

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/31

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/315 C07K 16/12

C12Q 1/68 G01N 33/53

A61K 39/09

[21] 申请号 00805589.0

[43] 公开日 2002 年 4 月 17 日

[11] 公开号 CN 1345375A

[22] 申请日 2000.3.27 [21] 申请号 00805589.0

[30] 优先权

[32] 1999.3.26 [33] GB [31] 9907114.4

[32] 1999.12.3 [33] GB [31] 9928678.3

[86] 国际申请 PCT/GB00/01167 2000.3.27

[87] 国际公布 WO00/58475 英 2000.10.5

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.26

[71] 申请人 普罗瓦利斯英国有限公司

地址 英国弗林特郡

[72] 发明人 A·W·克利普斯 J·M·吉德

M·乔玛 J·M·威尔斯

P·M·翰斯博罗

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

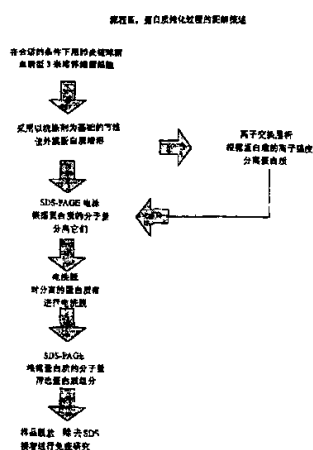
代理人 李 瑛

权利要求书 17 页 说明书 23 页 附图页数 7 页

[54] 发明名称 肺炎链球菌抗原

[57] 摘要

本发明提供了来自肺炎链球菌的各种新颖的抗原及其同系物、衍生物和片段。描述了这些抗原在医学、尤其是在治疗或预防肺炎链球菌感染方面的用途。还描述了抗原在诊断中的用途。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 可得自肺炎链球菌的蛋白质或多肽, 选自:

(i) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 55kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 VEPKAKPADPSVV 的蛋白质或多肽;

(ii) 用 S/PAGE 测定的分子量为 50kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 NDRLVATQSADGRNESVLMSIET 的蛋白质或多肽;

(iii) 用 SDS/PAGE 测定的具有分子量为 85kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 EDTTNSRFGSQFDKYRQPNAEPDHSHTDAVSADNSTAHNRFGYG FAIGSKYIRYD 的蛋白质或多肽;

(iv) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 38kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 DKYRQPNAEPDDHHYAV 的蛋白质或多肽;

(v) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 30kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 DAVSAD 或 SETNVY 的蛋白质或多肽;

(vi) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 32kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 DKVDGLSAKPDILKP 的蛋白质或多肽;

(vii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 43kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 ELKEEG (W) VVK 的蛋白质或多肽;

(viii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 100kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 EVHA 的蛋白质或多肽;

(ix) 用 SDS/PAGE 测定的分子量<14kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 MKLNEVKEFVKELRAET 的蛋白质或多肽;

(x) 用 SDS/PAGE 测定的分子量<14kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 AKYEILYIERPNIEEFAK 的蛋白质或多肽;

(xi) 用 SDS/PAGE 测定的分子量<14kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 I(R)LTRM(E)GGKKKP(K)FYY 的蛋白质或多肽;

(xii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 16kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 VMTDPIADXLXRI 的蛋白质或多肽;

(xiii) SDS/PAGE 测定的分子量为 27.5kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 (VA)(KE)LVFARHGE(LT)E(NK) 的蛋白质或多肽;

(xiv) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 44kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 IITDVYAREVLDSRGNPTL 的蛋白质或多肽;

(xv) 在还原条件下, 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 12-14kDa, 并且所具有的氨基末端序列如下的蛋白质或多肽:

A L N I E N I I A E I K I A S
Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Ile Ala Ser

(xvi) 为上述 (xv) 中所定义的蛋白质的还原毒性变体或片段;

(xvii) 在还原条件下, 用 SDS/PAGE 测定的分子量约为 16kDa 的蛋白质或多肽; 或者

(xviii) 在还原条件下, 用 SDS/PAGE 测定的分子量约为 57kDa, 并且具有下列氨基末端序列:

R I I K F V Y A K
Arg Ile Ile Lys Phe Val Tyr Ala Lys .

2. 权利要求 1 中所定义的蛋白质或多肽, 其以基本上纯的形式存在。

3. 权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽的同系物或衍生物。

4. 权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽的或权利要求 3 中所定义的同系物或衍生物的一或多个抗原性片段。

5. 包含下列序列或由下列序列组成的核酸分子:

(i) 编码权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽的 DNA 序列或它们的 RNA 等价物;

(ii) 与 (i) 序列中的任意一个互补的序列;

(iii) 基本上具有与 (i) 和 (ii) 序列中的任意一个同一性的序列;

(iv) 编码权利要求 1-4 任意一项中所定义的蛋白质或多肽的同系物、衍生物或片段的序列。

6. 包含权利要求 5 中所定义的核酸分子的载体。
7. 包含权利要求 6 中所定义的载体的宿主细胞。
8. 权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽，或权利要求 3 中所定义的同系物或衍生物在药物方面的用途。
9. 含有一或多种权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽，或它们的同系物或衍生物，和/或任何这些物质的片段的免疫原性/ 抗原性组合物。
10. 权利要求 9 中所定义的组合物，该组合物为疫苗或可用于诊断测定。
11. 包含一或多种权利要求 5 中所定义的核酸分子的疫苗。
12. 针对权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽、权利要求 3 中所定义的同系物或衍生物或权利要求 4 中所述片段而产生的和/或可与之结合的抗体。
13. 检测/诊断肺炎链球菌的方法，其包括使待测样品与至少一种权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽、权利要求 3 中所定义的同系物或衍生物或权利要求 4 中所定义的片段进行接触的步骤。
14. 检测/诊断肺炎链球菌的方法，其包括使待测样品与一或多种能够与一或多种权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽、权利要求 3 中所定义的同系物或衍生物或权利要求 4 中所定义的片段结合的抗体进行接触的步骤。
15. 检测/诊断肺炎链球菌的方法，其包括使待测样品与至少一种权利要求 5 中的核酸分子进行接触的步骤。
16. 给实验对象接种以抵抗肺炎链球菌的方法，其包括给予实验对象权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽、权利要求 3 中所定义的衍生物或同系物、权利要求 4 中所定义的片段，或权利要求 9 或 10 中所定义的免疫原性组合物的步骤。
17. 实验给对象接种以抵抗肺炎链球菌的方法，其包括给予对象权利要求 5 中所定义的核酸分子的步骤。
18. 预防或治疗肺炎链球菌感染的方法，其包括给予实验对象权

权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽、权利要求 3 中所定义的衍生物或同系物、权利要求 4 中所定义的片段，或权利要求 9 或 10 中所定义的免疫原性组合物的步骤。

19. 预防或治疗肺炎链球菌感染的方法，其包括给予实验对象权利要求 5 中所定义的核酸分子的步骤。

20. 用于检测/诊断肺炎链球菌感染的试剂盒，其包括一或多种权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽、权利要求 3 中所定义的同系物或衍生物、权利要求 4 中所定义的片段，或权利要求 9 或 10 中所定义的抗原性组合物。

21. 用于检测/诊断肺炎链球菌感染的试剂盒，其包括一或多种权利要求 5 中所定义的核酸分子。

22. 测定权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽是否代表潜在的抗微生物靶的方法，其包括使所述的蛋白质或多肽失活，并在体外或体内测定肺炎链球菌是否依然存活。

23. 能够拮抗、抑制或干扰权利要求 1 或 2 中所定义的蛋白质或多肽的功能或表达的药剂在制备用于治疗或预防肺炎链球菌感染的药物中的用途。

24. 制备分离和纯化的蛋白质的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 制备肺炎链球菌培养物，使培养物在合适的条件下生长并采集，接着在离心下洗涤，得到洗涤过的细胞小丸；

(b) 将洗涤过细胞再悬浮于合适的缓冲液中，接着使细胞破裂；

(c) 离心除去细胞碎屑并获得含有可溶性细胞蛋白质的上清液；

(d) 使得到的溶液以氯化钠作为梯度洗脱液进行阴离子交换层析，合并相应于每一个峰的组分；

(e) 将蛋白质组分悬浮于含有 0.5M Tris HCl pH 6.8; 10% (v/v) 甘油; 10% (w/v) SDS; 0.05% (w/v) 溴苯酚蓝; 以及 0.05% (v/v) β -巯基乙醇的缓冲液中; 将混合物煮沸, 然后利用 SDS-PAGE, 采用带有 4% (w/v) 丙烯酰胺/BIS 层积凝胶的 12% (w/v) 丙烯酰胺/BIS 分离凝胶进行纯化, 在 16mA 下在层积凝胶中和在 24mA 下在拆解凝

胶进行试验;

(f) 选择含有分子量为 12-14 kDa, 16 kDa, 34 kDa 或 57 kDa 的蛋白质的组分, 并从选择的组分中分离蛋白质。

肺炎链球菌抗原

本发明涉及衍生自肺炎链球菌的蛋白质、编码这些蛋白质的核酸分子、核酸和/或蛋白质作为抗原/免疫原及在检测/诊断中的用途，以及筛选蛋白质/核酸序列作为潜在抗微生物靶的方法。

在世界范围内呼吸道疾病仍然是引起发病和死亡的主要原因。肺炎链球菌是呼吸道的主要致病菌。由此致病菌引起的感染包括中耳炎、下呼吸道感染、菌血症以及脑膜炎。

肺炎链球菌，通常又称为肺炎球菌，是一种重要的致病生物体。已经有人对在发展中国家和发达国家中与人类疾病有关的肺炎链球菌感染的持续重要性进行了权威性的综述（Fiber, G.R. Science, 265: 1385-1387 (1994)）。该报告指出，在全球范围内，这种生物体被认为是急性呼吸道感染最常见的细菌性原因，估计每年可以导致一百万儿童死亡，主要是在发展中国家（Stansfield, S.K., Pediatr. Infect. Dis., 6: 622 (1987)）。在美国，有人提出（Breiman 等人, Arch. Intern. Med. 150: 1401 (1990)）肺炎球菌仍然是细菌性肺炎最常见的原因，该疾病在幼童、老人、和患有易感染疾病（例如无脾、心脏病、肺病以及肾病、糖尿病、酒精中毒或具有免疫抑制失调性疾病（尤其是 AIDS））的患者中发病率特别高。这些人群组具有肺炎球菌败血症并因此具有脑膜炎的高发危险性，因此更容易死于肺炎球菌感染。这些肺炎球菌还可以导致中耳炎和鼻窦炎，其仍为发展中国家儿童中的流行性感染，并带来很大的费用。

由于新近出现了抗青霉素的肺炎球菌使得对肺炎球菌感染的有效预防战略的需要变得突出。据报道，已发现在美国 12 个洲的 13 所医院中得到的肺炎球菌的分离物中有 6.6% 对青霉素具有抗性，有一些分离物还对其它抗菌素具有抗性，包括第三代的环孢菌素（Schappert, S.M., Vital and Health Statistics of the Centres for Disease

Control/National Centre for health Statistics,214:1(1992))。在一些医院中,青霉素抗性比率较高(高达 20%)(Breiman 等人, J .Am .Med. Assoc., 271: 1831 (1994))。由于肺炎球菌中产生青霉素抗性的情况是新近的而且很突然,其出现于一直用青霉素进行有效治疗的数十年之后,所以在这些发现被视为一种警示。

由这些致病菌引起的疾病的负担是很明显的,并对国家的健康预算有重大影响。尽管有针对于肺炎链球菌的疫苗,但这种疫苗对 2 岁以下的儿童不是十分有效。目前的治疗依赖于感染的抗菌素治疗。许多患有因肺炎链球菌引起感染的人群生活在发展中国家,那里的一些社区仅有非常有限的获得适当药物治疗的手段。因此,不可能得到抗菌素治疗。在可以获得抗菌素的发达国家,已经明显出现了这些细菌对抗菌素具有抗性的情况。

因此,开发抗肺炎链球菌的有效疫苗是人们期望的目标。特别地,期望开发出能够用于幼童的疫苗。

采取了各种方法以便提供用于预防肺炎球菌感染的疫苗。出现了一些困难,例如就基于围绕在有机体周围的多糖荚膜结构的各种血清型(至少 90 种)而言。能抵抗单个血清型的疫苗无法有效地抵抗其它血清型,这意味着疫苗必须包括来自全部血清型的多糖抗原,以便对大多数病症有效。由于已经发现当被纯化和用作疫苗时,荚膜多糖(其中的每一个决定血清型并作为主要的保护性抗原)对 2 岁以下的幼童不能可靠地诱导保护性抗体反应,而侵入性肺炎球菌感染和脑膜炎在该年龄组中的发病率最高,所以产生了另外一个问题。

对采用荚膜抗原的方法的修饰依赖于多糖与蛋白质的缀合,以便诱导增强的免疫反应,特别是通过给出反应 T-细胞依赖特性。例如该方法已经被用于开发抗流感嗜血菌疫苗。然而,这需要有关于复合多糖疫苗及基于缀合物的那些疫苗的费用支出。

第三个方法是寻找具有作为疫苗候选者潜力的其它抗原组分。这是本发明的基础。我们现已鉴定了一些来自肺炎链球菌的抗原性和免疫原性的蛋白质。

因此在本发明的第一个方面中提供了可得自肺炎链球菌的蛋白质或多肽，它们选自：

(i) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 55kDa，并且所具有的 N-末端序列为 VEPKAKPADPSVV 的蛋白质或多肽；

(ii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 50kDa，并且所具有的 N-末端序列为 NDRLVATQSADGRNESVLMSIET 的蛋白质或多肽；

(iii) 用 SDS/PAGE 测定的具有分子量为 85kDa，并且所具有的 N-末端序列为 EDTTNSRFGSQFDKYRQPNAEPDHSHTDAVSADNSTAHNRFGYG FAIGSKYIRYD 的蛋白质或多肽；

(iv) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 38kDa，并且所具有的 N-末端序列为 DKYRQPNAEPDDHHYAV 的蛋白质或多肽；

(v) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 30kDa，并且所具有的 N-末端序列为 DAVSAD 或 SETNVY 的蛋白质或多肽；

(vi) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 32kDa，并且所具有的 N-末端序列为 DKVDGLSAKPDILKP 的蛋白质或多肽；

(vii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 43kDa，并且所具有的 N-末端序列为 ELKEEG (W) VVK 的蛋白质或多肽；

(viii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 100kDa，并且所具有的 N-末端序列为 EVHA 的蛋白质或多肽；

(ix) 用 SDS/PAGE 测定的分子量<14kDa，并且所具有的 N-末端序列为 MKLNEVKEFVKELRAET 的蛋白质或多肽；

(x) 用 SDS/PAGE 测定的分子量<14kDa，并且所具有的 N-末端为 AKYEILYIERPNIEEFAK 的蛋白质或多肽；

(xi) 用 SDS/PAGE 测定的分子量<14kDa，并且所具有的 N-末端序列为 I(R)LTRM(E)GGKKKP(K)FYY 的蛋白质或多肽；

(xii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 16kDa，并且所具有的 N-末端序列为 VMTDPIADXLXRI 的蛋白质或多肽；

(xiii) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 27.5kDa，并且所具有的

N-末端序列为(VA)(KE)LVFARHGE(LT)E(NK)的蛋白质或多肽;

(xiv) 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 44kDa, 并且所具有的 N-末端序列为 IITDVYAREVLDSRGNPTL 的蛋白质或多肽;

(xv) 在还原条件下, 用 SDS/PAGE 测定的分子量为 12-14kDa, 并且所具有的氨基末端序列如下的蛋白质或多肽

A L N I E N I I A E I K I A S

Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Ile Ala Ser

(xvi) 为上述 (xv) 中所定义的蛋白质的还原毒性变体或片段;

(xvii) 在还原条件下, 用 SDS/PAGE 测定的分子量约为 16kDa 的蛋白质或多肽; 或者

(xviii) 在还原条件下, 用 SDS/PAGE 测定的分子量约为 57kDa, 并且具有下列氨基末端序列:

R I I K F V Y A K

Arg Ile Ile Lys Phe Val Tyr Ala Lys.

本发明中的蛋白质或多肽可以基本上纯的形式提供。例如, 其可以基本上不含其它蛋白质的形式提供。关于上面引用的分子量, 技术人员将会意识到用不同的人手或甚至用同样的人手在不同的场合会得到有细微差别的结果, 因此, 这里所引用的分子量数字应理解为有 $\pm 5\%$ 或甚至 $\pm 10\%$ 的波动。

正如这里所讨论的, 本发明蛋白质和/或多肽可用作抗原物质。这类物质可以是“抗原性”和/或“免疫原性”的。通常, “抗原性”是指蛋白质或多肽能够用来产生抗体或确实能够诱导实验对象的抗体反应。“免疫原性”是指蛋白质或多肽能够引发实验对象体内的保护性免疫反应。因此在后一种情况下, 蛋白质或多肽不仅可能能够产生抗体反应, 另外还能产生非抗体基础的免疫反应。

技术人员将会意识到本发明中的蛋白质或多肽的同系物或衍生物也将在本发明的上下文中找到用途, 即作为抗原性/免疫原性物质。

因此，包括一或多个添加、缺乏、取代等处理的蛋白质或多肽均包括在本发明的范围内。另外，可以用另一个相似“类型”的氨基酸取代一个氨基酸。例如用另一个氨基酸取代一个疏水性的氨基酸。人们可以利用程序（例如 CLUSTAL 程序）来比较氨基酸序列。该程序可比较氨基酸序列，并且在适当处通过在任一序列中插入间隔来发现最适顺序。可以计算最适顺序的氨基酸同一性或相似性（氨基酸类型的同一性加保守性）。类似 BLASTx 的程序将对比相似序列的最长的一段，并给该配合指定一个值。因此，有可能获得一个比较，在其中发现有几个区域是相似的，每一个具有不同的分值。这两种类型的分析本发明均予以关注。

在同系物和衍生物的情况下，与这里所述的蛋白质或多肽的同一性程度比起同系物或衍生物应该保留其对肺炎链球菌的抗原性或免疫性来说重要性要小得多。然而，适宜地是提供与这里所述的蛋白质或多肽具有至少 60% 相似性的同系物或衍生物（正如这里所讨论的）。优选的是，提供具有至少 70% 的相似性、更优选的是至少 80% 的相似性的同系物或衍生物，最优选的是，提供具有至少 90% 或甚至 95% 的相似性的同系物或衍生物。

在另一个方法中，同系物或衍生物可以是混入使纯化更为容易的组成成分的融合蛋白质，例如通过有效地标记需要的蛋白质或多肽。除去“标记”可能是必要的或也可以是这种情况：融合蛋白质本身保持足够可用的抗原性。

在本发明的另一个方面中，其提供了本发明蛋白质或多肽或其同系物或衍生物的抗原性片段。

对于这里所述的蛋白质或多肽或其同系物或衍生物的片段来说，情况稍有不同。已知可以筛选抗原性蛋白质或多肽来鉴定表位区域，即那些对蛋白质或多肽的抗原性或免疫性负有责任的区域。进行这类筛选的方法在本领域内是已知的。因此，本发明的片段应包括一或多个这样的表位区域或与这些区域足够相似以保留它们的抗原性/免疫性性质。因此，对于本发明的片段来说，同一性的程度可能是无关

的，因为它们可与这里所述的蛋白质或多肽、同系物或衍生物的特定部分达到 100% 的同一性。再一次地，关键的问题是该片段保留它们的抗原性/免疫原性。

因此，对于同系物、衍生物和片段来说，重要的是它们至少具有一定程度的蛋白质或多肽（它们从中衍生而来）的抗原性/免疫原性。

通过提取可以从肺炎链球菌中获得蛋白质，因此，在本发明的另一方面中，提供了一种制备分离的和纯化的蛋白质的方法，该方法包括以下步骤：

（a）制备肺炎链球菌培养物，使培养物在合适的条件下生长并采集，接着用离心洗涤，得到洗涤过的细胞小丸；

（b）将洗涤过细胞再悬浮于合适的缓冲液中，接着使细胞破裂；

（c）离心除去细胞碎屑并获得含有可溶性细胞蛋白质的上清液；

（d）使得到的溶液以氯化钠作为梯度洗脱液进行阴离子交换层析，合并相应于每一个峰的组分；

（e）将蛋白质组分悬浮于含有 0.5M Tris HCl pH 6.8；10%（v/v）甘油；10%（w/v）SDS；0.05%（w/v）溴苯酚蓝；以及 0.05%（v/v） β -巯基乙醇的缓冲液中；将混合物煮沸，然后利用 SDS-PAGE，采用带有 4%（w/v）丙烯酰胺/BIS 层积凝胶的 12%（w/v）丙烯酰胺/BIS 分离凝胶进行纯化，在 16mA 下在层积凝胶中和 24mA 下在拆解凝胶中进行试验；

（f）选择含有分子量为 12-14 kDa，16 kDa，34 kDa 或 57 kDa 的蛋白质的组分，并从选择的组分中分离蛋白质。

另外，可以采用基因克隆技术来提供本发明的基本上纯化形式的蛋白质。例如在 J. Sambrook 等人，Molecular Cloning 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）中公开了这些技术。因此，在这里公开的蛋白质的 N-末端序列可以反过来用作探针的基础，来分离编码单个蛋白质的基因。因此，本发明的另一个方面是提供了包含或由下列序列组成的核酸分子：

- (i) 编码这里所述蛋白质或多肽的 DNA 序列或它们的 RNA 等价物;
- (ii) 与 (i) 序列中的任意一个互补的序列;
- (iii) 基本上具有与 (i) 和 (ii) 序列中的任意一个同一性的序列;
- (iv) 编码这里所述的蛋白质的同系物、衍生物或片段的序列。

本发明的核酸分子可以包括众多的这类序列和/或片段。技术人员会意识到本发明可以包括在此举例说明的那些特定的新颖核酸分子的新颖变体。本发明包括这类变体。这些变体可以是天然存在的，例如由于菌株变化。例如，包括添加、取代和/或缺失。另外且特别是当利用微生物表达系统时，人们可以寄希望于在用来表达的特定的有机体中，利用已知的优选的密码子选择来人工改造核酸序列。因此，本发明也包括合成或非天然存在的变体。

上述使用的术语“RNA 等价物”是指给定的 RNA 分子具有与给定的 DNA 分子的序列互补的序列（考虑这样一个事实，即 RNA 中的“U”取代了遗传密码中的“T”。

当为了测定同源性或同一性的程度而进行核酸序列比较时，可以采用 BESTFIT 和 GAP 等程序（两者均来自 Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) 软件包）。例如 BESTFIT 可比较两个序列并产生最相似区段的最适顺序。GAP 可使序列沿着它们的整个长度排列，并通过在任一序列的适当位置插入间隔发现最适顺序。适宜地，在本发明的上下文中，当讨论核酸序列的同一性时，通过使序列沿着它们的整个长度排列进行比较。

优选地，具有实质同一性的序列与所述序列具有至少 50% 序列同一性、期望的是至少 75% 序列同一性、更需要的是至少 90% 或至少 95% 的序列同一性。在一些情况下，序列同一性可为 99% 或更高。

期望地，术语“实质同一性”是指，与现有技术的核酸序列相比，所述的序列与这里所述的任何序列具有更大程度的同一性。

然而，应该注意到，本发明的核酸序列为新颖基因产物的至少一部分进行编码，因此本发明包括所有可能为基因产物或为其新颖部分进行编码的序列。

核酸分子可以为分离或重组的形式。其可以混入载体中，并且该载体可以混入宿主中。这类载体和合适的宿主构成了本发明进一步的方面。

因此，例如，利用在这里所述的 N-终端氨基酸基础上设计的探针，可以鉴定肺炎链球菌中的基因。然后利用限制酶将它们切除，并克隆到载体中。可将载体引入合适的宿主中进行表达。

通过使用合适的与核酸分子序列的一部分互补的探针，可以从肺炎链球菌中获得本发明的核酸分子。可以采用限制酶或声处理技术来获得用于探测的合适大小的片段。

另外，可以利用 PCR 技术来扩增需要的核酸序列。因此，这里提供的序列数据可用来设计两个用于 PCR 的引物，以便能够靶向需要的序列（包括其整个基因或片段），然后以较高的程度进行扩增。一般情况下，一个引物将对位于 DNA 分子一条链上的第一个序列显示出高度的特异性，而另一个引物将对位于 DNA 序列互补链上的第二个序列显示出高度的特异性，并且与第一个序列的互补序列隔开。

典型的引物具有至少 15-25 个核苷酸长度。

作为另外的方案，可以采用化学合成。这种方法可以是自动化的。可以通过化学方法合成相对短的序列，然后连接起来提供一个较长序列。

正如这里所讨论的，本发明人还发现 12-14kDa 的蛋白质是一种毒素，如果通过修饰降低其毒性，有可能提供高度有效验的疫苗。确定蛋白质毒性部分的战略包括连续截短的片段或突变体的制备。

正如这里所讨论的，发现本发明的蛋白质以及其片段和同系物可以用作免疫原。因此，在另一个方面中，本发明提供了本发明蛋白质、其同系物和/或其片段在药物方面的用途，尤其是在肺炎链球菌感染的预防和/或治疗方面的用途。

在进一步的方面中，本发明提供了一种免疫原性/抗原性组合物，该组合物包含一或多种这里所述的蛋白质或多肽、或它们的同系物或衍生物，和/或任何这些物质的片段。在优选的实施方案中，免疫原性/抗原性组合物为一种疫苗或可用于诊断测定。

疫苗组合物还可以包含佐剂。本领域内熟知的佐剂的实例包括无机凝胶，例如氢氧化铝或油包水乳剂，例如弗氏不完全佐剂。其它有用的佐剂对于本领域内的专门人员来说是熟知的。

蛋白质可经各种途径进行给药，包括肠道给药，例如口服、鼻腔、颊、局部或肛门等途径，或非肠道给药，例如静脉、皮下、肌肉或腹膜内等途径。

当然，组合物所采用的剂型以及其所含有的赋形剂取决于选择的给药途径。例如，口服制剂可以为糖浆剂、酏剂、片剂或胶囊剂形式，其可以用肠衣包裹以使蛋白质免受在胃中的降解。鼻腔或透皮制剂通常分别为喷雾剂或贴片形式。注射制剂可以是溶于蒸馏水或其它药物上可接受的溶剂或悬浮剂中的溶液或悬浮液。

给予患者的本发明蛋白质合适的剂量将由医生来决定。然而，作为一种指导，合适的剂量可为约 0.5-20mg/kg 体重。在大多数情况下，预计剂量约为 1-15mg/kg 体重，优选的是 1-10mg/kg 体重。因此对于一个体重约 70kg 的男性来说，典型的剂量约为 70-700mg。

还可以利用这里所述的核酸序列来制备所谓的 DNA 疫苗。因此，本发明还提供了包含一或多种这里所定义的核酸序列的疫苗组合物。本领域内有关于这种 DNA 疫苗用途的描述。例如，可以参见 Donnelly 等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 15: 617-648 (1997)。

正如这里已经讨论的，这里所述的蛋白质或多肽、它们的同系物或衍生物，和/或任何这些物质的片段可以用于肺炎链球菌的检测/诊断方法中。这种方法可基于对抵抗可能存在于检测对象体内的这种蛋白质的抗体的检测。因此，本发明提供了检测/诊断肺炎链球菌的方法，该方法包括使受试样品与至少一种这里所定义的蛋白质、或它们的同系物、衍生物或片段进行接触的步骤。适宜地，样品为生物样品，例

如得自受试对象的组织样品或者血液或唾液样品。

在另一个方法中，可用这里所定义的蛋白质、或它们的同系物、衍生物和/或片段来产生抗体，该抗体反过来可用来检测抗原，如肺炎链球菌。这类抗体构成了本发明的另一个方面。包括在本发明范围内的抗体可以是单克隆的也可以是多克隆的。

当将这里所定义的蛋白质、或其同系物、衍生物或片段注射到动物体内时，在合适的动物宿主（例如小鼠、大鼠、荷兰猪、兔子、绵羊、山羊或猴子）中通过刺激它们的生成可以产生多克隆抗体。如有需要，可与蛋白质一起给予佐剂。熟知的佐剂包括弗氏佐剂（完全的和不完全的）以及氢氧化铝。借助该抗体与这里所述蛋白质的结合可以对其进行纯化。

从杂交瘤可以生产单克隆抗体。通过将能产生需要抗体的骨髓瘤细胞和脾细胞融合在一起以便形成无限增殖的细胞系可以形成这些抗体。因此，可以采用熟知的 Kohler & Milstein 技术(Nature 256(1975)) 或基于此技术其随后的变化形式。

用于生产与特定多肽/蛋白质结合的单克隆和多克隆抗体的技术在本领域中已经得到了充分的发展。在标准的免疫学教科书中有所讨论，例如 Roitt 等人，Immunology 第二版（1989），Churchill Livingstone, London.

除了整个的抗体之外，本发明还包括能够与这里所述的蛋白质等结合的抗体衍生物。因此，本发明包括抗体片段和合成构建物。Dougall 等人在 Tibtech 12 372-379(1994 年 9 月) 中给出了抗体片段和合成构建物的实例。

例如，抗体片段包括 Fab, $F(ab')_2$ 和 Fv 片段。Fab 片段（在 Roitt 等人[上文]中讨论了这些片段）。可以修饰 Fv 片段来生成已知为单链 Fv (scFv) 分子的合成的构建物。其包括与 V_h 和 V_l 区域共价结合的肽接头，它们有助于分子的稳定性。其它可用的合成构建物包括 CDR 肽。这些是包含抗原结合决定簇的合成肽。也可以采用肽模拟物。这些分子通常是构象受限的有机环，其模仿 CDR 环结构并且包括

抗原相互作用的侧链。

合成构建物包括嵌合分子。因此，例如，人源化（或灵长类化）抗体或其衍生物也在本发明的范围之内。人源化抗体的实例为具有人类构架区、但啮齿动物高变区的抗体。例如 Morrison 等人在 PNAS, 81, 6851-6855 (1984) 及 Takeda 等人在 Nature. 314, 452-454 (1985) 中讨论了生产嵌合抗体的方式。

合成构建物还包括含有附加的部分，该部分可以提供除了抗原结合之外具有一些期望性质的分子。例如该部分可以是一种标记（例如荧光或放射标记）。另外，其可为一种药物活性剂。

发现抗体或其衍生物在肺炎链球菌的检测/诊断上是有用。因此，本发明的另一个方面提供了检测/诊断肺炎链球菌的方法，其包括使待测样品与能够与一或多种这里所述的蛋白质或多肽、或其同系物、衍生物和/或片段结合的抗体进行接触的步骤。

另外，可以利用所谓的“亲和体”。它们是结合蛋白，选自 α -螺旋细菌受体结构域的组合文库（Nord 等人）。因此，可利用组合方法来选择能够与不同靶蛋白特异性结合的小蛋白质结构域。

还将清楚地看到，这里所述的核酸序列可用来检测/诊断肺炎链球菌。因此，再一方面本发明提供了检测/诊断肺炎链球菌的方法，其包括使受试样品与至少一种这里所述的核酸序列进行接触的步骤。适宜地，样品为生物样品，例如得自受试对象的组织样品或者血液或唾液样品。这些样品在用于本发明方法之前可以进行预处理。因此，例如，可以处理样品提取 DNA，然后可用基于这里所述的核酸序列的 DNA 探针检测来自肺炎链球菌的核酸。

在另外的方面中，本发明提供了：

（a）给受试对象接种以抵抗肺炎链球菌的方法，其包括给予受试对象本发明中的蛋白质或多肽、或其衍生物、同系物或片段，或免疫原性组合物的步骤。

（b）给受试对象接种以抵抗肺炎链球菌的方法，其包括给予受

试对象这里所定义的核酸分子的步骤。

(c) 预防或治疗肺炎链球菌感染的方法，其包括给予受试对象本发明中的蛋白质或多肽、或其衍生物、同系物或片段，或免疫原性组合物的步骤。

(d) 预防或治疗肺炎链球菌感染的方法，其包括给予受试对象这里所定义的核酸分子的步骤。

(e) 用于检测/诊断肺炎链球菌感染的试剂盒，其包括一或多种本发明蛋白质或多肽，或其同系物、衍生物或片段，或本发明抗原性组合物，以及

(f) 用于检测/诊断肺炎链球菌感染的试剂盒，其包括一或多种这里所定义的核酸分子。

假设我们鉴定了一组重要的蛋白质，这类蛋白质是用于抗微生物治疗的潜在的靶。然而，必要的是，测定是否每一种蛋白质对于有机体的存活来说都是必需的。因此，本发明还提供了一种测定这里所述的蛋白质或多肽是否代表潜在的抗微生物靶（其包含失活的所述蛋白质或多肽）以及测定在体外或体内肺炎链球菌是否依然存活的方法。

合适的用于使蛋白质失活的方法是进行选择的基因剔除，即防止蛋白质表达并测定这是否导致致死性变化。Li 等人在 P.N.A.S., 94: 13251-13256 中描述了进行这类基因剔除的适宜方法。

本发明的最后一个方面提供了能够拮抗、抑制或干扰本发明蛋白质或多肽的功能或表达的药剂在制备用于治疗或预防肺炎链球菌感染的药物中的用途。

通过下列实施例将进一步描述本发明，这些实施例不应以任何方式限制本发明的范围。

实施例提到下列附图，其中：

图 1：显示了从细胞壁物质中提取的蛋白质的 12% SDS PAGE 凝胶的照片，所述的细胞壁物质用 1M 的 1. 乙酸铵溶液、2. 氯化铵溶液、3. 三甲基氯化铵溶液或 4.Tris-HCl (pH6.8) 溶液进行过处理。

图 2：用本发明中所用的蛋白质纯化过程的图解概述来表示的流程图。

图 3：肺炎链球菌细胞壁提取物的电洗脱分布图，用 SDS-PAGE 进行分析。

泳道 1：用 SDS-PAGE 分离的粗品提取物的考马斯染色；

泳道 3：分子量标准

泳道 2 以及 4-11：通过电洗脱回收的蛋白质。

图 4：阴离子交换层析的分布图。

图 5：显示了分子量为 14、16、34 以及 57kDa 的纯化肺炎链球菌蛋白质。

图 6：是显示在用 16kDa 的肺炎链球菌蛋白质接种后的肺清除的直方图。

图 7：是显示在用 34kDa 的肺炎链球菌蛋白质接种后的肺清除的直方图。

图 8：是显示在用 57kDa 的肺炎链球菌蛋白质接种后的肺清除的直方图。

实施例 1

从肺炎链球菌菌株中分离抗原性或免疫原性蛋白质

从肺炎链球菌 NCTC 7466 (血清型 2) 的胞外被膜中分离出这里所鉴定的蛋白质。在不振摇的情况下，于 37℃ 下，使该菌株在含有 10% 马血以及 0.5% 葡萄糖的 Bacto Tryptic Soy Broth 中生长过夜至静止期。然后，将 10ml 过夜培养物接种到 500ml 含有 0.5% 葡萄糖但不含血的细菌培养用胰酪大豆肉汤 (Bacto Tryptic Soy Broth) 中，并且在不振摇的情况下，于 37℃ 下培养过夜。通过 3000rpm (1100g) 下离

心 25min 回收完整的细胞然后再悬浮于 40ml 50mM 的 Tris 马来酸盐 pH6.8 中，向其中加入蛋白酶抑制剂。将压力设置在 40Kpsi，在 Constant Systems 细胞破裂器（型号为 22/40/AA/AA）中使细菌破裂。在 4℃ 下用 2600rpm（1100g）的转速将细胞的匀浆离心 10min，除去完整的细胞。然后在 4℃、15,000rpm（27000g）的转速下离心上清液使细菌细胞壁成小丸。然后通过离心作用将细胞小丸在 10ml 含有蛋白酶抑制剂的 50mM 的 Tris 马来酸盐 pH6.8 中洗涤两次。最后使细胞小丸与含有不同化合物的同样缓冲液进行混合，来测定那一种蛋白质将从细胞壁物质中释放出来。离心后，从细胞壁物质中提取的蛋白质存在于上清液中。用 SDS-PAGE 分析从细胞壁物质中提取的蛋白质。图 1 的照片显示了从细胞壁物质中提取的蛋白质的 12% SDS PAGE 凝胶，所述的细胞壁物质用 1M 的乙酸铵溶液、氯化铵溶液、三甲基氯化铵溶液或 Tris-HCl 溶液（pH6.8）进行过处理。

采用 centricon 10 旋转滤器浓缩提取的蛋白质，并采用各种不同浓度的丙烯酰胺借助 SDS PAGE 对其进行分离。然后将分离的蛋白质转移至用于分离和 N-终端测序的硝基纤维素膜上。

根据 Applied Biosystems 方案进行 N-终端的测序。然而，根据 Matsudaira 在 J. Biol. Chem. 262: 10035-10038(1997)中所述的方法，技术人员也可以进行这样的测序。

实施例 2

动物研究

进行了一项比较试验，以观察如上制备的蛋白质混合物保护小鼠抵抗肺炎球菌攻击的能力。研究中还包括不同的佐剂。对鼻内攻击的抗体水平和存活率进行了评价。

接种方案

在第 1 周对 7 周大的雌性 CBA/Ca 小鼠进行接种，对弗氏和 Titremax 佐剂而言，在第 5 周进行加强，对于 Ribi 而言，在第 4 周进行加强，第 8 周用肺炎球菌进行鼻内攻击。在每次接种时，经皮下给

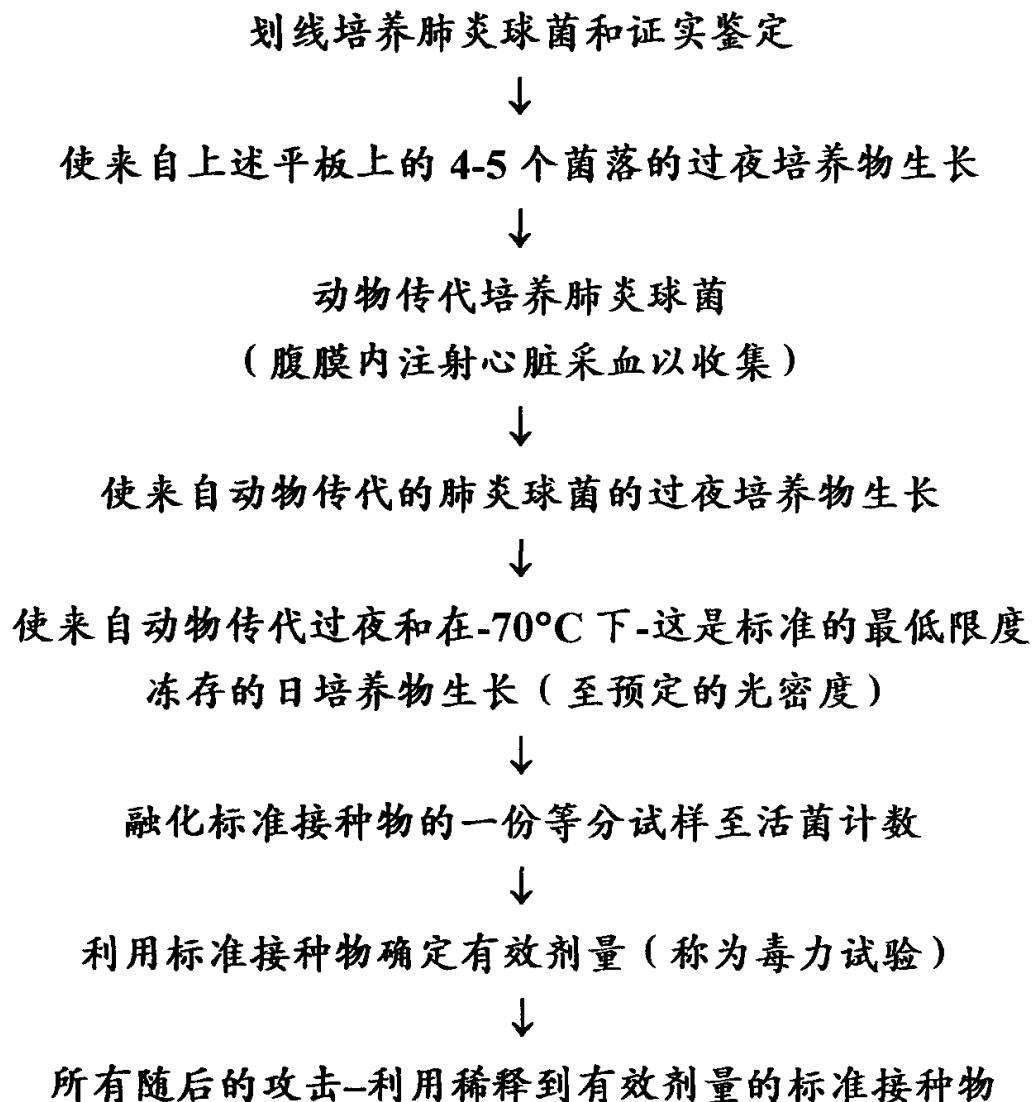
予 20 μ g 的剂量。从颈背处经皮下给予弗氏完全佐剂+蛋白质混合物和 Titremax+蛋白质混合物，并经皮下从腹部给予 Ribi+蛋白质混合物。

采血

在第 2, 4 和 6 周时采血用于进行抗体滴度的比较。

肺炎球菌攻击

按照以下方法制备 4 型肺炎链球菌的标准接种物：通过小鼠使肺炎球菌 1x 的培养物传代，从被感染的动物血中收集所述的培养物，在冻存前使之生长达到 10^9 cfu/ml 左右预定的活菌计数。可按下列流程图来进行制备：



在 PBS 中将标准接种物的等分试样稀释 500 倍, 并对小鼠进行接种。

用卤代烷使小鼠轻微麻醉, 然后将剂量为 50 μ l 的 1.4×10^5 cfu/ml 肺炎球菌施用于每只小鼠的鼻腔。通过小鼠的正常呼吸使摄入更为方便, 使小鼠仰卧让其恢复。

在感染过程中, 于设定的间隔记录小鼠的症状。

结果

存活数据

通过 24 小时对照, 未接种的小鼠显示出感染迹象, 它们的平均存活时间为 49.2 小时。弗氏佐剂+蛋白质的平均存活时间为 124.5 小时, Ribi+蛋白质以及 Titremax+蛋白质平均存活时间为 168 小时。在弗氏佐剂组的 6 只中有 2 只存活, Ribi 组的 6 只中有 4 只存活, Titremax 组的 6 只全部存活。

弗氏佐剂+蛋白质以及 Ribi+蛋白质组中的小鼠没有生病, 与未接种的对照小鼠比较, 发病有所拖延。

抗体滴度

利用 ELISA 在佐剂组之间进行了免疫反应评价。对于弗氏佐剂组来说, 平均滴度为 199024, 在第二和第三次采血时为 722119。对于 Ribi 组来说, 平均滴度为 16674, 在第二和第三次采血时为 1474354。对于 Titremax 组来说, 平均滴度为 138455, 在第二和第三次采血时为 705486。

实施例 2—抗原的分离和纯化

细菌

用血清组 3 肺炎链球菌 (ATCC 49619) 来获得本研究中所调查的抗原, 并将其用于动物研究中源性细菌的攻击。使细菌菌株在

37°C 并和 5%CO₂ 下在血液琼脂上生长过夜，或在 37°C 下于震荡培养箱中，在胰酪大豆肉汤（Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK）中培养过夜。

蛋白质纯化

细胞壁蛋白质的提取

无菌地，将一满环的肺炎链球菌接种到 10ml 无菌胰酪大豆肉汤中，并在 37°C 的震荡培养箱中培养过夜。使 2×5mL 的等分试样在 2×500mL 体积的无菌胰酪大豆肉汤中进行传代培养，并在 37°C 的震荡培养箱中培养过夜。无菌地，将一环细菌悬浮液从每一个培养物中移出，在血琼脂上划线并在 37°C 下在 CO₂ 中培养过夜，作为生长和污染物的检查。

在 4°C 下，用 Beckman J-2™ 离心机使细菌培养物在 18000×g 的转速下离心 20min。通过离心用磷酸缓冲盐水（PBS）将小丸洗涤两次，然后将小丸再悬浮于 10mL PBS 和 200μl 10%（w/v）脱氧胆酸钠中，室温下搅拌 1 小时。4°C 下，使悬浮液在 27000×g 的转速下离心 15min，回收上清液，搅拌下逐渐加入硫酸铵至最终浓度达到 70%（w/v）。4°C 下，使悬浮液在 27000×g 的转速下离心 15min，将小丸再溶于 10mL 10mM 磷酸钠（pH7.0）中。4°C 下，针对于 3×1L 10mM 磷酸钠（pH7.0）的更换透析再悬浮的小丸，更换之间最少留出 2 小时。4°C 下，使透析蛋白质悬浮液在 15000rpm 下离心 20min，保存上清液，进行蛋白质测定。经冷冻干燥浓缩蛋白质悬浮液，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析。

SDS-PAGE

根据蛋白质的分子量，采用 Protean II ixi 槽™（Bio-Rad）来分离蛋白质。从 30%（w/v）丙烯酰胺/BIS（N,N'-亚甲基双丙烯酰胺）Tris 缓冲液的储备溶液来制备由 12%（w/v）丙烯酰胺/BIS 分离凝胶和 4%（w/v）丙烯酰胺/BIS 积层（上部）凝胶组成的非连续凝胶。用

过硫酸铵和 TEMED 使聚丙烯酰胺凝胶进行聚合。将冷冻干燥的蛋白质提取物 1: 1 (v/v) 悬浮于样品缓冲液 (0.5M Tris HCl pH 6.8; 10% (v/v) 甘油; 10% (w/v) SDS; 0.05% (w/v) 溴酚蓝; 0.05% (v/v) β -巯基乙醇) 中, 煮沸 5min, 然后将大约 1mL 此溶液装载到凝胶的顶部。在每凝胶 16mA 的恒定电流下进行电泳, 直至染料前沿通过堆积处 (stacker), 然后将电流加大至 24mA, 通过拆解凝胶进行电泳。平均的泳动时间为 4-5 小时。在 200V 和 0.2mA 的最大电流下, 采用 BIORAD™ 平床电洗脱器电洗脱 1 小时, 将分离的蛋白质回收 30 根单独的管子中。用分析 SDS-PAGE 以及 Coomassie 或 Silver 蛋白质染色测定回收级分中的蛋白质组成。在 200V 的恒定电压下, 采用 Mini-protean II™ 槽 (Bio-Rad) 进行约 45min 分析 SDS-PAGE。采用 Pierce Micro BCA™ 蛋白质测定法并与白蛋白标准比较来测定蛋白质的浓度。

从纯化的蛋白质中除去 SDS

每 1mL 含有 SDS 的样品用 200 μ L 体积的 100mM 磷酸钾进行处理, 然后将其置于冰上 60min。4℃ 下, 使样品在微量离心机中于 10000 $\times$ g 的转速下离心 20min。回收上清液, 经对纳纯水过夜透析脱盐。

液相层析分离

阴离子交换液相层析

另外用阴离子交换层析纯化提取的蛋白质, 并根据它们分子电荷的相互作用进行分离。在 1mL/min 的流速下, 用低盐缓冲液 (20mM Tris- HCl pH8.45) 平衡柱子 (Q5 柱, Bio-Rad) 10min。将冻干的细胞壁提取物再悬浮于同样的缓冲液中, 达到浓度为 5mg/mL, 然后装载到柱子上。通过逐渐增加通过柱子的 20mM Tris- HCl, 500mM 氯化钠, pH8.6 的比例来利用增加的盐梯度洗脱蛋白质。回收组分, 冻干并用分析 SDS-PAGE 进行测定。将来自多个实验的组分进行混合,

通过制备 SDS-PAGE 以及前述的电洗脱进一步纯化蛋白质。

结果

上述方法成功地纯化了具有不同分子量的 10 种蛋白质，在下列实施例 4 中所述的动物免疫研究中能够对其进行评价。所纯化的最具活性的蛋白质具有的分子量为 12-14 kDa, 16 kDa, 34 kDa 和 57 kDa。总共，分离出 23 种不同的蛋白质，其产率范围为 20-500 μ g/6L 培养物，细胞壁提取物的总蛋白质浓度范围为 25-30mg。图 2 显示了细胞壁提取物以及粗品蛋白质提取物经电洗脱后分离出来的不同蛋白质的分布图。并不是所有蛋白质都是作为单一蛋白质条带从凝胶中洗脱出来的；一些级分由 2-3 种不同的蛋白质组成。

采用阴离子交换层析进行的细胞壁蛋白质的洗脱分布图

图 3 中显示了阴离子交换层析的洗脱分布图。第一个峰代表未结合蛋白质的洗脱，随后的两个主要峰含有用增加的盐浓度洗脱的大多数蛋白质。用 SDS-PAGE 对这些峰中的蛋白质进行进一步的纯化。

实施例 3-N-末端序列分析

从来自分析 SDS-PAGE 的切除条带中测定蛋白质的 N-末端序列。用 Biomolecular Resource Unit, The John Curtin School of Medical Science (Australian Capital Territory, Australia) 进行分析。

表 1-纯化蛋白质的氨基酸序列分析结果

蛋白质分子量 (kDa)	N-末端序列	同源性鉴定
12-14	ALNIENIIAEIKEAS	肺炎链球菌核糖体蛋白质
16	待证实	
34	AKYEILYIIRPNIEE	肺炎链球菌核糖体蛋白质
57	RIIKFVYAK	REV 蛋白质/片段

为了帮助蛋白质定性，通过 GenBank 数据库对从部分氨基酸序

列获得的信息进行检索以确定其与已知蛋白质序列的同源性。结果发现 12-14 kDa 的蛋白质与来自肺炎链球菌的 12 kDa 蛋白质具有 100% 的序列同源性。34 kDa 蛋白质与来自枯草芽孢杆菌的蛋白质具有 78% 的序列同源性。从对两种蛋白质有限的调查假设它们是核糖体蛋白质，但这有待进一步证实。

根据 Koberg 等人 (Microbiology, 143 (1), 55-61 (Jan 1997)) 的研究, 抵抗肺炎链球菌的两种单克隆抗体与真细菌的 L7/L12 核糖体蛋白质上高度保守的表位进行反应。在代表 27 个不同种的 66 种真细菌中发现了高度的氨基酸序列同源性。我们的大约 12-14 kDa 蛋白质与来自 Kolberg 等人研究中的 12 kDa 蛋白质具有 100% 的序列匹配。由于假设这种蛋白质具有毒性, 并在物种、甚至是革兰氏阴性细菌间是保守的, 因此人们对于进行进一步的研究以鉴定蛋白质并确定其在此有机体有关疾病的毒力方面所涉及到的情况具有很大兴趣。

34 kDa 蛋白质似乎为肺炎链球菌的新颖蛋白质, 因为最接近的匹配为与枯草芽孢杆菌核糖体蛋白质 S6 78% 匹配。核糖体蛋白质 S6 具有启动细胞周期中染色体复制的作用 (Moriya 等人, Nucleic Acids Res. 13, 2251-2265 (1985))。同源性匹配揭示了此蛋白质在物种间的保守性程度。

实施例 4—小鼠肺清除模型

动物

将 6-10 周龄的 Balb/c 小鼠圈养并保持在不含致病菌的环境中, 随意摄取无菌的食物和水。

活细菌的制备

在 37°C 和 5%CO₂ 下, 使细菌在血琼脂平板上生长过夜。收集细菌, 室温下通过在 10000×g 的转速下离心将上述细菌在无菌 PBS 中洗涤两次。由在 405nm 处的光密度确定细菌的浓度, 并从回归曲线计算。通过滴定和过夜培养证实活菌计数浓度的准确度。

免疫方案

在第 0 天，通过 Peyer's 贴片接种使小鼠开始免疫，14 天后经气管内给药进行加强。第 21 天时，用活的肺炎链球菌攻击这些小鼠。

Peyer's 贴片免疫

通过皮下注射 0.25mL 氯胺酮/甲苯噻嗪（剂量为 5mg/ml 盐酸氯胺酮；2mg/ml 盐酸甲苯噻嗪）使小鼠镇静。通过中部（mid-line）腹部切口暴露出小肠，蛋白质经浆膜下层注射到每一个 Peyer's 贴片中。按照与不完全弗氏佐剂成 1:1 的比例，通过乳化 2.5 μ g/ μ l 蛋白质来制备免疫蛋白质（Sigma Immunochemicals, St Louis, MI, USA），给予每只动物总浓度为 10 μ g 的蛋白质。

小鼠的气管内接种

第 14 天时，小鼠接受气管内加强。按每 Kg 体重 20mg 二羟孕烷二酮 - 21 - 醋酸酯 - 羟 - 5 α - 孕烷二酮复合剂经静脉注射使小鼠镇静。使用 22.1/2G 的导管将总体积为 20 μ L 的溶于 PBS 中的 10 μ g 蛋白质经气管送入肺中。

肺攻击

第 21 天时，使小鼠接受活菌攻击。用上述的二羟孕烷二酮 - 21 - 醋酸酯 - 羟 - 5 α - 孕烷二酮复合剂使小鼠镇静，就气管内加强而言，是将处于 20 μ L 活肺炎链球菌中的 1×10^7 CFU 的接种物经气管引入肺中。攻击 5 小时后，经腹膜内注射 0.2mL 的戊巴比妥钠使小鼠安乐死。

通过心脏穿刺采血，分析前将分离的血清储存于 -20 $^{\circ}$ C 下。暴露气管，通过加入和除去 0.5ml 的无菌 PBS 灌洗肺部。通过将 10 倍的系列稀释液平铺到用于 CFU 测定的血琼脂上，测定回收液（BAL）中的细菌回收率。移出等分试样用于制备 Cytospin 载玻片，染色并进行细胞分类计数。4 $^{\circ}$ C 下，使 BAL 在 1000rpm 的转速下离心 10min，将上清液储存于 -20 $^{\circ}$ C 下直至需要使用为止。将小丸再悬浮于 PBS 和亚

甲兰中，对 BAL 中的白细胞总数进行计数。灌洗后移出肺，置于 2mL 无菌 PBS 中并进行匀浆。将 10 倍的系列稀释液平铺到用于 CFU 测定的血琼脂上，进行肺匀浆测定。结果的表示仅对于蛋白质，其显示了显著程度的肺部的肺清除率。

结果

在免疫和细菌攻击中测定的三种蛋白质均显示了显著程度的肺部肺清除率。这些是分子量为 16, 34 和 57 kDa 的蛋白质，它们在上述表 1 中得到鉴定。下列表 2 中显示了细菌清除率以及与在同样时间遭受攻击的非免疫小鼠的回收率比较的结果，并在图 5-7 中以图示的方式进行了表达。第 4 种具有显著性的蛋白质是 12-14 kDa。在三个单独的免疫研究中且每项研究均使用新鲜分离的蛋白质的情况下，免疫对小鼠是致死性的，大多数动物未能从麻醉中恢复过来。17 只小鼠中的 13 只在 3 个实验过程中死亡，最多只有 2 只在任何给定的实验中存活。这种蛋白质作为一种毒素和潜在的肺炎链球菌的毒力组分而使人感兴趣。对毒性组分的鉴定以及蛋白质的脱毒可以产生高度有效验的抗原。由于这种蛋白质存在于许多细菌中，以前曾通过单克隆抗体测定进行过鉴定（参见上文）。然而，文献中没有证据表明其已作为疫苗抗原得到测试。

表 2-在用纯化蛋白质免疫后的肺清除率

	BAL (log ₁₀ CFU)	肺 (log ₁₀ CFU)	BAL 中的总白 细胞计数 (×10 ⁶)
16 kDa			
免疫	2.49 ± 0.16	2.56 ± 1.32	1.70 ± 1.01
未免疫	5.07 ± 0.26	4.77 ± 0.36	1.65 ± 0.41
34 kDa			
免疫	3.66 ± 0.99	2.38 ± 0.15	0.81 ± 0.17
未免疫	5.07 ± 0.26	4.77 ± 0.36	1.65 ± 0.41
57 kDa			
免疫	5.1 ± 0.20	5.1 ± 0.13	0.087 ± 0.047
未免疫	5.5 ± 0.20	5.3 ± 0.31	0.032 ± 0.015

说明书附图

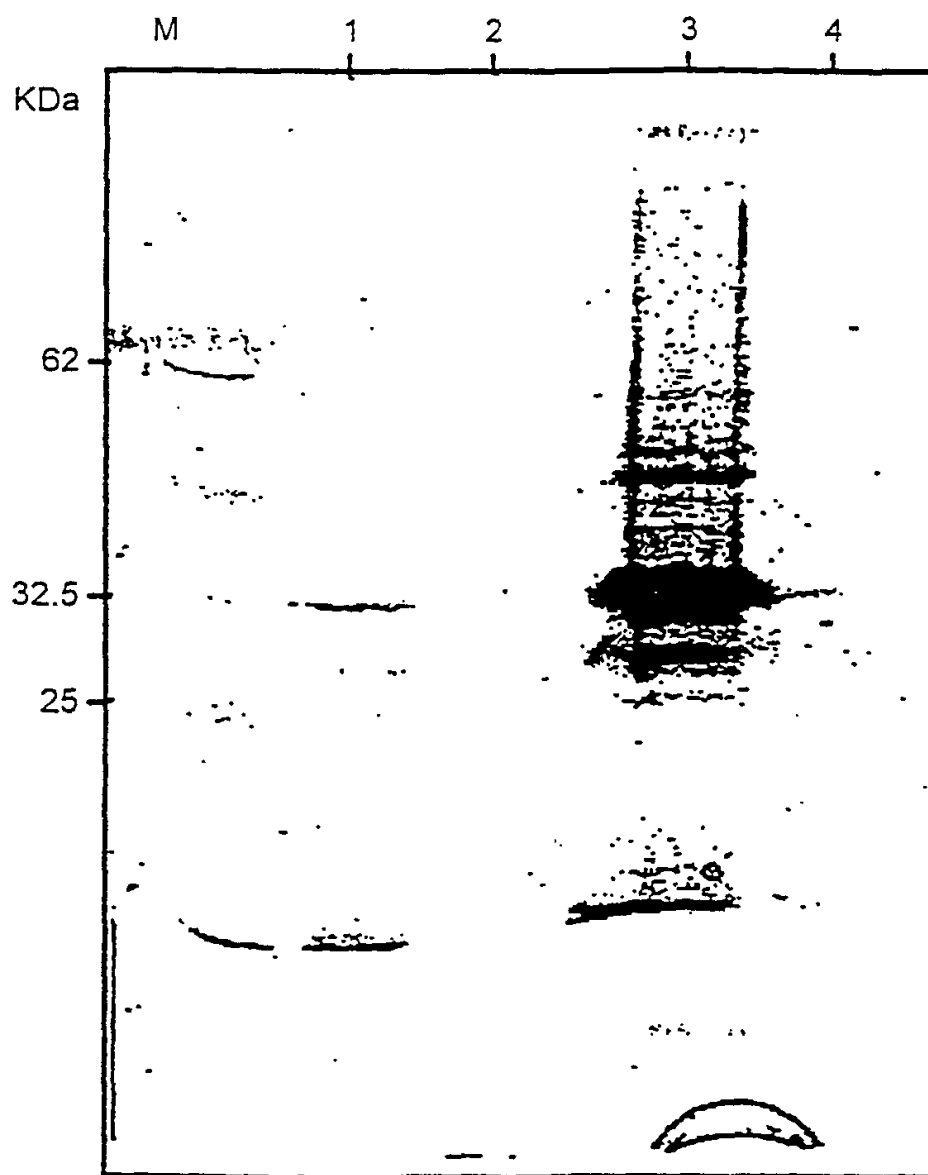
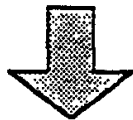


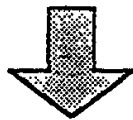
图 1

流程图，蛋白质纯化过程的图解概述

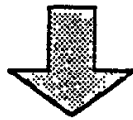
在合适的条件下用肺炎链球菌
血清型 3 来培养细菌细胞



采用以洗涤剂为基础的方法
使外膜蛋白质增溶



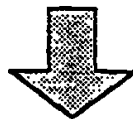
SDS-PAGE 电泳
根据蛋白质的分子量
分离它们



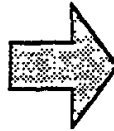
电洗脱
对分离的蛋白质带
进行电洗脱



SDS-PAGE
根据蛋白质的分子量
筛选蛋白质组分



样品脱盐，除去 SDS，
接着进行免疫研究



离子交换层析
根据蛋白质的离子强度
分离蛋白质



图 2

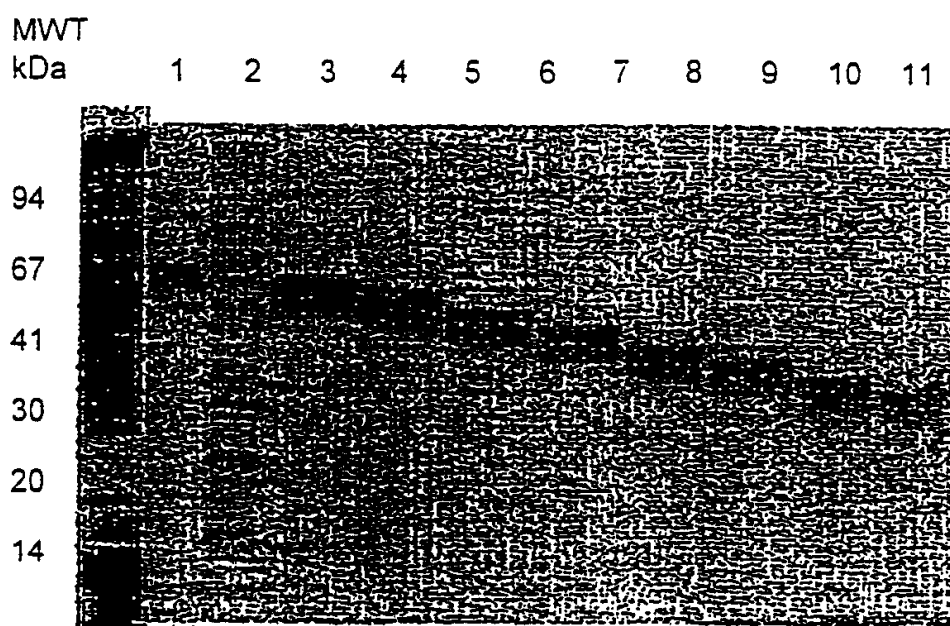


图 3

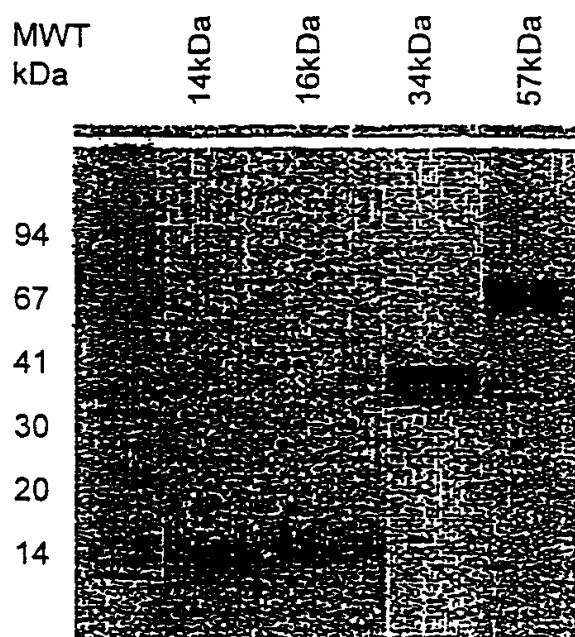


图 5

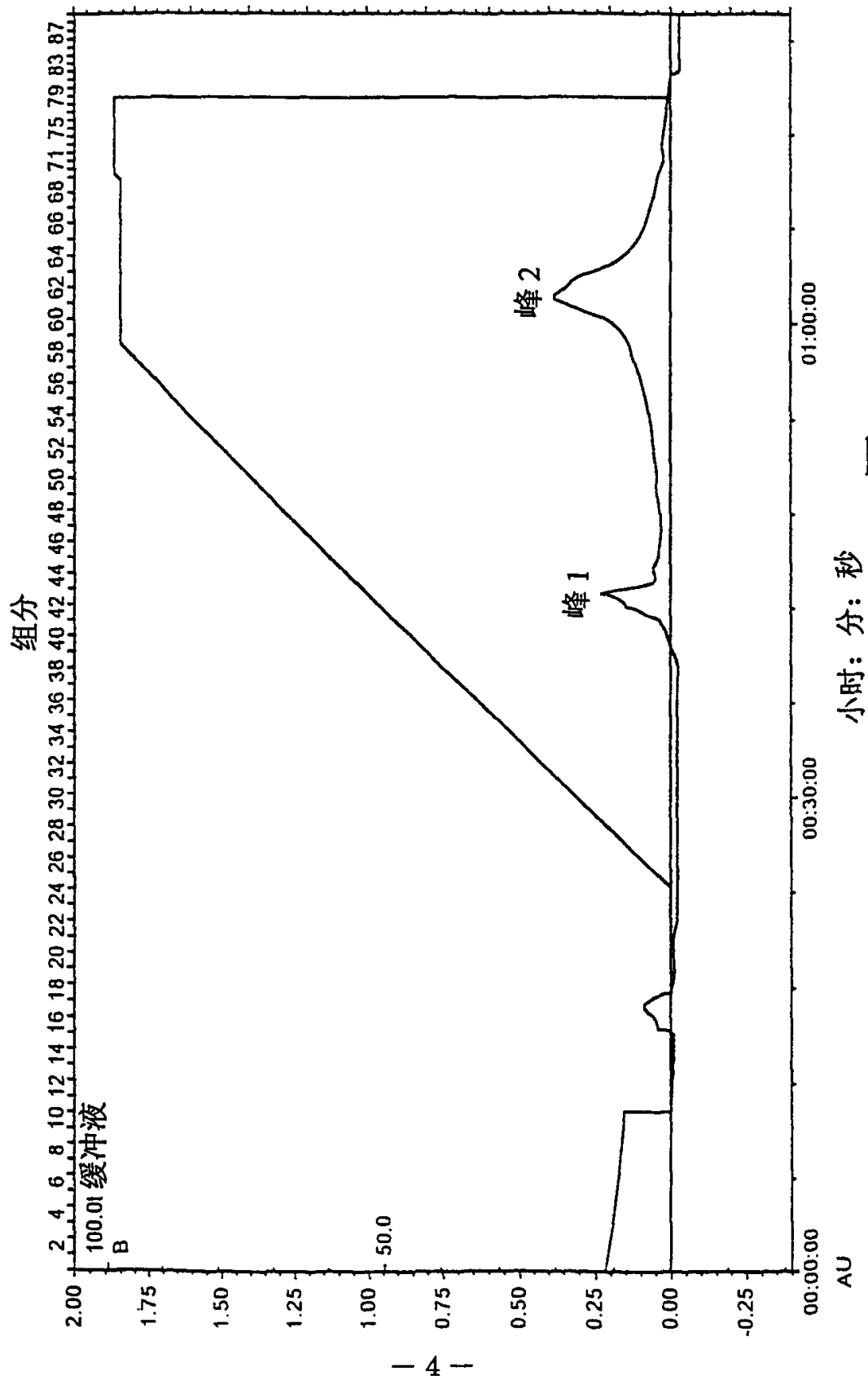


图 4

图 6

用 16kDa 的肺炎链球菌蛋白质免疫后的肺清除率

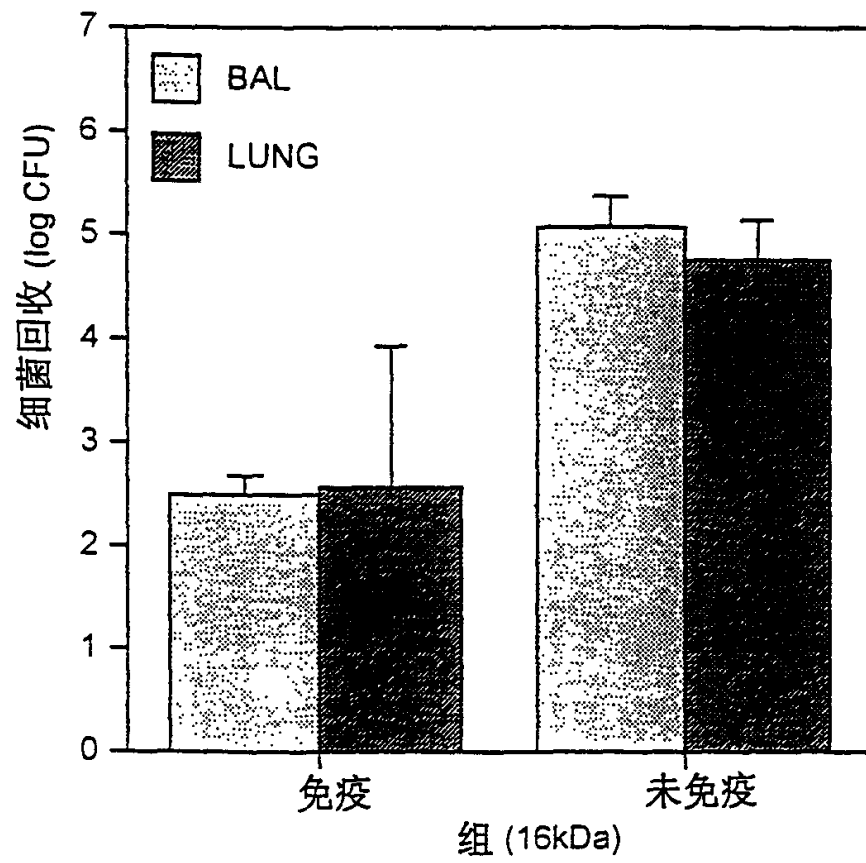


图 7

用 34kDa 的肺炎链球菌蛋白质免疫后的肺清除率

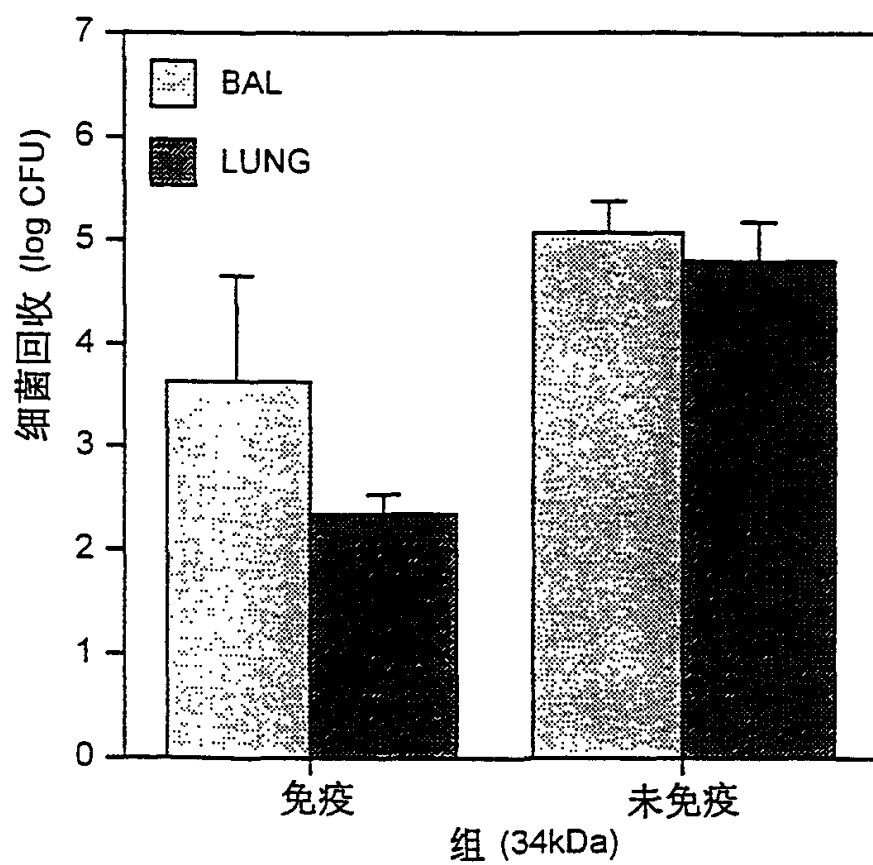
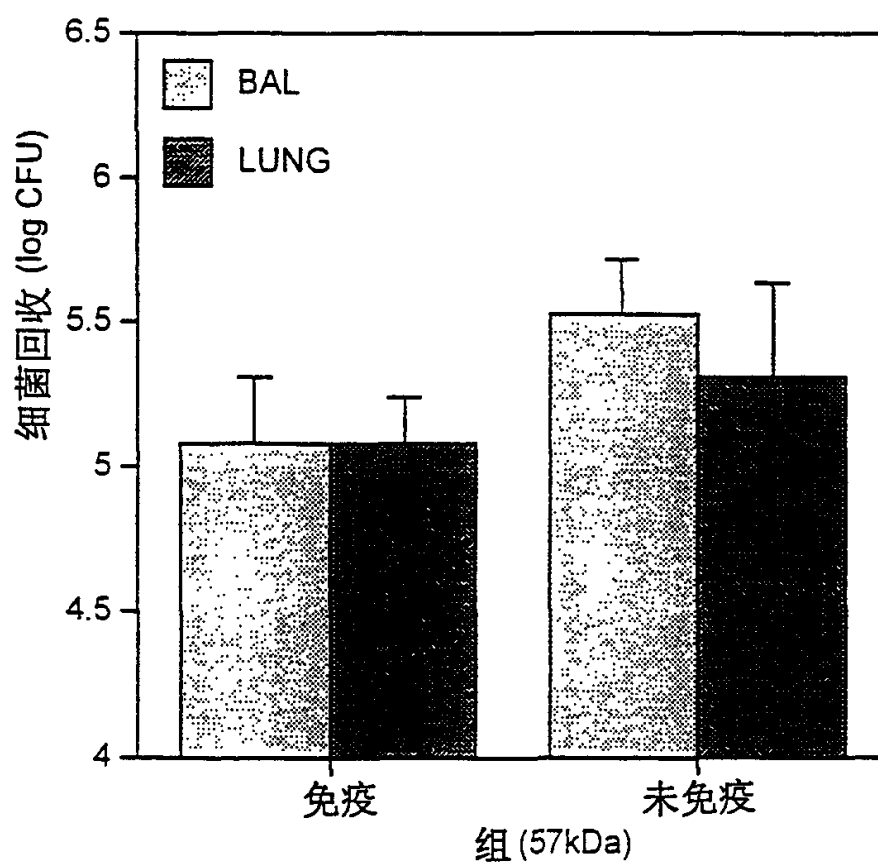


图 8

用 57kDa 的肺炎链球菌蛋白质免疫后的肺清除率



序列表

<110> Provalis UK Limited

Cripps, Allan W

Kyd, Jennelle M

Jomaa, Maha

Wells, Jeremy M

Hansbro, Phillip M

<120> 蛋白质

<130> PWC/P21130WO

<140> PCT/GB00/01167

<141> 2000-03-27

<150> GB 9928678.3

<151> 1999-12-03

<150> GB 9907114.4

<151> 1999-03-26

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 1

Val Glu Pro Lys Ala Lys Pro Ala Asp Pro Ser Val Val

1

5

10

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 2

Asn Asp Arg Leu Val Ala Thr Gln Ser Ala Asp Gly Arg Asn Glu Ser
1 5 10 15

Val Leu Met Ser Ile Glu Thr
20

<210> 3

<211> 54

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 3

Glu Asp Thr Thr Asn Ser Arg Phe Gly Ser Gln Phe Asp Lys Tyr Arg
1 5 10 15

Gln Pro Asn Ala Glu Pro Asp His Ser His Asp Ala Val Ser Ala Asp
20 25 30

Asn Ser Thr Ala His Asn Arg Phe Gly Tyr Gly Phe Ala Ile Gly Ser
35 40 45

Lys Tyr Ile Arg Tyr Asp
50

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 4

Asp Lys Tyr Arg Gln Pro Asn Ala Glu Pro Asp Asp His His Tyr Ala

1

5

10

15

Val

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 5

Asp Ala Val Ser Ala Asp

1

5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 6

Ser Glu Thr Asn Val Tyr

1

5

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 7

Asp	Lys	Val	Asp	Gly	Leu	Ser	Ala	Lys	Pro	Asp	Ile	Leu	Lys	Pro
1				5					10				15	

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 8

Glu	Leu	Lys	Glu	Glu	Gly	Trp	Val	Val	Lys
1				5					10

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 9

Glu	Val	His	Ala
1			

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 10

Met Lys Leu Asn Glu Val Lys Glu Phe Val Lys Glu Leu Arg Ala Glu

1 5 10 15

Thr

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 11

Ala Lys Tyr Glu Ile Leu Tyr Ile Glu Arg Pro Asn Ile Glu Glu Phe

1 5 10 15

Ala Lys

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 12

Ile Arg Leu Thr Arg Met Glu Gly Gly Lys Lys Lys Pro Lys Phe Tyr

1 5 10 15

Tyr

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<220>

<221> SITE

<222> (9)

<223> Xaa= 任何氨基酸

<220>

<221> SITE

<222> (11)

<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 13

Val Met Thr Asp Pro Ile Ala Asp Xaa Leu Xaa Arg Ile

1

5

10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 14

Val Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Asn

1

5

10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 15

Val Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Lys

1

5

10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 16

Val Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Asn

1

5

10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 17

Val Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Lys

1

5

10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 18

Val Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Asn

1

5

10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 19

Val Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Lys
1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 20

Val Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Asn
1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 21

Val Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Lys
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 22

Ala Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Asn
1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 23

Ala Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Lys

1

5

10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 24

Ala Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Asn

1

5

10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 25

Ala Lys Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Lys

1

5

10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 26

Ala Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Asn

1

5

10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 27

Ala Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Leu Glu Lys

1

5

10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 28

Ala Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Asn

1

5

10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 29

Ala Glu Leu Val Phe Ala Arg His Gly Glu Thr Glu Lys

1

5

10

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 30

Ile Ile Thr Asp Val Tyr Ala Arg Glu Val Leu Asp Ser Arg Gly Asn

1

5

10

15

Pro Thr Leu

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 31

Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Ile Ala Ser

1

5

10

15

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 32

Arg Ile Ile Lys Phe Val Tyr Ala Lys

1

5

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 33

Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 肺炎链球菌

<400> 34

Ala Lys Tyr Glu Ile Leu Tyr Ile Ile Arg Pro Asn Ile Glu Glu

1

5

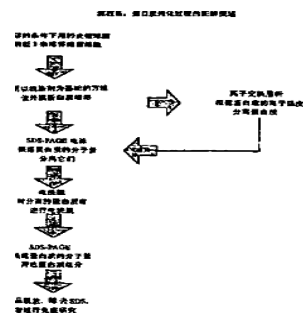
10

15

专利名称(译)	肺炎链球菌抗原		
公开(公告)号	CN1345375A	公开(公告)日	2002-04-17
申请号	CN00805589.0	申请日	2000-03-27
[标]发明人	AW克利普斯 JM吉德 M乔玛 JM威尔斯 PM翰斯博罗		
发明人	A·W·克利普斯 J·M·吉德 M·乔玛 J·M·威尔斯 P·M·翰斯博罗		
IPC分类号	G01N33/566 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/09 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/00 A61P31/04 C07K14/315 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12Q1/04 C12Q1/68 C12R1/46 G01N30/34 G01N30/88 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/315 C07K14/3156 A61K38/00 G01N33/56905 A61K39/00 A61P11/00 A61P31/04		
代理人(译)	李瑛		
优先权	1999007114 1999-03-26 GB 1999028678 1999-12-03 GB		
其他公开文献	CN1198932C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了来自肺炎链球菌的各种新颖的抗原及其同系物、衍生物和片段。描述了这些抗原在医学、尤其是在治疗或预防肺炎链球菌感染方面的用途。还描述了抗原在诊断中的用途。



社出版