



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117794565 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202280053682.5

(22) 申请日 2022.06.29

(30) 优先权数据

21189282.3 2021.08.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/067891 2022.06.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/011811 EN 2023.02.09

(71) 申请人 英特维特国际股份有限公司

地址 荷兰博克斯梅尔

(72) 发明人 A·A·C·雅各布斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表19页

(54) 发明名称

用于保护以对抗多种血清型的猪链球菌的疫苗

(57) 摘要

本发明涉及一种疫苗,其包含组合的猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原、猪链球菌菌苗(bacterin)血清型9序列型16,和药学上可接受的载体。本发明还涉及猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16的组合,其用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的方法中,以及通过向猪施用猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16来保护所述猪免受猪链球菌的致病性感染的方法中。

1. 一种疫苗,其包含组合的猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原、猪链球菌菌苗血清型9序列型16,和药学上可接受的载体。

2. 根据权利要求1所述的疫苗,其特征在于所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原是与猪链球菌血清型1细菌的相应的天然存在的IgM蛋白酶具有至少90%序列同一性的全IgM蛋白酶抗原。

3. 根据前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原是与猪链球菌血清型1细菌的相应的天然存在的IgM蛋白酶具有至少95%序列同一性的全IgM蛋白酶抗原。

4. 根据前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。

5. 根据前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原在其氨基酸序列中包含少于三个重复序列。

6. 根据前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原在其氨基酸序列中包含两个重复序列。

7. 根据前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原是序列型13的。

8. 根据前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于其不包含除猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16以外的其他猪链球菌抗原,或者至多包含猪链球菌血清型7的IgM蛋白酶抗原。

9. 猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16的组合,其用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的方法中。

10. 根据权利要求9所述的组合,其特征在于所述保护针对血清型1、2、7和9中的任一一种的猪链球菌的致病性感染。

11. 根据权利要求9和10中任一项所述的用途的组合,其特征在于所述方法包括向至多35日龄的猪施用猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16。

12. 根据权利要求9和10中任一项所述的用途的组合,其特征在于所述方法包括向母猪施用所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和所述猪链球菌菌苗血清型9序列型16,以通过摄入该母猪的初乳来保护猪。

13. 根据权利要求12所述的用途的组合,其特征在于在所述猪摄入所述初乳之前向所述母猪施用所述猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和所述猪链球菌菌苗血清型9序列型16两次。

14. 猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16用于制备保护猪免受猪链球菌的致病性感染的疫苗的用途。

15. 一种通过向猪施用猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16来保护所述猪免受猪链球菌的致病性感染的方法。

用于保护以对抗多种血清型的猪链球菌的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及保护猪免受多种血清型的猪链球菌的致病性感染,特别是最常见的血清型1、2、7和9。

背景技术

[0002] 猪链球菌 (*S.suis*) 是猪中接触传染性细菌性疾病的主要病原体之一。病原体可引起多种临床综合征,包括脑膜炎、关节炎、心包炎、多发性浆膜炎、败血病、肺炎和猝死。*S.suis* 是革兰氏阳性兼性厌氧球菌,最初被定义为兰斯斐尔德 (Lancefield) 类群 R、S、R/S 或 T。后来,提出了一种基于位于细胞壁中的类型特异性荚膜多糖抗原的新分型系统。这产生了包含 35 种血清型的系统 (Rasmussen 和 Andresen, 1998, “16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotypes”, *Int.J.Syst.Bacteriol.* 48, 1063-1065), 其中的血清型 1、2、7 和 9 最为普遍,尤其是在欧洲。然而,公认的荚膜血清型是毒力的不良标志物。因而,开发了一种替代系统来帮助了解 *S.suis* 感染的流行病学和血清分型方法的生物学相关性,即所谓的多位点序列分型 (MLST), 如 King 等在 *Journal of Clinical Microbiology*, 2022 年 10 月, 第 3671-3680 页 (Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange”) 中所描述的。在该研究中鉴定了在人群中占主导地位的 92 种序列类型, 其中 ST 复合体 ST1、ST27 和 ST87, 每一种都包含多种序列类型。另参见位于牛津大学的猪链球菌 MLST 网站 (<https://pubmlst.org/ssuis/>) (Jolley 等, *Wellcome Open Res* 2018, 3:124 (网站由 Wellcome Trust 资助), 其引用了 King 等的论文并使得能够容易地鉴定任何猪链球菌菌株的序列类型。

[0003] 猪群中猪链球菌的控制看来似乎非常困难。猪链球菌是猪的机会共生体。显然,并不是在每一次感染时都触发免疫系统。紧跟在这之后的是,猪链球菌是充分被有荚膜的病原体,并使用毒力因子库来逃避宿主免疫系统。这些特征已共同向开发有效疫苗来对抗这种重要病原体提出了挑战。最近,关于抗猪链球菌的疫苗的综述文章已经发表 (Mariela Segura: “*Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress, in Expert Review of Vaccines, 第 14 卷, 2015, 第 12 期, 第 1587-1608 页)。在这个综述中,已搜集并比较了临床现场信息和实验数据,以概述抗猪链球菌的疫苗开发的现状,如下文所概述的。

[0004] 当前使用的疫苗主要是全细胞菌苗。然而,现场报告描述了在疾病控制和管理中的困难,且特别地在使用细菌疫苗时,“疫苗失败 (vaccine failures)” 是常见的,特别是因为异源保护非常差。携带者猪是主要的传染源,且垂直传递和水平传递两者都与疾病在畜群中的扩散有关。在应激性条件下,如断奶和运输,将携带者动物与易感动物混合通常导致临床疾病。早期投药的断奶和分开的早期断奶实践没有消除猪链球菌感染。因此,预防疾病的有效控制措施的关键将在于预防/补救性预防 (metaphylactic) 程序 (在允许的场所) 和接种。目前,现场免疫工作已集中在商业或自体菌苗的使用上。这些疫苗策略已应用于小猪

或母猪。自断奶及以后,由于与断奶亦及后来常见的运输相关的应激,小猪更易感猪链球菌感染。因此,经常使用母猪的分娩前 (prepartum) 免疫来对小猪尝试且传递被动免疫,并在一生中早期的这些应激性情况下提供抗猪链球菌的保护。此外,母猪接种成本较低且劳动强度较低,因而代表了小猪接种的经济备择方案。然而,可用的结果似乎表明用菌苗进行母猪接种也是一个有争论的问题。在很多情况下,接种的母猪,甚至当在分娩前接种两次时,对接种的反应也不良或根本没有反应,这导致传递到幼崽的母体免疫低。而且即使母体免疫以足够的水平传递,在很多情况下,母源性抗体仍然太低以致于无法在4-7周龄的最关键时期中提供保护。

[0005] 在小猪中,在现场频繁地使用自体菌苗,尤其是在欧洲。其是从有临床问题的农场分离的强毒株制备的,并应用于同一农场。自体菌苗的缺点之一是缺乏疫苗安全性数据并且可能发生严重的不利反应。采样错误 (由于仅使用一头或两头猪或一个或两个样品) 可能导致不能鉴定与最近的暴发有关的菌株或血清型。这种失败在地方性畜群中可能尤其成问题。最后,自体菌苗最重要的困境是对其的实际功效尚缺少研究。由于自体疫苗的应用是根据经验性的,所以使用这些疫苗获得的结果不一致也就不令人惊讶了。

[0006] 本领域还描述了其他实验性疫苗。Kai-Jen Hsueh等表明 (“Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets”, BMC Veterinary Research, BMC series-open, inclusive and trusted, 13:15, 2017年1月7日) 菌苗+亚基可能是成功接种母猪以给予其小猪保护性免疫的基础。

[0007] 在本领域中也已预期活减毒疫苗。猪链球菌血清型2的未被有荚膜的同基因突变体已被清楚地表明是无毒性的。然而,基于未被有荚膜的血清型2突变体的活疫苗制剂仅诱导对抗死亡率的部分保护,且未能阻止用野生型菌株攻击的猪中临床病征的发展 (Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA等, “Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2.” Vet Microbiol. 2002, 84:155-168.)。

[0008] 在最近两三年中,已经报道了抗原性或免疫原性猪链球菌分子的广泛清单,并且已通过使用来自感染的猪或人的恢复期血清和/或实验室产生的免疫血清的免疫蛋白质组学发现了这些中的大多数。W02015/181356 (IDT Biologika GmbH) 已显示, IgM蛋白酶抗原 (全蛋白或仅相当于全部蛋白约35%的高度保守的Mac-1结构域) 可以在任选与含菌苗的最初接种 (prime vaccination) 组合的施用两剂IgM蛋白酶抗原的接种方案中的小猪中引发保护性免疫应答。在356号专利申请中提出, 由于IgM蛋白酶抗原在大多数 (如果不是所有的) 猪链球菌血清型, 特别是最流行的血清型1、2、7和9中是高度保守的这样的事实, 因而IgM蛋白酶抗体可用于在猪链球菌血清型 (特别是血清型1、2、7和9) 中获得广泛的交叉保护。

[0009] W02017/005913 (Intervacc AB) 证实了IgM蛋白酶在多种猪链球菌血清型中高度保守的事实, 因此, 使用该抗原可以获得预期的广泛保护。

[0010] 最近关于使用IgM蛋白酶抗原, 特别是血清型2的IgM蛋白酶抗原来保护免受其他血清型感染的专利申请已经公开。这些申请证实了IgM蛋白酶抗原的交叉保护性质。

[0011] 特别是, W0 2020/094762描述了血清型2的IgM蛋白酶抗原对抗血清型14攻击的用

途。其似乎能够获得非常充分的保护。

[0012] 在W0 2019/115741中,显示IgM蛋白酶抗原有效地保护免受血清型9的猪链球菌的致病性感染。然而,保护作用并不是很高,而且似乎充其量只能达到普通细菌疫苗可获得的水平,即,在人工攻击实验中,死亡和阳性血液分离减少了约50% (不排除在实践中,大多面临不那么激烈的攻击,保护作用将处于更高水平)。乍一看,这种有点令人失望的保护作用似乎与Rieckmann等,在Vaccine, 3 (2019) 100046 (“Vaccination with the immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, IdeSsuis, leads to protection against a highly virulent serotype 9 strain”)中报道的用IgM蛋白酶抗原获得的针对血清型9的猪链球菌的高水平保护,以及还在人工攻击实验和在如W0 2020/094762中所示的针对血清型14的猪链球菌的保护相冲突。基于现有技术,不能理解对常见血清型9细菌的相对低水平的保护。

[0013] 尽管预期至少有一些保护作用,但是在本领域中,没有关于IgM蛋白酶血清型2针对使用血清型1和血清型7的猪链球菌攻击的保护作用的可用数据。

[0014] 发明目的

[0015] 本发明的目的是找到一种改进的疫苗,用于对猪提供针对猪链球菌的(交叉)保护,特别是针对包括血清型1、2、7和9在内的多种血清型的猪链球菌。优选地,疫苗包含来源于少于这4种血清型的抗原,但仍能够提供至少针对全部这4种血清型,至少针对现场存在的这些血清型的代表型菌株的足够保护。

发明内容

[0016] 为了达到本发明的目的,已经设计了一种疫苗,其包含组合的猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原、猪链球菌菌苗血清型9序列型16,和药学上可接受的载体。

[0017] 本发明基于几个预料不到的发现。首先,血清型2的IgM蛋白酶提供的异源保护似乎不如基于现有技术教导所预期的那样好,特别是因为IgM蛋白酶在不同血清型的猪链球菌中高度保守。特别是,正如最好理解的那样,Mac-1结构域以非常高的同一性水平存在于今天已知的所有猪链球菌血清型中。尽管血清型的IgM蛋白酶抗原对血清型2的攻击提供的同源保护是极好的,但对链球菌血清型1和血清型7的保护仍可能显著提高。另一个出乎意料的发现是,血清型1的IgM蛋白酶抗原反过来提供的异源保护非常好,特别是针对血清型2和血清型7。特别地,对血清型2提供的异源保护水平明显好于血清型2对血清型1提供的异源保护的事实是完全出乎意料的。

[0018] 另一个非常出乎意料的发现是,血清型2或实际上任何血清型的IgM蛋白酶抗原几乎不能提供任何足够的保护来对抗最流行的链球菌血清型9,即链球菌血清型9序列型16 (提供了一些保护,但该水平不足以用于商业上成功的疫苗)。乍一看,这一发现似乎与Rieckmann报道的结果相矛盾。然而,仔细检查,在Rieckmann研究中,似乎使用了血清型9序列型94的猪链球菌菌株。在W0 2019/115741中,尽管未明示,但使用了序列型16的猪链球菌菌株。这是后来通过根据King等(见上文)所述的多位点序列分型对所使用的攻击菌株进行分型而发现的。显然,针对后一种类型(*S. suis*血清型9序列型16),IgM蛋白酶抗原提供了显著较低水平的保护。其原因尚不完全清楚,但非常不利,因为在很多国家,特别是荷兰等欧洲国家,序列型16的猪链球菌是猪链球菌血清型9细菌中最普遍(高达约95%)的致病型

(Willemse等,Scientific Reports,2019,9:15429,“Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations”)。因此,尽管IgM蛋白酶可以引起跨血清型的保护,但发现在有效保护方面存在差距,特别是对于猪链球菌血清型9序列型16。

[0019] 直到认识到所有上述发现后,才能够得出结论,即一种改进的疫苗可以在现场针对猪链球菌血清型1、2、7和9产生充分保护(从而抵御最流行的菌株类型),才得以设计出目前的疫苗。已经发现,当使用血清型1的IgM蛋白酶抗原时,可以获得针对血清型1、2和7的充分保护,其水平比本领域中使用的血清型2的IgM蛋白酶所获得的水平更好。此外,发现可以通过使用血清型9序列型16的猪链球菌菌苗来保护猪免受猪链球菌血清型9序列型16的致病性感染,来封闭针对血清型9序列型16的保护的缺口。组合中存在的IgM蛋白酶,尽管本身不适合提供针对血清型9序列型16的猪链球菌的充分保护,但是甚至可以提高菌苗的保护作用。

[0020] 利用本发明,通过仅使用两种不同血清型(1和9)的两种猪链球菌抗原,能够获得针对最流行的猪链球菌细菌的充分保护,当使用血清型2细菌的IgM蛋白酶时,封闭针对猪链球菌细菌保护的任何缺口或缺点。本发明不仅能够获得针对血清型9(包括作为重要代表的序列型16)的猪链球菌的尽可能好的保护,而且能够获得针对所有流行血清型,特别是血清型1、2、7和9的非常广泛和高水平保护的方法。

[0021] 本发明还涉及猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16的组合,其用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的方法。

[0022] 其次,本发明涉及猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16用于制备用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的疫苗的用途,以及一种用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的方法,通过向猪施用猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16。

[0023] 定义

[0024] 猪链球菌的IgM蛋白酶抗原是特异性降解猪IgM(而不是猪IgG或猪IgA;Seele等,Journal of Bacteriology,2013,195 930-940;和Vaccine 33:2207-2212;2015年5月5日)的酶,称为IdeSsuis的蛋白,或其免疫原性部分(一般具有全长酶的至少约30-35%的长度)。完整酶具有约100-125kDa的重量,对应于约1000-1150个氨基酸,大小取决于S.suis的血清型。在W0 2015/181356中,给出了代表猪链球菌的IgM蛋白酶抗原的几个序列,即SEQ ID NO:1(也并入本申请中)、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:5(这四条序列2、6、7和5未并入本申请中),后者是全长酶的免疫原性部分(表示为Mac-1结构域,即,SED ID NO:7的氨基酸80-414)。全长酶的免疫原型部分的其他实例在W02017/005913中给出。IgM蛋白酶的特定实例是根据W02015/1818356的SEQ ID NO:1的蛋白酶或在重叠区域中具有至少90%,或者甚至91、92、93、94、95、96、97、98、99%一直到100%序列同一性的蛋白。可以用使用带有默认参数的blastp算法的BLAST程序确立氨基酸序列同一性。预期各种血清型的猪链球菌的IgM蛋白酶具有高于75%的序列同一型,特别是预期为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、90、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%一直到100%。人工蛋白,例如在抗原的重组生产系统中优化产量,与整个酶相比,可以导致较低的氨基酸序列同一性,如85%、80%、75%、70%、65、60、55或甚至50%,同时保持所需的免疫原性功能,并

且理解为本发明意义上的猪链球菌的IgM蛋白酶抗原。

[0025] 猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原是至少包含Mac-1结构域、与结构功能相连的区域、CNV区域和任选的细胞粘附区域的抗原(参见实施例1以鉴定猪链球菌基因组中的这些区域)。可以将其视为全IgM蛋白酶抗原,因为信号肽无论如何都被认为在天然存在的(即,野生型)分泌酶中缺失,并且细胞粘附区被认为对其作为蛋白酶的功能不是必需的。

[0026] 疫苗是适于向受试者应用的构成,其包含一种或多种免疫学有效量的抗原(即,能够充分刺激目标受试者的免疫系统以至少减少野生型微生物攻击的负面影响),通常与药学上可接受的载体组合,其在向受试者施用后诱导免疫应答以治疗感染,即,帮助预防、改善或治愈感染或由所述感染引起的任何疾病或病症。

[0027] 基因组或相应氨基酸序列中的重复是在生物体的基因组或相应的氨基酸序列中重复一次或多次的拷贝(完全相同或高度相似,例如同源物)。这是拷贝数变异现象的一部分,在这种现象中基因组的部分重复。通常,同一生物体的不同菌株之间的重复次数不同。拷贝数变化是一种结构变化。其是一种复制事件,通常影响相当多的碱基对,例如,30至400个碱基对之间的某处,对应于10-130个氨基酸。

[0028] 针对微生物致病性感染的保护与获得保护性免疫相同,即,有助于预防、改善或治愈该微生物的致病性感染或由该感染引起的疾病,例如,预防或减少由病原体的致病性感染引起的实际感染或一种或多种临床症状。

[0029] 菌苗是用作疫苗的已杀死细菌的混悬液。

[0030] 抗原的组合是在一种疫苗接种策略中联合使用这些(个体不同的)抗原,或者通过将不同抗原结合到一种疫苗制剂中,或者通过使用单独的抗原制剂来同时施用单独的制剂。

[0031] 组合疫苗(即,包含抗原组合的疫苗)是同时包含不同抗原的一种(单一)制剂。这些不同的抗原可以在工厂中混合以提供所谓的即用型组合疫苗,或者在施用前或施用期间混合(例如,使用具有两个用于分离抗原的独立隔室的装置,这些隔室的内容物在使用施用装置时混合),只要抗原最终形成相同的制剂即可。

[0032] 猪是属于猪科的任何一种动物。

[0033] 药学上可接受的载体是生物相容性介质,即,在施用后不会在所治疗的受试者中引起明显不良反应,在施用包含载体的组合物后能够将抗原呈递给受试者的免疫系统。此类药学上可接受的载体可以是例如含有水和/或任何其他生物相容性溶剂的液体或固体载体,如通常用于获得冻干疫苗(基于糖和/或蛋白),任选地包含免疫刺激剂(也称为佐剂)。根据相应疫苗的预期用途或所需性质,任选地添加其他物质,如稳定剂、粘度调节剂或其他组分。

具体实施方式

[0034] 在根据本发明的疫苗的一个进一步的实施方式中,猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原是与相应的天然存在的(即,野生型)猪链球菌血清型1细菌的IgM蛋白酶具有至少90%序列同一性的全IgM蛋白酶抗原。尽管从现有技术中已知IgM蛋白酶的Mac-1结构域单独(约35%)足以提供保护,但据信整个抗原提供更有效的免疫应答。特别地,与天然存在的IgM蛋白酶具有90%或更高的(如91、92、93、94、95、96、97、98、99或者甚至100%)序列同一性是优

选的,以获得足够的同源和异源保护。

[0035] 在根据本发明的疫苗的又一个进一步的实施方式中,猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。对猪链球菌基因组的结构分析表明,该细菌的基因组容易出现拷贝数变异(CNV)现象,其中基因组的部分重复。特别地,该重复序列与具有水解酶活性的已知蛋白序列具有相似性。发现血清型2的IgM蛋白酶主要与那些提供更好的异源保护的蛋白酶(如血清型1和血清型7)的不同之处在于血清型2包含四个重复序列。因此认为,如果重复序列数小于4,或者甚至小于3,例如2,则有利的是达到尽可能好的(异源)保护。

[0036] 最优选的是序列型13的猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原,其含有2个重复序列。

[0037] 尽管疫苗可能含有其他猪链球菌抗原,比如例如血清型2的IgM蛋白酶,但发现该疫苗不包含除了猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16之外的其他猪链球菌抗原,或者至多包含猪链球菌血清型7的IgM蛋白酶抗原就足够了。更多抗原意味着更高的成本价格和由更高抗原负载而导致的更高副作用风险。

[0038] 在用于针对猪链球菌进行保护的组合的进一步的实施方式中,保护针对血清型1、2、7和9中的任何一个的猪链球菌的致病性感染。

[0039] 在用于根据本发明的组合的又一个进一步的实施方式中,所述方法包括向至多35日龄的猪施用猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16。

[0040] 在一个替代实施方式中,所述方法包括向母猪施用猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16,以通过摄入该母猪的初乳来保护猪(通常是仔猪)。已知IgM蛋白酶(参见W02019/193078)在仔猪从接种疫苗的母猪身上获取初乳时为其提供充分和长期的保护。此外,众所周知,菌苗提供的保护作用会通过初乳转移到仔猪身上。

[0041] 在一个实施方式中,在仔猪摄取所述初乳之前,已向母猪施用两次猪链球菌血清型1的IgM蛋白酶抗原和猪链球菌菌苗血清型9序列型16。

[0042] 现在将使用以下具体实施例来进一步说明本发明。

[0043] 实施例

[0044] 实施例1是猪链球菌基因组的结构分析。

[0045] 实施例2研究了IgM蛋白酶血清型2针对血清型1的交叉保护。

[0046] 实施例3研究了IgM蛋白酶血清型2针对血清型7的交叉保护。

[0047] 实施例4研究了IgM蛋白酶血清型2针对血清型9序列型16的交叉保护。

[0048] 实施例5研究了血清型1和血清型7的IgM蛋白酶针对使用血清型1攻击提供的保护。

[0049] 实施例6研究了血清型1和血清型7的IgM蛋白酶针对使用血清型2攻击提供的保护。

[0050] 实施例7研究了血清型1和血清型7的IgM蛋白酶针对使用血清型7攻击提供的保护。

[0051] 实施例8研究了菌苗针对使用血清型9序列型16攻击提供的保护。

[0052] 实施例1

[0053] 在该实施例中,提供了猪链球菌基因组的分析,即,编码IgM蛋白酶的部分,以显示基因组的这一部分是如何构建的。为此,我们使用血清型2的猪链球菌细菌基因组,如从W0

2015/181356中已知的,在该专利申请中其以SEQ ID NO:1公开。该序列再次作为SEQ ID NO:1包含在本专利的序列表中。除了蛋白注释(PDBSum和InterPro)外,还使用Needleman-Wunsch比对(参见Needleman等,1970,Laskowski等,1997,Apweiler等,2000;默认设置)进行序列相似性检索,揭示了IgM蛋白酶基因组的结构,其中可以鉴定5个区域:

[0054] 区域1(Met 1-Thr 34):来自位置1的信号序列;

[0055] 区域2(Val 35-Glu 426):具有预测水解酶活性的Mac-1结构域;

[0056] 区域3(Thr 427-Pro 687):与结构功能(例如,涉及正确折叠)和底物结合有关的区域。

[0057] 区域4(Thr 688-Ser 919):由4个重复序列组成的区域(1*{Thr688-Ser 744}、2*{Thr 745-Ser 801}、3*{Thr 802-Ser 858}、4*{Thr859-Ser 919}),其与具有水解酶活性的已知蛋白序列相似;

[0058] 区域5(Thr 920-Lys 1141):包含指示细胞壁锚定功能的预测跨膜区域。

[0059] 其他血清型的猪链球菌细菌的结构基本相同,但对于血清型9序列型16,存在显著差异(如下所示):

[0060] -信号肽在猪链球菌菌株之间高度保守;

[0061] -Mac-1结构域始终存在,在所有已知菌株中高度保守,包括血清型9序列型16菌株;

[0062] -与结构功能连接的区域3总是存在,也是高度保守的,但是仅为血清型9序列型16长度的约一半;

[0063] -关于CNV区域,不同血清型之间的重复序列非常相似,但数量不同,通常在2至6之间。血清型9序列型16具有12个完全不同类型的重复序列,其与其他血清型的那些相比短的多(即,12个AA而不是约60个),并且可以细分为三种基本上不同的重复序列;

[0064] -细胞粘附区在不同血清型之间也是高度保守的,但与血清型9序列型16菌株的区域几乎没有氨基酸序列同一性。

[0065] 简言之,在大多数血清型和序列类型中,基因组结构基本相同,最显著的差异是CNV区域的重复序列数。就Mac-1结构域而言,血清型9序列型16的基因组的IgM蛋白酶部分高度相似,但其余部分基本上不同。

[0066] 实施例2

[0067] 研究目的

[0068] 从现有技术可知,猪链球菌血清型2(SEQ ID NO:1)的全IgM蛋白酶针对同源攻击提供了极好的保护。此外,针对血清型9和血清型14的一些交叉保护是本领域公知的。在本实施例中,评估了使用该抗原针对血清型1攻击的实际保护水平。为此,使用了序列型13的菌株,这是常见的细菌类型,也是该血清型在现场的良好代表。

[0069] 研究设计

[0070] 首先,为了评估对血清型1细菌攻击的保护作用,唯一可用的攻击模型是对3周龄仔猪进行攻击的模型。这意味着,为了评估IgM蛋白酶抗原诱导的保护作用,仔猪本身不能接种疫苗,因为那时产生有效免疫应答的时间预计太短。因此,为了评估疫苗提供的保护,母猪在产前接种疫苗,从而通过摄入初乳将诱导的抗体转移到仔猪身上。从现有技术(US10,751,403)中已知,当IgM蛋白酶抗原在接种疫苗的动物自身中提供保护时,其也为接

种疫苗的母猪的后代提供极好的保护。换言之,在该(间接)攻击模型中看到的保护指示了在接种疫苗的动物自身中提供的保护,当然,仅次于通过摄入接种疫苗的母猪的初乳提供给仔猪的保护。

[0071] 本研究使用了10只妊娠母猪,分为2组,每组5只。一组在预期分娩前6周和2周接种亚单位疫苗,该亚单位疫苗包含血清型2的重组rIdeSsuis IgM蛋白酶抗原(Seele等: Vaccine 33:2207-2212;2015年5月5日,第2.2部分),每剂在水包油佐剂中80 μ g (μ Diluvac Forte, MSD Animal Health),一组作为未接种疫苗的对照组。分娩后,在3周龄时,从来自接种疫苗母猪中选择10只仔猪和从对照母猪中选择10只仔猪(每组包含每只母猪的2只仔猪)进行攻击。仔猪(2x10,接种疫苗者和对照)使用导管或(如果不可能)替代地通过气管内注射用10mL攻击接种物(目标为 5.0×10^{10} CFU/mL)进行气管内攻击。攻击后,每天观察仔猪感染S.suis的临床体征,如抑郁、运动问题和/或神经症状,并使用从0(无症状)到3的常规评分系统对严重病例进行评分。对达到人道终点的动物实施安乐死。在接种疫苗前后(10只母猪)定期和攻击前(20只仔猪)立即采集血清用于抗体测定。在攻击前后定期采集肝素血(20只仔猪),以重新分离攻击菌株。在研究结束时(即,攻击后11天),对所有存活仔猪进行安乐死。

[0072] 结果

[0073] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位(即,局部)或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时期的攻击后数据如表1中所示。

[0074] 表1:攻击后数据

组别	平均临床评分	攻击后死亡	存活时间(天数)	阳性血液分离
1	50.8	7/10	5.2	10/10
2	30.6	5/10	7.5	9/10

[0076] 结论

[0077] 血清型2的IgM蛋白酶针对使用血清型1猪链球菌细菌的攻击不能提供保护。

[0078] 实施例3

[0079] 研究目的

[0080] 在该实施例中,评估了使用与实施例2中使用的相同抗原(血清型2的IgM蛋白酶)针对血清型7攻击的实际保护水平。为此,使用了序列型29的菌株,这是常见细菌类型,也是该血清型在现场的代表。

[0081] 研究设计

[0082] 与血清型1一样,为了评估针对使用血清型7细菌攻击的保护作用,唯一可用的攻击模型是对3.5周龄仔猪进行攻击的模型。因此,在本研究中,母猪也在产前接种疫苗,从而通过摄入初乳将诱导的抗体转移到仔猪身上。

[0083] 本研究使用了10只妊娠母猪,分为2组,每组5只。一组在预期分娩前6周和2周接种亚单位疫苗,该亚单位疫苗包含血清型2的重组rIdeSsuis IgM蛋白酶抗原(Seele等: Vaccine 33:2207-2212;2015年5月5日,第2.2部分),每剂在水包油佐剂中80 μ g (μ Diluvac Forte, MSD Animal Health),一组作为未接种疫苗的对照组。分娩后,在3.5周龄时,从来自接种疫苗母猪中选择10只仔猪和从对照母猪中选择10只仔猪(每组包含每只母猪的2只仔猪)进行攻击。用10mL接种物(目标为 1.0×10^9 CFU/mL)对仔猪(2x10,接种疫苗者和对照)进

行气管内攻击。攻击后,每天观察仔猪感染*S. suis*的临床体征,如抑郁、运动问题和/或神经症状,并使用从0(无症状)到3的常规评分系统对严重病例进行评分。对达到人道终点的动物实施安乐死。在接种疫苗前后(10只母猪)定期和攻击前(20只仔猪)立即采集血清用于抗体测定。在攻击前后定期采集肝素血(20只仔猪),以重新分离攻击菌株。在研究结束时(即,攻击后11天),对所有存活仔猪进行安乐死。

[0084] 结果

[0085] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时间的攻击后数据如表2中所示。

[0086] 表2:攻击后数据

组别	平均临床评分	攻击后死亡	存活时间(天数)	阳性血液分离
1	13.2	7/10	7.2	3/10
2	11.4	5/10	7.4	4/10

[0088] 结论

[0089] 血清型2的IgM蛋白酶针对使用血清型7猪链球菌细菌的攻击不能提供保护。

[0090] 实施例4

[0091] 研究目的

[0092] 本研究的目的是测试使用与实施例2和实施例3中使用的相同抗原(即,血清型2的IgM蛋白酶)针对血清型9攻击(特别是使用血清型9序列型16的细菌攻击)的实际保护水平。

[0093] 研究设计

[0094] 使用24只3周龄血清阴性SPF仔猪。将仔猪分为两组(均匀分布在不同窝中),每组10只。如实施例2和实施例3中所述,第1组在3周龄和5周龄时肌肉接种两次,第2组作为未接种疫苗的攻击对照组。在7周龄时,用如上所述的*S. suis*血清型9的毒力培养物对猪进行气管内攻击。攻击后,在10天期间每天观察猪感染*S. suis*的临床症状,如抑郁、运动问题和/或神经症状。在表现出特定的临床症状(即,运动或神经)后,将达到人道终点的动物在没有尸检的情况下安乐死。对达到人道终点但没有表现出特定临床症状的动物进行安乐死和尸检,包括进行细菌检查,以确证*S. suis*感染。在攻击前后定期采集肝素血,用于攻击菌株的再分离。在第一次接种疫苗当天(5周龄),猪针对血清型2来源的IgM蛋白酶是血清阴性的。

[0095] 结果

[0096] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时间的攻击后数据如表3中所示。

[0097] 表3:攻击后数据

组别	临床评分	存活时间(天数)	攻击后死亡	阳性血液分离
1	54	3.7	9/12	8/12
2	45	4.8	8/12	9/12

[0099] 结论

[0100] 血清型2的IgM蛋白酶针对使用血清型9序列型16猪链球菌细菌的攻击不能提供保护。

[0101] 实施例5

[0102] 研究目的

[0103] 在该实施例中,针对血清型1和血清型7猪链球菌菌株的IgM蛋白酶抗原评估针对血清型1攻击的保护。为此,制备与实施例2、实施例3和实施例4中使用的血清型2的IgM蛋白酶相对应的抗原,即,使用如本领域所述的E.coli表达系统(参见1e等,见上文)。用于血清型7的IgM蛋白酶抗原的序列显示在所附的SEQ ID NO:2中,而用于血清型1的IgM蛋白酶抗原的序列显示在所附的SEQ ID NO:3中。这两个序列都包括在Mac-1区域旁边的CNV区域,并且在该区域中具有2个重复序列。攻击菌株与在实施例2中使用的相同。

[0104] 研究设计

[0105] 研究设计与实施例2和实施例3相同,但是在每种情况下都使用3.5周龄的攻击仔猪,并且使用10只仔猪。每种血清型的攻击对应于实施例2和实施例3中的攻击。第1组用血清型1的IgM蛋白酶免疫接种,第2组用血清型7的IgM蛋白酶免疫接种以及第3组作为攻击对照。

[0106] 结果

[0107] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时间的攻击后数据如表4中所示。

[0108] 表4:攻击后数据

[0109]

组别	临床评分	存活时间(天数)	攻击后死亡	阳性血液分离
1	17	8.0	3/10	2/10
2	27	6.8	4/10	4/10
3	52	3.9	8/10	7/10

[0110] 结论

[0111] 从数据中可以得出结论,血清型1的IgM蛋白酶以及血清型7的IgM蛋白酶保护免受血清型1菌株的毒力攻击。血清型1抗原提供的同源保护似乎略好于血清型7抗原提供的异源保护。

[0112] 实施例6

[0113] 研究目的

[0114] 在该实施例中,针对血清型1和血清型7猪链球菌菌株的IgM蛋白酶抗原评估针对血清型2攻击的保护。为此,使用与实施例5中相同的抗原。攻击菌株是血清型2,序列型1菌株,其是现场菌株的代表。

[0115] 研究设计

[0116] 研究设计基本上与实施例4相同。使用30只3周龄仔猪。将仔猪分为三组(均匀分布在不同窝中),每组10只仔猪。第1组和第2组在3周龄和5周龄时用各自的亚单位疫苗进行两次肌肉接种,而第3组保持未接种。在7周龄时,用S.suis血清型2菌株的毒力培养物对猪进行气管内攻击。在攻击后11天期间,每天观察猪感染S.suis的临床症状,如抑郁、运动问题和/或神经症状。对达到人道终点(HEP)的动物实施安乐死。在攻击前即刻、攻击后2天以及如果适用,在HEP当天(安乐死前)采集肝素血,以重新分离攻击菌株。

[0117] 在第一次接种疫苗当天,仔猪血清呈阴性或在特异性IgM抗体ELISA中具有非常低的效价。在接种疫苗后,第1组和第2组显示出对IgM蛋白酶的良好抗体应答,而对照组仍在非常低的水平。

[0118] 结果

[0119] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时间的攻击后数据如表5中所示。在第1组中的一只动物因非猪链球菌的特定原因在攻击后不得不实施安乐死。

[0120] 表5:攻击后数据

[0121]	组别	临床评分	存活时间(天数)	攻击后死亡	阳性血液分离
	1(st1)	13.2	9.0	2/9	2/9
	2(st7)	3.5	10.5	1/10	1/10
	3(-)	61.7	1.4	10/10	10/10

[0122] 结论

[0123] 从数据中可以得出结论,血清型1的IgM蛋白酶以及血清型7的IgM蛋白酶保护免受血清型2菌株的毒力攻击。

[0124] 实施例7

[0125] 研究目的

[0126] 在该实施例中,针对血清型1和血清型7猪链球菌菌株的IgM蛋白酶抗原评估针对血清型7攻击的保护。为此,使用与实施例5和实施例6中相同的抗原。攻击菌株是血清型7,序列型29菌株,其是现场菌株的代表。

[0127] 研究设计

[0128] 研究设计与实施例5相同(除了攻击菌株以外)。针对每种血清型的攻击对应于在实施例2和实施例3中的攻击。第1组用血清型1的IgM蛋白酶接种,第2组用血清型7的IgM蛋白酶接种以及第3组作为攻击对照。

[0129] 结果

[0130] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时间的攻击后数据如表6中所示。

[0131] 表6:攻击后数据

[0132]	组别	临床评分	存活时间(天数)	攻击后死亡
	1(st1)	0.4	11	0/10
[0133]	2(st7)	2.9	11	1/10
	3(-)	12.6	9.2	3/10

[0134] 结论

[0135] 尽管该攻击似乎不如此前的研究中那样具有毒力,但从数据中可以得出结论,血清型1的IgM蛋白酶以及血清型7的IgM蛋白酶保护免受血清型7菌株的毒力攻击。

[0136] 实施例8

[0137] 研究目的

[0138] 本研究的目的是找到一种针对血清型9攻击的保护型抗原,特别是针对代表现场循环的菌株的血清型9序列型16的细菌的攻击。评估的选项是单独的菌苗以及与IgM蛋白酶组合的菌苗,其在本领域中认为提高菌苗的功效(参见Seele等,Journal of Bacteriology,p.930-940 2013年3月,第195卷第5期,“Identification of a Novel Host-Specific IgM Protease in Streptococcus suis”;以及在W02015/181356中确证)。

[0139] 研究设计

[0140] 研究设计与在实施例4中使用的相同,但是使用非SPF仔猪,并将其分成三组(均匀分布在不同窝中),每组12只仔猪。第1组在3周龄和5周龄时用含有灭活血清型9序列型16的猪链球菌菌苗以 2×10^9 个细胞的水平肌内接种两次。第2组还含有实施例2的IgM蛋白酶,每剂80 μ g。两种疫苗都在水包油佐剂中配制,如其他实施例所用。将第3组作为未接种疫苗的攻击对照组。在7周龄时,用如上所述的S.suis血清型9的毒力培养物对猪进行气管内攻击。在10天期间每天观察猪感染S.suis的临床症状,如抑郁、运动问题和/或神经症状。在表现出特定的临床症状(即,运动或神经)后,将达到人道终点的动物在没有尸检的情况下安乐死。对达到人道终点但没有表现出特定临床症状的动物进行安乐死和尸检,包括进行细菌检查,以确证S.suis感染。在攻击前后定期采集肝素血,用于攻击菌株的再分离。在第一次接种疫苗当天(5周龄),猪针对血清型2来源的IgM蛋白酶是血清阴性的。

[0141] 结果

[0142] 所有疫苗均未诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前一段时间的攻击后数据如表7中所示。第2组中的一只动物因非猪链球菌的特定原因在攻击后不得不实施安乐死。

[0143] 表7:攻击后数据

[0144]

组别	临床评分	存活时间(天数)	攻击后死亡	阳性血液分离
1	14.3	9.3	2/12	4/12
2	14.3	9.4	2/11	2/11
3	51.8	5.0	8/12	9/12

[0145] 结论

[0146] 针对血清型9序列型16的猪链球菌毒力攻击的保护可以由该血清型的菌苗以及菌苗与IgM蛋白酶的组合提供。这两种类型的抗原不会产生负面干扰,这与基于现有技术的预期一致。

[0147] 基于上述实施例,本发明的目的可以通过将猪链球菌血清型7或血清型1的IgM蛋白酶抗原与猪链球菌菌苗血清型9序列型16组合以联合疫苗接种策略实现。此外,据信,如果需要,也可以将两种IgM蛋白酶抗原组合,以获得对血清型1和血清型7攻击的更好保护。此外,有理由相信交叉保护水平与IgM蛋白酶的CNV区域中的重复序列数量有关,因为这是血清型1和血清型7的IgM蛋白酶分子与血清型2相比的差异:血清型1、血清型7IgM蛋白酶各有两个重复序列,而血清型2有四个重复序列。交叉保护存在差异的原因尚不清楚,但较低的重复序列数量似乎有利于达到更好的交叉保护水平。

序列表

<110> 英特维特国际股份有限公司

<120> 用于保护以对抗多种血清型的猪链球菌的疫苗

<130> 25273 25274 25279

<160> 3

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1141

<212> PRT

<213> 猪链球菌

<400> 1

Met Asn Ile Gln Glu Arg Phe Ser Leu Arg Lys Ser Ala Val Gly Leu
1 5 10 15

[0001]

Val Ser Val Ser Leu Leu Cys Ala Ile Tyr Thr Ser Thr Val Ala Ala
20 25 30

Asp Thr Val Val Thr Gly Val Asn Glu Ile Ile Glu Glu Ser Gln Val
35 40 45

Lys Asp Glu Val Ser Ile Glu Ser Glu Lys Asn Glu Ser Leu Asp Gly
50 55 60

Ser Asn Ile Glu Ile Val Glu Glu Ile Ala Asp Asn Ile Pro Ser Pro
65 70 75 80

Val Ile Ala Glu Gly Glu Val Ala Val Glu Met Lys Val Asp Arg Gly
85 90 95

Thr Glu Asn Val Val Ser Arg Asn Asp Thr Glu Val Thr Thr Ser Glu

100	105	110
Gln Asn Gln Ile Glu Val Thr	Glu Thr Lys Glu Ile Leu Asn Gln Thr	
115	120	125
Ser Tyr Gln Thr Glu Ser Gly	Glu Gln Arg Gln Ile Ile Trp Ala His	
130	135	140
Gly Ile Thr Pro Pro Ala Met	Glu Gln Ser Gly Gly Phe Val Lys Glu	
145	150	155 160
Lys Tyr Gly Asp Tyr Leu Asn Tyr Thr Ala Pro Phe Glu Ala Gly Lys		
165	170	175
Gly Tyr Tyr Asp Thr Asn Lys Ser Leu Asn Ala Ser Phe Ile Asp Leu		
180	185	190
[0002]		
Asn Leu Cys Phe Ala Ala Val Ser Ser Asn Met Val His Trp Trp Leu		
195	200	205
Glu Gln Asn Ser Ser Tyr Val Glu Arg Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Gly		
210	215	220
Thr Val Asn Val Glu Glu Asn Tyr Ala Ile Thr Asp Leu Arg Arg Tyr		
225	230	235 240
Ile Asn Ser Phe Gln Asn Gln Gln Asn Ser Arg Val Phe Asp Met Phe		
245	250	255
Lys Thr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Thr Asn Gly Phe Val Ser Asp Ala Leu		
260	265	270
Val Asp Leu Phe Ile Asn Gly Tyr Lys Pro Lys Ala Gln Gly Gly Val		

275	280	285
Asn Leu Glu Asp Ser Gln Leu Val Pro Asp Ser Arg Gly Gly Phe Phe		
290	295	300
Tyr Asp Val Phe Lys Glu Lys Lys Leu Thr Asn Arg Ile Phe Ser Gly		
305	310	315 320
Ser Tyr Glu Arg Phe Gly Glu Asp Val Arg Thr Val Leu Glu Ser Lys		
325	330	335
Gly Leu Leu Gly Leu Thr Tyr Arg Thr Leu Gly Tyr Ala Thr His Ile		
340	345	350
Val Thr Val Trp Gly Ala Glu Tyr Asp Asn Gln Gly Lys Ile Lys Ala		
355	360	365
[0003]		
Val Tyr Ile Thr Asp Ser Asp Asp Gln Gln Glu Gln Ile Gly Leu Lys		
370	375	380
Arg Met Gly Ile Thr Arg Asp Ala Ser Gly Asn Pro Arg Leu Asn Asn		
385	390	395 400
His Met Lys Asn Asn Ser Ala Gly Ala Leu Leu Asp Tyr Val His Thr		
405	410	415
Ile Arg Leu Gly Gln Asp Leu Trp Glu Glu Tyr Phe Asn Pro Leu Ala		
420	425	430
Lys Ala Lys Glu Thr Ala Ser Gln Thr Leu Ala Asp Thr Lys Lys Ala		
435	440	445
Leu Asp Leu Ser Ile Gln Gly Gln Ser Glu Leu Pro Glu Ser Met Arg		

450	455	460
Leu Ile Tyr Leu Glu Lys Leu Asn Asn Leu Tyr Asn Gln Gly Ile Leu		
465	470	475 480
Ser Ile Gln Lys Ala Glu Ser Ser Glu Met Leu Ser Gly Ala Leu Glu		
	485	490 495
Asn Gly Leu Asn Ser Leu Lys Ser Leu Asp Phe Pro Ile Ser Glu Val		
	500	505 510
Gly Asn Ala Leu Ala Pro Asp Leu Pro Val Gly Asp Arg Ser Thr Val		
	515	520 525
Ser Asp Val Asp Ser Leu Ser Ser Gln Glu Thr Ser Ser Thr Asn Leu		
	530	535 540
[0004]		
Glu Ala Asp Thr Glu Asn Ala Gly Ile Ile Ala Asp Gly Thr Asn Gln		
545	550	555 560
Leu His Phe Pro Val Glu Ala Gln Thr Thr Ser Ser Val Glu Ala Glu		
	565	570 575
Gly Asp Asn Val Phe Glu Gln Glu Ala Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ile		
	580	585 590
Glu Asn Lys Asp Glu Phe Gly Ser Glu Leu Ser Arg Asn Met Gln Thr		
	595	600 605
Ser Glu Thr Asp Ser Leu Val Val Ala Val Glu Glu Asp Val Lys Asn		
610	615	620
Asp Glu Val Ala Gln Val Glu Glu Leu Leu Glu Ser Glu Lys Val Glu		

625	630	635	640
Asn Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Asp Thr Leu Ile Val Glu Ser Ala			
645	650	655	
Asn Asp Lys Glu Glu Asp Arg Val Glu Ala Val Val Ser Glu Gln Pro			
660	665	670	
Asp Ser Ile Pro His Gln Asn Val Glu Ile Ser Leu Val Glu Pro Thr			
675	680	685	
Asn Val Glu Thr Glu Thr Val Val Thr Pro Ile Asn Asp Ala Ala Thr			
690	695	700	
Pro His Gly Ser Pro Thr Tyr Ile Asp Asn Ser Val Thr Glu Ser Val			
705	710	715	720
[0005]			
Ala Thr Pro Leu Glu Lys Asp Ser Ile Gln Ala Gly Glu Thr Glu Ile			
725	730	735	
Ala Glu Pro Thr Ser Ser Glu Ser Thr Asn Val Glu Thr Glu Thr Val			
740	745	750	
Val Thr Pro Val Asn Asp Val Ala Thr Pro His Gly Ser Pro Thr Tyr			
755	760	765	
Ile Asp Asn Ser Val Thr Glu Ser Val Ala Thr Pro Leu Glu Lys Asp			
770	775	780	
Ser Ile Gln Ala Gly Glu Thr Glu Ile Ala Glu Pro Thr Ser Ser Glu			
785	790	795	800
Ser Thr Asn Val Glu Thr Glu Thr Val Val Thr Pro Val Asn Asp Val			

805

810

815

Ala Thr Pro His Gly Ser Pro Thr Tyr Ile Asp Asn Ser Val Thr Glu
820 825 830

Ser Val Ala Thr Pro Leu Glu Lys Asp Ser Ile Gln Ala Gly Glu Thr
835 840 845

Glu Ile Ala Glu Pro Thr Ser Ser Glu Ser Thr Ser Val Glu Ala Glu
850 855 860

Leu Val Asp Asn Ser Glu Ile His Ala Ala Thr Ser Ser Val Thr Pro
865 870 875 880

Cys Gly Ser Ser Ala Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Thr Glu Ser Val Ala
885 890 895

[0006]

Thr Pro Leu Glu Lys Asp Ser Ile Gln Thr Gly Asn Thr Glu Ile Ala
900 905 910

Glu Pro Thr Ser Ser Lys Ser Thr Asn Val Glu Ala Ala Ser Val Asp
915 920 925

Asn Ser Glu Ile His Ala Asp Ala Ser Leu Thr Ala Val Ser Ser Val
930 935 940

Asn Leu Asp Asn Pro Val Ile Glu Pro Val Ala Ile Ser Leu Ile Gly
945 950 955 960

Ser Lys Arg Asp Thr Asn Ala Glu Val Glu Val Ser Ser Leu Ser Lys
965 970 975

Arg Glu Val Arg Lys Thr Asn Thr Asp Gly Leu Ile Ser Val Gln Ser

	980	985	990
Lys Val Ile Lys Lys Glu Leu Leu		Glu Ser Ser Leu Ala	Glu Ala Gly
995		1000	1005
Ser Pro Leu Leu Glu Ala Thr		Ile Ala Gln Ser Ser	Asn Ser Asn
1010		1015	1020
Ser Thr Glu Ile Gly Met Ser		Tyr Gln Asn Thr Val	Leu Leu Glu
1025		1030	1035
Ser Asn Asn Thr Glu Arg Gln		Val Ser Lys Ala Glu	Ile Val Met
1040		1045	1050
Glu His Lys Glu Thr Glu Leu		Val Glu Thr Val Ser	Ser Ala Ser
1055		1060	1065
[0007]			
Glu Pro Val Val Leu Val Glu		Asn Ile Ser Gln Thr	Ser Asn Asn
1070		1075	1080
Thr Ile Glu Ser Gly Lys Asn		Met Gly Val Gln Ser	Gln Ala Gly
1085		1090	1095
Ala Lys Gln Ile Leu Gly Val		Glu Gln Ser Ser Lys	Val Ser Thr
1100		1105	1110
Pro Thr Ser Arg Gln Ile Met		Gly Val Gly Leu Leu	Thr Leu Val
1115		1120	1125
Leu Gly Ser Ala Leu Gly Leu		Leu Lys Lys Arg Arg	Lys
1130		1135	1140
<210> 2			

<211> 980

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的猪链球菌血清型 7 的 IgM 蛋白酶，没有信号序列和 25 个氨基酸的尾，但具有 His 标签

<400> 2

Met Asp Thr Val Val Thr Gly Val Asn Glu Ile Ile Glu Glu Ser Gln
1 5 10 15

Val Lys Asp Glu Val Ser Ile Glu Ser Glu Lys Asn Glu Ser Leu Asp
20 25 30

Gly Ser Asn Ile Glu Ile Val Glu Glu Ile Ala Asp Asn Ile Pro Ser
35 40 45

[0008]

Pro Val Ile Ala Glu Gly Glu Val Ala Val Glu Met Lys Val Asp Arg
50 55 60

Gly Thr Glu Asn Val Val Ser Arg Asn Asp Thr Glu Val Thr Thr Ser
65 70 75 80

Glu Gln Asn Gln Ile Glu Val Thr Glu Thr Lys Glu Ile Leu Asn Gln
85 90 95

Thr Ser Tyr Gln Thr Glu Ser Gly Glu Gln Arg Gln Ile Ile Trp Ala
100 105 110

His Gly Ile Thr Pro Pro Ala Met Glu Gln Ser Gly Gly Phe Val Lys
115 120 125

Glu Lys Tyr Gly Asp Tyr Leu Asn Tyr Thr Ala Pro Phe Lys Ala Gly
130 135 140

	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Thr	Asn	Lys	Ser	Leu	Asn	Ala	Ser	Phe	Ile	Asp	
	145						150				155					160	
	Leu	Asn	Leu	Cys	Phe	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Asn	Met	Val	His	Trp	Trp	
					165					170					175		
	Leu	Glu	Gln	Asn	Ser	Ser	Tyr	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	
				180						185					190		
	Gly	Thr	Val	Asn	Val	Gly	Glu	Asn	Tyr	Ala	Ile	Thr	Asp	Leu	Arg	Arg	
			195						200					205			
	Tyr	Ile	Asp	Ser	Phe	Gln	Asp	Gln	Gln	Asn	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Met	
	210							215					220				
[0009]	Phe	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Thr	Asn	Gly	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	
	225						230				235					240	
	Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Gly	Gly	
					245					250					255		
	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Arg	Gly	Gly	Phe	
			260						265					270			
	Phe	Tyr	Asp	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Lys	Leu	Thr	Asn	Arg	Ile	Phe	Ser	
			275						280					285			
	Gly	Ser	Tyr	Glu	Arg	Phe	Gly	Glu	Asp	Val	Arg	Thr	Val	Leu	Glu	Ser	
		290						295					300				
	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Thr	Leu	Gly	Tyr	Ala	Thr	His	
	305					310					315				320		

	Ile Val Thr Val Trp Gly Ala Glu Tyr Asp Asn Gln Gly Lys Ile Arg	
	325	330 335
	Ala Val Tyr Ile Thr Asp Ser Asp Asp Gln Gln Glu Gln Ile Gly Leu	
	340	345 350
	Lys Arg Met Gly Ile Thr Arg Asp Ala Ser Gly Asn Pro Arg Leu Asn	
	355	360 365
	Asn His Val Lys Asn Asn Ser Ala Gly Ala Leu Leu Asp Tyr Val His	
	370	375 380
	Thr Ile Arg Leu Gly Gln Asp Leu Trp Glu Glu Tyr Phe Asn Pro Phe	
	385	390 395 400
[0010]	Ala Lys Ala Lys Glu Ile Ala Ser Gln Ile Leu Ala Asp Arg Lys Lys	
	405	410 415
	Ala Leu Val Leu Ser Ile Gln Gly Gln Ser Glu Leu Pro Glu Ser Met	
	420	425 430
	Arg Leu Ile Tyr Leu Glu Lys Leu Asn Asn Leu Tyr Asn Gln Gly Ile	
	435	440 445
	Leu Ser Ile Gln Lys Thr Glu Ser Ser Glu Met Leu Ser Gly Ala Leu	
	450	455 460
	Glu Asn Gly Leu Asn Ser Leu Lys Ser Leu Asp Phe Pro Ile Ser Glu	
	465	470 475 480
	Val Gly Asn Ala Leu Ala Pro Asp Leu Ser Val Gly Asp Arg Ser Thr	
	485	490 495

	Val	Ser	Asp	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Gln	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Asn
				500					505						510	
	Leu	Glu	Ala	Asp	Thr	Glu	Asn	Ala	Gly	Ile	Ile	Ala	Asp	Gly	Thr	Asn
				515				520						525		
	Gln	Leu	His	Phe	Pro	Val	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Val	Glu	Ala
				530				535					540			
	Glu	Gly	Asp	Asn	Val	Phe	Glu	Gln	Glu	Ala	Asp	Thr	Leu	Pro	Ile	Ile
	545					550					555				560	
	Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Glu	Phe	Gly	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Asn	Met	Gln
				565					570						575	
[0011]	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Ser	Leu	Val	Val	Ala	Val	Glu	Glu	Asp	Val	Lys
				580					585					590		
	Asn	Asp	Glu	Val	Asp	Gln	Val	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Glu	Lys	Val
				595				600					605			
	Glu	Asn	Gln	Ser	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Glu	Gly
	610						615					620				
	Ala	Asn	Asp	Lys	Glu	Glu	Asp	Arg	Val	Glu	Ala	Val	Val	Ser	Glu	Gln
	625					630					635				640	
	Pro	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Gln	Asn	Val	Glu	Ile	Ser	Pro	Val	Glu	Pro
				645					650						655	
	Met	Asn	Val	Glu	Thr	Glu	Ser	Val	Val	Thr	Pro	Ile	Asn	Asp	Ala	Ala
				660					665					670		

	Val Ile Lys Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser Leu Val Glu Ala Gly Ser	
	850	855 860
	Pro Leu Leu Glu Ala Thr Ile Ala Gln Ser Ser Asn Ser Asn Ser Thr	
	865	870 875 880
	Glu Ile Gly Met Ser Tyr Gln Asn Thr Val Leu Leu Glu Ser Asn Asn	
		885 890 895
	Thr Glu Arg Gln Val Ser Lys Ala Glu Ile Val Ile Glu His Lys Glu	
		900 905 910
	Thr Glu Leu Val Glu Thr Val Ser Ser Ala Ser Glu Pro Val Val Leu	
		915 920 925
[0013]	Val Glu Asn Ile Ser Gln Thr Ser Asn Asn Thr Ile Glu Ser Gly Lys	
	930	935 940
	Asn Met Gly Val Gln Ser Gln Ala Gly Ala Lys Gln Ile Leu Gly Ile	
	945	950 955 960
	Glu Gln Ser Ser Lys Val Ser Thr Pro Thr His His His His His His	
		965 970 975
	His His His His	
		980
	<210> 3	
	<211> 980	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 修饰的猪链球菌血清型 1 的 IgM 蛋白酶，没有信号序列和 25 个氨基酸的尾，但具有 His 标签

<400> 3

Met Asp Thr Val Thr Thr Arg Glu Asn Leu Thr Ile Glu Glu Leu Gln
1 5 10 15

Glu Lys Glu Glu Ala Ser Thr Glu Ser Glu Lys Leu Gly Ser Leu Asp
20 25 30

Asp Ser Ser Ser Glu Ile Val Glu Lys Val Val Asp Asn Ile Pro Ser
35 40 45

Ser Ile Gly Ala Glu Arg Asp Gly Ala Val Glu Met Lys Val Asp Arg
50 55 60

[0014] Gly Thr Glu Asn Val Val Ser Arg Asn Asp Thr Glu Val Thr Thr Ser
65 70 75 80

Glu Gln Asn Gln Ile Glu Val Thr Glu Thr Lys Glu Ile Leu Asn Gln
85 90 95

Thr Ser Tyr Gln Thr Glu Ser Gly Glu Gln Arg Gln Ile Val Trp Ala
100 105 110

Tyr Gly Ile Thr Pro Pro Val Met Glu Gln Lys Gly Gly Phe Val Lys
115 120 125

Glu Lys Tyr Gly Asp Tyr Leu Asn Tyr Thr Ala Pro Phe Glu Ala Gly
130 135 140

Lys Gly Tyr Tyr Asp Thr Asn Lys Ser Leu Asn Ala Ser Phe Ile Asp
145 150 155 160

	Ala Val Tyr Ile Thr Asp Ser Asp Asp Gln Gln Glu Gln Ile Gly Leu	
	340	345 350
	Lys Arg Met Gly Ile Thr Arg Asp Ala Ser Gly Asn Pro Arg Leu Asn	
	355	360 365
	Asn His Val Lys Asn Asn Ser Ala Gly Ala Leu Leu Asp Tyr Val His	
	370	375 380
	Thr Ile Arg Leu Gly Gln Asp Leu Trp Glu Glu Tyr Phe Asn Pro Leu	
	385	390 395 400
	Ala Lys Ser Lys Glu Ile Ala Ser Gln Thr Leu Ala Asp Thr Lys Lys	
	405	410 415
[0016]	Ala Leu Asp Leu Ser Ile Gln Gly Gln Ser Glu Leu Pro Glu Ser Met	
	420	425 430
	Arg Leu Ile Tyr Leu Glu Lys Leu Asn Asn Leu Tyr Asn Gln Gly Ile	
	435	440 445
	Leu Ser Ile Gln Lys Ala Glu Ser Ser Glu Met Leu Ser Gly Ala Leu	
	450	455 460
	Glu Asn Gly Leu Asn Ser Leu Lys Ser Leu Asp Phe Pro Ile Ser Glu	
	465	470 475 480
	Val Gly Asn Ala Leu Ala Pro Asp Leu Pro Val Gly Asp Arg Ser Thr	
	485	490 495
	Val Ser Asp Val Asp Ser Leu Ser Ser Gln Glu Thr Ser Ser Thr Asn	
	500	505 510

	Val	Ala	Thr	Pro	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Ile	Gln	Ala	Gly	Glu	Thr	Glu	
	690						695						700				
	Asn	Ala	Glu	Pro	Thr	Ser	Ser	Glu	Ser	Thr	Ser	Val	Glu	Ala	Glu	Leu	
	705					710					715					720	
	Val	Asp	Asn	Ser	Glu	Ile	His	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Cys	
					725					730						735	
	Gly	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Ser	Val	Ala	Thr	
				740						745						750	
	Pro	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Ile	Gln	Thr	Gly	Asn	Thr	Glu	Ile	Ala	Glu	
		755						760								765	
[0018]	Pro	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Asn	Val	Glu	Ala	Ala	Ser	Val	Asp	Asn	
	770						775									780	
	Ser	Glu	Ile	His	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	Val	Asn	
	785					790					795					800	
	Leu	Asp	Asn	Pro	Val	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Ile	Ser	Leu	Ile	Gly	Ser	
					805						810					815	
	Lys	Arg	Asp	Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Glu	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Lys	Arg	
					820						825					830	
	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Gly	Leu	Ile	Ser	Val	Gln	Ser	Lys	
					835					840						845	
	Val	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Gly	Ser	
	850						855									860	

Pro Leu Leu Glu Ala Thr Ile Ala Gln Ser Ser Asn Ser Asn Ser Thr
865 870 875 880

Glu Ile Gly Met Ser Tyr Gln Asn Thr Val Leu Leu Glu Ser Asn Asn
885 890 895

Thr Glu Arg Gln Val Ser Lys Ala Glu Ile Val Met Glu His Lys Glu
900 905 910

Thr Glu Leu Val Glu Thr Val Ser Ser Ala Ser Glu Pro Val Val Leu
915 920 925

[0019]

Val Glu Asn Ile Ser Gln Thr Ser Asn Asn Thr Ile Glu Ser Gly Lys
930 935 940

Asn Met Gly Val Gln Ser Gln Ala Gly Ala Lys Gln Ile Leu Gly Val
945 950 955 960

Glu Gln Ser Ser Lys Val Ser Thr Pro Thr His His His His His His
965 970 975

His His His His
980