



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105793276 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201480066380.7

(22)申请日 2014.12.02

(30)优先权数据

13195402.6 2013.12.03 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/076313 2014.12.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/082501 EN 2015.06.11

(71)申请人 维罗米蒂克斯股份公司

地址 瑞士施利伦

申请人 瑞士热带疾病与公共卫生研究所

巴塞尔大学 苏黎士大学

(72)发明人 A·加斯帕里安 A·祖尼加

N·盖伯 M·坦博里尼 M·尤德

G·普卢施克 A·马雷罗诺达尔斯

J·A·鲁滨逊

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 14/315(2006.01)

A61K 39/09(2006.01)

A61K 39/085(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书43页

序列表21页 附图1页

(54)发明名称

针对肺炎链球菌进行保护的富含脯氨酸的肽

(57)摘要

本发明涉及脂肽,其由肽链组成,所述肽链包含平行卷曲螺旋结构域、富含脯氨酸的肽抗原和脂质部分,它们均通过共价连接,聚集成合成病毒样颗粒。关注的富含脯氨酸的肽抗原包含带负电荷和带正电荷的氨基酸,且至少15%的氨基酸是脯氨酸。这类携带富含脯氨酸的来源于肺炎球菌蛋白的抗原的合成的病毒样颗粒用作抵抗由革兰氏阳性菌例如肺炎链球菌导致的感染性疾病。

1. 脂肽结构单元, 由如下组成:

(1) 包含平行卷曲螺旋结构域的肽链, 其作为自立式的无脂质的肽, 形成平行的二聚化、三聚化或更高级寡聚化螺旋束;

(2) 包含至少一个带负电荷的氨基酸和至少一个带正电荷的氨基酸的富含脯氨酸的肽抗原, 且其中至少15%的氨基酸是脯氨酸, 其任选地连接至另外的抗原; 和

(3) 包含2或3个长烃基链的脂质部分,

其中肽链、富含脯氨酸的肽抗原和脂质部分直接或通过连接体共价连接。

2. 权利要求1的脂肽结构单元, 其中肽链包含21至200个氨基酸残基。

3. 权利要求1或2的脂肽结构单元, 其中肽链包含由3-8个七基序组成的卷曲螺旋结构域。

4. 权利要求3的脂肽结构单元, 其中在卷曲螺旋结构域中, 每个七基序(abcdefg)中的位置a和d包含具有小至中等大小疏水性侧链和/或具有芳族或杂芳族侧链的 α -氨基酸, 在所有a和d位置的0、1或2个中具有极性不带电荷的残基的氨基酸, 且在所有a和d位置的0或1个中具有极性阳离子残基的氨基酸或其酰化衍生物、或具有极性阴离子残基的氨基酸、或甘氨酸。

5. 权利要求4的脂肽结构单元, 其中

具有小至中等大小疏水性侧链的 α -氨基酸是丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;

具有芳族或杂芳族侧链的 α -氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸;

具有极性不带电荷的残基的 α -氨基酸是天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸;

具有极性阳离子残基的 α -氨基酸是精氨酸、赖氨酸和组氨酸; 和

具有极性阴离子残基的 α -氨基酸是天冬氨酸和谷氨酸。

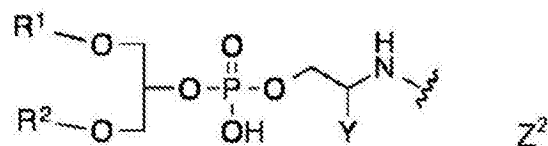
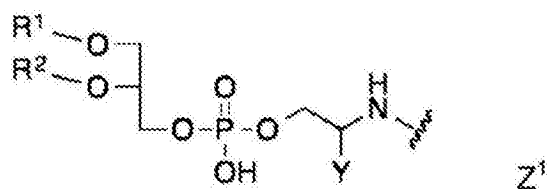
6. 权利要求1-5中任一项的脂肽结构单元, 其中富含脯氨酸的肽抗原包含至少一个谷氨酸残基和至少一个赖氨酸或精氨酸残基。

7. 权利要求1-6中任一项的脂肽结构单元, 其中富含脯氨酸的肽抗原来源于链球菌和/或葡萄球菌的蛋白质。

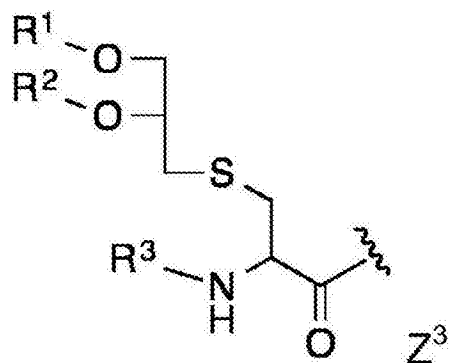
8. 权利要求1-6中任一项的脂肽结构单元, 其中富含脯氨酸的肽抗原来源于蛋白质PspA和/或PspC。

9. 权利要求1-8中任一项的脂肽结构单元, 其中富含脯氨酸的肽抗原包含SEQ ID NO: 27-112的肽和这样的肽, 其中1、2或3个氨基酸被另外的氨基酸替代。

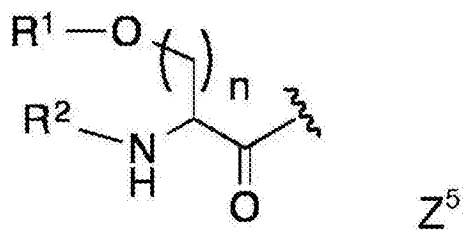
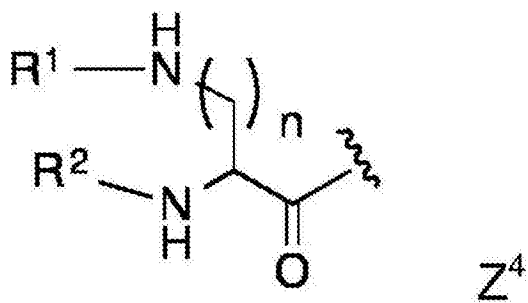
10. 权利要求1-9任一项的脂肽结构单元, 其中脂质部分是类型Z¹-Z⁸之一:



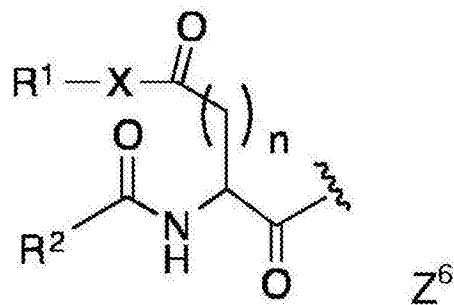
其中 R^1 和 R^2 是长烃基或是长烃基-C=O, 且Y是H或COOH,



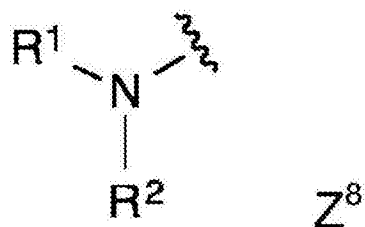
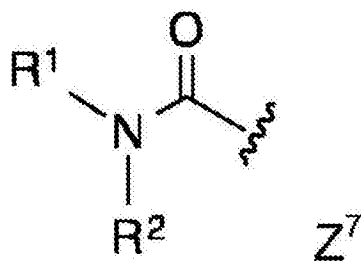
其中 R^1 、 R^2 和 R^3 是长烃基或是长烃基-C=O或 R^1 和 R^2 是长烃基或是长烃基-C=O, 且 R^3 是H或乙酰基或低级烷基-C=O,



其中 R^1 和 R^2 是长烃基或是长烃基-C=O, 且n是1、2、3或4,



其中 R^1 和 R^2 是长烃基, X 是O或NH,且 n 是1、2、3或4;或



其中 R^1 和 R^2 是长烃基,

且其中长烃基是由8-25个碳原子和任选地1、2或3个链中的双键组成的直链或支链烷基或烯基。

11. 权利要求10的脂肽结构单元,其中脂质部分是式 Z^3 的二-棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰基,其中 R^1 和 R^2 是棕榈酰基,且 R^3 是H或乙酰基。

12. 权利要求1-11中任一项的脂肽结构单元,其中包含平行卷曲螺旋的肽链在一个末端上连接至PR肽抗原并且在另一个末端上连接至脂质部分。

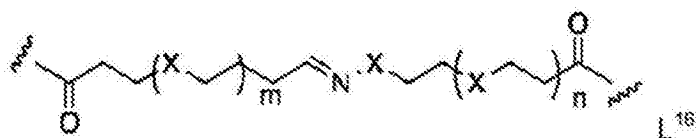
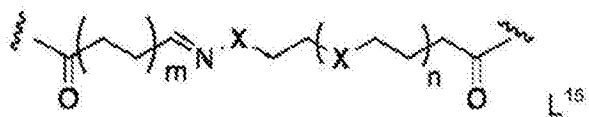
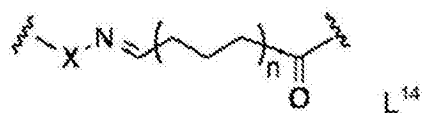
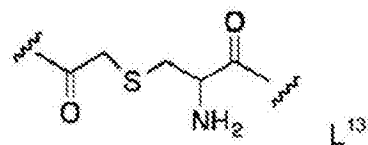
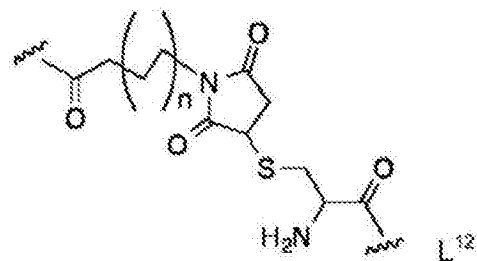
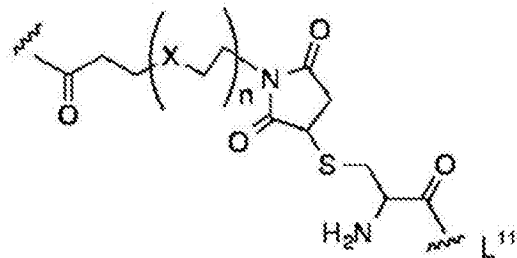
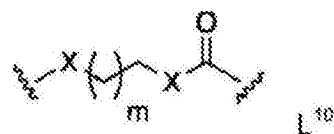
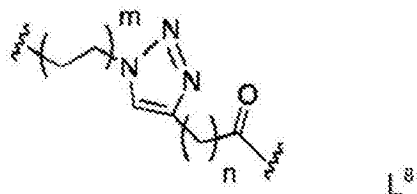
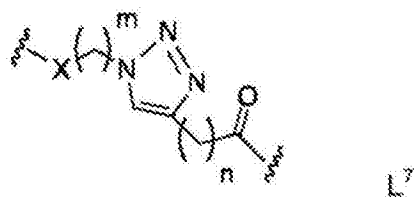
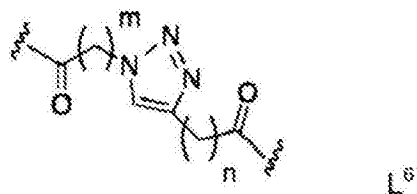
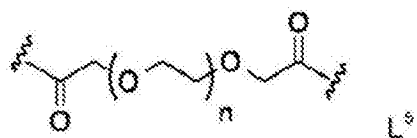
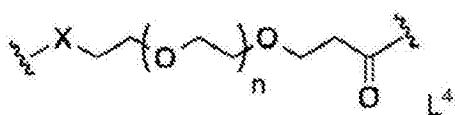
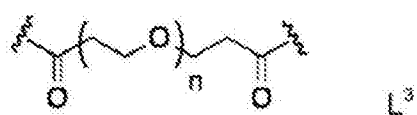
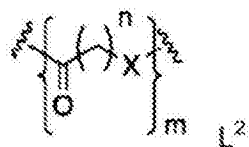
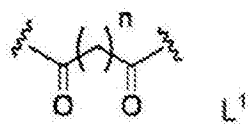
13. 权利要求12的脂肽结构单元,其中肽链PC与脂质部分LM在该肽链的一个末端或接近一个末端上直接共价连接为:

LM-PC (1)

或通过连接体(L)共价连接为:

LM-L-PC (2)

其中连接体L选自:



其中X是O或NH,m是1至45,且n是1至45。

14. 合成病毒样颗粒,由螺旋脂肽束组成,该螺旋脂肽束包含2、3、4、5、6或7个根据权利要求1-13中任一项的脂肽结构单元。

15. 包含权利要求14的合成病毒样颗粒的疫苗。

16. 抵抗由革兰氏阴性菌导致的疾病的接种方法, 其中对此需要的患者施用免疫原性有效量的根据权利要求14的合成病毒样颗粒。

针对肺炎链球菌进行保护的富含脯氨酸的肽

发明领域

[0001] 本发明涉及由肽链组成的聚集成合成病毒样颗粒的多聚化脂肽,所述肽链包含平行卷曲螺旋结构域、富含脯氨酸的肽抗原和脂质部分,它们均通过共价连接。这些携带富含脯氨酸抗原的合成病毒样颗粒用作抵抗由革兰氏阳性菌例如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)导致的感染性疾病的疫苗。

[0002] 发明背景

[0003] 革兰氏阳性细菌(包括链球菌(*Streptococci*)或葡萄球菌(*Staphylococci*))是众多严重性疾病的病原体和病原,所述疾病包括肺炎、脓毒症、脑膜炎、伤口感染、心内膜炎、急性风湿热、新生儿脓毒症或中毒性休克综合征。因此,对于开发抵抗这些病原体的疫苗存在需求。已经得到用于一些肺炎链球菌血清型的疫苗;它们存在缺陷,例如高度复杂性的生产过程。

[0004] 肺炎链球菌是高度不同的多糖包裹的甲型溶血性链球菌,其通常定居于人鼻咽并且可以导致非侵害性肺炎球菌性疾病,例如中耳炎、鼻窦炎和非菌血症性肺炎,和更严重性的侵害性疾病,例如菌血症/脓毒症、脑膜炎和菌血症性肺炎,主要是在年轻的儿童和中老年人中。

[0005] 多糖荚膜是侵害过程中主要的毒力决定因素并且防止C3b调理素作用和嗜中性粒细胞的非调理素杀伤作用。目前得到批准的疫苗包含单独地配制在肺炎球菌多糖菌苗(PPSV)中的荚膜多糖抗原类或在肺炎球菌缀合物疫苗(PCV)中与载体蛋白例如修饰的白喉毒素CRM 197缀合的荚膜多糖抗原类。存在40种血清群中的90种以上的不同荚膜血清型。

[0006] 多糖肺炎球菌菌苗可以提供血清型-特异性保护作用,但交叉保护作用甚至在同一血清群中较低。在2000年,在美国引入缀合疫苗**Prevnar®7**后已经观察到了血清型的替代品。在新出现的血清型中还有多重耐药荚膜-切换变体。因此,对于下一代靶向非荚膜的其它抗原的肺炎球菌疫苗存在需求。

[0007] 用于包含入下一代肺炎球菌疫苗的一种潜在的抗原是肺炎球菌表面蛋白A(PspA)。PspA是单体多态胆碱(cholin)-结合蛋白并且包含N-末端 α -螺旋部分,其与自身形成反向平行的卷曲螺旋,即富含脯氨酸的区,其中有时分散有相对保守的非脯氨酸区段和包含多个胆碱结合结构域重复的C-末端区。

[0008] PspA的N-末端区包含免疫显性表位。包含该区的重组蛋白和表达该区的细菌载体已经在各种模型中显示保护潜能。例如,Langermann等人已经制备了表达PspA的重组卡介苗(*Bacille Calmette-Guérin*)(rBCG)载体。为了能够锚定细菌膜中的PspA,使PspA-衍生的基因片段与Mtb19脂蛋白融合(参见Langermann S.等人,J.Exp.Med.1994,180,2277-2286)。存在于应用PspA作为疫苗抗原相关的安全性担忧,因为N-末端区可以模拟人肌球蛋白,且由此免疫接种包括该区的免疫原可能导致组织交叉反应性抗体。因此,近期进行尝试使用PspA的其它区作为抗原。可以适合于包含入下一代肺炎球菌疫苗的另一个PspA区是富含脯氨酸的区。尽管PspA的富含脯氨酸的区(PRR)是多态的,但是它包含几个保守的基序,包括短氨基酸基序,如PKP、PAPAP、PEKP和存在于一些PspA分子中的高度保守的非脯氨酸区

段(NPB)(Brooks-Walter, A. 等人, *Infect Immun* 1999, 67, 6533-6542; Hollingshead, S.K. 等人, *Infect Immun*, 2000, 68, 5889-5900; Daniels, C.C. 等人, *Infect Immun*, 2010, 78, 2163-2172.)。尽管PRR不含免疫显性表位, 但是使用酶联免疫测定法(EIA)与硫氧还蛋白(Trx)融合蛋白作为抗原在儿童中检测到了针对该PspA部分的抗体(Melin, M. 等人, *Vaccine* 2012, 30, 7157-7160)。因为NPB是高度保守的, 所以作者推定针对PRR的抗体可以与大部分菌株通过其NPB表位识别发生交叉反应。

[0009] PspA的PRR具有小尺寸(至多约100个氨基酸)且由此在单独地用作抗原时可能不足以是免疫原性的。已经生产了大肠杆菌(*Escherichia coli*)Trx融合蛋白, 且已经在静脉内感染小鼠模型中证实了其保护潜能(WO 2007/089866和Daniels, C.C. 等人, *Infect Immun*, 2010, 78, 2163-2172)。然而, Trx融合蛋白作为疫苗可能不适合于人体应用, 这归因于诱导对非保护性Trx表位的免疫应答的潜能和天然PR表位的差的结构代表。此外, NPB或富含脯氨酸(PR)的序列还可以包含非保护性表位, 且由此对于集中对保护性表位的免疫应答用于功效是关键。

[0010] 可以在另外的肺炎球菌蛋白中发现了类似的PR序列, 包括表面蛋白PspC(也称作CbpA或Hic)和PhtX蛋白PhtA、PhtB、PhtD和PhtE, 且衍生自这类另外的肺炎球菌蛋白的富含脯氨酸的区可以适合于包含入下一代肺炎球菌疫苗, 如来自PspA的富含脯氨酸的序列。

[0011] 来自其它革兰氏阳性菌的几种免疫原性细菌表面蛋白包含富含脯氨酸的序列, 其同样可以被抵抗这些病原体的疫苗靶向。这些蛋白质包括来自其它链球菌的表面蛋白, 例如酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的M6、SclA和SclB蛋白; 无乳链球菌(*S. agalactiae*)的CBeta(bac)和BibA; 或变异链球菌(*S. mutans*)的P1粘附素; 或来自金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的蛋白质。

[0012] 合成的细菌脂肽类似物在疫苗研究中因其佐剂效应和作为肽抗原的载体已经受到广泛关注(Ghielmetti M. 等人, *Immunobiology* 2005, 210, 211-215)。已经报道了许多脂肽构建体, 其中已经使具有已知佐剂效应的脂质与肽偶合, 生成自我-佐剂性疫苗候选物。特别充分的研究在于三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(N-棕榈酰基-S-(2,3-双-(O-棕榈酰氧基)-丙基)-半胱氨酸-或Pam3Cys)和二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(2,3-双-(O-棕榈酰氧基)-丙基)-半胱氨酸-或Pam2Cys)。在革兰氏阴性菌的内膜和外膜的脂蛋白成分中发现了这些脂质部分。专利申请WO 98/07752描述了脂肽类在药物靶向目的中的用途, 其中肽部分可以是能够诱导三重螺旋结构的胶原蛋白-样序列。专利申请WO 2008/068017描述了合成病毒样颗粒, 其包含螺旋脂肽束并且具有带有脂质芯和肽外表面的球形或球状结构。脂肽类的肽链包含卷曲螺旋结构域。脂肽结构单元的肽链中的卷曲螺旋结构域的特性决定组合成合成病毒样颗粒的结构单元数量。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及由如下组成的脂肽结构单元:(1)包含平行卷曲螺旋结构域的肽链, 作为自立式(self-standing)的无脂质肽, 其形成平行的二聚化、三聚化或更高级寡聚化螺旋束;(2)富含脯氨酸的(PR)肽抗原, 其包含至少一个带负电荷的和至少一个带正电荷的氨基酸, 且其中至少15%的氨基酸是脯氨酸, 所述肽抗原任选地连接至另外的抗原; 和(3)包含2个或3个长烃基链的脂质部分; 其中所述肽链、所述PR肽抗原和所述脂质部分直接或通过连接体共价连接。优选地, 包含平行的卷曲螺旋的肽链在一端上连接至所述PR肽抗原, 而在另

一端上连接至所述脂质部分。

[0015] 这些脂肽结构单元聚集成螺旋脂肽束和合成病毒样颗粒(SVLP)。所述PR抗原呈递在SVLP表面上强化了对PR表位的免疫应答。

[0016] 优选包含来源于链球菌和/或葡萄球菌、更优选来源于肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的PR肽抗原的脂肽结构单元。

[0017] 本发明还涉及生产脂肽结构单元、螺旋脂肽束和合成病毒样颗粒的方法;携带PR肽抗原的脂肽结构单元、螺旋脂肽束和合成病毒样颗粒在制备疫苗中的用途;和使用这类疫苗的接种的方法。本发明同样涉及包含携带PR抗原的合成病毒样颗粒的药物制品。

[0018] 本发明包含来源于链球菌和/或葡萄球菌、特别是来源于肺炎链球菌的PR肽抗原的组合物用于诱导对肺炎链球菌或其它革兰氏阳性菌的免疫应答,并且用于预防或治疗感染性疾病,例如由肺炎链球菌导致的肺炎球菌性疾病。

[0019] 附图简述

[0020] 图1:来自用脂肽15(封闭型圆圈和正方形)或白矾佐剂化的重组PspA(rPspA,封闭型三角形)免疫两次的BALB/c小鼠的血清和来自未免疫的对照组的血清(开放符号)中的IgG ELISA终点滴度。符号表示来自个体小鼠的终点滴度血清,直线表示中间值。对表示富含脯氨酸的区的肽(PR肽)和包含完整N-末端 α -螺旋部分、富含脯氨酸的区和非脯氨酸区段(rPspA)的重组PspA蛋白测定滴度。

[0021] 图2:使用递增剂量的肺炎链球菌血清型1免疫和未免疫的BALB/c小鼠的攻击后以天数(D)计的存活时间。存活百分比(%S)显示在y-轴上,且免疫原和攻击剂量(以CFU计)显示在右侧。给小鼠免疫2次脂肽15或rPspA+白矾,然后通过静脉内攻击。

[0022] 发明详述

[0023] 本发明涉及脂肽结构单元,其由如下组成:

[0024] (1)包含平行卷曲螺旋结构域的肽链,作为自立式的无脂质肽,其形成平行的二聚化、三聚化或更高级寡聚化螺旋束;

[0025] (2)富含脯氨酸的(PR)肽抗原,其包含至少一个带负电荷的和至少一个带正电荷的氨基酸,且其中至少15%的氨基酸是脯氨酸,所述肽抗原任选地连接至另外的抗原;和

[0026] (3)包含3个或优选2个长烃基链的脂质部分(LM);其中所述肽链、所述PR肽抗原和所述脂质部分直接或通过连接体、特别是2个不同的连接体共价连接。

[0027] 优选地,包含平行的卷曲螺旋的肽链在一端上连接至所述PR肽抗原,而在另一端上连接至所述脂质部分。

[0028] 肽链(PC)包含平行的卷曲螺旋结构域。这类卷曲螺旋结构域结合成确定的螺旋束,例如结合成二聚化、三聚化、四聚化、五聚化、六聚化或七聚化束。平行的卷曲螺旋结构域不同于反向平行的卷曲螺旋,其中单体肽链回环从而通过以反向平行排列的方式排列2个(或多个)单体肽的部分结构域以形成螺旋子结构。所述平行卷曲螺旋结构域可以包含12—120个氨基酸残基,优选21—80个氨基酸残基。卷曲螺旋结构域包含2个或更多个连续重复的模式(通常为七个重复单元,其中7个结构位置标记为a-g,其中a和d表示疏水性残基),其作为自立式的无脂质肽类具有自我组装成平行卷曲螺旋螺旋束的特性(Lupas A.N., Gruber M.; The structure of α -helical coiled coils, Adv. Protein Chem. 2005, 70, 37-78)。所述肽链必须多聚化成确定寡聚化状态的平行的卷曲螺旋螺旋束

(例如二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体或七聚体,特别是二聚体、三聚体、四聚体或五聚体)。优选的肽序列是非人的序列以避免在应用于人体接种时的自体免疫疾病风险。

[0029] 所述脂肽结构单元还包含富含脯氨酸的(PR)肽抗原,其包含至少一个带负电荷的和至少一个带正电荷的氨基酸。本文考量的带电荷的氨基酸是带有侧链的在生理pH下带正电荷或带负电荷的氨基酸。在天然存在的氨基酸中,本文考量的最常见的带正电荷的氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;最常见的带负电荷的氨基酸是谷氨酸和天冬氨酸。如果至少15%的氨基酸是脯氨酸,则肽被视为“富含脯氨酸”的。优选富含脯氨酸的肽类,其包含至少一个谷氨酸残基和至少一个赖氨酸或精氨酸残基。

[0030] 优选的PR肽抗原来源于链球菌和/或葡萄球菌,例如来源于革兰氏阳性菌,其选自酿脓链球菌、无乳链球菌、变异链球菌、猪链球菌(*Streptococcus suis*)、马链球菌(*Streptococcus equi*)、缺乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)和金黄色葡萄球菌。

[0031] 优选地,这种PR肽抗原来源于蛋白质PspA和/或PspC或其它针对肺炎球菌感染起保护的蛋白质,包括Phx蛋白。

[0032] “来源的”是指所述肽抗原的氨基酸序列或氨基酸序列的主要部分(即50%或以上)来源于一种或多种天然存在的蛋白质,而0%至最多50%的氨基酸序列重新设计。还包括PR肽抗原,其包含来自不同PspA/PspC分子和/或来自其它包含富含脯氨酸的片段的蛋白质的富含脯氨酸的序列的组合。“富含脯氨酸的片段”是指该片段中包含的至少15%的氨基酸是脯氨酸。

[0033] 特别关注的富含脯氨酸的(PR)肽抗原来源于肺炎链球菌且在PspA或PspC的螺旋区的C-末端后和非脯氨酸区段(如果PspA或PspC序列包含非脯氨酸区段)或重复区前紧邻定位。或者,PR肽抗原位于肺炎球菌多组氨酸三联蛋白质(Phx)的中心区。或者,所述PR肽抗原位于革兰氏阳性菌的PR蛋白质区内,所述革兰氏阳性菌选自酿脓链球菌、无乳链球菌、变异链球菌、猪链球菌、马链球菌、缺乳链球菌、大消化链球菌和金黄色葡萄球菌。例如变异链球菌的P1粘附素的中心区。

[0034] 保护性PR肽抗原通过下列步骤鉴定:测序PspA和/或PspC和/或其它来自临床隔离群的基因,选择部分PR区,合成PR肽,并且使其与并入或为脂肽部分的肽链(PC)缀合。

[0035] 通过施用脂肽缀合物和自其获得的合成病毒样颗粒并且观察在肺炎球菌性脓毒症或其它由链球菌感染导致的疾病的动物模型中的活性和功效测试PR肽抗原的功效。

[0036] PR肽抗原任选地与另外的抗原连接。考量的另外的抗原是其它的肺炎球菌肽类或多糖类,特别是具有氨基酸序列SEQ ID NO:113至119的肽类;和下述其它抗原。

[0037] 所述PR肽抗原直接或通过连接体在该PR肽抗原的N-或C-末端上缀合,并且连接至包含卷曲螺旋结构域的肽链(PC)N-或C-末端或任选地连接至氨基酸侧链。或者,所述PR肽抗原通过该PR肽抗原的侧链残基例如末端或内部天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、鸟氨酸或半胱氨酸侧链与包含卷曲螺旋结构域的肽链(PC)缀合。所考量的连接体是2—20个氨基酸的短肽;羟基烷基-或氨基烷基-羧酸;取代或未取代的聚烯氧基二醇类,优选包含1至12个C₂和/或C₃烯氧基单元;聚烯氧基二醇嵌段共聚物(例如普流罗尼克);单糖、二糖和寡糖类,其可以在一个或多个位置上包含乙酰基、甘油-磷酸或其它取代基;多糖类,例如聚(唾液酸)及其衍生物(例如肽缀合物)、蛋白原(proteinogenic)或非蛋白原氨基酸;和C₁-C₈饱和或不饱

和烃类,且可以包含如下官能团的一个或多个:二硫键、胺、酰胺、乙缩醛、酯、醚、硫醚、脞、酰肼、亚胺、脞、脲、硫脲、碳酸酯、亚氨基碳酸酯、脘、酰胺、二酰亚胺、烷基琥珀酰亚胺(其也可以水解成酰胺)、磺酰胺、砒或包含一个或多个选自氮和氧的原子的杂环,优选三唑。另外考量的是上述的连接体的组合,包括实施例中使用的那些。

[0038] 用于缀合肽类或其它抗原与抗原递送系统例如载体蛋白、聚合物、树状聚体、纳米粒或病毒样颗粒的任意方法可以用于使PR肽抗原与包含平行卷曲螺旋结构域的肽链(PC)缀合。这类方法是本领域技术人员众所周知的,参见,例如Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, 第2版, Academic Press, 2008。

[0039] PR肽抗原由5-200个氨基酸、优选8-80个氨基酸组成。多个PR肽缀合物可以与疫苗制剂联用。PR肽抗原也可以一起融合,以便产生生长的人工PR肽。PR缀合物还可以与包含另外的肺炎球菌肽类或多糖类的缀合物组合。包含官能团(例如氨基-、卤代-、胍基-、羟基氨基-或硫氢基基团)的氨基酸及其衍生物可以并入PR肽,以便有利于PR肽缀合并且增强稳定性。

[0040] 所述肽链(PC)还可以包含氨基酸序列,其包括一个或多个T-辅助细胞表位和/或促进脂肽结构单元在水中的溶解性的极性残基串。

[0041] 可以并入肽链(PC)的T-辅助表位包括下表1中列出的那些及其变体,其中1、2或3个氨基酸被另外的氨基酸替代或被缺失。

[0042] 表1

[0043]

T-辅助表位	SEQ ID NO:	序列 ^{a)}
TT830-843	1	QYIKANSKFIGITE
TT1064-1079	2	IREDNNTLKLDRNN
TT1084-1099	3	VSIDKFRIFCKANPK
TT947-968	4	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLET
TT1174-1189	5	LKFIKRYTPNNEIDS
DTD271-290	6	PVFAGANYAAWAVNVAQVID
DTD321-340	7	VHHNTEEIVAQSIALSSLMV
DTD331-350	8	QSIALSSLMVAQAIPLVGEL
DTD351-370	9	VDIGFAAYNFVESIINLFQV
DTD411-430	10	QGESGHDIKITAENTPLPIA
DTD431-450	11	GVLLPTIPGKLDVNKSKTHI
TT632-651	12	TIDKISDVSTIVPYIGPALN
CTMOMP36-60	13	ALNIWDRFDVFCTLGATTGYLKGNS
TraT1	14	GLQGKIADAVKAKG
TraT2	15	GLAAGLVGMAADAMVEDVN
TraT3	16	STETGNQHHYQTRVVSNAK
HbcAg50-69	17	PHHTALRQAILCWGELMTLA
HbSAg19-33	18	FFLLTRILTIPOSLD
HA307-319	19	PKYVKQNTLKLAT
MA17-31	20	YSGPLKAEIAQRLEDV
MVF258-277	21	GILES RGIKARITHVDTESY
MVF288-302	22	LSEIKGVIVHRLEGV
CS.T3*	23	IEKKIAKMEKASSVFNVVNS
SM Th	24	KWFKT NAPNGVDEKIRI
PADRE1 ^{b)}	25	aKFVAAWTLKAAa
PADRE2 ^{b)}	26	aK-Chx-VAAWTLKAAa
^{a)} 参考文献: SEQID NO: 1-5和17-20: Eur. J. Immunol. 2001,31, 3816-3824; SEQID NO: 6-12: JID 2000,181, 1001-1009; SEQID NO: 13-16, 21-22和24: US 5,759,551; SEQID NO: 23: Nature1988, 336, 778-780; SEQID NO: 25-26: Immunity1994, 1, 751-761. ^{b)} „a“表示D-Ala且„Chx“表示丙氨酸环己酯。		

[0044] 所述肽链(PC)的总长度优选为21至200个氨基酸残基,更优选21至120个氨基酸残基。

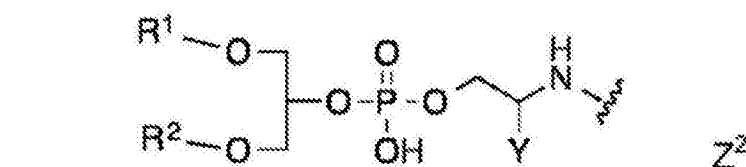
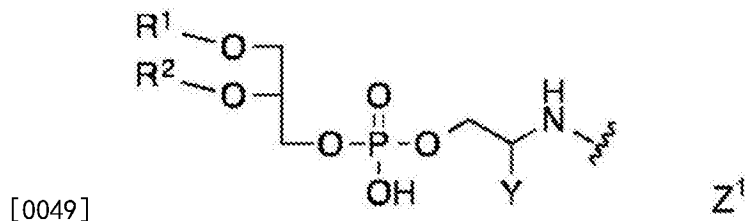
[0045] 所述脂质部分(LM)包含脂质锚,其带有2或3个、优选2个长烃基链和组合这些烃基链并且使其直接或通过连接体连接至肽链(PC)的结构。该脂质部分还可以再次连接至PR肽,由此与包含平行卷曲螺旋的肽链缀合,然而,优选所述脂质部分连接至所述肽链。优选

的脂质部分是包含2或3个、优选2个延长的烃基链的脂质。

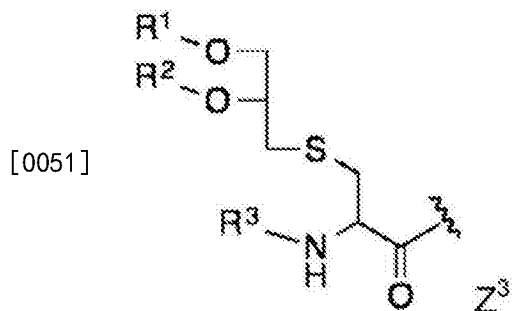
[0046] “长烃基”是指至少7个碳原子的直链烷基或烯基，例如8至50个C原子、优选8至25个C原子组成的直链烷基或烯基。烯基优选在链上具有1、2或3个双键，其各自具有E或Z几何形状，正如通常在天然脂肪酸和脂肪醇中发现的。在“长烃基”的定义中还包括支链烷基或烯基，例如在从链末端开始计数为第二或第三个碳原子上带有甲基或乙基取代基的烷基，例如如在2-乙基-己基中。

[0047] “低级烷基”是指1至7个碳原子(C₁-C₇)、优选1至4个碳原子(C₁-C₄)的烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。

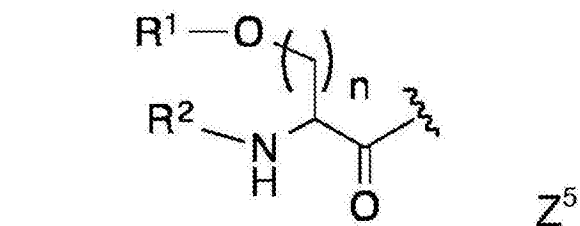
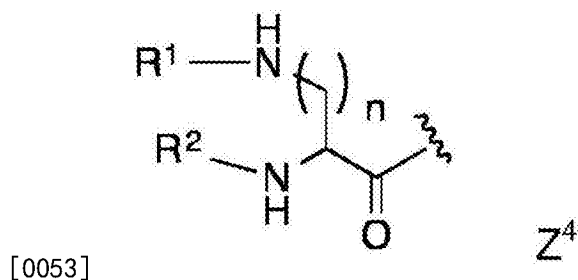
[0048] 本发明特别优选的脂质部分是式Z¹至Z⁸的那些，



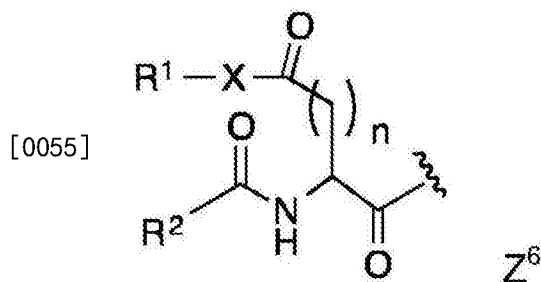
其中R¹和R²是长烃基或长烃基-C=O，且Y是H或COOH，



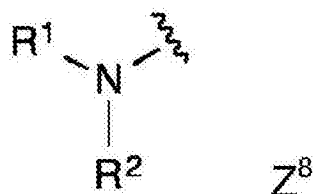
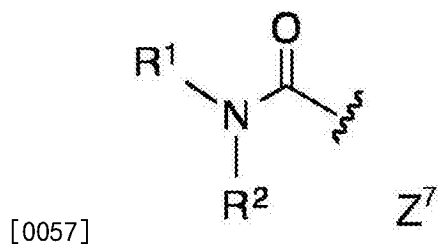
[0052] 其中R¹、R²和R³是长烃基或长烃基-C=O或R¹和R²是长烃基或长烃基-C=O，且R³是H或乙酰基或低级烷基-C=O，



[0054] 其中 R^1 和 R^2 是长烷基或长烷基-C=O,且n是1、2、3或4,



[0056] 其中 R^1 和 R^2 是长烷基,X是O或NH,且n是1、2、3或4,或



[0058] 其中 R^1 和 R^2 是长烷基。

[0059] 所述脂质部分包含至少2个长烷基链,例如在脂肪酸中发现的,例如如在 Z^1-Z^8 中。一个优选的脂质部分是不同类型的磷脂,例如式 Z^1 或 Z^2 的磷脂,其具有酯-或醚-连接的延长的烷基或烯基链,例如1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的对映体或非手性类似物,例如1,3-二棕榈酰基-甘油-2-磷酸乙醇胺。优选的脂质部分是三-或二-棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸残基(类型 Z^3)或类型 Z^4 至 Z^8 的脂质部分。最优选实施例中所指的脂质部分。

[0060] 所述肽链(PC)在一端或接近一端上、即N末端或C末端、优选N末端共价连接至脂质部分(LM)。所述脂质部分可以如下所述中被直接连接,

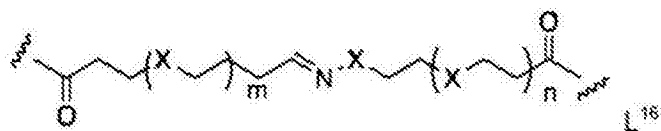
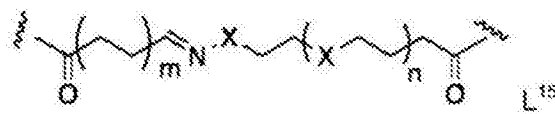
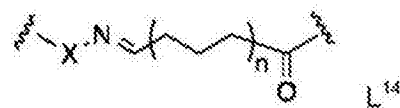
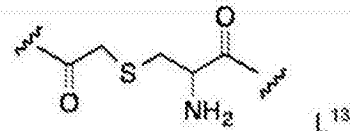
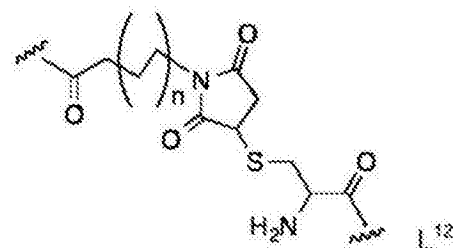
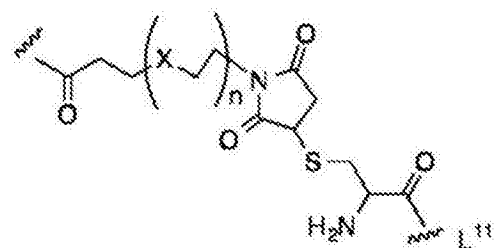
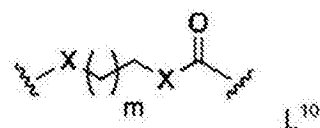
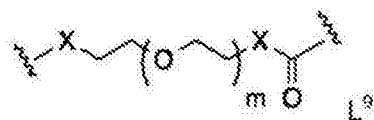
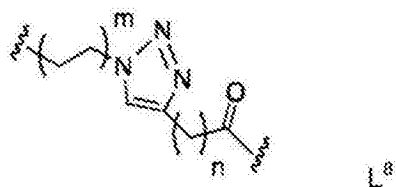
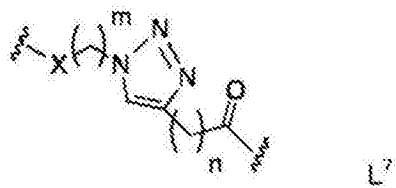
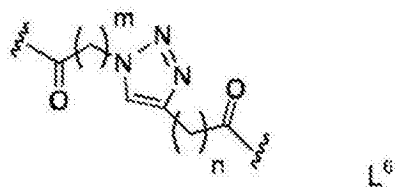
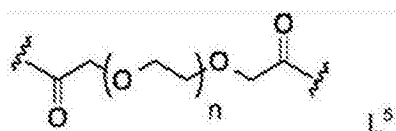
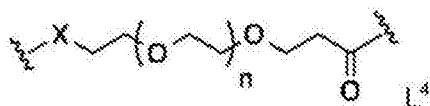
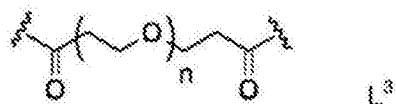
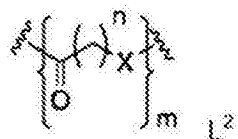
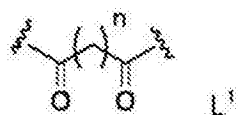
[0061] LM-PC (1)

[0062] 或通过连接体(L)连接,如下所示,

[0063] LM-L-PC (2)。

[0064] 如果所述肽链(PC)和所述脂质部分(LM)直接连接,这优选通过肽链(PC)的脂质部分羰基官能团与氨基官能团(例如N末端氨基官能团)之间的酰胺键来实现。具体的脂质部分 Z^1 、 Z^2 和 Z^8 优选通过其肽链(PC)的胺官能团与羧基官能团(例如C末端羧基官能团)之间的酰胺键连接。

[0065] 本领域普通技术人员显而易见,存在各种适合的连接体和偶合策略,包括、但不限于基于二羧酸衍生物的连接体、包含一个或多个乙二醇单元、氨基酸残基(包括 α -、 β -、 γ -、 δ -氨基酸)或糖(碳水化合物)单元或包含杂环的连接体。所考量的具体连接体是连接体 L^1 至 L^{16} ,其中n是1至45,且m是1至45,例如,其中n是1至20,且m是1至20,如连接官能团C=O和/或X所示,其中X是O或NH:



[0067] 最优选实施例中所述的连接体。

[0068] 具体的连接体L¹至L¹⁶如下被连接至LM和PC:

[0069] 对L¹至L¹⁶所示的羰基官能团可以通过酰胺键连接至适合的脂质部分(LM)的氨基官能团和/或肽链(PC)的氨基官能团,例如N末端氨基官能团。或者,对L¹至L¹⁶所示的羰基官能团可以通过替代相应的羰基官能团、特别是脂质部分Z³—Z⁷连接至脂质部分(LM)。

[0070] 对 L^1-L^{16} 所示的官能团X(具有含义为NH或O)可以通过酰胺键($X=NH$)或通过酯键($X=O$)连接至适合的脂质部分(LM)的羰基官能团和/或肽链(PC)的羧基官能团,例如C末端羧基官能团。

[0071] L^8 的末端 CH_2 基团可以连接至适合的脂质部分(LM)的氨基官能团、肽链(PC)的氨基官能团例如N末端氨基官能团或适合的脂质部分(LM)的羰基官能团。

[0072] 作为在这种方面中理解的“接近一端/接近一末端”是指所述脂质部分或所述连接体分别键合至所述肽的从N末端或C末端计算的第一、第二、第三、第四或第五位氨基酸。所述脂质部分可以直接或通过连接体连接至所述肽结构的主链或连接至接近该末端的这些氨基酸之一的侧链。

[0073] “卷曲螺旋结构域”通过谨慎地选择适合的氨基酸序列设计,这些适合的氨基酸序列通过自主自我结合形成螺旋的热力学稳定的、 α -螺旋平行束。

[0074] 卷曲螺旋结构域包括基于规范串连七重序列重复单元的肽类,所述规范串连七重序列重复单元形成右旋两亲性 α -螺旋,其然后与左旋超螺旋装配形成螺旋束。还包括来自基于不规范的、非七重的重复单元构成的肽,所述基于不规范的、非七重的重复单元形成不一定为左旋乃至有规则的超螺旋的卷曲螺旋。

[0075] 规范的卷曲螺旋广泛地出现在天然存在的生物活性肽类和蛋白质中,并且也已经重新设计。阐明了一组规则,其用于设计采用确定的寡聚化状态、拓扑学和稳定性的螺旋束的卷曲螺旋肽类(例如二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体或七聚体)。这些规则允许设计者构建与指定目标结构相容的肽序列。最重要地,规范的卷曲螺旋肽类的序列包含特征性七-残基基序,其典型的重复3-10次。一个七基序内的位置在传统上称作abcdefg,其中大部分(但不是全部)是出现在a和d位置上且在另外位置上一般为极性的、有利于螺旋的残基的疏水性残基。沿肽链的串连七基序具有a-d残基之间的平均分离,使得它们落在 α -螺旋的一面。当两个或多个螺旋共同填充入卷曲螺旋束时,该螺旋的疏水性表面结合并且彼此卷绕,以便疏水性表面之间的接触最大化。可以出现在七个重复单元内的每个位置上的残基类型影响螺旋束的稳定性和寡聚化状态。一般地,大部分疏水性残基(Ala、Ile、Leu、Met、Val)或芳族疏水性侧链(Phe、Trp和Tyr)用于a和d位置上。其余的b、c、e、f和g位置倾向于比a和d位置更具有许可性,不过,极性和有利于螺旋的残基(Ala、Glu、Lys和Gln)是有利的。a和d位置上的残基的选择可以影响卷曲螺旋的寡聚化状态(即二聚体vs.三聚体)。因此,当非- β -支链残基(例如Leu)出现在d位置上时,二聚体是有利的;在这些位置上, β -支链残基(Val和Ile)不利于二聚体。另一方面,在二聚体中, β -支链残基(Ile、Val)优选在a位置上。另一个规则在于a=d=Ile或Leu有利于三聚体,其用于设计特异性地形成平行三聚体的卷曲螺旋。这些和其它设计规则更详细地在Woolfson, D.N., Adv. Prot. Chem. 2005, 70, 79-112中讨论。

[0076] 七基序编码通过其疏水性表面寡聚化的两亲性 α -螺旋。卷曲螺旋结构域包括至少3个串连七重复单元基序。每个链上七重复单元的上限数将影响螺旋束的稳定性。它主要受长肽类化学合成的可行性的限制,但包含多于3个的七重复单元(例如4、5、6、7和8个七重复单元)的序列是优选的。下文讨论的实施例形成三聚化 α -螺旋卷曲螺旋,但本发明同样涉及二聚化、四聚化、五聚化、六聚化和七聚化卷曲螺旋结构域。

[0077] 本发明的卷曲螺旋结构域可以具有较长的重复单元,例如11-残基重复单元和15-

残基重复单元,例如存在于天然存在的卷曲螺旋上。因此,当使用具有除七之外的周期性的卷曲螺旋基序时,形成聚集物结构所需的螺旋束也可以产生。具有非常规的周期性的卷曲螺旋也是可能的。在许多天然存在的卷曲螺旋中,未打断的七重复单元模式可以包含各种不连续性。两个常见的不连续性是一个残基插入七重复单元模式,以及插入3或4个残基。例如,在流感血凝素的三聚化卷曲螺旋中观察到一个残基插入。其它天然存在的卷曲螺旋展示出不是七的周期性,例如,在海葡萄嗜热菌(*Staphylothermus marinus*)的表面层蛋白质 tetrabrachion中发现的11个残基的有规则的周期性(称作十一体(hendecads))。

[0078] 在病毒壳蛋白质类中天然存在的卷曲螺旋肽序列的其它实例是在HIV-1的gp41外被蛋白和RSV的F-糖蛋白中形成三聚化螺旋束的卷曲螺旋基序。这些卷曲螺旋结构域包括在本发明的卷曲螺旋结构域的定义中。

[0079] 优选的卷曲螺旋肽类应当包含3-8个串连连接的七基序。卷曲螺旋内的七基序口可以具有相同的序列,或它们可以各自具有不同的序列。在所有情况下,一个七基序内的7个氨基酸的7个位置使用字母设计:a b c d e f g。因此,卷曲螺旋肽包含具有位置(abcdefg)₃₋₈的氨基酸序列。

[0080] 优选包含3-8个串连连接的七基序的卷曲螺旋肽序列,其中每个七基序(abcdefg)中的位置a和d包含属于下文定义的组1和/或组2的 α -氨基酸。此外,所有a和d位置的不超过2个可以被属于组3的任意氨基酸残基占据,而所有a和d位置的不超过1个可以被属于组4或组5的任意氨基酸残基或甘氨酸占据。此外,在位置b、c、e、f和g上,属于组3、4和5的 α -氨基酸是优选的,但属于组1和组2的氨基酸是允许的,外加在任意一个七基序内的这些位置中不超过1个可以是甘氨酸,但都不是脯氨酸。

[0081] 组1包含具有小至中等大小疏水性侧链的 α -氨基酸残基。疏水性残基是指在生理pH下不带电荷的并且被水溶液排斥的氨基酸侧链。这些侧链一般不含氢键供体基团,例如伯和仲酰胺类、伯和仲胺类及其相应的质子化盐、硫醇类、醇类、脲类或硫脲类。然而,它们可以包含氢键接受体基团,例如醚类、硫醚类、酯类、叔酰胺类或叔胺类。该组中遗传编码的氨基酸包括丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸。

[0082] 组2包含具有芳族或杂芳族侧链的氨基酸残基。芳族氨基酸残基是指疏水性氨基酸,其具有包含至少一个环的侧链,该环具有共轭的芳香 $\pi(\pi)$ -电子系统。此外,它可以包含另外的疏水性基团,例如低级烷基、芳基或卤素、氢键供体基团例如伯和仲酰胺类及其相应的质子化盐、伯和仲胺类、醇类和氢键接受体基团,例如醚类、硫醚类、酯类、叔酰胺类或叔胺类。遗传编码的芳族氨基酸包括苯丙氨酸和酪氨酸。杂芳族氨基酸残基是指疏水性氨基酸,其具有包含至少一个环的侧链,该环具有并入了至少一个杂原子例如O、S和N的共轭芳香 π -系统。此外,这类残基可以包含氢键供体基团,例如伯和仲酰胺类、伯和仲胺类及其相应的质子化盐、醇类和氢键接受体基团,例如醚类、硫醚类、酯类、叔酰胺类或叔胺类。遗传编码的杂芳族氨基酸包括色氨酸和组氨酸。

[0083] 组3包含含有带有极性不带电荷的残基的侧链的氨基酸。极性不带电荷的残基是指亲水性侧链,其在生理pH下不带电荷,但不被水溶液排斥。这类侧链典型地包含氢键供体基团,例如伯和仲酰胺类、伯和仲胺类、硫醇类和醇类。这些基团可以与水分子形成氢键网状构造。此外,它们还可以包含氢键受体基团,例如醚类、硫醚类、酯类、叔酰胺类或叔胺类。遗传编码的极性不带电荷的氨基酸包括天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸。

[0084] 组4包含含有具有极性阳离子残基及其酰化衍生物的侧链的氨基酸,所述酰化衍生物例如酰氨基-衍生的残基和脲-衍生的残基。极性阳离子侧链是指碱性侧链,其在生理pH下质子化。遗传编码的极性阳离子氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。瓜氨酸是脲-衍生的氨基酸残基的实例。

[0085] 组5包含含有具有极性阴离子残基的侧链的氨基酸。极性阴离子是指酸性侧链,其在生理pH下脱质子化。遗传编码的极性阴离子氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。具体的极性阳离子残基是 $-(CH_2)_aCOOH$,其中a是1至4。

[0086] 更优选包含3—8个串连连接的七基序的卷曲螺旋肽序列,其中每个七基序(abcdefg)可以具有如下序列的任意一种:

[0087] 1xx1xxx(分别是指位置abcdefg);

[0088] 1xx2xxx(分别是指位置abcdefg);

[0089] 2xx1xxx(分别是指位置abcdefg);或

[0090] 2xx2xxx(分别是指位置abcdefg);

[0091] 其中1是来自组1的遗传编码的氨基酸,2是来自组2的遗传编码的氨基酸,且其中x是来自组1、2、3、4或5的遗传编码的氨基酸或甘氨酸。

[0092] 同样优选在天然存在的肽类和蛋白质中鉴定的卷曲螺旋肽序列,但不包括人体来源的那些。例如,它们是在病毒和细菌蛋白中鉴定的卷曲螺旋。

[0093] 本发明还涉及携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒和制备这类合成病毒样颗粒的方法,包括将所述脂肽结构单元溶于适合的载体,优选水性缓冲系统(例如缓冲盐水或未缓冲的盐水)。在制备合成病毒样颗粒后,例如,通过冻干或喷雾干燥除去溶剂。

[0094] 本发明还涉及引起免疫应答的方法,其中将免疫原性有效量的携带如本文所述的PR肽抗原的合成病毒样颗粒施用于动物。尽管温血动物、尤其是人类在本文中被视为最优先考量的,但是可以使用任意的动物。

[0095] 本发明还涉及疫苗(或同样涉及任意的其它药物制品或药物),其包含一种或多种携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒作为主要或另外的活性成分所述颗粒是单独的或与药学上可接受的载体的组合。

[0096] 所述疫苗还可以包含一种或多种佐剂,例如无机盐(例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、磷酸钙)、单磷酸类脂A(MPL)、包含皂苷类的植物提取物(例如QS-21)、咪唑并喹啉类(例如咪喹莫特)、胞壁酰二肽类和三肽类、脂肽类、水包油型乳剂(例如Montanide ISA 720)、细胞因子(例如IL-2或GM-CSF)、分支杆菌和细菌衍生物(例如弗氏完全佐剂)、BCG、核酸衍生物(例如聚C)和本领域技术人员已知的其它佐剂。

[0097] 疫苗的一些成分还可以被包封在可生物降解的聚合物中或与之连接,例如,所述可生物降解的聚合物可以用于控释,例如聚乳酸、聚- ϵ -己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯类、聚乙缩醛类、聚二氢吡喃类、聚氰基丙烯酸酯类和交联或水凝胶的两亲性嵌段共聚物;或疫苗的一些成分可以被配制在脂质体中。

[0098] 按照本身已知的方式制备疫苗,例如,通过常规的溶解和冻干方法,和/或该疫苗可以包含赋形剂,例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、张度调节剂和/或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和/或用于稳定pH的缓冲物质。

[0099] 所述疫苗可以是液体形式或固体(例如冻干)形式,并且可以通过常规的众所周知

的灭菌技术灭菌或进行无菌过滤。可以将得到的水溶液包装照此使用,或冻干、喷雾干燥或按照另一种方式除去溶剂。固体形式可以在施用前与无菌稀释剂(例如水)组合,或可以将其照此施用。同样,所述疫苗可以包含乳剂、分散液或混悬液或适合于预期的施用途经的任意其它形式。

[0100] 所述疫苗可以通过任意适合的肠或胃肠外途经施用,例如鼻内、口服、舌下、肌内、真皮内、透皮和皮下或经皮途经。还可以使用本领域公知的其它途经。

[0101] 装置可以用于施用,例如常用的针头和注射器、显微针、用于施用固体的弹果装置(ballistic devices)(例如在W0 99/27961中)、贴片(例如在W098/20734中)、无针头注射系统(例如在W001/054539中)、喷雾装置等,视剂型和施用途经的不同而定。可以给装置预填充或涂布疫苗。

[0102] 所述疫苗在适合的剂型中包含约0.05%—约50%的活性成分。用于胃肠外施用的单位剂型是,例如安瓿、预装注射器或小瓶,例如包含在约0.25ml—1.5ml的剂量体积中的约0.0001mg—约0.75g活性成分的小瓶。

[0103] 活性成分的剂量取决于预期的接受者(例如物种)、其年龄、体重和个体情况和施用途经。用于特定活性成分和特定目标群体的最佳剂量可以通过标准研究确定,包括观察在受试者中的适当的免疫应答。

[0104] 足以赋予致病性肺炎球菌或其它革兰氏阳性菌免疫性的疫苗用量通过本领域技术人员众所周知的方法确定。该用量基于疫苗接受者的特征和对肺炎球菌或其它革兰氏阳性菌感染导致的疾病的想要的免疫性水平来确定。

[0105] 将所述疫苗作为单剂量或两次或多次剂量在足够的间隔时间点施用。该疫苗还可以与另外的疫苗一起施用。例如,该疫苗可以与另外的疫苗在最初的加强方案中联用。

[0106] 所述疫苗用于预防或治疗目的或它们两者,用于预防和/或治疗菌血症和其它由肺炎链球菌感染导致的疾病,例如肺炎、急性鼻窦炎、中耳炎、脑膜炎、菌血症、败血病、骨髓炎、脓毒性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心包炎、蜂窝织炎或脑脓肿或carriage。该疫苗同样用于预防或治疗目的或它们两者,用于预防和/或治疗由A型链球菌或变异链球菌导致的疾病,例如咽头炎、脓皮病、风湿热、肾小球肾炎或骨疽。

[0107] 例如,所述疫苗针对菌血症、肺炎和脑膜炎进行保护或针对侵害性肺炎球菌性疾病(IPD);感染,其中肺炎链球菌可以分离自血液或另一种正常的无菌地点进行保护;或针对菌血症、肺炎和中耳炎进行保护。或者,所述疫苗针对咽头炎、脓皮病、风湿热、肾小球肾炎或骨疽进行保护。

[0108] 所述疫苗可以施用于不同的目标群体,包括首次接种或感染或不能对感染或接种预先应答的群体;适当年龄的老年人(例如超过65、75或85岁);处于风险升高的成年人,例如在健康机构中的人;具有风险因素的年轻的成年人;免疫受损的人或儿科人群。

[0109] 本发明还涉及制备疫苗的方法,包括混合携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒与携带另外的抗原的合成病毒样颗粒或不由合成病毒样颗粒携带的抗原。

[0110] 本发明还涉及针对携带保护性PR肽抗原的合成病毒样颗粒的抗体,尤其是针对PR肽抗原的抗体。针对PR肽抗原的抗体可以与广泛种类的遗传差异的菌株和不同的荚膜血清型发生交叉反应并且延长被动转移模型中的平均存活时间。

[0111] 针对PR肽抗原的保护性抗体可以具有调理吞噬(opsonophagocytic)活性(OPA)。

使用OPA的抗体可以通过适合的测定法例如调理吞噬杀伤测定法(OPKA)、使用来自供体的细胞系或全血在体外检测。保护性抗体还可以介导由其它不牵涉OPA的机制的保护作用。

[0112] 本发明还涉及针对如本文所述的PR肽类的保护性抗体在制备用于治疗 and/或预防目的药物制品或药物以及还在制备诊断试剂盒中的用途。

[0113] 并非所有的PR肽类都可以等同地作为疫苗抗原具有保护作用。保护性PR肽类是优选的。可以使用众所周知的方法鉴定它们,例如在适合的链球菌性疾病的动物模型中的攻击研究。例如,在肺炎球菌性脓毒症模型中,可以用携带如本文所述的PR肽抗原的合成病毒样颗粒免疫小鼠,且随后用致死剂量的肺炎链球菌通过静脉内攻击。在这种模型中,用携带保护性PR肽抗原的合成病毒样颗粒免疫的小鼠随后具有明显比免疫的对照组小鼠更长的存活时间。

[0114] PR肽抗原还可以来自其它致病性链球菌,例如酿脓链球菌、无乳链球菌、变异链球菌、马链球菌、猪链球菌、缺乳链球菌、大消化链球菌或其它致病性革兰氏阳性菌,例如金黄色葡萄球菌,且携带这些PR肽抗原的合成病毒样颗粒同样用于针对这些细菌的疫苗。

[0115] 将优选的来自肺炎链球菌PspA和PspC的PR肽抗原序列采集在下表2中。肽抗原P3是组合2个序列的合成构建体。

[0116] 表2

名称	SEQ ID NO:	序列
P1	27	PAPKPEQPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKT
P2	28	PKPEQPAPAPKPEQPAKPEKPA
P3	29	PAPKPEQPAEQPKPEQPAPAPKPEQPAKPEKP
P4	30	PAPKPEQPAEQPKPA
P5	31	PAPQAPAPKPEKT
P6	32	QPAEQPKPAPAPQAPAP
P7	33	PAPAPKPEQPAEQPKP
P8	34	PAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAEQPKPEKT
P9	35	PAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAEQ
P10	36	PKPAPAPQAPAPKPEKPAEQPKPEKT
P11	37	KAEKPAPAPQPEQPAPAPKT
P12	38	PAPAPQPEQPAPAPQPEQPAPAPKPEQPAPAPKPEQPTPA
P13	39	PAPAPQPEQPAPAPKPEQPAPAPKPEQPTPAPKPEQPTPAPKT
P14	40	PEQPAPAPKPEQPAPAPKPEQPTPAPKPEQPTPAPKT
P15	41	PKPEQPTPAPKPEQPTPAPKT
P16	42	PKPEQPAEQPKPAPAPQ
P17	43	PKPEQPAPAPKPEQPAKPEKPAEEPTQPEKPATPKT
P18	44	PKPEQPAKPEKPAEEPTQPEKPATPKT
P19	45	PAPAPQAPAPKPAAPAPQPEKPAEQPKAEKPA
P20	46	PETPAPAPKPETPAPAPEAPAPAPKPEQPAPAPKPEKSA
P21	47	PAPAPKPEQPAPAPKPEKSA
P22	48	PKPEQPAPAPKPEKSA
P23	49	KAEKPAPAPKPEQPVAPKT
P24	50	PAPAPKPAAPAPQPEKPAAPAPKPEKSA
P25	51	PAEQPTTEPTQPEKPAEETPAPKPEKPAEQPKAEKT
P26	52	PAPKPEKPAEQPKAEKT
P27	53	PAPAPKPEQPAEQPKPAPAPQPEKPAEEEPENPAPAP
P28	54	APAPKPETPAPAPEAPAPAPAPKPEQPAPAPKPEKS
P29	55	APAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAEQPKPEKT
P30	56	PAEQPTTEPTQPEKPAEETPAPKPEKPAEQPKAEKT
P31	57	APAPKPETPAPAPEAPAPAPAPKPEQPAPAPKPEKS
P32	58	APAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAEQPKPEKT
P33	59	APAPKPETPAPAPEAPAPAPAPKPEQPAPAPKPEKS
P34	60	APAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAEQPKPEKT
P35	61	APAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAEQPKAEKPA

[0121]

名称	SEQ ID NO:	序列 ^{a)}
P58	84	SRLEQPSLQPTPEPSPGPQAPN
P59	85	RPEEPSQPTPEPSPSPQAPSNP
P60	86	HWVPDSRPEQSPSQSTPEPSPSPQAPNPQAPSNP
P61	87	PKSNQIGQPTLPNNSLATPSPSLPINPGTSHE
P62	88	PEVTPTPETPEQPGGEKAPEKSPEVTPTPETPEQP
P63	89	PEVTPTPETPEQPGGEKAPEK
P64	90	PEKSPEVTPTPETPEQP
P65	91	KAPEKSPEVTPTPEMP
P66	92	PGKPAPKTPEVPQKPDTPHTPKTP
P67	93	KPSAPKAPEKAPAPKAPK
P68	94	PAPKAPKASEQSSNPAPAPKSAP
P69	95	PGPAGPRGLQGPGQPRGDKGET
P70	96	PQAPSTPEKQPEVPESP
P71	97	PETPDAPSTPKDEPQAP
P72	98	PAPVEPSYEAETPPTRTPDQAEPNKPT
P73	99	PTYETEKPLEPAPVEPSYEAET
P74	100	KPTAPTPTYETEKPLKPAPVAPNYEKEPT
P75	101	KPVVPEQPDEPGEIEIP
P76	102	PEVPSEPETPTPTPEVPAEPGKPVPPAK
P78	103	KYTPKKPNKPIYPEKPKDKTPPTKPDHS
P79	104	PEKPVSEPST
P80	105	KPVEPSEPSTPDVPSNPSTPDVPSTPDVPSNPSTPEVPSNP
P81	106	PQVEPNVPDTPQEKPLT
P82	107	KPLTPLAPSEPSQPSIPETPLIPSEPSVPET
P83	108	PEVKPDVKPEAKPEAKPA
P84	109	KPEAKPEAKPA
P85	110	PDVKPEAKPEAKPDVKPEAK
P86	111	PETPDTPKIPQLPQ
P87	112	PDTPQAPDTPHVPESPKTPE
^{a)} 来自肺炎链球菌的蛋白质的SEQ ID NO: 84-87; 酿脓链球菌: 88-92, 95; 马链球菌: 93-94; 猪链球菌: 96-97; 变异链球菌: 98-100; 金黄色葡萄球菌: 101-103; 大肠化链球菌: 104; 链乳链球菌: 105-107; 无乳链球菌: 108-112。		

[0122] 在优选的SEQ ID NO:84-112的PR肽类中,1、2或3个氨基酸可以被其它氨基酸替代。

[0123] 在单独施用提供有限的保护潜能的另外的序列可以与PR肽抗原、特别是来源于PspA或PspC的区的序列或其它蛋白质缀合,它们在每一第3或第4位上不含脯氨酸和/或包含小于15%的脯氨酸,特别是如下序列:

[0124] QQAEEDYARRSEEEYNRLPQQQPPKAKEP(非脯氨酸区段)(SEQ ID NO:113)

[0125] 和

[0126] AEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEV(来自PspC的螺旋肽)(SEQ ID NO:114)。

[0127] 可以与PR肽抗原组合的另外的序列包括来源于细菌表面蛋白的序列,所述细菌表

面蛋白不含富含脯氨酸的区,包括:

[0128] 来自StkP的序列,优选C-末端79-82个氨基酸,

[0129]

SVAMPSYIGSSLEFTKNNLIQIVGIKEANIEVVEVTTAPAGSAEGMVVEQSPRAGEKVDLNKTRVKISIIYKPKTTSA
TP(SEQ ID NO:115),

[0130] 及其片段;

[0131] 来自PsaA的序列,优选氨基酸250-309:

[0132] SLFVESSVDDRPMKTVSQDTNIPIYAQIFTDSIAEQGKEGDSYYSMMKYNLDKIAEGLAK(SEQ ID
NO:116);

[0133] 来自胆固醇依赖性溶细胞素的序列,例如Ply的第4个结构域,氨基酸360-471:

[0134]

NGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQKEVLTPKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWWW
RTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYPQVEDKVEND(SEQ ID NO:117),

[0135] 及其片段;

[0136] 链球菌聚组氨酸三联蛋白质,例如来自肺炎链球菌PhtD的C-末端一半的片段,例如氨基酸680-770:

[0137]

VEHPNERPHSDNGFGNASDHVRKNKVDQDSKPEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNLYKPSTDTEETEE
EAEDTTDEAEIPQV(SEQ ID NO:118),

[0138] 或氨基酸771-839:

[0139] ENSVINAKIADAEALLEKVTDPsirQNAMEtLTGLKSSLLLGTKDNNTISAEVDSLLALLKESQPAPIQ
(SEQ ID NO:119),

[0140] 或其片段。

[0141] 在优选的序列SEQ ID NO:113-119中,1、2或3个氨基酸可以被另其它的氨基酸替代。

[0142] 另外的序列包括PCT/US2012/022127或US 2005/0020813 A1中所述的序列。可选序列包括EP 0280576A2中所述的序列。

[0143] 另外的抗原可以与携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒组合。例如,如下蛋白质可以与携带肺炎球菌性PR肽抗原的合成病毒样颗粒组合:W0 98/18931、W0 98/18930、US 6,699,703、US 6,800,744、W0 97/43303和W0 97/37026中鉴定的肺炎链球菌蛋白质;Lyt家族(LytX)、Pht家族(PhtX)、Sp128、1型或2型菌毛蛋白质;其它链球菌抗原,例如W01993/005155、W0 2002/034771、W0 2002/083859、W0 2002/34771、W0 2003/093306、W0 2004/041157或W0 2005/002619中鉴定的那些;或其它抗原,例如Sp101、Sp130、Sp125或Sp133。

[0144] 糖抗原也可以与携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒组合,例如肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、14、18C、19A、19F、22F、23F或33F的荚膜糖。或者,其它糖类可以与PR肽抗原组合,例如来源于其它肺炎链球菌血清型的糖类和/或来自其它革兰氏阳性菌的糖类(例如来源于无乳链球菌、酿脓链球菌和/或金黄色葡萄球菌的糖类)。

[0145] 同样,来自其它革兰氏阳性菌的蛋白质可以与携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒组合,例如一种或多种来自酿脓链球菌的蛋白质,包括M蛋白、纤连蛋白结合蛋白(Sfb1)、链球

菌血红素结合蛋白(Shp)或链球菌溶血素S中鉴定的蛋白质(SagA);和/或一种或多种来自金黄色葡萄球菌的蛋白质,例如 α -毒素、聚集因子A(ClfA)、胶原结合蛋白(CNA)、纤连蛋白结合蛋白A(FbA)、胞外纤维蛋白原结合蛋白(Efb)、离子调节的表面决定子(Isd)蛋白、青霉素结合蛋白2a(PBP2a)、丝氨酸天冬氨酸重复蛋白(Sdr)和/或IgG结合子(Sbi)。同样,来源于这类蛋白质的肽抗原也可以与携带PR肽抗原的合成病毒样颗粒组合。

实施例

[0146] 缩写::

[0147] Boc,叔丁氧基羰基;

[0148] BSA,牛血清白蛋白;

[0149] DIEA,二异丙基乙胺;

[0150] DMF,N,N-二甲基甲酰胺;

[0151] EDT,乙二硫醇;

[0152] Fmoc,9-芴基甲氧羰基;

[0153] HATU,2-(1H-9-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐;

[0154] HBTU,2-[1H-苯并三唑-1-基]-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐;

[0155] HOBt,N-羟基苯并三唑;

[0156] Pbf,2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基;

[0157] NMP,N-甲基吡咯烷酮;

[0158] MBHA,甲基二苯甲胺;

[0159] OD,光密度;

[0160] iPr₂O,二异丙基醚;

[0161] PCR,聚合酶链反应

[0162] PyBOP,(苯并三唑-1-基氧基)-三吡咯烷子基磷-六氟磷酸盐;

[0163] PE06,N-Fmoc-21-氨基-4,7,10,13,16,19-六氧杂二十一烷酸;

[0164] r.t.,室温;

[0165] RP-HPLC,反相高效液相色谱法;

[0166] TA,茴香硫醚;

[0167] TIS,三异丙基硅烷;

[0168] Trt,三苯甲基;

[0169] TFA,三氟乙酸;

[0170] TFE,2,2,2-三氟乙醇

[0171] t_R,保留时间

[0172] SD,标准偏差

[0173] 实施例1:PR肽类的设计和合成

[0174] 使用两条引物(LSM13和SKH2)、根据Hollingshead,Becker等人,Infect Immun,2000,68,5889-5900扩增来自高毒力血清型1临床隔离群SP1577(Leimkugel等人,JID,2005,192,192-199)的PspA的富含脯氨酸的区并且测序。

[0175] LSM13:5'-GCAAGCTTATGATATAGAAATTTGTAAC-3' (SEQ ID NO:120)

[0176] SKH2:5'-CCACATACCGTTTTCTTGTTCAGCC-3' (SEQ ID NO:121)

[0177] 通过PCR,使用引物LSM13和SKH2和GoTaq聚合酶(PCR条件:退火48℃ 1min,延伸72℃ 3min,30个循环)扩增富含脯氨酸的区。使用引物LSM13和SKH2从PCR反应中分离大小约为1.2kb的得到的片段并且测序。可以读取pspA基因的约1'100个碱基。翻译的核苷酸序列如下所示。包括非脯氨酸区段的富含脯氨酸的区用斜体字表示。

[0178] XXLGAGFVXX XPTXXXXXEA PVASQXKAEK DXDAXKRDAE NXXKALEEAKXXQKKYEDDQ
KKTEEKXKKE KEASKEEQAA NLKYQQELVK YASEKDSVKKAKILKEVEEA EKEHKKKRAE FEKVRSEVIP
SAEELKKTRQ KAEAKAKEAELIKKVEEAE KKVTEAKQKL DAERAKEVAL QAKIAELENE
VYRLETTELK GIDESSEDYV KEGLRAPLQS ELDAKRTKLS TLEELSDKID ELDAEIAKLEKNVEYFKKTD
AEQTEQYLAA AEKDLADKKA ELEKTEADLK KAVNEPEKPAEET

PAPAPKP EQPAEQPKPA PAQAPAPAPK PEKTDDQQA E EDYARRSEEE

YNRLPQQQPP KAEKPAPAPK PEQVPAPKT GWKQENGMWC R (SEQ ID NO:122)

[0179] 从该序列中,选择P1PR序列

[0180] (PAPKPEQPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKT, SEQ ID NO:27)。P1位于SP1577PspA的螺旋/卷曲螺旋区与非脯氨酸区段之间。

[0181] 为了能够与SVLP脂肽缀合,设计并且合成下列马来酰亚氨基肽:

[0182] 马来酰亚氨基肽1:

[0183]



[0184] 在马来酰亚氨基肽1中,使3-马来酰亚氨基丙酸与P1(SEQ ID NO:27)中的N-末端通过21-氨基-3,6,9,12,15,18-六氧杂二十一烷-21-酸连接体偶合,并且将甘氨酸添加到C-末端P1,后面是作为酰胺("NH₂")的D-丙氨酸残基("a"),以便赋予针对外蛋白酶类的稳定性。

[0185] 使用如下Fmoc固相肽合成(SPPS)方法合成马来酰亚氨基肽1:

[0186] 在ABI 433A肽合成仪上使用Rink酰胺MBHA树脂(载量:0.69mmol/g)(362mg, 0.25mmol)和标准Fmoc-SPPS方案组装肽PAPKPEQPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKTGa(由甘氨酸-D-丙氨酸延伸的SEQ ID NO:27)。使用如下氨基酸(以正确的次序):Fmoc-Ala-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Pro-OH和Fmoc-Thr(tBu)-OH。在组装和除去N-末端Fmoc保护基后,用N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)和CH₂Cl₂洗涤树脂。为了偶合马来酰亚胺,用DMF洗涤部分树脂(约0.1mmol),制备Fmoc-PEO6-OH(115mg, 0.2mmol)PyBOP(104mg, 0.2mmol)、HOBt(27mg, 0.2mmol)和DIEA(66μl, 0.4mmol)在4.5ml DMF中的溶液,混合30秒,在氩气气氛中加入到树脂中。将该混合物振摇16h。过滤树脂,用DMF洗涤4x。然后通过用20%哌啶的DMF溶液(6x 2min.)处理除去Fmoc基团。然后再用DMF洗涤树脂,制备3-马来酰亚氨基丙酸(34mg, 0.2mmol)、PyBOP(104mg, 0.2mmol)、HOBt(27mg, 0.2mmol)和DIEA(66μl, 0.4mmol)在DMF中的溶液,在氩气下加入到树

脂中。将树脂振摇3h,过滤,依次用DMF、CH₂Cl₂和MeOH洗涤4次,用KOH颗粒真空干燥过夜。为了从树脂上裂解肽并且除去侧链保护基,制备TFA/TIS/TA/苯酚85:5:5:5(10ml),在氩气气氛下加入到干燥树脂中。将树脂振摇3h,过滤,用iPr₂O沉淀马来酰亚氨基肽1,预冷却至-20℃(50ml)。然后用iPr₂O洗涤肽4次,风干过夜,通过使用制备型C18柱的RP-HPLC(Agilent Zorbax SB300PrepHT, 250x 21.5mm)和线性梯度10-40% MeCN的H₂O溶液(+0.1% TFA)纯化,历时16min,冻干,得到1,为白色粉末。通过使用Agilent XDB-C18柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度10-100% MeCN的H₂O溶液(+0.1% TFA)分析肽,25min:纯度>97%; t_R=8.53min。

[0187] ESI-MS:针对C₁₆₃H₂₅₉N₄₁O₅₁计算的MW:3609.1Da;MW测定值:3609.7(±0.02%)。

[0188] 马来酰亚氨基肽2:

[0189]



[0190] 在这一马来酰亚氨基肽中,将甘氨酸加入到P1(SEQ ID NO:27)的C-末端上,使马来酰亚与甘氨酸P1通过氨基乙基间隔区偶合。N-末端是乙酰化的。

[0191] 使用Fmoc SPPS在ABI 433A上如对1所述组装马来酰亚氨基肽2上的肽链,除了使用向2-氯三苯甲基树脂上预先加载Fmoc-Gly-OH至树脂取代水平为0.6mmol/g(416mg, 0.25mmol),而不是使用Rink酰胺MBHA树脂作为固相支持物。在组装和除去N-末端Fmoc保护基后,通过用0.5M Ac₂O、0.05M HOBt和0.136M DIEA在NMP(10ml)中的溶液处理、同时振摇30min使树脂乙酰化。然后用DMF将树脂洗涤4次,用CH₂Cl₂洗涤4次,并用TFE/CH₂Cl₂ 2:8(10ml)处理,同时在氩气中振摇4h,以便从树脂上释放完全侧链保护的肽。过滤树脂,用10ml TFE/CH₂Cl₂ 2:8洗涤2次,浓缩滤液,用4℃冷Et₂O沉淀被保护的肽,并用Et₂O洗涤4次。然后真空干燥被保护的肽过夜,储存在-20℃下。

[0192] 为了使马来酰亚胺偶合,将部分粗的侧链被保护的肽(100mg)、HATU(15mg, 39μmol)、HOAt(5mg, 39μmol)溶于DMF(0.8ml),加入DIEA(23μl, 142μmol),将该混合物搅拌1min。加入N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺TFA盐(150mg, 60μmol)在DMF(0.2ml)中的溶液,将该混合物在氩气气氛中搅拌3h。然后减压除去DMF。将侧链被保护的肽混悬于0.3ml CH₂Cl₂,用4℃冷Et₂O沉淀,用Et₂O洗涤4次,并真空干燥过夜。

[0193] 然后除去侧链保护基,沉淀肽,如上述对1所述纯化,通过使用Agilent XDB-C18柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度10-100% MeCN的H₂O溶液(+0.1% TFA)分析终产物2,25min:纯度>97%; t_R=7.06min。MALDI-TOF MS:对C₁₄₆H₂₂₇N₃₉O₄₃计算的MW:3216.6Da;MW测定值:3215.7Da(±0.05%)。

[0194] 马来酰亚氨基肽3:

[0195]



[0196] 在马来酰亚氨基肽3中,使3-马来酰亚氨基丙酸与SEQ-ID NO:113的N-末端通过21-氨基-3,6,9,12,15,18-六氧杂二十一烷-21-酸连接体偶合,用D-丙氨酸(“a”)将C-末端封端,酰胺化。SEQ ID NO:113对应于P1577PspA的非脯氨酸区段。

[0197] 如上述对马来酰亚氨基肽1所述合成和纯化马来酰亚氨基肽3,通过使用XDB-C18柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度10-100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析,25min:纯度>97%;*t_R*=5.31min。MALDI-TOF MS:对C₁₇₄H₂₇₂N₅₀O₆₃计算的MW:4072.3Da;MW测定值:4071.0Da(±0.05%)。

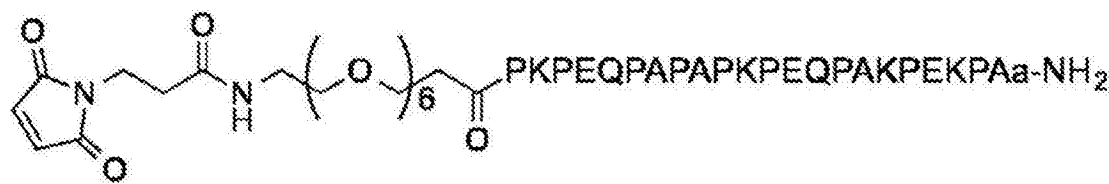
[0198] 通过对pspA或pspC基因测序得到其它PR序列,或者,可以在公共数据库中得到该序列,例如UniProtKB。例如,血清型19A隔离群TCH8431的PspA序列(UniProtKB登录号D6ZPW2)为:

[0199] MNKKKMILTS LASVAILGAG FVTSQPTVVR AEESPVASQS KAEKDYDAVKKSEAAKKHY
EEAKKKAEDA QKKYDEDQKK TEAKAEKERK ASEKIAEATKEVQQAYLAYL QASN ESQRKE ADKKIKEATQ
RKDEAEAAFA TIRTTIVVPEPSELAETKKK AEEAKAEEKV AKRKYDYATL KLALAKKEVE
AKELEIEKLQYEISTLEQEV ATAQHQVDNL KKLLAGADPD DGTEVIEAKL KKGEAELNAKQAEAKKQTE
LEKLLDSLDP EGKTQDELDK EAEAEELDKK ADELQNKVADLEKEISNLEI LLGGADPEDD TAALQNKLA
KKAELAKKQT ELEKLLDSLDP EGKTQDELD KEAEAEELDK KADELQNKVA DLEKEISNLE
ILLGGADSEDDTAALQNKLA TKKAELEKTQ KELDAALNEL GPDGDEEET **PAPAPQPEQPA**
PAPKPEQPAP APKPEQPAPA PKPEQPAPAP KPEQPAKPEK PAEEPTQPEK
PATPKTGWKQ ENGMWYFYNT DGSMATGWLQ NNGSWYYLNA NGSMATGWVKDGTWYYLEA SGAMKASQWF
KVSDKWYYVN SNGAMA TGWL QYNGSWYYLNANGDMATGWL QYNGSWYYLN ANGDMATGWA KVNGSWYYLN
ANGAMATGWAKVNGSWYYLN ANGSMATGWV KDGTWYYLE ASGAMKASQW FKVSDKWYYVNLGALAVNT
TVDGYKVNAN GEW(SEQ ID NO:123)

[0200] 从该序列中,选择P2序列(PKPEQPAPAPKPEQPAKPEKPA,SEQ ID NO:28)。P2紧接位于TCH8431 PspA的螺旋/卷曲螺旋区之后。为了有利于使SVLP脂肽缀合,设计并且合成下列马来酰亚氨基肽类:

[0201] 马来酰亚氨基肽4

[0202]



[0203] 这一马来酰亚氨基肽包含通过21-氨基-3,6,9,12,15,18-六氧杂二十一烷-21-酸连接体与P2(SEQ ID NO:28)N-末端偶合的3-马来酰亚氨基丙酸。“a”表示D-丙氨酸。C-末端被酰胺化。

[0204] 如上述对马来酰亚氨基肽1所述合成和纯化马来酰亚氨基肽4,通过使用XDB-C18柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度10-100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析,25min:纯度>97%;*t_R*=5.21min。MALDI-TOF MS:对C₁₃₁H₂₁₀N₃₂O₄计算的MW:2889.3Da,MW测定值:2888.8Da(±0.05%)。

[0205] 马来酰亚氨基肽5



[0207] 在这一马来酰亚氨基肽中,甘氨酸被添加到P2(SEQ ID NO:28)C-末端,并且使马来酰亚胺与甘氨酸通过氨基乙基间隔区偶合。N-末端是乙酰化的。

[0208] 如上述对马来酰亚氨基肽2所述合成和纯化马来酰亚氨基肽5,通过使用XDB-C18柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度10-100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析, 25min:纯度>97%;t_R=6.31min。ESI MS:对C₁₁₃H₁₇₈N₃₀O₃₃计算的MW:2484.8Da;MW测定值:2483.2Da(±0.02%)。

[0209] 马来酰亚氨基肽6

[0210] 通过融合来自两种或多种不同PspA蛋白质的短PR序列生成人工PR序列。例如,通过融合P1中的N-末端残基PAPKPEQPAEQ(SEQ ID NO:124)至P2(SEQ ID NO:28)并且用G1y残基替代P2中的C-末端Ala设计序列P3(SEQ ID NO:29)。为了能够缀合,设计并且合成下列马来酰亚氨基肽:

[0211]



[0212] 如上述对马来酰亚氨基肽2所述合成和纯化马来酰亚氨基肽6,通过使用XDB-C18柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度10-100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析, 25min:纯度>97%;t_R=10.11min。MALDI-TOF MS:对C₁₆₄H₂₅₅N₄₅O₅₀计算的MW:3657.1Da;MW测定值:3654.9Da(±0.05%)。

[0213] PR肽抗原的另外的实例如下所述:

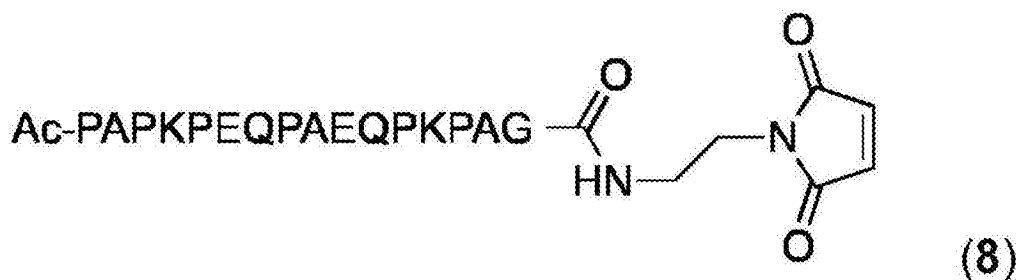
[0214] 马来酰亚氨基肽7



[0216] 如上述对马来酰亚氨基肽2所述合成和纯化马来酰亚氨基肽7。ESI MS:对C₉₁H₁₃₇N₂₅O₂₇计算的MW:2012.0Da;MW测定值:2012.4Da(±0.05%)。

[0217] 马来酰亚氨基肽8

[0218]



[0219] 如上述对马来酰亚氨基肽2所述合成和纯化马来酰亚氨基肽8。ESI MS: 对 $C_{81}H_{124}N_{22}O_{25}$ 计算的MW:1804.9Da;MW测定值:1805.4Da($\pm 0.05\%$)。

[0220] 马来酰亚氨基肽9

[0221]



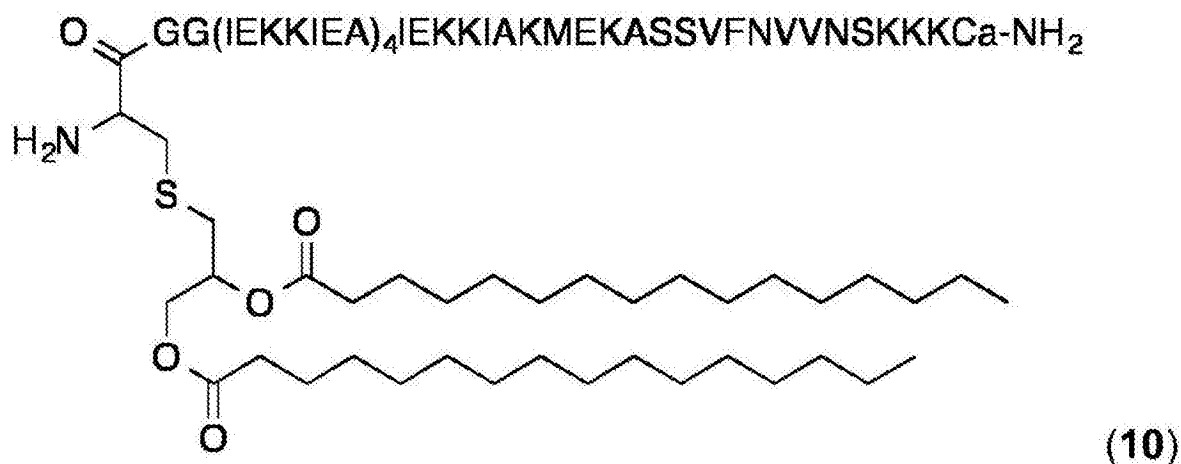
[0222] 这一马来酰亚氨基肽来源于PhTD(P60, SEQID NO:86)的PR肽。N-末端是乙酰化的。如上述对马来酰亚氨基肽2所述合成和纯化马来酰亚氨基肽,通过使用XDB-C18柱(250x4.6mm)的分析型RP-HPLC和线性梯度20-100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析,25min:纯度>97%; $t_R=3.41$ min。ESI-MS MS:对 $C_{136}H_{201}N_{37}O_{48}$ 计算的MW:3120.4Da;MW测定值:3120.6Da($\pm 0.05\%$)。

[0223] 实施例2:PR肽抗原与脂肽的缀合

[0224] 为了制备用于免疫的脂肽缀合物,合成下列4种脂肽结构单元。

[0225] 脂肽结构单元10

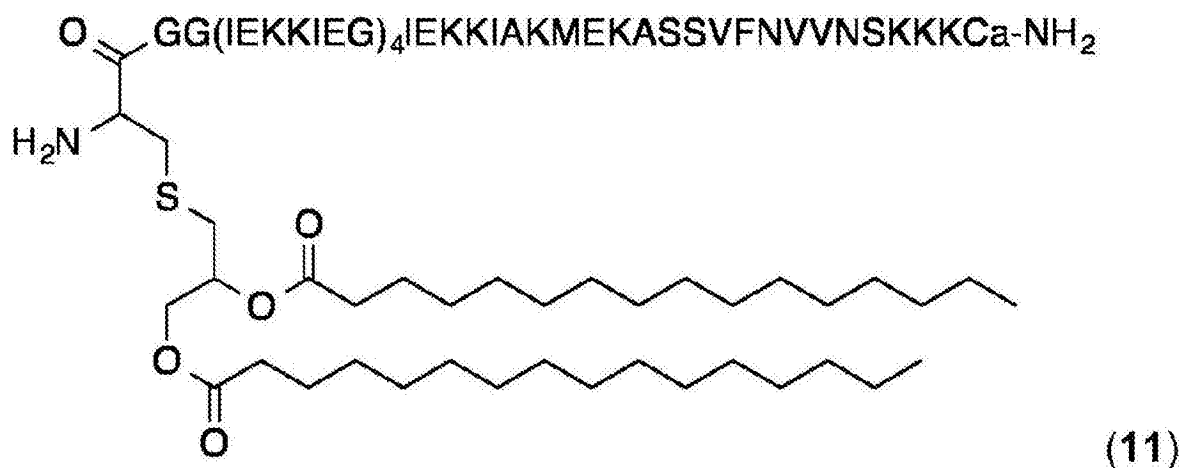
[0226]



[0227] 这种脂肽对应于W0 2008/068017的实施例13。如W0 2008/068017和Ghasparian, Riedel等人,Chembiochem,2011,12,100-109中所述进行合成并且表征产物。分析型RP-HPLC(Interchrom UP5WC4-25QS,25-100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA),历时25min.):纯度>96%; $t_R=22.71$ min。MALDI-TOF:对 $C_{312}H_{552}N_{74}O_{85}S_3$ 计算的MW:6796.4Da;MW测定值:6798.2Da($\pm 0.05\%$)。

[0228] 脂肽结构单元11

[0229]

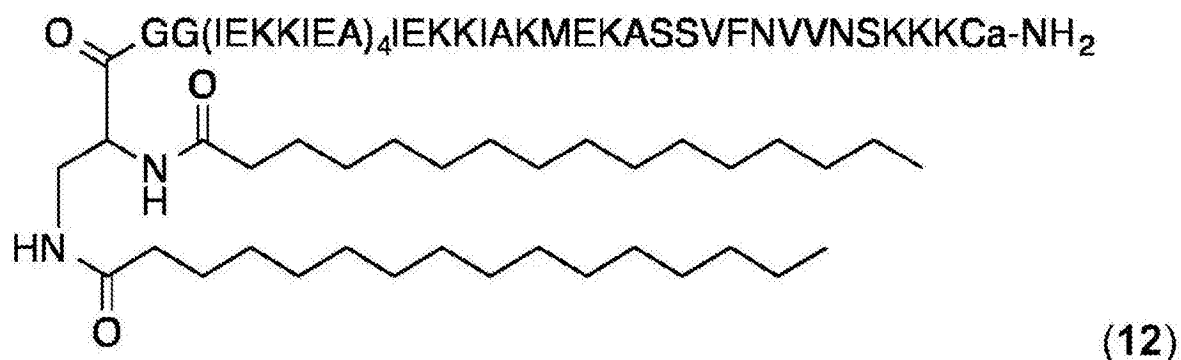


[0230] 这种脂肽结构单元包含修饰的卷曲螺旋结构域,其在七重复单元“defgabc”IEKKIEG (SEQ ID NO:125)的“c”位置上具有Gly。

[0231] 如W0 2008/068017中所述合成并且纯化修饰的脂肽结构单元。分析型RP-HPLC (Interchrom UP5WC4-25QS, 25—100% MeCN的H₂O溶液(+0.1% TFA), 历时25min.): 纯度>98%, t_R=21.41min。ESI-MS: 对C₃₀₈H₅₄₄N₇₄O₈₅S₃计算的MW 6740.3Da; 测定值6741.7Da。

[0232] 脂肽结构单元12

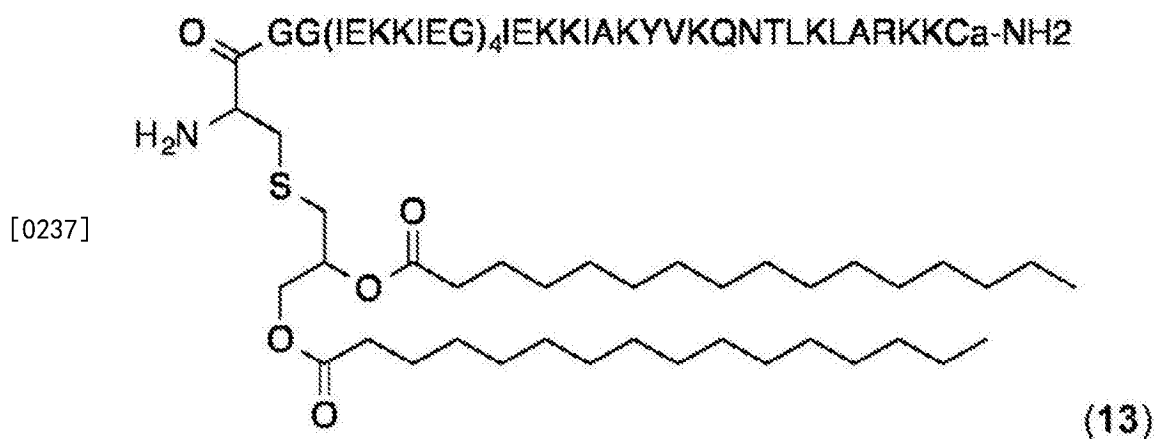
[0233]



[0234] 这种脂肽结构单元包含修饰的脂质N,N'-二棕榈酰基.-2,3-二氨基丙酰胺 (“Pam₂Dap”)。“a”表示D-丙氨酸。

[0235] 如W0 2008/068017中所述合成并且纯化脂肽结构单元,除了在合成结束时并入Pam₂Dap而不是Pam₂Cys。通过分析型HPLC和MS分析脂肽。分析型RP-HPLC (C4柱, A=H₂O+0.1% TFA, B=MeCN+0.1% TFA, 20—100%B, 25min.): 纯度:>95%。t_R=22.1min。ESI-MS: MW 计算值9594.5Da, 测定值9596.17Da。

[0236] 脂肽结构单元13



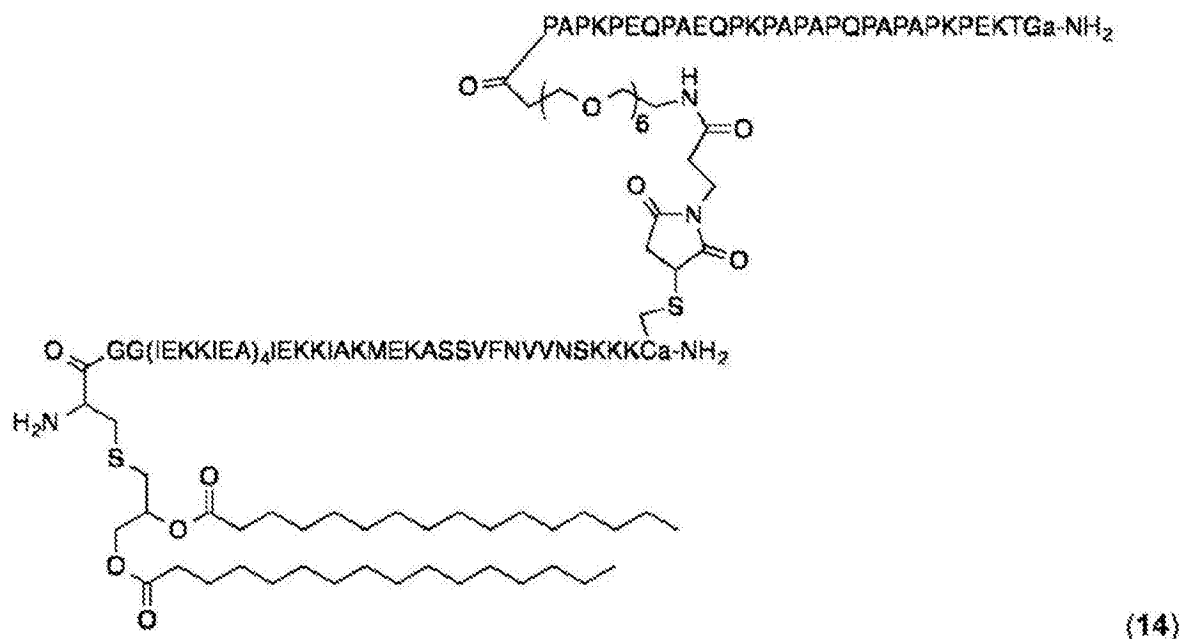
[0238] 这种脂肽结构单元包含泛宿主性T-辅助表位(KYVKQNTLKLARK, SEQID NO:126),其来源于来自流感血凝素残基307-309(SEQID NO:19)的HLA-DRB 101限制表位(Stern,LJ.等人Nature1994,368,215)。“a”表示D-丙氨酸。

[0239] 基本上如W0 2008/068017中所述合成并且纯化脂肽结构单元,并且通过分析型HPLC和MS分析。分析型RP-HPLC(C4柱,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20—100%B,25min.):纯度:>95%。t_R=22.35min。ESI-MS:对C₃₀₂H₅₃₈N₇₄O₇₉S₂计算的MW:6530.0Da;测定值6530.4Da(±0.05%)。

[0240] 合成如下缀合物:

[0241] 缀合物14(马来酰亚氨基肽1+脂肽10)

[0242]



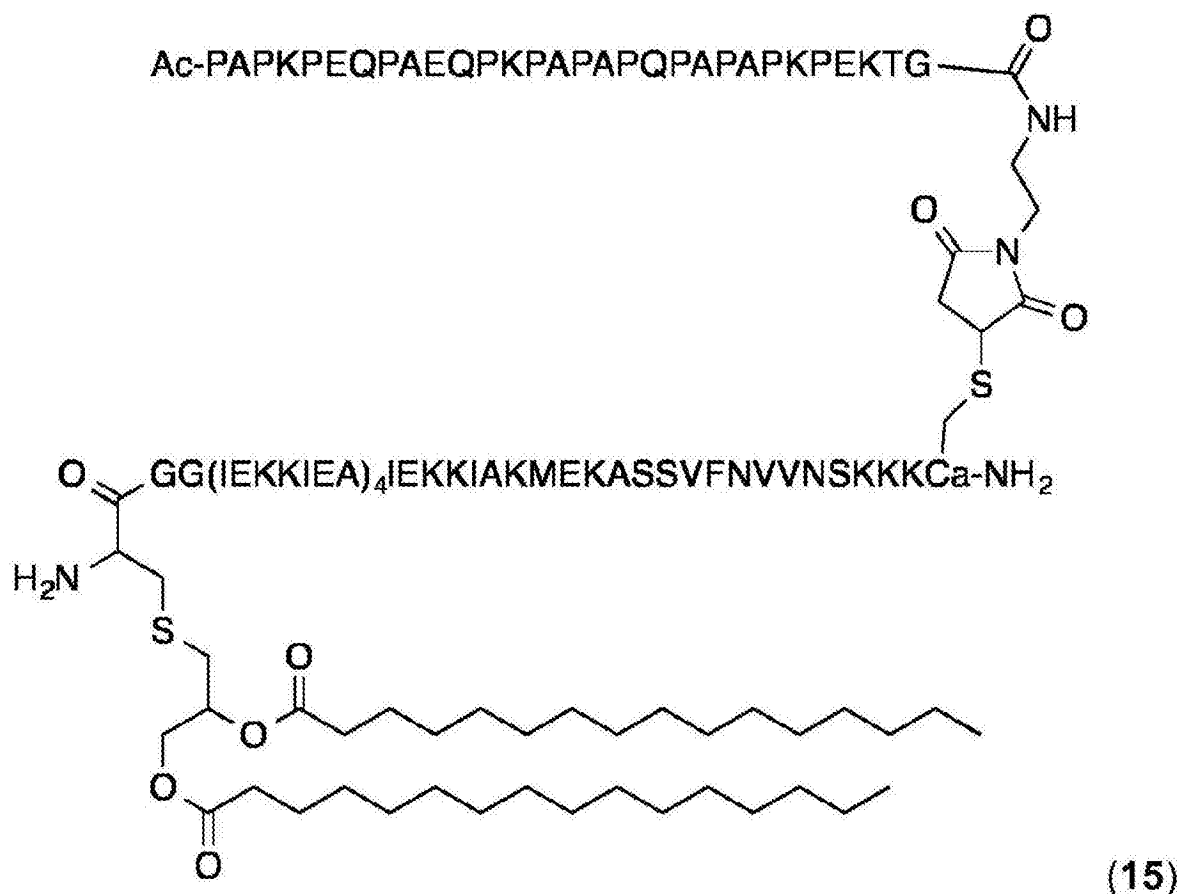
[0243] 1与10缀合基本上如W0 2008/068017中所述进行。向10(6.0mg,0.9μmol)在H₂O/MeCN 1:1(3ml)中的溶液中加入1(4.8mg,1.3μmol)在H₂O/MeCN 1:1(2.4ml)中的溶液。谨慎地调节pH,使用0.1NaOH维持在pH 6.5-7.0,将该混合物在室温搅拌2h。然后通过使用C4制备型柱(Interchrom UP5WC4-25M,250x 10mm)的RP-HPLC和梯度50—100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)纯化缀合物,历时17min。通过使用Interchrom UP5WC4-25QS柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和梯度20—100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析缀合物14,25min:纯度

>97% ; $t_R = 22.34 \text{ min}$ 。MALDI-TOF MS: 对 $C_{475}H_{811}N_{115}O_{136}S_3$ 计算的MW: 10406.6Da; 测定值 10407.8Da ($\pm 0.1\%$)。

[0244] 将该缀合物混悬于PBS中, 平衡30min., 稀释至0.5mg/ml, 通过使用Wyatt DynaPro Titan仪器的动态光散射(DLS)在4℃、25℃和37℃、应用激光强度400'000计数/s和10s获取时间分析。通过规律化分析的大小分布是单模态的, 且大小分散性很小。平均流体动力学半径(R_h)为12.0nm, 且%Pd值在25℃为12.3%。 R_h 和%Pd的类似值在其它温度下得到。

[0245] 缀合物15(马来酰亚氨基肽2+脂肽10)

[0246]

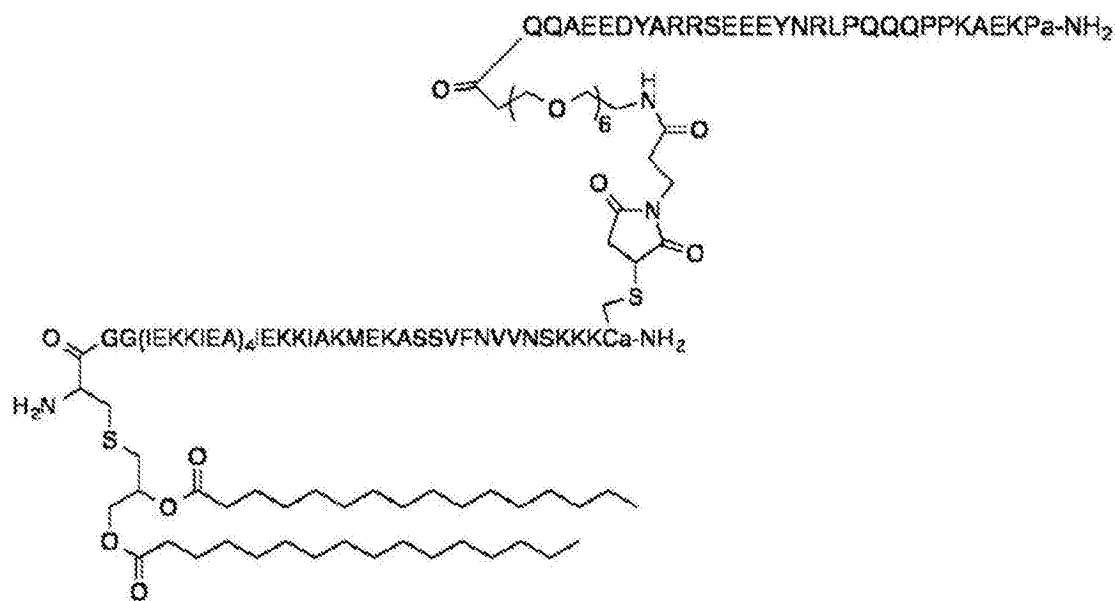


[0247] 2与10缀合和缀合物的纯化基本上如上述对缀合物14中所述进行。通过使用Interchrom UP5WC4-25QS柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和梯度20—100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析产物15, 25min: 纯度>97% ; $t_R = 22.41 \text{ min}$ 。ESI-MS: 对 $C_{458}H_{779}N_{113}O_{128}S_3$ 计算的MW: 10012.9Da; 测定值10011.1Da ($\pm 0.1\%$)。

[0248] 制备缀合物12在PBS中的混悬液, 使用DLS如上述对14所述分析。 R_h 值在13.2—14.2nm的范围, 且%Pd值在25℃下在12.6-18.0%的范围。

[0249] 缀合物16(马来酰亚氨基肽3+脂肽10)

[0250]

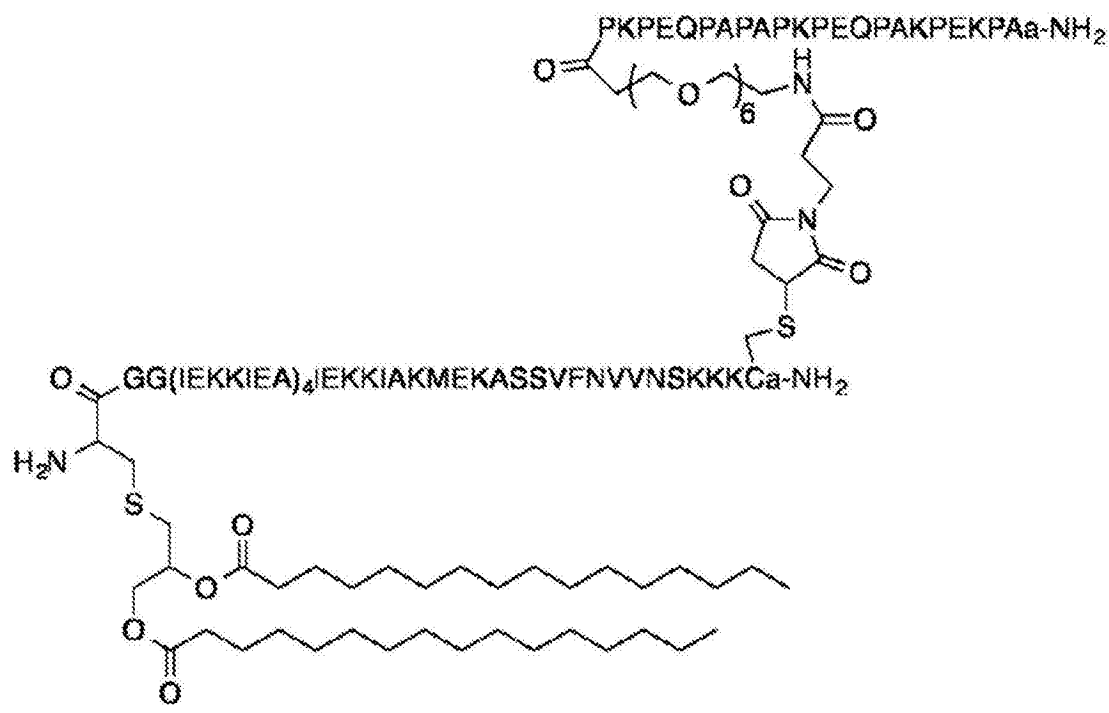


[0251] 3与10缀合和缀合物的纯化基本上如上述对缀合物14中所述进行。通过使用Interchrom UP5WC4-25QS柱(250x 4.6mm)的分析型RP-HPLC和梯度20—100%MeCN的H₂O溶液(+0.1%TFA)分析产物16, 25min:纯度>97%; t_R=22.0min。MALDI-TOF MS: 对C₄₇₅H₈₁₁N₁₁₅O₁₃₆S₃计算的MW:10869.8Da;测定值10'872.3Da(±0.1%)。

[0252] 制备缀合物13在PBS中的混悬液,使用DLS如上述对14所述分析。R_h值在14.0-15.0nm的范围,且%Pd值在13.0-13.7%的范围。缀合物14和缀合物16颗粒的混合物的DLS分析产生了12.3-13.3nm的R_h和约25-26%的%Pd值,表明混合颗粒不会改变总大小分布。

[0253] 缀合物17(马来酰亚氨基肽4+脂肽14)

[0254]



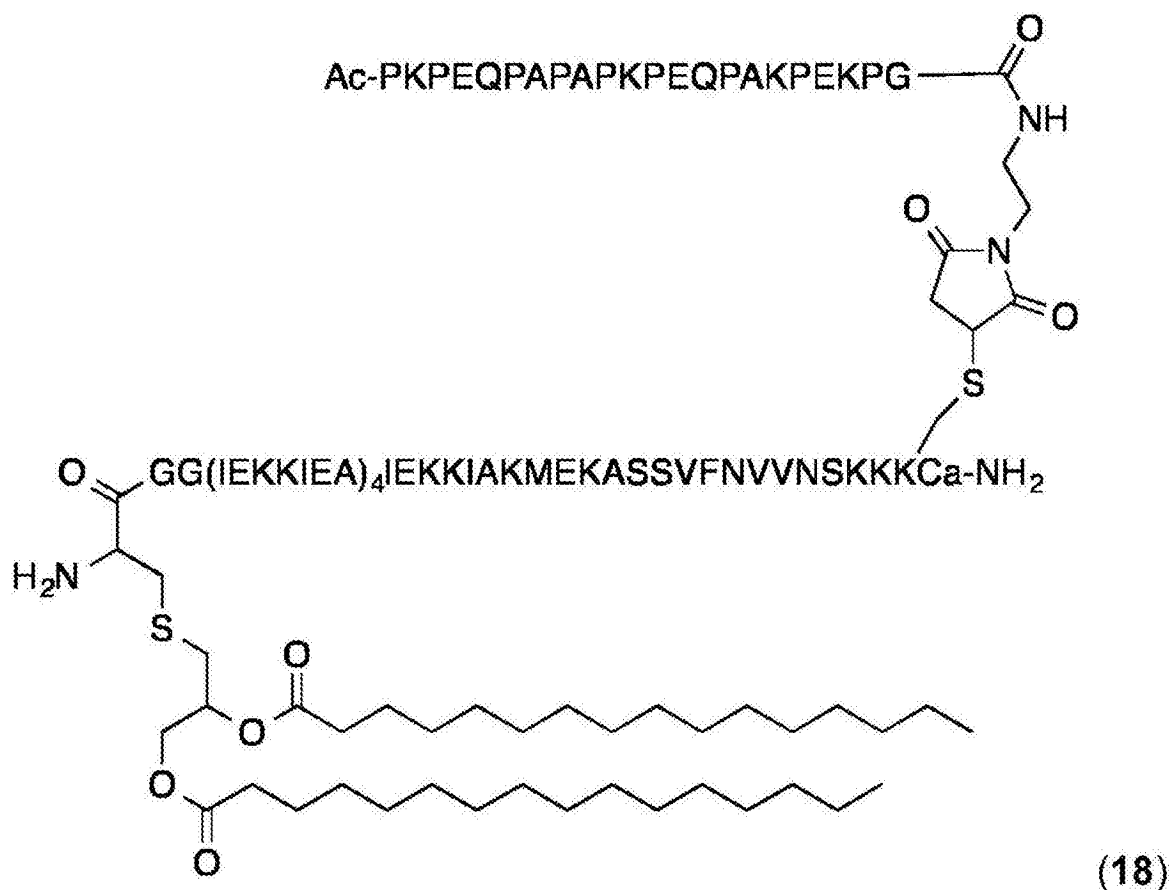
[0255] 4与10缀合和缀合物的纯化基本上如上述对缀合物17中所述进行。通过C4分析型

柱(Interchrom, UP5WC4-25QS, 4.6mm x 250mm, **300 Å**)的反相HPLC和MALDI-MS分析产物17。分析型RP-HPLC(C4柱, A=H₂O+0.1% TFA, B=MeCN+0.1% TFA, 20—100%B, 25min.): 纯度:>95%。 t_R =18.8min。MALDI-TOF MS: 对C₄₄₃H₇₆₂N₁₀₆O₁₂₆S₃计算的MW: 9685.6Da; 测定值9686.2Da(±0.1%)。

[0256] 制备缀合物17在PBS中的混悬液, 使用DLS如上述对14所述分析。 R_h 值在11.1—11.8nm的范围, 且%Pd值约为13%。

[0257] 缀合物18(马来酰亚氨基肽5+脂肽10)

[0258]

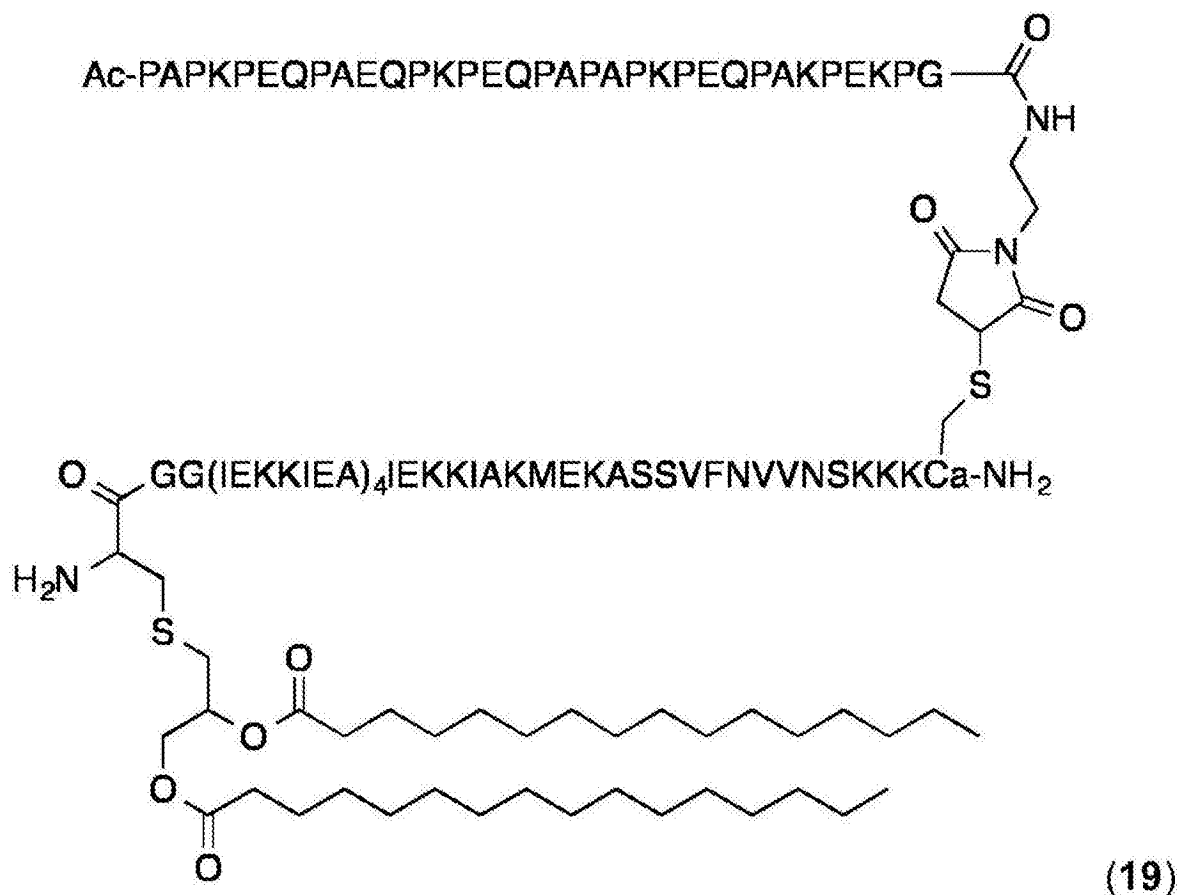


[0259] 5与10缀合和缀合物的纯化基本上如上述对缀合物18中所述进行。通过使用C4分析型柱(Interchrom, UP5WC4-25QS, 4.6mm x 250mm, **300 Å**)的反相HPLC和MALDI-MS分析产物18。分析型RP-HPLC(C4柱, A=H₂O+0.1% TFA, B=MeCN+0.1% TFA, 20—100%B, 25min.): 纯度:>96%。 t_R =22.55min。MALDI-TOF MS: 对C₄₂₅H₇₂₈N₁₀₄O₁₁₈S₃计算的MW: 9279.2Da; 测定值9280.2Da(±0.1%)。

[0260] 制备缀合物18在PBS中的混悬液, 使用DLS如上述对14所述分析。 R_h 值在10.0—10.5nm的范围, 且%Pd值约为16%。

[0261] 缀合物19(马来酰亚氨基肽6+脂肽10)

[0262]

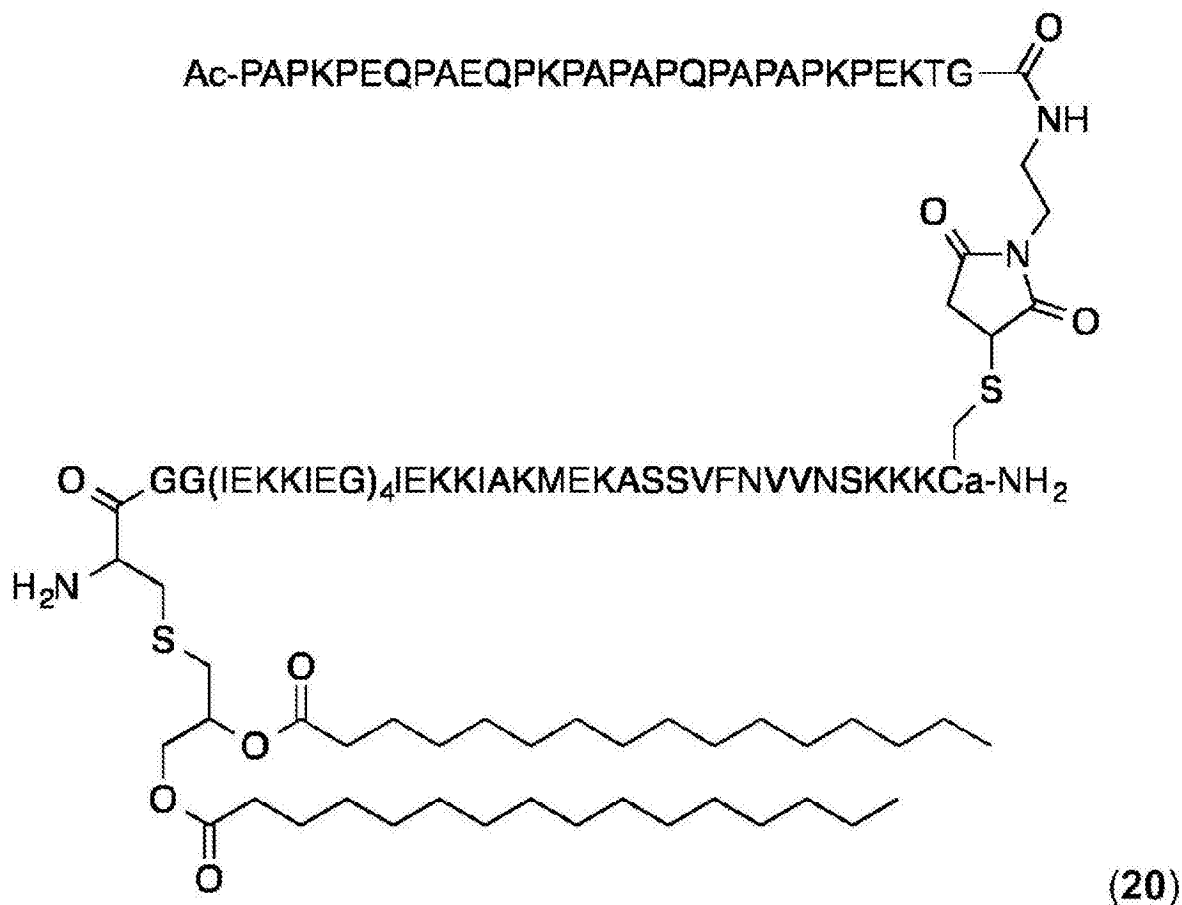


[0263] 6与10缀合和缀合物的纯化基本上如上述对缀合物14中所述进行。通过使用C4分析型柱(Interchrom,UP5WC4-25QS,4.6mm x 250mm,**300 Å**)的反相HPLC和MALDI-MS分析产物19。分析型RP-HPLC(C4柱,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20—100%B,25min.):纯度:>96%。t_R=22.34min。MALDI-TOF MS:对C₄₇₆H₈₀₇N₁₁₉O₁₃₅S₃计算的MW:10453.4Da;测定值10452.7Da(±0.1%)。

[0264] 制备缀合物17在PBS中的混悬液,使用DLS如上述对19所述分析。 R_h 值在12.1-14.5nm的范围,且%Pd值为12-20%。

[0265] 缀合物20(马来酰亚氨基肽6+脂肽11)

[0266]

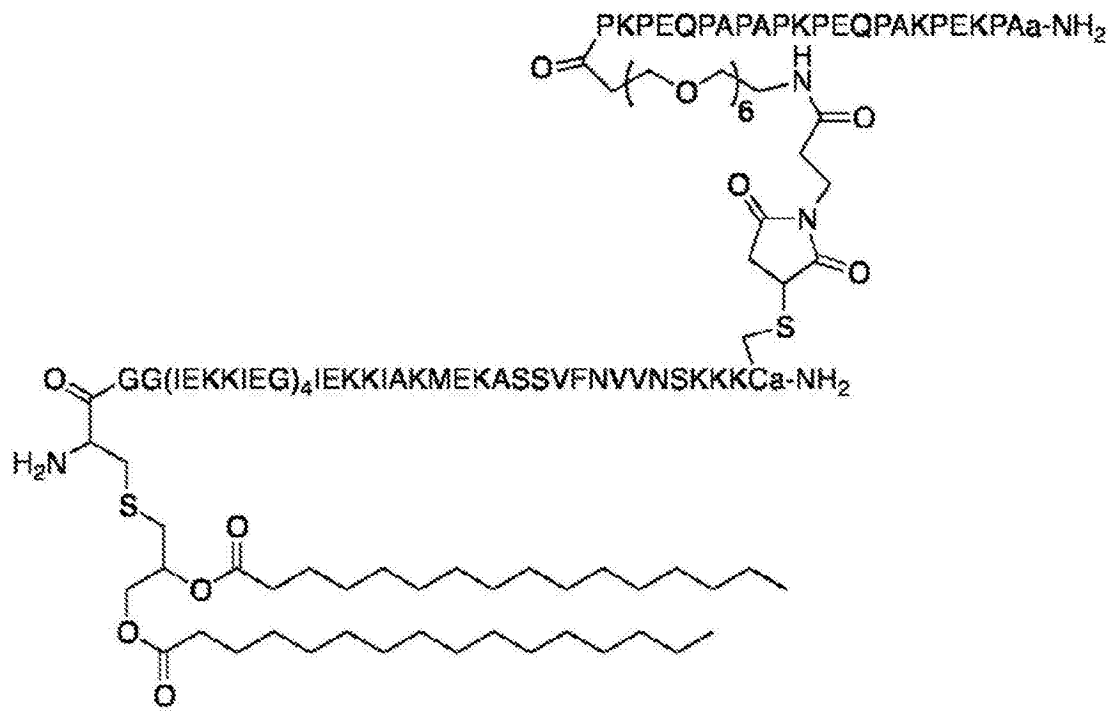


[0267] 6与11缀合和缀合物的纯化基本上如上述对缀合物14中所述进行。通过使用C4分析型柱(Interchrom, UP5WC4-25QS, 4.6mm x 250mm, **300 Å**)的反相HPLC和MALDI-MS分析产物20。分析型RP-HPLC(C4柱, A=H₂O+0.1% TFA, B=MeCN+0.1% TFA, 20—100% B, 25min.): 纯度:>98%。t_R=22.34min。ESI-MS: 对C₄₅₄H₇₇₃N₁₁₃O₁₂₉S₃(琥珀酰亚胺环水解)计算的MW: 9975.02Da; 测定值9974.7Da(±0.01%)。

[0268] 制备缀合物20在PBS中的混悬液, 使用DLS如上述对14所述分析。R_h值在11.7—12.3nm的范围, 且%Pd值约为20%。

[0269] 缀合物21(马来酰亚胺氨基酸4+脂肽11)

[0270]

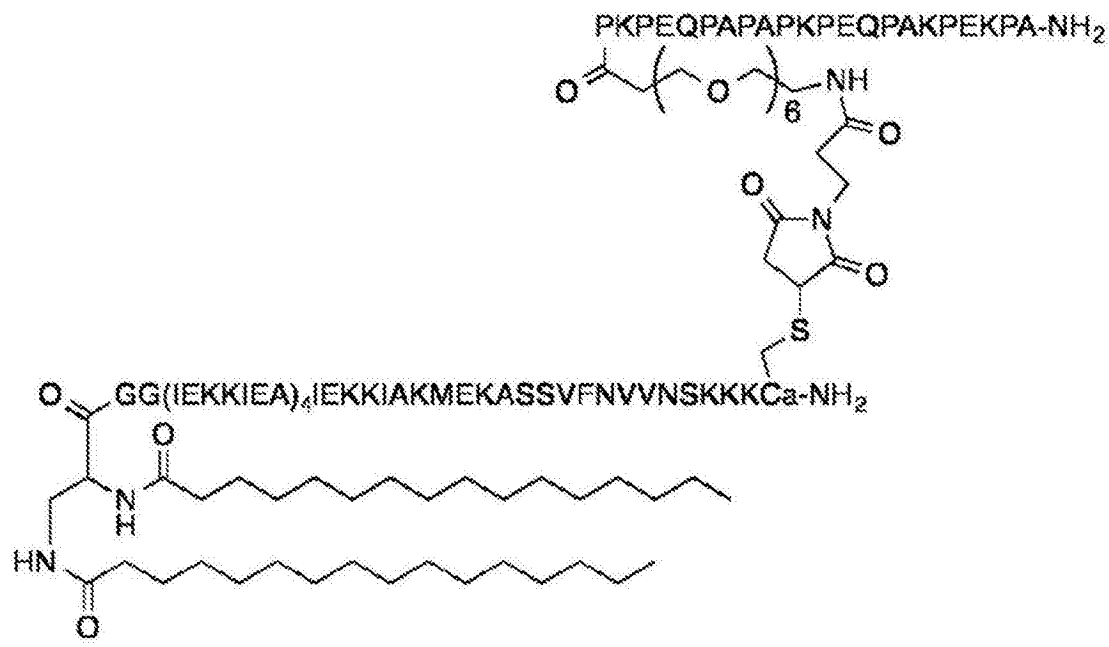


[0271] 使马来酰亚氨基肽4与11缀合,且如上述对缀合物14所述纯化该缀合物。分析型RP-HPLC(C4柱,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20-100%B,25min.):纯度:>95%。t_R=17.78min。对C₄₃₉H₇₅₃N₁₀₅O₁₂₇S₃计算的MW:9630.5Da;测定值9631.2Da。

[0272] DLS(0.5mg/ml,在PBS中,25℃):R_h=10.7nm;%Pd=12-13%。

[0273] 缀合物22(马来酰亚氨基肽6+脂肽12)

[0274]



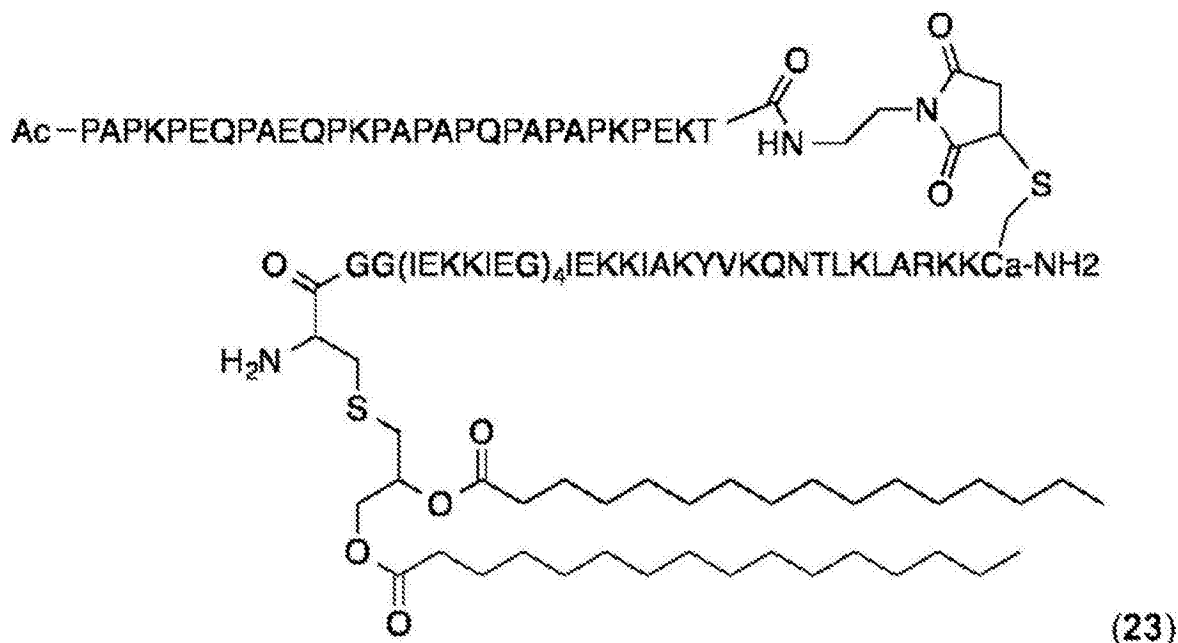
[0275] 使马来酰亚氨基肽4与12缀合,且如上述对缀合物14所述纯化该缀合物。分析型RP-HPLC(C4柱,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20-100%B,25min.):纯度:>95%。t_R=18.37min。MALDI-TOF:对于C₄₄₀H₇₅₇N₁₀₇O₁₂₄S₂计算的MW:9594.5Da,测定值9595.1(±

0.1%)Da。

[0276] DLS测量(在PBS中0.5mg, 25°)得到 R_h 为10.4-11.1nm且%Pd值为10-12%。

[0277] 缀合物23(马来酰亚氨基肽6+脂肽13)

[0278]



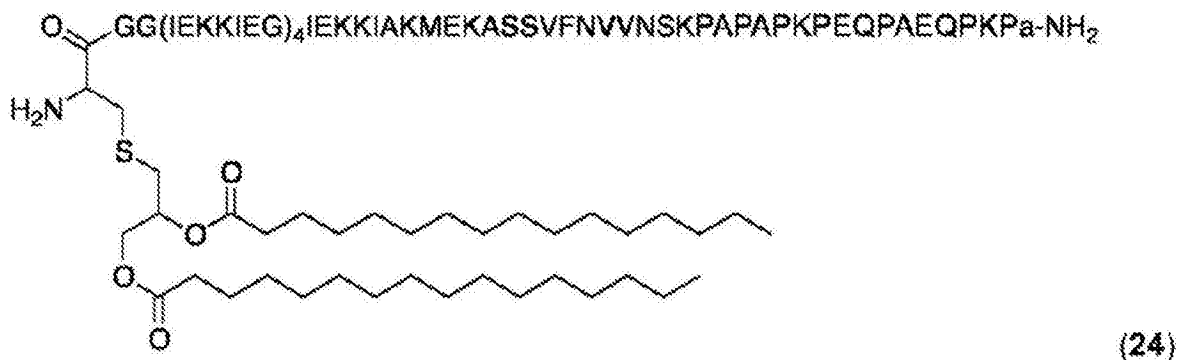
[0279] 使马来酰亚氨基肽6与13缀合,且如上述对缀合物14所述纯化该缀合物。分析型RP-HPLC(C4柱,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20-100%B,25min.):纯度:>95%。 t_R =18.25min。MALDI-TOF:对C₄₄₈H₇₆₅N₁₁₃O₁₂₃S₂(琥珀酰亚胺环水解)计算的MW:9768.7Da,测定值9767.0Da(±0.1%)。

[0280] DLS测量(在PBS中0.5mg, 25°)得到 R_h 为9.9-10.2nm且%Pd值为15-18%。

[0281] 通过融合PR肽抗原的N-末端与脂肽结构单元的C-末端制备另外的脂肽类。制备了下列融合脂肽。

[0282] 脂肽(24)

[0283]



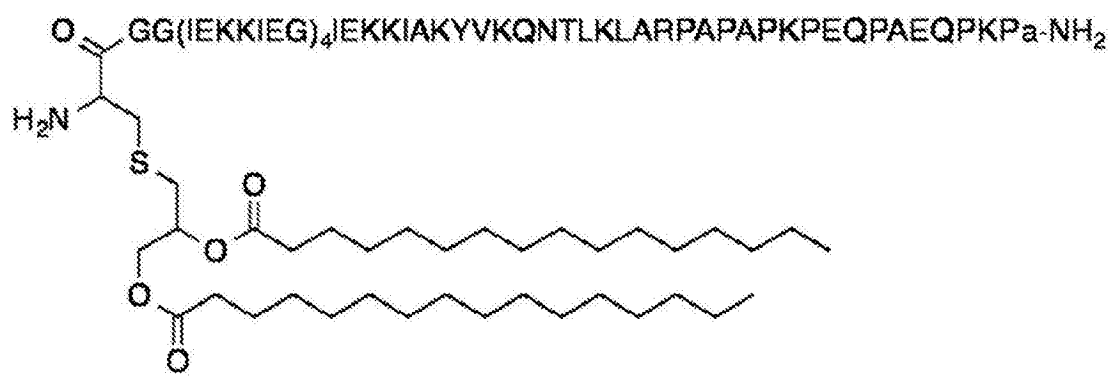
[0284] 在本实施例中,使PR序列P7,PAPAPKPEQPAEQPKP(SEQ ID NO:33)直接与GG(IEKKIEG)₄IEKKIAKMEKASSVFNVVNSK(SEQ ID NO:127)的C-末端融合,得到序列GG(IEKKIEG)₄IEKKIAKMEKASSVFNVVNSKPAPAPKPEQPAEQPK P(SEQ ID NO:128)。通过添加Pam2Cys使N-末端脂化,并且向脂肽24中的C-末端添加D-丙氨酸(“a”)。

[0285] 使用常规固相态合成方法合成融合脂肽24(W.C.Chan,P.D.White,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach,Oxford University Press,Oxford,UK,2000),且如上述对脂肽10所述纯化。MALDI-TOF MS:对于 $C_{369}H_{633}N_{89}O_{104}S_2$ 计算的MW:8044.6Da;测定值:8044.6Da($\pm 0.1\%$)。分析型RP-HPLC(Interchrom UP5WC4-25QS,25—100%MeCN在 H_2O 中的溶液(+0.1%TFA),历时25min.):纯度>98%, $t_R=20.48min$ 。

[0286] DLS(在PBS中0.5mg/ml,25℃): $R_h=10.7nm$; %Pd=12-13%。

[0287] 脂肽(25)

[0288]



[0289] 在本实施例中,使PR序列P7,PAPAPKPEQPAEQPKP(SEQ ID NO:33)直接与GG(IEKKIEG)4IEKKIAKYVKQNTLKLAR(SEQ ID NO:129)的C-末端融合,得到序列GG(IEKKIEG)4IEKKIAKMEKASSVFNVVNSKPAPAPKPEQPAEQPKP(SEQ ID NO:130)。通过添加Pam2Cys使N-末端脂化,并且向脂肽25中的C-末端添加D-丙氨酸(“a”)。

[0290] 如上述对24所述合成并且纯化融合脂肽25。ESI-MS:对于 $C_{360}H_{639}N_{91}O_{99}S$ 计算MW:7966.6Da;测定值:7967.0Da($\pm 0.1\%$)。分析型RP-HPLC(Interchrom UP5WC4-25QS,25—100%MeCN的 H_2O 溶液(+0.1%TFA),历时25min.):纯度>98%, $t_R=21.41min$ 。

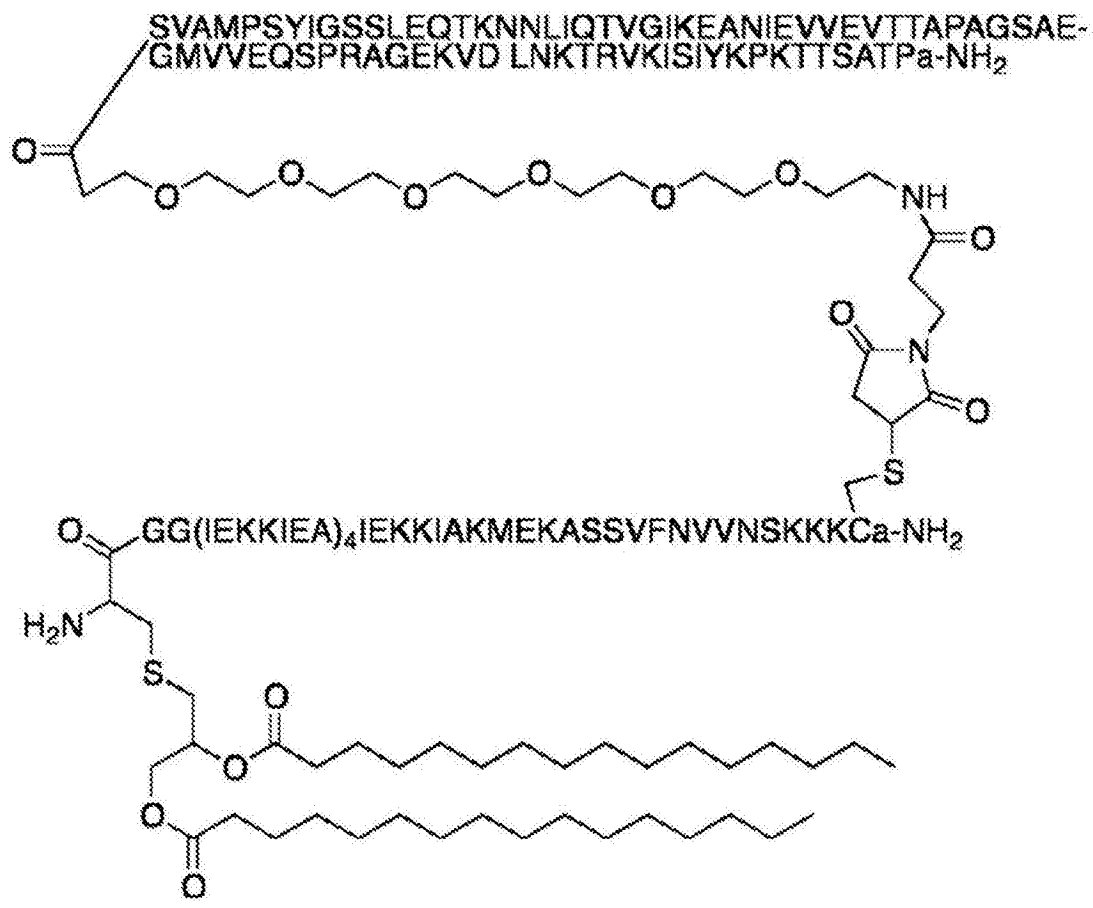
[0291] DLS(在PBS中0.5mg/ml,25℃): $R_h=12.2-13.7nm$; %Pd=10-15%。

[0292] 实施例3:对照品的制备

[0293] 制备下列对照化合物用于免疫接种和攻击实验。

[0294] 缀合物26(非PR缀合物)

[0295]



[0296] 这种缀合物包含StkP(SEQ ID NO:115)的C-末端部分(StkP-C;PASTA+C-末端),除了将2个突变(F594Q和I602T)并入StkP序列以除去表面暴露的疏水性残基,得到序列

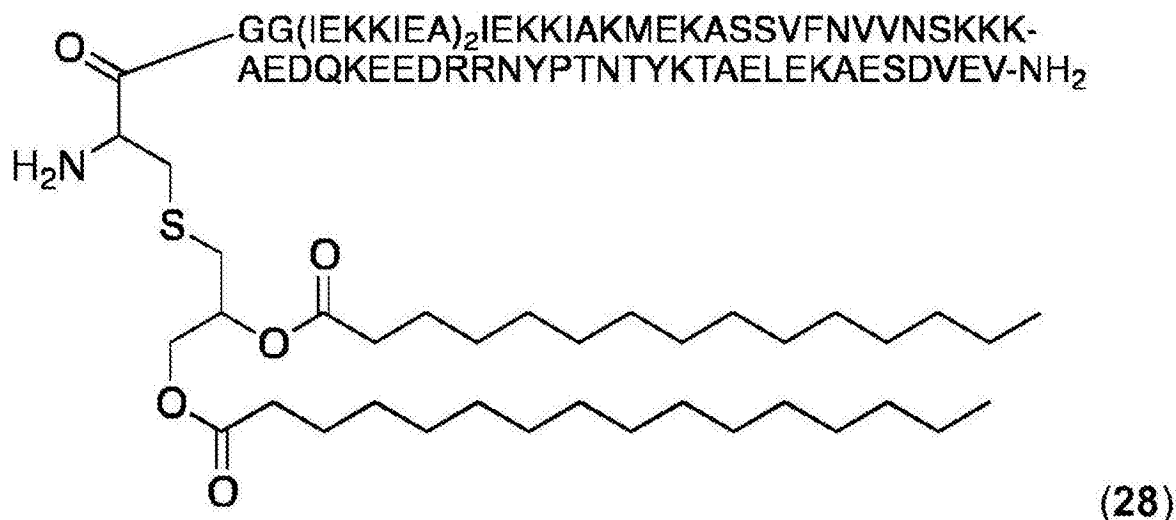
[0297]

SVAMPSYIGSSLEQTKNNLIQTVGIKEANIEVVEVTTAPAGSAEGMVVEQSPRAGEKVD LNKTRVKISIIYKPKTTSATP(SEQ ID NO:131)。用a-NH₂阻断C-末端,其中“a”表示D-丙氨酸。通过NMR发现,缀合物中的这种StkP肽采用有规则的青霉素结合蛋白和Ser/Thr激酶结合(PASTA)结构域-结构。

[0298] 合成相应的马来酰亚氨基肽27(3-马来酰亚氨基丙酰基)-21-氨基-4,7,10,13,16,19-六氧杂二十一烷酰-(SEQ ID NO:131)-a-NH₂)并且如上述对14所述与10缀合。通过HPLC、MALDI-MS和DLS分析缀合物26。分析型RP-HPLC(Interchrom UP5WC4-25QS,250x4.6mm,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20-100%B,25min.):纯度:>95%。t_R=18.41min。MALDI-TOF:对C₇₀₀H₁₂₀₁N₁₇₇O₂₁₆S₅计算的MW:15713.41Da;测定值15715.4Da(±0.1%)。DLS(在PBS中0.5mg/ml,25℃):R_h=16.3nm,%Pd=16.9%。

[0299] 脂肽28

[0300]



[0301] 在这种脂肽中,C末端上的31个氨基酸对应于来自TIGR4的PspC(SEQ ID NO:116)的氨基酸344—377,除了2个突变被并入抗原以改善溶解性(L366A,I370K;TIGR4PspC编号),得到肽AEDQKEEDRRNYPTNTYKTAELEKAESDVEV(SEQ ID NO:132)。用r-NH₂阻断C-末端,其中“r”表示D-精氨酸。这种肽进一步通过短连接体(KKK)与通用T-辅助细胞表位CST.3*(SEQ ID NO:23)偶合。

[0302] 如W0 2008/068017中所述合成并且纯化脂肽28,并且通过HPLC、MALDI-MS和DLS分析。分析型RP-HPLC(Interchrom UP5WC4-25QS,250x 4.6mm,A=H₂O+0.1%TFA,B=MeCN+0.1%TFA,20-100%B,25min.):纯度:>95%.t_R=18.41min。MALDI-TOF:对C₃₈₆H₆₅₄N₁₀₀O₁₂₁S₂计算的MW:8696.1Da;测定值8696.0Da。DLS(在PBS中0.5mg/ml,25℃):R_h=7.9nm;%Pd=29%。

[0303] 重组PspA蛋白(rPspA)

[0304] 克隆来自肺炎链球菌菌株SP1577的PspA的富含脯氨酸的区,并且将其表达为重组Trx融合蛋白(rPspA)。克隆和表达来自SP1577菌株的重组PR如W0 2007/089866中所述进行。通过SDS-PAGE、使用抗-PspA抗体的斑点印迹和质谱法证实纯度和身份。该蛋白质的序列为:

[0305] MSDKIIHLTD DSFDTDVLKA DGAILVDFWA EWCGPCKMIA PILDEIADEYQGKLTVAKLN
IDQNPGTAPK YGIRGIPTLL LFKNGEVAAT KVGALSKGQLKEFLDANLAG SGSGHMHMHHH HHSSGLVPRG
SGMKETAALK FERQHMDSPDLGTDDDDKAM ADLKKAVN EP EKPAEET

PAP APKPEQPAEQ PKPAPAPQPA

PAPKPEKTDD QQAEDYARR SEEYENRLPQ QQPPKAEKPA PAPKPEQPVP

APKPEQPVPA PKTGWKQE(SEQ ID NO:133)

[0306] 包括非脯氨酸区段的PspA富含脯氨酸的区如斜体字所示。

[0307] 实施例4:小鼠免疫研究

[0308] 在小鼠中测试缀合物对肺炎链球菌的免疫原性。全部实验根据Swiss规则和动物权利保护条例进行并且经过责任当局批准。

[0309] 为了分析抗体应答,给远系杂交种的6-8周龄雌性NMRI远系杂交种小鼠(10只/组)经皮下免疫2次表4中所示的0.1ml制剂,在第0天和第21天,间隔3周进行。给对照组动物免

疫PBS或rPspA+白矾的盐水溶液。在第一次免疫前和第二次免疫后10天采集血液,并且使用ELISA分析血清,以便测定IgG抗体针对富含脯氨酸的肽的滴度;使用Western Blot以便测定IgG与内源性蛋白质结合,并且使用流式细胞术以便测定IgG与完整肺炎球菌的表面结合。

[0310] 表4.用于小鼠免疫的制剂

[0311]

制剂	佐剂	浓度(mg/ml) ^{a)}
在 PBS 中的 14	无	0.2
在 PBS 中的 15	无	0.2
在 PBS 中的 16	无	0.2
在 PBS 中的 17	无	0.2
在 PBS 中的 18	无	0.2
在 PBS 中的 19	无	0.2
在 PBS 中的 16 + 14	无	0.2 + 0.2
在盐水中的 rPspA	白矾	0.2
PBS	无	-
^{a)} 显示总脂肽缀合物/蛋白质浓度。		

[0312] 为了进行ELISA,在4℃,用5μl/ml PR肽类或rPspA在PBS中的溶液(pH 7.2,50μl/孔)将MaxiSorp 96-孔微量滴定板(Nunc,Fischer Scientific)包被过夜。基本上如W02008/068017中所述,使用用于IgG检测的山羊抗-小鼠IgG(γ-链-特异性)抗体(Sigma, St.Louis,MO)和1mg/ml磷酸对-硝基苯酯(Sigma)进行ELISA。将终点滴度定义为测试血清OD大于PBS平均OD+两个SD的最高血清稀释度。

[0313] 为了对免疫血清进行Western Blot,在37℃、5%CO₂在血液琼脂平板上培养SP1577并且制备总细菌裂解物。通过SDS-PAGE在还原条件下分离裂解物并且印迹在硝酸纤维素膜上。将印迹用免疫或免疫前血清温育(在PBS中1:500),并且使用ECL系统展开。将PspA-特异性单克隆抗体用作阳性对照。

[0314] 为了进行流式细胞术分析(FACS),如上所述培养SP1577,用福尔马林使其失活30min.,用5mg/ml在PBS中的无脂肪酸的BSA封闭,并且将约7x 10⁵CFU与免疫或免疫前血清(在PBS中1:100)一起在室温下温育1h。使用Alexafluor 488-缀合的二抗检测表面结合的IgG。

[0315] 将ELISA几何平均值终点滴度(GMT)±平均值的一个标准偏差(SEM)和来自Western Blot和FACS分析(作为阳性vs.阴性的反应性)的结果总结在表5中。

[0316] 表5:2次免疫后小鼠中的IgG应答

[0317]

免疫原	ELISA (GMT $\pm$ SEM) ^{a)}	Western Blot (阳性/阴性)	FACS (阳性/阴性)
14	26013 $\pm$ 30255	9/1	8/2
15	271227 $\pm$ 82014	10/0	10/0
16	65606 $\pm$ 13592	10/0	10/0
17	82066 $\pm$ 36672	8/2	6/4
18	10354 $\pm$ 6760	7/3	5/5
19	263069 $\pm$ 62452	7/3	7/3
14+ 16 ^{a)}	9027 $\pm$ 6150	10/0	10/0
14 + 16 ^{b)}	65606 $\pm$ 13592	10/0	10/0
rPspA + 白矾	212977 $\pm$ 65684	10/0	10/0
PBS	< 100	0/10	0/10
^{a)} 免疫前血清显示在 ELISA、Western Blot 和 FACS 中无显著反应性。 ^{b)} 在 ELISA 中测定的对 14 的 IgG 应答。 ^{c)} 在 ELISA 中测定的对 16 的 IgG 应答。			

[0318] 尽管在远系杂交种小鼠中抗体应答可变,但是全部小鼠如ELISA中测定的均出现抗原-特异性IgG的高滴度,且大部分免疫血清中的IgG结合内源性PspA并且结合完整SP1577细胞。在免疫前血清和来自PBS-免疫小鼠的血清中未检测到显著水平的抗原-特异性IgG。

[0319] 使用Western Blot和FACS和一组有遗传差异的肺炎球菌菌株评价引起的IgG的交叉反应性,所述一组有遗传差异的肺炎球菌菌株代表属于来自PspA家族1-3的不同进化枝的不同PspA,它们定义在Hollingshead,Becker等人,Infect Immun,2000,68,5889-5900中;和不同的肺炎球菌荚膜血清型,包括目前批准的肺炎球菌缀合疫苗未涵盖的血清型。

[0320] 培养细菌并且使用来自免疫小鼠的血清如上述对SP1577所述进行Western Blot和FACS分析。将结果总结在下表6中。

[0321] 表6:小鼠血清中的IgG与遗传多样的肺炎球菌的交叉反应性

[0322]

免疫原	试验 ^{a)}	菌株 /血清型						
		SP1577	SP920	SP4408	SP1272	SP1388	SP1260	SP716
		/1	/8	/19A	/2	/4	/4	/5
14	WBA	++	+	+	++	+	+	++
	FACS	++	+	++	++	+	++	++
15	WBA	++	++	++	++	+	++	++
	FACS	++	+	++	+	+	++	++
16	WBA	++	++	+	++	++	++	++
	FACS	++	++	++	++	++	++	++
17	WBA	++	-	-	+	++	-	-
	FACS	++	++	++	++	++	-	-
18	WBA	++	-	-	+	++	-	-
	FACS	++	++	++	++	++	-	-
19	WBA	+	-	-	+	++	-	+

[0323]

	FACS	+	+	++	++	++	++	++
14 + 16	WBA	++	++	++	++	++	++	++
	FACS	++	++	++	++	++	++	++
rPspA + 白矾	WBA	++	++	++	++	++	++	++
	FACS	++	++	++	++	++	++	++
^{a)} 使用两次免疫后的血清。免疫前血清在测定中未显示反应性。++ =强带/信号; + = 弱带/信号; - = 未检测到结合。								

[0324] 使用遗传多样的组得到的结果表明,用PR肽抗原免疫引起广泛的交叉反应性IgG,不过,一些PR肽抗原构建体引起超过其它的更广泛的交叉反应性IgG。

[0325] 为了进行攻击性研究,给NMRI远系杂交种小鼠用如上所述的不同制剂免疫。为了比较免疫原性,给另外的动物用rPspA+白矾、缀合物44或脂肽46免疫。在最终免疫后10天给小鼠取血,如上所述通过ELISA分析血清,以便测定血清转换。然后对小鼠经尾静脉用100倍预先测定的致死剂量(100x LD₁₀₀)肺炎球菌通过静脉内(iv)攻击,在攻击前所述肺炎球菌通过在小鼠中传代被赋予高度毒力。通过腹膜内(ip)或静脉内(iv)注射使细菌传代。攻击后,检测小鼠的健康状态,历时14天。对濒临死亡的动物实施安乐死,并且记录达到濒临死

亡的时间。将用脂肽类或蛋白质免疫的动物的存活和达到濒临死亡的时间与单独用PBS免疫的动物的存活和达到濒临死亡的时间比较。

[0326] 将使用菌株SP1577得到的结果总结在下表7中。SP1577菌株在小鼠中是具有高度毒力的。未保护的小鼠死亡或在攻击后的前12-24h变成濒临死亡。因此,保护显示了高功效。

[0327] 表7:针对菌株SP1577致死性攻击保护NMRI小鼠

[0328]

制剂	传代	到濒临死亡的天数		存活的 P-值 ^{b)}
		测试	对照(PBS)	
在 PBS 中的 14	ip	1, 2, 3 x > 14	5 x 1	0.0143
在 PBS 中的 14	iv	2 x 1, 5, 2 x > 14	5 x 1	0.0495
在 PBS 中的 15	ip	1, 2, 3, 2 x > 14	5 x 1	0.0143
在 PBS 中的 15	iv	3 x 2, 2 x > 14	5 x 1	0.0027
在 PBS 中的 16 + 14	ip	1, 1.5, 4, 2 x > 14	5 x 1	0.0143
在 PBS 中的 16 + 14	iv	3 x 2, 6, 14	5 x 1	0.0027
在 PBS 中的 18	ip	1, 1.5, 3 x > 14	5 x 1	0.0143
在 PBS 中的 19	ip	2 x 2, 3 x > 14	5 x 1	0.0027
在 PBS 中的 17+26+28	ip	2 x 1, 3 x > 14	5 x 1	0.0495
rPspA + 白矾	ip	3 x 1, 2 x > 14	5 x 1	NS
rPspA + 白矾	iv	3 x 1, 5, > 14	5 x 1	NS
在 PBS 中的 16	iv	5 x 1	5 x 1	NS
在 PBS 中的 26	ip	5 x 1	5 x 1	NS
在 PBS 中的 28	ip	4 x 1, 1 x 3	5 x 1	NS
^{b)} 通过时序检验显示与用 PBS 免疫的小鼠分布比较的存活分布的 P-值。NS = 无显著性(P > 0.05)。				

[0329] 用与SVLPs缀合的PR肽抗原免疫的小鼠部分被保护,且平均存活时间比PBS免疫的小鼠和rPspA免疫的小鼠延长。通过时序检验将对于用SVLPs或rPspA免疫的小鼠得到的存活分布与用单独的PBS(阴性对照)免疫的小鼠的存活分布比较。用单独的PR缀合物或其它抗原的组合物免疫的小鼠结果显著不同于PBS免疫的小鼠的那些结果。P-值范围在0.0027-0.0143。尽管一些小鼠得到保护,但是用rPspA免疫的小鼠的结果与用PBS免疫的小鼠相比无显著性差异(P=0.1336)。该差异在较大的组中更为显著。StkP和PspC-衍生的缀合物的结果与PBS没有显著不同,表明这些抗原在该模型中无保护作用。

[0330] 为了进行被动免疫/攻击实验,以便测定抗体是否介导保护作用,在小鼠中产生单克隆抗体。在一个实验中,给BALB/c小鼠免疫3次缀合物17。从1只小鼠的脾细胞中生成产生抗原特异性单克隆IgG抗体(mAbs)的7个B细胞杂交瘤品系,并且通过FACS分析测试其与不同肺炎球菌的交叉反应性。1个mAb(5H8)结合广泛的菌株(临床隔离群),其代表不同PspA分化体和荚膜血清型。在ELISA中,其它的mAbs结合PR抗原,但不结合完整的细菌。表位作图显示mAb 5H8识别在出现在广泛种类的不同PspA序列中的PR肽的C-末端部分上的表位,而另一种6mAbs识别另外的表位,它们通常较少在不同PspA序列中发现。为了进行攻击,将0.1—0.5mg纯化的5H8或另外的mAbs通过iv注射施用于5NMRI小鼠组。用StkP-衍生的mAb(1A7)被动免疫的动物和首次用于实验的动物用作对照组。在足够的平衡时间后,用传导的肺炎球菌iv攻击小鼠,并且如上所述监测健康状态和达到濒临死亡的时间。使用菌株SP1577得到的结果如下表8中所示。

[0331] 表8:NMRI小鼠对使用菌株SP1577致死性攻击的被动保护

[0332]

剂量 (mg/ml)	mAb	达到濒临死亡的天数		存活的 P-值 ^{a)}
		测试	对照	
0.5	5H8	1.5, 2, 3, 2 x >14	5 x 1	0.0027
0.1	5H8	2 x 1, 1 x 1.5, > 14	5 x 1	0.0495
0.5	3H5	5 x 1	5 x 1	NS
0.5	1H9	5 x 1	5 x 1	NS
0.5	1A7	5 x 1	5 x 1	NS
^{a)} 通过时序检验显示存活分布与首次用于实验的小鼠的分布对比的 P-值。NS = 无显著性(P > 0.05)。				

[0333] 在被动免疫后仅mAb 5H8与首次用于实验的小鼠相比得到显著性差异结果。保护作用是剂量依赖性的。MAbs 3H5和1H9在这种被动保护模型中未显示显著作用。测序揭示出菌株SP1577的PspA仅包含5H8表位,但不含另外2个PR-衍生的抗体的表位。在该模型中对于StkP-衍生的mAb1A7未观察到保护作用。

[0334] 结果显示,当单独施用或与另外的抗原组合施用,不施用佐剂时,用形成SVLP的携带富含脯氨酸的肽抗原的脂肽免疫在小鼠中引起高度肺炎链球菌交叉反应性抗体。

[0335] 实施例5:兔免疫研究

[0336] 为了在非啮齿动物中表征抗体应答,给新西兰白色兔在第0、28和56天时sc免疫3次在0.4ml PBS中不同浓度的缀合物17、18或19,不使用或使用佐剂(R848)(表9)。在第0、14、38和66天时采血样用于测定血清转换。

[0337] 表9:用于兔免疫的制剂

[0338]

组	制剂	佐剂	浓度(mg/ml) ^{a)}
1	在 PBS 中的 17	无	0.35
2	在 PBS 中的 22	无	0.35
3	在 PBS 中的 21	无	0.1
4	在 PBS 中的 21	无	0.025
5	在 PBS 中的 21	R848	0.025
^{a)} 显示脂肽浓度。			

[0339] 如上述对小鼠所述通过Western Blot和FACS、使用兔-IgG-特异性二抗和不同肺炎球菌隔离群分析免疫前和第3次免疫后的血清。基本上如上所述,还通过ELISA、使用用于IgG检测的单克隆抗-兔IgG(γ -链特异性)碱性磷酸酶抗体与4-硝基苯基-磷酸酯分析IgG应答的发生。结果如表10中所示。所有免疫的兔均出现结合内源性表达的PspA和在完整肺炎球菌上表达的PspA的IgG来应答免疫。免疫前血清显示在这些测定中无显著反应性。在来自免疫的兔的免疫血清中,甚至在不使用佐剂时施用低剂量的缀合物后,检测到高滴度的PR肽-特异性IgG抗体。

[0340] 表10: NZW兔中IgG应答的发生(N=3)

[0341]

组	ELISA (GMT $\pm$ SEM) ^{a)}			Western Blot (阳性/阴性) ^{b)}	FACS (阳性/阴性) ^{b)}
	1 st imm.	2 nd imm.	3 rd imm.		
1	4.01 $\pm$ 0.22	4.92 $\pm$ 0.15	4.66 $\pm$ 0.16	3/0	3/0
2	2.96 $\pm$ 0.05	4.13 $\pm$ 0.19	4.15 $\pm$ 0.08	3/0	3/0
3	< 2.3	4.47 $\pm$ 0.05	4.67 $\pm$ 0.16	3/0	3/0
4	< 2.3	2.84 $\pm$ 0.25	3.79 $\pm$ 0.34	3/0	3/0
5	< 2.3	3.70 $\pm$ 0.38	4.56 $\pm$ 0.08	3/0	3/0
^{a)} 显示 1(1 st imm.)、2(2 nd imm.)或 3(3 rd imm.)免疫后的 log10 几何平均滴度(GMT) $\pm$ 一个平均值的标准偏差(SEM)。					
^{b)} 显示了菌株 SP1577 的结果。					

[0342] 结果显示,同样在当不使用佐剂施用时,用形成SVLP的携带富含脯氨酸的肽抗原的脂肽免疫在非啮齿动物中引起广泛的交叉反应性抗体。

[0343] 实施例6: BALB/c小鼠中抗原特异性抗体应答的比较

[0344] 将缀合物15SVLPs引起的抗原-特异性抗体应答与重组PspA蛋白引起的抗原-特异性抗体应答对比。给6-8周龄雌性BALB/c小鼠(18只/组)在第0和第21天时间间隔3周经皮下用在PBS中的0.1ml缀合物15或如上述实施例5中所述制备的在盐水中的rPspA+白矾免疫2次。在第二次免疫后10天采血。

[0345] 为了测定抗体应答的抗原特异性,如实施例5中所述进行ELISA,其中使用PR肽SEQ ID NO: 27用作用于测量PR-特异性抗体的包被抗原,并且将rPspA用作用于测量总抗-PspA抗体(即针对N-末端表位、NPB和PR的抗体)的包被抗原。结果如图1中所示。在ELISA中,来自

非免疫接的小鼠的血清未显示与任一抗原的交叉反应性。

[0346] 正如预期的, rPspA为高度免疫原性的(抗-PspA IgG GMT $\pm$ SEM=81'969 $\pm$ 28'068),但不能引起显著水平的抗-PR抗体(抗-PspA IgG GMT $\pm$ SEM=213 $\pm$ 218)。这不能归因于针对结合PR肽的rPspA的抗体增加失败,因为在ELISA中,针对缀合物15SVLPs增加的抗体识别PR肽(抗-PspA IgG GMT $\pm$ SEM=27'583 $\pm$ 6'204)和rPspA抗原(20'919 $\pm$ 3'444)。因此,可能的情况是,大部分rPspA-引起的抗体结合N-末端 α 螺旋部分中的表位。

[0347] 为了测定缺乏N-末端 α 螺旋的PspA是否可以引起更多的PR-特异性抗体,给小鼠免疫截短的重组PspA-Trx融合蛋白(rPspA- δ -N-末端;包含PR和NPB)。令人惊奇地,截短的蛋白质也不能引起显著水平的抗-PR抗体:对于该蛋白质,GMT $\pm$ SEM为128'496 $\pm$ 28'481,而对于PR抗原为213 $\pm$ 1'094。这显著低于缀合物15SVLP-免疫的对照组动物(对于该蛋白质,GMT $\pm$ SEM为32'776 $\pm$ 6974,而对于PR肽为47'679 $\pm$ 23'383)。这些结果共同表明SVLPs比重组PspA引起明显更高水平的PR-特异性抗体。

[0348] 实施例7:对增加的攻击剂量的保护

[0349] 为了测定免疫的BALB/c小鼠对于增加的攻击剂量的保护作用,给小鼠免疫缀合物15或如上述实施例6中所述的rPspA,通过静脉内以递增剂量血清型1细菌(范围从 10^2 — 10^6 CFU)攻击,并且监测存活。如上述Aaberge I.S.等人, Microbial Pathogenesis, 1995, 18, 141-152中所述制备标准化肺炎球菌血清型1细菌接种物。通过给BALB/c小鼠静脉内注射递增剂量的细菌并且监测存活验证未免疫小鼠中的LD₅₀。

[0350] 免疫小鼠的保护作用依赖于细菌攻击剂量和免疫原类型。在低攻击剂量下,保护作用比得上用rPspA或脂肽结构单元15SVLP免疫的动物(参见图2)。在较高攻击剂量(100-10'000x LD₅₀)下,用缀合物15SVLPs免疫的小鼠的保护作用优于用rPspA免疫的那些小鼠的保护作用。这些结果共同表明通过SVLPs引起的抗-PR抗体比针对rPspA提起的抗体在更宽的细菌攻击剂量范围内有保护作用。

序列表

<110> 维罗米诺克斯股份公司 (Virometix AG)
瑞士热带疾病与公共卫生研究所 (Swiss Tropical and Public Health Institute)
巴塞尔大学 (Universitaet Basel)
苏黎士大学 (Universitaet Zuerich)

<120> 针对肺炎链球菌进行保护的富含脯氨酸的肽类

<130> F3101FC00

<150> EP13195402.6

<151> 2013-12-03

<160> 133

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

[0001]

Val Ser Ile Asn Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Asn Pro Lys
1 5 10 15

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Phe Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu Thr
20

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser
1 5 10 15

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala
1 5 10 15

Gln Val Ile Asp
20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0002]

<223> 合成构建体
<400> 7
Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
1 5 10 15
Ser Leu Met Val
20
<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 8
Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu
1 5 10 15
Val Gly Glu Leu
20
<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 9
Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn
1 5 10 15
Leu Phe Gln Val
20
<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 10
Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro
1 5 10 15
Leu Pro Ile Ala
20
<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 11
Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser
1 5 10 15
Lys Thr His Ile
20
<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 12
Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly
1 5 10 15
Pro Ala Leu Asn
20
<210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 13
Ala Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Cys Thr Leu Gly Ala
1 5 10 15
Thr Thr Gly Tyr Leu Lys Gly Asn Ser
20 25
<210> 14
<211> 14
<212> PRT

[0003]

<210> 14
<220>
<223> 合成构建体
<400> 14
Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ala Asp Ala Val Lys Ala Lys Gly
1 5 10
<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 15
Gly Leu Ala Ala Gly Leu Val Gly Met Ala Ala Asp Ala Met Val Glu
1 5 10 15
Asp Val Asn
<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 16
Ser Thr Glu Thr Gly Asn Gln His His Tyr Gln Thr Arg Val Val Ser
1 5 10 15
Asn Ala Asn Lys
20
<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 17
Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu
1 5 10 15
Met Thr Leu Ala
20
<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 18
Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp
1 5 10 15
<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 19
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10
<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 20
Tyr Ser Gly Pro Leu Lys Ala Gln Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val
1 5 10 15
<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成构建体
<400> 21
Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile Thr His Val Asp
1 5 10 15

[0004]

Thr Glu Ser Tyr
20

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 22

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
1 5 10 15

<210> 23
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 23

Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn
1 5 10 15

Val Val Asn Ser
20

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 24

Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys Ile Arg
1 5 10 15

Ile

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> X
<222> (1)...(1)
<223> D-丙氨酸

<220>
<221> X
<222> (13)...(13)
<223> D-丙氨酸

<400> 25

Xaa Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Xaa
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> X
<222> (1)...(1)
<223> D-丙氨酸

<220>
<221> X
<222> (3)...(3)
<223> 丙氨酸环己酯

<220>
<221> X
<222> (13)...(13)
<223> D-丙氨酸

<400> 26

Xaa Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Xaa
1 5 10

<210> 27
<211> 29
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 27

Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Ala Pro
1 5 10 15

[0005]

Ala. Pro. Gln. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Lys. Thr.
20 25

<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 28

Pro. Lys. Pro. Glu. Gln. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Gln. Pro. Ala.
1 5 10 15

Lys. Pro. Glu. Lys. Pro. Ala.
20

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 29

Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Gln. Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys. Pro. Glu. Gln.
1 5 10 15

Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Gln. Pro. Ala. Lys. Pro. Glu. Lys. Pro.
20 25 30

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 30

Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Gln. Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys. Pro. Ala.
1 5 10 15

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 31

Pro. Ala. Pro. Gln. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Lys. Thr.
1 5 10

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 32

Gln. Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Gln. Pro. Ala. Pro.
1 5 10 15

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 33

Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Gln. Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys. Pro.
1 5 10 15

<210> 34
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 34

Pro. Ala. Pro. Glu. Ala. Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro.
1 5 10 15

Gln. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Lys. Pro. Glu. Lys. Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys.
20 25 30

Pro. Glu. Lys. Thr.
35

<210> 35
<211> 25
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 35

Pro. Ala. Glu. Gln. Pro. Lys. Pro. Ala. Pro. Ala. Pro. Gln. Pro. Ala. Pro. Ala.
1 5 10 15

Pro. Lys. Pro. Glu. Lys. Pro. Ala. Glu. Gln.
20 25

<210> 36
<211> 27
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 36

[0006]

Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu
1 5 10 15
Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Glu Lys Thr
20 25
<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 37
Lys Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Lys Thr
20
<210> 38
<211> 40
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 38
Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30
Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala
35 40
<210> 39
<211> 43
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 39
Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro
20 25 30
Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Thr
35 40
<210> 40
<211> 37
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 40
Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala
1 5 10 15
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr
20 25 30
Pro Ala Pro Lys Thr
35
<210> 41
<211> 21
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 41
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr
1 5 10 15
Pro Ala Pro Lys Thr
20
<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 42
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Gln
<210> 43
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 43
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala
1 5 10 15
Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
20 25 30
Thr Pro Lys Thr
35

[0007]

<210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 44
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro
1 5 10 15
Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Thr Pro Lys Thr
20 25
<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 45
Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Ala
1 5 10 15
Pro Gln Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala
20 25 30
<210> 46
<211> 41
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 46
Pro Glu Thr Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Thr Pro Ala Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala
20 25 30
Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Ser Ala
35 40
<210> 47
<211> 20
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 47
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
1 5 10 15
Glu Lys Ser Ala
20
<210> 48
<211> 16
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 48
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Ser Ala
1 5 10 15
<210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 49
Lys Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Val Pro
1 5 10 15
Ala Pro Lys Thr
20
<210> 50
<211> 28
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 50
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Ser Ala
20 25
<210> 51
<211> 26
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 51
Pro Ala Pro Glu Gln Pro Thr Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
1 5 10 15
Glu Glu Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys
20 25 30
Ala Glu Lys Thr
35
<210> 52

[0008]

<211> 17
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 52
Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys
1 5 10 15
Thr
<210> 53
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 53
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Glu Asn Pro
20 25 30
Ala Pro Ala Pro
35
<210> 54
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 54
Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Thr Pro Ala Pro Ala Pro Glu Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys
20 25 30
Pro Glu Lys Ser
35
<210> 55
<211> 42
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 55
Ala Pro Ala Pro Glu Thr Pro Ala Pro Glu Ala Pro Ala Glu Gln Pro
1 5 10 15
Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys
20 25 30
Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Glu Lys Thr
35 40
<210> 56
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 56
Pro Ala Pro Glu Gln Pro Thr Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
1 5 10 15
Glu Glu Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys
20 25 30
Ala Glu Lys Thr
35
<210> 57
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 57
Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Thr Pro Ala Pro Ala Pro Glu Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys
20 25 30
Pro Glu Lys Ser
35
<210> 58
<211> 42
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 58
Ala Pro Ala Pro Glu Thr Pro Ala Pro Glu Ala Pro Ala Glu Gln Pro
1 5 10 15
Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys
20 25 30
Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Glu Lys Thr
35 40

[0009]

<210> 59
<211> 36
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 59
Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Thr Pro Ala Pro Ala Pro Glu Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys
20 25 30
Pro Glu Lys Ser
35
<210> 60
<211> 42
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 60
Ala Pro Ala Pro Glu Thr Pro Ala Pro Glu Ala Pro Ala Glu Gln Pro
1 5 10 15
Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys
20 25 30
Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Glu Lys Thr
35 40
<210> 61
<211> 43
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 61
Ala Pro Ala Pro Glu Thr Pro Ala Pro Glu Ala Pro Ala Glu Gln Pro
1 5 10 15
Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys
20 25 30
Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala
35 40
<210> 62
<211> 33
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 62
Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala
1 5 10 15
Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu His
20 25 30
Pro
<210> 63
<211> 35
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 63
Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30
Lys Pro Glu
35
<210> 64
<211> 33
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 64
Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln
1 5 10 15
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro
20 25 30
Pro
<210> 65
<211> 35
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 65
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu
20 25 30

[0010]

Gln Pro Ala
35

<210> 66
<211> 33
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 66

Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro
20 25 30

Thr

<210> 67
<211> 35
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 67

Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro
20 25 30

Lys Pro Glu
35

<210> 68
<211> 31
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 68

Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Gln
20 25 30

<210> 69
<211> 35
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 69

Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Gln Gln Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30

Lys Pro Ala
35

<210> 70
<211> 34
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 70

Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr
1 5 10 15
Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln
20 25 30

Pro Thr

<210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 71

Pro Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15
Lys Pro Ala Pro Ala
20

<210> 72
<211> 23
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 72

Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Ala
1 5 10 15
Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala
20

<210> 73

[0011]

<211> 16
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 73
Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Glu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
1 5 10 15
<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 74
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro
1 5 10 15
Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
20
<210> 75
<211> 18
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 75
Pro Ala Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys
1 5 10 15
Pro Ala
<210> 76
<211> 27
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 76
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Lys Pro
1 5 10 15
Ala Glu Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
20 25
<210> 77
<211> 32
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 77
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Asn Pro Glu Gln Pro Ala
1 5 10 15
Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
20 25 30
<210> 78
<211> 29
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 78
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln
1 5 10 15
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala
20 25
<210> 79
<211> 32
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 79
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala
1 5 10 15
Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
20 25 30
<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 80
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala
1 5 10 15
Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala
20 25 30
<210> 81
<211> 38
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 81
Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro

[0012]

1 5 10 15
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30
Lys Pro Glu Gln Pro Ala
35
<210> 82
<211> 43
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 82
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30
Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
35 40
<210> 83
<211> 43
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 83
Pro Ala Arg Ala Leu Gln Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
1 5 10 15
Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ala Pro
20 25 30
Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
35 40
<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 84
Ser Arg Leu Glu Gln Pro Ser Leu Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro
1 5 10 15
Gly Pro Gln Pro Ala Pro Asn
20
<210> 85
<211> 24
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 85
Arg Pro Glu Glu Pro Ser Pro Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser
1 5 10 15
Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro
20
<210> 86
<211> 26
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 86
His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro Glu Gln Pro Ser Pro Gln Ser Thr
1 5 10 15
Pro Glu Pro Ser Pro Ser Pro Gln Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala
20 25 30
Pro Ser Asn Pro
35
<210> 87
<211> 32
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 87
Pro Lys Ser Asn Gln Ile Gly Gln Pro Thr Leu Pro Asn Asn Ser Leu
1 5 10 15
Ala Thr Pro Ser Pro Ser Leu Pro Ile Asn Pro Gly Thr Ser His Glu
20 25 30
<210> 88
<211> 34
<212> PRT
<213> 酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)
<400> 88
Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Glu Thr Pro Glu Gln Pro Gly Glu Lys
1 5 10 15
Ala Pro Glu Lys Ser Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Glu Thr Pro Glu
20 25 30
Gln Pro

[0013]

<210> 89
<211> 20
<212> PRT
<213> 酿脓链球菌
<400> 89
Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Glu Thr Pro Glu Gln Pro Gly Glu Lys
1 5 10 15
Ala Pro Glu Lys
20
<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 酿脓链球菌
<400> 90
Pro Glu Lys Ser Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Glu Thr Pro Glu Gln
1 5 10 15
Pro
<210> 91
<211> 16
<212> PRT
<213> 酿脓链球菌
<400> 91
Lys Ala Pro Glu Lys Ser Pro Glu Val Thr Pro Thr Pro Glu Met Pro
1 5 10 15
<210> 92
<211> 25
<212> PRT
<213> 酿脓链球菌
<400> 92
Pro Gly Lys Pro Ala Pro Lys Thr Pro Glu Val Pro Gln Lys Pro Asp
1 5 10 15
Thr Ala Pro His Thr Pro Lys Thr Pro
20 25
<210> 93
<211> 18
<212> PRT
<213> 马链球菌(Streptococcus equi)
<400> 93
Lys Pro Ser Ala Pro Lys Ala Pro Glu Lys Ala Pro Ala Pro Lys Ala
1 5 10 15
Pro Lys
<210> 94
<211> 24
<212> PRT
<213> 马链球菌
<400> 94
Pro Ala Pro Lys Ala Pro Lys Ala Ser Glu Gln Ser Ser Asn Pro Lys
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Lys Ser Ala Pro
20
<210> 95
<211> 22
<212> PRT
<213> 酿脓链球菌
<400> 95
Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Leu Gln Gly Pro Gln Gly Pro Arg
1 5 10 15
Gly Asp Lys Gly Glu Thr
20
<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> 猪链球菌(Streptococcus suis)
<400> 96
Pro Gln Ala Pro Ser Thr Pro Glu Lys Gln Pro Glu Val Pro Glu Ser
1 5 10 15
Pro
<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 猪链球菌
<400> 97

[0014]

Pro Glu Thr Pro Asp Ala Pro Ser Thr Pro Lys Asp Glu Pro Gln Ala
1 5 10 15
Pro

<210> 98
<211> 28
<212> PRT
<213> 变异链球菌(Streptococcus mutans)

<400> 98
Pro Ala Pro Val Glu Pro Ser Tyr Glu Ala Glu Pro Thr Pro Pro Thr
1 5 10 15
Arg Thr Pro Asp Gln Ala Glu Pro Asn Lys Pro Thr
20 25

<210> 99
<211> 23
<212> PRT
<213> 变异链球菌

<400> 99
Pro Thr Tyr Glu Thr Glu Lys Pro Leu Glu Pro Ala Pro Val Glu Pro
1 5 10 15
Ser Tyr Glu Ala Glu Pro Thr
20

<210> 100
<211> 30
<212> PRT
<213> 变异链球菌

<400> 100
Lys Pro Thr Ala Pro Thr Lys Pro Thr Tyr Glu Thr Glu Lys Pro Leu
1 5 10 15
Lys Pro Ala Pro Val Ala Pro Asn Tyr Glu Lys Glu Pro Thr
20 25 30

<210> 101
<211> 18
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)

<400> 101
Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gln Ile Glu Pro
1 5 10 15
Ile Pro

<210> 102
<211> 29
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 102
Pro Glu Val Pro Ser Glu Pro Glu Thr Pro Thr Pro Pro Thr Pro Glu
1 5 10 15
Val Pro Ala Glu Pro Gly Lys Pro Val Pro Pro Ala Lys
20 25

<210> 103
<211> 28
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 103
Lys Tyr Thr Pro Lys Lys Pro Asn Lys Pro Ile Tyr Pro Glu Lys Pro
1 5 10 15
Lys Asp Lys Thr Pro Pro Thr Lys Pro Asp His Ser
20 25

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> 大消化链球菌(Peptostreptococcus magnus)

<400> 104
Pro Glu Lys Pro Val Glu Pro Ser Glu Pro Ser Thr
1 5 10

<210> 105
<211> 44
<212> PRT
<213> 链球菌(Streptococcus dysgalactiae)

<400> 105
Lys Pro Val Glu Pro Ser Glu Pro Ser Thr Pro Asp Val Pro Ser Asn
1 5 10 15
Pro Ser Asn Pro Ser Thr Pro Asp Val Pro Ser Thr Pro Asp Val Pro
20 25 30
Ser Asn Pro Ser Thr Pro Glu Val Pro Ser Asn Pro

[0015]

35 40

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> 链球菌
<400> 106
Pro Glu Val Glu Pro Asn Val Pro Asp Thr Pro Glu Glu Lys Pro Leu
1 5 10 15
Thr

<210> 107
<211> 31
<212> PRT
<213> 链球菌
<400> 107
Lys Pro Leu Thr Pro Leu Ala Pro Ser Glu Pro Ser Gln Pro Ser Ile
1 5 10 15
Pro Glu Thr Pro Leu Ile Pro Ser Glu Pro Ser Val Pro Glu Thr
20 25 30

<210> 108
<211> 18
<212> PRT
<213> 无乳链球菌 (Streptococcus agalactiae)
<400> 108
Pro Glu Val Lys Pro Asp Val Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Ala Lys
1 5 10 15
Pro Ala

<210> 109
<211> 11
<212> PRT
<213> 无乳链球菌
<400> 109
Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Ala Lys Pro Ala
1 5 10

<210> 110
<211> 20
<212> PRT
<213> 无乳链球菌
<400> 110
Pro Asp Val Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Ala Lys Pro Asp Val Lys
1 5 10 15
Pro Glu Ala Lys
20

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> 无乳链球菌
<400> 111
Pro Glu Thr Pro Asp Thr Pro Lys Ile Pro Glu Asp Pro Gln
1 5 10

<210> 112
<211> 20
<212> PRT
<213> 无乳链球菌
<400> 112
Pro Asp Thr Pro Gln Ala Pro Asp Thr Pro His Val Pro Glu Ser Pro
1 5 10 15
Lys Thr Pro Glu
20

<210> 113
<211> 29
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 113
His Glu Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn
1 5 10 15
Arg Leu Pro Gln Gln Gln Pro Pro Lys Ala Glu Lys Pro
20 25

<210> 114
<211> 31
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 114
Ala Glu Asp Glu Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr

[0016]

1 5 10 15
Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val
20 25 30
<210> 115
<211> 79
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 115
Ser Val Ala Met Pro Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Leu Glu Phe Thr Lys
1 5 10 15
Asn Asn Leu Ile Glu Ile Val Gly Ile Lys Glu Ala Asn Ile Glu Val
20 25 30
Val Glu Val Thr Thr Ala Pro Ala Gly Ser Ala Glu Gly Met Val Val
35 40 45
Glu Gln Ser Pro Arg Ala Gly Glu Lys Val Asp Leu Asn Lys Thr Arg
50 55 60
Val Lys Ile Ser Ile Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ala Thr Pro
65 70 75
<210> 116
<211> 60
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 116
Ser Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Asp Arg Pro Met Lys Thr Val
1 5 10 15
Ser Gln Asp Thr Asn Ile Pro Ile Tyr Ala Gln Ile Phe Thr Asp Ser
20 25 30
Ile Ala Glu Gln Gly Lys Glu Gly Asp Ser Tyr Tyr Ser Met Met Lys
35 40 45
Tyr Asn Leu Asp Lys Ile Ala Glu Gly Leu Ala Lys
50 55 60
<210> 117
<211> 112
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 117
Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr
1 5 10 15
Tyr Ile Thr Tyr Asn Glu Leu Ser Tyr Asp His Gln Gly Lys Glu Val
20 25 30
Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn Gly Gln Asp Leu Thr Ala His
35 40 45
Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly Asn Val Arg Asn Leu Ser Val
50 55 60
Lys Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Gly Trp Trp Arg Thr Val
65 70 75 80
Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile
85 90 95
Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
100 105 110
<210> 118
<211> 91
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 118
Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn
1 5 10 15
Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro
20 25 30
Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu Pro Thr His Pro Glu
35 40 45
Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn Pro Ser Ala Asp Asn
50 55 60
Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val
85 90
<210> 119
<211> 69
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 119
Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu
20 25 30
Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr
35 40 45
Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln
50 55 60
Pro Ala Pro Ile Cln
65

<210> 120
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 120
gcaagcttat gatatagaaa ttigttaac 28

<210> 121
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 121
ccacatacgg ttttttgttt tccagcc 27

<210> 122
<211> 394
<212> PRN
<213> 肺炎链球菌

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(18)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0017]

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(67)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 122

Xaa Xaa Leu Gly Ala Gly Phe Val Xaa Xaa Xaa Pro Thr Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Glu Ala Pro Val Ala Ser Cln Xaa Lys Ala Glu Lys Asp Xaa
20 25 30

Asp Ala Xaa Lys Arg Asp Ala Glu Asn Xaa Lys Lys Ala Leu Glu Glu
35 40 45

Ala Lys Xaa Xaa Cln Lys Lys Tyr Glu Asp Asp Cln Lys Lys Thr Glu
50 55 60

Glu Lys Xaa Lys Lys Glu Lys Glu Ala Ser Lys Glu Glu Cln Ala Ala
65 70 75 80

Asn Leu Lys Tyr Cln Cln Glu Leu Val Lys Tyr Ala Ser Glu Lys Asp
85 90 95

Ser Val Lys Lys Ala Lys Ile Leu Lys Glu Val Glu Glu Ala Glu Lys
100 105 110

Glu His Lys Lys Lys Arg Ala Glu Phe Glu Lys Val Arg Ser Glu Val
115 120 125

Ile Pro Ser Ala Glu Glu Leu Lys Lys Thr Arg Gln Lys Ala Glu Glu
130 135 140
Ala Lys Ala Lys Glu Ala Glu Leu Ile Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu
145 150 155 160
Lys Lys Val Thr Glu Ala Lys Gln Lys Leu Asp Ala Glu Arg Ala Lys
165 170 175
Glu Val Ala Leu Gln Ala Lys Ile Ala Glu Leu Glu Asn Glu Val Tyr
180 185 190
Arg Leu Glu Thr Glu Leu Lys Gly Ile Asp Glu Ser Asp Ser Glu Asp
195 200 205
Tyr Val Lys Glu Gly Leu Arg Ala Pro Leu Gln Ser Glu Leu Asp Ala
210 215 220
Lys Arg Thr Lys Leu Ser Thr Leu Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile Asp
225 230 235 240
Glu Leu Asp Ala Glu Ile Ala Lys Leu Glu Lys Asn Val Glu Tyr Phe
245 250 255
Lys Lys Thr Asp Ala Glu Gln Thr Glu Gln Tyr Leu Ala Ala Ala Glu
260 265 270
Lys Asp Leu Ala Asp Lys Lys Ala Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp
275 280 285
Leu Lys Lys Ala Val Asn Glu Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Thr Pro
290 295 300
Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln Pro Lys Pro Ala
305 310 315 320
Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Thr Asp Asp
325 330 335
Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn
340 345 350
Arg Leu Pro Gln Gln Gln Pro Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala
355 360 365
Pro Lys Pro Glu Gln Pro Val Pro Ala Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln
370 375 380
Glu Asn Gly Met Trp Cys Arg
385 390
<210> 123
<211> 723
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌
<400> 123
Met Asn Lys Lys Lys Met Ile Leu Thr Ser Leu Ala Ser Val Ala Ile
1 5 10 15
Leu Gly Ala Gly Phe Val Thr Ser Gln Pro Thr Val Val Arg Ala Glu
20 25 30
Glu Ser Pro Val Ala Ser Gln Ser Lys Ala Glu Lys Asp Tyr Asp Ala
35 40 45
Ala Val Lys Lys Ser Glu Ala Ala Lys Lys His Tyr Glu Glu Ala Lys
50 55 60
Lys Lys Ala Glu Asp Ala Gln Lys Lys Tyr Asp Glu Asp Gln Lys Lys
65 70 75 80
Thr Glu Ala Lys Ala Glu Lys Glu Arg Lys Ala Ser Glu Lys Ile Ala
85 90 95
Glu Ala Thr Lys Glu Val Gln Gln Ala Tyr Leu Ala Tyr Leu Gln Ala
100 105 110
Ser Asn Glu Ser Gln Arg Lys Glu Ala Asp Lys Lys Ile Lys Glu Ala
115 120 125
Thr Gln Arg Lys Asp Glu Ala Glu Ala Ala Phe Ala Thr Ile Arg Thr
130 135 140
Thr Ile Val Val Pro Glu Pro Ser Glu Leu Ala Glu Thr Lys Lys Lys
145 150 155 160
Ala Glu Glu Ala Lys Ala Glu Glu Lys Val Ala Lys Arg Lys Tyr Asp
165 170 175
Tyr Ala Thr Leu Lys Leu Ala Leu Ala Lys Lys Glu Val Glu Ala Lys
180 185 190
Glu Leu Glu Ile Glu Lys Leu Gln Tyr Glu Ile Ser Thr Leu Glu Gln
195 200 205
Glu Val Ala Thr Ala Gln His Gln Val Asp Asn Leu Lys Lys Leu Leu
210 215 220
Ala Gly Ala Asp Pro Asp Asp Gly Thr Glu Val Ile Glu Ala Lys Leu
225 230 235 240
Lys Lys Gly Glu Ala Glu Leu Asn Ala Lys Gln Ala Glu Leu Ala Lys
245 250 255
Lys Gln Thr Glu Leu Glu Lys Leu Leu Asp Ser Leu Asp Pro Gln Gly

[0018]

[0019]

260 265 270
Lys Thr Gln Asp Glu Leu Asp Lys Glu Ala Glu Glu Ala Glu Leu Asp
275 280 285
Lys Lys Ala Asp Glu Leu Gln Asn Lys Val Ala Asp Leu Glu Lys Glu
290 295 300
Ile Ser Asn Leu Glu Ile Leu Leu Gly Gly Ala Asp Pro Glu Asp Asp
305 310 315 320
Thr Ala Ala Leu Gln Asn Lys Leu Ala Ala Lys Lys Ala Glu Leu Ala
325 330 335
Lys Lys Gln Thr Gln Leu Glu Lys Leu Leu Asp Ser Leu Asp Pro Glu
340 345 350
Gly Lys Thr Glu Asp Glu Leu Asp Lys Glu Ala Glu Glu Ala Glu Leu
355 360 365
Asp Lys Lys Ala Asp Glu Leu Gln Asn Lys Val Ala Asp Leu Glu Lys
370 375 380
Glu Ile Ser Asn Leu Glu Ile Leu Leu Gly Gly Ala Asp Ser Glu Asp
385 390 395 400
Asp Thr Ala Ala Leu Gln Asn Lys Leu Ala Thr Lys Lys Ala Glu Leu
405 410 415
Glu Lys Thr Gln Lys Glu Leu Asp Ala Leu Asn Glu Leu Gly Pro
420 425 430
Asp Gly Asp Glu Glu Glu Thr Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Gln
435 440 445
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro
450 455 460
Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Pro Ala Pro
465 470 475 480
Lys Pro Glu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu Pro Thr
485 490 495
Gln Pro Glu Lys Pro Ala Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln Glu Asn
500 505 510
Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn Thr Asp Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp
515 520 525
Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met
530 535 540
Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala
545 550 555 560
Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp
565 570 575
Tyr Tyr Val Asn Ser Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr
580 585 590
Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly
595 600 605
Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp
610 615 620
Met Ala Thr Gly Trp Ala Lys Val Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn
625 630 635 640
Ala Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Ala Lys Val Asn Gly Ser Trp
645 650 655
Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp
660 665 670
Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser
675 680 685
Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Leu Gly
690 695 700
Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val Asp Gly Tyr Lys Val Asn Ala Asn
705 710 715 720
Gly Glu Trp

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 124
Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln
1 5 10

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 125

[0020]

Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly
1 5

<210> 126
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 126
Lys Tyr Val Lys Glu Asn Thr Leu Lys Leu Ala Arg Lys
1 5 10

<210> 127
<211> 51
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 127
Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15
Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu
20 25 30
Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val
35 40 45
Asn Ser Lys
50

<210> 128
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 128
Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15
Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu
20 25 30
Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val
35 40 45
Asn Ser Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln
50 55 60
Pro Lys Pro
65

<210> 129
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 129
Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15
Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu
20 25 30
Lys Lys Ile Ala Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Arg
35 40 45

<210> 130
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 130
Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15
Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gly Ile Glu
20 25 30
Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val
35 40 45
Asn Ser Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln
50 55 60
Pro Lys Pro
65

<210> 131
<211> 79

[0021]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 131

Ser Val Ala Met Pro Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Leu Glu Gln Thr Lys
1 5 10 15

Asn Asn Leu Ile Gln Thr Val Gly Ile Lys Glu Ala Asn Ile Glu Val
20 25 30

Val Glu Val Thr Thr Ala Pro Ala Gly Ser Ala Glu Gly Met Val Val
35 40 45

Glu Gln Ser Pro Arg Ala Gly Glu Lys Val Asp Leu Asn Lys Thr Arg
50 55 60

Val Lys Ile Ser Ile Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ala Thr Pro
65 70 75

<210> 132
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体

<400> 132

Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Glu Lys Ala Glu Ser Asp Val Glu Val
20 25 30

<210> 133
<211> 268
<212> PRT
<213> 肺炎链球菌

<400> 133

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met
145 150 155 160

Ala Asp Leu Lys Lys Ala Val Asn Glu Pro Glu Lys Pro Ala Glu Glu
165 170 175

Thr Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Ala Glu Gln Pro Lys
180 185 190

Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Thr
195 200 205

Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu
210 215 220

Tyr Asn Arg Leu Pro Gln Gln Gln Pro Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln Pro Val Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gln
245 250 255

Pro Val Pro Ala Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln Glu
260 265

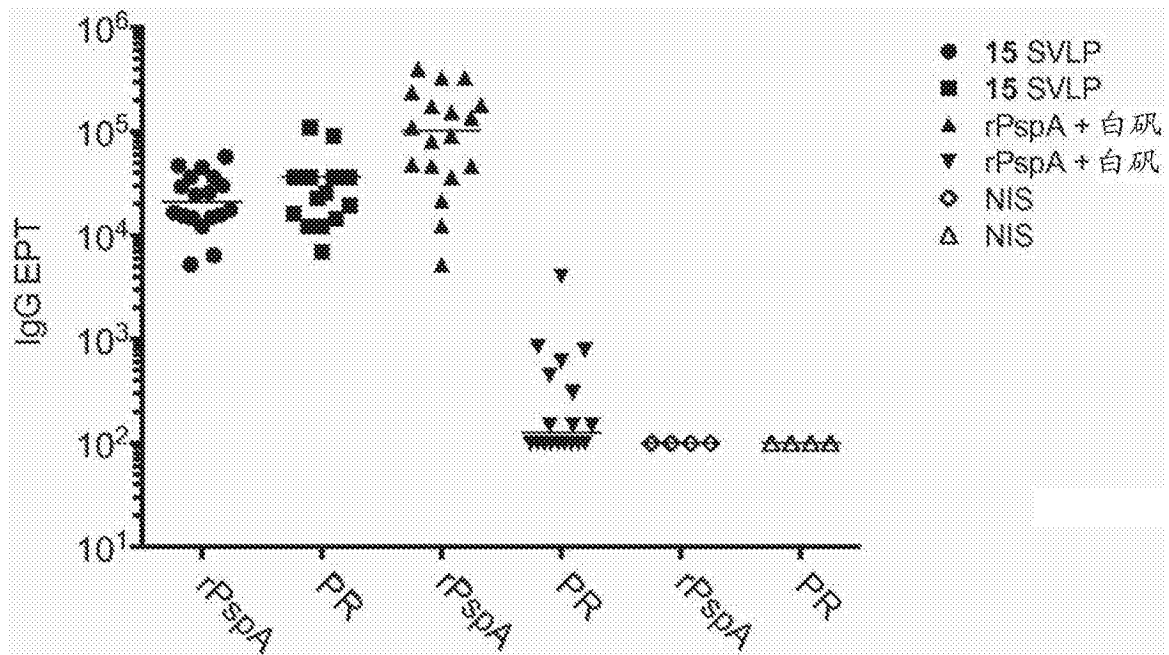


图1

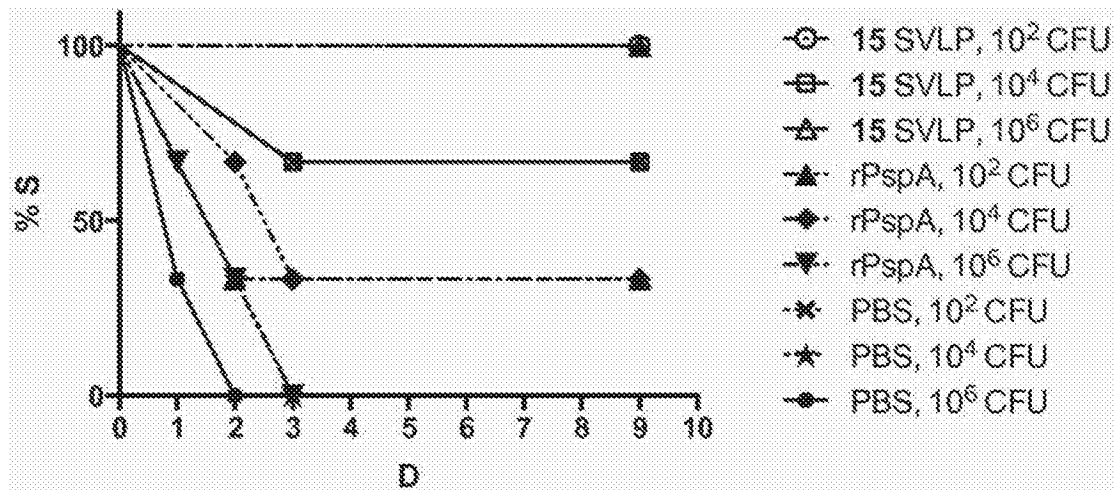


图2