染、组织脓肿、毛囊炎、骨髓炎、肺炎、烫伤样皮肤综合征、败血症、脓毒性关节炎、心肌炎、心内膜炎和中毒性休克综合征。

[0048] 在本发明的一个实施方式中,将所述 CD11b 抑制剂预防性施用以预防、延迟或抑制在处于获得金黄色葡萄球菌感染或相关病状的危险中的受试者中的金黄色葡萄球菌感染的发展。在本发明的一些实施方式中,预防性施用 CD11b 抑制剂有效地完全预防在个体中的金黄色葡萄球菌感染。在其它实施方式中,预防性施用有效预防在缺乏所述施用的情况下将另外发展的最大程度的感染,即基本预防或抑制在个体中的金黄色葡萄球菌感染。

[0049] 在本发明的另一实施方式中,将所述 CD11b 抑制剂治疗性施用到具有金黄色葡萄球菌感染的个体以抑制所述感染的进一步发展,即抑制所述感染散布到在个体中的其它细胞。

[0050] 根据正治疗的金黄色葡萄球菌感染的性质,本发明的治疗组合物可作为组合疗法的一部分结合另一活性剂施用。所述其它活性剂包括抗感染剂、抗生素剂和抗微生物剂。

[0051] 可用于本发明的代表性抗感染剂包括万古霉素和溶葡萄球菌素。其它抗感染剂包括 LukAB 抑制剂,如在 Torres 等的美国专利申请公告 2011/0274693 号中所述,该专利公告在

此通过引用整体并入；LukED 抑制剂或抗体，如在 Torres 等的美国专利公告 2013/0017203 号中所述，该专利公告在此通过引用整体并入；和 CCR5 抑制剂，Torres 等的 2013/0039885，其在此通过引用整体并入。

[0052] 可用于本发明的代表性抗生素剂和抗微生物剂包括青霉素酶抗性青霉素、头孢菌素 (cephalosporins) 和美罗培南 (carbapenems)，包括万古霉素、溶葡萄球菌素、青霉素 G、氨苄西林 (ampicillin)、苯唑西林 (oxacillin)、萘夫西林 (nafcillin)、氯唑西林 (cloxacillin)、双氯西林 (dicloxacillin)、头孢噻吩 (cephalothin)、头孢唑林 (cefazolin)、头孢胺苄 (cephalexin)、头孢环己烯 (cephradine)、头孢孟多 (cefamandole)、头孢西丁 (cefoxitin)、亚胺培南 (imipenem)、美罗培南 (meropenem)、庆大霉素 (gentamycin)、替考拉宁 (teicoplanin)、林可霉素 (lincomycin) 和克林霉素 (clindamycin)。这些抗生素的配量在本领域中熟知 (参见，例如 M<sub>ERCK</sub> M<sub>ANUAL OF D</sub>IAGNOSIS AND T<sub>HERAPY</sub> (Beers&Berkow 编, 2004)，其在此通过引用整体并入)。所述抗感染、抗生素和 / 或抗微生物剂可在施用本发明的 CD11b 抑制剂组合物之前组合或与其同时施用 (作为同一组合物的一部分或作为不同组合物) 或与其相继施用。在某些实施方式中，重复所述施用。

[0053] 本发明的治疗组合物可以单剂量或根据多剂量方案施用。例如，在本发明的一个实施方式中，施用相对较少剂量的所述治疗组合物，诸如一剂或两剂。在本发明的另一实施方式中，将所述治疗组合物较频繁地施用，例如每日施用，直至感染的水平减小或消失。在包括通常包括经数天或数周时间的多剂量的常规抗生素疗法的实施方式中，所述抗生素可每日施用一次、两次或三次或多次历时一段时间，例如至少 5 天、10 天或甚至 14 天或更多天，而所述 CD11b 抑制剂组合物仅施用一次或两次。然而，所述治疗组合物和抗生素的不同剂量、配药时间和相对量可基于正治疗的受试者和感染且应该由本领域的普通技术人员基于正治疗的受试者和感染来选择并调节。

[0054] 在使用本发明的 CD11b 抑制组合物来预防金黄色葡萄球菌感染的情况下，所述抑制 CD11b 组合物的浓度必须足以实现金黄色葡萄球菌感染的预防或明显预防，特别是在易感人群 (即，婴儿、青少年、成人或免疫低下的婴儿、青少年或成年) 中的金黄色葡萄球菌的预防。在使用治疗组合物处理金黄色葡萄球菌感染的情况下，CD11b 抑制组合物的剂量为足以抑制 LukAB 介导的细胞毒性且能够实现症状数目减少、至少一种症状的严重性减小或延迟至少一种症状的进一步进展或甚至全面减轻所述感染的剂量。

[0055] 用于抑制 LukAB 介导的细胞毒性的 CD11b 抑制剂的治疗有效量可根据标准程序确定，其考虑许多因子，例如包括这些活性剂在组合物中的浓度、施用模式和频率、欲治疗 (或预防) 的金黄色葡萄球菌感染的严重性、和诸如年龄、体重和总体健康及免疫情况的受试者详情。一般指南可在例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990) 中找到，其在此通过引用整体并入。临床医师可施用 CD11b 抑制组合物，直至达到提供所要或需要的预防或治疗作用的剂量。该疗法的进程可通过常规测定容易地监测。

[0056] 本发明的试剂可通过肠胃外、局部、静脉内、经口、皮下、腹膜内、鼻内或肌肉内方式施用用于预防性和 / 或治疗性治疗。

[0057] 本发明的医药剂可配制用于肠胃外施用。所述试剂的溶液或悬浮液可在合适地与诸如羟丙基纤维素的表面活性剂混合的水中制备。分散体也可在甘油、液态聚乙二醇及其

在油中的混合物中制备。说明性油为石油、动物、植物或合成来源的那些油，例如花生油、大豆油或矿物油。通常，水、盐水、水性右旋糖和有关的糖液和诸如丙二醇或聚乙二醇的二醇为优选的液态载剂，特别是对于可注射溶液。在普通的储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0058] 适合可注射用途的医药制剂包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下，所述形式必须为无菌的且必须为易于注射的流体。在制造和储存条件下，所述组合物必须稳定且必须在贮存中防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。载剂可为溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇）、其合适的混合物及植物油。

[0059] 当需要全身传送本发明的医药剂时，可将它们配制成通过注射，例如通过弹丸注射或连续输液来肠胃外施用。注射用制剂可以单位剂量呈现，例如在安瓿中或在多剂量容器中，并加有防腐剂。所述组合物可采用诸如在油性或水性媒剂中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式，且可含有诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂的配制剂。

[0060] 本发明试剂的腹膜内和鞘内施用也可使用诸如 Medtronic, Northridge, CA 描述的那些的输液泵装置实现。所述装置允许所要化合物的连续输液，避免多重注射和多重操作。

[0061] 除了先前描述的制剂之外，所述试剂还可配制为储存制剂。所述长效制剂可用合适的聚合或疏水材料（例如，配制为在可接受的油中的乳剂）或离子交换树脂配制，或配制为微溶性衍生物，例如配制为微溶性盐。

[0062] 本发明的另一方面涉及转基因非人动物，所述转基因非人动物的基因组包含包含编码人 CD11b 的多核苷酸序列的稳定整合的表达构建体。

[0063] 编码人 CD11b 的合适核苷酸序列在本领域中已知且在下文显示为 SEQ ID NO:1(NCBI 登录号 NM\_000632) 和 SEQ ID NO:3(NCBI 登录号 NM\_001145808)。相应的 CD11b 氨基酸序列在下文还分别显示为 SEQ ID NO:2(NCBI 登录号 NP\_000632) 和 SEQ ID NO:4(NM\_00001139280)。

[0064] SEQ ID NO :1

[0065]

```
tggcttcctt gtggctctc agtggtgctt gcaaccctg gttcaacctc ttccaggctc      60
tggctctctc cagccatggc tctcagagtc cttctgttaa cagccttgac cttatgtcat      120
gggttcaact tggacaactga aaacgcaatg accttccaag agaacgcaag gggcttcggg      180
cagagcgtgg tcagcttca gggatccagg gtgggtggtg gagcccccca ggagatagtg      240
gctgccaaac aaaggggcag cctctaccag tgcgactaca gcacaggctc atgcgagccc      300
atccgcctgc aggtccccgt ggaggccgtg aacatgtccc tgggcctgtc cctggcagcc      360
```

[0066]

accaccagcc cccctcagct gctggcctgt ggtcccaccg tgcaccagac ttgcagtgag	420
aacacgtatg tgaagggtct ctgcttctctg tttggatoca acctacggca gcagccccag	480
aagtccccag aggccctccg aggggtgtcct caagaggata gtgacattgc cttcttgatt	540
gatggctctg gtagcatcat cccacatgac tttcggcgga tgaaggagt tgtctcaact	600
gtgatggagc aattaaaaaa gtecaaaacc ttgttctctt tgatgcagta ctctgaagaa	660
ttccggatcc actttacctt caaagagttc cagaacaacc ctaaccaag atcactgggtg	720
aagccaataa cgcagctgct tgggcggaaca cacacggcca cgggcatccg caaagtggta	780
cgagagctgt ttaacatcac caacggagcc cgaaagaatg cctttaagat cctagttgtc	840
atcacggatg gagaaaagtt tggcgatccc ttgggatatg aggatgtcat ccctgaggca	900
gacagagagg gagtcatcog ctacgtcatt ggggtgggag atgccttccg cagtgagaaa	960
tcccgccaaag agcttaatac catcgcatcc aagccgcctc gtgatcacgt gttccaggtg	1020
aataactttg aggctctgaa gaccattcag aaccagcttc gggagaagat ctttgcgatc	1080
gagggtactc agacaggaag tagcagctcc tttgagcatg agatgtctca ggaaggcttc	1140
agcgtgcca tcacctctaa tggccccttg ctgagcactg tggggagcta tgactgggct	1200
ggtggagtct ttctatatac atcaaaggag aaaagcacct tcatcaacat gaccagagtg	1260
gattcagaca tgaatgatgc ttacttgggt tatgctgcog ccatcatctt acggaaccgg	1320
gtgcaaagcc tggttctggg ggcacctcga tatcagcaca tggcctgggt agcgatgttc	1380
aggcagaaca ctggcatgtg ggagtccaac gctaattgtca agggcaccca gatcggcgcc	1440
tacttcgggg cctcctctg ctccgtggac gtggacagca acggcagcac cgacctggtc	1500
ctcatcgggg cccccatta ctacgagcag acccgagggg gccaggtgtc cgtgtgcccc	1560
ttgcccaggg ggagggtctg gtggcagtgt gatgctgttc tctacgggga gcaggggcaa	1620
ccctggggcc gctttggggc agccctaaca gtgctggggg acgtaaattg ggacaagctg	1680
acggactgtg ccattggggc ccaggagag gaggacaacc ggggtgctgt ttaacctgtt	1740
cacggaacct caggatctgg catcagcccc tccatagcc agcggatagc aggtccaag	1800
ctctctccca ggctccagta ttttggtcag tcaactgagtg ggggcccagga cctcacaatg	1860
gatggaactg tagacctgac tgtaggagcc caggggcaag tgctgctgct caggteccag	1920
ccagtactga gagtcaaggc aatcatggag ttcaatccca gggaagtggc aaggaatgta	1980
tttgagtgta atgatcaggt ggtgaaaggc aaggaagccg gagaggtcag agtctgcctc	2040
catgtccaga agagcacacg ggatcggcta agagaaggac agatccagag tgttgtgact	2100
tatgacctgg ctctggactc cggccgccc aattcccgcg cegtcttcaa tgagacaaag	2160
aacagcacac gcagacagac acaggtcttg gggctgacct agacttgtga gaccctgaaa	2220
ctacagttgc cgaattgcat cgaggaccca gtgagcccca ttgtgctgog cctgaacttc	2280

[0067]

tctctgggtgg gaacgccatt gtctgctttc gggaaacctcc ggccagtgct ggccggaggat	2340
gctcagagac tcttcacagc cttgtttccc ttgagaaga attgtggcaa tgacaacatc	2400
tgccaggatg acctcagcat caccttcagt ttcattgagcc tggactgcct cgtggtgggt	2460
ggccccggg agttcaacgt gacagtgact gtgagaaatg atggtgagga ctctacagg	2520
acacaggta ccttcttctt cccgcttgac ctgtctacc ggaagggtgc cacactccag	2580
aaccagcgt cacagcagc ctggcgctg gcctgtgagt ctgcctctc caccgaagtg	2640
tctggggcct tgaagagcac cagctgcagc ataaaccacc ccatcttccc ggaaaactca	2700
gaggtaacct ttaatatcac gtttgatgta gactctaagg ctcccttgg aaacaaactg	2760
ctcctcaagg ccaatgtgac cagtgagaac aacatgccca gaaccaacaa aaccgaatc	2820
caactggagc tgccggtgaa atatgctgtc tacatggtgg tcaccagcca tggggtctcc	2880
actaaatata tcaacttcac ggctcagag aataccagtc gggtcattgca gcataatat	2940
caggtcagca acctggggca gaggagccc cccatcagcc tgggtttctt ggtgcccgtc	3000
cggtgaacc agactgtcat atgggaccgc cccaggtca ccttctcca gaacctctc	3060
agtacgtgcc acaccaagga ggccttccc tctactccg actttctggc tgagcttcgg	3120
aaggccccg tgggtaactg ctccatcgt gtctgccaga gaatccagtg tgacatccc	3180
ttctttggca tccaggaaga attcaatgt accctcaaag gcaacctctc gtttgactgg	3240
tacatcaaga cctgcataa ccacctctg atcgtgagca cagctgagat cttgtttaac	3300
gattccgtgt tcacctgtt gccgggacag ggggcgtttg tgaggtecca gacggagaac	3360
aaagtggagc cgttcagggt ccccaacccc ctgccgtca tegtgggag ctctgtcggg	3420
ggactgtgc tctggccct catcaccgc gcgctgtaca agctcggctt cttcaagcgg	3480
caatacaagg acatgatgag tgaaggggt cccccgggg cgaaccca gtagcggctc	3540
cttccgaca gagetgctc tcggtggcca gcaggactct gccagacca cacgagcccc	3600
caggctgctg gacacgtgg acagcgaagt atccccgaca ggacgggctt gggcttccat	3660
ttgtgtgtgt gcaagtgtgt atgtgctgt gtgcgagtgt gtgcaagtgt ctgtgtgcaa	3720
gtgtgtgac gtgtgctgt gcgtgcatgt gcactcgcac gccatgtgt gagtgtgtgc	3780
aagtatgtga gtgtgtccag tgtgtgtgcg tgtgtccatg tgtgtgcagt gtgtgcatgt	3840
gtgcgagtgt gtgcatgtgt gtgtcaggg gctgtgctc acgtgtgtga ctcagagtgt	3900
ctctggcgtg tgggtagggt acggcagcgt agcctctcc gcagaagga actgctcggg	3960
ctcccttgtg cgtgggtaag ccgctgctgg gtttctctc gggagagggg acggtcaatc	4020
ctgtgggtga agagagaggg aaacacagca gcctctctc actgaaagaa gtgggacttc	4080
ccgtgcctg cgagcctgcg gcctgctgga gcctgcgcag ctgggatgga tactccatga	4140

[0068]

```

gaaaagccgt ggggtggaacc aggagcctcc tccacaccag cgctgatgcc caataaagat 4200
goccaactgag gaatcatgaa gcttcctttc tggattcatt tattatttca atgtgacttt 4260
aatTTTTTgg atggataagc ctgtctatgg tacaaaaatc acaaggcatt caagtgtaca 4320
gtgaaaagtc tccctttcca gatattcaag tcacctcctt aaaggtagtc aagattgtgt 4380
tttgaggttt ccttcagaca gattccaggc gatgtgcaag tgtatgcacg tgtgcacaca 4440
ccacacacat acacacacac aagctTTTTT acacaaatgg tagcatactt tatattggtc 4500
tgtatcttgc tttttttcac caatatttct cagacatcgg ttcataattaa gacataaatt 4560
actTTTTcat tcttttatac cgctgcatag tattccattg tgtgagtgtc ccataatgta 4620
tttaaccagt cttcttttga tatactattt tcatctcttg ttattgcacg tgctgagtta 4680
ataaatcaaa tatatgtcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740
    
```

[0069] SEQ ID NO :2

[0070]

```

Met Ala Leu Arg Val Leu Leu Leu Thr Ala Leu Thr Leu Cys His Gly
1           5           10           15
Phe Asn Leu Asp Thr Glu Asn Ala Met Thr Phe Gln Glu Asn Ala Arg
20          25          30
Gly Phe Gly Gln Ser Val Val Gln Leu Gln Gly Ser Arg Val Val Val
35          40          45
Gly Ala Pro Gln Glu Ile Val Ala Ala Asn Gln Arg Gly Ser Leu Tyr
50          55          60
Gln Cys Asp Tyr Ser Thr Gly Ser Cys Glu Pro Ile Arg Leu Gln Val
65          70          75          80
Pro Val Glu Ala Val Asn Met Ser Leu Gly Leu Ser Leu Ala Ala Thr
85          90          95
Thr Ser Pro Pro Gln Leu Leu Ala Cys Gly Pro Thr Val His Gln Thr
100         105         110
Cys Ser Glu Asn Thr Tyr Val Lys Gly Leu Cys Phe Leu Phe Gly Ser
115        120        125
Asn Leu Arg Gln Gln Pro Gln Lys Phe Pro Glu Ala Leu Arg Gly Cys
130        135        140
Pro Gln Glu Asp Ser Asp Ile Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Gly Ser
145        150        155        160
Ile Ile Pro His Asp Phe Arg Arg Met Lys Glu Phe Val Ser Thr Val
165        170        175
Met Glu Gln Leu Lys Lys Ser Lys Thr Leu Phe Ser Leu Met Gln Tyr
180        185        190
Ser Glu Glu Phe Arg Ile His Phe Thr Phe Lys Glu Phe Gln Asn Asn
195        200        205
    
```

[0071]

Pro Asn Pro Arg Ser Leu Val Lys Pro Ile Thr Gln Leu Leu Gly Arg  
 210 215 220  
 Thr His Thr Ala Thr Gly Ile Arg Lys Val Val Arg Glu Leu Phe Asn  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Asn Gly Ala Arg Lys Asn Ala Phe Lys Ile Leu Val Val Ile  
 245 250 255  
 Thr Asp Gly Glu Lys Phe Gly Asp Pro Leu Gly Tyr Glu Asp Val Ile  
 260 265 270  
 Pro Glu Ala Asp Arg Glu Gly Val Ile Arg Tyr Val Ile Gly Val Gly  
 275 280 285  
 Asp Ala Phe Arg Ser Glu Lys Ser Arg Gln Glu Leu Asn Thr Ile Ala  
 290 295 300  
 Ser Lys Pro Pro Arg Asp His Val Phe Gln Val Asn Asn Phe Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Thr Ile Gln Asn Gln Leu Arg Glu Lys Ile Phe Ala Ile Glu  
 325 330 335  
 Gly Thr Gln Thr Gly Ser Ser Ser Ser Phe Glu His Glu Met Ser Gln  
 340 345 350  
 Glu Gly Phe Ser Ala Ala Ile Thr Ser Asn Gly Pro Leu Leu Ser Thr  
 355 360 365  
 Val Gly Ser Tyr Asp Trp Ala Gly Gly Val Phe Leu Tyr Thr Ser Lys  
 370 375 380  
 Glu Lys Ser Thr Phe Ile Asn Met Thr Arg Val Asp Ser Asp Met Asn  
 385 390 395 400  
 Asp Ala Tyr Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Ile Ile Leu Arg Asn Arg Val  
 405 410 415  
 Gln Ser Leu Val Leu Gly Ala Pro Arg Tyr Gln His Ile Gly Leu Val  
 420 425 430  
 Ala Met Phe Arg Gln Asn Thr Gly Met Trp Glu Ser Asn Ala Asn Val  
 435 440 445  
 Lys Gly Thr Gln Ile Gly Ala Tyr Phe Gly Ala Ser Leu Cys Ser Val  
 450 455 460  
 Asp Val Asp Ser Asn Gly Ser Thr Asp Leu Val Leu Ile Gly Ala Pro  
 465 470 475 480  
 His Tyr Tyr Glu Gln Thr Arg Gly Gly Gln Val Ser Val Cys Pro Leu  
 485 490 495  
 Pro Arg Gly Arg Ala Arg Trp Gln Cys Asp Ala Val Leu Tyr Gly Glu  
 500 505 510  
 Gln Gly Gln Pro Trp Gly Arg Phe Gly Ala Ala Leu Thr Val Leu Gly  
 515 520 525

[0072]

Asp Val Asn Gly Asp Lys Leu Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gly  
 530 535 540  
 Glu Glu Asp Asn Arg Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Gly Thr Ser Gly  
 545 550 555 560  
 Ser Gly Ile Ser Pro Ser His Ser Gln Arg Ile Ala Gly Ser Lys Leu  
 565 570 575  
 Ser Pro Arg Leu Gln Tyr Phe Gly Gln Ser Leu Ser Gly Gly Gln Asp  
 580 585 590  
 Leu Thr Met Asp Gly Leu Val Asp Leu Thr Val Gly Ala Gln Gly His  
 595 600 605  
 Val Leu Leu Leu Arg Ser Gln Pro Val Leu Arg Val Lys Ala Ile Met  
 610 615 620  
 Glu Phe Asn Pro Arg Glu Val Ala Arg Asn Val Phe Glu Cys Asn Asp  
 625 630 635 640  
 Gln Val Val Lys Gly Lys Glu Ala Gly Glu Val Arg Val Cys Leu His  
 645 650 655  
 Val Gln Lys Ser Thr Arg Asp Arg Leu Arg Glu Gly Gln Ile Gln Ser  
 660 665 670  
 Val Val Thr Tyr Asp Leu Ala Leu Asp Ser Gly Arg Pro His Ser Arg  
 675 680 685  
 Ala Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Ser Thr Arg Arg Gln Thr Gln Val  
 690 695 700  
 Leu Gly Leu Thr Gln Thr Cys Glu Thr Leu Lys Leu Gln Leu Pro Asn  
 705 710 715 720  
 Cys Ile Glu Asp Pro Val Ser Pro Ile Val Leu Arg Leu Asn Phe Ser  
 725 730 735  
 Leu Val Gly Thr Pro Leu Ser Ala Phe Gly Asn Leu Arg Pro Val Leu  
 740 745 750  
 Ala Glu Asp Ala Gln Arg Leu Phe Thr Ala Leu Phe Pro Phe Glu Lys  
 755 760 765  
 Asn Cys Gly Asn Asp Asn Ile Cys Gln Asp Asp Leu Ser Ile Thr Phe  
 770 775 780  
 Ser Phe Met Ser Leu Asp Cys Leu Val Val Gly Gly Pro Arg Glu Phe  
 785 790 795 800  
 Asn Val Thr Val Thr Val Arg Asn Asp Gly Glu Asp Ser Tyr Arg Thr  
 805 810 815  
 Gln Val Thr Phe Phe Phe Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Val Ser  
 820 825 830  
 Thr Leu Gln Asn Gln Arg Ser Gln Arg Ser Trp Arg Leu Ala Cys Glu  
 835 840 845

[0073]

Ser Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Gly Ala Leu Lys Ser Thr Ser Cys  
 850 855 860  
 Ser Ile Asn His Pro Ile Phe Pro Glu Asn Ser Glu Val Thr Phe Asn  
 865 870 875 880  
 Ile Thr Phe Asp Val Asp Ser Lys Ala Ser Leu Gly Asn Lys Leu Leu  
 885 890 895  
 Leu Lys Ala Asn Val Thr Ser Glu Asn Asn Met Pro Arg Thr Asn Lys  
 900 905 910  
 Thr Glu Phe Gln Leu Glu Leu Pro Val Lys Tyr Ala Val Tyr Met Val  
 915 920 925  
 Val Thr Ser His Gly Val Ser Thr Lys Tyr Leu Asn Phe Thr Ala Ser  
 930 935 940  
 Glu Asn Thr Ser Arg Val Met Gln His Gln Tyr Gln Val Ser Asn Leu  
 945 950 955 960  
 Gly Gln Arg Ser Pro Pro Ile Ser Leu Val Phe Leu Val Pro Val Arg  
 965 970 975  
 Leu Asn Gln Thr Val Ile Trp Asp Arg Pro Gln Val Thr Phe Ser Glu  
 980 985 990  
 Asn Leu Ser Ser Thr Cys His Thr Lys Glu Arg Leu Pro Ser His Ser  
 995 1000 1005  
 Asp Phe Leu Ala Glu Leu Arg Lys Ala Pro Val Val Asn Cys Ser  
 1010 1015 1020  
 Ile Ala Val Cys Gln Arg Ile Gln Cys Asp Ile Pro Phe Phe Gly  
 1025 1030 1035  
 Ile Gln Glu Glu Phe Asn Ala Thr Leu Lys Gly Asn Leu Ser Phe  
 1040 1045 1050  
 Asp Trp Tyr Ile Lys Thr Ser His Asn His Leu Leu Ile Val Ser  
 1055 1060 1065  
 Thr Ala Glu Ile Leu Phe Asn Asp Ser Val Phe Thr Leu Leu Pro  
 1070 1075 1080  
 Gly Gln Gly Ala Phe Val Arg Ser Gln Thr Glu Thr Lys Val Glu  
 1085 1090 1095  
 Pro Phe Glu Val Pro Asn Pro Leu Pro Leu Ile Val Gly Ser Ser  
 1100 1105 1110  
 Val Gly Gly Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Thr Ala Ala Leu Tyr  
 1115 1120 1125  
 Lys Leu Gly Phe Phe Lys Arg Gln Tyr Lys Asp Met Met Ser Glu  
 1130 1135 1140  
 Gly Gly Pro Pro Gly Ala Glu Pro Gln  
 1145 1150

[0074] SEQ ID NO :3

[0075]

ttttctgccc	ttctttgctt	tggtggcttc	cttgtggttc	ctcagtggtg	cctgcaaccc	60
ctggttcacc	tccttcacgg	ttctggctec	ttccagccat	ggctctcaga	gtcctttctgt	120
taacagcctt	gaccttatgt	catgggttca	acttggacac	tgaaaacgca	atgaccttcc	180
aagagaacgc	aaggggcttc	gggcagagcg	tggtccagct	tcagggatcc	agggtgggtg	240
ttggagcccc	ccaggagata	gtggctgcca	accaaagggg	cagcctctac	cagtgcgact	300
acagcacagg	ctcatgcgag	cccatccgcc	tgcaggtecc	cgtggaggcc	gtgaacatgt	360
ccctgggcct	gtccctggca	gccaccacca	gccccctca	gctgctggcc	tgtggtecca	420
ccgtgcacca	gacttgcagt	gagaacacgt	atgtgaaagg	gctctgcttc	ctgtttggat	480
ccaacctacg	gcagcagccc	cagaagttcc	cagaggccct	ccgaggggtg	cctcaagagg	540
atagtacat	tgctttcttg	attgatggct	ctggtagcat	catcccacat	gactttcggc	600
ggatgaagga	gtttgtctca	actgtgatgg	agcaattaa	aaagtccaaa	acctgtttct	660
ctttgatgca	gtactctgaa	gaattccgga	ttcactttac	cttcaaagag	ttccagaaca	720
acctaaccc	aagatcactg	gtgaagccaa	taacgcagct	gcttgggggg	acacacacgg	780
ccacgggcat	ccgcaaagtg	gtacgagagc	tgtttaacat	caccaacgga	gcccgaagaa	840
atgcctttaa	gacccatggt	gtcatcacgg	atggagaaaa	gtttggcgat	cccttgggat	900
atgaggatgt	catccctgag	gcagacagag	agggagtcat	tcgctacgtc	attgggggtg	960
gagatgcctt	ccgcagtgag	aaatcccgcc	aagagcttaa	taccatcgca	tccaagccgc	1020
ctcgtgatca	cgtgttcacg	gtgaataact	ttgaggctct	gaagaccatt	cagaaccagc	1080
ttcgggagaa	gatctttgcg	atcgagggta	ctcagacagg	aagtagcagc	tcctttgagc	1140
atgagatgtc	tcaggaaggc	ttcagcgctg	ccatcacctc	taatggcccc	ttgctgagca	1200
ctgtggggag	ctatgactgg	gctggtggag	tctttctata	tacatcaaag	gagaaaagca	1260
ccttcatcaa	catgaccaga	gtggattcag	acatgaatga	tgcttacttg	ggttatgctg	1320
ccgccatcat	cttacggaac	cgggtgcaaa	gcctggttct	gggggcacct	cgatatcagc	1380
acatcggcct	ggtagcgatg	ttcaggcaga	acactggcat	gtgggagtcc	aacgctaattg	1440
tcaagggcac	ccagatcggc	gcctacttcg	gggcctccct	ctgctccgtg	gacgtggaca	1500
gcaacggcag	caccgacctg	gtcctcatcg	gggcccccca	ttactacgag	cagacccgag	1560
ggggccaggt	gtccgtgtgc	cccttgccca	gggggcagag	ggctcgggtg	cagtgtgatg	1620
ctgttctcta	cggggagcag	ggccaacct	ggggccgctt	tggggcagcc	ctaacagtgc	1680
tgggggacgt	aaatggggac	aagctgacgg	acgtggccat	tggggccccca	ggagaggagg	1740
acaaccgggg	tgctgtttac	ctgtttcaag	gaacctcagg	atctggcattc	agccccctcc	1800
atagccagcg	gatagcaggc	tccaagctct	ctcccaggct	ccagtatitt	ggtcagtcac	1860

[0076]

tgagtggggg ccaggacctc acaatggatg gactggtaga cctgactgta ggagcccagg 1920  
ggcacgtgct getgctcagg tcccagccag tactgagagt caaggcaatc atggagttca 1980  
atcccagggg agtggcaagg aatgtatgtg agtgtaatga tcaggtgggt aaaggcaagg 2040  
aagccggaga ggtcagagtc tgcctccatg tccagaagag cacacgggat cggctaagag 2100  
aaggacagat ccagagtgtt gtgacttatg acctggctct ggactccggc cggccacatt 2160  
cccgcgccgt cttcaatgag acaaagaaca gcacacgag acagacacag gtcttggggc 2220  
tgacccagac ttgtgagacc ctgaaactac agttgccgaa ttgcatcgag gacccagtga 2280  
gccccattgt gctgcgctg aacttctctc tgggtgggaa gccattgtct gctttcggga 2340  
acctccggcc agtgctggcg gaggatgctc agagactctt cacagccttg tttccctttg 2400  
agaagaattg tggcaatgac aacatctgcc aggatgacct cagcatcacc ttcagtttca 2460  
tgagcctgga ctgcctcgtg gtgggtgggc cccgggagtt caacgtgaca gtgactgtga 2520  
gaaatgatgg tgaggactcc tacaggacac aggtcacctt cttcttcccg cttgacctgt 2580  
cctaccggaa ggtgtccacg ctccagaacc agcgcacaca gcgatcctgg cgcctggcct 2640  
gtgagtctgc ctctccacc gaagtgtctg gggccttgaa gagcaccagc tgcagcataa 2700  
accaccccat cttcccgaa aactcagagg tcacctttaa taccagttt gatgtagact 2760  
ctaaggcttc ccttggaac aaactgctcc tcaaggcaa tgtgaccagt gagaacaaca 2820  
tgcccagaac caacaaaacc gaattccaac tggagctgcc ggtgaaatat gctgtctaca 2880  
tgggtggtcac cagccatggg gtctccacta aatattctaa cttcacggcc tcagagaata 2940  
ccagtccggg catgcagcat caatcagag tcagcaacct ggggcagagg agcctccca 3000  
tcagcctggt gttcttgggt cccgtccggc tgaaccagac tgcatatgg gaccgcccc 3060  
aggtcacctt ctccgagaac ctctcgagta cgtgccacac caaggagcgc ttgccctctc 3120  
actccgactt tctggctgag ctccggaagg cccccgtggt gaactgctcc atcgtgtct 3180  
gccagagaat ccagtgtgac atcccgttct ttggcatcca ggaagaattc aatgctacce 3240  
tcaaaggcaa cctctcgttt gactggtaca tcaagacctc gcataaccac ctctgatcg 3300  
tgagcacagc tgagatcttg ttaacgatt ccgtgttcac cctgctgccg ggacaggggg 3360  
cgtttgtgag gtcccagacg gagaccaaag tggagccgtt cgaggctccc aaccocctgc 3420  
cgctcatcgt gggcagctct gtcgggggac tgctgctect ggccctcatc accgccgcgc 3480  
tgtacaagct cgcttcttc aagcggcaat acaaggacat gatgagtga gggggtcccc 3540  
cgggggcoga accccagtag cggctcctc ccgacagagc tgcctctcgg tggccagcag 3600  
gactctgccc agaccacaag tagccccag gctgctggac acgtcggaca gcgaagtatc 3660  
cccagacagga cgggcttggg cttccatttg tgtgtgtgca agtgtgtatg tgcgtgtgtg 3720

[0077]

```

caagtgtctg tgtgcaagtg tgtgcacatg tgtgctgtg cgtgcatgtg caettgcacg      3780
cccatgtgtg agtgtgtgca agtatgtgag tgtgtccaag tgtgtgtgcg tgtgtccatg      3840
tgtgtgcaag tgtgtgcatg tgtgcgagtg tgtgcatgtg tgtgtctcagg ggcgtgtggc      3900
tcaagtgtgt gactcagatg tctctggcgt gtgggttaggt gaoggcagcg tagcctctcc      3960
ggcagaaggg aactgcctgg gctcccttgt gcggtgggtga agcoctgct gggttttctc      4020
ccgggagagg ggacgggtcaa tctgtgtggg gaagacagag ggaaacacag cagcttctct      4080
ccactgaaag aagtgggact tcccgtcgc tgcgagcctg cggcctgctg gagcctgcgc      4140
agcttggatg gagactccat gagaagccgt ggggtggaacc aggaacctcc tccacaccag      4200
cgctgatgcc caataaagat gcccaactgag gaatgatgaa gcttctcttc tggattcatt      4260
tattatttca atgtgacttt aattttttgg atggataagc ttgtctatgg tacaaaaatc      4320
acaaggcatt caagtgtaca gtgaaaagtc tccctttcca gatattcaag tcacctctct      4380
aaaggtagtc aagattgtgt tttgaggttt ccttcagaca gattccaggc gatgtgcaag      4440
tgtatgcacg tgtgcacaca caccacacat acacacacac aagctttttt acacaaatgg      4500
tagcatactt tatattggtc tgtatcttgc tttttttcac caatatttct cagacatcgg      4560
ttcatattaa gacataaatt actttttcat tcttttatac cgctgcatag tattccattg      4620
tgtgagtgta ccataatgta ttaaccagt cttcttttga tatactattt tcattctctt      4680
gttattgcat caatgctgag ttaataaatc aaatatatgt catttttgca tatatgtaag      4740
gataa                                          4745
    
```

[0078] SEQ ID NO :4

[0079]

```

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

[0080]

Asn Leu Arg Gln Gln Pro Gln Lys Phe Pro Glu Ala Leu Arg Gly Cys  
 130 135 140  
 Pro Gln Glu Asp Ser Asp Ile Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Ile Ile Pro His Asp Phe Arg Arg Met Lys Glu Phe Val Ser Thr Val  
 165 170 175  
 Met Glu Gln Leu Lys Lys Ser Lys Thr Leu Phe Ser Leu Met Gln Tyr  
 180 185 190  
 Ser Glu Glu Phe Arg Ile His Phe Thr Phe Lys Glu Phe Gln Asn Asn  
 195 200 205  
 Pro Asn Pro Arg Ser Leu Val Lys Pro Ile Thr Gln Leu Leu Gly Arg  
 210 215 220  
 Thr His Thr Ala Thr Gly Ile Arg Lys Val Val Arg Glu Leu Phe Asn  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Asn Gly Ala Arg Lys Asn Ala Phe Lys Ile Leu Val Val Ile  
 245 250 255  
 Thr Asp Gly Glu Lys Phe Gly Asp Pro Leu Gly Tyr Glu Asp Val Ile  
 260 265 270  
 Pro Glu Ala Asp Arg Glu Gly Val Ile Arg Tyr Val Ile Gly Val Gly  
 275 280 285  
 Asp Ala Phe Arg Ser Glu Lys Ser Arg Gln Glu Leu Asn Thr Ile Ala  
 290 295 300  
 Ser Lys Pro Pro Arg Asp His Val Phe Gln Val Asn Asn Phe Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Thr Ile Gln Asn Gln Leu Arg Glu Lys Ile Phe Ala Ile Glu  
 325 330 335  
 Gly Thr Gln Thr Gly Ser Ser Ser Ser Phe Glu His Glu Met Ser Gln  
 340 345 350  
 Glu Gly Phe Ser Ala Ala Ile Thr Ser Asn Gly Pro Leu Leu Ser Thr  
 355 360 365  
 Val Gly Ser Tyr Asp Trp Ala Gly Gly Val Phe Leu Tyr Thr Ser Lys  
 370 375 380  
 Glu Lys Ser Thr Phe Ile Asn Met Thr Arg Val Asp Ser Asp Met Asn  
 385 390 395 400  
 Asp Ala Tyr Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Ile Ile Leu Arg Asn Arg Val  
 405 410 415  
 Gln Ser Leu Val Leu Gly Ala Pro Arg Tyr Gln His Ile Gly Leu Val  
 420 425 430  
 Ala Met Phe Arg Gln Asn Thr Gly Met Trp Glu Ser Asn Ala Asn Val  
 435 440 445

[0081]

Lys Gly Thr Gln Ile Gly Ala Tyr Phe Gly Ala Ser Leu Cys Ser Val  
 450 455 460

Asp Val Asp Ser Asn Gly Ser Thr Asp Leu Val Leu Ile Gly Ala Pro  
 465 470 475 480

His Tyr Tyr Glu Gln Thr Arg Gly Gly Gln Val Ser Val Cys Pro Leu  
 485 490 495

Pro Arg Gly Gln Arg Ala Arg Trp Gln Cys Asp Ala Val Leu Tyr Gly  
 500 505 510

Glu Gln Gly Gln Pro Trp Gly Arg Phe Gly Ala Ala Leu Thr Val Leu  
 515 520 525

Gly Asp Val Asn Gly Asp Lys Leu Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro  
 530 535 540

Gly Glu Glu Asp Asn Arg Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Gly Thr Ser  
 545 550 555 560

Gly Ser Gly Ile Ser Pro Ser His Ser Gln Arg Ile Ala Gly Ser Lys  
 565 570 575

Leu Ser Pro Arg Leu Gln Tyr Phe Gly Gln Ser Leu Ser Gly Gly Gln  
 580 585 590

Asp Leu Thr Met Asp Gly Leu Val Asp Leu Thr Val Gly Ala Gln Gly  
 595 600 605

His Val Leu Leu Leu Arg Ser Gln Pro Val Leu Arg Val Lys Ala Ile  
 610 615 620

Met Glu Phe Asn Pro Arg Glu Val Ala Arg Asn Val Phe Glu Cys Asn  
 625 630 635 640

Asp Gln Val Val Lys Gly Lys Glu Ala Gly Glu Val Arg Val Cys Leu  
 645 650 655

His Val Gln Lys Ser Thr Arg Asp Arg Leu Arg Glu Gly Gln Ile Gln  
 660 665 670

Ser Val Val Thr Tyr Asp Leu Ala Leu Asp Ser Gly Arg Pro His Ser  
 675 680 685

Arg Ala Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Ser Thr Arg Arg Gln Thr Gln  
 690 695 700

Val Leu Gly Leu Thr Gln Thr Cys Glu Thr Leu Lys Leu Gln Leu Pro  
 705 710 715 720

Asn Cys Ile Glu Asp Pro Val Ser Pro Ile Val Leu Arg Leu Asn Phe  
 725 730 735

Ser Leu Val Gly Thr Pro Leu Ser Ala Phe Gly Asn Leu Arg Pro Val  
 740 745 750

Leu Ala Glu Asp Ala Gln Arg Leu Phe Thr Ala Leu Phe Pro Phe Glu  
 755 760 765

[0082]

Lys Asn Cys Gly Asn Asp Asn Ile Cys Gln Asp Asp Leu Ser Ile Thr  
 770 775 780  
 Phe Ser Phe Met Ser Leu Asp Cys Leu Val Val Gly Gly Pro Arg Glu  
 785 790 795 800  
 Phe Asn Val Thr Val Thr Val Arg Asn Asp Gly Glu Asp Ser Tyr Arg  
 805 810 815  
 Thr Gln Val Thr Phe Phe Phe Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Val  
 820 825 830  
 Ser Thr Leu Gln Asn Gln Arg Ser Gln Arg Ser Trp Arg Leu Ala Cys  
 835 840 845  
 Glu Ser Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Gly Ala Leu Lys Ser Thr Ser  
 850 855 860  
 Cys Ser Ile Asn His Pro Ile Phe Pro Glu Asn Ser Glu Val Thr Phe  
 865 870 875 880  
 Asn Ile Thr Phe Asp Val Asp Ser Lys Ala Ser Leu Gly Asn Lys Leu  
 885 890 895  
 Leu Leu Lys Ala Asn Val Thr Ser Glu Asn Asn Met Pro Arg Thr Asn  
 900 905 910  
 Lys Thr Glu Phe Gln Leu Glu Leu Pro Val Lys Tyr Ala Val Tyr Met  
 915 920 925  
 Val Val Thr Ser His Gly Val Ser Thr Lys Tyr Leu Asn Phe Thr Ala  
 930 935 940  
 Ser Glu Asn Thr Ser Arg Val Met Gln His Gln Tyr Gln Val Ser Asn  
 945 950 955 960  
 Leu Gly Gln Arg Ser Leu Pro Ile Ser Leu Val Phe Leu Val Pro Val  
 965 970 975  
 Arg Leu Asn Gln Thr Val Ile Trp Asp Arg Pro Gln Val Thr Phe Ser  
 980 985 990  
 Glu Asn Leu Ser Ser Thr Cys His Thr Lys Glu Arg Leu Pro Ser His  
 995 1000 1005  
 Ser Asp Phe Leu Ala Glu Leu Arg Lys Ala Pro Val Val Asn Cys  
 1010 1015 1020  
 Ser Ile Ala Val Cys Gln Arg Ile Gln Cys Asp Ile Pro Phe Phe  
 1025 1030 1035  
 Gly Ile Gln Glu Glu Phe Asn Ala Thr Leu Lys Gly Asn Leu Ser  
 1040 1045 1050  
 Phe Asp Trp Tyr Ile Lys Thr Ser His Asn His Leu Leu Ile Val  
 1055 1060 1065  
 Ser Thr Ala Glu Ile Leu Phe Asn Asp Ser Val Phe Thr Leu Leu  
 1070 1075 1080

[0083]

Pro Gly	Gln Gly	Ala Phe	Val Arg	Ser Gln	Thr Glu	Thr Lys	Val
1085			1090		1095		
Glu Pro	Phe Glu	Val Pro	Asn	Pro Leu	Pro Leu	Ile Val	Gly Ser
1100			1105			1110	
Ser Val	Gly Gly	Leu Leu	Leu Leu	Ala Leu	Ile Thr	Ala Ala	Leu
1115			1120			1125	
Tyr Lys	Leu Gly	Phe Phe	Lys Arg	Gln Tyr	Lys Asp	Met Met	Ser
1130			1135			1140	
Glu Gly	Gly Pro	Pro Gly	Ala Glu	Pro Gln			
1145			1150				

[0084] 可通过本领域技术人员所熟知的任何标准技术将编码人 CD11b 蛋白或多肽的多核苷酸序列整合到转基因小鼠的基因组中。可使用本领域已知的多种技术中的任一种将转基因引入动物中以生成转基因动物的始创线（参见，例如 Hogan 等, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1986) ; Hogan 等, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1994) ; 和 Lazzarini 的美国专利 5,602,299 号 ; Krimpenfort 的美国专利 5,175,384 号 ; Ginsburg 的美国专利 6,066,778 号 ; 和 Sato 等的美国专利 6,037,521 号, 它们在此通过引用整体并入)。所述技术包括但不限于原核微量注射 (Wagner 等的美国专利 4,873,191 号, 其在此通过引用整体并入) ; 将反转录病毒介导的基因转移到种系 (germ line) 中 (Van der Putten 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148-6152(1985), 其在此通过引用整体并入) ; 在胚胎干细胞中的基因靶向 (Thompson 等, *Cell* 56:313-321(1989), 其在此通过引用整体并入) ; 电穿孔胚胎 (Lo 等, *Mol. Cell. Biol.* 3:1803-1814(1983), 其在此通过引用整体并入) ; 和精子介导的基因转移 (Lavitrano 等, *Cell* 57:717-723(1989), 其在此通过引用整体并入)。

[0085] 例如, 可使用处于各种发育阶段的胚细胞以引入转基因, 从而生成转基因动物。根据胚细胞的发育阶段使用不同的方法。接合子是微量注射的良好目标, 且熟知微量注射接合子的方法 (参见, Wagner 等的美国专利 4,873,191 号, 其在此通过引用整体并入)。在小鼠中, 雄性原核达到直径约 20 微米的尺寸, 这允许可重现地注入 1-2 皮升 (p1) 的 DNA 溶液。使用接合子作为基因转移的目标的主要优势在于, 在大多数情况下, 注射的 DNA 将在第一分裂之前并入宿主基因组 (Brinster 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442(1985), 其在此通过引用整体并入)。因此, 转基因非人动物的所有细胞都将承载并入的转基因。这通常还将在有效传输转基因到始创者的后代中反映, 因为 50% 的生殖细胞将装载转基因。

[0086] 本发明的转基因动物还可通过将目标载体引入胚胎干 (ES) 细胞而产生。ES 细胞通过在适当条件下体外培养植入前胚胎来获得 (Evans 等, *Nature* 292:154-156(1981) ; Bradley 等, *Nature* 309:255-258(1984) ; Gossler 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069(1986) ; 和 Robertson 等, *Nature* 332:445-448(1986), 它们在此通过引用整体并入)。转基因可使用本领域已知的各种方法通过 DNA 转染有效地引入 ES 细胞中, 所述方法包括电穿孔、磷酸钙共同沉淀、原生质体或球粒体融合、脂质转染法 (lipofection) 和 DEAE- 葡聚糖 - 介导的转染。转基因也可通过反转录病毒 - 介导的转导或通过微量注射引

入 ES 细胞中。所述转染的 ES 细胞此后可在将它们引入胚囊阶段的胚胎的囊胚腔中之后移植胚胎并促进所产生的嵌合动物的种系（在 Jaenisch, Science 240:1468-1474(1988) 中综述,其在此通过引用整体并入）。如果转基因提供所述选择的方式,则在将转染的 ES 细胞引入囊胚腔中之前,可对转染的 ES 细胞进行各种选择方案以富集具有整合的转基因的 ES 细胞。或者,可使用 PCR 筛选已经整合了转基因的 ES 细胞。该技术避免了对于在转移到囊胚腔中之前使转染的 ES 细胞在适当选择的条件下生长的需要。

[0087] 另外,还可使用逆转录病毒感染以将转基因引入非人动物中。可将发育的非人胚胎离体培养到胚囊阶段。在此期间,可将卵裂球靶向逆转录病毒感染 (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264(1976), 其在此通过引用整体并入)。用以引入转基因的病毒载体系统通常为承载转基因的复制缺陷型反转录病毒 (Jahner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927-6931(1985); Van der Putten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152(1985))。转染通过将卵裂球在病毒产生细胞的单层上培养而容易且有效地获得。或者,感染可在稍后阶段进行。使用反转录病毒或逆转录病毒载体产生本领域已知的转基因动物的另外方式包括将产生反转录病毒的逆转录病毒粒子或丝裂霉素 C- 处理过的细胞微量注射到受精卵或早期胚胎的卵黄周隙中 (Onions 的 WO 90/08832, 其在此通过引用整体并入)。

[0088] 本发明提供在所有它们的细胞中承载转基因的转基因非人动物以及在它们的一些、但并非所有的细胞中承载转基因的动物,即转基因的表达通过置于转基因上游的细胞特异性启动子和 / 或增强子元素控制。在本发明的一个实施方式中,表达人 CD11b 的转基因动物仅在白细胞中表达 CD11b 转基因。根据本发明的该实施方式,白细胞特异性启动子序列操作性连接到编码人 CD11b 的多核苷酸序列。合适的白细胞特异性启动子包括而限于 LSP1 启动子 (Malone 等, "Leukocyte-Specific Expression of the pp52(LSP1) Promoter is Controlled by the cis-acting pp52 Silencer and Anti-Silencer Elements," Gene 268:9-16(2001), 其在此通过引用整体并入)、巨噬蛋白启动子 (Li 等, "The Macrophage Promoter Directs High Levels of Transcriptional Activity in Macrophages Dependent on Combinatorial Interactions Between Pu.1 and c-Jun," J. Biol. Chem. 273:5389-5399(1998), 该在此通过引用整体并入)、溶菌酶启动子 (Bonifer 等, "Tissue Specific and Position Independent Expression of the Complete Gene Domain for the Chicken Lysozyme in Transgenic Mice," EMBO J. 9:2843-48(1990), 其在此通过引用整体并入) 和促进人 CD11b 仅在通常表达 CD11b 的细胞中表达的骨髓特异性 CD11b 启动子 (例如, 粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞) (Pahl 等, "Characterization of the Myeloid-Specific CD11b Promoter," Blood 79:865-870(1992) 和 Hickstein 等, "Identification of the Promoter of the Myelomonocytic Leukocyte Integrin CD11b," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2105-09(1992), 它们在此通过引用整体并入)。适合驱动在转基因动物中的转基因表达的表达或克隆构建体在本领域中熟知。所述表达构建体的其它组分包括强多聚腺苷酸化部位、适当的限制酶部位和确保转录体接合的内含子。

[0089] 编码人 CD11b 的多核苷酸可插入任何非人动物中。在一个实施方式中,所述动物为啮齿动物,例如小鼠。常用于产生转基因模型的小鼠的合适菌株包括而限于 CD-1<sup>®</sup>

Nude 小鼠、NU/NU 小鼠、BALB/C Nude 小鼠、BALB/C 小鼠、NIH-III 小鼠、SCID<sup>®</sup> 小鼠、远系杂交 SCID<sup>®</sup> 小鼠、SCID Beige 小鼠、C3H 小鼠、C57BL/6 小鼠、DBA/2 小鼠、FVB 小鼠、CB17 小鼠、129 小鼠、SJL 小鼠、B6C3F1 小鼠、BDF1 小鼠、CDF1 小鼠、CB6F1 小鼠、CF-1 小鼠、Swiss Webster 小鼠、SKH1 小鼠、PGP 小鼠和 B6SJL 小鼠。

[0090] 筛选并评价所述转基因动物以选择具有其中在所有细胞上或在白细胞上特异性表达人 CD11b 的表型的那些动物。初始筛选可使用例如南方墨点分析或 PCR 技术进行以分析动物细胞,从而证实已经发生转基因的整合。转基因在所述转基因动物的细胞中的 mRNA 表达水平也可使用包括但不限于以下技术的技术评定:从动物获得的组织样品的北方墨点分析、原位杂交分析和逆转录酶-PCR (rt-PCR)。另外,人 CD11b 的表面表达可通过流式细胞术使用与荧光分子结合的人特异性抗-CD11b 抗体评价。可进一步表征所述转基因非人哺乳动物以鉴定具有可用于本发明方法中的表型的那些动物。特别地,可将所述转基因非人动物暴露于金黄色葡萄球菌且可检验白细胞细胞死亡。

[0091] 本发明的另一方面涉及使用本发明的转基因非人动物鉴定适合预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法。在本发明的该方面的一个实施方式中,鉴定候选化合物的所述方法包括提供候选化合物的集合。所述方法还包括将表达人 CD11b 的转基因动物暴露于能够诱发 LukAB 介导的白细胞死亡的试剂和将所述一种或多种候选化合物施用到所述转基因动物。所述方法还包括测量在施用了所述一种或多种候选化合物的转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡的水平 and 比较在施用了所述一种或多种候选化合物的所述转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡的水平与在未施用所述一种或多种候选化合物的转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡的对照水平。LukAB 介导的细胞死亡的对照水平为在施用 LukAB 剂、但未施用所述候选化合物的转基因动物中的 LukAB 介导的细胞死亡的水平。将与所述对照水平相比降低在所述转基因动物中的 LukAB 介导的白细胞死亡的水平 of 的候选化合物鉴定为适合预防或治疗金黄色葡萄球菌和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

[0092] 根据本发明的方法,能够诱发 LukAB 介导的白细胞死亡或表达人 CD11b 蛋白的所有细胞的细胞死亡的试剂包括而不仅限于金黄色葡萄球菌,特别是 MRSA 或 MSSA 菌株;包含分离的 LukA、LukB 或 LukAB 蛋白复合物的组合物;包含重组生成的 LukA、LukB 或 LukAB 蛋白复合物的组合物;或设计加工以生成 LukA、LukB 或 LukAB 蛋白复合物的原核和/或真核细胞。

[0093] 在本发明的该方面的一个实施方式中,在将所述转基因动物暴露于作为鉴定合适预防性试剂的工具的能够诱发 LukAB 细胞毒性的试剂之前施用所述候选化合物。或者,在将所述转基因动物暴露于作为鉴定合适治疗剂的工具 LukAB 试剂之后施用所述候选化合物。

[0094] 使用转基因啮齿动物鉴定适合预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的本发明的另一方法包括提供候选化合物的集合,将表达人 CD11b 的转基因动物暴露于金黄色葡萄球菌和将来自所述集合的一种或多种候选化合物施用到所述转基因动物。所述方法还包括测量在施用了所述一种或多种候选化合物的转基因动物中的金黄色葡萄球菌感染水平,比较在施用了所述一种或多种候选化合物

的所述转基因动物中的金黄色葡萄球菌感染水平与在暴露于金黄色葡萄球菌、但未施用所述一种或多种候选化合物的转基因动物中的对照金黄色葡萄球菌感染水平,和鉴定与所述对照金黄色葡萄球菌感染水平相比降低在所述转基因动物中的金黄色葡萄球菌感染水平的候选化合物为适合预防或治疗金黄色葡萄球菌和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

[0095] 测量金黄色葡萄球菌感染水平涵盖评价或测量包括而限于动物存活率、细胞生存率、发炎反应、载菌量和感染有关的病理的金黄色葡萄球菌感染的任一个或多个指标。增加动物存活率和 / 或细胞生存率、降低在动物中的发炎反应或载菌量和改善感染的病理的候选化合物为适合预防或治疗金黄色葡萄球菌和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

[0096] 在本发明的该方面的一个实施方式中,在将所述转基因动物暴露于作为鉴定合适预防性试剂的工具的金黄色葡萄球菌之前施用所述候选化合物。或者,在将所述转基因动物暴露于作为鉴定合适治疗剂的工具的金黄色葡萄球菌之后施用所述候选化合物。

[0097] 本发明的另一方面涉及鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物的方法。该方法通常在体外,即在细胞培养物中进行。该方法包括提供候选化合物的集合和提供表达人 CD11b 的细胞群体。所述方法还包括用能够诱发 LukAB 介导的细胞毒性的试剂处理所述细胞群体和使所述处理过的细胞群体与来自所述集合的一种或多种候选化合物接触。所述方法还包括测量在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下在所述处理过的细胞群体中 LukAB 介导的细胞毒性水平和比较在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下 LukAB 介导的细胞毒性的测量水平。与在缺乏所述一种或多种候选化合物的情况相比较,在存在所述一种或多种候选化合物的情况下 LukAB 介导的细胞毒性水平减小鉴定出能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和 / 或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

[0098] 适合根据本发明的该方法使用的表达 CD11b 的细胞包括白细胞,诸如单核细胞、粒细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞。其它合适的细胞包括设计加工成表达 CD11b 的任何有核细胞,例如,用含有人 CD11b 多核苷酸序列的表达构建体稳定或短暂转染的细胞(例如,包含 SEQ ID NO:1 或 3 的核苷酸序列的表达构建体)。

[0099] 如本文所述,本发明的该方法设计用来鉴定抑制导致 LukAB- 介导的细胞毒性和人吞噬细胞的溶胞的级联事件的某一方面的试剂。作为所述级联的一部分的目标事件包括例如 LukA 和 / 或 LukB 与在吞噬细胞上的 CD11b 受体结合、LukB 与 LukA 结合(LukAB 低聚)和堵塞由 LukAB 低聚体形成的膜孔。所述测定利用包含 LukAB 结合域的表达人 CD11b 蛋白或其片段的任何哺乳动物或非哺乳动物细胞、合适培养基和分离或重组的 LukA 和 / 或 LukB 或金黄色葡萄球菌。所述测定还包括细胞毒性的标记的标示物,所述标示物在表达人 CD11b 的细胞与能够诱发 LukAB 细胞毒性的试剂接触之前、期间或之后暴露于所述细胞。所述细胞毒性的标记的标示物可包含细胞生存率染料、细胞不可渗透的染料和 / 或细胞溶胞的指示剂。

[0100] 技术人员应了解以下方案仅为说明性的且各种操作参数,诸如反应条件、可检测的标记和装置(例如,用于检测和量化的仪器)的选择是可以进行适当变化的。以下方法通常涉及鉴定抑制 LukAB 细胞毒性的试剂,而不需要揭示出级联中哪个确切事件受到影响。

[0101] 为了鉴定 CD11b-LukAB 细胞毒性的抑制剂,可将表达人 CD11b 的细胞(例如,人吞噬细胞或用人 CD11b 转染的鼠吞噬细胞)以在最终体积 50  $\mu$ l 的补充有 10% 热灭活的胎牛血清 (FBS) 的 RPMI (Gibco) 中的  $5 \times 10^3$  个细胞 / 孔铺在 384 孔黑色静底组织培养物处理过的板 (Corning) 上。随后可将细胞与测试化合物 / 分子 (约 5  $\mu$ l / 不同浓度) 接触 / 混合 / 反应 / 处理,且随后用 LukA 和 LukB 染毒,其在优选的实施方式中为基本失活的 (5  $\mu$ l 的约 0.001-2  $\mu$ M 溶液),优选一起加入,在培养条件下使 LukA 和 LukB 染毒吞噬细胞,例如在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下 1 小时。作为对照,可将细胞用培养基处理 (100% 存活) 及用 0.1% v/v Triton X100 处理 (100% 死亡)。

[0102] 在这些实施方式中,随后可将如上所述处理的细胞用染料孵化以监测细胞生存率,诸如用 CellTiter (Promega) (其能够经由吸收度量化细胞的代谢活性而测量在培养基中活细胞的数目,从而确定细胞生存率) 且另外孵化一段时间 (例如,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下约 2 小时)。随后可诸如通过使用例如 Envision 2103 Multi-label Reader (Perkin-Elmer) 的读板器测量在 492nm 下的比色反应来确定细胞生存率。活细胞百分比可诸如通过使用以下方程式计算: % 生存率 =  $100 \times [(Ab_{492} \text{ 样品} - Ab_{492} \text{ Triton X}) / (Ab_{492} \text{ 组织培养基})]$ 。生存率百分比的增加提示 LukAB 细胞毒性的抑制。

[0103] 将该测定的变体称为膜破损测定。在这些实施方式中,随后可将如上所述处理 (例如,按照或包括用测试化合物 / 分子处理细胞且随后用纯化的 LukA 或 LukAB 染毒细胞) 的细胞用诸如 SYTOX 绿 (0.1  $\mu$ M; Invitrogen) 的细胞不能透过的荧光染料孵化 (根据生产商的说明书) 并例如在室温下避光另外孵化 15 分钟。随后可使用诸如 Envision 2103 Multilabel Reader (Perkin-Elmer) 的读板器在激发 485nm、发射 535nm 下测量作为膜破损的指示剂的荧光。荧光减小提示 LukAB 细胞毒性的抑制。

[0104] 总之,这些测定有助于鉴定抑制或降低 LukAB 对于表达人 CD11b 的细胞的细胞毒素作用的化合物。可独立地或与上述方法结合使用其它方法,特别是如果上述方法揭示出抑制活性,其将使得本领域的技术人员能够更精确地确定在生物化学级联中的哪个事件受到该试剂的影响或被其靶向。这些事件包括 LukA、LukB 或 LukAB 与 CD11b 受体结合、LukB 与 LukA 结合 (LukAB 低聚) 和堵塞由 LukAB 低聚体形成的膜孔。

[0105] 为了筛选阻断或降低 LukA、LukB 或 LukAB 与靶细胞结合的抑制剂,这被认为是染毒过程的第一步,可将表达人 CD11b 的细胞 (例如,PMN-HL60 细胞) 以在最终体积 50  $\mu$ l 的补充有 10% 热灭活的胎牛血清 (FBS) 的 RPMI (Gibco) 中的  $2.5 \times 10^3$  个细胞 / 孔铺在 384 孔组织培养物处理过的平底板 (Corning) 上。随后可将细胞用测试化合物 / 分子处理 (约 5  $\mu$ l / 不同浓度),并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下用纯化、荧光标记的 LukA、LukB 或 LukAB (例如, FITC、Cy3、Cy5、APC、PE) 5  $\mu$ l 的约 0.01-2  $\mu$ M 溶液染毒 1 小时。为了评价测试化合物 / 分子的功效,可将细胞相关的荧光测量为 LukA、LukB 或 LukAB 结合 CD11b 的指标,例如使用设计用于高含量筛选和高含量分析的自动荧光显微成像系统 (例如,Cellomics ArrayScan ECS Reader (Thermo Scientific) (激发 485nm, 发射 535nm))。

[0106] 为了筛选阻断或降低 LukA/LukB 相互作用的抑制剂,这被认为是染毒过程的第二步,可将表达人 CD11b 的细胞 (例如,PMN-HL60 细胞) 以在最终体积 50  $\mu$ l 的补充有 10% 热灭活的胎牛血清 (FBS) 的 RPMI (Gibco) 中的  $2.5 \times 10^3$  个细胞 / 孔铺在 384 孔组织培养物处理过的平底板 (Corning) 上。随后可将细胞用测试化合物 / 分子处理,且随后用纯化

的 LukA 和纯化的 LukB 的混合物染毒,其中 LukB 用诸如 FITC、Cy3、Cy5、APC 和 PE 的荧光分子荧光标记,且允许坚持完成染毒过程(例如,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下 1 小时)。为了评价测试化合物/分子的功效,可将细胞相关的 LukB-FITC 荧光测量为 LukA/LukB-FITC 相互作用的指标,例如使用设计用于高含量筛选和高含量分析的自动荧光显微成像系统(例如,Cellomics ArrayScan ECS Reader(Thermo Scientific)(激发 485nm,发射 535nm))。

[0107] 为了筛选阻断或降低 LukAB 孔形成的抑制剂、导致溶胞的效应分子,可将表达人 CD11b 的细胞(例如,PMN-HL60 细胞)以在最终体积 50  $\mu$ l 的补充有 10% 热灭活的胎牛血清(FBS)和 50  $\mu$ M 溴化乙锭阳离子染料的 RPMI(Gibco)中的  $2.5 \times 10^3$  个细胞/孔铺在 384 孔黑色静底组织培养物处理过的板(Corning)上。LukAB 孔促进该染料的吸收。随后可将细胞用测试化合物/分子(约 5  $\mu$ l 含有不同浓度)处理,且随后在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下用纯化的 LukAB(约 0.001-2  $\mu$ M)染毒 10-20 分钟。随后可使用诸如 Envision 2103Multilabel Reader(Perkin-Elmer)的读板器测量作为膜破损的指示剂的荧光。荧光减小提示 LukAB 孔的抑制。作为对照,可将 PMN-HL60 细胞用培养基处理(阴性对照)和用 0.01% v/v Triton X100 处理(阳性对照)。

[0108] 本发明的另一方面涉及鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的候选化合物的方法。该方法包括提供候选化合物的集合和提供包含 LukAB 结合域的分离的 CD11b 受体或其片段。所述方法还包括用包含标记的 LukA、LukB 和/或标记的 LukAB 蛋白的试剂处理所述分离的 CD11b 受体或其片段和使所述处理过的分离的 CD11b 受体或其片段与来自所述集合的一种或多种候选化合物接触。测量在存在和缺乏一种或多种候选化合物的情况下所述标记的 LukA、LukB 和/或标记的 LukAB 与所述分离的 CD11b 受体或其片段的结合水平,和比较在存在和缺乏所述一种或多种候选化合物的情况下 LukA、LukB 和/或 LukAB 与所述分离的 CD11b 受体或其片段的结合水平。基于该比较鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的一种或多种候选化合物。

[0109] 根据本发明的该方面,与在缺乏所述候选化合物的情况相比较,在存在所述候选化合物的情况下 LukA、LukB 和/或 LukAB 与分离的 CD11b 受体或其片段的结合减少鉴定能够预防或治疗金黄色葡萄球菌感染和/或由金黄色葡萄球菌感染引起的病状的化合物。

[0110] 根据本发明的该方面,在存在和缺乏候选物 CD11b 抑制剂的情况下进行体外配体结合测定的方法在本领域中熟知(参见,例如, Bansal 等,“Small Molecule Antagonists of Complement Receptor Type3 Block Adhesion and Adhesion-Dependent Oxidative Burst in Human Polymorphonuclear Leukocytes,” J. Pharm. Exp. Therap. 304(3):1016-24(2003),其在此通过引用整体并入)。这些方法通常包括使用由 Cai 等,“Energetics of Leukocyte Integrin Activation,” J. Biol. Chem. 270:14358-65(1995)所述和由 Bansal 等,“Small Molecule Antagonists of Complement Receptor Type 3Block Adhesion and Adhesion-Dependent Oxidative Burst in Human Polymorphonuclear Leukocytes,” J. Pharm. Exp. Therap. 304(3):1016-24(2003)改进的方法,从例如人 PMN 的合适细胞中分离并纯化 CD11b 或 CD11b/CD18 受体复合物,该两个文献都在此通过引用整体并入。或者,可重组生成 CD11b、其片段或 CD11b/CD18。当在本发明的方法中利用包含 LukAB 结合域的 CD11b 的肽



入)。

[0116] 蛋白质通过使菌株在具有  $10 \mu\text{g/ml}$  氯霉素的胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB) 中在  $37^\circ\text{C}$ 、 $180\text{rpm}$  下生长 5 小时从金黄色葡萄球菌中纯化, 达到约 1.5 的  $\text{OD}_{600}$ 。随后将细菌在  $4000\text{rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  下制粒 15 分钟且收集上清液并经  $0.2 \mu\text{m}$  过滤器过滤。将培养上清液在  $10\text{mM}$  咪唑存在下在  $4^\circ\text{C}$  下在搅拌下用镍-NTA 树脂 (Qiagen) 孵化 30 分钟。将样品施用到管柱上并用补充有  $25\text{mM}$  咪唑的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (TBS:  $50\text{mM}$  Tris、 $150\text{mM}$  NaCl, pH 7.5) 洗涤且用  $500\text{mM}$  咪唑洗脱。将蛋白质在  $1\text{X}$  TBS+ $10\%$  甘油中在  $4^\circ\text{C}$  下渗析过夜。

[0117] 检测 LukAB 与 Mac-1 的相互作用的生物化学研究。为了用抗生蛋白链菌素检测捕获产物, 将 PMN-HL60 细胞在冷 PBS 中在  $4^\circ\text{C}$  下在旋转下用 EZ- 连接的磺基-NHS-LC- 生物素 (Thermo Scientific) 孵化 30 分钟。为了终止该反应, 随后将细胞用在冷 PBS 中的冷  $100\text{mM}$  甘氨酸洗涤。将细胞用不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物 (Thermo Scientific) 再悬浮于冷 TBS 中, 且在  $4^\circ\text{C}$  下在旋转下用  $1\%$  正辛基- $\beta$ -D- 果聚糖 (Affimetrix) 溶解 30 分钟。将样品在  $15000\text{rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  下离心 30 分钟且收集含有溶解的部分的上清液。将溶解的部分 (来自约  $2 \times 10^6$  个细胞) 用  $10 \mu\text{g}$  ( $5 \mu\text{g}$ / 百万个细胞) 的 His-LukAB 孵化且在  $4^\circ\text{C}$  下在旋转下用 TBS 模拟孵化 30 分钟。将样品在  $10\text{mM}$  咪唑存在下在  $4^\circ\text{C}$  下在旋转下用  $50 \mu\text{l}$  镍树脂孵化 1 小时。将树脂用  $1\text{X}$  PBS+ $50\text{mM}$  咪唑洗涤且将蛋白质用  $1\text{X}$  PBS+ $500\text{mM}$  咪唑洗脱。使样品在  $4\text{X}$  SDS 沸腾缓冲液中沸腾且以  $4$ - $15\%$  SDS-PAGE 梯度 (BioRad) 上在  $80\text{V}$  下操作, 接着在  $30\text{V}$  下转移到硝化纤维膜上历时 1 小时。将膜用在 PBS 中的  $0.01\%$  吐温阻断 1 小时, 且随后用抗生蛋白链菌素-Dylight 680 (Thermo Scientific) 以  $1:1000$  孵化 1 小时。将膜干燥且使用 Odyssey 红外成像系统 (LI-COR Biosciences) 扫描。

[0118] 用 PMN-HL60 溶胞产物的捕获还在没有生物素化的情况下用如上所述的 His- 标签的 LukAB、His- 标签的 LukED (Alonzo 等, "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth In Vivo," Mol. Microbiol. 83(2):423-435 (2012), 其在此通过引用整体并入) 或 His- 标签的 PVL (Alonzo 等, "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED," Nature 493(7430):51-55 (2013), 其在此通过引用整体并入) 进行, 其中将样品在  $15\%$  SDS-PAGE 上操作并在  $1$  安培下转移到硝化纤维膜上历时 1 小时。将膜用抗-CD11b 抗体 (23843 克隆, R&D Systems) 探测, 其使用  $1:25,000$  稀释的 AlexaFluor-680- 结合的抗-兔二次抗体 (Invitrogen) 和 Odyssey 成像系统检测。

[0119] 对于用纯化的 LukAB 和纯化的 Mac-1 的捕获, 将  $4 \mu\text{g}$  重组 Mac-1 (R&D Systems) 在  $0.1\%$  正辛基- $\beta$ -D- 果聚糖存在下在  $4^\circ\text{C}$  下在旋转下用  $4 \mu\text{g}$  纯化的重组 His-LukAB、His-LukED、His-PVL 或 PBS 孵化 30 分钟。如上所述, 将样品用  $100 \mu\text{l}$  镍树脂孵化、洗涤并洗脱。将在  $4\text{X}$  SDS 缓冲液中的沸腾样品在  $4$ - $15\%$  梯度凝胶上操作。一组样品通过用如上所述的抗-CD11b 抗体免疫印迹加工。对于其它组的样品, 将凝胶在制造商的说明书下用全蛋白染色 Sypro Ruby (Invitrogen) 染色。

[0120] 将 PMN ( $2 \times 10^7$ ) 用  $1\%$  正辛基- $\beta$ -D- 果聚糖溶解, 将可溶性部分用  $20 \mu\text{g}$  His-LukAB 孵化, 且将复合物用如上所述的镍树脂纯化。将样品在  $4$ - $15\%$  梯度凝胶上操作且用 Sypro Ruby 染色。将整个跑道 (lane) 从凝胶中消去并进行质谱分析。

[0121] 荧光激活的细胞分选 (FACS) 分析。将细胞用荧光结合的抗体在冰上染色 30 分

钟,随后用 1X PBS+2% FBS+0.05%叠氮化钠 (FACS 缓冲剂) 洗涤。对于未结合的抗体,将细胞在冰上用一次抗体染色 30 分钟,用 FACS 缓冲剂洗涤,在冰上用荧光结合的二次抗体染色 30 分钟,随后用 FACS 缓冲剂洗涤。所有 FACS 数据都在 LSRII 流式细胞仪 (BD Biosciences) 上使用 FACSDiva 软件获取。数据使用 Flowjo 软件 (TreeStar) 分析。

[0122] 用于 FACS 分析的抗体。用于表面染色原代人细胞和人细胞系的抗体包括以下抗体:抗-CD11b-APC (ICRF44 克隆)、抗-CD18-PE/Cy5 (TS1/18 克隆)、抗-CD11a-FITC (HI111 克隆) 和抗-CD11c-PerCP/Cy5.5 (Bu15 克隆) (BioLegend)。用于绘制在 LukAB 和 CD11b 之间的相互作用的抗体包括上文列出的人特异性抗体的未结合型式以及 LM2/1 抗-CD11b 克隆 (Santa Cruz) 和 CBRM1/5 抗-CD11b 克隆 (BioLegend)。为了检测 I- 缺少 CD11b,使用具有抗-山羊 IgG-APC 的山羊抗-CD11b (多克隆) (R&D Systems)。

[0123] 用于表面染色表达鼠 Mac-1 的原代鼠细胞 293T 细胞的抗体包括以下抗体:抗-CD11b-APC (M1/70 克隆) 和抗-Ly-6G-FITC (1A8 克隆) (BD Pharmingen)。

[0124] 用 CD11b cDNA 转染 HEK293T 细胞。将 HEK293T 细胞用含有全长人 CD11b cDNA 的 pCMV6-XL5 质体 (OriGene) 或空载体使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 在生产商说明书下孵化。如用 GFP- 生成对照载体所测定,转染效率为 70-80%,且在 48 小时之后通过流式细胞术测定 CD11b 表面水平。此时,对 LukAB 或 PVL 的敏感性通过在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下将 40 μg/ml 各种毒素或 PBS 加到细胞中历时 2 小时来测定。随后将细胞用 α-CD11b-APC (ICRF44 克隆) 洗涤并染色。CD11b<sup>+</sup> 细胞的消耗通过流式细胞术测量,其中将用 PBS 处理的 CD11b<sup>+</sup> 细胞的百分数标准化到 100%。

[0125] 通过重叠 PCR 产生 hCD11b I- 缺少突变体。自人 CD11b 删除 I 域通过重叠 PCR 实现,其中在 I- 域上游的 5' 链段和在 I- 域下游的 3' 链段从含有人 CD11b cDNA 的 pCMV6-XL5 载体 (OriGene) 扩增。对于没有 5' UTR、但具有 Kozak 序列的 CD11b 的 5' 链段的扩增,使用以下引物:5'-TGACTCTAGACCACCATGGCTCTCAGAGTCCCTTCTG-3' (SEQ ID NO:11) 和 5'-GCTGCTACTTCCTGTCTGAGTTTGGAGGACACCCTCGGAGG-3' (SEQ ID NO:12)。对于 CD11b 的 3' 链段的扩增,使用以下引物:5'-CCTCCGAGGGTGTCTCAAACCTCAGACAGGAAGTAGCAGC-3' (SEQ ID NO:13) 和 5'-TTGCGGCCGAGCCCAAGCCCCTCTGTC-3' (SEQ ID NO:14)。这两个链段通过重叠 PCR 使用以下引物连接:5'-TGACTCTAGACCACCATGGCTCTCAGAGTCCCTTCTG-3' (SEQ ID NO:15) 和 5'-TTGCGGCCGAGCCCAAGCCCCTCTGTC-3' (SEQ ID NO:16)。野生型 (WT) 人 CD11b 也用这后一组引物自 OriGene 质体扩增。扩增的序列使用 XbaI 和 NotI 克隆到 pLenti-CMV-GFP-Puro (Addgene) 中,产生 pLenti-CMV-hCD11b-puro 和 pLenti-CMV-I- 缺少 .hCD11b-puro 构建体。将重组质体转化成大肠杆菌 RecA<sup>5α</sup> (New England BioLabs) 且转化体通过氨苄西林抗性选择。

[0126] 人 CD11b 和 CD18 的基于慢病毒 (Lentivirus) 的敲低和 CD11b 的过度表达。慢病毒 shRNA 表达载体原料如先前所述 (Unutmaz 等, "Cy tokine Signals are Sufficient for HIV-1 Infection of Resting Human T Lymphocytes," J. Exp. Med. 189(11):1735-1746 (1999), 其在此通过引用整体并入) 通过用以下质体磷酸钙共转染 HEK293T 细胞生成:自 SIGMA MISSION TRC 1.5 库购买的 pMDG gag-pol、pRSV-Rev、pVSV-G Env 和 pLK0.1CD11b 或 CD18shRNA 构建体。使用以下 shRNA 序列:对于 CD11b, 5'-CCGGCGCAATGACCTTCCAAGAGAACTCGAGTTCTCTTGAAGGTCATTGCGTTTTT-3' (SEQ ID NO:17) 和对于 CD18, 5'-CCGGGAAACCCAGGAAGACCACAATCTCGAGATTGTGGTCTTCCTGGGTTTTTTTT-3' (SEQ ID

NO:18)。在 48 小时之后收集上清液,离心,过滤以除去细胞碎片,且在 Jurkat 细胞上滴定,如先前所述 (Unutmaz 等,“Cytokine Signals are Sufficient for HIV-1 Infection of Resting Human T Lymphocytes,” *J. Exp. Med.* 189(11):1735-1746 (1999), 其在此通过引用整体并入)。将 HL60 细胞用相应病毒或空载体对照病毒转导 72 小时,接着用 2 μg/ml 嘌呤霉素选择,对其进行测定以杀死约 95-99% 的未转导的细胞。使残存的细胞扩张,通过流式细胞术确认敲低。

[0127] 如先前所述 (Hofmann 等,“The Vpx Lentiviral Accessory Protein Targets SAMHD1 for Degradation in the Nucleus,” *J. Virol.* 86(23):12552-12560 (2012), 其在此通过引用整体并入),慢病毒表达载体原料通过使用 Lipofectamine 2000 用以下质体共转染 HEK293T 细胞产生:pMDG gag-pol、pRSV-Rev、pVSV-G Env 和 pLenti-CMV-hCD11b-puro 或 pLenti-CMV-I- 缺少 hCD11b-puro。收集病毒且将 HL60 细胞如上所述转导。使残存的细胞扩张且通过流式细胞术确认 WT 和 I- 缺少 CD11b 表面水平。使用 BD Biosciences FACS Aria 细胞分选仪分选细胞以收集顶部 25% 的 α-CD11b 抗体染色的细胞。

[0128] 腹腔渗出细胞 (PEC) 的引出。如先前所述 (Alonzo 等,“CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED,” *Nature* 493(7430):51-55 (2013), 其在此通过引用整体并入),鼠 PEC 用热杀的金黄色葡萄球菌引出。

[0129] FITC-LukAB 的产生。为了产生重组 N- 末端荧光素标记的 LukA B,将来自金黄色葡萄球菌纽曼基因组 DNA 的 LukA 的成熟蛋白编码序列 PCR- 扩增,其中使用以下引物将半胱氨酸加到在该信号序列之后的 N- 末端上:5'-CCCCGATCCTGTAATTCAGCTCATAAAGACTCTCAG-3' (SEQ ID NO:19) 和 5'-CCCTCTAGATTATCCTTCTTTATAAGGTTTATTG-3' (SEQ ID NO:20)。如上所述,扩增的序列使用 BamH1 和 XbaI 克隆到 P<sub>LukAB</sub>-sslukA-6His-lukB 中。将重组质体转化成大肠杆菌 DH5 α 且转化体通过氨苄西林抗性选择。将阳性克隆转化成金黄色葡萄球菌纽曼 ΔlukAB (Dumont 等,“Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis,” *Mol. Microbiol.* 79(3):814-825 (2011), 其在此通过引用整体并入)。如上所述,将蛋白从金黄色葡萄球菌中纯化且用 20 倍摩尔过量的 Alexa Fluor-488C5 顺丁烯二酰亚胺 (Invitrogen) 在 4°C 下在搅拌下标记过夜。过量的染料经由用在具有 10% 甘油的 TBS 中的 10kDa 分子量筛截渗析盒渗析而除去。标记的蛋白的活性通过细胞毒性测定确认。

[0130] 自大肠杆菌纯化 Flag- 标签的 CD11b I- 域。为了产生具有 C- 末端 3XFlag 标签和 N- 末端 6X-His 标签的重组人和小鼠 CD11b I 域,将人 I 域和小鼠 I 域分别从 pCMV6-XL5 人 CD11b cDNA 构建体和 pCMV-Entry 小鼠 CD11b cDNA 构建体 (OriGene) 扩增。对于用 C- 末端 6X- 甘氨酸连接子、接着用 3X-Flag 标签的人 I- 域扩增,使用以下引物:5'-TTTCATATGGGATCCAACCTACGGCAGCAG-3' (SEQ ID NO:21) 和 5'-TTTCTCGAGTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCGATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCCGCAAAGATCTTCTCCGAAG-3' (SEQ ID NO:22)。对于用 C- 末端 6X- 甘氨酸连接子、接着用 3X-Flag 标签的鼠 I- 域扩增,使用以下引物:5'-TTTCATATGGGATCCAACCTGCTGAGGCC-3' (SEQ ID NO:23) 和 5'-TTTCTCGAGTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCGATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTCCTCCTCCTCCTCCTGCAAAGATCTTTTCTGAAGCTG-3' (SEQ ID NO:24)。扩增的序列用 NdeI 和 XhoI 克隆到 pET15b 载体 (Novagen) 中,以使得载体编码的 6X-His 标签处于 I

域的 N- 末端。将重组质体转化成大肠杆菌 T7LysY lacQ 且转化体通过氨苄西林抗性选择。

[0131] 为了从大肠杆菌纯化蛋白质,使菌株在 37°C、180rpm 下在补充有 100 μg/ml 氨苄西林的 Luria-Bertani (LB) 肉汤中生长到 OD<sub>600</sub> 为 0.5,且随后在 37°C、180rpm 下用 1mM IPTG 诱发 3 小时。将细菌溶胞且将溶胞产物用镍树脂孵化。将 His- 标签的 I 域用 500mM 咪唑洗脱。

[0132] 斑点印迹分析以确定 LukAB-CD11b I- 域相互作用。使用斑点印迹真空 (BioRad) 将 5-0.156 μg 纯化的重组人和小鼠 CD11b I 域吸收到 PVDF 膜上。将该膜用在 1X TBS 中的 2% BSA 阻断 1 小时,接着用在 TBS+2% BSA 中的 5 μg/ml 纯化的 FITC-LukAB 孵化 1 小时。对于竞争测定,将 10- 倍过量 (50 μg/ml) 的未标记的纯化 LukAB 或 PVL 也用该膜孵化。FITC-LukAB 的结合使用 Odyssey 红外成像系统检测且通过密度测定法使用 AlphaImager 软件量化。

[0133] LukAB 与 Mac-1 和 CD11b I- 域的结合的 表面等离子体共振分析。如先前所述 (Huergo 等,“The Campylobacter Jejuni Dps Protein Binds DNA in the Presence of Iron or Hydrogen Peroxide,” J. Bacteriol. (2013), 其在此通过引用整体并入), 表面等离子体共振 (SPR) 使用 Biacore T100 系统 (GE) 操作。简要地讲,重组 MAC-1 (R&D Systems) 或重组 I- 域 (小鼠和人) 使用 NHS 捕集试剂盒固定到 S 系列传感芯片 CM5 (GE) 的流动池 2-4 上,且流动池 1 作为空白试验固定操作。LukAB 及其突变体使用多循环动力学用于各种相互作用进行的至少三个实验在 0.625-25ug/mL 的浓度下操作。在完成多循环动力学之前,利用单循环动力学来优化浓度。用于所有 SPR 实验的操作缓冲液为处于 pH 6.8 下的 1x PBS。

[0134] 细胞毒性测定。如先前所述来染毒细胞 (Dumont 等,“Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis,” Mol. Microbiol. 79(3):814-825 (2011), 其在此通过引用整体并入)。简要地讲,将 1×10<sup>5</sup> 个细胞 / 孔在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下用所指示浓度的纯化的重组 LukAB 染毒 1-2 小时。细胞膜破损、毒素孔形成或细胞代谢分别用 SYTOX 绿 (Invitrogen)、溴化乙锭 (MP biomedical) 或 CellTiter (Promega) 评价。对于用抗 - 整合素抗体的实验,将抗体在室温下在染毒之前 30 分钟加入且其在染毒期间存在。

[0135] 用金黄色葡萄球菌的体外和离体感染。这些感染如先前所述用 ΔlukAB、用 lukAB 染色体补充的 lukAB (ΔlukAB::lukAB) 或野生型 (WT) USA300 克隆型 LAC 菌株进行。简要地讲,为了确定通过胞外金黄色葡萄球菌实现的 PMN 或 PMN-HL60 杀死,将标准化 USA300 用 1×10<sup>5</sup> 个细胞 / 孔在 100、50、10 或 1 的多重性感染 (MOI) 下在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵化 1-2 小时。对于用抗 - 整合素抗体的实验,将抗体在室温下在感染之前 30 分钟加入且其在感染期间存在。膜破损使用 SYTOX 绿评价。

[0136] 为了确定在感染 PMN-HL60 后吞噬的金黄色葡萄球菌的生长回弹,受调理的 USA300 经由离心在 MOI 10 下与 1×10<sup>5</sup> 个 PMN-HL60 / 孔同步化。在同步化后 30、60、120 和 180 分钟,将 PMN-HL60 用皂苷溶胞且连续稀释。回收的细菌通过计数集落形成单位 CFU 测定。

[0137] 在用受调理的金黄色葡萄球菌感染之后 PMN 或 PMN-HL60 膜破损也通过如上所述制备 PMN 和细菌来确定,其中在同步化后 1-2 小时加入 SYTOX 绿。

[0138] 荧光显微术。将 PMN 用受调理的 LAC WT、 $\Delta$ lukAB 和  $\Delta$ lukAB::lukAB 菌株感染，用 pOS1-P<sub>sarA</sub>-sodRBS-sgfp 转化以构成性表达 GFP。

[0139] 为了确定 CD11b 在吞噬金黄色葡萄球菌的 PMN 中的定位，将 PMN 用抗 -CD11b-APC(ICRF44) 抗体或相应同种型对照物（小鼠 IgG1  $\kappa$ -APC, MOPC-21 克隆, BioLegend）在冰上预染色 30 分钟。随后将 PMN 以  $3 \times 10^6$  个细胞铺在 35mm 玻璃底部微孔盘（20mm 微孔, 1.5 厚度、未涂布, MatTek）中且用 GFP-USA300 以 MOI 10 同步化。将 PMN 的板模拟感染以检测在缺乏感染的情况下的 CD11b 染色。加入从兔血清和溶葡萄球菌素（Ambi Products LLC）中纯化的多克隆抗 -LukA 抗体亲和性以消除胞外细菌的作用。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下用溶葡萄球菌素孵化 10 分钟之后，将细胞用 2% 聚甲醛和 0.1M 赖氨酸在 1X PBS 中在冰上固定 30 分钟。将板用 1X PBS 洗涤并在 1X PBS 中在 4°C 下储存，直至成像。使用由 Olympus IX-71 倒置显微镜、CoolSnap HQ2CCD 摄像机和具有 z-堆叠能力的 SoftWorx 套组构成的 Applied Precision PersonalDV 活细胞成像系统上使用 60X 油浸物镜捕集图像。图像使用 ImageJ 软件加工。

[0140] 为了成像 GFP-USA300 和在存在中和抗体的情况下并入溴化乙锭，将 PMN 用抗 -CD11b(LM2/1, Santa Cruz) 抗体或相应同种型对照物（小鼠 IgG1, Santa Cruz）在室温下预处理 30 分钟。随后将 PMN 如上所述感染且在同步化后 0 分钟和 30 分钟使用在 Axiovert 40CFL 上荧光显微镜（Zeiss）上的 40X 物镜、AxioCam ICc 1(Zeiss) 和来自 Zeiss 的 Zen 软件捕集图像。

[0141] 统计。除非另外指示，否则使用测试后单因素 ANOVA 和 Tukey 多重比较 (GraphPad Prism 5.0 版 ;GraphPad Software) 分析数据。除非另外指示，否则在此提供的数据来自给出类似结果的至少三个独立实验中的一个。

[0142] 实施例 1-LukAB 介导在人嗜中性白细胞中金黄色葡萄球菌的细胞毒素性质

[0143] 将人多形核细胞暴露于自等基因野生型和 lukAB 突变体 ( $\Delta$ lukAB) 甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA) 和甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 菌株中分离的分泌蛋白。将 PMN 暴露于来自野生型金黄色葡萄球菌菌株的分泌蛋白引起如通过 CellTiter 测定所检验的有效细胞死亡（图 1A ;黑条）。相比之下，将 PMN 暴露于来自 lukAB 突变株的分泌蛋白引起显著降低的细胞死亡（图 1A ;灰条）。由  $\Delta$ lukAB 菌株发挥的细胞毒素活性的缺乏通过用表达 lukAB( $\Delta$ lukAB/pLukAB) 的质体的菌株转化逆转，如在图 1A(白条) 中所示。这些数据指示 LukAB 造成 MSSA 和 MRSA 菌株两者对于人嗜中性白细胞的细胞毒素性质。

[0144] LukAB 的重要性通过 LukAB 对于在离体感染人全血和原代人 PMN 期间的金黄色葡萄球菌存活率具有关键性的发现进一步支持（图 1B ;比较黑条 (WT) 和白条 ( $\Delta$ lukAB/pLukAB) 与灰条 ( $\Delta$ lukAB))。另外，已经使用肾脓肿的小鼠模型确定了 LukAB 对体内金黄色葡萄球菌致病原因的贡献。在该模型中，将小鼠用含有金黄色葡萄球菌的眼窝注射攻毒且随后在感染 96 小时后安乐死。将在肾组织匀浆中的载菌量用作金黄色葡萄球菌致病原因的量度。使用该模型，与 WT CA-MRSA 相比较，缺乏 lukAB 的等基因突变体展示出肾组织中载菌量减少约 100 倍（图 1C ;灰条）。lukAB 突变体的表型通过在具有质体的 trans 中表达 lukAB 部分地补充（图 1C ;白条）。总起来说，这些数据指示 LukAB 为金黄色葡萄球菌致病原因关键的致病因子。

[0145] 用纯化的重组毒素的实验揭示 LukAB 对于靶向并杀死包括人 PMN、单核细胞

(原代细胞和 THP1 细胞两种)、巨噬细胞和树状细胞的多种人细胞是必需且足够的(图 2;也参见 Dumont 等,“Characterization of a New Cytotoxin that Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis,”Mol.Microbiol. 79(3):814-25,其在此通过引用整体并入)。相比之下,肥大细胞(RBL3H3)、淋巴细胞(Jurkats)、上皮细胞(HepG2 和 293T)和红细胞高耐 LukAB(图 2)。另外,人骨髓细胞系 HL60 分化成 PMN 类细胞(“PMN-HL60”)指示这些细胞对 LukAB 细胞毒性高度敏感(图 2)。

[0146] 上文提供的数据指示 LukAB 靶向并杀死人吞噬细胞(图 2)。重要地,采用原代鼠嗜中性白细胞的实验揭示 LukAB 似乎对人具有特异性,因为当从等基因野生型金黄色葡萄球菌分离的分泌蛋白用鼠细胞孵化时没有观察到细胞毒性或观察到很少的细胞毒性(图 3)。这些数据具有巨大的含义,因为它们提示感染的鼠模型并不能完全测量 LukAB 的贡献,其基于用人细胞系的研究,为由金黄色葡萄球菌生成的最重要的白细胞毒素。因此,致使人吞噬细胞对 LukAB 敏感的细胞决定子的鉴定将能够产生将较好地代表人金黄色葡萄球菌感染的病理学的转基因动物。

[0147] 实施例 2-LukAB 与整合素  $\alpha M/\beta 2$ (Mac-1 或 CR3) 直接相互作用

[0148] 为了鉴定与 LukAB 相互作用的宿主蛋白,用 PMN-HL60 细胞进行捕获测定,PMN-HL60 细胞用从对 LukAB 极度敏感的 HL60 骨髓细胞系中分化的短命嗜中性白细胞类细胞(Dumont 等,“Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis,”Mol.Microbiol. 79(3):814-825(2011),其在此通过引用整体并入)。将溶胞产物用 His- 标签的 LukAB 孵化且使用镍柱分离毒素-宿主蛋白复合物。在用 LukAB 孵化之前将在 PMN-HL60 细胞上的表面蛋白生物素化,从而宿主蛋白可使用荧光素结合的抗生物素蛋白显现(图 4A)。通过采用该技术,观察与 LukAB 相关的许多宿主蛋白(图 4A)。用从人血液中分离、没有生物素化的原代人 PMN 重复捕获,且在用 LukAB 的捕获中富集的细胞因子的同一性和量通过质谱法测定。最丰富的 LukAB- 相互作用细胞表面蛋白为 CD18 和 CD11b(表 1),其分别为整合素复合物的称为整合素  $\alpha M/\beta 2$  的  $\alpha$  和  $\beta$  组分、CR3 或在本文中称为 Mac-1 的 Mac-1。LukAB,而不是 LukED 或 PVL,与 CD11b 的相关性通过用 CD11b 特异性抗体免疫印迹确认(图 4B)。当用纯化的重组毒素和纯化的受体进行捕获时,确立在 LukAB 和 Mac-1 之间的特异性和直接相互作用。全蛋白染色揭示 LukAB、但不是 LukED 或 PVL,可捕获纯化的 Mac-1 复合物的 CD11b 和 CD18 亚单位两者,其分别为约 150kDa 和 95kDa(图 4C)。免疫印迹进一步证实在用 LukAB、而不是其它毒素的捕获中 CD11b 的存在(图 4D)。

[0149] 表 1. LukAB- 相互作用细胞因子的质谱分析

[0150]

鉴定的蛋白( $\geq 3$ 肽)	登录号	分子量	肽的编号
整合素 $\alpha$ -M	ITAM_HUMAN	127 kDa	17
血清白蛋白	ALBU_HUMAN (+2)	69 kDa	13
整合素 $\beta 2$	B4E0R1_HUMAN (+1)	77 kDa	12
Cntm_P13645	Cntm_P13645	24 kDa	10
丙酮酸激酶同工酶 M1/M2	KPYM_HUMAN	58 kDa	9
cDNA FLJ78440	A8K494_HUMAN (+2)	78 kDa	8
网素-2(Plastin-2)	PLSL_HUMAN (+2)	70 kDa	8

[0151]

鉴定的蛋白(≥3肽)	登录号	分子量	肽的 编号
髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase)	PERM_HUMAN	84 kDa	7
肌动蛋白	ACTG_HUMAN (+1)	42 kDa	7
cDNA FLJ55635	B4E0S6_HUMAN (+1)	90 kDa	7
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	G3P_HUMAN (+2)	36 kDa	6
冠蛋白(Coronin)-1A	COR1A_HUMAN	51 kDa	6
杀菌渗透性增强蛋白	BPI_HUMAN	54 kDa	6
cDNA FLJ55493	B4DMF5_HUMAN (+3)	57 kDa	5
蛋白S100-A8	S10A8_HUMAN	11 kDa	5
促分裂素原激活蛋白激酶1	MK01_HUMAN	41 kDa	5
cDNA FLJ75120	A8K345_HUMAN (+1)	42 kDa	5
血红蛋白亚单位β	HBB_HUMAN	16 kDa	5
脂肪细胞质膜-相关蛋白	APMAP_HUMAN	46 kDa	5
ATP合酶亚单位β	A8K4X0_HUMAN (+2)	57 kDa	5
推测非典型蛋白LCN2	A6NII8_HUMAN (+7)	23 kDa	5
热休克70kDa蛋白1A	A8K5I0_HUMAN (+1)	70 kDa	5
苹果酸酶	B2R8J2_HUMAN (+1)	65 kDa	5
内浆网驻留蛋白ERp44	ERP44_HUMAN	47 kDa	4
肽聚糖识别蛋白	PGRP_HUMAN	22 kDa	4
SFPQ蛋白	Q6PIX2_HUMAN (+3)	55 kDa	4
血红蛋白亚单位α	HBA_HUMAN (+1)	15 kDa	4
腺苷酰环化酶-相关蛋白	B2RDY9_HUMAN (+4)	52 kDa	4
转酮醇酶	A8K089_HUMAN (+6)	68 kDa	4
cDNA, FLJ92148	B2R4M6_HUMAN (+1)	13 kDa	4
cDNA FLJ76817	A8K525_HUMAN (+2)	54 kDa	3
CD63抗原	CD63_HUMAN (+1)	26 kDa	3
α-烯醇酶	ENOA_HUMAN	47 kDa	3
E3泛素-蛋白连接酶CBL	CBL_HUMAN	100 kDa	3
鸟嘌呤核苷酸-结合蛋白G(i)	GNAI2_HUMAN (+1)	40 kDa	3
cDNA FLJ53963	B4E3A8_HUMAN (+1)	39 kDa	3
6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	6PGD_HUMAN (+3)	53 kDa	3
催化酶	CATA_HUMAN	60 kDa	3
葡糖-6-磷酸异构酶	G6PI_HUMAN (+3)	63 kDa	3
肌球蛋白-9	MYH9_HUMAN (+1)	227 kDa	3
β-肾上腺素能受体激酶1	ARBK1_HUMAN	80 kDa	3
蛋白酪氨酸磷酸酶	B1ALS2_HUMAN (+2)	147 kDa	3
α-辅肌动蛋白-1	ACTN1_HUMAN (+5)	103 kDa	3

[0152] 为了较好地表征 LukAB 与 Mac-1 的直接相互作用,进行表面等离子体共振 (SPR) 分析,这指示 LukAB 以剂量依赖且可饱和的方式与 Mac-1 结合,产生约 38.4nM 的解离常数 (Kd) (表 2)。

[0153] 表 2. LukAB/Mac-1 相互作用的 SPR 分析

[0154]

蛋白 + LukAB	解离常数(Kd)
人重组 Mac-1	$3.84 \times 10^{-8} \text{ M} (\pm 2.61 \times 10^{-8})$
人重组 I 域	$1.92 \times 10^{-9} \text{ M} (\pm 1.13 \times 10^{-9})$
鼠重组 I 域	$1.06 \text{ M} (\pm 0.89)$

[0155] 实施例 3-Mac-1 的 CD11b 亚单位对于致使细胞对 LukAB 敏感是必需且足够的。

[0156] 为了提供在细胞对 LukAB 和 Mac-1 的敏感性之间的连接,将 HL60 细胞用含有非靶向 shRNA (NT shRNA) 的病毒或用 CD18shRNA 转导。为了增强这些细胞对 LukAB 的敏感性,将稳定转导的 HL60 细胞系分化成 PMN-HL60s (图 5A),且 shRNAs 对 CD18 和 CD11b 的细胞表面水平的影响通过流式细胞术确认 (图 5B)。与 NT shRNA 细胞相比较,CD18shRNA 细胞明显消耗了 CD18 (图 5B)。因为所有整合素  $\alpha$  亚单位的稳定性和表面定位都需要 CD18 (Weber 等, "Characterization of Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1)-Deficient T Cell Lines: The Alpha and Beta Subunits are Interdependent for Cell Surface Expression," *J. Immunol.* 158(1):273-279(1997); Springer 等, "Inherited Deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150, 95 Glycoprotein Family and Its Molecular Basis," *J. Exp. Med.* 160(6):1901-1918(1984), 它们在此通过引用整体并入), 在 CD18shRNA 细胞中也消耗了 CD11b (图 5B)。因此,通过靶向 CD18,产生消耗 Mac-1 的细胞系。用纯化的 LukAB 染毒 CD18shRNA 细胞揭示形成 LukAB 孔需要 Mac-1 (图 5C)。相比之下, PVL 以不依赖 Mac-1 的方式形成孔,致使 LukAB 和 PVL 利用不同的细胞决定子以发挥它们的细胞毒性 (图 5C)。

[0157] 除了 Mac-1 之外,将 PMN-HL60s 用 CD11a/CD18 (LFA) 和 CD11c/CD18 (p150/95) 装饰,且 CD18 的消耗还引起这些  $\beta 2$  整合素的表面水平降低 (图 6)。为了确保 Mac-1 复合物的敲低造成对 LukAB 的抗性增加,而  $\beta 2$  整合素的一般敲低并不造成对 LukAB 的抗性增加,将 HL60 细胞用 CD11b-靶向 shRNA 稳定转导。该策略引起 CD11b 的明显消耗,而对 CD18 水平没有显著影响 (图 5D)。事实上,在用 CD11b-靶向 shRNA 转导的细胞上观察到的 Mac-1 水平与亲本 HL60 细胞的那些相似 (图 5D)。CD11b 的消耗致使细胞对 LukAB 孔具有抗性,而对 PVL 孔没有抗性 (图 5E)。这些发现证明 CD11b 对于致使细胞对 LukAB 敏感是关键的。

[0158] 为了确定 CD11b 对于致使细胞对 LukAB 敏感是否足够,进行功能实验的增益。已经显示 HEK293T 细胞可在缺乏 CD18 的情况下支持 CD11b 表面定位 (Solovjov 等, "Distinct Roles for the Alpha and Beta Subunits in the Functions of Integrin  $\alpha$   $\beta$  2," *J. Biol. Chem.* 280(2):1336-1345(2005), 其在此通过引用整体并入)。因此,将这些细胞用编码 CD11b 的质体或空质体短暂转染,且 CD11b 表面水平经由流式细胞术确定 (图 5F)。用 LukAB、而不是 PVL 染毒这些细胞导致消耗大部分 (80-90%) 的 CD11b<sup>+</sup>HEK293T 细胞,证实 CD11b 对于致使细胞对 LukAB 敏感是必需且足够的 (图 5F)。

[0159] 实施例 4- 对于 LukAB- 介导的对靶细胞的毒性需要 CD11b 的 I- 域。

[0160] 检验用 CD11b 特异性抗体是否可阻断 LukAB 细胞毒性。在用 LukAB 染毒之前,将原代 PMN 用靶向 CD11b 的三种不同抗体以及抗 CD18、CD11a 和 CD11c 的抗体预处理。虽然所有三种 CD11b 抗体和 CD18 抗体都显示出一定程度的阻断 LukAB 毒性,但当与未处理的细胞或同种型对照物相比较时,仅 LM2/1CD11b 抗体显著地抑制 LukAB 活性 (图 7A-7B)。

[0161] LM2/1 抗体识别 CD11b I- 域 (或 A- 域),该域为大多数内源 Mac-1 配体经由依赖金属离子的粘附部位 (MIDAS) 结合之处 (Arnaout 等, "Integrin Structure, Allostery, and Bidirectional Signaling," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:381-410(2005), 其在此通过引用整体并入)。基于 LM2/1 阻断数据,假设 LukAB- 介导的靶细胞杀死需要 CD11b 的 I- 域。为了查明该可能性,构建突变的 CD11b,其中如先前所述 (Yalamanchili 等, "Folding and Function of I Domain-Deleted Mac-1 and Lymphocyte Function-Associated

Antigen-1,” J. Biol. Chem., I- 域使用重叠 PCR 删除 275(29):21877-21882(2000), 其在此通过引用整体并入)。已经确立, I- 域的删除不影响 CD11b 与 CD18 的相互作用或在 Mac-1 和内源配体之间的相互作用不需要 I- 域 (Yalamanchili 等, “Folding and Function of I Domain-Deleted Mac-1 and Lymphocyte Function-Associated Antigen-1,” J. Biol. Chem. 275(29):21877-21882(2000), 其在此通过引用整体并入)。将 HL60 细胞用由含有野生型 (WT) CD11b、I- 缺少 CD11b 或空载体对照物的构建体制成的病毒转导。选择这些细胞, 因为它们高度抵抗 LukAB 且具有低水平的 CD11b (图 5A 和图 5D)。如果 I- 域为细胞毒性所需, 则外源 WT CD11b 将致使这些细胞像 PMN-HL60 细胞一样敏感, 而 I- 缺少型式的 CD11b 却不会。在转导和稳定整合之后, 在 HL60 细胞系的表面上 CD11b 的水平通过流式细胞术用识别 CD11b 的 WT 型式和 I- 缺少型式两者的  $\alpha$ -CD11b 抗体评价 (图 7C)。WT CD11b 和 I- 缺少 CD11b 两者都在与 PMN-HL60 细胞相当或更高的水平下表面暴露 (图 7C)。如通过与空载体对照 HL60 细胞相比较膜破损和细胞死亡增加所证明 (图 7D-7E), 外源 WT CD11b 致使 HL60 细胞对 LukAB 敏感。由具有外源 WT CD11b 的 HL60 细胞展示的敏感性水平与分化的 PMN-HL60 细胞相当。相比之下, 尽管具有与 PMN-HL60 细胞等效的表面 CD11b 水平, 但具有外源 I- 缺少 CD11b 的 HL60 细胞高度抵抗 LukAB- 介导的细胞毒性 (图 7C-7E)。

[0162] 实施例 5- 与鼠 CD11b I- 域相比较, LukAB 对于人 CD11b I- 域显示较高的亲和性。

[0163] 已经显示纯化的 LukAB 对人和猴 PMN 具有高度细胞毒性, 对于兔 PMN 具有中等毒性, 且对于鼠 PMN 具有最低毒性 (图 3) (Malachowa 等, “Staphylococcus aureus Leukotoxin GH Promotes Inflammation,” J. Infect. Dis. 206(8):1185-1193(2012), 其在此通过引用整体并入)。这些发现提示 LukAB 以物种特异性方式靶向血液纯化的 PMN。对 LukED 高度敏感的鼠腹腔渗出细胞 (PECs) 抵抗 LukAB (图 8A)。PECs 主要由复原的 PMN (Ly6G<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) 和单核细胞及巨噬细胞 (Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>) 组成, 其全部具有高水平的表面 CD11b (图 8B)。

[0164] 鉴于 LukAB 的物种特异性以及 CD11b I- 域对毒素活性的必要性 (图 7C-7D), 检验来自不同物种的该域的保守度。人、大猩猩、兔和小鼠 CD11b I- 域的氨基酸序列的比对揭示, 正如所料, 大猩猩与人最类似 (98.6% 同一性), 接着是兔 (79.1% 同一性) 且随后是鼠 (78.1% 同一性) (图 8C)。这些数据与 LukAB 对来自这些物种的 PMN 的趋性相关 (Malachowa 等, “Staphylococcus aureus Leukotoxin GH Promotes Inflammation,” J. Infect. Dis. 206(8):1185-1193(2012), 其在此通过引用整体并入)。为了研究这些差别是否可影响 LukAB 与 CD11b I- 域的结合, 研发了检测 LukAB-CD11b I- 域相互作用的斑点印迹测定。观察在荧光标记的 LukAB 和人 CD11b I- 域之间的剂量依赖性相互作用, 其与过量的未标记的 LukAB、而不是与未标记的 PVL 竞争 (图 8D)。使用该测定比较 LukAB 与人 CD11b I- 域的结合和 LukAB 与鼠 CD11b I- 域的结合揭示 LukAB 优先结合人 CD11b I- 域 (图 8E)。SPR 分析揭示 LukAB 以 1.92nM 的近似 Kd 与人 CD11b I- 域结合, 其比以 1.06M 的 LukAB-鼠 CD11b I- 域相互作用低约 8-9 对数值 (表 1)。

[0165] 实施例 6- 胞外金黄色葡萄球菌利用 CD11b 以在感染期间产生 LukAB- 介导的细胞破损

[0166] 为了确立 CD11b 在金黄色葡萄球菌感染中的作用, 将 NT 或 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞用 CA-MRSA USA300 菌株 LAC 或缺乏 LukAB 的等基因突变体 ( $\Delta$ lukAB) 感染。WT USA300

以 LukAB- 依赖性方式杀死 NT PMN-HL60 细胞 (图 9A)。相比之下,当 CD11b 表面水平在这些细胞中因 shRNA (CD11b) 而降低时,WT USA300 不再导致细胞破损,而是与 lukAB 突变株相似 (图 9A)。

[0167] 进行用 USA300 菌株离体感染纯化的人 PMN,且测试在感染之前经由用抗 CD11b 抗体预处理是否可阻断 LukAB- 介导的细胞破损。这些实验揭示抗 -I- 域 LM2/1 抗体成功地中和 USA300- 介导的细胞破损 (图 9B),因此确立在金黄色葡萄球菌 -PMN 相互作用期间对 LukAB- 介导的 CD11b I- 域的靶向的作用。

[0168] 实施例 7- 吞噬的金黄色葡萄球菌利用 LukAB- 介导的 CD11b 靶向以引起细胞破损并辅助从内部逃逸

[0169] 近来确立,吞噬作用后 LukAB- 介导的细胞破损辅助 USA300 从 PMN 内部早期逃逸和随后的 USA300 生成。为了确定 CD11b 是否促进 LukAB 的胞内细胞毒素活性,将 NT 和 CD11b shRNA PMN-HL60 细胞用受调理的 USA300 感染并同步化以辅助吞噬作用。重要地,CD11b 的消耗不影响 USA300 的吞噬作用 (图 10A-10B)。在这些条件下,CD11b 的敲低消除了由 WT USA300 引起的细胞破损 (图 11A)。

[0170] 这些实验揭示,吞噬的 USA300 采用 LukAB 来防止 PMN-HL60- 介导的生长约束 (图 11B)。然而,CD11b 的敲低消除了与  $\Delta$  lukAB 突变株相比较 WT USA300 的生长优势 (图 11B)。

[0171] 为了使 CD11b 被吞噬的金黄色葡萄球菌所利用以从 PMN 内部逃逸,CD11b 必须存在于包围金黄色葡萄球菌的吞噬体膜中。为了确定在金黄色葡萄球菌吞噬期间 CD11b 的定位,将人 PMN 用荧光标记的  $\alpha$ -CD11b 抗体或荧光标记的同种型对照物预染色,接着用 GFP-USA300 感染。在同步化之后将受感染的细胞固定且使用具有 z- 堆叠能力的 Applied Precision Personal DV 活细胞成像系统成像。在未感染的人 PMN 中,CD11b 染色在细胞的质膜上散布 (图 11C)。然而,在用 USA300 感染之后,发现 CD11b 与吞噬的 GFP-USA300 相关 (图 11C)。

[0172] 中和 LM2/1 抗 -CD11b 抗体用以致力于阻断由吞噬的 USA300 引起的 LukAB- 介导的 PMN 破损。对于这些实验,将 PMN 用 LM2/1 抗体或同种型对照物预处理,之后用 GFP-USA300WT、等基因  $\Delta$  lukAB、或用 lukAB 染色体补充的等基因的  $\Delta$  lukAB 感染。这些实验在存在溶葡萄球菌素和抗 -LukA 的情况下进行以消除胞外细菌和胞外 LukA B 的潜在贡献以及荧光染料溴化乙锭以测量孔形成。值得注意的是,在感染之前用 LM2/1 预处理并不阻断金黄色葡萄球菌的吞噬作用,因为在 PMN 内观察到的 GFP-USA300 的量类似,与 LM2/1 处理无关 (图 12)。当将 PMN 用同种型对照抗体预处理时,在同步化后 30 分钟,吞噬的 USA300 导致 LukAB- 介导的孔形成 (图 11D)。相比之下,LM2/1 预处理引起 LukAB- 介导孔形成减少 (图 11D-11E),模拟在用 lukA B 突变株的情况下观察的表型。

[0173] 实施例 1-7 的论述

[0174] 该研究描述鉴定 Mac-1 整合素的 CD11b 作为由葡萄球菌白细胞毒素 LukAB 使用以特异性靶向并杀死细胞的细胞分子。该结论通过 LukAB 与 Mac-1 复合物 (特别是 CD11b 的 I- 域) 直接相互作用的发现支持,且如通过敲低和功能分析的增益所证明,CD11b 对于致使细胞对 LukAB 敏感是必需并足够的。

[0175] 由 LukAB、而不是其它双组分毒素如 LukED 和 PVL 特异性利用的细胞靶的鉴定凸显葡萄球菌白细胞毒素对于靶向具体细胞类型具有非冗余机制。CCR5 近来被鉴定为由

LukED 利用以靶向并杀死淋巴细胞、巨噬细胞和树状细胞的细胞受体 (Alonzo 等, “CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED,” *Nature* 493(7430):51-55(2013), 其在此通过引用整体并入)。然而, 单核细胞和 PMN 被 LukED 以不依赖 CCR5 的方式杀死, 这提示 LukED 可利用另外的细胞受体以靶向这些细胞 (Alonzo 等, “CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED,” *Nature* 493(7430):51-55(2013), 其在此通过引用整体并入)。单一葡萄球菌毒素可靶向多种受体且各种毒素可利用不同的非冗余受体的事实大大增加可在已经广泛的毒素清单上消除金黄色葡萄球菌的细胞类型的数目。

[0176] 诸如 PMN 的先天免疫细胞的靶向杀死对于金黄色葡萄球菌以及许多其它人病原体的致病原因是关键性的。Mac-1 在由 LukAB 靶向的包括 PMN、巨噬细胞、单核细胞和树状细胞的所有细胞 (Ho&Sp ringer, “Mac-1 Antigen: Quantitative Expression in Macrophage Pop ulations and Tissues, and Immunofluorescent Localization in Spleen,” *J. Immunol.* 128(5):2281-2286(1982), 其在此通过引用整体并入) 上表达 (Dumont 等, “Characterization of a New Cytotoxin That Contr ibutes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis,” *Mol. Microbiol.* 79(3):814-825(2011), 其在此通过引用整体并入), 且涉及到多种细胞功能, 诸如吞噬、细胞激活、细胞介导的杀死和化学趋向性 (Solovjov 等, “D istinct Roles for the Alpha and Beta Subunits in the Functions of I ntegrin AlphaMbeta2,” *J. Biol. Chem.* 280(2):1336-1345(2005); Hynes R. O., “Integrins: Bidi rectional, Allosteric Signaling Machines,” *C ell* 110(6):673-687(2002), 它们在此通过引用整体并入)。本研究证明胞外金黄色葡萄球菌和吞噬的金黄色葡萄球菌两者采用 LukAB, 以在感染期间通过靶向 CD11b 造成 PMN 破损。CD11b 包围吞噬的金黄色葡萄球菌的发现使 CD11b 与 LukAB- 介导的金黄色葡萄球菌从吞噬体中逃逸相连。

[0177] 鉴定人 CD11b I- 域作为 LukAB 的细胞靶提供对于由该毒素展示出的所观察的物种特异性的解释。LukAB 对鼠 CD11b I- 域的亲和性比对于人 CD11b I- 域观察到的亲和性小约 8-9 对数值, 这与先前报道的鼠 PMN 的敏感性相关 (Malachowa 等, “*Staphylococcus aureus* Leuko toxin GH Promotes Inflammation,” *J. Infect. Dis.* 206(8):1185-1193(2012), 其在此通过引用整体并入)。在结合亲和性方面的差别最可能通过基于氨基酸序列比对在来自这两种物质的 I- 域之间的发散序列同源性来解释, 其在这两个 I- 域之间产生 78.1% 的同一性。当然, 据观察 USA300 在鼠脓肿中体内表达 lukAB, 并且毒素促进在鼠肾脓肿模型中的感染过程和载菌量两者 (Dumont 等, “Characterization of a N ew Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesi s,” *Mol. Microbiol.* 79(3):814-825(2011), 其在此通过引用整体并入)。即使 LukAB 在该肾脓肿形成的鼠模型中起作用, 但与 PMN 相比较, 小鼠 PMN 对该毒素的明显抗性也提示小鼠模型低估 LukAB 对人的金黄色葡萄球菌病理学的真实贡献。由金黄色葡萄球菌生成的扩大数目的致病因子的物种特异性活性 (例如, 超级抗原、CHIPS、P VL、LukAB) (Vandenesch 等, “*Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arse nal of Membrane-Damaging Virulence Factors ?” *Front Cell Infect. Mi crobiol.* 2:12(2012); Rooijackers 等, “*Staphylococcal* Innate Immune Evasion,” *Trends Microbiol.* 13(12):596-601(2005), 它们在此通过引用整体并入) 凸显目前用以研究金黄色葡萄球菌致病原因的动物模型的局

限性。因此,改善的动物模型对于理解金黄色葡萄球菌的全部致病潜在性的是首要的,这是研发可抗击该重要人病原体的有效药物的先决条件。

[0178] 尽管为了说明的目的详细地描述了本发明,但是应理解,这些细节仅为了该目的,且在脱离由以下权利要求书定义的本发明的精神和范围下本领域的技术人员可在此进行改变。

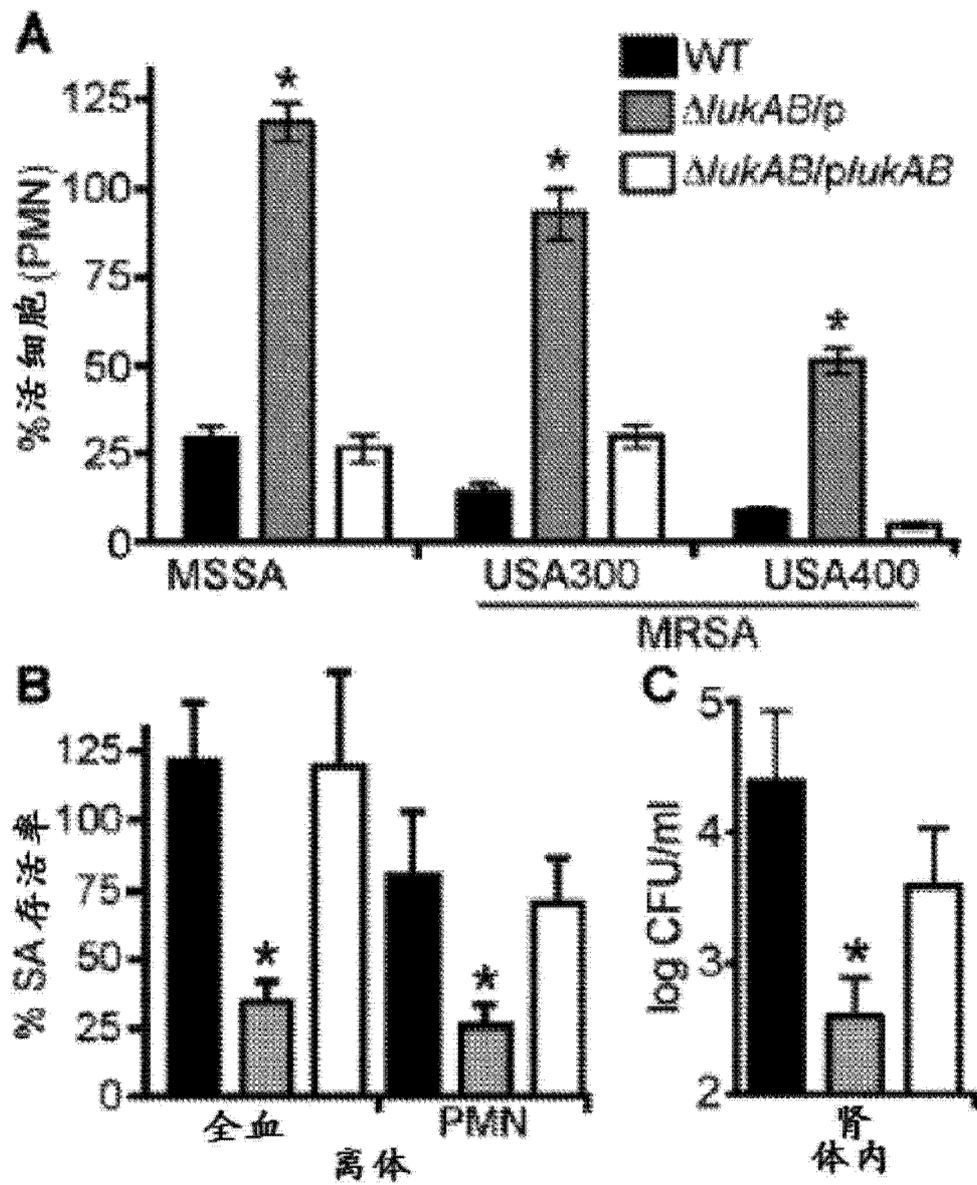


图 1A-1C

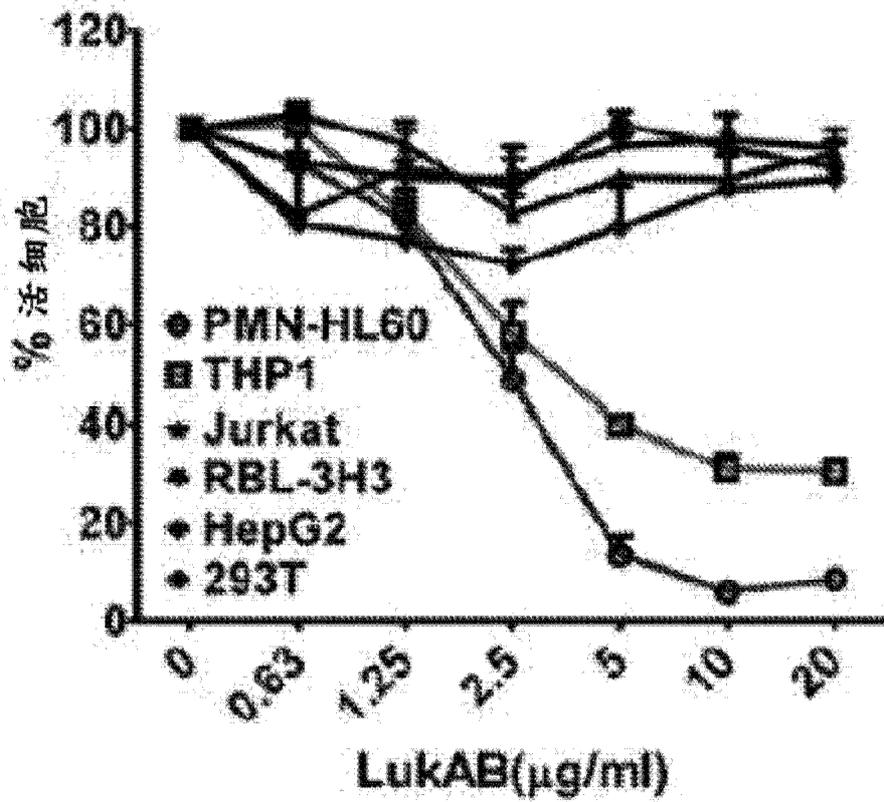


图 2

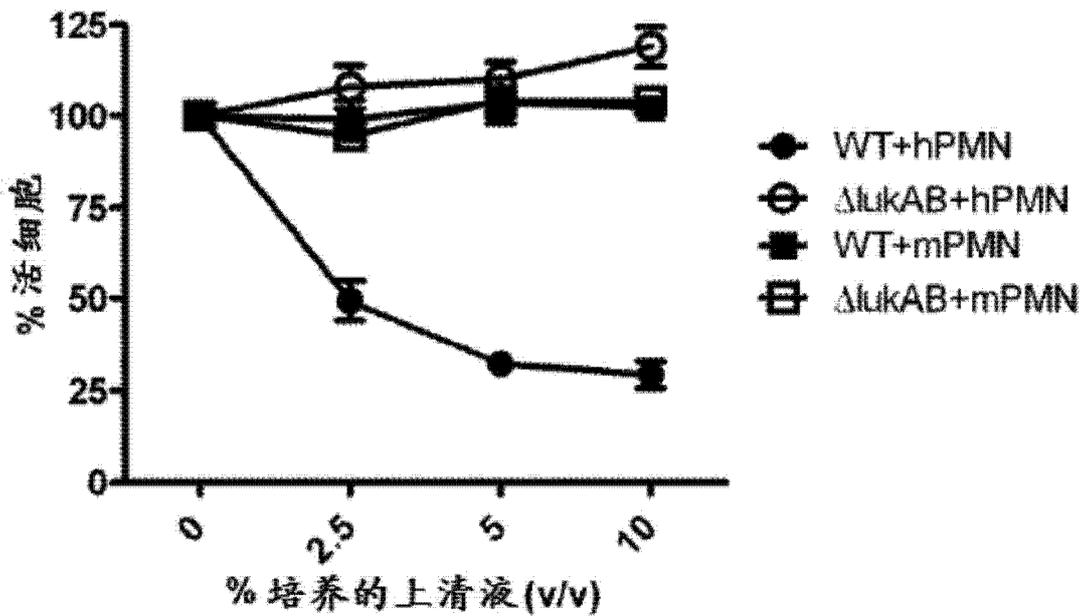


图 3

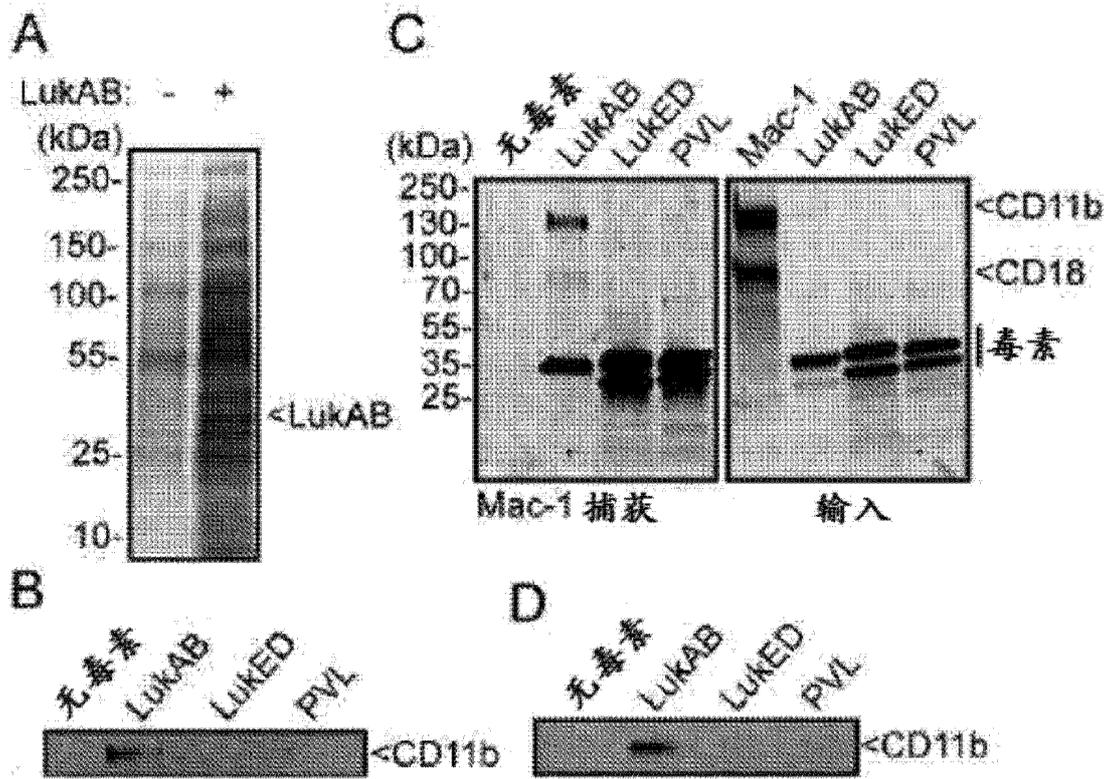


图 4A-4D

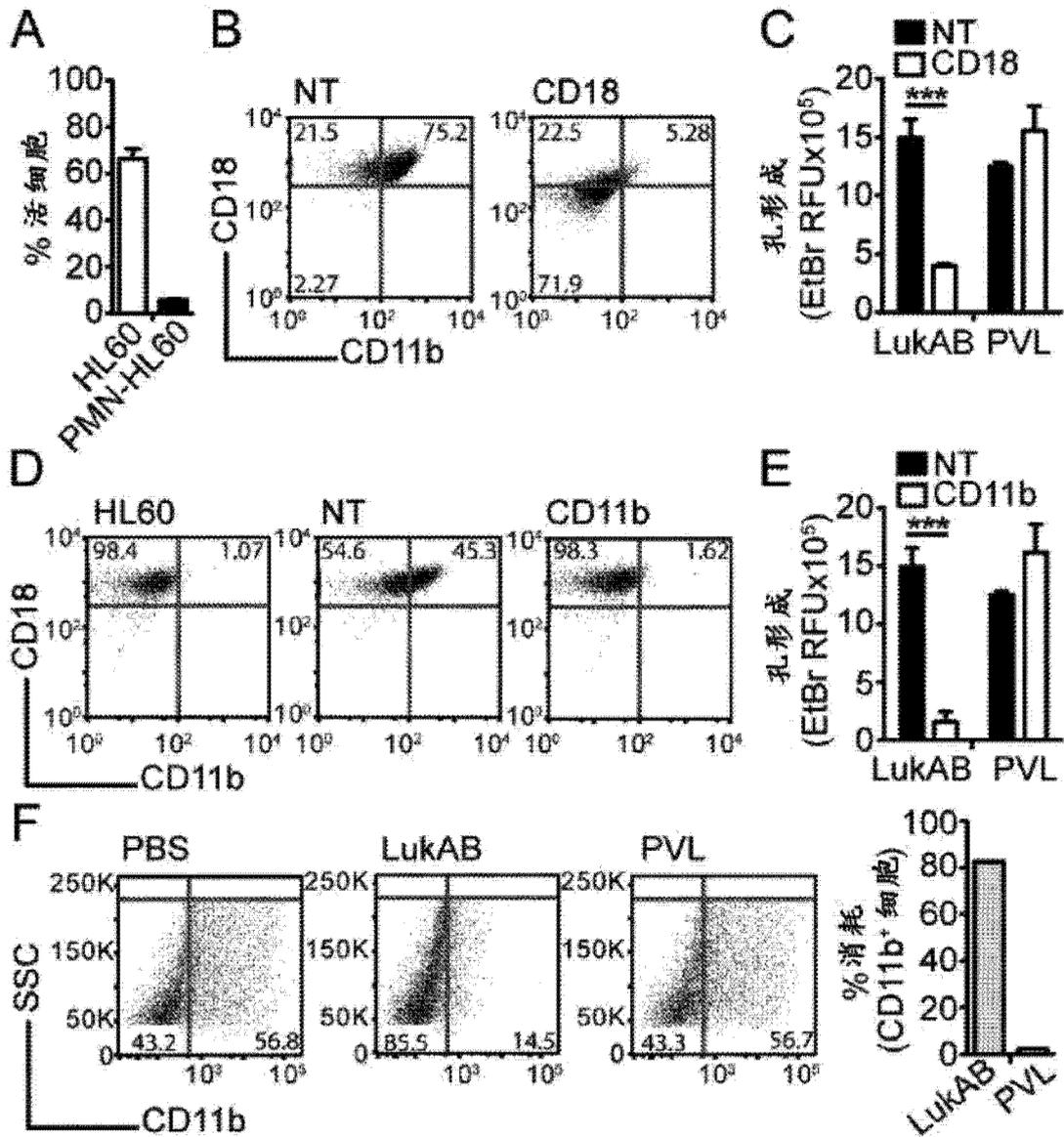


图 5A-5F

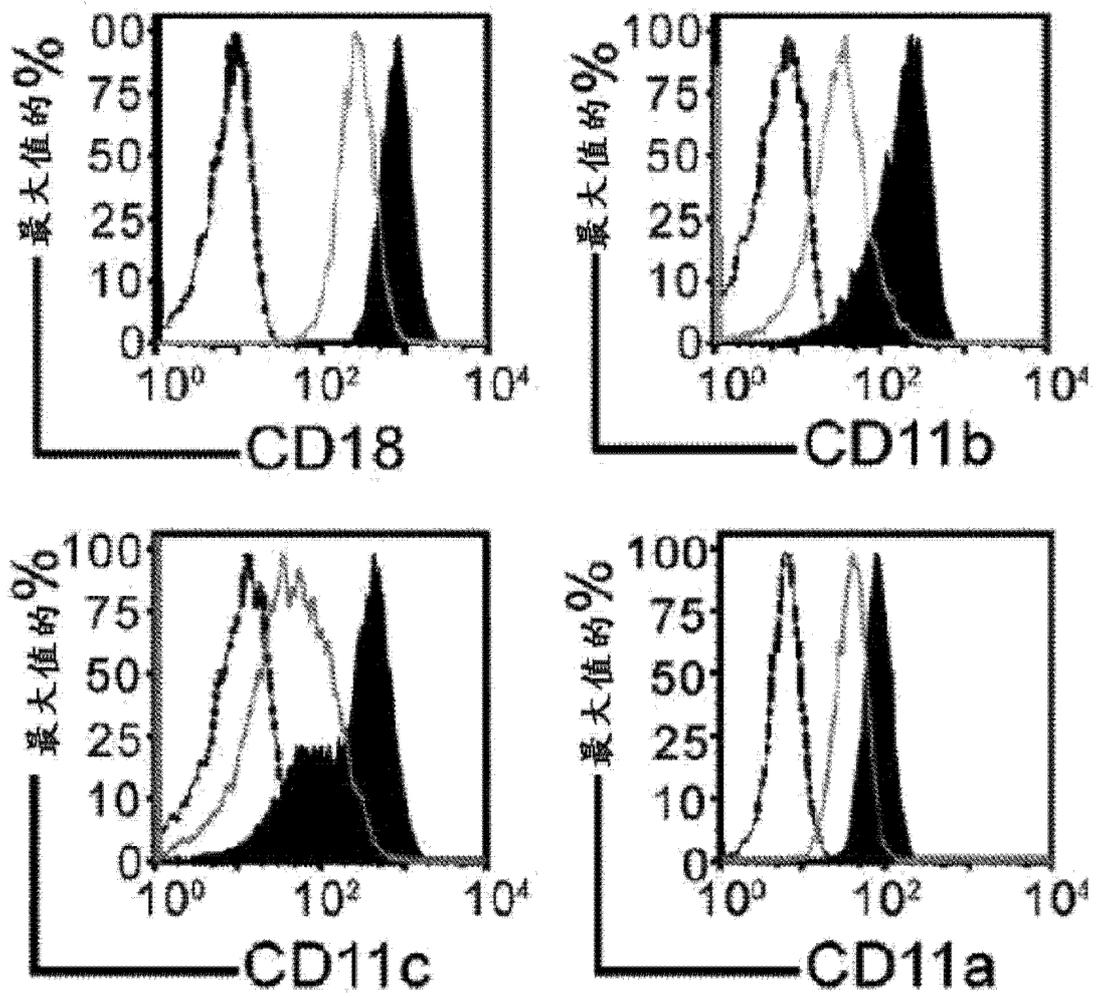


图 6

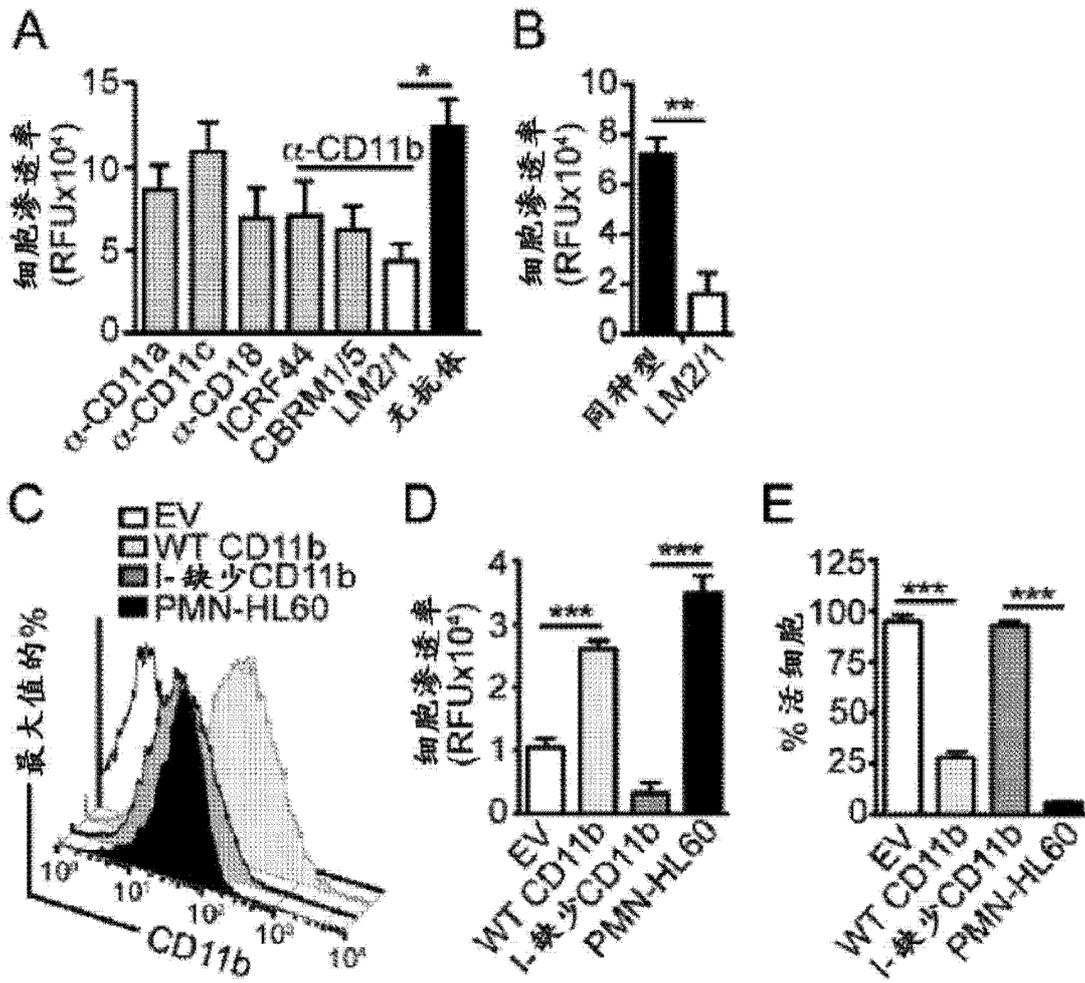


图 7A-7E

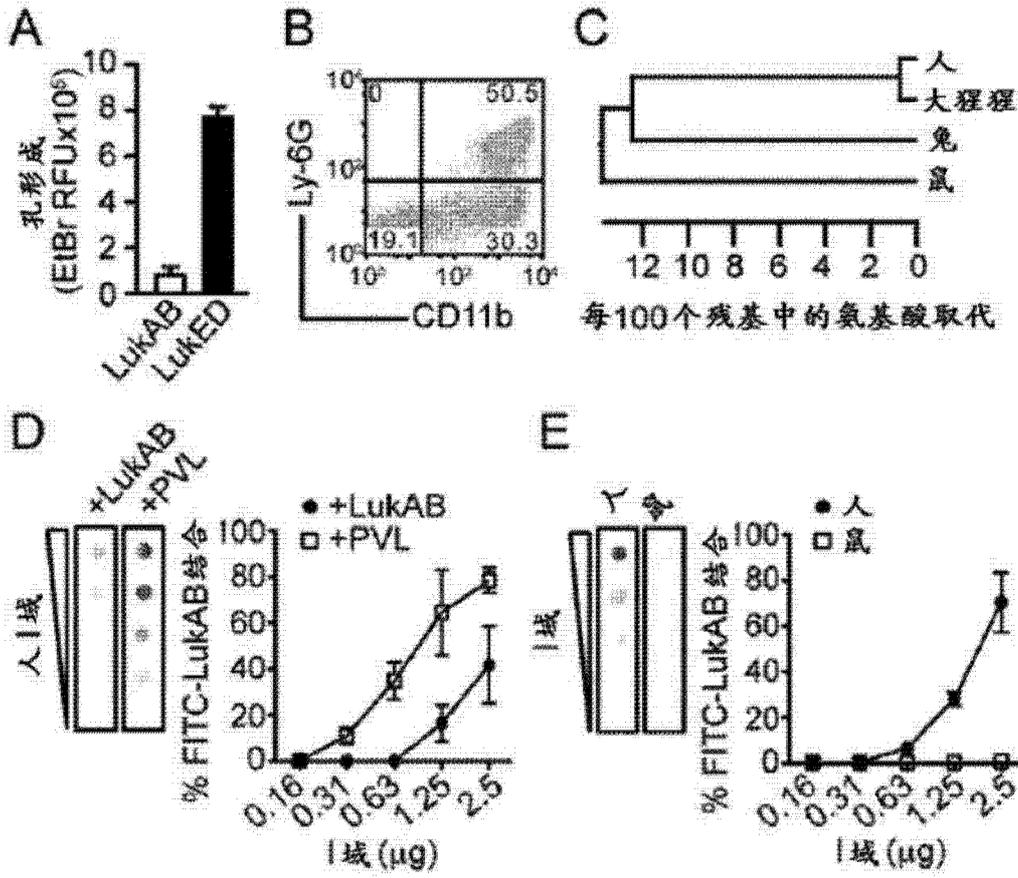


图 8A-8E

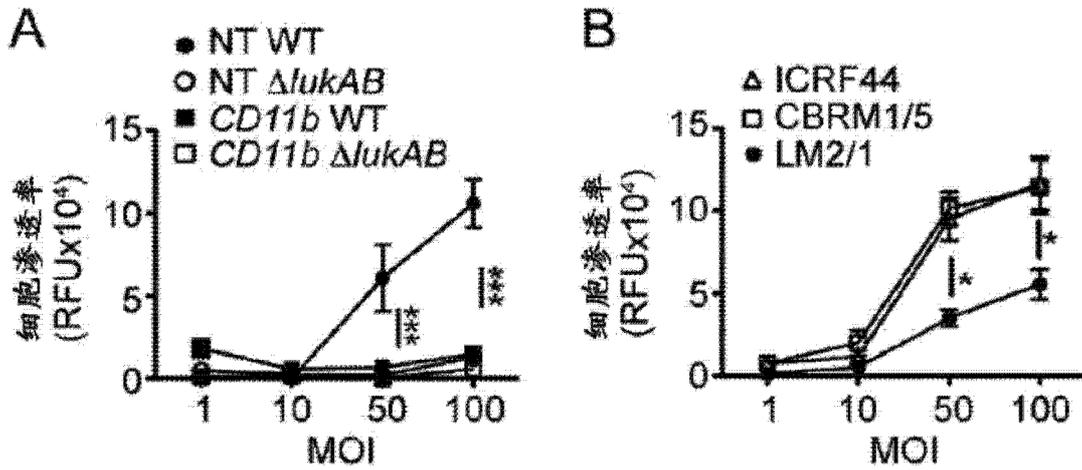


图 9A-9B

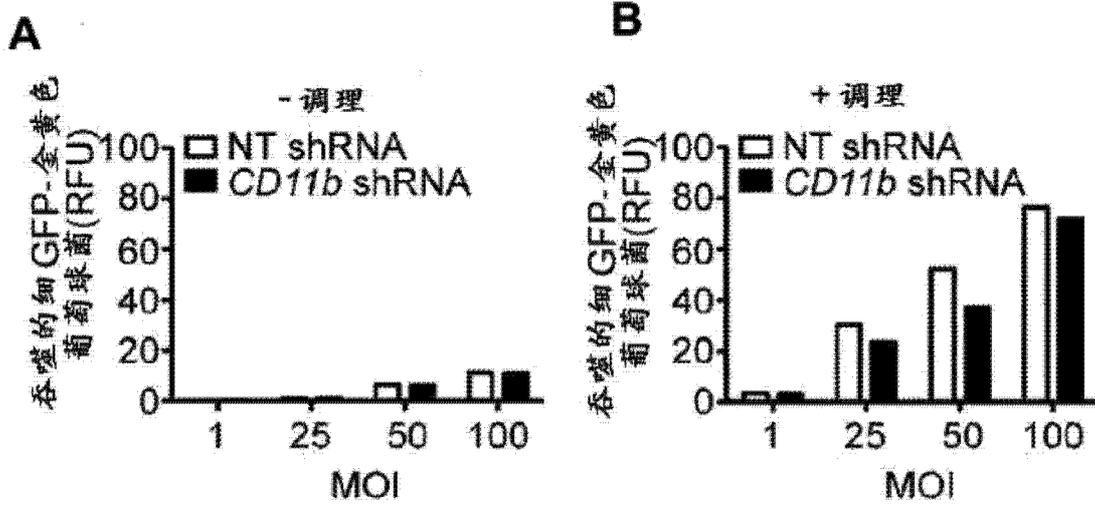


图 10A-10B

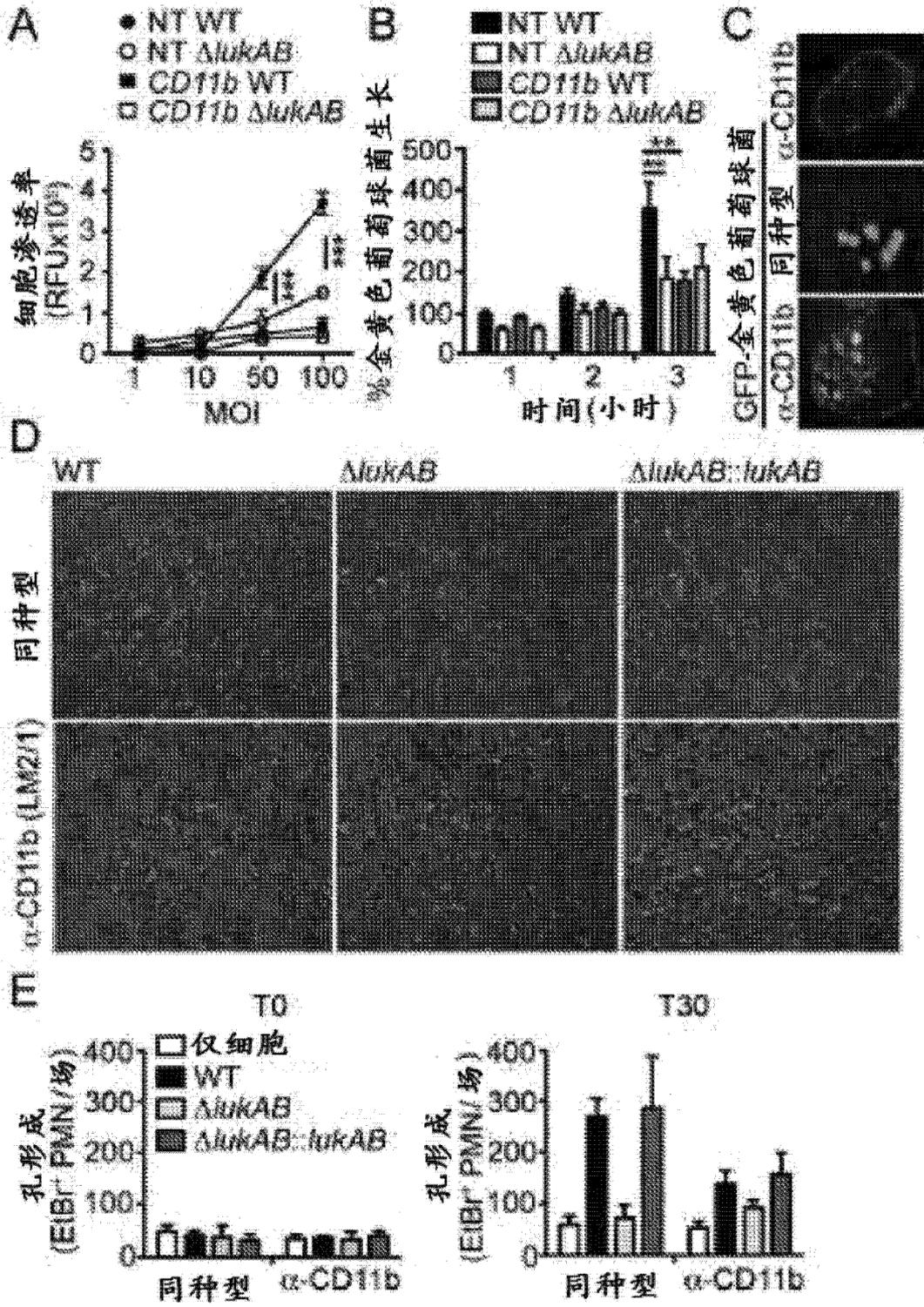


图 11A-11E

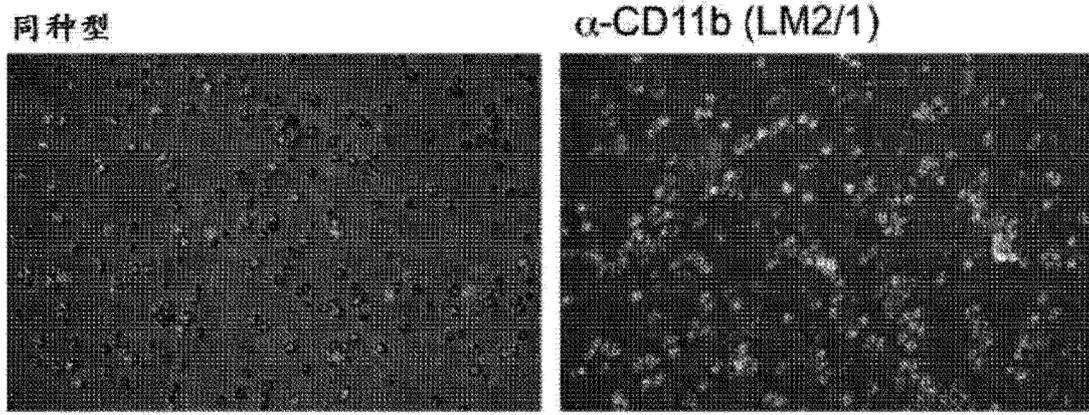


图 12