



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105407915 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201480028566. 3

代理人 沈敬亭 徐丽华

(22) 申请日 2014. 03. 14

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/00(2006. 01)

61/789, 091 2013. 03. 15 US

A61K 39/38(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/028521 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/144211 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 加州大学洛杉矶分校港口医学中心

生物医学研究所

地址 美国加利福尼亚州

申请人 诺瓦蒂格姆疗法有限公司

(72) 发明人 阿什拉夫·S·易卜拉欣

迈克尔·R·伊曼 斯科特·G·菲勒

小约翰·E·爱德华兹

小约翰·P·亨尼西

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

权利要求书10页 说明书34页

(54) 发明名称

用于治疗真菌性和细菌性病原体的组合物和方法

(57) 摘要

本发明的特征在于在使受试者对真菌或细菌感染或两者免疫中有用的念珠菌属细胞表面蛋白Als3 和Hyr1 的片段及其组合。

Als3(18-324)

1. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

```

      KTI   TGVENSFNLSLTWSNAATYNY   KGPGTPTWNAVLGWSLDGTS
ASPGDTFTLNMPFCVFKETTS   QTSVDLTAHGVKYATCQFQA   GEEFMTFSTLTCTVSNTLTP
SIKALGTVTLPLAFNVGGTG   SSVLDLEDSKCFTAGTNTVTF   NDGGKKISINVDFERSNVDP
KGYLTDSRVIPSLNKKVSTLF   VAPQCANGYTSGMTGFANTY   GDVQIDCSNIHVGITKGLND
WNYPVSSSESFSYTKTCSSNG   IFITYKNVPAGYRPFVDAIY   SATDVNSYTLSYANEYTCAG
GYWQRAPEFTLRWTGYRNSDA   GSNG (SEQ ID NO: 2)。

```

Als3(富含 Ser/Thr 的序列)

2. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

```

IVIVATTRITVDSTTA       VTTLFPDPNRDKTKTIEILK
PIPTTTITTSYVGVTTSYST   KTAPIGETATVIVDIPYHTT   TTVTSKWTGTITSTTHTNP
TDSIDTVIVQVP (SEQ ID NO :3)。

```

Hyr1(疏水性序列)

3. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

```

TSRIDRGGIQQFGHDVKVHS   GATWAILGTTLCSEFFGGLEV   EKGASLFIKSDNGPVLALNV
ALSTLVRPVINNGVISLNSK   SSTSFNFIDIGSSFTNNGE   IYLDSSGLVKSTAYLYAREW
TNNGLIVAY (SEQ ID NO :5)。

```

Hyr1(154-350)

4. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

```

QNQKAAG       NIAFGTAYQTITNNGQICLR
HQDFVPATSIKGTGCVTADE   DTWIKLGNTILSVEPTNPFY   LKDSKSSLIVRAVSSNQTFY
VHGFGNGNKLGLTLPLTGNR   DHFRFEYYPDTGILQLRADA   LPQYFKIGKGYDSKLPRIYN
SRGLKNAVITYDGPVPNNRIP   AVCLIPCTNGPSAPESSEDL   NTFITSSDET (SEQ ID NO: 6)。

```

Hyr1(201-350)

5. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

```

DTWIKLGNTILSVEPTNPFY   LKDSKSSLIVRAVSSNQTFY
VHGFGNGNKLGLTLPLTGNR   DHFRFEYYPDTGILQLRADA   LPQYFKIGKGYDSKLPRIYN
SRGLKNAVITYDGPVPNNRIP   AVCLIPCTNGPSAPESSEDL   NTFITSSDET (SEQ ID NO: 7)。

```

Hyr1(25-469)

6. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

TQRIDRGGIQGFHGDV	KVHSGATWAILGTTLCSEFFG	
GLEVENGASLFIKSDNGFVL	ALNVALSTLVRPVINNGVIS	LNSKSSSTSF3NFDIGGGSFT
NNGEIVLDSSGLVKSTAYLY	AKEWTTNGLIVATQMQKAAG	NIAFGTAYQTITNNGQICLR
HQDFVPATKINGTGCVTADE	DTWIKLGNTILSVEPTNHFY	LKDSKSSGLIVHAVSSNQFTT
VHGFGNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDGTGILQLRADA	LPQYFKIGNGYDCKLFRIVN
GRGLKNAVITYDGPVFNNEIP	AVCLIPCTNGCPAPESEEDL	NTPTTSSCIETSSYSSAATES
SVVSESSSAVDGLTSSSLSS	KSESSDVVSGSTTNIESSTTA	IETTMNSESSTDAGSSGISQ
SESSSTAITSSSETSSSESM	SASSTTASNTSIETDSGIVS	QSESSSNAL (SEQ ID NO: 8)。

Hyr1 (201-469)

7. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

DTWIKLGNTILSVEPTNHFY	LKDSKSSGLIVHAVSSNQFTT	
VHGFGNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDGTGILQLRADA	LPQYFKIGNGYDCKLFRIVN
GRGLKNAVITYDGPVFNNEIP	AVCLIPCTNGCPAPESEEDL	NTPTTSSCIETSSYSSAATES
SVVSESSSAVDGLTSSSLSS	KSESSDVVSGSTTNIESSTTA	IETTMNSESSTDAGSSGISQ
SESSSTAITSSSETSSSESM	SASSTTASNTSIETDSGIVS	QSESSSNAL (SEQ ID NO: 9)。

Hyr1 (富含 Ser/Thr 的序列)

8. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

SSYSSAATESVVVS ESSSAVDLSLSSSLSSKSES
SDVVSSTTNIESSTAIETT MNSESSTDAGSSSISQSESS STAITSSSEISSSESMSASS
TTASNTSIETDSGIVSQSES SSNAL (SEQ ID NO: 10)。

Hyr1 (154-469)

9. 一种可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列由与以下具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

QKQKAAG	NIAFGTAYQTITNNGQICLR	
HQDFVPATKINGTGCVTADE	DTWIKLGNTILSVEPTNHFY	LKDSKSSGLIVHAVSSNQFTT
VHGFGNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDGTGILQLRADA	LPQYFKIGNGYDCKLFRIVN
GRGLKNAVITYDGPVFNNEIP	AVCLIPCTNGCPAPESEEDL	NTPTTSSCIETSSYSSAATES
SVVSESSSAVDGLTSSSLSS	KSESSDVVSGSTTNIESSTTA	IETTMNSESSTDAGSSGISQ
SESSSTAITSSSETSSSESM	SASSTTASNTSIETDSGIVS	QSESSSNAL (SEQ ID NO: 13)。

大肠杆菌 (E. coli) 表达的 Als3/Hyr1 融合蛋白

E1 = A-B-X-C-D

10. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-B-X-C-D (SEQ ID NO: 11),

其中 A 为 SEQ ID NO: 2;

其中 B 为 SEQ ID NO: 3;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 C 是 SEQ ID NO: 5; 和

其中 D 是 SEQ ID NO: 6。

11. 根据权利要求 10 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 A-B-C-D (SEQ ID

NO:12)。

12. 根据权利要求 10 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 A-B-C-D(SEQ ID NO:12)。

E2 = A-X-C-D

13. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-X-C-D(SEQ ID NO:13),

其中 A 为 SEQ ID NO:2;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 C 是 SEQ ID NO:5;和

其中 D 是 SEQ ID NO:6。

14. 根据权利要求 13 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 A-C-D(SEQ ID NO:14)。

15. 根据权利要求 13 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 A-C-D(SEQ ID NO:14)。

E3 = A-X-D

16. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-X-D(SEQ ID NO:15),

其中 A 为 SEQ ID NO:2;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;和

其中 D 是 SEQ ID NO:6。

17. 根据权利要求 16 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 A-D(SEQ ID NO:16)。

18. 根据权利要求 16 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 A-D(SEQ ID NO:16)。

E4 = C-D-X-A-B

19. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

C-D-X-A-B(SEQ ID NO:17),

其中 C 是 SEQ ID NO:5;

其中 D 是 SEQ ID NO:6;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 A 为 SEQ ID NO:2;和

其中 B 为 SEQ ID NO:3。

20. 根据权利要求 19 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 C-D-A-B(SEQ ID NO:18)。

21. 根据权利要求 19 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 C-D-A-B(SEQ ID NO:18)。

E5 = C-D-X-A

22. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

C-D-X-A(SEQ ID NO:19),

其中 C 是 SEQ ID NO:5;

其中 D 是 SEQ ID NO:6;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;和

其中 A 为 SEQ ID NO:2。

23. 根据权利要求 22 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 C-D-A (SEQ ID NO:20)。

24. 根据权利要求 22 所述的分离的多肽, 其中所述多肽是 C-D-A (SEQ ID NO:20)。

E6 = D-X-A-B

25. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

D-X-A-B (SEQ ID NO:21),

其中 D 是 SEQ ID NO:6;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 A 为 SEQ ID NO:2; 和

其中 B 为 SEQ ID NO:3。

26. 根据权利要求 25 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 D-A-B (SEQ ID NO:22)。

27. 根据权利要求 25 所述的分离的多肽, 其中所述多肽是 D-A-B (SEQ ID NO:22)。

E7 D-X-A

28. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

D-X-A (SEQ ID NO:23),

其中 D 是 SEQ ID NO:6;

其中 X 是不存在的或者是连接肽; 和

其中 A 为 SEQ ID NO:2。

29. 根据权利要求 28 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 D-A (SEQ ID NO:24)。

30. 根据权利要求 28 所述的分离的多肽, 其中所述多肽是 D-A (SEQ ID NO:24)。

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 表达的 Als3/Hyr1 融合蛋白

S1 = A-B-X-C-D

31. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11),

其中 A 为 SEQ ID NO:2;

其中 B 为 SEQ ID NO:3;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 C 是 SEQ ID NO:5; 和

其中 D 是 SEQ ID NO:6。

32. 根据权利要求 31 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 A-B-C-D (SEQ ID NO:12)。

33. 根据权利要求 31 所述的分离的多肽, 其中所述多肽是 A-B-C-D (SEQ ID NO:12)。

S2 = A-X-C-D-E

34. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-X-C-D-E (SEQ ID NO:25),

其中 A 为 SEQ ID NO:2;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;和

其中 E 为 SEQ ID NO :10。

35. 根据权利要求 34 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 A-C-D-E (SEQ ID NO :26)。

36. 根据权利要求 34 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 A-C-D-E (SEQ ID NO :26)。

S3 = A-X-D-E

37. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-X-D-E (SEQ ID NO :27),

其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;

其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;和

其中 E 为 SEQ ID NO :10。

38. 根据权利要求 37 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 A-D-E (SEQ ID NO :28)。

39. 根据权利要求 37 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 A-D-E (SEQ ID NO :28)。

S4 = C-D-E-X-A-B

40. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

C-D-E-X-A-B (SEQ ID NO :29),

其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

其中 E 为 SEQ ID NO :10 ;

其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

其中 B 为 SEQ ID NO :3。

41. 根据权利要求 40 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 C-D-E-A-B (SEQ ID NO :30)。

42. 根据权利要求 40 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 C-D-E-A-B (SEQ ID NO :30)。

S5 = C-D-X-A-B

43. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

C-D-X-A-B (SEQ ID NO :17),

其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

其中 B 为 SEQ ID NO :3。

44. 根据权利要求 43 所述的分离的多肽,其中所述多肽基本上同一于 C-D-A-B (SEQ ID NO :18)。

45. 根据权利要求 43 所述的分离的多肽,其中所述多肽是 C-D-A-B (SEQ ID NO :18)。

S6 = D-X-A-B

46. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

D-X-A-B (SEQ ID NO:21),

其中 D 是 SEQ ID NO:6;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 A 为 SEQ ID NO:2; 和

其中 B 为 SEQ ID NO:3。

47. 根据权利要求 46 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 D-A-B (SEQ ID NO:22)。

48. 根据权利要求 46 所述的分离的多肽, 其中所述多肽是 D-A-B (SEQ ID NO:22)。

S7 = D-X-A

49. 一种分离的多肽, 包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

D-X-A (SEQ ID NO:23),

其中 D 是 SEQ ID NO:6;

其中 X 是不存在的或者是连接肽; 和

其中 A 为 SEQ ID NO:2。

50. 根据权利要求 49 所述的分离的多肽, 其中所述多肽基本上同一于 D-A (SEQ ID NO:24)。

51. 根据权利要求 49 所述的分离的多肽, 其中所述多肽是 D-A (SEQ ID NO:24)。

52. 一种分离的核酸分子, 所述核酸分子编码根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽。

53. 一种分离的核酸分子, 包含基本上同一于根据权利要求 52 所述的分离的核酸分子的核酸序列。

54. 一种包含根据权利要求 52 或 53 所述的核酸分子的载体。

55. 一种包含根据权利要求 52 或 53 所述的核酸分子的细胞。

56. 一种生产重组多肽的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 提供用根据权利要求 52 或 53 所述的核酸分子转化的细胞, 所述核酸分子编码定位用于在所述细胞中表达的多肽;

(b) 在用于表达所述核酸分子的条件培养所述转化的细胞, 其中所述培养导致所述重组多肽的表达; 和

(c) 分离所述重组多肽。

57. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述细胞是细菌。

58. 根据权利要求 57 所述的方法, 其中所述细胞是酵母。

59. 一种根据权利要求 56 所述的方法生产的重组多肽。

60. 一种基本上纯的抗体, 特异性识别并结合于根据权利要求 1-51、59 或 118-137 所述的多肽中的任一个。

61. 一种抗原组合物, 包含根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽和药用载体、稀释剂和 / 或赋形剂。

62. 根据权利要求 61 所述的组合物, 还包含佐剂。

63. 一种在哺乳动物中对抗原引起免疫应答的方法,包含将根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽,或根据权利要求 61 所述的抗原组合物给予所述哺乳动物,其中所述多肽或所述组合物在所述哺乳动物中对所述抗原引起免疫应答。

64. 根据权利要求 63 所述的方法,其中将单一剂量的所述多肽或所述组合物给予所述哺乳动物。

65. 根据权利要求 63 所述的方法,其中将多个剂量的所述多肽或所述组合物给予所述哺乳动物。

66. 根据权利要求 63 所述的方法,其中至少隔一天给予所述多个剂量。

67. 根据权利要求 65 所述的方法,其中给予所述组合物两次。

68. 根据权利要求 65 所述的方法,其中至少隔两星期给予所述多个剂量。

69. 根据权利要求 63-68 中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

70. 一种疫苗,包含免疫原性量的根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽、和药用赋形剂。

71. 根据权利要求 70 所述的疫苗,包含不同的根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽的混合物。

72. 根据权利要求 70 或 71 所述的疫苗,还包含佐剂。

73. 根据权利要求 72 所述的疫苗,其中所述佐剂是铝胶。

74. 根据权利要求 70-73 中任一项所述的疫苗,用于对哺乳动物接种抵抗念珠菌病或革兰氏阴性菌或金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)。

75. 根据权利要求 74 所述的疫苗,其中所述哺乳动物是人。

76. 根据权利要求 74 或 75 所述的疫苗,其中所述疫苗将通过肌内、皮下或皮内给药来给予。

77. 根据权利要求 76 所述的疫苗,其中所述疫苗将通过肌内给药来给予。

78. 根据权利要求 70-77 中任一项所述的疫苗,其中所述接种还包括给予加强剂量。

79. 根据权利要求 74-77 中任一项所述的疫苗,其中所述念珠菌病是播散性念珠菌病。

80. 根据权利要求 79 所述的疫苗,其中所述播散性念珠菌病是血源性播散性念珠菌病。

81. 根据权利要求 74-77 中任一项所述的疫苗,其中所述念珠菌病是粘膜念珠菌病。

82. 根据权利要求 74-81 中任一项所述的疫苗,其中所述念珠菌病是由白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、克鲁斯念珠菌 (*Candida krusei*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*) 或热带念珠菌 (*Candida tropicalis*) 引起的。

83. 一种对哺乳动物接种抵抗念珠菌病的方法,包括将根据权利要求 70 所述的疫苗给予所述哺乳动物,由此对所述哺乳动物接种抵抗念珠菌病或革兰氏阴性菌或金黄色葡萄球菌。

84. 根据权利要求 83 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

85. 根据权利要求 83 或 84 所述的方法,其中通过肌内、皮下或皮内给药来给予所述疫苗。

86. 根据权利要求 83 或 84 所述的方法,其中通过肌内给药来给予所述疫苗。

87. 根据权利要求 83-86 中任一项所述的方法,其中所述给予还包括给予加强剂量。

88. 根据权利要求 83-87 中任一项所述的方法,其中所述念珠菌病为播散性念珠菌病。
89. 根据权利要求 88 所述的方法,其中所述播散性念珠菌病是血源性播散性念珠菌病。
90. 根据权利要求 83-87 中任一项所述的方法,其中所述念珠菌病是粘膜念珠菌病。
91. 根据权利要求 83-90 中任一项所述的方法,其中所述念珠菌病是由白色念珠菌、光滑念珠菌、克鲁斯念珠菌、近平滑念珠菌或热带念珠菌引起的。
92. 一种产生嵌合疫苗的方法,包括以下步骤:
- (a) 提供噬菌体、酵母或病毒;
 - (b) 将编码根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽的核酸分子插入到所述噬菌体、酵母或病毒中;
 - (c) 使所述多肽在所述噬菌体、酵母或病毒中表达;
 - (d) 分离包含表达的所述多肽的步骤 (c) 中所述的噬菌体、酵母或病毒;和
 - (e) 将药用赋形剂加入到步骤 (d) 中分离的所述噬菌体、酵母或病毒中。
93. 根据权利要求 92 所述的方法,其中在步骤 (c) 后,在所述噬菌体、酵母或病毒的表面上显示所述多肽。
94. 一种分离的单克隆抗体,结合于根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽。
95. 根据权利要求 94 所述的抗体,其中所述抗体是人或人源化的。
96. 根据权利要求 94 所述的抗体,其中所述抗体是嵌合的。
97. 根据权利要求 94 和 96 中任一项所述的抗体,其中所述抗体是重组产生的。
98. 一种诊断组合物,包含根据权利要求 94-97 中任一项所述的抗体。
99. 一种药物组合物,包含根据权利要求 94-97 中任一项所述的抗体和药用赋形剂。
100. 根据权利要求 99 所述的药物组合物,包含具有多种不同特异性的根据权利要求 94-97 中任一项所述的抗体的混合物。
101. 一种药物组合物,包含结合于根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽或结合于不同的根据权利要求 1-51、59 或 118-137 中任一项所述的多肽的混合物的多克隆抗体。
102. 根据权利要求 98-100 中任一项所述的药物组合物,用于哺乳动物抵抗念珠菌病或革兰氏阴性菌或金黄色葡萄球菌的被动免疫。
103. 根据权利要求 102 所述的组合物,其中所述哺乳动物是人。
104. 根据权利要求 102 或 103 所述的组合物,其中所述药物组合物通过肌肉、皮下或皮内给药来给予。
105. 根据权利要求 104 所述的组合物,其中所述药物组合物通过肌肉给药来给予。
106. 根据权利要求 102-105 中任一项所述的组合物,其中所述念珠菌病是播散性念珠菌病。
107. 根据权利要求 106 所述的组合物,其中所述播散性念珠菌病是血源性播散性念珠菌病。
108. 根据权利要求 102-105 中任一项所述的组合物,其中所述念珠菌病是粘膜念珠菌病。

109. 根据权利要求 102-108 中任一项所述的组合物,其中所述念珠菌病是由白色念珠菌、光滑念珠菌、克鲁斯念珠菌、近平滑念珠菌或热带念珠菌引起的。

110. 一种使哺乳动物抵抗念珠菌病的被动免疫方法,包括将有效量的根据权利要求 102 所述的药物组合物给予所述哺乳动物,由此使所述哺乳动物被动免疫抵抗所述念珠菌病或革兰氏阴性菌或金黄色葡萄球菌。

111. 根据权利要求 110 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

112. 根据权利要求 110 或 111 所述的方法,其中通过肌内、皮下或皮内给药来给予所述药物组合物。

113. 根据权利要求 112 所述的方法,其中通过肌内给药来给予所述药物组合物。

114. 根据权利要求 110-113 中任一项所述的方法,其中所述念珠菌病是播散性念珠菌病。

115. 根据权利要求 114 所述的方法,其中所述播散性念珠菌病是血源性播散性念珠菌病。

116. 根据权利要求 110-113 中任一项所述的方法,其中所述念珠菌病是粘膜念珠菌病。

117. 根据权利要求 110-116 中任一项所述的方法,其中所述念珠菌病是由白色念珠菌、光滑念珠菌、克鲁斯念珠菌、近平滑念珠菌或热带念珠菌引起的。

118. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

A-B-X-C-D-E (SEQ ID NO:31),

其中 A 是不存在的或是 SEQ ID NO:2;

其中 B 是不存在的或是 SEQ ID NO:3;

其中 X 是不存在的或者是连接肽;

其中 C 是不存在的或是 SEQ ID NO:5;

其中 D 是不存在的或是 SEQ ID NO:6;和

其中 E 是不存在的或是 SEQ ID NO:10,

条件是 A、B、C、D 和 E 中的两种或更多种存在于所述多肽中。

119. 根据权利要求 118 所述的多肽,其中所述多肽是 A-B-C-D-E (SEQ ID NO:32)。

120. 根据权利要求 118 所述的多肽,其中所述多肽是 A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11)。

121. 根据权利要求 120 所述的多肽,其中所述多肽是 A-B-C-D (SEQ ID NO:12)。

122. 根据权利要求 118 所述的多肽,其中所述多肽是 A-X-C-D-E (SEQ ID NO:25)。

123. 根据权利要求 122 所述的多肽,其中所述多肽是 A-C-D-E (SEQ ID NO:26)。

124. 根据权利要求 118 所述的多肽,其中所述多肽是 A-X-C-D (SEQ ID NO:13)。

125. 根据权利要求 124 所述的多肽,其中所述多肽是 A-C-D (SEQ ID NO:14)。

126. 根据权利要求 118 所述的多肽,其中所述多肽是 A-X-D-E (SEQ ID NO:27)。

127. 根据权利要求 126 所述的多肽,其中所述多肽是 A-D-E (SEQ ID NO:28)。

128. 根据权利要求 118 所述的多肽,其中所述多肽是 A-X-D (SEQ ID NO:15)。

129. 根据权利要求 128 所述的多肽,其中所述多肽是 A-D (SEQ ID NO:16)。

130. 一种分离的多肽,包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

C-D-E-X-A-B (SEQ ID NO:29),

其中 C 是不存在的或是 SEQ ID NO :5 ;

其中 D 是不存在的或是 SEQ ID NO :6 ;

其中 E 是不存在的或是 SEQ ID NO :10 ;

其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

其中 A 是不存在的或是 SEQ ID NO :2 ;

其中 B 是不存在的或是 SEQ ID NO :3 ,

条件是 C、D、E、A 和 B 中的两种或更多种存在于所述多肽中。

131. 根据权利要求 130 所述的多肽,其中所述多肽是 C-D-E-A-B (SEQ ID NO :30) 。

132. 根据权利要求 130 所述的多肽,其中所述多肽是 C-D-X-A-B (SEQ ID NO :17) 。

133. 根据权利要求 132 所述的多肽,其中所述多肽是 C-D-A-B (SEQ ID NO :18) 。

134. 根据权利要求 130 所述的多肽,其中所述多肽是 D-X-A-B (SEQ ID NO :21) 。

135. 根据权利要求 134 所述的多肽,其中所述多肽是 D-A-B (SEQ ID NO :22) 。

136. 根据权利要求 130 所述的多肽,其中所述多肽是 D-X-A (SEQ ID NO :23) 。

137. 根据权利要求 136 所述的多肽,其中所述多肽是 D-A (SEQ ID NO :24) 。

138. 在任一上述权利要求中,其中所述革兰氏阴性菌是不动杆菌 (Acinetobacter) 。

139. 在任何上述权利要求中,其中金黄色葡萄球菌是 MRSA 。

用于治疗真菌性和细菌性病原体的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及用于检测、治疗和预防受试者中传染性疾病的组合物和方法。

背景技术

[0002] 念珠菌属真菌 (fungus *Candida*) 是造成与健康有关的血流感染的第三常见的原因,在美国其每年导致约60,000例血源性播散性念珠菌病 (hematogenously disseminated candidiasis),并造成数十亿美元的保健支出。尽管当前有抗真菌疗法,但高死亡率仍是不可接受的。由于危急生命的念珠菌病发病率的上升和高治疗失败率,因此需要更有效的预防和治疗策略。

[0003] 抗生素耐受病原菌的致死性感染,如念珠菌属所造成的感染,正日益常见。此外,对于每年处于重病监护室 (ICU) 的众多风险患者以及部署至前线战区的士兵,感染这些致死性感染的风险极高。不动杆菌菌种,具体地,鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 菌种是住院患者和士兵中常见的感染源。不动杆菌是属于丙型变形菌 (*Gammaproteobacteria*) 的革兰氏阴性菌属。不动杆菌菌种有助于土壤中芳族化合物的矿化。不幸地,除了医院环境中标准的洗手及其它感染控制实践外,目前尚无预防不动杆菌感染的技术。

[0004] 另一种细菌,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是皮肤和皮肤结构感染 (包括蜂窝组织炎和疖疮) 的主要原因,并且是造成菌血症的最常见原因。显示出二甲氧苯青霉素耐受性 (MRSA) 表型的金黄色葡萄球菌株是造成医源性感染和社区获得性感染的主要原因,所述感染包括有免疫能力的宿主中、免疫抑制 (例如,中性白细胞减少、实体器官或骨髓移植) 中以及表现出皮肤感染反复发作的继承免疫功能障碍 (例如,乔布综合征 (Job's syndrome)、慢性肉芽肿病) 中的侵袭性疾病。鉴于即使用适当的抗微生物疗法时与侵袭性金黄色葡萄球菌疾病有关的高死亡率 (例如,菌血症和心内膜炎中 15-40%), MRSA 对公共卫生的显著影响是特别受关注的。危及生命的感染率的提高以及对抗生素敏感性的降低需要开发针对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的有效疫苗。

[0005] 因此,仍需要降低与真菌和细菌感染有关的传染性疾病风险并提供有效疗法的化合物和方法。本发明满足了这种需要并且也提供了相关优势。

发明内容

[0006] 以下描述了在使受试者抗真菌或细菌感染或两者免疫中有用的念珠菌属细胞表面蛋白 Als3 和 Hyr1 的片段及其组合。

[0007] 天然白色念珠菌 (*C. albicans*) SC5314Als3 多肽的氨基酸序列如下所示:

[0008]

1	MLQQYILLIYLSVATAKTI	TGVFNSFNSLTWGNAATYNY	KGPSTPTWNAVLGWSLDGTS
61	ASPGDTFTLNMPGVFKFTTS	QTSVDLTAHGKATCQFQA	GEEFMFTSTLTCTVSNILTP
121	SIKALGTVTLPALFNVGGTG	SSVDLEDSKCFTAGTNTVTF	NDGGKKISINVDPERSNVDP
181	KGYLTDSRVIPSLNKVSTLF	VAPQCANGYTSGMTGFANTY	GDVQIDCSNIHVGLTKGLND
241	WNYPVSSSEFSYTKTSSNG	IFITYKNVPAGYRPFVDAYI	SATDVNSYTLSEYANEYTCAG
301	GYWQAPFTLRWTGYRNSDA	GSNGIVIVATTRVTDSTTA	VTTLPFDPNRDKTKEILK
361	PIPTTTITTSYVGVTTSYST	KTAPIGETATVIVDIPYHTT	TTVTSKWTGTITSTTTHTNP
421	TDSIDTVIVQVPSNPVTIT	TEYWSQSFATTTTITGPPGN	IDTVLIREPPNHTVTTTEYW
481	SESYTTTSTFTAPPGGTDSV	LIKEPPNPVTITTEYWSSEY	TTTSTFTAPPGGTDSVILKE
541	PPNHTVTTTEYWSQSYTTT	TVTAPPGGIDTVLVREPPNH	TVTTTEYWSQSYTTTTTILIA
601	PPGGTDSVIREPPNPVTIT	TEYWSQSYATTTTITAPPGE	TDTVLIREPPNHTVTTTEYW
661	SQSYATTTTITAPPGETDIV	LIREPPNPVTITTEYWSQSF	ATTTTVIAPPGGIDTVIIRE
721	PPNHTVTTTEYWSQSYATTT	TITAPPGETDIVLIREPPNH	TVTTTEYWSQSYATTTTTILIA
781	PPGETDIVLIREPPNPVTIT	TEYWSQSYTTATITVTAPEGG	IDTVIYDIMSSEISSEFSK
841	PHYTNSTTLWSTTWIETKT	ITETSCESGKGCWVYVSTR	IVTIFNNIETPMVNTVDET
901	TTESTSQSPSGIFSESQVSV	ETESSTVITAQTNFSPVPTTE	SENVETTKGNNGCPYESPS
961	TNVKSSMDENSEFTTSTAAS	TSTDIENETIATGSGVEASS	PIISSSADETITVTTTAESE
1021	SVIEQPTNNNGGKAPSATS	SPSTTTIANNDSEVITGTST	NQSQSQSQYNSDTQQTILSQ
1081	QMTSSLVSLHMLTTFDGSQS	VIGNSTWLCGLITLLSLFI	

[0009] 所选 A1s 片段如下所示。

[0010] A1s3(18-324)

[0011] 在一个方面,本发明的特征在于 A1s3(18-324 个氨基酸片段)。具体地,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣(异源融合配偶体, heterologous fusion partner)的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0012]

KTI	TGVFNSFNSLTWGNAATYNY	KGPGTPTWNAVLGWSLDGTS
ASPGDTFTLNMPGVFKFTTS	QTSVDLTAHGKATCQFQA	GEEFMFTSTLTCTVSNILTP
SIKALGTVTLPALFNVGGTG	SSVDLEDSKCFTAGTNTVTF	NDGGKKISINVDPERSNVDP
KGYLTDSRVIPSLNKVSTLF	VAPQCANGYTSGMTGFANTY	GDVQIDCSNIHVGLTKGLND
WNYPVSSSEFSYTKTSSNG	IFITYKNVPAGYRPFVDAYI	SATDVNSYTLSEYANEYTCAG
GYWQAPFTLRWTGYRNSDA	GSNG (SEQ ID NO: 2)。	

[0013] A1s3(富含 Ser/Thr 的序列)

[0014] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0015]

IVIVATTRVTDSTTA	VTTLPFDPNRDKTKEILK
PIPTTTITTSYVGVTTSYST	KTAPIGETATVIVDIPYHTT
TTVTSKWTGTITSTTTHTNP	
TDSIDTVIVQVP (SEQ ID NO: 3)。	

[0016] Hyr1

[0017] 在其它方面,本发明的特征在于 Hyr1 的片段。天然白色念珠菌 (C. albicans) SC5314Hyr1 多肽的氨基酸序列如下所示:

[0018]

1	MKVVGNFIFTILLTLNLSAA	LEVVTORIDRGGIQGFHGDV	KVHSGATWAILGTTLCSEFFG
61	GLEVEKGASLFIKSDNGPVL	ALNVALSTLVRPVINNGVIS	LNSKSTSTFSNFDIGSSSFT
121	NNGETYLDSSGLVKSTAYLY	AREWENNGLIVAYQNQKAAG	NIAFGTAYQTITNNGQICLR
181	HQDFVPATKIKGTGCVTAE	DTWIKLGNTILSVEPTNFI	LKDSKSSLIVHAVSSNQFT
241	VHGFNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDTGILQLRADA	LPQYFKIGKGYDSKLFRIVN
301	SRGLKNAVITYDGPVPNEIP	AVCLIPCTNGPSAPESESDL	NTPTTSSSIETSSYSSAATES
361	SVVSESSCAVDSLTSSELSG	KSESSDVVSSTTNIESSSTA	IETIMNSESSTDAGSSSISQ
421	SESSSTAIT992ET3SSSEM	SASSTTA9NTSIESTDGIVS	QSESSSNAL3STEQSIT33P
481	GQSTIYVNSTVTSTILSCDE	NKCTEDVVTIFTIVPCSTDC	VPITGDIPMSISTYQKIVTS
541	TITNCDEVSCSQDVVTYTN	VPHTVTDATTTTTTSTGDN	STGGNESGGNHGPGNGSTEG
601	SGNGSGAGSNEG3QSGFNNG	SGSGSEGG3NNGSGSDGGN	NG9G3G3NNGSGSGSTEGSE
661	GGSGSNEG3SGSGSQF3PN	EGSGSGSGSNEG3NHG3NEG	SGSG3G3G3NNGSGSGSQSG
721	GGSGSQSG3SGSGSNEG	SNFGAGNGSGSGSQGGNG	SEAGCGGSGGFNNGSGSGHN
781	DGSGSG3NQGSGNFGAGSGG	SESSSKAGSGSGNEGAKTE	STEGFHTESKFGFNTGASTD
841	ATVTGNSVANPVTTSSTSDT	TISVTVSITSYMIGFQKPK	PFTTVDVIPVPHMPENTTD
901	SSSVPTIDTNEGSSIVTGG	RSILFGLIVSMVVLFM	

[0019] 所选 Hyr1 片段如下所示。

[0020] Hyr1 (疏水性序列)

[0021] 具体地,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0022]

TSRIDRGGIQGFHGDVKVHS	GATWAILGTTLCSEFFGGLEV	EKGASLFIKSDNGPVLALNV
ALSTLVRPVINNGVISLNSK	SSTSFNSNFDIGSSSFTNNGE	IYLDSSGLVKSTAYLYAREW
TNNGLIVAY (SEQ ID NO: 5)。		

[0023] Hyr1 (154-350)

[0024] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0025]

	QNQKAAG	NIAFGTAYQTITNNGQICLR
HQDFVPATKIKGTGCVTAE	DTWIKLGNTILSVEPTNFI	LKDSKSSLIVHAVSSNQFT
VHGFNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDTGILQLRADA	LPQYFKIGKGYDSKLFRIVN
SRGLKNAVITYDGPVPNEIP	AVCLIPCTNGPSAPESESDL	NTPTTSSSIET (SEQ ID NO:
6)。		

[0026] Hyr1 (201-350)

[0027] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0028]

	DTWIKLGNTILSVEPTNFI	LKDSKSSLIVHAVSSNQFT
VHGFNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDTGILQLRADA	LPQYFKIGKGYDSKLFRIVN
SRGLKNAVITYDGPVPNEIP	AVCLIPCTNGPSAPESESDL	NTPTTSSSIET (SEQ ID NO:
7)。		

[0029] Hyr1 (25-469)

[0030] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0031]

	TSRIDRGGIQGFHGDV	KVHSGATWAILGTTLCSPFG
GLEVEKGASLFIKSDNGPVL	ALNVALSTLVRFVINNGVIS	LNSKSETSFNSNFDIGGSSFT
NNGEIYLDSSGLVKSTAYLY	AREWTNNGLIVAYQNQKAAG	NIAFGTAYQTITNNGQICLR
HQDFVPATKIKGTGCVTADE	DTWIKLGNTILSVEPTHNFY	LKDSKSSLIVHAVSSNQTFY
VHGFNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDTGILQLRADA	LPQYFKIKGKYDSKLFRIYN
SRGLKNAVITYDGPVPNNEIF	AVCLIPCTNGPSAPESES DL	NTPTTSSSIETSSYSSAATES
SVVSESSSAVDLSLSSSLSS	KSESSDVVSSTTNIESSTA	IETTMNSESSTDAGSSSISQ
SESSSTAITSSETSSSESM	SASSTTASNTSIETDSGIVS	QSESSSNAL (SEQ ID NO: 8)。

[0032] Hyr1 (201-469)

[0033] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0034]

	DTWIKLGNTILSVEPTHNFY	LKDSKSSLIVHAVSSNQTFY
VHGFNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDTGILQLRADA	LPQYFKIKGKYDSKLFRIYN
SRGLKNAVITYDGPVPNNEIF	AVCLIPCTNGPSAPESES DL	NTPTTSSSIETSSYSSAATES
SVVSESSSAVDLSLSSSLSS	KSESSDVVSSTTNIESSTA	IETTMNSESSTDAGSSSISQ
SESSSTAITSSETSSSESM	SASSTTASNTSIETDSGIVS	QSESSSNAL (SEQ ID NO: 9)。

[0035] Hyr1 (富含 Ser/Thr 的序列)

[0036] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0037]

	SSYSSAATESSVVS	ESSSAVDLSLSSSLSSKSE
SDVVSSTTNIESSTAIAETT	MNESSTDAGSSSISQSESS	STAITSSETSSSESMSSAGS
TTASNTSIETDSGIVSQSES	SSNAL (SEQ ID NO: 10)。	

[0038] Hyr1 (154-469)

[0039] 在另一个方面,本发明的特征在于可选地融合于异源融合伴侣的分离的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列由与以下序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列构成

[0040]

	QNQKAAG	NIAFGTAYQTITNNGQICLR
HQDFVPATKIKGTGCVTADE	DTWIKLGNTILSVEPTHNFY	LKDSKSSLIVHAVSSNQTFY
VHGFNGNKLGLTLPLTGNR	DHFRFEYYPDTGILQLRADA	LPQYFKIKGKYDSKLFRIYN
SRGLKNAVITYDGPVPNNEIF	AVCLIPCTNGPSAPESES DL	NTPTTSSSIETSSYSSAATES
SVVSESSSAVDLSLSSSLSS	KSESSDVVSSTTNIESSTA	IETTMNSESSTDAGSSSISQ
SESSSTAITSSETSSSESM	SASSTTASNTSIETDSGIVS	QSESSSNAL (SEQ ID NO: 33)。

[0041] 可以在大肠杆菌 (*E. coli*) 或酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中重组产生任何上述多肽

片段。另外,本发明的特征在于 Als3/Hyr1 融合多肽和产生所述多肽的重组表达系统。

[0042] 大肠杆菌表达的 Als3/Hyr1 融合多肽

[0043] 在另一个方面,本发明涉及大肠杆菌中表达的 Als3 和 Hyr1 多肽的组合的片段。具体地,这些片段和连接这些片段的接头如下所示:

[0044] Als3

[0045]

```
A=      KTIITGVFNSEFNLTWENAAI      YNFKGPGTPIWNAVLGWSLD      GTCASPQDFTFLNMPQVFRF
      TISQTEVDLTARGVKYATCQ      FQAGEEFMTFTSLTCTVQNT      LTPGKALGTVTLPLAENVG
      GIGSSVLLSDSKCFTAGINT      VTFNDGGKKISINVDPEREN      VDPKGYLTDSRVIPSLNKVS
      TLFVAPQCANGYTSGTMGFA      NTYGDVQIDCSNIHVGITSG      LNDWNYFVSSGESFSYTKCS
      SNGIFITYKNVPAGYBPFEVD      AYISATDVNSYTLSEANEYT      CAGGYWQRAFFTLEWTGYRN
      SDAGSNG (SEQ ID NO: 2).
```

```
B=      IVIVATIRIVTDS      TIAVTTLPFDPNRDKTKIE      ILKPIPIITITITSYGVQVTS
      YSTKTAPIGETATVIVDIPY      HIIITVTSTKWIGTITSITH      TNPTDSIDTVINQVP (SEQ
      ID NO: 3)
```

[0046] Hyr1

[0047]

```
C=      TCRIDRGGGIQGFHSDVKVHS      GATWAILGTTLCSEFFGGLEV      EKGASLFIKSDNGPVLALNV
      ALSTLVRPVIINNGVIGLSNK      SSTSFNSNFDIGGSSFTNNGE      IYLDSSGLVKSTAYLYAREW
      TNNGLIVAY (SEQ ID NO: 5)
```

```
D=      QNQKAAGNIAF      GTAYQTITNNGQICLRHQDF      VPATKINGTGCVIADEDIWI
      KLGNITLSVEPTNFFYLKDS      KESLIVHAVSSNQITFTVHGF      GNGNKLGLTLPLTGNRUEFR
      FEYYPDIGILQLRADALPQY      FKIGKGYDSKLEFRIVNSRGL      KNAVITYDGPVPNNEIFAVCL
      IPTCTNGPSAPESESDLNIFT      TSSIET (SEQ ID NO: 6)
```

[0048] X = 是存在或不存在的 (表示为 -X), 其中 X 是连接肽 (接头肽, linker peptide)。

[0049] 示例性融合多肽如下所示:

[0050] E1 = A-B-X-C-D (SEQ ID NO: 11) E1 (-X) = A-B-C-D (SEQ ID NO: 12)

[0051] E2 = A-X-C-D (SEQ ID NO: 13) E2 (-X) = A-C-D (SEQ ID NO: 14)

[0052] E3 = A-X-D (SEQ ID NO: 15) E3 (-X) = A-D (SEQ ID NO: 16)

[0053] E4 = C-D-X-A-B (SEQ ID NO: 17) E4 (-X) = C-D-A-B (SEQ ID NO: 18)

[0054] E5 = C-D-X-A (SEQ ID NO: 19) E5 (-X) = C-D-A (SEQ ID NO: 20)

[0055] E6 = D-X-A-B (SEQ ID NO: 21) E6 (-X) = D-A-B (SEQ ID NO: 22)

[0056] E7 = D-X-A (SEQ ID NO: 23) E7 (-X) = D-A (SEQ ID NO: 24)

[0057] E1 = A-B-X-C-D

[0058] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性 (实质同一性, 较高同一性, substantial identity) 的序列

[0059] A-B-X-C-D (SEQ ID NO: 11),

[0060] 其中 A 为 SEQ ID NO: 2;

[0061] 其中 B 为 SEQ ID NO :3 ;

[0062] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0063] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;和

[0064] 其中 D 是 SEQ ID NO :6。

[0065] 在一些实施方式中,所述分离的多肽基本上同一于 A-B-C-D(SEQ ID NO :12)。在其它实施方式中,所述多肽是 A-B-C-D(SEQ ID NO :12)。

[0066] E2 = A-X-C-D

[0067] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0068] A-X-C-D(SEQ ID NO:13),

[0069] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;

[0070] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0071] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;和

[0072] 其中 D 是 SEQ ID NO :6。

[0073] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 A-C-D(SEQ ID NO :14)。在其它实施方式中,所述多肽是 A-C-D(SEQ ID NO :14)。

[0074] E3 = A-X-D

[0075] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0076] A-X-D(SEQ ID NO:15),

[0077] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;

[0078] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;和

[0079] 其中 D 是 SEQ ID NO :6。

[0080] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 A-D SEQ ID NO :16)。在其它实施方式中,所述多肽是 A-D(SEQ ID NO :16)。

[0081] E4 = C-D-X-A-B

[0082] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0083] C-D-X-A-B(SEQ ID NO:17),

[0084] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

[0085] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0086] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0087] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

[0088] 其中 B 为 SEQ ID NO :3。

[0089] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 C-D-A-B(SEQ ID NO :18)。在其它实施方式中,所述多肽是 C-D-A-B(SEQ ID NO :18)。

[0090] E5 = C-D-X-A

[0091] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0092] C-D-X-A (SEQ ID NO:19),

[0093] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

[0094] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0095] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;和

[0096] 其中 A 为 SEQ ID NO :2。

[0097] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 C-D-A (SEQ ID NO :20)。在其它实施方式中,所述多肽是 C-D-A (SEQ ID NO :20)。

[0098] E6 = D-X-A-B

[0099] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0100] D-X-A-B (SEQ ID NO:21),

[0101] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0102] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0103] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

[0104] 其中 B 为 SEQ ID NO :3。

[0105] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 D-A-B (SEQ ID NO :22)。在其它实施方式中,所述多肽是 D-A-B (SEQ ID NO :22)。

[0106] E7 D-X-A

[0107] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0108] D-X-A (SEQ ID NO:23),

[0109] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0110] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;和

[0111] 其中 A 为 SEQ ID NO :2。

[0112] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 D-A (SEQ ID NO :24)。在其它实施方式中,所述多肽是 D-A (SEQ ID NO :24)。

[0113] 酿酒酵母 (S. cerevisiae) 表达的 Als3/Hyr1 融合多肽

[0114] 在另一个方面,本发明涉及酿酒酵母中表达的 Als3 和 Hyr1 多肽的组合的片段。具体地,这些片段和连接这些片段的接头如下所示 :

[0115] Als2

[0116]

A= XIITGVFNGFNSLIWSNAAT YNYKGPSTPTIWNNAVLGWGLD QTSACPGSTFTILNMPGVFKF
 TTSQTSVDLTASGVKVATCQ FQAGEEFMTFTSTLTCTVONT LTPSIKALSTVTLPLAFNVG
 GTGSSVDLEDKCFCTAGTNT VTFNDGCKKISINVDPEREN VDPKGYLTDSRVIPSLNKVS
 TLEVPQCANGYISGTMGFA NTYGDVQIDCSNIHVGITKG LNDQNYFVSSSESFSYKTCG
 ENGFITYKNVPAGYREFVD AYISATDVNSEYTLGYANEYI CAGGYWQRAPFTLRWTGYRN
 SDAGSNG (SEQ ID NO: 2)

B= IVIVATITRTVDS TTAVTILPFPDPNRDKTIE ILKPIPTITITTSYGVGITS
 YSTKIAPISGETATVIVDIPY HTTTVTSTKWTGTITSTTH INPTDSIDIVIVQVP (SEQ
 ID NO: 3)

[0117] Hyr1

[0118]

C= TSKIDSGGIQGFHGDVKVHS GATWAILGTTLCSPFGGLEV EKGASLFKSDNGFVLALNV
 ALSTLVRFVINNGVISLNSK SETSFQNFEDIGGSSPTNNGE IYLDSSGLVKSTAYLYAREW
 TNNGLIVAY (SEQ ID NO: 5)

D= QNQKAAGNIAP GTAYQIITNNGQICLRQDF VPATKIKGTGCVTADEDTWI
 NLGNTILSVEPIHNFYLNKDC KSELIVHAVSSNQFTVHGF GNGNKLGLTLPLTGNRDHFR
 FEYYPDTGILQLRADALPOY FKIGKGYDSKLFRIVNERGL KNAVITYDGPVENNEIPAVCL
 IPCTNGPAPPESESDLNTPT TSSLET (SEQ ID NO: 6)

E= SSYSGAATESSVVS ESSSANDSLTSSSLGKSES
 SDVVSSTTNIESSTAIETT MNSESSTDAQSSSISQSES STAITSSSETSSSESMCASG
 TTASNTSIEITDSGIVSQSES SENAL (SEQ ID NO: 10)

[0119] X = 是存在或不存在的, 其中 X 是连接肽。

[0120] S1 = A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11) S1 (-X) = A-B-C-D (SEQ ID NO:12)

[0121] S2 = A-X-C-D-E (SEQ ID NO:25) S2 (-X) = A-C-D-E ((SEQ ID NO:26)

[0122] S3 = A-X-D-E (SEQ ID NO:27) S3 (-X) = A-D-E (SEQ ID NO:28)

[0123] S4 = C-D-E-X-A-B (SEQ ID NO:29) S4 (-X) = C-D-E-A-B (SEQ ID NO:30)

[0124] S5 = C-D-X-A-B (SEQ ID NO:17) S5 (-X) = C-D-A-B (SEQ ID NO:18)

[0125] S6 = D-X-A-B (SEQ ID NO:21) S6 (-X) = D-A-B (SEQ ID NO:22)

[0126] S7 = D-X-A (SEQ ID NO:23) S7 (-X) = D-A (SEQ ID NO:24)

[0127] S1 = A-B-X-C-D

[0128] 在另一个方面, 本发明的特征在于分离的多肽, 其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0129] A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11),

[0130] 其中 A 为 SEQ ID NO:2;

[0131] 其中 B 为 SEQ ID NO:3;

[0132] 其中 X 是不存在的或者是连接肽;

[0133] 其中 C 是 SEQ ID NO:5;和

[0134] 其中 D 是 SEQ ID NO :6。

[0135] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 A-B-C-D(SEQ ID NO :12)。在其它实施方式中,所述多肽是 A-B-C-D(SEQ ID NO :12)。

[0136] S2 = A-X-C-D-E

[0137] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,分离的多肽包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0138] A-X-C-D-E(SEQ ID NO:25),

[0139] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;

[0140] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0141] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

[0142] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;和

[0143] 其中 E 为 SEQ ID NO :10。

[0144] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 A-C-D-E(SEQ ID NO :26)。在其它实施方式中,所述多肽是 A-C-D-E(SEQ ID NO :26)。

[0145] S3 = A-X-D-E

[0146] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,分离的多肽包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0147] A-X-D-E(SEQ ID NO:27),

[0148] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;

[0149] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0150] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;和

[0151] 其中 E 为 SEQ ID NO :10。

[0152] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 A-D-E(SEQ ID NO :28)。在其它实施方式中,所述多肽是 A-D-E(SEQ ID NO :28)。

[0153] S4 = C-D-E-X-A-B

[0154] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,分离的多肽包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0155] C-D-E-X-A-B(SEQ ID NO:29),

[0156] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

[0157] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0158] 其中 E 为 SEQ ID NO :10 ;

[0159] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0160] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

[0161] 其中 B 为 SEQ ID NO :3。

[0162] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 C-D-E-A-B(SEQ ID NO :30)。在其它实施方式中,所述多肽是 C-D-E-A-B(SEQ ID NO :30)。

[0163] S5 = C-D-X-A-B

[0164] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,分离的多肽包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0165] C-D-X-A-B (SEQ ID NO:17),

[0166] 其中 C 是 SEQ ID NO :5 ;

[0167] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0168] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0169] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

[0170] 其中 B 为 SEQ ID NO :3。

[0171] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 C-D-A-B (SEQ ID NO :18)。在其它实施方式中,所述多肽是 C-D-A-B (SEQ ID NO :18)。

[0172] S6 = D-X-A-B

[0173] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,分离的多肽包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0174] D-X-A-B (SEQ ID NO:21),

[0175] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0176] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0177] 其中 A 为 SEQ ID NO :2 ;和

[0178] 其中 B 为 SEQ ID NO :3。

[0179] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 D-A-B (SEQ ID NO :22)。在其它实施方式中,所述多肽是 D-A-B (SEQ ID NO :22)。

[0180] S7 = D-X-A

[0181] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,分离的多肽包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0182] D-X-A (SEQ ID NO:23),

[0183] 其中 D 是 SEQ ID NO :6 ;

[0184] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;和

[0185] 其中 A 为 SEQ ID NO :2。

[0186] 在一些实施方式中,所述多肽基本上同一于 D-A (SEQ ID NO :24)。在其它实施方式中,所述多肽是 D-A (SEQ ID NO :24)。

[0187] 在其它方面,本发明的特征在于分离的核酸分子,其编码本文所述的任何多肽或融合多肽。

[0188] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的核酸分子,其包含基本上同一于编码本文所述的任何多肽或融合多肽的任何分离的核酸分子的核酸序列。

[0189] 本发明的特征还在于包含编码本文所述的多肽或融合多肽的任何核酸分子的载体。因此,本发明还提供了含有本发明所述核酸的载体。适合的表达载体是本领域中熟知的并且包括能够表达操纵性连接于调控序列或元件如能够调节该核酸的表达的启动子区或增强子区的核酸的载体。适合的表达载体包括在真核细胞和 / 或原核细胞中可复制的载体和仍保持游离的载体或整合至宿主细胞基因组中的载体。

[0190] 本发明还提供了通过在适合于多肽表达的条件下培养含有编码所述多肽的核酸的细胞来表达如本文所公开的多肽的方法。因此,提供了通过在适合的宿主细胞中表达编码所述多肽的核酸序列来重组产生本发明的多肽的方法。本文描述了适合于多肽生产的重

组 DNA 表达系统并且它们在本领域中是熟知。例如,可以将上述核苷酸序列引入到载体中以用于进一步操作。载体可以包括重组 DNA 或 RNA 质粒或含有用于将异源 DNA 引入到细胞中以用于它的表达或复制的分离的元件的病毒。

[0191] 类似地,本发明的特征在于包含编码本文所述的多肽或融合多肽的任何核酸分子的细胞。

[0192] 在另一个方面,本发明的特征在于生产重组多肽的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 提供用编码本文所述的多肽或融合多肽的核酸分子转化的细胞,所述多肽或融合多肽定位用于在细胞中表达;(b) 在表达所述核酸分子的条件培养转化的细胞,其中所述培养导致所述重组多肽的表达;和(c) 分离所述重组多肽。在一些实施方式中,细胞是细菌(例如,大肠杆菌(*E. coli*))。在其它实施方式中,细胞是酵母细胞(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))。在另一个方面,本发明的特征在于根据该上述方法生产的重组多肽。

[0193] 在另一个方面,本发明的特征在于特异性(specifically)识别并结合于本文所述多肽中任一种的基本上纯的抗体。

[0194] 在又一个方面,本发明的特征在于包含上述多肽和药用载体、稀释剂和/或赋形剂的抗原组合物。在一些实施方式中,所述组合物还包含佐剂。

[0195] 在另一个方面,本发明的特征在于在哺乳动物中引起对抗原的免疫应答的方法,其包括向哺乳动物(例如,人)给予任何上述多肽或上述抗原组合物,其中所述多肽或组合物在哺乳动物中引起对抗原的免疫应答。通常,向所述哺乳动物给予单一剂量的所述多肽或组合物。在一些实施方式中,向所述哺乳动物给予多个剂量的所述多肽或组合物。在一些实施方式中,至少隔一天(at least one day apart)给予多个剂量(例如,至少隔两周给予多个剂量)。在还有的其它实施方式中,给予两次所述组合物。

[0196] 在另一个方面,本发明的特征在于包含免疫原性量的任何上述多肽和药用赋形剂的疫苗。在一些实施方式中,所述疫苗包含任一种上述多肽的不同多肽的混合物。在一些实施方式中,所述疫苗还包含佐剂(铝胶(*Alhydrogel*))。本发明所述的疫苗对向哺乳动物(例如,人)接种抵抗念珠菌病、细菌感染如由葡萄球菌(*Staphylococcus*)或不动杆菌(*Acinetobacter*)所引起的感染疫苗是有用的。通常,通过肌内、皮下或皮内给药来给予疫苗。还可以通过肌内给药来给予疫苗。接种还可以包括给予加强剂量。念珠菌病可以采取多种形式,如播散性念珠菌病(例如,血源性播散性念珠菌病)或粘膜念珠菌病(*mucosal candidiasis*)。念珠菌病是由例如白色念珠菌(*Candida albicans*)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、克鲁斯念珠菌(*Candida krusei*)、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)或热带念珠菌(*Candida tropicalis*)引起的。在一些实施方式中,接种是抗不动杆菌(*Acinetobacter*)或葡萄球菌(*Staphylococcus*)的。

[0197] 在其它方面,本发明的特征在于产生嵌合疫苗的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 提供噬菌体、酵母或病毒;(b) 将编码任何上述多肽的核酸分子插入到噬菌体、酵母或病毒中;(c) 使所述多肽在噬菌体、酵母或病毒中表达;(d) 分离步骤(c)中包含表达的多肽的噬菌体、酵母或病毒;和(e) 向步骤(d)中所述分离的噬菌体、酵母或病毒中加入药用赋形剂。在一些实施方式中,在步骤(c)后,在所述噬菌体、酵母或病毒的表面上显示所述多肽。

[0198] 在其它方面,本发明的特征在于结合于任何上述多肽或融合多肽的分离的单克隆抗体。通常,所述抗体是人或人源化的。所述抗体还可以是嵌合的。所述抗体还可以重组地产生。包含这些抗体的诊断组合物在本发明之内。

[0199] 本发明的另一个方面涉及包含单独和组合的任何上述抗体和药用赋形剂的药物组合物。在一些实施方式中,所述药物组合物包含具有多种不同特异性的抗体的混合物。

[0200] 在另一个方面,本发明的特征在于包含结合于任何本文所述的多肽或融合多肽或结合于所述多肽的不同多肽的混合物的多克隆抗体的药物组合物。在一些实施方式中,所述药物组合物用于在哺乳动物(例如,哺乳动物)对念珠菌病或细菌感染的被动免疫中使用。通常,通过肌内、皮下或皮内给药来给予所述药物组合物。在一些实施方式中,通过肌内给药来给予所述药物组合物。在一些实施方式中,所述念珠菌病是播散性念珠菌病,例如,血源性播散性念珠菌病。在其它实施方式中,所述念珠菌病是粘膜念珠菌病。在一些实施方式中,念珠菌病是由白色念珠菌(*Candida albicans*)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、克鲁斯念珠菌(*Candida krusei*)、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)或热带念珠菌(*Candida tropicalis*)引起的。在一些实施方式中,被动免疫抵抗不动杆菌(*Acinetobacter*)或葡萄球菌(*Staphylococcus*)。

[0201] 在另一个方面,本发明的特征在于使哺乳动物(例如,人)对念珠菌病或细菌感染如由葡萄球菌(*staphylococcus*)或不动杆菌(*Acinetobacter*)所引起的感染被动免疫的方法,其包括向所述哺乳动物给予有效量的任何本文所公开的药物组合物,由此使所述哺乳动物对念珠菌病被动免疫。在一些实施方式中,通过肌内、皮下或皮内给药来给予所述药物组合物。在其它实施方式中,通过肌内给药来给予所述药物组合物。在一些实施方式中,所述念珠菌病是播散性念珠菌病,例如,血源性播散性念珠菌病。在一些实施方式中,所述念珠菌病是粘膜念珠菌病。在一些实施方式中,念珠菌病是由白色念珠菌(*Candida albicans*)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、克鲁斯念珠菌(*Candida krusei*)、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)或热带念珠菌(*Candida tropicalis*)引起的。

[0202] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基本同一性的序列

[0203] A-B-X-C-D-E (SEQ ID NO:31),

[0204] 其中A是不存在的或是SEQ ID NO:2;

[0205] 其中B是不存在的或是SEQ ID NO:3;

[0206] 其中X是不存在的或者是连接肽;

[0207] 其中C是不存在的或是SEQ ID NO:5;

[0208] 其中D是不存在的或是SEQ ID NO:6;和

[0209] 其中E是不存在的或是SEQ ID NO:10,

[0210] 条件是A、B、C、D和E中的两种或更多种存在于所述多肽中。

[0211] 在一些实施方式中,所述多肽是A-B-C-D-E (SEQ ID NO:32); A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11); A-B-C-D (SEQ ID NO:12); A-X-C-D-E (SEQ ID NO:25); A-C-D-E (SEQ ID NO:26); A-X-C-D (SEQ ID NO:13); A-C-D (SEQ ID NO:14); A-X-D-E (SEQ ID NO:27); A-D-E (SEQ ID NO:28); A-X-D (SEQ ID NO:15); 或者A-D (SEQ ID NO:16)。

[0212] 在另一个方面,本发明的特征在于分离的多肽,其包含与以下氨基酸序列具有基

本同一性的序列

[0213] C-D-E-X-A-B (SEQ ID NO:29),

[0214] 其中 C 是不存在的或是 SEQ ID NO :5 ;

[0215] 其中 D 是不存在的或是 SEQ ID NO :6 ;

[0216] 其中 E 是不存在的或是 SEQ ID NO :10 ;

[0217] 其中 X 是不存在的或者是连接肽 ;

[0218] 其中 A 是不存在的或是 SEQ ID NO :2 ;

[0219] 其中 B 是不存在的或是 SEQ ID NO :3,

[0220] 条件是 C、D、E、A 和 B 中的两种或更多种存在于所述多肽中。

[0221] 在一些实施方式中,所述多肽为 C-D-E-A-B (SEQ ID NO :30) ;C-D-X-A-B (SEQ ID NO :17) ;C-D-A-B (SEQ ID NO :18) ;D-X-A-B (SEQ ID NO :21) ;D-A-B (SEQ ID NO :22) ;D-X-A (SEQ ID NO :23) ;或者 D-A (SEQ ID NO :24)。

[0222] 在还有的其它方面,本发明的特征在于如本文所公开的组合物和方法,其至少部分基于以下提议:免疫应答如抗体及其它机制靶向念珠菌属 HYR1 多肽并赋予对不动杆菌如鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 感染的保护。使用本文所公开的 HYR1 多肽片段或 Als3/Hyr1 多肽融合蛋白的主动或被动免疫方法对保护由革兰氏阴性棒状细菌 (包括但不限于鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)) 所引起的感染是有用的。本文所公开的组合物和方法的一些用途包括使急性风险患者被动接种一个剂量的抗 HYR1 或抗 Als/Hyr1 抗体以预防获得鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 感染。另外,可以单独或与其它抗菌剂结合使用所述抗体来治疗主动鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 感染的患者。可替换地,可以用本文所公开的 Hyr1 或 Als3/Hyr1 多肽或特异性鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 多肽主动接种具有发展这类感染风险的患者 (诸如例如,军事人员) 来预防这类感染。

[0223] 除了对不动杆菌或念珠菌属感染或两者敏感的受试者接种外,本发明的疫苗组合物还可以用于免疫治疗性地治疗患有多种革兰氏阴性菌感染的受试者。因此,含有与佐剂结合的本文所述的一种或多种多肽和 / 或抗体组合物的疫苗可以起到预防性或治疗性治疗革兰氏阴性菌感染的目的。在一个实施方式中,本发明的疫苗将诱导身体自身的免疫系统去找到并抑制革兰氏阴性菌或念珠菌属或两者。

[0224] 根据本发明的疫苗是指可以给予受试者以保护个体抵抗传染病的组合物。疫苗通过引起或提高动物中对传染病的免疫应答来保护不受疾病影响。受使用本发明疫苗治疗的作用的示例性传染病包括重症肺炎、泌尿道感染、血流感染和身体其它部分感染。当受试者受例如本文所述的多肽或蛋白质的免疫原性部分激发时,疫苗介导的保护可以是在宿主中引起的体液和 / 或细胞介导的免疫。

[0225] 因此,在一些实施方式中,本发明通过给予治疗有效量的如本文所公开的药物组合物或如本文所公开的疫苗组合物,在对需要其的受试者中提供了治疗或预防革兰氏阴性菌感染的方法。例如,本发明提供了治疗或预防由一种或多种革兰氏阴性菌所引起的感染的方法,所述革兰氏阴性菌包括不动杆菌属细菌,如鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii*)、鲁氏不动杆菌 (*A. iwoffii*)、溶血不动杆菌 (*A. haemolyticus*)、醋酸钙不动杆菌 (*A. calcoaceticus*)、约氏不动杆菌 (*A. johnsonii*)、抗辐射不动杆菌 (*A. radioresistens*)

和琼氏不动杆菌 (*A. junii*), 嗜血菌属细菌, 如埃及嗜血杆菌 (*H. aegyptius*)、嗜沫嗜血杆菌 (*H. aphrophilus*)、禽嗜血杆菌 (*H. avium*)、杜克嗜血杆菌 (*H. ducreyi*)、猫胃嗜血杆菌 (*H. felis*)、溶血性嗜血杆菌 (*H. haemolyticus*)、流感嗜血杆菌 (*H. influenza*)、副流感嗜血杆菌 (*H. parainfluenzae*)、副兔嗜血杆菌 (*H. paracuniculus*)、副溶血性嗜血杆菌 (*H. parahaemolyticus*)、*H. pittmaniae* 和睡眠嗜血杆菌 (*H. somnus*), 博德特氏菌属细菌, 如 *B. ansorpii*、禽波氏杆菌 (*B. avium*)、支气管败血波氏杆菌 (*B. bronchiseptica*)、欣氏波氏杆菌 (*B. hinzii*)、霍氏波氏杆菌 (*B. holmesii*)、副百日咳波氏杆菌 (*B. parapertussis*)、百日咳波氏杆菌 (*B. pertussis*)、*B. petrii* 和创口波氏杆菌 (*B. trematum*), 沙门氏菌属细菌, 如鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、邦戈沙门氏菌 (*S. bongori*)、肠道沙门氏菌肠道亚种 (*S. enterica* subsp. *enteric*)、肠道沙门氏菌萨拉姆亚种 (*S. enterica* subsp. *salamae*)、亚利桑那沙门菌 (*S. arizonae*)、肠道沙门氏菌双相亚利桑那亚种 (*S. enterica* subsp. *diarizonae*)、肠道沙门氏菌浩敦亚种 (*S. enterica* subsp. *houtenae*) 和肠道沙门氏菌因迪卡亚种 (*S. enterica* subsp. *indica*), 耶尔森氏菌属 (*Yersinia* genus) 细菌, 如假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuber*)、奥氏耶尔森氏菌 (*Y. aldovae*)、*Y. aleksiciae*、伯氏耶尔森氏菌 (*Y. bercovieri*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Y. enterocolitica*)、弗氏耶尔森氏菌 (*Y. frederiksenii*)、中间耶尔森菌 (*Y. intermedia*)、克氏耶尔森菌 (*Y. kristensenii*)、莫氏耶尔森菌 (*Y. mollaretii*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Y. pestis*)、假结核性耶尔森氏菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、罗氏耶尔森氏菌 (*Y. rohdei*) 和鲁氏耶尔森氏菌 (*Y. ruckeri*), 埃希氏菌属细菌, 如阿氏埃希氏菌 (*E. albertii*)、蟑螂埃希氏菌 (*E. blattae*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、费格森埃希氏菌 (*E. fergusonii*)、赫氏埃希氏菌 (*E. hermannii*) 和伤口埃希菌 (*E. vulneris*), 土地杆菌属 (*Pedobacter* genus) 细菌, 如 *P. heparinus*、*P. roseus* sp. nov. 和 *P. aquatilis* sp. nov., 假单胞菌属细菌, 如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、产碱假单胞菌 (*P. alcaligenes*)、门多萨假单胞菌 (*P. mendocina*)、荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)、蒙氏假单胞菌 (*P. monteilii*)、稻皮假单胞菌 (*P. oryzae*)、浅黄假单胞菌 (*P. luteola*)、恶臭假单胞菌 (*P. putida*)、洋葱假单胞菌 (*P. cepacia*)、斯氏假单胞菌 (*P. stutzeri*)、嗜麦芽糖假单胞菌 (*P. maltophilia*)、腐败假单胞菌 (*P. putrefaciens*)、鼻疽假单胞菌 (*P. mallei*) 和类鼻疽假单胞菌 (*P. pseudomallei*) 或克雷白氏菌属细菌, 如肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*)、植生克雷伯氏菌 (*K. planticola*)、产酸克雷伯氏菌 (*K. oxytoca*) 和鼻硬结克雷伯氏菌 (*K. rhinoscleromatis*)。在其它实施方式中, 可以治疗或预防如本文所公开的念珠菌属菌种。

[0226] “佐剂”是指引起免疫系统刺激的一种或多种物质。在上下文中, 佐剂用于提高对一种或多种疫苗抗原或抗体的免疫应答。可以在疫苗或抗体给予前、结合所述给予或给予后, 将佐剂给予受试者。用作佐剂的化合物的实例包括但不限于铝化合物 (例如, 明矾 (*alum*)、铝胶 (*Alhydrogel*))、油剂、嵌段聚合物、免疫刺激复合物、维生素和矿物质 (例如, 维生素 E、维生素 A、硒和维生素 B12)、*Quil A* (皂苷)、细菌和真菌细胞壁组分 (例如, 脂多糖、脂蛋白和糖蛋白)、激素、细胞因子和共刺激因子。

[0227] “抗体”是指完整抗体、免疫球蛋白或其任何抗原结合片段或单链。如本文所使用的, 抗体可以是哺乳动物 (例如, 人或小鼠) 抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组抗体、合成产生或天然分离的抗体, 并且可以是例如单克隆或多克隆的。在大部分哺乳动物 (包括人)

中,完整抗体具有通过二硫键连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个域, C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 和位于 C_{H1} 和 C_{H2} 之间的铰链区组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个域, C_L 组成。 V_H 和 V_L 区还可以再分为与更保守的区(称为框架区(FR))相互交替的高变区(称为互补决定区(CDR))。每个 V_H 和 V_L 由3个CDR和4个FR组成,它们从氨基末端至羧基末端按以下顺序布置:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,其包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0228] 本发明的抗体包括所有已知形式的抗体及具有抗体样性质的其它蛋白骨架。例如,所述抗体可以是人抗体、人源化抗体、双重特异性抗体、嵌合抗体或具有抗体样性质的蛋白骨架,如纤连蛋白或锚蛋白重复。抗体还可以是Fab、Fab' 2、scFv、SMIP、双链抗体、纳米抗体、适体或域抗体。抗体可以具有任何以下同种型:IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)、IgM、IgA(例如,IgA1、IgA2和IgAsec)、IgD或IgE。

[0229] 如本文所使用的“抗体片段”是指保留了特异性结合于抗原的能力的抗体的一种或多种片段。可以通过全长抗体的片段来发挥抗体的抗原结合功能,其包括但不限于:(i) Fab片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 域构成的一价片段;(ii) F(ab')₂片段,包括在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和 C_{H1} 域构成的Fd片段;(iv) 由抗体的一个臂的 V_L 和 V_H 域构成的Fv片段,(v) dAb,包括 V_H 和 V_L 域;(vi) dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989)),其由 V_H 域组成;(vii) 由 V_H 或 V_L 域组成的dAb;(viii) 分离的互补决定区(CDR);和(ix) 可以可选地通过合成接头连接的两种或更多种分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个域, V_L 和 V_H ,由不同的基因编码,但是使用重组方法,通过合成接头能将它们连接,所述接头使得它们成为一个蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成一价分子(已知为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988)和Huston等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988))。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且以和完整抗体相同的方式筛选所述片段的用途。可以通过重组DNA技术,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割产生抗体片段。

[0230] “抗原”是指抗体可以选择性结合的分子。靶标抗原可以是蛋白质(例如,抗原肽)、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原,或其它天然存在的或合成的化合物。靶标抗原可以是多肽或肽模拟物。还可以将抗原给予动物从而在动物中产生免疫应答。

[0231] 在结合物的背景中,“载体”是指适合于连接于或显示如本文所述的多肽的部分或颗粒,例如,KLH、CRM197、破伤风类毒素、噬菌体、酵母、病毒、病毒体、重组病毒样颗粒。

[0232] “嵌合抗体”是指其可变区衍生自第一物种而其恒定区衍生自第二物种的免疫球蛋白或抗体。可以例如通过基因工程从属于不同物种(例如,来自小鼠和人)的免疫球蛋白基因片段构造嵌合抗体。

[0233] “嵌合疫苗”是指包含至少两种不同抗原,例如,共价结合的抗原的疫苗。嵌合疫苗的实例是包含在例如颗粒如噬菌体、病毒、酵母、病毒体或重组病毒样颗粒的表面上显示的多肽的组合物。

[0234] “结合物(缀合物)”是指包括与另一个部分或颗粒连接的本发明的多肽的化合

物,所述部分或颗粒,例如, KLH、CRM197、破伤风类毒素、噬菌体、酵母、病毒、病毒体或重组病毒样颗粒。

[0235] 氨基酸序列中的“保守取代”是指用其侧链化学性质相关的氨基酸家族内的一种氨基酸取代另一种氨基酸。

[0236] 遗传编码的氨基酸可以分为四类:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸);碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸);非极性氨基酸(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);和不带电的极性氨基酸(甘氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时也分类为芳香族氨基酸。以类似的方式,氨基酸还可以分为以下组:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸);碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸);脂肪族氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸),其中丝氨酸和苏氨酸可选地单独分为脂肪族-羟基氨基酸;芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸);酰胺氨基酸(天门冬酰胺、谷氨酰胺);和含硫氨基酸(半胱氨酸、蛋氨酸)。

[0237] 可以通过使用如本文所述的那些的标准方法评价变体多肽以类似于野生型多肽的方式起作用的能力来确定氨基酸序列的变化是否会产生功能性变体。

[0238] “诊断组合物”是指配制与诊断方法一起使用的含有本发明的多肽、结合物、疫苗或抗体的组合物。

[0239] 在使用例如包含抗体的药物组合物的被动免疫的背景中,“有效量”是指以临床相关方式被动免疫所需的药物组合物的量。基于给药方式、受试者的年龄、体重和一般健康状况,用于实践本文所述的被动免疫方法的药物组合物的有效量是不同的。最终,主治医师将决定适当的量和定量给药方案。

[0240] “侧翼氨基酸”是指紧邻具体限定序列的 N- 或 C- 端的多肽序列中的氨基酸。期望地,侧翼氨基酸存在于 SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸序列或其片段的 N- 和 / 或 C- 端上;并且更期望地,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个侧翼氨基酸存在于 SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸序列或其片段的 N- 和 / 或 C- 端。

[0241] “融合蛋白”是指包含本发明的多肽例如,肽片段或变体和融合伴侣的蛋白质。

[0242] “融合伴侣”是指可以融合于本发明的多肽或肽例如,肽 3-11 或其变体中的一个或多个的异源序列。本文描述了融合伴侣的实例,并且所述融合伴侣包括检测标志物、稳定域、辅助蛋白产生或纯化的序列或者提高多肽抗原性的域。

[0243] “免疫原性的”是指能够在受试者中诱导免疫应答的任何物质。

[0244] 在疫苗的背景中,“免疫原性量”是指以临床相关方式在受试者中诱导免疫应答所需的疫苗量。基于给药方式、受试者的年龄、体重和一般健康状况,用于实践如本文所述的接种方法的疫苗的免疫原性量是不同的。最终,主治医师将决定适当的量和定量给药方案。

[0245] “分离的”或“纯化的”是指与其它天然伴随成分分离。通常,当化合物是至少按重量计 60% 不含其天然相联系的蛋白质和 / 或天然存在的有机分子时,化合物(例如,核酸、多肽、抗体或小分子)是基本上分离的。该定义还延伸至例如与其侧接序列分离的多肽或核酸分子(例如,对于氨基酸序列,分离的是指序列不含在多肽中该序列天然相联系的侧接氨基酸)。在一些情况下,化合物是按重量计至少 75%、更优选地至少 90% 并且最优选地至少 99% 分离的。可以通过标准技术获得分离的化合物(例如,多肽),例如,通过从天然

来源提取（例如，从念珠菌属感染的细胞纯化）；通过编码 A1s3 或 CNA 片段或变体或其融合蛋白的重组核酸表达；或者通过化学合成所述多肽。可以通过任何适当的方法，例如，通过柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳或 HPLC 分析来测量纯度。

[0246] 在结合物的背景中，“连接于”或“结合于”是指多肽和载体或融合伴侣之间的共价或非共价相互作用。非共价相互作用包括但不限于氢键作用、带电基团中的离子相互作用、静电结合、范德华相互作用、非极性基团中的疏水性相互作用、疏油相互作用和基于 LogP 的吸引力 (LogP-based attraction)。

[0247] 如本文所使用的“接头”是指例如通过例如自切割、酶促或化学切割不可切割的一个或多个氨基酸长度的氨基酸序列。所述接头可以包括非极性、极性和 / 或带电氨基酸。在一些实施方式中，接头包括柔性部分或由柔性部分组成，例如，无明显固定二级或三级结构的区域。示例性柔性接头为富含甘氨酸的接头，例如，含有至少 50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或甚至 100% 的甘氨酸残基。接头还可以含有例如丝氨酸残基。在一些情况下，接头的氨基酸序列仅由甘氨酸和丝氨酸残基组成。接头长度可以是例如 1 至 100 个氨基酸，例如，长度为 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 个氨基酸。

[0248] “单克隆抗体”是指源自基本均一的抗体群体的抗体，即除了可以少量存在的可能的天然存在的突变之外，包含所述群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异的，并且针对单个抗原位点。此外，与通常包括针对不同决定簇 (determinant) (表位) 的不同抗体的常规 (多克隆) 抗体制备相反，每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。可以使用任何本领域承认的技术和如本文所述的那些技术制备单克隆抗体，所述技术如例如杂交瘤方法，如 Kohler 等人，Nature 256:495 (1975)、转基因动物（例如，Lonberg 等人，Nature 368 (6474):856-859 (1994)）、重组 DNA 方法（例如，美国专利号 4,816,567）或者使用例如 Clackson 等人，Nature, 352:624-628 (1991) 和 Marks 等人，J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 中所述的技术使用噬菌体、酵母或合成骨架抗体文库。

[0249] “核酸分子”是指具有两种或更多种共价键合、天然存在或修饰的核苷酸的序列的分子，例如，RNA 或 DNA。所述核酸分子可以是例如单链或双链的，并且可以包括修饰或未修饰的核苷酸或者它们的混合物或组合。还包括多种盐、混合的盐和游离酸形式。

[0250] “患者”或“受试者”是指哺乳动物，其包括但不限于人或非人哺乳动物，如牛、马、狗、羊或猫。

[0251] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”是可互换使用的，并且表示不考虑翻译后修饰（例如，糖基化作用或磷酸化作用），两个或更多个天然或非天然氨基酸的任何链，其构成了所有或部分天然存在或非天然存在的多肽或肽，如本文所述的。这种多肽通常是连续且无支链的肽。肽是氨基酸单体的短聚合物。“蛋白质”旨在包括以生物学功能性方式布置的一种或多种多肽。可以通过肽键或其它键（例如，酯键或醚键）连接包括本发明所述多肽的氨基酸。包含本发明所述多肽的氨基酸可以包括天然存在或化学合成的非遗传编码的氨基酸。

[0252] 本发明的多肽还可以涵盖一种或多种保守取代。所编码的氨基酸的保守取代包括例如属于以下组内的氨基酸：(1) 非极性氨基酸 (Gly、Ala、Val、Leu 和 Ile)；(2) 极性中性氨基酸 (Cys、Met、Ser、Thr、Asn 和 Gln)；(3) 极性酸性氨基酸 (Asp 和 Glu)；(4) 极性碱性

氨基酸 (Lys、Arg 和 His) ;和 (5) 芳香族氨基酸 (Phe、Trp、Tyr 和 His)。只要所述多肽保留了如本文所述的其功能的一些或全部,那么本发明的多肽内也包括了其它微小的修饰。

[0253] 本发明的多肽还可以包括其衍生物、类似物和功能模拟物,只要这些多肽保留了本文所公开的其功能的一些或全部。例如,衍生物可以包括多肽的化学修饰,如烷基化、酰基化、氨甲酰化、碘化或使多肽衍生化的任何修饰。这些衍生化分子包括例如其中自由氨基已衍生化形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、苄氧羰基 (carbobenzoxy groups)、叔丁氧羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。自由羧基可以衍生化形成盐、甲酯和乙酯或者其它类型的酯或酰胺。自由羟基可以衍生化形成 O- 酰基或 O- 烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可以衍生化形成 N- 咪唑 - 苄基组氨酸 (N-im-benzylhistidine)。作为衍生物或类似物,还包括含有二十种标准氨基酸的一种或多种天然存在的氨基酸衍生物的那些肽,所述衍生物例如 4- 羟基脯氨酸、5- 羟基赖氨酸、3- 甲基组氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸或羧基谷氨酸,并且可以包括未通过肽键连接的氨基酸。只要维持如本文所公开的免疫原活性,本发明的多肽还包括相对于其序列如本文所示的多肽序列具有一个或多个残基添加和 / 或缺失的任何多肽。

[0254] 本发明的多肽可以通过本领域中熟知的多种方法分离,例如,重组表达系统、沉淀、凝胶过滤、离子交换、反相和亲和色谱法等。在 Deutscher 等人, *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology* Vol.182 (Academic Press, (1990)) 中描述了其它熟知的方法。可替换地,可以使用熟知的重组方法获得本发明的分离的多肽 (参见,例如, Ausubel 等人, “Immunology,” *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. Chapter 11. Page 11.1-11.29 (1999) ; Sambrook and Russell, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Laboratory (2001))。本领域技术人员可以选择用于本发明多肽的生物化学纯化的方法和条件,并且通过例如免疫学测定或功能性测定来监控纯化。

[0255] 制备本发明多肽的方式的实例是使用本领域中熟知的方法在适合的宿主细胞 (如细菌细胞、酵母细胞、两栖动物细胞 (如卵母细胞) 或哺乳动物细胞) 中表达编码本发明多肽的核酸,并且再次使用如本文所述的熟知的纯化方法回收所表达的多肽。可以直接从已用如本文所述的表达载体转化的细胞中分离本发明的多肽。还可以通过化学合成生产本发明的多肽。用于化学合成多肽的方法在本领域中是熟知的并且是可商购的。

[0256] 本发明的重组表达的多肽还可以与适合的融合伴侣一起作为融合蛋白表达。适合的融合伴侣可以是通常未连接到所述氨基酸序列的氨基酸序列,如异源序列,其起到特定的功能并且为本发明的多肽提供额外的特性。适合的异源序列的非限制性实例包括可检测标志物、稳定域、用于抗体产生的载体蛋白、接头序列和辅助多肽纯化的序列。可以辅助本发明多肽纯化的序列包括亲合标签,如谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 或聚 His。因此,在一些方面,本发明提供了具有融合于异源序列的如本文所公开的多肽、载体蛋白、亲合标签或接头序列或如本文所公开的其它多肽的融合蛋白。

[0257] 如本文所使用的,天然氨基酸是具有 L- 构型的天然 α - 氨基酸,如通常在天然多肽中存在的那些。非天然氨基酸是指多肽中通常不存在的氨基酸,例如,具有 L 构型的天然 α - 氨基酸的差向异构体,即具有非天然 D- 构型的氨基酸 ;或其 (D, L) - 异构混合物 ;或这种氨基酸的同系物,例如, β - 氨基酸、 α , α - 二取代氨基酸,或其中通过一个或两个亚甲基缩短氨基酸侧链或将氨基酸侧链延长至高达 10 个碳原子的 α - 氨基酸,如在直链中具

有 5 长至并且包括 10 个碳原子的 α -氨基链烷酸、未取代的或取代的芳香族 (α -芳基或 α -芳基低级烷基) 氨基酸, 例如, 取代的苯丙氨酸或苯基甘氨酸。

[0258] 术语“药用载体”和“药用赋形剂”是可互换使用的, 并且表示对所治疗患者是生理学可用的同时保留了与其一起给予的化合物的治疗性质的载体或赋形剂。一个示例性药用载体物质是生理盐水。其它生理学可用的载体及其制剂是本领域技术人员已知的并且在例如雷明顿药物科学 (第 20 版), A. Gennaro 编辑, 2000, Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia, PA 中描述。

[0259] “药物组合物”是指含有与药用赋形剂一起配制的本发明的多肽、结合物、疫苗或抗体的组合物, 并且所述组合物经过政府管理机构批准, 作为用于哺乳动物中疾病或事件的治疗或预防的治疗方案的一部分生产或销售。可以将药物组合物以例如单位剂量形式配制例如用于静脉内给药 (例如, 作为不含颗粒栓塞物 (particulate emboli) 并在适合于静脉内使用的溶剂系统中的无菌溶液), 用于口服给药 (例如, 片剂、胶囊剂、囊片剂、囊形片 (gelcap) 或糖浆剂) 或本文所述的任何其它制剂。

[0260] “特异性结合”是指结合部分 (例如, 抗体、抗体片段、受体、配体或如本文所述的试剂的小分子部分) 与靶标分子 (例如, 多肽或包含多肽的结合物) 或者与具有靶标分子 (例如, 细胞表面抗原, 如受体或配体) 的细胞或组织的优先结合, 并且不与非靶标分子、缺少所述靶标分子的细胞或组织结合。应承认在结合部分和非靶标分子 (单独存在或与细胞或组织结合存在) 之间可以发生一定程度的非特异性相互作用。尽管如此, 特异性结合可以区别为通过靶标分子的特异性识别所介导的。特异性结合导致结合部分 (例如, 抗体) 和靶标分子 (例如, 多肽或包含多肽的结合物) 之间的结合比结合部分与例如非靶标分子或缺少靶标分子的其它组合物之间的结合更强。特异性结合通常导致与缺少靶标分子或标志物的细胞或组织相比, (每单位时间) 与例如具有靶标分子或标志物的细胞或组织结合的结合部分的量提高大于 2 倍、优选大于 5 倍、更优选大于 10 倍并且最优选大于 100 倍。结合部分以例如小于 10^{-6} M、小于 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或 10^{-12} M 或甚至小于 10^{-13} M、 10^{-14} M 或 10^{-15} M 的解离常数结合于靶标分子或者标志物。在这些条件下, 与蛋白的特异性结合需要因其对特定蛋白的特异性而选择的结合部分。对于选择能够特异性结合于特定靶标分子的结合部分 (例如, 抗体), 多种测定形式是合适的。例如, 固相 ELISA 免疫测定通常用于选择对蛋白质具有特异性免疫活性的单克隆抗体。有关对可以用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述, 参见 Harlow&Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)。

[0261] “基本同一 (substantially identical)”是指对参考序列显示出至少 50% 同一性的氨基酸序列或核酸序列。这种序列在氨基酸水平或核酸水平对参考序列通常是至少例如 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的。一般地, 对于多肽, 比较序列的长度可以是至少 5 个氨基酸, 例如, 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300 或更多个氨基酸, 直至整个多肽长度。对于核酸, 比较序列的长度通常可以是至少 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、800、900 或更多个核苷酸, 直至整个核酸分子长度。应理解出于确定序列同一性的目的, 当将 DNA 序列与 RNA 序列相比较时, 胸腺嘧啶核苷酸相当于尿嘧啶核苷酸。

[0262] 如本文所使用的, 当多肽或核酸序列被称为对参考序列具有“至少 X% 序

列同一性”时,则它表示当序列为最佳比对时,所述多肽或核酸中至少 X% 的氨基酸或核苷酸与参考序列中的那些是同一的(相同的)。可以以本领域技术范围内的多种方式确定最佳序列比对,例如,Smith Waterman 比对算法(Smith 等人, J. Mol. Biol. 147:195-7, 1981) 和 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool; Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)。使用公共计算机软件,如引入到 GeneMatcher Plus™(Schwarz 和 Dayhof, Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, M. O. 编辑,第 353-358 页, 1979) 中的“Best Fit”(Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489, 1981)、BLAST、BLAST-2、BLAST-P、BLAST-N、BLAST-X、WU-BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、CLUSTAL 或 Megalign(DNASTAR),这些及其它比对算法是可使用的。另外,本领域技术人员可以确定测量比对的适当参数,其包括对要比较的序列全长实现最佳比对所需的任何算法。

[0263] “金黄色葡萄球菌皮肤或软组织感染”、“金黄色葡萄球菌 SSTI”、“金黄色葡萄球菌皮肤 / 皮肤结构感染”和“金黄色葡萄球菌 SSSI”在本文中可互换使用,并且表示由金黄色葡萄球菌在切伤、刮伤、咬伤或使皮肤破裂的其它伤口位点进入体内所造成的皮肤或软组织感染(例如,蜂窝组织炎、软组织脓肿、皮肤坏死、肌炎或其它感染)。在一些情况下,金黄色葡萄球菌 SSSI 是生活在身体上的金黄色葡萄球菌所造成的,并且可以在不存在可见皮肤损伤或伤口位点的情况下自发发生。这些感染可以影响皮肤层或更深层组织,如肌肉和结缔组织(形成韧带、腱及其它身体支持结构的交织组织框架)。还可能在身体正在抵抗金黄色葡萄球菌感染的皮肤区域中发生皮肤脓肿。造成皮肤或软组织感染的更重要的金黄色葡萄球菌株是被称为二甲氧苯青霉素耐受性金黄色葡萄球菌(MRSA)的抗生素耐受性葡萄球菌;金黄色葡萄球菌的万古霉素耐受性和达托霉素耐受性株也可能造成 SSSI。MRSA 对普通抗生素耐受。金黄色葡萄球菌 SSSI 也可能是由二甲氧苯青霉素敏感性金黄色葡萄球菌(MSSA)造成的。

[0264] 可以以预防形式治疗具有发展金黄色葡萄球菌皮肤或软组织感染风险的哺乳动物。可替换地,可以当出现金黄色葡萄球菌皮肤或软组织感染症状时治疗哺乳动物。如本文所述的疫苗将减轻症状的严重性,延缓或防止症状的发展。如果哺乳动物住院或生活在制度化社区,用抗生素治疗或免疫抑制(包括患有 HIV/AIDS 或损害免疫功能的其它疾病的儿童),个体频率与医疗系统接触,患有慢性疾病(如糖尿病、癌症、HIV/AIDS),极年幼或极年老,频繁使用抗生素,具有开放性伤口、皮炎或皮肤损害、营养不良或卫生条件差,则所述哺乳动物具有较高风险。其它具有风险的哺乳动物包括在拥挤的生活条件中生活的那些、军事人员(特别是部署的部队)、运动员和监狱犯人。具有发展金黄色葡萄球菌皮肤或软组织感染风险的其它哺乳动物为先前患有这些感染的个体或者安排或已经进行了手术或侵入式医学程序的个体。

[0265] “靶标分子”或“靶标细胞”是指结合部分(例如,抗体)可以特异性结合的分子(例如,多肽、表位、抗原、受体或配体)或细胞。在一些情况下,靶标分子暴露在靶标细胞的外部(例如,细胞表面或分泌的蛋白质),但是靶标分子可以替代性地或还可以存在于靶标细胞内部。

[0266] “治疗”或“处理”是指以疾病、病理状况、病症或事件的治愈、改善、稳定、可能性的降低或预防为目的,通过给予药物组合物对患者进行医学控制。该术语包括积极疗法,即特

别针对疾病、病理状况、病症或事件的改善或与疾病、病理状况、病症或事件的治愈有关的治疗,并且还包括病因疗法,即针对除去相关疾病、病理状况、病症或事件的病因的治疗。另外,该术语包括舒减疗法,即旨在缓解症状而不是治愈疾病、病理状况、病症或事件的治疗;症状疗法,即针对相关疾病、病理状况、病症或事件的全身症状的治疗;预防治疗,即针对在例如现在尚未患病,但对特定疾病、病理状况、病症或事件敏感或否则具有风险的患者中最大程度降低或者部分或完全抑制相关疾病、病理状况、病症或事件的发展的治疗;和支持疗法,即用于补充针对相关疾病、病理状况、病症或事件的改善的另一种特定疗法的治疗。

[0267] 如本文所使用的,“疫苗”是指在所给予的受试者中引起免疫应答的组合物。

[0268] 如本文所使用的,“接种”是指通过给予疫苗来治疗患者,例如,预防或改善疾病、病理状况、病症或事件。

[0269] 在如本文所述的多肽或其部分的背景中,“变体”或编码变体的核酸分子是指包括氨基酸序列或核酸序列中的取代或变化,例如,导致基本上同一的序列。具有变体序列的多肽可以维持原始多肽的至少一种生物活性,例如,免疫原活性。术语“变体”包括例如氨基酸插入衍生物,如氨基和 / 或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸的序列内插入。插入的氨基酸变体是其中将一个或多个氨基酸残基引入到蛋白质中预定位点的那些。通过对所得产物的适当筛选,随机插入也是可能的。缺失变体的特征在于从序列中除去一个或多个氨基酸。取代氨基酸变体是其中在其位置插入至少一个残基的那些。当通过氨基酸取代使蛋白质衍生化时,氨基酸通常被保守取代所替代,例如,具有类似理化性质如疏水性、亲水性、电负性、大侧链等的其它氨基酸。

[0270] 对本发明来说,变体还包括与所述多肽可以来源的天然存在的蛋白质的部分天然或人工地结合的一种或多种任何组分如碳水化合物、脂肪和 / 或其它蛋白质部分的单个或多个取代、缺失和 / 或添加。术语“变体”涵盖了所有这些分子。

[0271] “变体序列”是指如本文所定义的变体的氨基酸或核酸序列。

[0272] 根据以下详细说明和权利要求,本发明的其它特征和优势将是显而易见的。

具体实施方式

[0273] 本文所述的 Als3 和 Hyr1 多肽片段和 Als3/Hyr1 融合多肽及其它组合物的识别使得能够例如有效治疗念珠菌病或细菌感染如由任何本文所公开的那些所引起的那些并能够接种抗所述念珠菌病或细菌感染的疫苗。

[0274] 本发明提供了例如来源于 Als3 或 Hyr1 的多肽,或 Als3/Hyr1 融合多肽、结合物、疫苗、抗体、组合物,使用它们接种的方法,和生产它们的方法,如以下进一步详细说明书的。

[0275] 多肽

[0276] 本发明的特征在于来源于 Als3 或 Hyr1 的多肽。rAls3 蛋白的氨基酸序列如下所示:

[0277]

1	KTITGVFNSFNSLTWNAAT	YNYKGGPTPTWNAVLGWSLD	GTGASPGDTFTLNMPGVFKF
61	TTSQTSVDLTAHGVKYATCQ	FQAGEEFMTFSTLTCTVSNT	LTPSIKALGTVTLPLAFNVG
121	GTGSSVDLEDSCFTAGTNT	VTENDGGKKISINVDERSN	VDPKGYLTDSEVIPSLNKVS
181	TLFVAPQCANQYTSSTMGFA	NTYGDVQIDCSNIHVGITKG	LNDWNYPVSSSESFYTKTCS
241	ENGFITLYKNVPAGYRPFVD	AYISATDVNSYTLSEYANEYT	CAGGYWQRAFFTLLRWTYGRN
301	SDAGSNGIVIVATTRTVTDS	TTAVTTLPEDPNRDKTKTIE	ILKPIPTTTTITTSYVGVTTT
361	YSTKTAPIGETATVIVDIPY	HTTTTVTSKWTGTITSTTTH	TNPTDSIDTVIVQVP

[0278] rHyr1 蛋白的氨基酸序列如下所示：

[0279]

1	TSRIDRGGGIQGFHGDVKVHS	GATWAILGTTLCSEFFGGLEV	EKGASLFIKSDNGPVLALNV
61	ALSTLVRPVINNGVISLNSK	SSTSFSNFDIGSSSFTNNGE	IYLDSSGLVKSTAYLYAREW
121	TNNGLIVAYQNQKAAGNIAF	GTAYQTITNNGQICLRHQDF	VPATKIKGTGCVTADTDWI
181	KLGNTILSVEPTNHFYLNKDS	KSSLIVHAVSSNQFTTVHGF	GNGNKLGLTLPLTGNRDHFR
241	FEYYPDGTGILQLRADALPQY	FKIGKGYDSKLFRIVNSRGL	KNAVITYDGPVPNNEIPAVCL
301	IPCTNGPSAPESESDLNTPT	TSSIETSSYSSAATESVVS	ESSSAVDSLTSSSLSSKSES
361	SDVVSSTTNIESSSTAIETT	MNESSTDAGSSSISQSESS	STAITSSSETSSSESMSASS
401	TTASNTSIETDSGIVSQSES	SSNAL	

[0280] 本发明的特征在于与本文所述的多肽具有基本同一性的多肽，其包括下述：

[0281] Als3

[0282]

A=	KTITGVFNSFNSLTWNAAT	YNYKGGPTPTWNAVLGWSLD	GTGASPGDTFTLNMPGVFKF
	TTSQTSVDLTAHGVKYATCQ	FQAGEEFMTFSTLTCTVSNT	LTPSIKALGTVTLPLAFNVG
	GTGSSVDLEDSCFTAGTNT	VTENDGGKKISINVDERSN	VDPKGYLTDSEVIPSLNKVS
	TLFVAPQCANQYTSSTMGFA	NTYGDVQIDCSNIHVGITKG	LNDWNYPVSSSESFYTKTCS
	ENGFITLYKNVPAGYRPFVD	AYISATDVNSYTLSEYANEYT	CAGGYWQRAFFTLLRWTYGRN
	SDAGSNG (SEQ ID NO: 2).		

[0283]

B=	IVIVATTRTVTDS	TTAVTTLPEDPNRDKTKTIE	ILKPIPTTTTITTSYVGVTTT
	YSTKTAPIGETATVIVDIPY	HTTTTVTSKWTGTITSTTTH	TNPTDSIDTVIVQVP (SEQ ID NO: 3)

[0284] Hyr1

[0285]

C=	TSRIDRGGGIQGFHGDVKVHS	GATWAILGTTLCSEFFGGLEV	EKGASLFIKSDNGPVLALNV
	ALSTLVRPVINNGVISLNSK	SSTSFSNFDIGSSSFTNNGE	IYLDSSGLVKSTAYLYAREW
	TNNGLIVAY (SEQ ID NO: 5)		
D=	QNQKAAGNIAF	GTAYQTITNNGQICLRHQDF	VPATKIKGTGCVTADTDWI
	KLGNTILSVEPTNHFYLNKDS	KSSLIVHAVSSNQFTTVHGF	GNGNKLGLTLPLTGNRDHFR
	FEYYPDGTGILQLRADALPQY	FKIGKGYDSKLFRIVNSRGL	KNAVITYDGPVPNNEIPAVCL
	IPCTNGPSAPESESDLNTPT	TSSIET (SEQ ID NO: 6)	

[0286] X = 是存在或不存在的 (-X), 其中 X 是连接肽。

[0287] E1 = A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11) E1(-X) = A-B-C-D (SEQ ID NO:12)

[0288] E2 = A-X-C-D (SEQ ID NO:13) E2(-X) = A-C-D (SEQ ID NO:14)

[0289] E3 = A-X-D (SEQ ID NO:15) E3(-X) = A-D (SEQ ID NO:16)

[0290] E4 = C-D-X-A-B (SEQ ID NO:17) E4(-X) = C-D-A-B (SEQ ID NO:18)

[0291] E5 = C-D-X-A (SEQ ID NO:19) E5(-X) = C-D-A (SEQ ID NO:20)

[0292] E6 = D-X-A-B (SEQ ID NO:21) E6(-X) = D-A-B (SEQ ID NO:22)

[0293] E7 = D-X-A (SEQ ID NO:23) E7(-X) = D-A (SEQ ID NO:24)

[0294] Als3

[0295]

A=	KIITGVFNENSLTWGNAAT	YNYKGGPTFTWNAVLGWSLE	GTSASPEDIEFTLMPGVFKF
	TISQTSVDLTAKGVKYATCQ	FQAGEEFMTFTSLICTVSNF	LTPSIRALGTVTLPALFNVG
	GTGGVNDLEDSKCFATGTNT	VTENGSGKKISINVDFERGN	VDPKGYLTDGRVIPGLNVG
	TLFVAPQCANGYISGIMGFA	NTYGDVQIDCSNLAHVGITKG	LNDQNYPVSSSESFSYATCG
	ENGIFITYKNVPAGYRPFVD	AVISATDVNSYTLGVANEYT	CAGGVWQAPFTLRNTGYRN
	SDAGSNG (SEQ ID NO: 2)		
B=	IVIVATITRTVIDS	TTAVTTLPPDPNRDKIRTIE	ILKPIFITTITTSYGVGTIS
	YSTKIAPISGETATVIVDIPY	HTTTVTSTKWTGIIITSTTH	TNPTDSIDTVIVQVF (SEQ ID NO
	3)		

[0296] Hyr1

[0297]

C=	TSRIDRGGIGQGFHGDVXVHS	GATWAILGTTLCSEFFGGLEV	EKGASLFIKSDNGPVLALNV
	ALSTLVRPVINNGVISLNCK	ESTSPENFDIGGSSFTNNGE	IYLDSSGLVKSTAVLYAREW
	TNNGELIVAY (SEQ ID NO: 8)		
D=	QNKAAAGNIAF	GTAYQTITNNGQICLRHQDF	VPATKIKGTGEVTADELTWI
	KLGNTILSVEPTNMFYLNDS	KSSLIVHAVSSNQTFIVHGF	QNGNKLGLTLPLTGNRDHFR
	FRYNPDIGILQLRADALPQY	FKICKGYDSKLFRIVNSRGL	KNAVITYDGPVPNNELPAVCL
	IFCTNGPSAPESSEGLNTFT	ISSIET (SEQ ID NO: 6)	
E=	S	EYSSAATESGVVS	EESSAVDSLTSSGLSEKSES
	SDVVSSTINIESSTAIETT	MNSESSTDAGSSSISQSESS	STAITSSSETSSSESMSASS
	TTASNTSIEETDSGIVSQSES	GSNAL (SEQ ID NO: 10)	

[0298] X = 是存在或不存在的 (-X), 其中 X 是连接肽。

[0299] S1 = A-B-X-C-D (SEQ ID NO:11) S1(-X) = A-B-C-D (SEQ ID NO:12)

[0300] S2 = A-X-C-D-E (SEQ ID NO:25) S2(-X) = A-C-D-E (SEQ ID NO:26)

[0301] S3 = A-X-D-E (SEQ ID NO:27) S3(-X) = A-D-E (SEQ ID NO:28)

[0302] S4 = C-D-E-X-A-B (SEQ ID NO:29) S4(-X) = C-D-E-A-B (SEQ ID NO:30)

[0303] S5 = C-D-X-A-B (SEQ ID NO:17) S5(-X) = C-D-A-B (SEQ ID NO:18)

[0304] S6 = D-X-A-B (SEQ ID NO:21) S6(-X) = D-A-B (SEQ ID NO:22)

[0305] S7 = D-X-A (SEQ ID NO :23) S7(-X) = D-A (SEQ ID NO :24)

[0306] 在一些情况下,对如本文所述的多肽的修饰不会显著降低所述多肽的生物活性,例如,免疫原活性。修饰的多肽可以具有或可以优化多肽特征,如体内稳定性、生物利用率、毒性、免疫活性、免疫学一致性(同一性)或结合性质。

[0307] 修饰包括通过天然过程的那些,如翻译后加工,或者通过本领域中已知的化学修饰技术的那些。修饰可以发生在多肽中的任何地方,包括多肽主链、氨基酸侧链和氨基-或羧基-末端。在给定多肽中的一些位点处,可以存在相同或不同程度的相同类型的修饰,并且多肽可以含有不止一种类型的修饰。

[0308] 变体或以其它方式修饰的多肽还可以包括多肽序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失或者保守取代或非保守取代(例如,D-氨基酸、脱氨基酸(desamino acid))。例如,向本发明的任何多肽的氨基或羧基末端添加一个或多个半胱氨酸残基可以有利于这些多肽的结合。示例性多肽具有N-或C-末端半胱氨酸。

[0309] 氨基酸取代可以是保守的(即,其中残基被一般相同类型或组中的另一种取代)或非保守的(即,其中残基被另一种类型的氨基酸取代)。另外,可以用非天然存在的氨基酸取代天然存在的氨基酸(即,非天然存在的保守氨基酸取代或非天然存在的非保守氨基酸取代)。

[0310] 例如,使用本领域中已知的方法合成制备的多肽可以包括通过DNA非天然编码的氨基酸(例如,非天然存在的或非天然氨基酸)的取代。非天然存在的氨基酸的实例包括D-氨基酸、具有连接到半胱氨酸的硫原子的乙酰氨基甲基的氨基酸、聚乙二醇化的氨基酸、式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 的 Ω 氨基酸(其中n为2-6)、中性非极性氨基酸,如肌氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸和正亮氨酸。苯基甘氨酸可以取代Trp、Tyr或Phe;瓜氨酸和蛋氨酸亚砷是中性非极性的,磺基丙氨酸是酸性的,并且鸟氨酸是碱性的。脯氨酸可以被羟脯氨酸取代并且保留赋予性质的构型。

[0311] 可以通过取代突变产生变体,并且所述变体保留或甚至提高了原始多肽的生物活性,例如,免疫原活性。

[0312] 可以例如使用可商购的自动肽合成仪,通过化学合成获得本文所述的多肽。可以将合成的蛋白质或多肽沉淀并进一步纯化,例如,通过高效液相色谱法(HPLC)。可替换地,可以通过例如本领域熟知的重组方法获得蛋白质和多肽。

[0313] 结合物

[0314] 本发明的多肽可以结合至另一个部分或颗粒。

[0315] 蛋白质部分

[0316] 在一些情况下,例如,使用如本领域中已知的双官能或衍生化试剂,例如,马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛或琥珀酸酐,将多肽结合至在待免疫物种中是免疫原的蛋白质可以是有用的,所述蛋白质例如钥孔血蓝素(KLH)、CRM197、破伤风类毒素、白喉类毒素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂或聚阳离子(聚-L-赖氨酸或聚-L-精氨酸)。

[0317] 在一些情况下,所述结合物可以是重组融合蛋白例如以有利于多肽的表达和纯化。

[0318] 用于多肽结合或显示的颗粒

[0319] 在一些情况下,将多肽结合至颗粒上或在颗粒上显示,所述颗粒例如噬菌体、酵母、病毒、病毒体或重组病毒样颗粒。

[0320] 例如,可以将一个或多个多肽结合至噬菌体、酵母或病毒颗粒,例如,结合至所述颗粒的表面。在一个实施方式中,将编码所述多肽的核酸分子插入到噬菌体、酵母或病毒颗粒中,从而导致在所述噬菌体、酵母或病毒中,例如,在所述颗粒表面上表达多肽。然后,可以通过添加药用赋形剂例如作为疫苗分离和制备含有所述多肽的噬菌体、酵母或病毒群体。

[0321] 在一些实施方式中,如本文所述的多肽结合至病毒体或病毒样颗粒 (VLP)。病毒体和 VLP 通常含有可选地与磷脂组合或配制的来自病毒的一种或多种蛋白质。它们通常是非病原性、非复制的并且通常不含任何天然病毒基因组。所述病毒蛋白质可以重组产生或从完整病毒中分离。适合在病毒体或 VLP 中使用的病毒蛋白质包括来源于流感病毒 (如 HA 或 NA)、乙型肝炎病毒 (如核或衣壳蛋白质)、戊型肝炎病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、反转录病毒、诺沃克病毒、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA- 噬菌体、Q β - 噬菌体 (如外壳蛋白)、GA- 噬菌体、fr- 噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty (如反转座子 Ty 蛋白 p1) 的蛋白。在例如 Gluck 等人 (2002), Vaccine 20:B10-B16 中进一步讨论了病毒体,将其以其全部内容作为参考并入。

[0322] 在例如 Niikura 等人 (2002), Virology 293:273-280 ;Lenz 等人 (2001), J Immunol 166:5346-5355 ;Pinto 等人 (2003), J Infect Dis 188:327-338 ;Gerber 等人 (2001), Viral 75:4752-4760 ;W003/024480 ;和 W003/024481 中进一步讨论了 VLP, 以上每篇文献以其全部内容作为参考并入。

[0323] 抗体

[0324] 本发明的特征在于结合于本文所述的多肽或结合物的单克隆和多克隆抗体。

[0325] 单克隆抗体

[0326] 可以例如使用 Kohler 等人, Nature, 256:495(1975) 首先描述的杂交瘤方法制备单克隆抗体,或者可以通过重组 DNA 方法 (参见,例如,美国专利号 4,816,567) 制备。在杂交瘤方法中,使用例如本文所述的多肽或结合物使小鼠或其它适合的宿主动物如仓鼠或恒河猴免疫以引起淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或能够产生将特异性结合于用于免疫的多肽或结合物的抗体。可替换地,淋巴细胞可以体外免疫。然后使用适合的融合试剂,如聚乙二醇,将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

[0327] 将因此所制备的杂交瘤细胞接种并在适合的培养基中生长,所述培养基可以含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺少酶次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶 (HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基),所述物质防止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0328] 示例性骨髓瘤细胞是有效融合,支持所选抗体产生细胞稳定、高水平地产生抗体并且对培养基如 HAT 培养基敏感的那些。其中,可以考虑使用的具体的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,如来源于从美国加利福尼亚圣地亚哥的 Salk Institute Cell Distribution Center 可得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些,和从美国模式培养物保藏所 (马纳萨斯, VA, 美国) 可得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。还已描述了用于人单克隆抗体产生的

人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系 (Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984 ;Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0329] 对杂交瘤细胞在其中生长的培养基测定了针对所述抗原的单克隆抗体的产生。可以通过免疫沉淀或通过体外结合测定,如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 确定通过杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0330] 在将杂交瘤细胞识别为产生具有所需特异性、亲合力和 / 或活性的抗体后,可以将克隆通过有限稀释程序亚克隆并通过标准方法生长 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。出于此目的,适合的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水肿瘤体内生长。

[0331] 通过常规免疫球蛋白纯化程序将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水液或血清适当地分离,所述纯化程序如例如蛋白 A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法。

[0332] 使用常规程序 (例如,通过使用能够特异性结合于编码单克隆抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针) 将编码单克隆抗体的 DNA 容易地分离并测序。杂交瘤细胞用作该 DNA 的来源。一旦分离,可以将 DNA 置于表达载体中,然后将所述载体转染到宿主细胞中,如大肠杆菌 (E. coli) 细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不以其他方式产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。以下将更详细地描述抗体的重组产生。

[0333] 在其它实施方式中,可以从使用例如 McCafferty 等人, Nature 348:552-554, 1990 中所述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗体或抗体片段。

[0334] Clackson 等人, Nature 352:624-628, 1991 和 Marks 等人, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991 分别描述了使用噬菌体文库的鼠和人抗体的分离。随后的出版物描述了通过链替换的高亲和力 (nM 范围) 人抗体的产生 (Marks 等人, Bio/Technology, 10:779-783, 1992)) 以及组合感染和体内重组作为用于构建极大噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等人, Nucl. Acids. Res., 21:2265-2266, 1993)。因此,这些技术是用于单克隆抗体分离的常规单克隆抗体杂交瘤技术的可行的替代。

[0335] 还可以例如通过用人重链和轻链恒定域的编码序列代替同源鼠科序列 (美国专利号 4,816,567 ;Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81:6851, 1984), 或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接于免疫球蛋白编码序列来修饰 DNA。

[0336] 通常,用这类非免疫球蛋白多肽取代抗体恒定域,或者用它们取代抗体的一个抗原结合位点的可变域以产生包含对抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同的抗原具有特异性的另一个抗原结合位点的嵌合二价抗体。

[0337] 多克隆抗体

[0338] 通常通过多次注射例如,皮下注射或腹膜内注射相关抗原和佐剂在动物中产生多克隆抗体。在一些情况下,例如,使用如本领域中已知的双官能或衍生化试剂,例如,马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛或琥珀酸酐,将多肽结合至在待免疫物种中是免疫原的蛋白质可以是

有用的,所述蛋白质例如钥孔血蓝素 (KLH)、CRM197、破伤风类毒素、白喉类毒素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂或聚阳离子 (聚-L-赖氨酸或聚-L-精氨酸)。

[0339] 疫苗和含有抗体的药物组合物

[0340] 可以使用熟练技术人员易于获得的标准药物制剂化学和方法制备如本文所述的疫苗和含有抗体的药物组合物 (统称为“组合物”) 的制剂。例如,可以将如本文所述的多肽、结合物或抗体与一种或多种药用赋形剂或媒介物 (载体) 组合。所述赋形剂或媒介物中可以存在助剂物质,如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。这些赋形剂、媒介物和助剂物质是在接受所述组合物的个体中不引起免疫应答并且可以给予且无过度毒性的一般药物试剂。药用赋形剂包括但不限于液体,如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油和乙醇。药用盐还可以包括其中,例如,无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。有关药用赋形剂、媒介物和助剂物质的深入讨论在雷明顿药物科学 (Mack Pub. Co., N. J. 1991) 中是可得。

[0341] 可以以适合于弹丸给药或连续给药的形式制备、包装或销售这些组合物。可以以单位剂量形式,如以包含防腐剂的安瓿瓶或多剂量容器的形式制备、包装或销售可注射组合物。组合物可以包括但不限于混悬液、溶液、油性或水性媒介中的乳液、糊剂和可植入缓释或生物可降解制剂。这些组合物还可以包含一种或多种其它成分,其包括但不限于混悬剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外给药的组合物的一个实施方式中,在复原组合物的肠胃外给药之前,以使用适当媒介物 (例如,无菌、无热原水) 复原的干燥 (例如,粉剂或颗粒剂) 形式提供活性成分。可以以无菌可注射水性或油性混悬液或溶液形式制备、包装或销售组合物。可以根据已知技术配制这种混悬液或溶液,并且除活性成分外,所述混悬液或溶液可以包含其它成分,如本文所述的分散剂、湿润剂或助悬剂。例如,可以使用无毒的肠胃外可用的稀释剂或溶剂,如水或 1,3-丁二醇制备这类无菌可注射制剂。其它可用的稀释剂和溶剂包括但不限于林格氏溶液、等渗氯化钠溶液和不挥发油,如合成单或双甘油酯。

[0342] 有用的其它肠胃外可给予组合物包括包含处于微晶形式、在脂质体制剂中或作为生物可降解聚合物系统的组分的活性成分的那些。用于缓释或植入的组合物可以包含药用聚合物或疏水性材料,如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0343] 可替换地,可以将本文所述的多肽、结合物和抗体包封、吸附至或结合于微粒载体。适合的微粒载体包括来源于聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的那些,和来源于聚 (丙交酯) 和聚 (丙交酯-共聚-乙交酯) 的 PLG 微粒。参见,例如,Jeffery 等人, (1993) Pharm. Res. 10:362-368。还可以使用其它微粒体系和聚合物,例如,聚合物,如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺以及这些分子的结合物。

[0344] 配制的组合物将包含足以引起免疫学反应的量的一种或多种本文所述的多肽或结合物。本领域技术人员可以容易地确定免疫原性量。该量将位于通过常规试验可以确定的相对宽的范围内。使用本领域技术人员所知的方法,所述组合物可以含有约 0.1% 至约 99.9% 的多肽、结合物或抗体,并且可以直接给予受试者,或者可替换地,可以离体递送至来源于受试者的细胞。

[0345] 组合物可以包含如本文所述的不同多肽、结合物或抗体的混合物。例如,疫苗可以包含例如如本文所述的 2、3、4、5、6、7、8 或更多个不同的多肽或结合物,例如,含有或由本文所公开的氨基酸序列组成,或对本文所公开的任一种氨基酸序列的氨基酸序列具有多

至三个取代、缺失或添加的它的变体序列。在一个实施方式中,疫苗包含 8 种不同的多肽,其中所述 8 种多肽的氨基酸序列由本文所公开的氨基酸序列的序列组成。在另一个实施方式中,含有抗体的药物组合物可以包含例如对如本文所述的多肽或结合物具有不同特异性的单克隆或多克隆抗体的混合物。

[0346] 可以在所述组合物例如,疫苗中包含刺激免疫应答的物质例如,佐剂。用作佐剂的化合物的实例包括但不限于铝化合物(例如,明矾、铝胶(Alhydrogel))、油剂、嵌段聚合物、免疫刺激复合物、维生素和矿物质(例如,维生素 E、维生素 A、硒和维生素 B12)、Quil A(皂苷)、细菌和真菌细胞壁组分(例如,脂多糖、脂蛋白和糖蛋白)、激素、细胞因子和共刺激因子。

[0347] 治疗方法

[0348] 本发明的特征在于对哺乳动物接种抵抗念珠菌病的方法,其包括向所述动物给予如本文所述的疫苗,由此对所述哺乳动物接种抵抗念珠菌病的疫苗。另外,本发明的特征在于使哺乳动物对念珠菌病被动免疫的方法,其包括向所述哺乳动物给予有效量的如本文所述的药物组合物,由此使所述哺乳动物对念珠菌病被动免疫。念珠菌病可以包含例如播散性念珠菌病例如,血源性播散性念珠菌病或粘膜念珠菌病。在一些情况下,所述念珠菌病是由例如白色念珠菌、光滑念珠菌、克鲁斯念珠菌、近平滑念珠菌或热带念珠菌引起的。其它念珠菌属包括葡萄牙念珠菌(*Candida lusitanae*)和类星形念珠菌(*Candida stellatoidea*)。

[0349] 另外,可以使用本文所述的组合物和方法例如来使具有发展金黄色葡萄球菌全身感染或者皮肤或软组织感染风险的人接种抗金黄色葡萄球菌。首先,鉴别具有发展金黄色葡萄球菌感染或金黄色葡萄球菌 SSSI 的风险的人。第二,向所述人给予免疫原性量的在添加或不添加佐剂的药用媒介中包含本文所述的多肽的疫苗。例如,向所述人给予 1 至 3 剂量之间的本文所公开的多肽,其每剂量含有 3 至 1000 μg 的所述多肽,并以 2 周至 6 个月的间隔给予多个剂量。

[0350] 预计在疫苗给予后,所述人在持续 1 个月至几年或更长时间的一段时间内发展金黄色葡萄球菌感染或金黄色葡萄球菌 SSSI 的风险降低。

[0351] 同样地,可以通过给予在添加或未添加佐剂的药用媒介中的免疫原性量的包含肽 1 的药物组合物来治疗鉴别为患有金黄色葡萄球菌感染或金黄色葡萄球菌 SSSI 的人。例如,向所述人给予 1 至 3 剂量之间的本文所公开的多肽,其每剂量含有 3 至 1000 μg 的所述多肽,并以 2 周至 6 个月的间隔给予多个剂量。

[0352] 此外,预期在药物组合物给予后,人的金黄色葡萄球菌 SSSI 的严重性降低。

[0353] 可以使用本文所述的组合物和方法例如来使具有发展全身金黄色葡萄球菌感染或甚至是金黄色葡萄球菌皮肤或软组织感染的牛物种接种抗金黄色葡萄球菌的疫苗。具体地,所述牛物种可以具有发展由金黄色葡萄球菌所引起的牛乳腺炎的风险。首先,鉴别具有发展金黄色葡萄球菌 SSSI(例如,牛乳腺炎)的风险的牛物种。例如,可以认为任何产奶的牛具有发展由金黄色葡萄球菌所造成的牛乳腺炎的风险。第二,向所述牛物种给予在添加或不添加佐剂的药用媒介中的免疫原性量的包含本文所公开的多肽中的一种或多种的疫苗。例如,向所述牛物种给予 1 至 3 剂量之间的本文所公开的多肽,其每剂量含有 3 至 1000 μg 的所述多肽,并以 2 周至 6 个月的间隔给予多个剂量。

[0354] 预期在疫苗给予后,所述牛物种发展金黄色葡萄球菌 SSSI(例如,牛乳腺炎)的风险降低。

[0355] 同样地,可以通过给予在添加或未添加佐剂的药用媒介中的免疫原性量的包含本文所公开的一种或多种多肽的药物组合物来治疗鉴别为患有金黄色葡萄球菌 SSSI(例如,牛乳腺炎)的牛物种。例如,向所述牛物种给予 1 至 3 剂量之间的多肽,其每剂量含有 3 至 1000 μg 的所述多肽,并以 2 周至 6 个月的间隔给予多个剂量。

[0356] 预期在给予药物组合物后,牛物种的金黄色葡萄球菌 SSSI(例如,牛乳腺炎)的严重性降低。

[0357] 可以预防性或治疗性地单独或与引起对病原体(例如,病毒、细菌、真菌或寄生虫病原体)、肿瘤或癌症、变应原、自身免疫病症或移植排斥的保护反应的其它本领域已知的组合物结合给予如本文所述的疫苗和含有抗体的药物组合物(统称为“组合物”)。例如,可以同时、分别或顺序地与例如另一种免疫疫苗,如用于例如流感、疟疾、肺结核、天花、麻疹、风疹、病毒性腮腺炎的疫苗或本领域中已知的任何其它疫苗一起给予所述组合物。

[0358] 可以使用多种已知途径和技术将如本文所述的组合物递送至哺乳动物受试者(例如,本文所述的人或其它哺乳动物)。例如,可以作为可注射溶液、混悬液或乳液提供组合物,并使用常规针头和注射器或使用液体喷射注射系统通过肌肉、皮下、皮内、腔内、肠胃外、表皮、动脉、腹膜内或静脉注射给予。还可以将组合物局部(如经鼻、气管内、肠、直肠或阴道)给予皮肤或粘膜组织,或者作为适合于呼吸或肺部给药的细碎喷雾提供。其它给药形式包括口服给药、栓剂和主动或被动经皮递送技术。

[0359] 可以以与剂量制剂相容并且将是预防和/或治疗有效的量将本文所述的组合物给予哺乳动物受试者(例如,本文所述的人或其它哺乳动物)。适当的有效量将落在相对宽的范围内,但是本领域技术人员可以通过常规试验容易地确定。出于确定所需量的目的,“Physicians Desk Reference”和“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics”是有用的。

[0360] 可以通过在单个时间点的单次直接给药或可选地在多个时间点的多次给药来完成预防或治疗。还可以将给予递送至单个或多个位点。本领域技术人员可以调节剂量和浓度以适合特定递送途径。在一个实施方式中,在单个时间给予单次剂量。在替代实施方式中,在相同时间但例如在不同位点将多个剂量给予受试者。在其它实施方式中,在多个时间给予多个剂量。可以分批给予这些多个剂量,即在不同位点、相同时间多次给予,或者可以分别给予,在多个时间的每一个给予一次(可选地在多个位点)。可以使用这些给予方案的任意组合。

[0361] 在一个实施方式中,可以在不同位点或在不同时间作为相同治疗方案的一部分给予本发明不同的组合物。

[0362] 可以在相同时间,在同一天、隔 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天或 6 天,或者隔 1 周、2 周、3 周、4 周或更多周进行不同的给药。在一些情况下,给予为隔 1 至 5 周,例如,隔 2 至 4 周,如隔 2 周、3 周或 4 周。本领域技术人员可以通过常规试验优化特定疫苗或药物组合物的这些多次给予的时间表和时机。

[0363] 剂量

[0364] 根据如制备方法、给药方法、患者年龄、体重和性别、症状严重性、给药时间、给药

途经、排泄率和反应性的因素,本文所述的疫苗或含有抗体的药物组合物的足够剂量是可以改变的。本领域一般技术医师将容易地确定和确诊对治疗有效的给药剂量。

[0365] 根据本领域中已知的方法,使用药用载体和/或赋形剂,本领域技术人员可以将组合物制备成单位剂量或多剂量制剂。

[0366] 载体

[0367] 本发明还提供了含有编码本文所公开的多肽的核酸的载体。适合的表达载体是本领域中熟知的并且包括能够表达操纵性连接于调控序列或元件(如能够调节该核酸的表达的启动子区或增强子区)的核酸的载体。适合的表达载体包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的载体和仍保持游离的载体或整合至宿主细胞基因组中的载体。

[0368] 术语“载体”、“克隆载体”和“表达载体”表示通过其可以将核酸引入到宿主细胞中的载体。载体可以用于增殖或携带核酸或用于编码序列的多肽表达。多种载体在本领域中是已知的并且包括例如质粒、噬菌体和病毒。示例性载体可见于,例如, Sambrook 等人,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual,”第3版, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; 和 Ausubel 等人, “Current Protocols in Molecular Biology,” John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

[0369] 根据调控性质,启动子或增强子可以是组成型的或调控的。调控序列或调控元件操纵性地连接于本发明的核酸,从而使得所述核酸和所述调控序列之间的物理和功能关系允许所述核酸的转录。

[0370] 用于在真核细胞中表达的载体可以包括例如调控元件,其包括 SV40 早期启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)类固醇可诱导启动子、莫洛尼小鼠白血病病毒(MMLV)启动子等。本发明所述的载体对于亚克隆和扩增核酸分子和对于重组表达如本文所公开的多肽是有用的。本发明的载体可以包括例如病毒载体,如噬菌体、杆状病毒或反转录病毒;粘粒或质粒;并且具体对于克隆大核酸分子,细菌人工染色体载体(BAC)和酵母人工染色体载体(YAC)。这些载体是可商购的,并且它们的使用在本领域中是熟知的。本领域技术人员将了解或可以容易地确定用于在具体的宿主细胞中表达的适合的启动子。

[0371] 本发明另外提供了含有本发明的核酸的重组细胞。重组细胞是通过向宿主细胞引入含有核酸分子的载体产生的。将重组细胞转导、转染或以其他方式遗传修饰。可以用于表达重组分子的示例性宿主细胞包括哺乳动物原代细胞;确立的哺乳动物细胞系,如 COS、CHO、HeLa、NIH3T3、HEK293 和 PC12 细胞;两栖动物细胞,如非洲爪蛙胚胎和卵母细胞;和其它脊椎动物细胞。示例性宿主细胞还包括昆虫细胞如果蝇(*Drosophila*),酵母细胞如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母(*Saccharomyces Pombe*)或巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)和原核细胞如大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

[0372] 本发明的实施方式还提供了特异性 Als3 或 Hyr1 多肽或 Als3/Hyr1 多肽,所述多肽可以作为抗原起作用,从而对念珠菌属、革兰氏阴性菌(包括不动杆菌细菌,例如,鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*))和葡萄球菌产生免疫应答。

[0373] 在本发明的一些方面,本发明所述的多肽包括本文所述的氨基酸序列的任一项中所示的基本相同的氨基酸序列。例如,所述氨基酸序列可以与 SEQ ID NO:1-33 中任一个具有至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性。在其它方面,这些多肽是免疫原性的并且能够在受试者中引起抗 Als3 抗体、抗 HYR1 抗体和 Als3/Hyr1

抗体的产生或引起免疫原性应答。

[0374] 如本文所述,本发明所述的多肽可以涵盖与参考氨基酸序列具有至少约 65% 的同一性并且保留了参考氨基酸序列可比的功能和生物活性特征的基本类似的氨基酸序列。在一个方面,具有基本相同的氨基酸序列的多肽将具有至少 50% 或 60% 的同一性、至少 65% 的同一性、至少 70% 的同一性、至少 75% 的同一性、至少 80% 的同一性、至少 85% 的同一性、至少 90% 的同一性、至少 95% 的同一性、至少 98% 的同一性或至少 99% 的同一性。然而,已认识到含有小于所述序列同一性水平的作为拼接变体出现的或者通过保守氨基酸取代或通过简并密码子取代修饰的多肽或编码核酸也涵盖在本发明的范围内。

[0375] 评价

[0376] 下列实施例旨在说明本发明。它们不意味着以任何方式限制本发明。

[0377] 用于评价念珠菌病治疗的方法和材料

[0378] 念珠菌属菌种和生长条件

[0379] 白色念珠菌 (*C. albicans*) 15663、光滑念珠菌 (*C. glabrata*) 31028、近平滑念珠菌 (*C. parapsilosis*) 22019 和热带念珠菌 (*C. tropicalis*) 4243 是从 Harbor-UCLA 医疗中心采集的临床血流分离菌。克鲁斯念珠菌 (*C. krusei*) 91-1159 是 Michael Rinaldi, San Antonio, TX 慷慨提供的。白色念珠菌 CAAH-31 和 THE31 菌株如文献所述。所有测试菌株在 YPD (2% 细菌蛋白胨 (Bacto Peptone)、1% 酵母提取物、2% 葡萄糖) 中常规生长。通过在血球计数器中计数来确定细胞密度。

[0380] 重组多肽和兔多克隆抗体

[0381] 根据标准方法产生重组多肽。为了产生抗体,可以使用标准免疫规程,在单独产生兔抗血清之前纯化所述肽并将其结合至钥孔血蓝素 (keyhole limpet hemocyanin) (KLH)。在被动免疫研究中给予之前,使用 Pierce Protein A 加上琼脂糖 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 亲和纯化混合血清中的总 IgG。

[0382] 免疫规程和动物研究

[0383] 根据标准方法进行所有主动接种。简言之,在第 0 天,使用在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的与作为佐剂的明矾 (2% 铝胶 (Alhydrogel); Brenntag Biosector, Frederikssund, 丹麦) 混合的 30 μ g 多肽皮下接种幼体 (10-12 周) Balb/C 小鼠,在第 21 天用相同剂量加强,然后在第 35 天,通过尾静脉感染。用单独的明矾接种对照小鼠。

[0384] 为了测试疫苗在免疫力受损的小鼠中的效力,在通过第 -2 天腹膜内注射 200mg/kg 环磷酰胺,然后在第 +7 天相对于感染用 100mg/kg 的另一剂量注射以引起中性白细胞减少之前,如上所述接种小鼠。根据标准方法,该方案导致约 10 天的白细胞减少,以及中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞计数减少。对于具有免疫力的小鼠和中性白细胞减少的小鼠,通过对数秩和检验 (Log Rank test) 比较接种疫苗和接种佐剂小鼠之间存活率的差异。

[0385] 对于被动免疫,在用白色念珠菌 (*C. albicans*) 静脉内感染前 2h,向首次接受试验的小鼠腹膜内给予免疫 IgG。对照小鼠给予同种型匹配的 IgG (Innovative Research, USA)。感染后 3 天,重复 IgG 剂量,每天监控两次小鼠的存活率。

[0386] 根据标准方法,定量培养来自待感染有不同念珠菌属的菌种的接种或对照小鼠的肾。简言之,通过尾部静脉感染小鼠。感染后 3 天收获肾、将其匀浆化、在 0.85% 的盐水中

逐次稀释并在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的 YPD 上定量培养。在 37°C 将板培育 24 至 48h 后,对集落计数,并将结果表示为每克感染器官的 log CFU。

[0387] 与真菌负荷实验相伴,每组从两只小鼠无菌除去肾以用于组织病理学检查。将肾浸没在锇福尔马林固定液中直至检查。在梯度酒精溶液中对固定器官脱水,包埋在石蜡中并切成 6 μm 厚的切片。使用 Gomori 六胺银 (methenamine silver) 对固定切片染色并通过光学显微镜检查 (Davis 等人 (2000) *Infect Immun* 68:5953-5959)。

[0388] 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0389] 为了测试多肽是否引起免疫应答,如先前所述,在 96 孔板中通过 ELISA 测定了采集自接种小鼠和对照小鼠的血清样品的抗体滴度 (Ibrahim 等人, (2005) *Infect Immun* 73:999-1005)。使用 5 $\mu\text{g/ml}$ 处于 PBS 中的肽 (例如,肽 2-11 中的一种或多种),以 100 μl /孔涂覆孔。在室温下将小鼠血清培育 1 小时,随后使用含有 3% 牛血清白蛋白的 Tris 缓冲盐水 (TBS; 0.01M Tris HCl [pH 7.4], 0.15M NaCl) 进行阻断步骤。使用含有 0.05% 吐温 20 的 TBS 将孔清洗三次,随后使用 TBS 再清洗三次。以 1:5000 的最终稀释度加入与辣根过氧化物酶结合的山羊抗小鼠二抗 (Sigma),并且在室温下将板进一步培育 1 小时。然后,使用 TBS 清洗孔,并且使用含有 0.1M 柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.0)、50mg 邻苯二胺 (Sigma) 和 10 μl 30% H_2O_2 的底物进行培育。允许显色 30 分钟,之后通过添加 10% H_2SO_4 来终止反应,并且在酶标仪中在 490nm 下测定光密度 (OD)。阴性对照孔仅接收稀释剂,并且从测试孔中减去背景吸光值以得到最终的 OD 读数。将 ELISA 滴度取为最后血清稀释度的倒数,从而得到正 OD 读数 (即,比阴性对照样品的平均 OD 加上 2 个标准偏差更大)。

[0390] F(ab')_2 阻断测定

[0391] 为了研究抗多肽 (例如,本文所述的一种多肽) 抗体介导的保护在巨噬细胞介导的杀死白色念珠菌 (*C. albicans*) 中的机制,使用已分化为嗜中性粒细胞样表型的 HL-60 细胞 (Luo 等人, (2010) *J Infect Dis* 201:1718-1728)。如先前所述,在存在抗肽 IgG 或 F(ab')_2 片段的情况下进行杀伤测定 (Luo (2010) *J Infect Dis* 201:1718-1728)。简言之,在 37°C 使用 5% CO_2 ,用 2.5 μM 视黄酸和 1.3% DMSO 诱导 HL-60 细胞三天。如果需要,将免疫性抗 Als3 或抗 Hyr1 或抗 Als3/Hyr1 多肽血清混合,并使用蛋白质 A 琼脂糖 (Thermo Scientific) 分离总的 IgG。在使用所述多肽进行免疫之前,将从相同兔中采集的血清用作对照血清。根据生产商的说明,使用 Pierce F(ab')_2 制备试剂盒纯化来自免疫或对照 IgG 的 F(ab')_2 片段。使用 SDS-PAGE 分析以显示 >95% 的 Fc 片段被消化。然后,将过表达或抑制 Als3 的白色念珠菌细胞在冰上与 50 $\mu\text{g/ml}$ 接种的或对照 F(ab')_2 片段一起培育 45 分钟。将与 F(ab')_2 片段共培养的白色念珠菌与 HL-60 来源的中性粒细胞一起在 37°C 和 5% CO_2 下培育 1 小时,然后超声处理并在 YPD 板上定量培养。将与 HL-60 来源的中性粒细胞共培养后的 CFU 数除以来自与不含中性粒细胞样细胞的培养基培育的白色念珠菌的 CFU 数来计算杀伤%。

[0392] 统计分析

[0393] 使用非参数对数秩和检验来确定小鼠存活时间的差异。通过曼-惠特尼 U 检验来比较中性粒细胞的杀伤实验、抗体滴度以及组织真菌负荷,以进行未配对比较。使用 Spearman 秩和检验来计算相关性。认为 P 值 <0.05 是显著的。

[0394] 预期结果

[0395] 在本发明中,认为在用白色念珠菌静脉内激发的免疫活性小鼠中显著改善存活并降低真菌负荷的多肽是有用的。类似地,在统计学上保护免疫力受损小鼠不受念珠菌病侵害的多肽在本发明中是有用的。不仅将在以剂量特异性方式接受了靶向本文所公开的多肽的纯化的 IgG 后保护不被真菌感染的小鼠作为治疗念珠菌病的被动免疫策略的有用性的指示,而且还作为用于引起免疫应答的多肽抗原的有用性的指示。同样地,将在用念珠菌属的一些非白色念珠菌种激发的 BALB/c 小鼠中显著降低组织真菌负荷的多肽疫苗认为是在本发明中有用的。

[0396] 用于评价对不动杆菌感染的治疗的方法和材料

[0397] 根据标准方法,例如,使用大肠杆菌表达系统产生了本文所公开的重组多肽。然后,将所述重组多肽用于主动接种小鼠。例如,在第 0 天使用单独的氢氧化铝或混合有氢氧化铝的重组多肽 ($n = 9$) 对小鼠进行免疫,并且在第 21 天进行加强。随后在第 35 天使用鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii*) 对接种的小鼠进行感染。将与对照小鼠相比提供统计学显著的存活的多肽疫苗认为在本发明中是有用的。此外,类似地对接种并感染的小鼠组织中的细菌负荷测量进行检查。通过每克组织的集落形成单位数目所测量的细菌负荷显示,与对照组织样品相比,来自肾、肺和脾的组织分离物具有较低的细菌负荷,这也作为多肽疫苗有用的指示。

[0398] 在另一个工作实施例中,还可以在糖尿病小鼠中测定抗鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 感染的整体被动免疫。在感染前 2 小时,将来自八种不同的多克隆抗体的纯化的 IgG 给予糖尿病小鼠。向糖尿病对照小鼠给予可商购的无关兔 IgG。然后,通过尾静脉注射致死剂量的鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 感染小鼠。将与接受对照 IgG 的小鼠相比,接受单剂量的适当的 IgG 后确定存活显著更长的小鼠(例如,通过对数秩和检验,相对于对照组中为 0%,抗多肽 IgG 中 -80% 的存活率, $p < 0.0001$) 作为多肽抗原有效性的证明。

[0399] 用于评价对葡萄球菌感染的治疗的方法和材料

[0400] 简要地,为了确定本文所述的多肽是否保护以抵抗金黄色葡萄球菌,根据标准方法,在第 0 天,根据方案用弗氏完全佐剂接种雌性 Balb/c 小鼠,然后在第 3 周,给予弗氏不完全佐剂的加强剂量。接种后 2 周,通过尾静脉用致死剂量的二甲氧苯青霉素耐受的并且已知在动物模型中有毒力的金黄色葡萄球菌株 67-0 感染小鼠。将在这些感染的小鼠中介导改善的长期存活的多肽认为在本发明中是有用的。

[0401] 还可以在以下皮肤或软组织感染的鼠科模型中测试多肽。使用铝胶佐剂方案,在整个剂量范围评价多肽接种。平行研究 3、10、30、100 或 300 μg (IM) 剂量。初次接种(第 0 天)后,在研究的第 21 天进行相同的加强接种。加强后 14 天(研究的第 35 天),用金黄色葡萄球菌感染小鼠。对于这些研究,根据 Ding 等人 (*J. Bacteriol.* 2008190:7123-9) 和/或 Voyich 等人 (*J. Infect. Dis.* 2006194:1761-1770) 修改皮下皮肤/软组织脓肿模型。在研究的第 35 天,将小鼠麻醉,侧腹剃毛并消毒,并通过注射 (100 μl) 将 2×10^7 CFU 接种物(无珠或基质)引入至皮下区室。在每个研究中使用最少 20 只小鼠/对照或疫苗方案组。然后,在激发后多至 14 天的研究期间,在每个小鼠的侧腹测量脓肿面积/体积。要进行测量,将小鼠麻醉,并且评价病变位点长度 (l) 和宽度 (w) 以定量脓肿或皮肤坏死面积 (cm^2)。根据用于球形椭圆体的公式: $[v = (\pi/6) \times l \times w^2]$, 计算脓肿体积 (cm^3)。对于定量培养分

析,在感染后预选择的时间,将小鼠人道处死并进行定量脓肿培养。将每个侧面无菌解剖,除去脓肿并准备用于培养。将脓肿单个匀浆,并在无菌 PBS 中连续稀释以用于在羊血琼脂板上定量培养。将培养物培育 (37°C) 24 小时,并且对所得集落计数。对于统计分析,基于动力估计 (power estimates) 比较了实验结果中的差异,表明每组中 16-20 只小鼠获得了 >85% 的动力以检测每克组织或者 2mm 脓肿面积的 CFU 中的 1log 差异 ($\alpha = 0.05$; 曼-惠特尼 U 检验)。根据标准方法定义 P 值。

[0402] 预期结果

[0403] 将在 MRSA 皮肤或软组织测定的鼠科模型中显著降低脓肿面积、体积或 CFU 密度的多肽疫苗认为在本发明中是有用的。这些结果表明在哺乳动物中测试的多肽疫苗作为防止或缓和 MRSA 皮肤感染或脓肿或两者的方式是有用的。

[0404] 使用人 PMBC 的其它评价

[0405] 还使用标准人 PMBC 鉴别了本文所述的有用的多肽抗原。在接种后的多个时间点从使用 AIs3 或 Hyr1 接种的个体中获得 PMBC。将采集的 PMBC 储存在 -80°C,并在使用前融化。

[0406] 对于测定,使用了用抗特异性人细胞因子或趋化因子,例如, IFN- γ 、IL-17A、IL-4 或 GRO 的抗体涂覆的 ELISpot 板。然后,将 PBMC 样品在培养中激活 48h,并以 ~ 200,000 个细胞 / 孔分布在 96 孔 ELISpot 板中。将特异性多肽和 / 或多肽组合加入到三个孔中,并培育 48-96h,然后从每个孔中移除上清液进行分析。使 ELISpot 板显像以显示每个孔的斑点形成单位,其反映了孔中产生所关心的化合物的数或细胞。将相对于未刺激的 PMBC,具有细胞因子或趋化因子产生提高的肽或肽组合认为在本发明中是有用的。

[0407] 其它实施方式

[0408] 在以上说明书中提及的所有专利公开、专利和专利申请由此作为参考并入本文。本发明所述方法的各种改变和变化在不背离本发明的范围和精神的前提下,将对本领域的技术人员来说是显而易见的。尽管已结合特定实施方式对本发明进行说明,但是应该理解所主张的本发明不应过度地限于这些特定的实施方式。的确,对本领域技术人员显而易见的用于实施本发明的所述方式的各种改变在本发明的范围内。

[0409] 其他的实施方式在该权利要求中。