



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101977926 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 08

(21) 申请号 200880126781. 1

(22) 申请日 2008. 12. 18

(30) 优先权数据

61/016, 193 2007. 12. 21 US

61/088, 381 2008. 08. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2008/003725 2008. 12. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/081274 EN 2009. 07. 02

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 G·本斯 I·马格里特伊若斯

E·恰洛特 G·格兰迪

M·斯卡塞利

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀

(51) Int. Cl.

C07K 14/315(2006. 01)

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 39/09(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 93/05155 A1, 1993. 03. 18, 全文.

GB 233977 A1, 1991. 01. 23, 全文.

CN 101018863 A, 2007. 08. 15, 全文.

WO 2005108419 A1, 2005. 11. 17, 全文.

Pinkney M等. The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. 《Infection and Immunity》. 1989, 第 57 卷 (第 8 期), 2553-2558.

审查员 尹军团

权利要求书3页 说明书40页

序列表50页

(54) 发明名称

链球菌溶血素 O 的突变形式

(57) 摘要

无毒但仍保留诱导抗酿脓链球菌感染的能力的 GAS25(链球菌溶血素 O) 可用于疫苗组合物以诱导抗酿脓链球菌感染。

1. 一种纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白,其在 P427 和 W535 位置包含氨基酸取代,其中所述 P427 位置的取代为 P427L、P427G、P427K 和 P427E 中任一种,其中所述 W535 位置的取代为 W535F,其中所述氨基酸的位置按 SEQ ID NO:1 编号,且其中所述突变型 SLO 蛋白的溶血活性相比野生型 SLO 降低至少 50%。

2. 如权利要求 1 所述的纯化的突变型 SLO 蛋白,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:27。

3. 如权利要求 1 所述的纯化的突变型 SLO 蛋白,其特征在于,该蛋白偶联于载体蛋白。

4. 如权利要求 3 所述的纯化的突变型 SLO 蛋白,其特征在于,所述载体蛋白选自:细菌毒素、细菌类毒素、脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白、热激蛋白、百日咳蛋白、流感嗜血杆菌蛋白 D、细胞因子、淋巴因子、激素、生长因子、艰难梭菌毒素 A、艰难梭菌毒素 B 和铁摄取蛋白。

5. 编码权利要求 1 或 2 所述的突变型 SLO 蛋白的核酸分子。

6. 如权利要求 5 所述的核酸分子,其特征在于,该分子包含选自 SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:33 所示编码序列的核苷酸序列。

7. 一种疫苗组合物,其包含:

(a) 选自以下的活性剂:

(i) 权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白;和

(ii) 编码权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白的核酸分子;和

(b) 药学上可接受的运载体。

8. 如权利要求 7 所述的疫苗组合物,其特征在于,该组合物还包含一种或多种选自下组的活性剂:

(a) GAS 抗原;和

(b) 编码 GAS 抗原的核酸分子。

9. 如权利要求 7 所述的疫苗组合物,其特征在于,该组合物还包含儿童疫苗所用的活性剂。

10. 如权利要求 9 所述的疫苗组合物,其特征在于,所述活性剂选自:

(a) 选自以下的病原体的多肽抗原:脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、百日咳博德特菌、粘膜炎莫拉菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、呼吸道合胞病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒和轮状病毒多肽抗原;和

(b) 编码所述多肽抗原的核酸分子。

11. 如权利要求 7 所述的疫苗组合物,其特征在于,该组合物还包含用于老年人或免疫力低下个体疫苗的第二种活性剂。

12. 如权利要求 11 所述的疫苗组合物,其特征在于,所述第二种活性剂选自下组:

(a) 选自以下的病原体的多肽抗原:粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团病杆菌、单核细胞增多症李斯特菌、流感病毒和副流感病毒多肽抗原;和

(b) 编码所述多肽抗原的核酸分子。

13. 有效量的疫苗组合物在制备治疗或预防酿脓链球菌感染的药物中的应用,该疫苗组合物包含:

(a) 选自以下的活性剂：  
(i) 权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白；和  
(ii) 编码权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白的核酸分子；和

(b) 药学上可接受的运载体。

14. 如权利要求 13 所述的应用,其特征在於,所述疫苗组合物还包含一种或多种选自下组的活性剂：

(a) GAS 抗原；和

(b) 编码 GAS 抗原的核酸分子。

15. 一种试剂盒,其包括：

(a) 含有如权利要求 7-12 中任一项所述疫苗组合物的容器；和

(b) 用所述组合物治疗或预防酿脓链球菌感染的说明书。

16. 一种制备预防或治疗酿脓链球菌感染的疫苗的方法,所述方法包括混合：

(a) 选自以下的活性剂：

(i) 权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白；和

(ii) 编码权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白的核酸分子；和

(b) 药学上可接受的运载体。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在於,所述活性剂是纯化的突变型 SLO 蛋白,所述突变型 SLO 蛋白通过以下方法制备,该方法包括：

(a) 培养含编码所述突变型 SLO 蛋白的表达构建物的宿主细胞；和

(b) 回收突变型 SLO 蛋白。

18. 如权利要求 16 所述的方法,还包括将药学上可接受的运载体与一种或多种选自下组的活性剂组合：

(a) GAS 抗原；和

(b) 编码 GAS 抗原的核酸分子。

19. 活性剂在制造治疗或预防酿脓链球菌感染的药物中的应用,所述活性剂选自：

(a) 权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白；和

(b) 编码权利要求 1 或 2 中定义的纯化的突变型链球菌溶血素 O (SLO) 蛋白的核酸分子。

20. 如权利要求 1-4 中任一项所述的纯化的突变型 SLO 蛋白或如权利要求 5-6 中任一项所述的核酸分子在制备作为疫苗的药物中的应用。

21. 如权利要求 1-4 中任一项所述的纯化的突变型 SLO 蛋白、如权利要求 5-6 中任一项所述的核酸分子、或如权利要求 8-12 中任一项所述的疫苗组合物在制备治疗或预防酿脓链球菌感染的药物中的应用。

22. 如权利要求 1-4 中任一项所述的纯化的突变型 SLO 蛋白或如权利要求 8-12 中任一项所述的疫苗组合物,其特征在於,所述突变型 SLO 蛋白还包括以下一种或多种：

(a) C530 取代为甘氨酸；

(b) 缺失 A248；和 / 或

(c)D482 取代为天冬酰胺。

## 链球菌溶血素 O 的突变形式

[0001] 本申请要求 2007 年 12 月 21 日提交的 US61/016193 和 2008 年 8 月 13 日提交的 US61/088381 的优先权,其内容通过引用纳入本文。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及免疫学和疫苗学领域。

[0003] 发明背景

[0004] 链球菌溶血素 O (SLO ;GAS25) 是人病原体酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (GAS) 的一种最重要的致病因子。由于它能激发人的早期且强烈的免疫应答,因此通常用作 GAS 感染的诊断标记物。

[0005] SLO 属于高同源性巯基激活的溶细胞素 (TACY) 家族,该家族通过与细胞膜上的胆固醇相互作用、自发寡聚化以及形成穿孔发挥其溶细胞活性。此外,它们能够结合人 IgG 的 Fc 区从而直接激活经典补体途径,这可导致对宿主细胞的补体介导的直接攻击。TACY 也通过诱导细胞因子和炎性介质从而干扰宿主的防御和免疫细胞功能。

[0006] 一些 TACY 可被动或主动保护试验动物。参见 FEMS Lett. 182,197-205,2000。然而,这些毒素复杂的有害副作用模式将影响它们作为疫苗候选物的用途。也就是说,本领域需要无毒的 SLO 蛋白。

[0007] 附图简述

[0008] 图 1. SLO 的三维计算机模型。脯氨酸表示为空间填充。Pro427 为白色。

[0009] 图 2. 该图显示了用含有野生型 SLO 和 SLO 突变型 P427L 的大肠杆菌提取物进行的溶血试验的结果。

[0010] 图 3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶的显微照片,显示了纯化的 SLO 突变型 P427L。

[0011] 图 4. 该图显示了用纯化的野生型 SLO 和 SLO 突变型 P427L 进行的溶血试验的结果。

[0012] 图 5. 大肠杆菌裂解上清液的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的显微照片。泳道 A,大肠杆菌阴性对照 ;泳道 B,rSLO 野生型,无标签 ;泳道 C,rSLO P427L,无标签 ;和泳道 D,纯化的 rSLO 野生型,无标签 (5mg)。

[0013] 图 6. 该图证明,在相同条件下,SLO 突变型 P427L 的溶血能力比野生型 SLO 低 1000 倍。

[0014] 图 7. 该图证明了胆固醇对野生型 SLO 和 SLO 突变型 P427L 溶血作用的影响。

[0015] 图 8. 细胞提取物中所有无标签蛋白的 SDS-PAGE 分析的显微照片。图 8A, SLO 野生型和 P427L 无标签蛋白的表达 ;图 8B, SLO P427L+W535、P427L+C530G、和 P427L+C530G+W535F 无标签蛋白的表达。

[0016] 图 9. 细胞提取物中所有带 His 标签的蛋白质的 SDS-PAGE 分析的显微照片。

[0017] 图 10. 纯化的带 His 标签的蛋白质的 SDS-PAGE 分析的显微照片。

[0018] 图 11. 纯化的无标签蛋白质的 SDS-PAGE 分析的显微照片。图 11A,泳道 A, SLO 野生型无标签蛋白 ;泳道 B, SLO P427L 无标签蛋白 ;分子量标记

(116-66. 2-45-35-25-18. 4-14. 4) ;黑色箭头表示从突变型和野生型克隆纯化的 SLO 蛋白。图 11B,泳道 A, SLO 野生型无标签蛋白 (3  $\mu$ g) ;泳道 B, SLO P427L-W535F 无标签蛋白 (3  $\mu$ g) ;分子量标记 (116-66. 2-45-35-25-18. 4-14. 4) ;黑色箭头表示从突变型和野生型克隆纯化的 SLO 蛋白。

[0019] 图 12. 纯化的无标签 SLO 野生型蛋白的 SDS-PAGE 分析的显微照片。在还原和非还原条件下分析野生型 SLO 不同纯化批次的样品。

[0020] 图 13. 该图显示了带 His 标签的 SLO 突变体的溶血测试结果。

[0021] 图 14. 该图显示了抗-SLO 抗血清对 SLO- 诱导的溶血活性的抑制作用。

[0022] 图 15. 该图显示了抗-SLO 抗血清抑制 SLO 溶血作用的滴度。

[0023] 图 16. 该图显示了 SLO 溶血活性滴度。

[0024] 图 17. 该图显示了野生型 SLO、化学去毒的野生型 SLO 和 SLO 突变体 (P427L ; P427L+W535F) 的溶血活性滴度。

[0025] 图 18. 该图显示了野生型 SLO 和 SLO 突变体 (P427L ;P427L+W535F) 的溶血活性滴度。

[0026] 图 19. 该图显示了野生型 SLO 和化学去毒的野生型 SLO 的溶血活性滴度。

[0027] 图 20. 该图显示了使 SLO 溶血活性 (50ng/ml SLO) 降低 50% 所需的 SLO 突变体 P427L+W535F 抗血清的稀释度。

[0028] 图 21. 该图显示了使 SLO 溶血活性 (100ng/ml SLO) 降低 50% 所需的 SLO 突变体 P427L+W535F 抗血清的稀释度。

[0029] 图 22. 滴定曲线,显示了用 100% 溶血毒素浓度进行的溶血抑制试验。

[0030] 图 23. SLO 蛋白的比对。M1\_SF370, SEQ ID NO :1 ;M12\_2096, SEQ ID NO :2 ;M12\_9429, SEQ ID NO :3 ;M1\_5005, SEQ ID NO :4 ;M2, SEQ ID NO :5 ;M28, SEQ ID NO :6 ;M6, SEQ ID NO :7 ;M18, SEQ ID NO :8 ;M5, SEQ ID NO :9 ;M3, SEQ ID NO :10 ;M3\_SSI, SEQ ID NO :11 ;和 M4, SEQ ID NO :12。

[0031] 图 24. 野生型 SLO 和带 His 标签的 SLO 突变体的比对。SLO\_M1 株 SF370 (SLO\_M1strainSF370), SEQ ID NO :13 ;SLO 野生型\_带 his 标签 (SLO WT\_histagged), SEQ ID NO :14 ;SLO 突变型.P427L\_带 his 标签 (SLOmut.P427L\_histagged), SEQ ID NO :15 ;SLO 突变型.C530G\_带 his 标签 (SLOmut.C530G\_histagged), SEQ ID NO :16 ;SLO 突变型.  $\delta$  A248\_带 his 标签 (SLOmut.DeltaA248\_histagged), SEQ ID NO :17 ;SLO 突变型.W535F\_带 his 标签 (SLOmut.W535F\_histagged), SEQ ID NO :18 ;和 SLO 突变型.W535F&D482N\_带 his 标签 (SLOmutW535F&D482N\_histagged), SEQ ID NO :19。

[0032] 图 25. 该图比较了野生型 SLO 抗血清和 SLO 突变体 P427L+W535F 抗血清造成的 SLO 溶血活性的降低。

[0033] 图 26. 该图显示了采用明矾或 MF59 作为佐剂的重组 SLO 突变体 P427L+W535F 的体内保护特性。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明提供无毒但仍保留了诱导抵御酿脓链球菌保护能力的链球菌溶血素 O 的突变体 (SLO ;GAS25)。SLO 的突变形式可用于疫苗组合中诱导抗酿脓链球菌的保护力。

[0036] 突变型 SLO 蛋白

[0037] 通过溶血试验测得,本发明的 SLO 突变形式的溶血活性比野生型 SLO 低至少 50% (例如低 50、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99 或 100%),但具有免疫原性,例如能赋予小鼠模型抵御 GAS 致死性攻击的保护力(例如见实施例 7)。本发明的 SLO 突变体包括 SLO 突变体 P427L (SEQ ID NO :20), W535F (SEQ ID NO :21), C530G (SEQ ID NO :22),  $\Delta$  A248 (SEQ ID NO :23), W535F+D482N (SEQ ID NO :24), P427L+W535F (SEQ ID NO :25), P427L+C530G (SEQ ID NO :26), 和 P427L+C530G+W535F (SEQ ID NO :27)。本发明还包括这些突变体的带 His 标签的形式。例子显示于图 24。

[0038] 本发明的 SLO 突变体包括在按照 SEQ ID NO :1 所示野生型 SLO 序列编号的氨基酸 P427、W535、C530、A248 和 D482 中的一处或多处具有氨基酸改变(即取代、缺失或插入)的那些。图 23 提供了不同 M 类型野生型 GAS25 序列的比对。

[0039] 本发明的 SLO 突变体包括在 P427、W535、C530、A248 和 / 或 D482 位置的一个、二个或三个氨基酸改变(“单突变体”、“双突变体”、“三突变体”)。因此, SLO 突变体可包括以下:

[0040] i. P427L (SEQ ID NO :20), P427R, P427N, P427C, P427Q, P427E, P427G, P427H, P427I, P427L, P427K, P427M, P427F, P427A, P427S, P427T, P427W, P427Y, 或 P427V ;

[0041] ii. W535F (SEQ ID NO :21), W535R, W535N, W535D, W535C, W535Q, W535E, W535G, W535I, W535L, W535K, W535M, W535A, W535P, W535S, W535T, W535Y, 或 W535V ;

[0042] iii. C530G (SEQ ID NO :22), C530R, C530N, C530D, C530S, C530Q, C530E, C530A, C530H, C530I, C530L, C530K, C530M, C530F, C530P, C530T, C530W, C530Y, 或 C530V ;

[0043] iv. D482L, D482R, D482N, D482C, D482Q, D482E, D482G, D482H, D482I, D482L, D482K, D482M, D482F, D482A, D482S, D482T, D482W, D482Y, 或 D482V ;

[0044] v. A248L, A248R, A248N, A248C, A248Q, A248E, A248G, A248H, A248I, A248L, A248K, A248M, A248F, A248S, A248T, A248W, A248Y, 或 A248V ;

[0045] vi.  $\Delta$  P427 ;或  $\Delta$  W535 ;或  $\Delta$  C530 ;或  $\Delta$  D482 ;或  $\Delta$  A248 (SEQ ID NO :23) ;和

[0046] vii. 它们的组合,如 W535F+D482N (SEQ ID NO :24), P427L+W535F (SEQ ID NO :25), P427L+C530G (SEQ ID NO :26), 和 P427L+C530G+W535F (SEQ ID NO :27)。

[0047] 本发明的双重突变体包括 P427L+W535F (SEQ ID NO :25), P427L+C530G (SEQ ID NO :26), P427L+A248L, P427L+D482L, W535F+C530G, W535F+A248L, W535F+D482L, C530G+A248L, 和 A248L+D482L。三重突变体包括 P427L+C530G+A248L, P427L+C530G+D482L, P427L+A248L+D482L, P427L+C530G+W535F (SEQ ID NO :27), W535F+C530G+A248L, W535F+C530G+D482L, W535F+A248L+D482L, 和 C530G+A248L+D482L。

[0048] 本发明的突变型 SLO 蛋白也包括含上述突变型 SLO 蛋白和另一种 GAS 抗原的融合多肽。GAS 抗原披露于,例如, WO 02/34771, 且包括但不限于: GAS39 (spy0266 ; gi-15674446), GAS40 (spy0269 ; gi-15674449), GAS42 (spy0287 ; gi-15674461), GAS45 (M5005\_spy0249 ; gi-71910063), GAS57 (spy0416 ; gi-15674549), GAS58 (spy0430 ; gi-15674556), GAS84 (spy1274 ; gi-15675229), GAS95 (spt1733 ; gi-15675582), GAS117 (spy0448 ; gi-15674571), GAS130 (spy0591 ; gi-15674677), GAS137 (spy0652 ; gi-15674720), GAS159 (spy1105 ; gi-15675088), GAS193 (spy2025 ; gi-15675802), GAS202 (spy1309 ; gi-15675258), GAS217 (spy0925 ; gi-15674945), GAS236 (spy1126 ;

gi-15675106), GAS253(spy1524 ;gi-15675423), GAS277(spy1939 ;gi-15675742), GAS294(spy1173 ;gi-15675145), GAS309(spy0124 ;gi-15674341), GAS366(spy1525 ;gi-15675424), GAS372(spy1625 ;gi-15675501), GAS384(spy1874 ;gi-15675693), GAS389(spy1981 ;gi-15675772), GAS504(spy1751 ;gi-15675600), GAS509(spy1618 ;gi-15675496), GAS290(spy1959 ;gi-15675757), GAS511(spy1743 ;gi-15675592), GAS527(spy1204 ;gi-15675169), GAS529(spy1280 ;gi-15675233), 和 GAS533(spy1877 ;gi-15675696)。进一步的 GAS 抗原包括但不限于 :GAS68(Spy0163 ;gi13621456)、GAS84(Spy1274 ;gi13622398)、GAS88(Spy1361 ;gi13622470)、GAS89(Spy1390 ;gi13622493)、GAS98(Spy1882 ;gi13622916)、GAS99(Spy1979 ;gi13622993)、GAS102(Spy2016 ;gi13623025)、GAS146(Spy0763 ;gi13621942)、GAS195(Spy2043 ;gi13623043)、GAS561(Spy1134 ;gi13622269)、GAS179(Spy1718 ;gi13622773) 和 GAS681(Spy1152 ;gi1362228)。

[0049] 编码突变型 SLO 蛋白的核酸分子

[0050] 本发明包括编码突变型 SLO 蛋白的核酸分子。本发明也包括所含核苷酸序列与这种分子至少有 50% 序列相同性的核酸分子。取决于具体的序列,所述序列相同性程度优选大于 50% (如 60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高)。核苷酸序列之间的相同性优选采用 Smith-Waterman 同源性检索算法测定,以 MPSRCH 程序(牛津分子公司(Oxford Molecular))进行,所用仿射空位检索的参数是:空位开放罚分 = 12,空位延伸罚分 = 1。

[0051] 本发明也提供能与上述这些分子杂交的核酸分子。可在不同“严谨性”条件下进行杂交反应。提高杂交反应严谨性的条件是本领域广为所知和已发表的。参见例如 Sambrook 等“分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning :A Laboratory Manual)”1989,第 7.52 页。相关条件的例子包括(严谨性逐渐提高的顺序):25°C、37°C、50°C、55°C 和 68°C 的培育温度;10X SSC、6X SSC、1X SSC 和 0.1XSSC(SSC 是 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸缓冲液)的缓冲液浓度和与其等同的采用其它缓冲液的系统;0%、25%、50% 和 75% 的甲酰胺浓度;5 分钟至 24 小时的培育时间;1、2 或更多次的洗涤步骤;1、2 或 15 分钟的洗涤培育时间;6X SSC、1X SSC、0.1X SSC 或去离子水的洗涤液。杂交技术及其优化是本领域熟知的,可参见例如, Sambrook, 1989 ;Ausubel 等编著的“分子生物学简短方案(Short Protocols in Molecular Biology)”第 4 版,1999 ;美国专利 5,707,829 ;Ausubel 等编著“分子生物学当前方案(Current Protocols in Molecular Biology)”,增刊 30,1987。

[0052] 在某些实施方式中,本发明的核酸分子能在低严谨条件下与靶分子杂交;在其它实施方式中,本发明的核酸分子能在中等严谨条件下杂交;在优选的实施方式中,本发明的核酸分子能在高严谨条件下杂交。低严谨性杂交条件的一个例子是 50°C 和 10X SSC。中等严谨性杂交条件的一个例子是 55°C 和 1XSSC。高严谨性杂交条件的一个例子是 68°C 和 0.1X SSC。

[0053] 突变型 SLO 蛋白的制造

[0054] 重组制备

[0055] 遗传密码的冗余度是众所周知的。因此,可利用编码野生型 SLO 蛋白或编码本发明 SLO 突变蛋白的任何核酸分子(多核苷酸)来重组产生蛋白质。编码野生型 SLO、

SLO 突变体 P427L, W535F, C530G,  $\Delta$  A248, W535F+D482N, P427L+W535F, P427L+C530G, 和 P427L+C530G+W535F 的核苷酸序列的例子提供在序列表中 (也可分别见 SEQ ID NOS :28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 和 36)。也可采用标准的核酸纯化技术从合适的酿脓链球菌分离编码野生型 SLO 的核酸分子, 或采用扩增技术, 如聚合酶链式反应 (PCR) 或用自动化合成仪合成该核酸分子。参见 Caruthers 等, Nucl Acids Res Symp Ser. 215, 223, 1980 ;Horn 等, Nucl Acids Res Symp Ser. 225, 232, 1980 ;Hunkapiller 等, Nature 310, 105-11, 1984 ;Grantham 等, Nucl Acids Res. 9, r43-r74, 1981。

[0056] 可用标准分子生物学技术, 以 mRNA 为模板制备 cDNA 分子。然后可用本领域熟知的分子生物学技术复制 cDNA 分子。可利用基因组 DNA 或 cDNA 作模板, 以扩增技术, 如 PCR 获得更多拷贝的本发明多核苷酸。

[0057] 如果需要, 可用本领域众所周知的方法为各种原因工程改造多核苷酸以改变抗原编码序列, 包括但不限于导致克隆、加工和 / 或多肽或 mRNA 产物表达的修饰等的改变。可采用基因片段和合成寡核苷酸的随机片段化和 PCR 重装配来改组 DNA, 从而工程改造核苷酸序列。例如, 可利用定点诱变插入新的限制性酶位点, 改变糖基化模式, 改变密码子偏爱, 产生剪接变体, 引入突变等等。

[0058] 可利用序列修饰, 例如加入纯化标签序列或优化密码子来促进表达。例如, 用编码标签蛋白如聚组氨酸 (“HIS”) 或谷胱甘肽 S- 转移酶 (“GST”) 的序列替代 N- 末端前导序列。可利用这种标签蛋白促进表达蛋白的纯化、检测和稳定性。可选择具体的原核或真核宿主偏爱的密码子来提高蛋白表达率, 或制备具有所需性能, 如半寿期比天然序列产生的转录物更长的 RNA 转录物。这些方法是本领域熟知的, 在 WO 05/032582 中也有描述。

[0059] 表达载体

[0060] 可将编码突变型 SLO 蛋白的核酸分子插入表达载体中, 该表达载体含有转录和翻译插入的编码序列所需的元件。可采用本领域技术人员熟知的方法构建包含编码序列和合适转录和翻译调控元件的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。

[0061] 宿主细胞

[0062] 能产生突变型 SLO 蛋白的宿主细胞可以是原核或真核细胞。优选的宿主细胞是大肠杆菌, 其它合适的宿主包括: 乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus cremoris*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)、乳酰胺奈瑟菌 (*Neisseria lactamica*)、灰色奈瑟菌 (*Neisseria cinerea*)、分枝杆菌 (*Mycobacteria*) (如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*))、酵母菌、杆状病毒、哺乳动物细胞等等。

[0063] 可选择能以所需方式调节插入序列的表达或加工所表达多肽的宿主细胞株。多肽的这种修饰包括但不限于: 乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。也可利用切割“前蛋白 (prepro)”形式多肽的翻译后加工来帮助正确插入、折叠和 / 或行使功能。可从美国模式培养物保藏中心 (ATCC ;10801, 大学大道, 玛娜丝, 弗吉尼亚州 (University Boulevard, Manassas, VA) 20110-2209) 获得具有翻译后活化特异性细胞机制和特征机理的不同宿主细胞, 选择这些宿主细胞以确保外源蛋白的正确修饰和加工。参见 WO 01/98340。

[0064] 可采用已良好建立的技术将表达构建物引入宿主细胞,包括但不限于:转铁蛋白-聚阳离子介导的 DNA 转移,用裸核酸或包裹的核酸转染,脂质体介导的细胞融合,包裹 DNA 的胶乳珠的胞内转运,病毒感染,原生质体融合、电穿孔,“基因枪”方法,和 DEAE- 或磷酸钙介导的转染。

[0065] 将表达载体转化的宿主细胞培养在适合从细胞培养表达蛋白和回收的条件下。转化细胞产生的蛋白可能分泌出来或包含在细胞内,这取决于所用的核苷酸的序列和 / 或表达载体。本领域技术人员知道可以设计含有信号序列的表达载体,其能引导可溶性抗原穿过原核或真核细胞膜而分泌。

#### [0066] 纯化

[0067] 可在重组产生的突变型 SLO 蛋白中包含信号输出序列,以使用已知方法纯化细胞培养液中的抗原。或者,可用本领域熟知的方法,从工程改造的宿主细胞中分离本发明重组产生的突变型 SLO 蛋白,使其与宿主细胞的其它组分,如蛋白质、糖或脂质分开。这类方法包括但不限于:分子大小排阻层析、硫酸铵分级、离子交换层析、亲和层析和制备型凝胶电泳。纯化的突变型 SLO 蛋白制品至少 80% 纯,优选该制品为 90%、95% 或 99% 纯。可用本领域已知的任何方法,例如 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳来评估制品的纯度。可用适当的试剂,如脲素来促进突变型 SLO 蛋白的溶解。

#### [0068] 化学合成

[0069] 突变型 SLO 蛋白的合成,例如可采用固相技术。参见,如 Merrifield, J Am Chem Soc. 85, 2149-54, 1963 ;Roberge 等, Science 269, 202-04, 1995。可采用手工技术或自动化技术进行蛋白质合成。实施自动化合成,例如可采用泊金艾尔默公司的应用生物系统 431A 肽合成仪 (Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer, Perkin Elmer)。可任选分别合成突变型 SLO 蛋白的各片段,再用化学方法组合产生全长分子。

#### [0070] 抗体

[0071] 本发明提供了特异性结合本发明的突变型 SLO 蛋白但不结合野生型 SLO 蛋白的抗体。术语“抗体”包括完整的免疫球蛋白分子,及其能结合抗原的片段。这些抗体片段包括:杂交(嵌合)抗体分子(如 Winter 等, Nature 349, 293-99, 1991 ;美国专利 4, 816, 567); F(ab')<sub>2</sub> 和 F(ab) 片段及 Fv 分子;非共价连接的异质二聚体(如 Inbar 等, Proc Natl Acad Sci. USA. 69, 2659-62, 1972 ;Ehrlich 等, Biochem. 19, 4091-96, 1980);单链 Fv 分子 (sFv) (如 Huston 等, Proc Natl Acad Sci. USA. 85, 5897-83, 1988);二聚或三聚抗体片段构建物;微小抗体(如 Pack 等, Biochem. 31, 1579-84, 1992 ;Cumber 等, J Immunology. 149B, 120-26, 1992);人源化抗体分子(如 Riechmann 等, Nature. 332, 323-27, 1988 ;Verhoeyan 等, Science. 239, 1534-36, 1988 和公开的英国专利号 GB2, 276, 169, 1994/9/21 公开);获自这些分子的任何功能性片段及通过非常规方法,如噬菌体展示技术获得的抗体。抗体优选为单克隆抗体。本领域熟知获取单克隆抗体的方法。

[0072] 形成表位通常需要至少 6、7、8、10 或 12 个毗连氨基酸。然而,包含非毗连氨基酸的表位可能需要更多,例如,至少 15、25 或 50 个氨基酸。可采用各种免疫测定(例如,Western 印迹、ELISA、放射免疫测定、免疫组化测定、免疫沉淀或本领域已知的其他免疫化学测定)来鉴定具有所需特异性的抗体。许多竞争性结合或免疫放射测定方案是本领域熟知的。此类免疫实验通常包括检测免疫原和特异性结合该免疫原的抗体之间形成的复合物。当用于

免疫化学测定时,特异性结合突变型 SLO 蛋白的抗体制品提供的检测信号通常比用其他蛋白质提供的检测信号高至少 5-、10- 或 20- 倍,且如果与野生型 SLO 蛋白结合则不提供可检测信号。优选地,在免疫化学测定中,所述抗体不检测其他蛋白质并且可从溶液中免疫沉淀特定抗原。

#### [0073] 抗体的制备

[0074] 可利用突变型 SLO 蛋白或非 SLO 多肽抗原(下文所述)免疫哺乳动物,例如小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、猴子或人来产生多克隆抗体。如果需要,可将抗原偶联于载体蛋白,如牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白或匙孔**螺**血蓝蛋白。根据宿主种类,可采用不同的佐剂来增强免疫应答。这类佐剂包括但不限于:弗氏佐剂、无机胶体(如氢氧化铝)和表面活性剂(如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔**螺**血蓝蛋白和二硝基苯酚)。人用佐剂中,特别采用 BCG(卡介苗)和短棒杆菌。

[0075] 可采用通过连续培养细胞系产生抗体分子的任何技术来制备能特异性结合抗原的单克隆抗体。这些技术包括但不限于:杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和 EBV 杂交瘤技术(Kohler 等, *Nature* 256, 495-497, 1985 ;Kozbor 等, *J Immunol Methods* 81, 31-42, 1985 ;Cote 等, *Proc Natl Acad Sci.* 80, 2026-2030 ;Cole 等, *Mol Cell Biol.* 62, 109-120, 1984)。

[0076] 此外,可采用为产生“嵌合抗体”而开发的技术,该技术将小鼠抗体基因剪接于人抗体基因获得具有合适抗原特异性和生物学活性的分子(Morrison 等, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 81, 6851-6855 ;Neuberger 等, *Nature.* 312, 604-608, 1984 ;Takeda 等, *Nature.* 314, 452-454, 1985)。也可“人源化”单克隆抗体和其它抗体以防止病人对所用治疗抗体产生免疫反应。这类抗体的序列与直接用于治疗的人抗体应充分相似或可能需要改变几个关键残基。可通过定点诱变单个残基或移植整个互补决定区来取代不同于人序列的残基以最大程度减少啮齿类抗体与人序列之间的序列差异。

[0077] 或者,可用以下所述重组方法产生人源化抗体。如美国专利 5, 565, 332 所述,特异性结合特定抗原的抗体可包含部分或完全人源化的抗原结合位点。

[0078] 或者,可采取所述的产生单链抗体的技术,用本领域已知方法来产生特异性结合特定抗原的单链抗体。可从免疫球蛋白随机组合库的链改组来产生具有相关特异性但独特性组成不同的抗体(Burton 等, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 88, 1112-023)。

[0079] 也可用 DNA 扩增方法,如 PCR,用杂交瘤 cDNA 作模板构建单链抗体(Thirion 等, 1996, *Eur J Cancer Prev.* 5, 507-11)。单链抗体可以是单-或双-特异性,可以是二价或四价抗体。构建四价双特异性单链抗体可参见,例如 Coloma and Morrison., *Nat Biotechnol.* 15, 159-63, 1997 中所述。构建二价双特异性单链抗体可参见 Mallender 和 Voss., *J Biol Chem.* 269, 199-206, 1994 中所述。

[0080] 可用手工或自动化核苷酸合成构建编码单链抗体的核苷酸序列,如下所述,用标准重组 DNA 方法将其克隆入表达构建物中,再引入细胞而表达该编码序列。或者,可采用丝状噬菌体技术直接产生单链抗体(Verhaar 等, *Int J Cancer.* 61, 497-501, 1995 ;Nicholls 等, *J Immunol Meth.* 165, 81-91, 1993)。

[0081] 也可通过体内诱导淋巴细胞群产生,或通过筛选文献所述的免疫球蛋白库或一些高特异性结合物质(Orlandi 等, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 86, 3833-37, 1989 ;Winter 等, *Nature* 349, 293-99, 1991)来制备能特异性结合特定抗原的抗体。

[0082] 可按 WO 93/03151 所述构建嵌合抗体。也可制备免疫球蛋白衍生的多价多特异性结合蛋白,如 WO 94/13804 所述的“二抗体”。

[0083] 可用本领域熟知方法纯化抗体。例如,可通过结合有相关抗原的层析柱来亲和纯化抗体。然后可用高盐浓度缓冲液洗脱结合的抗体。

[0084] 药物组合物

[0085] 本发明也提供用作药物的组合物(如免疫原性组合物或疫苗)。可用本发明的组合物预防和/或治疗酿脓链球菌感染所引起的疾病,该组合物包含至少一种活性成分,可以是多肽、核酸分子或抗体。所述疾病,例如可以是菌血症、脑膜炎、产褥期猩红热、猩红热、丹毒、咽炎、脓疱病、坏死性筋膜炎、肌炎或中毒性休克综合征。

[0086] 含有突变型 SLO 蛋白的组合物优选是免疫原性组合物,更优选是疫苗组合物。这种组合物的 pH 宜在 6-8 之间,优选约 7。可用缓冲剂维持此 pH。该组合物可以无菌和/或无热原。组合物与人体等张。

[0087] 本发明的疫苗可用于预防或治疗,但通常用于预防。因此,本发明包括治疗或预防性治疗酿脓链球菌感染的方法。动物优选哺乳动物,最优选人。该方法包括给予动物治疗或预防量的本发明免疫原性组合物。

[0088] 本发明的某些组合物包含本文所述的多肽突变型 SLO 蛋白。本发明的其它组合物包含编码突变型 SLO 蛋白的核酸分子及任选的可包含在此组合物中的其它抗原(见下文)。参见例如 Robinson 和 Torres(1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283; Donnelly 等, (1997) *Ann Rev Immunol* 15:617-648; Scott-Taylor & Dalglish(2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-80; Apostolopoulos & plebanski(2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-47; Ilan(1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-20; Dubensky 等, (2000) *Mol Med* 6:723-32; Robinson & Pertmer(2000) *Adv Virus Res* 55:1-74; Donnelly 等, (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4Pt2):S190-193; Davis(1999) *Mt Sinai J Med* 66:84-90。所述核酸分子通常是 DNA 分子,如质粒形式。

[0089] 在某些实施方式中,本发明的组合物可包含一种或多种其它活性剂。这种活性剂包括但不限于:(a) 本发明的另一种突变型 SLO 蛋白,(b) 用于儿童疫苗的多肽抗原,(c) 用于老年人或免疫力低下个体的疫苗的多肽抗原,(d) 编码(a)-(c)的核酸分子和特异性结合(a)-(c)的抗体。

[0090] 其它抗原

[0091] 本发明的组合物可与用于本发明治疗或预防方法的一种或多种其他抗原一起给予。合适的抗原包括以下所列的那些。此外,可用本发明的组合物治疗或预防以下所列任何一种病原体引起的感染。除与以下所述抗原联用外,本发明组合物也可与本文所述佐剂联用。

[0092] 可与本发明联用的抗原包括但不限于一种或多种以下抗原,或衍生自一种或多种以下病原体的抗原:

[0093] A. 细菌抗原

[0094] 适合用于本发明的细菌抗原包括可从细菌分离、纯化或衍生的蛋白质、多糖、脂多糖及外膜囊泡。此外,细菌抗原可包括细菌裂解物和灭活的细菌制剂。可重组表达产生细菌抗原。细菌抗原优选包含在细菌生命周期至少某阶段暴露在细菌表面的表位。细菌抗原

优选多种血清型之间的保守性抗原。细菌抗原包括衍生自以下的一种或多种细菌及以下鉴定的特异性示范抗原中的抗原。

[0095] 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitides*): 脑膜炎球菌抗原可包括自奈瑟氏脑膜炎球菌血清群如 A、C、W135、Y 和 / 或 B 纯化的或衍生的蛋白质 (如参考文献 1-7 所鉴定的那些)、糖 (包括多糖、寡糖或脂多糖) 或外膜囊泡 (参考文献 8、9、10、11)。可从粘附蛋白、自身转运蛋白 (autotransporter)、毒素、Fe 获取蛋白和膜缔合蛋白 (优选外膜整合蛋白) 中选择脑膜炎球菌的蛋白抗原。

[0096] 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*): 肺炎链球菌抗原可包括肺炎链球菌的糖 (包括多糖或寡糖) 和 / 或蛋白质。可选用血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 的糖抗原。可选用 WO 98/18931、WO 98/18930、美国专利号 6,800,744、WO 97/43303 和 WO 97/37026 所鉴定蛋白质的蛋白抗原。可从聚组氨酸 Triad 家族 (PhtX)、胆碱结合蛋白家族 (CbpX)、CbpX 截短物、LytX 家族、LytX 截短物、CbpX-LytX 截短嵌合蛋白、肺炎球菌溶酶 (Ply)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125 或 Sp133 蛋白选择肺炎链球菌蛋白。

[0097] 酿脓链球菌 (A 群链球菌): A 组链球菌抗原可包括: WO 02/34771 或 WO2005/032582 中鉴定的蛋白质 (包括但不限于: GAS39(spy0266 ;gi-15674446), GAS40(spy0269 ;gi-15674449), GAS42(spy0287 ;gi-15674461), GAS45(M5005\_spy0249 ;gi-71910063), GAS57(spy0416 ;gi-15674549), GAS58(spy0430 ;gi-15674556), GAS84(spy1274 ;gi-15675229), GAS95(spt1733 ;gi-15675582), GAS117(spy0448 ;gi-15674571), GAS130(spy0591 ;gi-15674677), GAS137(spy0652 ;gi-15674720), GAS159(spy1105 ;gi-15675088), GAS193(spy2025 ;gi-15675802), GAS202(spy1309 ;gi-15675258), GAS217(spy0925 ;gi-15674945), GAS236(spy1126 ;gi-15675106), GAS253(spy1524 ;gi-15675423), GAS277(spy1939 ;gi-15675742), GAS294(spy1173 ;gi-15675145), GAS309(spy0124 ;gi-15674341), GAS366(spy1525 ;gi-15675424), GAS372(spy1625 ;gi-15675501), GAS384(spy1874 ;gi-15675693), GAS389(spy1981 ;gi-15675772), GAS504(spy1751 ;gi-15675600), GAS509(spy1618 ;gi-15675496), GAS290(spy1959 ;gi-15675757), GAS511(spy1743 ;gi-15675592), GAS527(spy1204 ;gi-15675169), GAS529(spy1280 ;gi-15675233), 和 GAS533(spy1877 ;gi-15675696)), GAS M 蛋白片段融合物 (包括 WO 02/094851 以及 Dale, Vaccine(1999)17 :193-200, 和 Dale, Vaccine 14(10) :944-948 中描述的那些), 纤连蛋白结合蛋白 (Sfb1), 链球菌血红素相关蛋白 (Shp) 以及链球菌溶血素 S(SagA)。进一步的 GAS 抗原包括: GAS68(Spy0163 ;gi13621456)、GAS84(Spy1274 ;gi13622398)、GAS88(Spy1361 ;gi13622470)、GAS89(Spy1390 ;gi13622493)、GAS98(Spy1882 ;gi13622916)、GAS99(Spy1979 ;gi13622993)、GAS102(Spy2016 ;gi13623025)、GAS146(Spy0763 ;gi13621942)、GAS195(Spy2043 ;gi13623043)、GAS561(Spy1134 ;gi13622269)、GAS179(Spy1718 ;gi13622773) 和 GAS681(Spy1152 ;gi1362228)。

[0098] 粘膜莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*): 粘膜莫拉菌抗原包括 W002/18595 和 W0 99/58562 鉴定的抗原、外膜蛋白抗原 (HMW-OMP)、C- 抗原和 / 或 LPS。

[0099] 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*): 百日咳菌抗原包括百日咳全毒素 (PT)

和丝状血凝素 (FHA), 任选也与百日咳杆菌粘附素 (pertactin) 和 / 或凝集原 2 和 3 联用。

[0100] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*): 金黄色葡萄球菌抗原包括任选与无毒重组铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 外毒素 A 偶联的 5 型和 8 型金黄色葡萄球菌荚膜多糖, 例如 StaphVAX™, 或衍生自表面蛋白质, 侵袭素 (杀白细胞素、激酶、透明质酸酶), 抑制吞噬细胞吞噬作用的表面因子 (荚膜, A 蛋白), 类胡萝卜素, 过氧化氢酶产物, A 蛋白, 凝固酶, 凝血因子, 和 / 或裂解真核细胞膜的膜破坏性毒素 (任选脱毒的) (溶血素、白细胞毒素、杀白细胞素) 的抗原。

[0101] 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*): 表皮葡萄球菌抗原包括粘质结合抗原 (SAA)。

[0102] 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*) (破伤风): 破伤风菌抗原包括破伤风类毒素 (TT), 优选用作与本发明组合物结合 / 偶联的载体蛋白质。

[0103] 白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) (白喉): 白喉抗原包括白喉毒素, 优选脱毒的, 如 CRM197。此外考虑将能调节、抑制 ADP 核糖基化或与之结合的抗原与本发明组合物联用 / 共同给药 / 偶联。所述白喉类毒素可用作运载体蛋白。

[0104] 流感嗜血杆菌 B (*Haemophilus influenzae* B) (Hib): Hib 抗原包括 Hib 糖抗原。

[0105] 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*): 铜绿假单胞菌抗原包括内毒素 A、Wzz 蛋白、铜绿假单胞菌 LPS, 更具体说是分离自 PA01 (O5 血清型) 的 LPS 和 / 或外膜蛋白, 包括外膜蛋白 F (OprF) (*Infect Immun.* 2001, May ;69 (5) :3510-15)。3510-3515)。

[0106] 嗜肺军团病杆菌 (*Legionella pneumophila*): 可以是衍生自嗜肺军团杆菌病杆菌的细菌抗原。

[0107] 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 群链球菌): B 群链球菌抗原包括 WO 02/34771、WO 03/093306、WO 04/041157 或 WO 2005/002619 鉴定的蛋白或糖抗原 (包括蛋白 GBS80、GBS 104、GBS276 和 GBS322 以及包括血清型 Ia、Ib、Ia/c、II、III、IV、V、VI、VII 和 VIII 产生的糖抗原)。

[0108] 淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*): 淋病奈瑟菌抗原包括 Por (或膜通道蛋白) 蛋白, 如 PorB (参见 Zhu 等, *Vaccine* (2004) 22 :660-669)、转移结合蛋白如 TbpA 和 TbpB (参见 Price 等, *Infection and immunity* (2004) 71 (1) :277-283)、混浊蛋白 (如 Opa)、还原可修饰蛋白 (Rmp) 和外膜囊泡 (OMV) 制品 (参见 Plante 等, *J Infectious Disease* (2000) 182 :848-55), 也参见例如 WO 99/24578、WO 99/36544、WO99/57280、WO 02/0792430。

[0109] 砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*): 砂眼衣原体抗原包括血清型 A、B、Ba 和 C 产生的抗原 (砂眼致病因子, 导致失明)、血清型 L1、L2 和 L3 产生的抗原 (与性病性淋巴肉芽肿 (*Lymphogranuloma venereum*) 有关) 和血清型 D-K 产生的抗原。砂眼衣原体抗原还可包括 WO 00/37494、WO 03/049762、W003/068811 或 WO 05/002619 鉴定的抗原, 包括 PepA (CT045)、LcrE (CT089)、ArtJ (CT381)、DnaK (CT396)、CT398、OmpH- 样 (CT242)、L7/L12 (CT316)、OmcA (CT444)、AtosA (CT467)、CT547、Eno (CT587)、HrtA (CT823) 和 MurG (CT761)。

[0110] 苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*) (梅毒): 苍白密螺旋体抗原包括 TmpA 抗原。

[0111] 杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*) (导致软性下疳): 软性下疳抗原包括外

膜蛋白 (DsrA)。

[0112] 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 或屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) :抗原包括三糖重复序列或美国专利号 6,756,361 提供的其它肠球菌衍生抗原。

[0113] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) :幽门螺杆菌抗原包括 Cag、Vac、Nap、HopX、HopY 和 / 或脲酶抗原。

[0114] 腐生性葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*) :抗原包括 160kDa 腐生葡萄球菌血凝素。

[0115] 小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) :抗原包括 LPS (Infect Immun. 2002, Augst ;70(8) :4414)。4414)。

[0116] 大肠杆菌 (*E. coli*) :大肠杆菌抗原可以是肠毒素性大肠杆菌 (ETEC)、肠聚集性大肠杆菌 (EAggEC)、弥散性附性大肠杆菌 (DAEC)、肠致病性大肠杆菌 (EPEC) 和 / 或肠溶血性大肠杆菌 (EHEC) 产生的抗原。

[0117] 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) (炭疽) :炭疽杆菌抗原任选是脱毒的,可选自 A-组分(致死因子(LF)和水肿因子(EF)),二者具有称为保护性抗原(PA)的共同B-组分。

[0118] 鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*) (鼠疫) :鼠疫抗原包括 F1 荚膜抗原 (Infect Immun. ,2003 年 1 月 ;71(1) :374-383), LPS (Infect Immun. 1999 年 10 月 ;67(10) :5395), 鼠疫耶尔森菌 V 抗原 (Infect Immun. 1997 年 11 月 ;65(11) :4476-4482)。

[0119] 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) :结核菌抗原包括脂蛋白、LPS、BCG 抗原、抗原 85B (Ag85B) 和 / 或 ESAT-6 的融合蛋白,任选配在阳离子脂质载体中 (Infect Immun. 2004 年 10 月 ;72(10) :6148), 结核分枝杆菌 (Mtb) 异柠檬酸脱氢酶相关抗原 (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 年 8 月 24 日 ;101(34) :12652), 和 / 或 MPT51 抗原 (Infect Immun. 2004 年 7 月 ;72(7) :3829)。

[0120] 立克次体 (*Rickettsia*) :抗原包括外膜蛋白 A 和 / 或 B (OmpB) (Biochim Biophys Acta. 2004 年 11 月 1 日 ;1702(2) :145), LPS 和表面蛋白抗原 (SPA) (J Autoimmun. 1989 年 6 月 ;2 增刊 ;81)。单核细胞增多症李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) :

[0121] 单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) :细菌抗原可衍生自单核细胞增多性利斯特菌。

[0122] 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) :抗原包括 W0 02/02606 鉴定的那些抗原。

[0123] 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) :抗原包括蛋白酶抗原、LPS、特别是霍乱弧菌 II 的脂多糖、01 Inaba 0- 特异性多糖、霍乱弧菌 0139、IEM108 疫苗的抗原 (Infect Immun. 2003 年 10 月 ;71(10) :5498-504) 和 / 或紧密连接毒素 (Zot)。

[0124] 伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*) (伤寒热) :抗原包括荚膜多糖,优选偶联物 (Vi, 即 vax-TyVi)。

[0125] 博氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) (莱姆病) :抗原包括脂蛋白 (如 OspA、OspB、OspC 和 OspD), 其它表面蛋白如 OspE- 相关蛋白 (Erps)、核心蛋白多糖结合蛋白 (如 DbpA) 和抗原性可变的 VI 蛋白,如与 P39 和 P13 结合的蛋白 (一种膜内在蛋白, Infect Immun. 2001 年 5 月 ;69(5) :3323-34)、VLsE 抗原可变异蛋白 (J Clin Microbiol. 1999 年 12 月 ;37(12) :3997)。

[0126] 牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) :抗原包括其牙龈卟啉单胞菌外膜

蛋白 (OMP)。

[0127] 克雷伯菌 (*Klebsiella*) :抗原包括 OMP,包括 OMPA,或任选与破伤风类毒素偶联的多糖。

[0128] 本发明的其它细菌抗原可以是任何上述的荚膜抗原、多糖抗原或蛋白抗原。其它细菌抗原也可包括外膜囊泡 (OMV) 制品。此外,抗原包括活的、减毒的和 / 或纯化的任何上述细菌。本发明的抗原可以衍生自革兰 - 阴性菌或革兰 - 阳性菌。本发明的抗原可以衍生自需氧菌或厌氧菌。

[0129] 此外,可将上述细菌产生的任何一种糖 (多糖、LPS、LOS 或寡糖) 与其它物质或抗原,如运载体蛋白 (如 CRM197) 偶联。这种偶联可以是糖上羰基部分与蛋白质氨基基团还原胺化实现的直接偶联,如美国专利 5,360,897 和 *Can J Biochem Cell Biol.* 1984 年 5 月 ;62(5) :270-5 所述。或者,糖可以通过连接基团偶联,例如采用《生物偶联技术》(*Bioconjugate Techniques*),1996 和 CRC,《蛋白质偶联与交联化学》(*Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*),1993 中提供的琥珀酸酰胺或其他连接键。

[0130] B. 病毒抗原

[0131] 适合本发明用的病毒抗原包括灭活 (或杀伤) 病毒、减毒病毒、裂解病毒制剂、纯化亚单位制剂、从病毒和病毒样颗粒 (VLP) 分离、纯化或衍生的病毒蛋白质。病毒抗原可以是在培养细胞或其它基质上增殖病毒产生的抗原。或者,可重组表达病毒抗原。病毒抗原优选包含在其生命周期至少某阶段暴露在病毒表面的表位。病毒抗原优选在多种血清型或分离物中为保守的抗原。病毒抗原包括衍生自以下一种或多种病毒及以下鉴定的特异性抗原例子的抗原。

[0132] 正粘病毒 (*Orthomyxovirus*) :病毒抗原可衍生自正粘病毒,例如甲型、乙型和丙型流感 (病毒)。正粘病毒抗原可选自一种或多种病毒蛋白质,包括血凝素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、核蛋白 (NP)、基质蛋白 (M1)、膜蛋白 (M2) ;一种或多种转录酶组分 (PB1、PB2 和 PA)。优选的抗原包括 HA 和 NA。

[0133] 流感病毒抗原可以可衍生自流行病爆发间的 (年度) 流感毒株。或者,流感病毒抗原可以衍生自可能导致流行病爆发的毒株 (即,与目前的流行毒株相比,具有新血凝素的流感毒株,或者在禽类对象中致病并可能平行转移至人群的流感毒株,或对人致病的流感毒株)。

[0134] 副粘病毒科病毒 :病毒抗原可以衍生自副粘病毒科病毒,如肺病毒属 (RSV)、副粘病毒属 (PIV) 和麻疹病毒属 (麻疹)。

[0135] 肺病毒属 :病毒抗原可以衍生自肺病毒属,如呼吸道合胞病毒 (RSV)、牛呼吸道合胞病毒、小鼠肺炎病毒和火鸡鼻气管炎病毒产生的病毒抗原。优选的肺病毒是 RSV。肺病毒抗原可选自以下一种或多种蛋白,包括表面融合蛋白 (F)、糖蛋白 (G) 和小疏水蛋白 (SH)、基质蛋白 M1 和 M2、核衣壳蛋白 N、P 和 L 及非结构蛋白 NS1 和 NS2。优选的肺病毒抗原包括 F、G 和 M。参见 *J Gen Virol.* 2004 年 11 月 ;85(部分 11) :3229。肺病毒属抗原还可配制成或衍生自嵌合病毒。例如,嵌合型 RSV/PIV 病毒可同时包含 RSV 和 PIV 的组分。

[0136] 副粘病毒属 :病毒抗原可衍生自副粘病毒属,如 1-4 型副流感病毒 (PIV)、腮腺炎病毒、仙台病毒、猿猴病毒 5、牛副流感病毒和新城疫病毒。副粘病毒优选 PIV 或腮腺炎病毒。副粘病毒抗原可以选自以下一种或多种蛋白 :血凝素 - 神经氨酸酶 (HN)、融合蛋白 F1

和 F2、核蛋白 (NP)、磷蛋白 (P)、大蛋白 (L) 和基质蛋白 (M)。优选的副粘病毒属蛋白包括 HN、F1 和 F2。副粘病毒属抗原还可配制成或衍生自嵌合病毒。例如,嵌合型 RSV/PIV 病毒可同时包含 RSV 和 PIV 的组分。可商品化购得的腮腺炎病毒疫苗包括单价形式或与麻疹和风疹疫苗联用 (MMR) 的减毒活腮腺炎病毒。

[0137] 麻疹病毒属:病毒抗原可以衍生自麻疹病毒属如麻疹病毒。麻疹病毒属抗原可选自以下一种或多种蛋白:血凝素 (H)、糖蛋白 (G)、融合因子 (F)、大蛋白 (L)、核蛋白 (NP)、聚合酶磷蛋白 (P) 和基质 (M)。可商品化购得的麻疹病毒疫苗包括通常与腮腺炎和风疹病毒组成联合减毒活疫苗 (MMR)。

[0138] 微小 RNA 病毒:病毒抗原可衍生自微小 RNA 病毒,如肠病毒、鼻病毒、嗜肝 RNA 病毒 (Heparnavirus)、心病毒和口蹄疫病毒。优选衍生自肠病毒,如脊髓灰质炎病毒的抗原。

[0139] 肠道病毒:病毒抗原衍生自肠病毒,如 1、2 或 3 型脊髓灰质炎病毒、1-22 型和 24 型柯萨奇 A 病毒、B1-6 型柯萨奇病毒、1-9 型、11-27 型和 29-34 型艾柯病毒 (ECHO),及 68-71 型肠病毒。优选的肠病毒是脊髓灰质炎病毒。肠病毒抗原宜选自以下 VP1、VP2、VP3 和 VP4 衣壳蛋白的一种或多种。可商品化购得的脊髓灰质炎疫苗包括灭活的脊髓灰质炎疫苗 (IPV) 和口服脊髓灰质炎病毒疫苗 (OPV)。

[0140] 嗜肝 RNA 病毒:病毒抗原可衍生自可以是嗜肝 RNA 病毒,如甲肝病毒 (HAV)。可商品化购得的 HAV 疫苗包括灭活的 HAV 疫苗。

[0141] 披膜病毒:病毒抗原可衍生自披膜病毒,如风疹病毒、 $\alpha$  病毒或动脉炎病毒。优选衍生自风疹病毒属,如风疹病毒的抗原。披膜病毒抗原可选自 E1、E2、E3、C、NSP-1、NAPO-2、NSP-3 或 NSP-4。优选的披膜病毒抗原是 E1、E2 或 E3。可商品化购得的风疹病毒疫苗包括通常与腮腺炎和麻疹疫苗联用的冷适应的活病毒 (MMR)。

[0142] 黄病毒属:病毒抗原可衍生自黄病毒属,如蜱传脑炎 (病毒) (TBE)、登革热 (病毒) (1、2、3 或 4 型)、黄热病 (病毒)、日本脑炎 (病毒)、西尼洛河脑炎 (病毒)、圣路易斯脑炎 (病毒)、俄罗斯春夏型脑炎 (病毒)、波瓦桑脑炎病毒。黄病毒属抗原可选自:PrM、M、C、E、NS-1、NS-2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5。优选的黄病毒属抗原是 PrM、M 和 E。可商品化购得的 TBE 疫苗包括病毒灭活疫苗。

[0143] 鼠疫病毒:病毒抗原可衍生自鼠疫病毒,如牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、经典猪瘟病毒 (CSFV) 或边界病病毒 (BDV)。

[0144] 嗜肝 DNA 病毒:病毒抗原可衍生自嗜肝 DNA 病毒,如乙肝病毒。嗜肝 DNA 病毒抗原选自:表面抗原 (L、M 和 S)、核心抗原 (HBc、HBe)。可商品化购得的 HBV 疫苗包括含表面抗原 S 蛋白的亚单位疫苗。

[0145] 丙型肝炎病毒:病毒抗原可衍生自丙肝病毒 (HCV)。HCV 抗原可选自 E1、E2、E1/E2、NS345 糖蛋白、NS345- 核心多蛋白和 / 或非结构区肽中的一种或多种 (Houghton 等, *Hepatology* (1991) 14 :381)。

[0146] 杆状病毒:病毒抗原可衍生自杆状病毒,如如莱萨病毒 (狂犬病病毒) 和水泡病毒 (VSV)。杆状病毒抗原可选自:糖蛋白 (G)、核蛋白 (NP)、大蛋白 (L)、非结构蛋白 (NS)。可商品化购得的狂犬病病毒疫苗包含在人二倍体细胞或恒河猴胎肺细胞上培养的杀伤病毒。

[0147] 杯状病毒科:病毒抗原可衍生自杯状病毒科,如诺瓦克病毒,和诺瓦克样病毒如夏威夷病毒和雪山病毒。

[0148] 冠状病毒:病毒抗原可衍生自冠状病毒, SARS、人呼吸道冠状病毒、禽传染性支气管炎病毒 (IBV)、小鼠肝炎病毒 (MHV) 和猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)。冠状病毒抗原可选自:突刺 (S)、包膜 (E)、基质 (M)、核衣壳 (N) 和血凝素-脂酶糖蛋白 (HE)。冠状病毒抗原优选衍生自 SARS 病毒。SARS 病毒抗原参见 WO 04/92360 中的描述。

[0149] 逆转录病毒:病毒抗原可衍生自逆转录病毒, 如肿瘤病毒、慢病毒或泡沫病毒。肿瘤病毒抗原可衍生自 HTLV-1、HTLV-2 和 HTLV-5。慢病毒抗原可衍生自 HIV-1 或 HIV-2。逆转录病毒抗原选自:gag、pol、env、tax、tat、rex、rev、nef、vif、vpu 和 vpr。HIV 抗原选自:gag (p24gag 和 p55gag)、env (gp160 和 gp41)、pol、tat、nef、rev、vpu、微小蛋白 (优选 p55gag 和 gp140v 缺失)。HIV 抗原可衍生自以下一种或多种毒株:HIVIIb, HIVSF2, HIVLAV, HIVLAI, HIVMN, HIV-1CM235, HIV-1US4。

[0150] 呼肠孤病毒:病毒抗原可衍生自呼肠孤病毒, 如正呼肠孤病毒、轮状病毒、环状病毒或科罗拉多蜱传热病毒 (Coltivirus)。呼肠孤病毒抗原可选自:结构蛋白  $\lambda$  1、 $\lambda$  2、 $\lambda$  3、 $\mu$  1、 $\mu$  2、 $\sigma$  1、 $\sigma$  2 或  $\sigma$  3 或非结构蛋白  $\sigma$  NS、 $\mu$  NS 或  $\sigma$  1s。优选的呼肠孤病毒抗原可衍生自轮状病毒。轮状病毒抗原选自:VP1、VP2、VP3、VP4 (或切割产物 VP5 和 VP8)、NSP1、VP6、NSP3、NSP2、VP7、NSP4 或 NSP5。优选的轮状病毒抗原包括 VP4 (或切割产物 VP5 和 VP8) 及 VP7。

[0151] 细小病毒:病毒抗原可衍生自细小病毒, 如细小病毒 B19。细小病毒抗原选自:VP-1、VP-2、NS-1 和 NS-2。优选的细小病毒抗原是衣壳蛋白 VP-2。

[0152]  $\delta$ -肝炎病毒 (HDV):病毒抗原可以是衍生的 HDV, 特别是 HDV 的  $\delta$ -抗原 (参见例如美国专利号 5, 378, 814)。

[0153] 戊肝病毒 (HEV):病毒抗原可衍生自 HEV。

[0154] 庚肝病毒 (HGV):病毒抗原可衍生自 HGV。

[0155] 人疱疹病毒:病毒抗原可衍生自人疱疹病毒, 如单纯疱疹病毒 (HSV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、EB 病毒 (EBV)、巨细胞病毒 (CMV)、人疱疹病毒 6 (HHV6)、人疱疹病毒 7 (HHV7) 和人疱疹病毒 8 (HHV8)。人疱疹病毒抗原可选自:立即早期蛋白 ( $\alpha$ )、早期蛋白 ( $\beta$ ) 和晚期蛋白 ( $\gamma$ )。HSV 抗原可衍生自 HSV-1 或 HSV-2 毒株。HSV 抗原选自:糖蛋白 gB、gC、gD 和 gH、融合蛋白 (gB) 或免疫逃避蛋白 (gC、gE 或 gI)。VZV 抗原可选自核心、核衣壳、外被膜或包膜蛋白。可商品化购得 VZV 减毒活疫苗。EBV 抗原可选自早期抗原 (EA) 蛋白、病毒衣壳抗原 (VCA) 和膜抗原 (MA) 的糖蛋白。CMA 抗原可选自衣壳蛋白、包膜糖蛋白 (如 gB 和 gH) 和外被膜蛋白。

[0156] 乳多空病毒:抗原可衍生自乳多空病毒, 如乳头瘤病毒和多瘤病毒。乳头瘤病毒包括 HPV 血清型 1、2、4、5、6、8、11、13、16、18、31、33、35、39、41、42、47、51、57、58、63 和 65。HPV 抗原优选衍生自血清型 6、11、16 或 18。HPV 抗原选自:衣壳蛋白 (L1) 和 (L2) 或其融合蛋白。优选将 HPV 抗原配制成病毒样颗粒 (VLP)。多瘤病毒包括 BK 病毒和 JK 病毒。多瘤病毒抗原选自 VP1、VP2 或 VP3。

[0157] 《疫苗》(Vaccines), 第四版, (Plotkin 和 Orenstein 编, 2004); 《医学微生物》(Medical Microbiology), 第四版, (Murray 等编, 2002); 《病毒学》(Virology), 第三版, (W. K. Joklik 编, 1988); 《基础病毒学》(Fundamental Virology), 第二版, (B. N. Fields 和 D. M. Knipe 编, 1991) 也描述其它抗原、组合物、方法和微生物, 本发明的组合物涵盖了这些

抗原。

[0158] C. 真菌抗原

[0159] 可用于本发明的真菌抗原是以下一种或多种真菌产生的抗原。

[0160] 真菌抗原可衍生自皮肤真菌,包括:絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*)、头癣小孢子菌 (*Microsporum audouini*)、犬小孢子菌、扭曲小孢子菌 (*Microsporum distortum*)、马小孢子菌 (*Microsporum equinum*)、石膏样小孢子菌、矮小孢子菌 (*Microsporum nanum*)、同心发癣菌 (*Trichophyton concentricum*)、马发癣菌、鸡发癣菌 (*Trichophyton gallinae*)、石膏样发癣菌 (*Trichophyton gypseum*)、麦格发癣菌 (*Trichophyton megnini*)、须发癣菌、昆克努发癣菌 (*Trichophyton quinckeanum*)、红色发癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、舍恩莱发癣菌 (*Trichophyton schoenleinii*)、断发癣菌 (*Trichophyton tonsurans*)、疣状发癣菌 (*Trichophyton verrucosum*)、疣状发癣菌 *album* 变种 (*var. album*)、*discoides* 变种 (*var. discoides*)、*ochraceum* 变种 (*var. ochraceum*)、堇色发癣菌 (*Trichophyton violaceum*) 和 / 或蜜块状发癣菌 (*Trichophyton faviforme*)。

[0161] 真菌病原体可衍生自:烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、聚多曲霉 (*Aspergillus sydowi*)、黄麴菌 (*Aspergillus flavus*)、灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*)、头状芽生裂殖酵母 (*Blastoschizomyces capitatus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、烯醇酶假丝酵母 (*Candida enolase*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、克鲁斯念珠菌 (*Candida krusei*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、类星形念珠菌 (*Candida stellatoidea*)、克鲁斯念珠菌、(*Candida parakrusei*)、葡萄牙念珠菌 (*Candida lusitanae*)、假热带念珠 (*Candida pseudotropicalis*)、吉利蒙德念珠菌 (*Candida guilliermondii*)、卡里翁分支孢子菌 (*Cladosporium carrionii*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatidis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、棒地霉 (*Geotrichum clavatum*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、巴西芽生菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*)、腐霉菌 (*Pythium insidiosum*)、瓶形酵母 (*Pityrosporum ovale*)、酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*)、布拉第酵母菌 (*Saccharomyces boulardii*)、粟酒裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*)、尖端赛多孢子菌 (*Scedosporium apiospermum*)、申克(氏)孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、白色毛孢子菌 (*Trichosporon beigeli*)、鼠弓形体 (*Toxoplasma gondii*)、马尼弗(氏)青霉菌 (*Penicillium marneffei*)、鳞斑霉属 (*Malassezia* spp.)、产色芽生菌属 (*Fonsecaea* spp.)、万吉拉菌属 (*Wangiella* spp.)、孢子丝菌属 (*Sporothrix* spp.)、担子菌团属 (*Basidiobolus* spp.)、耳霉属 (*Conidiobolus* spp.)、根霉菌属 (*Rhizopus* spp.)、毛霉属 (*Mucor* spp.)、犁头霉属 (*Absidia* spp.)、被孢霉属 (*Mortierella* spp.)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella* spp.)、瓶霉属 (*Saksenaea* spp.)、链格孢属 (*Alternaria* spp.)、弯孢霉属 (*Curvularia* spp.)、长蠕孢属 (*Helminthosporium* spp.)、镰孢菌属 (*Fusarium* spp.)、曲霉菌属 (*Aspergillus* spp.)、青霉菌属 (*Penicillium* spp.)、褐腐病菌属 (*Monolinia* spp.)、丝核菌属 (*Rhizoctonia* spp.)、拟青霉属 (*Paecilomyces* spp.)、皮司霉属 (*Pithomyces* spp.) 和分支孢子菌属 (*Cladosporium* spp.)。

[0162] 制备真菌抗原的方法是本领域熟知的(参见美国专利号6,333,164)。在一优选方法中,提取溶解组分,将其与真菌细胞的不可溶组分分开,其中基本上除去或至少部分除去了细胞壁,该方法的特征在于包括以下步骤:获得活的真菌细胞;获得基本上除去或至少部分除去细胞壁的真菌细胞;使基本上除去或至少部分除去细胞壁的真菌细胞破裂;获得不可溶组分;和提取溶解的组分并将其与不可溶组分分开。

#### [0163] D. STD 抗原

[0164] 本发明的组合物可包含衍生自性传播疾病(STD)的一种或多种抗原。这种抗原可供预防或治疗STD,如衣原体、生殖器疱疹、肝炎(如丙肝)、生殖器疣、淋病、梅毒和/或软下疳(参见WO 00/15255)。抗原可衍生自一种或多种病毒或细菌性STD。用于本发明的病毒STD抗原可衍生自,例如,HIV、单纯疱疹病毒(HSV-1和HSV-2)、人乳头瘤病毒(HPV)和肝炎(HCV)病毒。用于本发明的细菌STD抗原可衍生自,例如,淋病奈瑟球菌、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、砂眼衣原体、苍白密螺旋体、杜克雷嗜血杆菌、大肠杆菌和无乳链球菌。上文描述了这些病原体产生的特定抗原的例子。

#### [0165] E. 呼吸性抗原

[0166] 本发明的组合物可包含一种或多种衍生自引起呼吸道疾病的病原体的抗原。例如,呼吸道抗原可衍生自呼吸道病毒,如正粘病毒(流感)、肺病毒(RSV)、副粘病毒(PIV)、麻疹病毒(麻疹)、披膜病毒(风疹)、VZV和冠状病毒(SARS)。呼吸道抗原可衍生自引起呼吸道疾病的细菌,如肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、百日咳博德特菌、结核分支杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、炭疽杆菌和粘膜炎莫拉菌。上文描述了这些病原体产生的特定抗原的例子。

#### [0167] F. 儿科疫苗抗原

[0168] 本发明的组合物可包含适合用于儿科对象的一种或多种抗原。儿科对象一般年龄小于约3岁,或小于约2岁,或小于约1岁。儿科抗原可在6个月、1年、2年或3年的时间中多次给予。儿科抗原可衍生自靶向儿科群体的病毒和/或儿科群体易受感染的病毒。儿科病毒抗原包括衍生自以下一种或多种病毒的抗原:正粘病毒(流感)、肺病毒(RSV)、副粘病毒(PIV和腮腺炎)、麻疹病毒(麻疹)、披膜病毒(风疹)、肠病毒(脊髓灰质炎)、HBV、冠状病毒(SARS)和水痘-带状疱疹病毒(VZV)、EB病毒(EBV)。儿科细菌抗原衍生自以下一种或多种细菌的抗原:肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟球菌、酿脓链球菌(A群链球菌)、粘膜炎莫拉菌、百日咳博德特菌、金黄色葡萄球菌、破伤风梭菌(破伤风)、白喉棒状杆菌(白喉)、流感嗜血杆菌B(Hib)、铜绿假单胞菌、无乳链球菌(B群链球菌)和大肠杆菌。上文描述了这些病原体产生的特定抗原的例子。

#### [0169] G. 适合用于老年人和免疫力低下个体的抗原

[0170] 本发明的组合物可包含适合用于老年人和免疫力低下个体的一种或多种抗原。所述个体可能需要更经常接种疫苗,用较高剂量或含佐剂的制剂以增强对靶抗原的免疫反应。用于老年人和免疫力低下个体的抗原包括衍生自以下一种或多种病原体的抗原:脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌(A群链球菌)、粘膜炎莫拉菌、百日咳博德特菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、破伤风梭菌(破伤风)、白喉棒状杆菌(白喉)、流感嗜血杆菌B(Hib)、铜绿假单胞菌、嗜肺军团病杆菌、无乳链球菌(B群链球菌)、粪肠球菌、幽门螺杆菌、肺炎衣原体、正粘病毒(流感)、肺病毒(RSV)、副粘病毒(PIV和腮腺炎)、麻疹病毒(麻

疹)、披膜病毒(风疹)、肠病毒(脊髓灰质炎)、HBV、冠状病毒(SARS)、水痘-带状疱疹病毒(VZV)、EB病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)。上文描述了这些病原体产生的特定抗原的例子。

[0171] H. 适合用于青少年疫苗的抗原

[0172] 本发明的组合物可包含合用于青少年对象的一种或多种抗原。青少年可能需要以前给予的儿科抗原的加强免疫。上文描述了适合用于青少年的儿科抗原。此外,青少年可能需要接受衍生自STD病原体的抗原以在开始性活动前确保具有保护性或治疗性免疫力。上文描述了适合用于青少年的STD抗原。

[0173] I. 抗原制剂

[0174] 本发明的其它方面,提供了吸附抗原微粒的生产方法。该方法包括:(a)将含有以下成分的混合物分散来提供乳液:(i)水,(ii)洗涤剂,(iii)有机溶剂和(iv)生物可降解的聚合物,所述聚合物选自:聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酐和聚氰基丙烯酸酯。与有机溶剂相比,混合物中存在的所述聚合物浓度通常约1%-约30%,而根据洗涤剂-聚合物的重量比,混合物中存在的洗涤剂通常约为0.00001:1-约0.1:1(更常见是约0.0001:1-约0.1:1,约0.001:1-约0.1:1,或约0.005:1-约0.1:1);(b)除去乳液中的有机溶剂;和(c)将抗原吸附到微粒表面。在一些实施方式中,与有机溶剂相比,所述生物可降解聚合物的存在浓度是约3%-约10%。

[0175] 可以用可灭菌、无毒和生物可降解的材料制备本文所用的微粒。这些材料包括但不限于:聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酐、PACA和聚氰基丙烯酸酯。本发明所用的微粒优选源自聚( $\alpha$ -羟酸),特别是聚(丙交酯) (“PLA”)或D,L丙交酯和乙交酯或乙醇酸的共聚物,例如聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯) (“PLG”或“PLGA”)或D,L-丙交酯和己内酯的共聚物。微粒可源自分子量不同的任何聚合起始材料,以共聚物,例如PLG为例,各种丙交酯:乙交酯的比例(其选择在很大程度上是个选择问题)部分取决于共同给予的大分子。下文将更详细地讨论这些参数。

[0176] 其它抗原还包括外膜囊泡(OMV)制品。

[0177] 其它配制方法和抗原(特别是肿瘤抗原)参见美国专利序列号09/581,772。

[0178] J. 抗原参考文献

[0179] 以下参考文献包含可与本发明组合物联合使用的抗原

[0180] 1 国际专利申请 W099/24578

[0181] 2 国际专利申请 W099/36544.

[0182] 3 国际专利申请 W099/57280.

[0183] 4 国际专利申请 W000/22430.

[0184] 5 Tettelin 等 (2000) Science 287 :1809-1815.

[0185] 6 国际专利申请 W096/29412.

[0186] 7 Pizza 等 (2000) Science 287 :1816-1820.

[0187] 8 PCT WO 01/52885.

[0188] 9 Bjune 等 (1991) Lancet 338 (8775).

[0189] 10 Fuskasawa 等 (1999) Vaccine 17 :2951-2958.

[0190] 11 Rosenqist 等 (1998) Dev. Biol. Strand 92 :323-333.

- [0191] 12Constantino 等 (1992)Vaccine 10 :691-698.
- [0192] 13Constantino 等 (1999)Vaccine 17 :1251-1263.
- [0193] 14Watson(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :331-332.
- [0194] 15Rubin(2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-285, v.
- [0195] 16Jedrzejewski(2001)Microbiol Mol Biol Rev 65 :187-207.
- [0196] 172001年7月3日递交的国际专利申请,要求GB-0016363.4;W002/02606;PCTIB/01/00166的优先权
- [0197] 18Kalman 等 (1999)Nature Genetics 21 :385-389.
- [0198] 19Read 等 (2000)Nucleic Acids Res 28 :1397-406.
- [0199] 20Shirai 等 (2000)J. Infect. Dis 181(增刊3):S524-S527.
- [0200] 21 国际专利申请 W099/27105.
- [0201] 22 国际专利申请 W000/27994.
- [0202] 23 国际专利申请 W000/37494.
- [0203] 24 国际专利申请 W099/28475.
- [0204] 25Bell(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :1187-1188.
- [0205] 26Iwarson(1995)APMIS 103 :321-326.
- [0206] 27Gerlich 等 (1990)Vaccine 8 增刊 :S63-68 & 79-80.
- [0207] 28Hsu 等 (1999)Clin Liver Dis 3 :901-915.
- [0208] 29Gastofsson 等 (1996)N. Engl. J. Med. 334- :349-355.
- [0209] 30Rappuoli 等 (1991)TIBTECH 9 :232-238.
- [0210] 31Vaccines(1988) 编. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [0211] 32Del Giudice 等 (1998)Molecular Aspects of Medicine 19 :1-70.
- [0212] 33 国际专利申请 W093/018150.
- [0213] 34 国际专利申请 W099/53310.
- [0214] 35 国际专利申请 W098/04702.
- [0215] 36Ross 等 (2001)Vaccine 19 :135-142.
- [0216] 37Sutter 等 (2000)Pediatr Clin North Am 47 :287-308.
- [0217] 38Zimmerman 和 Spann(1999)Am Fam Physician 59 :113-118, 125-126.
- [0218] 39Dreensen(1997)Vaccine 15Suppl "S2-6.
- [0219] 40MMWR Morb Mortal Wkly rep 1998年1月16 :47(1) :12,9.
- [0220] 41McMichael(2000)Vaccine19 增刊 1 :S101-107.
- [0221] 42Schuchat(1999)Lancet 353(9146) :51-6.
- [0222] 43 英国专利申请 0026333.5,0028727.6&0105640.7.
- [0223] 44Dale(1999)Infect Disclin North Am 13 :227-43, viii.
- [0224] 45Ferretti 等 (2001)PNAS USA 98 :4658-4663.
- [0225] 46Kuroda 等 (2001)Lancet 357(9264) :1225-1240 ;see also pages1218-1219.
- [0226] 47Ramsay 等 (2001)Lancet 357(9251) :195-196.
- [0227] 48Lindberg(1999)Vaccine 17 Suppl 2 :S28-36.
- [0228] 49Buttery 和 Moxon(2000)J R Coil Physicians Long 34 :163-168.

- [0229] 50Ahmad 和 Chapnick(1999) *Infect Dis Clin North Am* 13 :113-133, vii.
- [0230] 51Goldblatt(1998) *J. Med. Microbiol.* 47 :663-567.
- [0231] 52 欧洲专利 0 477 508.
- [0232] 53 美国专利号 5, 306, 492.
- [0233] 54 国际专利申请 W098/42721.
- [0234] 5555Conjugate Vaccines( 偶联物疫苗 ) (Cruse 等编) ISBN 3805549326, 特卷 10 : 48-114.
- [0235] 5656Hermanson(1996) *Bioconjugate Techniques*( 生物偶联技术 ) ISBN : 012323368 和 012342335X.
- [0236] 57 欧洲专利申请 0372501.
- [0237] 58 欧洲专利申请 0378881.
- [0238] 59 欧洲专利申请 0427347.
- [0239] 60 国际专利申请 W093/17712.
- [0240] 61 国际专利申请 W098/58668.
- [0241] 62 欧洲专利申请 0471177.
- [0242] 63 国际专利申请 W000/56360.
- [0243] 64 国际专利申请 W000/67161.
- [0244] 以上引用的所有专利、专利申请和杂志论文的内容通过引用全文纳入本文。
- [0245] 当采用糖或碳水化合物抗原时, 优选将其与载体蛋白偶联以增强免疫原性。参见 Ramsay 等 (2001) *Lancet* 357 (9251) :195-196 ;Lindberg(1999) *Vaccine* 17 增刊 2 :S28-36 ; Buttery 和 Moxon(2000) *J R Coll Physicians Lond* 34 :163-168 ;Ahmad 和 Chapnick(1999) *Infect Dis Clin North Am* 13 :113-133, vii ;Goldblatt(1998) *J. Med. Microbiol.* 47 : 563-567 ;欧洲专利 0 477 508 ;美国专利 5, 306, 492 ;W098/42721 ;Conjugate Vaccines( 偶联物疫苗 ) (Cruse 等编) ISBN 3805549326, 具体是 10 :48-114 ;Hermanson(1996) *Bioconjugate Techniques*( 生物偶联技术 ) ISBN :0123423368 或 012342335X。优选的载体蛋白是细菌毒素或类毒素, 如白喉或破伤风类毒素。特别优选 CRM197 白喉类毒素。
- [0246] 其它载体多肽包括: 脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 (EP-A-0372501)、合成肽 (EP-A-0378881 和 EP-A 0427347)、热激蛋白 (W0 93/17712 和 W0 94/03208)、百日咳蛋白 (W0 98/58668 和 EP A 0471177)、流感嗜血杆菌蛋白 D(W000/56360)、细胞因子 (W0 91/01146)、淋巴因子、激素、生长因子、艰难梭菌毒素 A 或 B(W0 00/61761)、铁摄取蛋白 (W0 01/72337) 等等。当混合物包含血清群 A 和 C 的荚膜糖时, 优选 MenA 糖 : MenC 糖的比例 (w/w) 大于 1( 如 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 10 : 1 或更高)。可将不同糖与相同或不同类型的载体蛋白偶联。需要时可采用任何适合的偶联反应, 和任何适合的接头。
- [0247] 如需要可脱毒有毒性的蛋白抗原, 如用化学和 / 或遗传方法脱毒百日咳毒素。
- [0248] 药学上可接受的运载体
- [0249] 本发明的组合物除了上述组分外, 通常包含一种或多种“药学上可接受的运载体”。包含的这些运载体本身不会诱导产生对接受此组合物个体有害的抗体。合适的运载体通常是大的、代谢缓慢的大分子, 如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集物 ( 如油滴或脂质体)。这类运载体是本领域技术人员熟知的。所述组

合物也可包含稀释剂,如水、盐水、甘油等。此外,可存在辅助剂,如湿润或乳化剂、pH 缓冲剂等。可从 Gennaro (2000) “Remington :The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药物科学与实践)”第 20 版 ISBN :0683306472 一书中获得关于药学上可接受组分的全面论述。

[0250] 免疫调节剂

[0251] 佐剂

[0252] 本发明的疫苗可与其它免疫调节剂联合给予。具体说,该组合物通常包含佐剂。本发明可用的佐剂包括但不限于以下的一种或多种:

[0253] A. 含矿物质的组合物

[0254] 适合用作本发明佐剂的含矿物质组分包括矿物盐,如铝盐和钙盐。本发明包括矿物盐,如氢氧化物(如羟基氧化物)、磷酸盐(如羟基磷酸盐,正磷酸盐)、硫酸盐等(例如参见 Powell 和 Newman 主编的“疫苗设计 (Vaccine Design…)”,第 8 和 9 章,ISBN :030644867X 普莱纳姆出版社 (Plenum.)) 或不同矿物质化合物的混合物(如磷酸盐与氢氧化物佐剂的混合物,任选磷酸盐过量),这些化合物可采取任何合适的形式(如凝胶、晶体、无定形等),这些盐优选(具有)吸附性。也可将含矿物质的组合物配制成金属盐颗粒 (WO 00/23105)。

[0255] 本发明疫苗中可包含铝盐,  $Al^{3+}$  的剂量在 0.2-1.0mg/剂之间。

[0256] 在一实施方式中,本发明所用的铝盐佐剂是明矾(硫酸钾铝  $AlK(SO_4)_2$ ),或者,例如通过在磷酸缓冲液中混合抗原与铝盐,再用碱如氢氧化铵或氢氧化钠滴定和沉淀原位形成的明矾衍生物。

[0257] 本发明疫苗制剂可用的另一种铝佐剂是氢氧化铝 ( $Al(OH)_3$ ) 或结晶碱式氢氧化铝 ( $AlOOH$ ),这是一种极佳吸附剂,表面积约  $500m^2/g$ 。或者,可用含有磷酸基团替代了氢氧化铝佐剂中的一些或全部羟基的磷酸铝佐剂 ( $AlPO_4$ ) 或羟基磷酸铝。本文提供的优选磷酸铝佐剂是无定形的并可溶于酸性、碱性和中性介质。

[0258] 在另一实施方式中,本发明的佐剂包含磷酸铝和氢氧化铝。在一更具体的实施方式中,此佐剂的磷酸铝含量高于氢氧化铝,例如以重量计,磷酸铝与氢氧化铝之比为 2 : 1、3 ; 1、4 : 1、5 ; 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1 或高于 9 : 1。更具体说,该疫苗所含的铝盐为:每疫苗剂量 0.4-1.0mg、或每疫苗剂量 0.4-0.8mg、或每疫苗剂量 0.5-0.7mg 或每疫苗剂量约 0.6mg。

[0259] 一般通过优化分子间的静电吸引使抗原在所需 pH 时携带与佐剂相反的电荷,从而能选择优选的铝佐剂或多种铝佐剂,例如磷酸铝与氢氧化铝之比。例如,pH 7.4 时磷酸铝佐剂 ( $i_{ep} = 4$ ) 吸附溶菌酶,但不吸附白蛋白。如果白蛋白是靶标,则应选择氢氧化铝佐剂 ( $i_{ep} 11.4$ )。或者,用磷酸预处理氢氧化铝可降低其等电点,使其成为碱性更高的抗原的优选佐剂。

[0260] B. 油-乳剂

[0261] 适合用作本发明佐剂的油-乳剂包括角鲨烯-水乳剂,如 MF59 (5%角鲨烯、0.5%吐温™ 80 和 0.5%司盘 85,用微流化器制成亚微米颗粒)。参见 W090/14837。也参见 Podda, Vaccine (2001) 19 :2673-2680 ;Frey 等, Vaccine (2003) 21 :4234-4237。MF59 已用作 FLUAD™ 流感病毒三价亚单位疫苗中的佐剂。

[0262] 本发明组合物中所用的特别优选佐剂是亚微米水包油乳剂。本文所用的优选亚

微米水包油乳剂是任选含有不同含量的 MTP-PE 的角鲨烯 / 水乳剂, 例如含 4-5% w/v 角鲨烯、0.25-1.0% w/v 吐温 80™ (聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯) 和 / 或 0.25-1.0% 司盘 85™ (失水山梨醇三油酸酯) 和任选的 N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (MTP-PE) 的亚微米水包油乳剂, 例如称为“MF59”的亚微米水包油乳剂 (国际公布号 W090/14837; 美国专利号 6,299,884 和 6,451,325; 和 Ott 等, “MF59- 人用疫苗的一种安全而强效佐剂的设计与评估” (MF59--Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines), 刊于《疫苗设计: 亚单位和佐剂方法》(Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach) (Powell, M. F. 和 Newman, M. J. 编), 普莱纳姆出版社 (Plenum Press), 纽约, 1995, 第 277-296 页)。MF59 含有 4-5% w/v 角鲨烯 (如 4.3%)、0.25-0.5% w/v 吐温™80 和 0.5% w/v 司盘 85™, 并任选含有各种含量的 MTP-PE, 用微流化仪, 例如 110Y 型微流化仪 (微射流公司 (Microfluidics), 牛顿市, 马萨诸塞州) 配制成亚微米颗粒。例如, MTP-PE 的含量可以是约 0-500 μg/剂, 更优选 0-250 μg/剂, 最优选 0-100 μg/剂。本文所用的术语“MF59-0”指不含 MTP-PE 的以上亚微米水包油乳剂, 而术语“MF59-MTP”表示含有 MTP-PE 的制剂。例如, “MF59-100”含有 100 μg MTP-PE/剂, 等等。MF69 是本文所用的另一种亚微米水包油乳剂, 其含有 4.3% w/v 角鲨烯、0.25% w/v 吐温™80 和 0.75% w/v 司盘 85™ 和任选的 MTP-PE。还有另一种亚微米水包油乳剂是 MF75, 也称为 SAF, 其含有 10% 角鲨烯、0.4% 吐温™80、5% 普朗尼克-嵌段聚合物 L121 和 thr-MDP, 也微流化成亚微米乳剂。MF75-MTP 表示含有 MTP 的 MF75 制剂, 例如 100-400 μg MTP-PE/剂。

[0263] 国际公布号 W090/14837; 美国专利号 6,299,884 和美国专利 6,451,325 详细描述了用于组合物中的亚微米水包油乳剂、其制备方法和免疫刺激剂, 例如胞壁酰肽。

[0264] 弗氏完全 (CFA) 和不完全佐剂 (IFA) 也可用作本发明的佐剂。

[0265] C. 皂苷制剂

[0266] 皂苷制剂也适用作本发明佐剂。皂苷是在许多植物种类的树皮、叶、茎、根、甚至花中发现的固醇糖苷和三萜系糖苷的异质混合物 (heterologous group)。皂树 (*Quillaja saponaria* Molina) 树皮中分离的皂苷是广泛研究的佐剂。皂苷也可商品化购自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜 (*sarsapilla*))、锥花丝石竹 (*Gypsophilla paniculata*) (婚纱花 (*brides veil*)) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) (皂根 (*soap root*))。皂苷佐剂制剂包括纯化的制剂, 例如 QS21, 以及脂质制剂, 例如 ISCOM。

[0267] 已利用高效薄层色谱 (HP-LC) 和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 纯化皂苷组合物。已经鉴定了用这些技术专门纯化的部分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。皂苷优选 QS21。美国专利号 5,057,540 披露了 QS21 的制备方法。皂苷制剂也可含有固醇, 例如胆固醇 (参见 W096/33739)。

[0268] 可联用皂苷和胆固醇来形成称为免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒。ISCOM 一般还含有磷脂, 例如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷可用在 ISCOM 中。ISCOM 优选含有 Qui1A、QHA 和 QHC 中的一种或多种。EP0109942、W096/11711 和 W096/33739 进一步描述了 ISCOM。ISCOM 任选不含其它洗涤剂。参见 W000/07621。

[0269] 开发皂苷佐剂的综述可参见 Barr 等, *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32: 247-271。也可参见 Sjolander 等, *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32: 321-338。

[0270] D. 病毒体和病毒样颗粒 (VLP)

[0271] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 也适用作本发明的佐剂。这些结构通常含有一种或多种任选与磷脂混合或用磷脂配制的病毒蛋白质。它们通常无致病性、不能复制,通常不含有任何天然病毒基因组。可重组产生或从完整病毒分离病毒蛋白。适用于病毒体或 VLP 中的这些病毒蛋白包括源自以下的蛋白质:流感病毒(例如 HA 或 NA)、乙肝病毒(例如核心或衣壳蛋白)、戊肝病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺瓦克病毒、人乳头瘤病毒、HIV、RNA-噬菌体、Q $\beta$ -噬菌体(例如外壳蛋白)、GA-噬菌体、fr-噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty(例如逆转录转座子 Ty 蛋白 p1)。W003/024480、W003/024481;Niikura 等,(2002), *Virology* 293:273-280;Lenz 等,(2001), *J. Immunol* 166(9):5246-5355;Pinto 等,(2003), *J. Infect. Dis.* 188:327-338;和 Gerber 等,(2001), *J. Virol.* 75(10):4752-4760 进一步讨论了 VLP。例如,Gluck 等,(2002), *Vaccine* 20:B10-B16 进一步讨论了病毒体。鼻内三价 INFLEXAL™ 产品(Mischler 和 Metcalfe,(2002) *Vaccine* 20,增刊 5:B17-B23) 和 INFLUVAC PLUS™ 产品中使用免疫增强型重建流感病毒体(IRIV) 作为亚单位抗原递送系统。

[0272] E. 细菌或微生物衍生物

[0273] 适合用于本发明的佐剂包括细菌和微生物衍生物,如:

[0274] (1) 肠细菌脂多糖 (LPS) 的无毒衍生物

[0275] 这种衍生物包括单磷酸基脂质 A (MPL) 和 3-O-脱酰基 MPL (3dMPL)。3dMPL 是含有 4、5 或 6 条酰化链的 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 的混合物。EP 0 689 454 公开了 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 的优选“小颗粒”形式。3dMPL 的这种“小颗粒”足够小从而可经 0.22  $\mu$ m 膜无菌过滤(参见 EP 0 689 454)。其它无毒的 LPS 衍生物包括单磷酸基脂质 A 模拟物,例如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯衍生物,如 RC-529。参见 Johnson 等,(1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2273-2278。

[0276] (2) 脂质 A 衍生物

[0277] 脂质 A 衍生物包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的脂质 A 衍生物,例如 OM-174。OM-174 描述于,例如 Meraldi 等 (2003) *Vaccine* 21:2485-2491;和 Pajak 等 (2003) *Vaccine* 21:836-842。

[0278] (3) 免疫刺激寡核苷酸

[0279] 适合用作本发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含有 CpG 基序(含有通过磷酸键与随后的鸟苷相连的未甲基化胞嘧啶的序列)的核苷酸序列。含有回文或聚(dG) 序列的细菌双链 RNA 或寡核苷酸也显示具有免疫刺激性。

[0280] CpG 可含有核苷酸修饰/类似物,例如硫代磷酸酯修饰并且可以是双链或单链。可任选用类似物,例如 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。可能的类似物取代可参见 Kandimalla 等,(2003), *Nucleic Acids Research.* 31(9):2393-2400;W002/26757 和 W099/62923。Krieg,(2003), *Nat. Med.* 9(7):831-835;McCluskie 等,(2002), *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 32:179-185;W098/40100;美国专利号 6,207,646;美国专利号 6,239,116 和美国专利号 6,429,199 进一步讨论了 CpG 寡核苷酸作为佐剂的作用。

[0281] CpG 序列可涉及 TLR9,例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT。参见 Kandimalla 等 (2003)

Biochemical Society Transactions. 31(部分3):654-658。654-658. CpG 序列, 例如 CpG-A ODN 可特异性诱导 Th1 免疫应答, 或者, 例如 CpG-B ODN 可更特异地诱导 B 细胞应答。Blackwell 等 (2003) J. Immunol. 170(8):4061-4068; Krieg (2002) TRENDS in Immunol. 23(2):64-65; 和 WO 01/95935 讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。CpG 优选是 CpG-A ODN。  
[0282] 优选将 CpG 寡核苷酸构建为 5' 端易于为受体识别。任选将两条 CpG 寡核苷酸序列在它们的 3' 端相连以形成“免疫聚体”(immunomer)。参见, 例如 Kandimalla 等 (2003) BBRC 306:948-953; Kandimalla 等 (2003) Biochemical Society Transactions. 31(部分3):664-658; Bhagat 等 (2003) BBRC 300:853-861; 和 W003/035836。

#### [0283] (4) ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物

[0284] 细菌 ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物可用作本发明的佐剂。蛋白质优选源自大肠杆菌(即, 大肠杆菌热不稳定肠毒素“LT”)、霍乱(弧菌)(“CT”)或百日咳(杆菌)(“PT”)。W095/17211 中描述了将脱毒的 ADP-核糖基化毒素用作粘膜佐剂, W098/42375 中描述了将其用作胃肠道外佐剂。佐剂优选脱毒的 LT 突变体如 LT-K63、LT-R72 和 LTR192G。ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物, 特别是 LT-K63 和 LT-R72 作为佐剂的应用见以下参考文献: Beignon 等, Infection and Immunity (2002) 70(6):3012-3019; Pizza 等, Vaccine (2001) 19:2534-2541; Pizza 等, Int. J. Med. Microbiol (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten 等, Infection and Immunity (2000) 68(9):5306-5313; Ryan 等, Infection and Immunity (1999) 67(12):6270-6280; Partidos 等, Immunol. Lett. (1999) 67(3):209-216; Peppoloni 等, Vaccines (2003) 2(2):285-293 和 Pine 等, (2002) J. Control Release (2002) 85(1-3):263-270。氨基酸取代的数字基准优选以 Domenighini 等, Mol. Microbiol (1995) 15(6):1165-1167 所述的 ADP-核糖基化毒素的 A 和 B 亚基排列对比为基础。

#### [0285] F. 生物粘合剂和粘膜粘合剂

[0286] 生物粘合剂 (bioadhesive) 和粘膜粘合剂 (mucoadhesive) 也可用作本发明的佐剂。合适的生物粘合剂包括酯化的透明质酸微球 (Singh 等, (2001) J. Cont. Release. 70:267-276), 或者粘膜粘合剂, 例如聚丙烯酸、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。壳多糖及其衍生物也可用作本发明的佐剂。参见 W099/27960。

#### [0287] G. 微粒

[0288] 微粒也可用作本发明的佐剂。可从生物可降解和无毒的材料(例如, 聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己酸内酯等), 优选用聚(丙交酯-共-乙交酯)形成微粒(即, 直径约 100nm 到 150  $\mu$ m, 优选约 200nm 到约 30  $\mu$ m, 最优选约 500nm 到约 10  $\mu$ m 的颗粒), 任选将这些微粒处理成带负电的表面(例如, 用 SDS) 或带正电的表面(例如, 用阳离子洗涤剂, 如 CTAB)。

#### [0289] H. 脂质体

[0290] 适合用作本发明佐剂的脂质体制剂例子描述于美国专利 6,090,406; 美国专利 5,916,588 和 EP 0 626 169。

#### [0291] I. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0292] 适用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯(参见, 例如 W099/52549)。W099/52549。这种制剂还包括聚氧乙烯去水山梨糖醇酯表面活性剂和辛苯糖醇

(W001/21207) 以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种其它非离子表面活性剂如辛苯糖醇 (W0 01/21152) 的混合物。

[0293] 优选的聚氧乙烯醚选自:聚氧乙烯-9-月桂醚(月桂醇聚醚9)、聚氧乙烯-9-硬脂酰基(stearyl)醚、聚氧乙烯-8-硬脂酰基醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

[0294] J. 聚磷腈(PCPP)

[0295] PCPP 制剂描述于,例如 Andrianov 等,“Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions(通过凝聚聚磷腈水溶液制备水凝胶微球)”, Biomaterials(1998)19(1-3):109-115 和 Payne 等,“Protein Release from Polyphosphazene Matrices(聚磷腈基质的蛋白质释放)”, Adv. Drug. Delivery Review(1998)31(3):185-196。

[0296] K. 胞壁酰肽

[0297] 适合用作本发明佐剂的胞壁酰肽的例子包括 N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰(normuramyl)-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺(去甲-MDP)和 N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(MTP-PE)。

[0298] L. 咪唑并喹啉化合物

[0299] 适合用作本发明佐剂的咪唑并喹啉化合物的例子包括咪喹莫特(Imiquimod)及其类似物,其描述参见 Stanley, Clin Exp Dermatol(2002)27(7):571-577; Jones, Curr Opin Investig Drugs(2003)4(2):214-218 和美国专利 4,689,338、5,389,640、5,268,376、4,929,624、5,266,575、5,352,784、5,494,916、5,482,936、5,346,905、5,395,937、5,238,944 和 5,525,612。

[0300] M. 缩氨基硫脲化合物

[0301] 所有适合用作本发明佐剂的缩氨基硫脲化合物的例子以及配制、制备和筛选这种化合物的方法包括 W0 04/60308 所述的。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核的细胞产生细胞因子,例如 TNF- $\alpha$  中特别有效。

[0302] N. 色胺酮化合物

[0303] 所有适合用作本发明佐剂的色胺酮化合物的例子以及配制、制备和筛选这种化合物的方法包括 W0 04/64759 所述的。色胺酮化合物在刺激人外周血单核的细胞产生细胞因子,例如 TNF- $\alpha$  中特别有效。

[0304] 本发明还包括以上鉴定和一种或多种佐剂的组合。例如,以下佐剂组合物可用于本发明:

[0305] (1) 皂苷和水包油乳剂(W099/11241);

[0306] (2) 皂苷(例如 QS21)+无毒的 LPS 衍生物(例如 3dMPL)(参见 W094/00153);

[0307] (3) 皂苷(例如 QS21)+无毒的 LPS 衍生物(例如 3dMPL)+胆固醇;

[0308] (4) 皂苷(例如 QS21)+3dMPL+IL-12(任选+固醇)(W098/57659);

[0309] (5) 联用 3dMPL 与例如 QS21 和 / 或水包油乳剂混合物(参见欧洲专利申请 0 835 318; 0 735 898 和 0 761 231);

[0310] (6) SAF, 含 10%角鲨烷、0.4%吐温 80、5%普流罗尼嵌段聚合物 L121 和 thr-MDP,

微流化形成亚微米乳剂或涡旋形成较大粒径的乳剂。

[0311] (7)RIBI™佐剂系统(RAS)，(Ribi免疫化学公司(Ribi Immunochem))，其含有2%角鲨烯、0.2%吐温80和一种或多种由单磷酸酰脂质A(MPL)、海藻糖二分枝菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)，优选MPL+CWS(Detox™)组成的细菌细胞壁组分；和

[0312] (8)一种或多种无机盐(例如铝盐)+无毒性LPS衍生物(例如3dMPL)。

[0313] (9)一种或多种无机盐(例如铝盐)+免疫调节性寡核苷酸(例如包含CpG基序的核苷酸序列)。

[0314] 0. 人免疫调节剂

[0315] 适合用作本发明佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子，如白介素(如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、干扰素(如干扰素- $\gamma$ )、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0316] 可注射的流感疫苗采用的优选佐剂是铝盐和MF59。粘膜递送疫苗采用的优选佐剂是细菌毒素和生物粘合剂。

[0317] 以上引用的所有专利、专利申请和杂志论文的内容通过引用全文纳入本文。

[0318] 治疗方法

[0319] 本发明提供的上述组合物可用于治疗。本发明提供的上述组合物可诱导或增强对酿脓链球菌的免疫反应。本发明提供用上述组合物诱导或增强对酿脓链球菌的免疫反应的方法。免疫反应优选为保护性，包括抗体和/或细胞介导免疫力(包括全身和粘膜免疫力)。免疫反应包括增强反应。

[0320] 青少年和儿童，包括学步儿童和婴儿可接受预防用疫苗，而治疗疫苗通常给予青少年和成人。儿童疫苗也可给予成人，例如评估其安全性、剂量、免疫原性等。

[0321] 可按照本发明预防或治疗酿脓链球菌引起的疾病，包括但不限于：咽炎(如链球菌扁桃体炎)、猩红热、小脓疱疹、丹毒、蜂窝组织炎、败血症、中毒性休克综合征、坏死性筋膜炎和后遗症，如风湿热和急性肾小球肾炎。该组合物对其它链球菌，如GBS也有效。

[0322] 检测免疫反应效果的试验

[0323] 一种评估治疗性治疗效果的方法涉及给予本发明组合物后监测GSA感染。一种评估预防性治疗效果的方法涉及在给予本发明组合物后监测对该组合物中突变型SLO蛋白的免疫反应。

[0324] 另一种评估本发明免疫原性组合物中组分蛋白的免疫原性的方法是重组表达突变型SLO蛋白并通过免疫印迹筛检患者的血清或粘膜分泌物。该蛋白与患者血清之间发生阳性反应表明该患者已对所述蛋白产生了免疫反应，即所述蛋白为免疫原。也可用此法鉴定免疫优势蛋白和/或抗原表位。

[0325] 另一种核查治疗性治疗效果的方法涉及给予本发明组合物后监测GSA感染。一种核查预防性治疗效果的方法涉及给予本发明组合物后全身性(如监测IgG1和IgG2a的产生水平)和粘膜性(如监测IgA的产生水平)监测抗SLO的免疫反应。血清特异性抗体反应通常在免疫后但攻击前检测，而粘膜特异性抗体反应在免疫后和攻击后检测。

[0326] 可在给予宿主，如人前用体外和体内动物模型评价本发明疫苗组合物。特别有用的小鼠模型包括先腹膜内免疫小鼠，然后腹膜内攻击或经鼻攻击的那些。

[0327] 也可在体内确定本发明免疫原性组合物的功效，方法是用免疫原性组合物免疫动

物模型（如豚鼠或小鼠）并确定 GAS 攻击后获得的保护水平。

[0328] 体内效力模型包括但不限于：(i) 采用人 GAS 血清型的小鼠感染模型；(ii) 采用小鼠适应 GAS 菌株，如在小鼠中特别有毒性的 M23 菌株的小鼠患病模型；(iii) 采用人 GAS 分离株的灵长动物模型。

[0329] 免疫反应可以是 TH1 免疫反应和 TH2 免疫反应之一或两者。免疫反应可能是改善的或增强的或改变的免疫反应。免疫反应可以是全身和粘膜免疫反应之一或二者。优选的免疫反应是增强的全身和 / 或粘膜反应。

[0330] 提高的全身和 / 或粘膜免疫表现为提高的 TH1 和 / 或 TH2 免疫反应。增强的免疫反应优选包括 IgG1 和 / 或 IgG2a 和 / 或 IgA 产生增多。

[0331] 粘膜免疫反应优选是 TH2 免疫反应。粘膜免疫反应优选包括 IgA 产生增多。

[0332] 活化的 TH2 细胞提高抗体产量，因而在应对胞外感染时有价值。活化的 TH2 细胞可分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 中的一种或多种。TH2 免疫反应可导致产生 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞，用于将来的保护作用。

[0333] TH2 免疫反应可包括与 TH2 免疫反应相关的一种或多种细胞因子（例如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10）增加，或者 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞产量增加中的一种或多种现象。增强的 Th2 免疫反应优选包括 IgG1 产生增加。

[0334] TH1 免疫反应可包括 CTL 中的一种或多种增加，与 TH1 免疫反应相关的细胞因子（例如 IL-2、IFN  $\gamma$  和 TNF  $\beta$ ）中一种或多种的增加，活化巨噬细胞的增加，NK 活性增加，或 IgG2a 产量增加。增强的 TH1 免疫反应优选包括 IgG2a 产量的增加。

[0335] 本发明的免疫原性组合物，具体说，含本发明一种或多种突变型 SLO 蛋白的免疫原性组合物可单独使用或与其它 GAS 抗原联用，任选与能引发 Th1 和 / 或 Th2 反应的免疫调节剂联用。

[0336] 本发明还包括含有一种或多种免疫调节剂，如矿物盐（如铝盐）和含 CpG 基序的寡核苷酸的免疫原性组合物。最优选，该免疫原性组合物同时包含铝盐和含 CpG 基序的寡核苷酸。或者，该免疫原性组合物包含 ADP 核糖基化毒素（如脱毒的 ADP 核糖基化毒素）和含 CpG 基序的寡核苷酸。优选的一种或多种免疫调节剂包括佐剂。佐剂可选用 TH1 佐剂和 TH2 佐剂中的一种或多种。

[0337] 本发明的组合物优选能引发细胞介导免疫反应和体液免疫反应二者，以有效应对 GAS 感染。这种免疫应答宜诱导产生长效（如中和性）抗体和在接触一种或多种 GAS 抗原后能快速反应的细胞介导免疫力。

[0338] 在一特别优选的实施方式中，该免疫原性组合物包含能引发中和抗体反应的一种或多种突变型 SLO 蛋白，和能引发细胞介导免疫反应的一种或多种突变型 SLO 蛋白。以此方法，中和抗体能防止或抑制最初的 GAS 感染，而细胞介导免疫反应能引发增强的 Th1 细胞反应以防止 GAS 感染进一步扩散。

[0339] 通常将本发明的组合物直接给予患者。可通过各种不同途径单独或作为组合物的一部分给予本发明组合物。某些途径对某些组合物可能更有利益，因为可产生更有效的免疫反应，优选 CMI 反应，或诱导副作用可能性较低，或较容易给药。

[0340] 递送方法包括：胃肠外注射（如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或组织间隙注射）和经直肠、口服（如药片、喷雾）、经阴道、局部、经皮（如参见 W099/27961）、透皮（如参见

W002/074244 和 W002/064162)、鼻内(如参见 W003/028760)、眼部、耳部和肺部或其它粘膜途径给予。

[0341] 例如,本发明的组合物可通过全身途径或粘膜途径或经皮途径给予,或可直接给予特定组织。本文所用的术语“全身给予”包括但不限于任何胃肠外途径给药。具体说,胃肠道外给药包括但不限于:皮下、腹膜内、静脉内、动脉内、肌肉内或胸骨内注射,静脉内、动脉内或肾透析灌注技术。优选的全身性、胃肠外给药是肌肉内注射。本文所用的术语“粘膜给予”包括但不限于:口服、鼻内、阴道内、直肠内、气管内、肠和眼部给药。

[0342] 治疗剂量可以是单剂量方案或多剂量方案。初次免疫方案和/或加强免疫方案可采用多剂量。在多剂量方案中,通过相同或不同途径给予不同剂量,例如胃肠外初免和粘膜加强,粘膜初免和胃肠外加强,等等。

[0343] 可将本发明组合物制成各种剂型。例如,可将组合物制成可注射的液体溶液或悬浮液。还可以制备适合在注射前用液体运载体配制成溶液或悬浮液的固体剂型(如冻干的组合物)。可制备口服给药的组合物,如片剂或胶囊、喷雾剂,或糖浆(任选加入调味剂)。可制备肺部给药的组合物,如吸入剂,采用细粉或喷雾剂。可将组合物制备成栓剂或阴道栓。可制备鼻部、耳部或眼部给药的组合物,例如滴剂。组合物可以是试剂盒形式,如此设计使得在给予患者之前可重建成合并的组合物。这种试剂盒装有液体形式的一种或多种突变型 SLO 和其它抗原及一种或多种冻干抗原。

[0344] 用作疫苗的免疫原性组合物包含免疫有效量的突变型 SLO 或其它抗原(或编码该抗原的核酸分子),以及需要的其它组分,如抗生素。“免疫有效量”是以单剂量或一系列剂量的一部分给予个体时能增强可测定的免疫反应或防止或减少临床症状的用量。

[0345] 本发明的免疫原性组合物可与抗生素治疗方案组合给予。在一实施方式中,给予抗生素然后给予本发明的抗原,或包含本发明的一种或多种突变型 SLO 蛋白的组合物。

[0346] 在另一实施方式中,先给予本发明的突变型 SLO 蛋白然后给予抗生素。适合用于治疗 GAS 感染的抗生素包括但不限于:青霉素或其衍生物,或克林霉素、先锋霉素、糖肽类(如万古霉素)和环丝氨酸。

[0347] 然而,该组合物中活性药物的含量可以不同,取决于所治疗个体的健康和生理状况、年龄、所治疗个体的物种分类(如非人灵长动物,灵长动物等)、个体的免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗制剂、治疗医师对医学状况的评估和其它相关的因素。此用量落在可通过常规试验确定的较广泛范围内。

[0348] 试剂盒

[0349] 本发明还提供装有本发明组合物的一个或多个容器的试剂盒。组合物可以是液体形式或冻干形式,可以是各个抗原。组合物的合适容器包括,例如瓶子,小药瓶,针筒和试管。可用各种材料,包括玻璃或塑料制备容器。容器可配备无菌的入口(例如,容器可以是装有皮下注射针头可刺破塞子的静脉内输液袋或小药瓶)。

[0350] 该试剂盒也可装有包含药学上可接受的缓冲液,如磷酸缓冲盐水、林格液或葡萄糖液的第二容器。也可装有终末用户所用的其它物质,包括其它缓冲液、稀释液、过滤器、针头和针筒。该试剂盒还可装有含另一活性药物,如抗生素的第二或第三容器。

[0351] 该试剂盒也可装有书面的包装插页,说明诱导抗酿脓链球菌免疫力或治疗酿脓链球菌感染的方法。该包装说明书可以是未经批准的草稿插页或可以是经食品药品监督管理局

(FDA) 或其它管理当局批准的包装插页。

[0352] 本文引用的所有专利、专利申请和参考文献专门通过引用纳入本文。以上公开内容已总体上描述了本发明。参考以下具体实施例可获得更全面的理解,提供实施例的目的只是说明而非限制本发明的范围。

[0353] 实施例 1.

[0354] 野生型和突变型 SLO 蛋白的克隆

[0355] 用表 1 所示 SF370 基因组的引物通过 PCR 扩增野生型和突变型 SLO 蛋白的编码基因。

[0356] 用 NheI-XhoI 消化 PCR 产物,再与用相同酶切割的 pet24b+(诺瓦基公司(Novagen))载体连接。用连接反应转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  电感受态细胞。加入 LBPTK 培养基,以 250rpm 振荡在 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时后将细菌铺放到含 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素的 LBPTK 平板上。通过集落 PCR 鉴定阳性菌落。

[0357] 在含 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素的 LBPTK 培养基中培养一夜,从其中制备阳性菌落的质粒,并通过 DNA 测序分析,分析证实了在 T7 聚合酶启动子控制下的预期的插入基因。克隆基因的最终 DNA 序列和蛋白质序列显示在序列表中。参见表 2。

[0358] 表 1.

[0359]

基因	引物
SLO 野生型 无标签	25F NheI, GTGCGTGCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEQ ID NO:35) 25rev = GCATTCGATCCTCGAGCTACTTATAAGTAATCGAACCATATG (SEQ ID NO:36)
SLO P427L 无标签	外部引物: 25F NheI, GTGCGTGCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEQ ID NO:35) 25rev, GCATTCGATCCTCGAGCTACTTATAAGTAATCGAACCATATG (SEQ ID NO:36) 内部引物: PL427_for, GCTACCTTCAGTAGAAAAACCTAGCTTATCCTATTTTCATACACC (SEQ ID NO:37) PL427_rev, GGTGTATGAAATAGGATAAGCTAGGTTTTTCTACTGAAGGTAGC (SEQ ID NO:38)
SLO 野生型 带 His 标签	25F NheI, GTGCGTGCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEQ ID NO:35) 25revhis, GCATTCGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEQ ID NO:39)
SLO W535F 带 His 标签	外部引物: 25F NheI, GTGCGTGCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEQ ID NO:35) 25revhis, GCATTCGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEQ ID NO:39) 内部引物: WF535_for, GAGTGCACTGGCTTAGCTTTTTCGAATGGTGGCGAAAAGTGATC (SEQ ID NO:40) WF535_rev, GATCACTTTTCGCCACCATTTCGAAAGCTAAGCCAGTGCACTC (SEQ ID NO:41)
SLO W535F-D48 2N 带 His 标签	外部引物: 25F NheI, GTGCGTGCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEQ ID NO:35) 25revhis, GCATTCGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEQ ID NO:39) 内部引物: WF535_for, GAGTGCACTGGCTTAGCTTTTTCGAATGGTGGCGAAAAGTGATC (SEQ ID NO:40) WF535_rev, GATCACTTTTCGCCACCATTTCGAAAGCTAAGCCAGTGCACTC (SEQ ID NO:41) and DN482_for, GTTGCTCAATATGAAATCCTTTGGAATGAAATCAATTATGATGACAAAGGAA AAG (SEQ ID NO:42) DN482_rev, CTTTTCCTTTGTCATCATAATTGATTCATTCCAAAGGATTCATATTGAGCA AC (SEQ ID NO:43)
SLO C530G 带 His 标签	外部引物: 25F NheI, GTGCGTGCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEQ ID NO:35) 25revhis, GCATTCGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEQ ID NO:39) 内部引物: CG530_for, CCGTATCATGGCTAGAGAGGGCACTGGCTTAGCTTGGGAATG (SEQ ID NO:44) CG530_rev, CATTCCAAGCTAAGCCAGTGCCCTCTCTAGCCATGATACGG (SEQ ID NO:45)

[0360]

SLO P427L 带 His 标签	外部引物: 25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC</u> (SEQ ID NO:35) 25 revhis, GCATT <u>CGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG</u> (SEQ ID NO:39) 内部引物: PL427_for, GCTACCTTCAGTAGAAAAACCTAGCTTATCCTATTCATACACC (SEQ ID NO:37) PL427_rev, GGTGTATGAAATAGGATAAGCTAGGTTTTTTCTACTGAAGGTAGC (SEQ ID NO:38)
SLO P427L-W53 5F-C535G 无标签	外部引物: 25_F, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAAC</u> (SEQ ID NO:46) 25_stopR, GCGT <u>TCTCGAGTCACTTATAAGTAATCGAACCATATA</u> (SEQ ID NO:47) 内部引物: W-C_for, CCGTATCATGGCTAGAGAGGGCACTGGCTTAGCTTTTGAATG (SEQ ID NO:48) W-C_rev, CATTGAAAGCTAAGCCAGTGCCCTCTCTAGCCATGATACGG (SEQ ID NO:49)
SLO P427L-W53 5F 无标签	外部引物: 25_F, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAAC</u> (SEQ ID NO:46) 25_stopR, GCGT <u>TCTCGAGTCACTTATAAGTAATCGAACCATATA</u> (SEQ ID NO:47) 内部引物: WF535_for, GAGTGCACTGGCTTAGCTTTTGAATGGTGGCGAAAAGTGATC (SEQ ID NO:40) WF535_rev, GATCACTTTTCCACCATTTCGAAAGCTAAGCCAGTGCACTC (SEQ ID NO:41)
SLO P427L-C530 G 无标签	外部引物: 25_F, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAAC</u> (SEQ ID NO:46) 25_stopR, GCGT <u>TCTCGAGTCACTTATAAGTAATCGAACCATATA</u> (SEQ ID NO:47) 内部引物: CG530_for, CCGTATCATGGCTAGAGAGGGCACTGGCTTAGCTTGGGAATG (SEQ ID NO:44) CG530_rev, CATTCCCAAGCTAAGCCAGTGCCCTCTCTAGCCATGATACGG (SEQ ID NO:45)
SLO ΔA248 带 His 标签	外部引物: 25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC</u> (SEQ ID NO:35) 25 revhis, GCATT <u>CGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG</u> (SEQ ID NO:39) 内部引物: 248for, CTGGTGGTAATACGCTTCCTAGAACACAATATACTGAATCAATGG (SEQ ID NO:50) 248rev, CCATTGATTCAGTATATTGTGTTCTAGGAAGCGTATTACCACCAG (SEQ ID NO:51)

[0361] 表 2.

SLO 基因	序列标识符			
	氨基酸		核苷酸	
	无标签	带 His 标签	无标签	带 His 标签
野生型	1-12	13	28	14
P427L	20	15	29	57
C530G	22	16	31	58
W535F	21	18	30	52
$\Delta$ A248	23	17		59
W535F + D482N	24	19		53
P427L + C530G	26	54	33	
P427L + W535F	25	55	32	
P427L + C530G + W535F	27	56	34	

[0363] 用正确的构建物转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 诺瓦基公司 (Novagen) 电感受态细胞。加入 LBPTK 培养基, 以 250rpm 振荡在 37°C 培育 1 小时后将细菌铺放到含 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素的 LBPTK 平板上。BL21 (DE3) pet24b+SLO 野生型无标签细胞在 25°C 生长并用 1mM IPTG 诱导。通过 SDS PAGE 验证克隆表达 (无标签, 图 8A 和 8B ; 带 His 标签, 图 9)。

[0364] 实施例 2.

[0365] 带 His 标签的蛋白质的纯化

[0366] 将大肠杆菌团粒悬浮于裂解缓冲液并室温混合 30-40 分钟。将裂解液 30-40000xg 离心 20-25 分钟, 将上清液加载于用洗涤缓冲液 A 平衡的柱 (Poly-Prep, 含 1ml Ni 活化的螯合琼脂糖速流树脂 (Ni-Activated Chelating Sepharose Fast Flow resin))。加载的树脂用洗涤缓冲液 A 洗涤三次, 用洗涤缓冲液 B 洗涤三次。用洗脱缓冲液将蛋白质洗脱在含 2mM 终浓度 DTT 的离心管中。总洗脱蛋白质用 Bradford 试剂量化, 然后通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (图 8 和 9)。

[0367] 缓冲液

[0368] 裂解缓冲液 :

[0369] 10ml B-PER™ (细菌蛋白质提取试剂 (Bacterial-Protein Extraction Reagent), 皮尔斯公司 (Pierce), 编号 78266)

[0370] MgCl<sub>2</sub> 终浓度 0.1mM

[0371] DNAsi I (西格玛公司 (Sigma), 编号 D-4263) 100 单位

[0372] 溶菌酶 (西格玛公司, 编号 L-7651) 终浓度 1mg/ml

[0373] 洗涤缓冲液 A : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, pH 8, 0

[0374] 洗涤缓冲液 B : 20mM 咪唑, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, pH 8.0

[0375] 洗脱缓冲液 : 250mM 咪唑, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, pH 8.0

[0376] 实施例 3.

[0377] 无标签蛋白的纯化

[0378] 制备裂解物

[0379] 将约 80-110g 细菌培养物团粒悬浮于 200-280ml B-PER™ 试剂 (皮尔斯公司), 加入 6 片 COMPLETE® 蛋白酶抑制剂、10ml 0.2M EDTA pH 7.5 (5mM 终浓度)、10ml 100mg/ml 溶菌酶溶液, 8ml 10000K 单位 /ml DNA 酶 I 溶液和 1ml 50mM MgCl<sub>2</sub> 溶液。将细菌悬浮液振荡 60

分钟直到获得均一悬浮液从而得到细菌裂解液。

[0380] 然后 13000rpm(25400xg) 离心 60 分钟,上清液用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤并用水稀释直到电导率达到 1.8-1.9mS。将 pH 调整为 8.0。通过 Bradford 法确定蛋白质浓度。

[0381] 阴离子交换层析

[0382] 将上述处理得到的裂解液的上清液部分加载于 HP 50/10Q 琼脂糖柱(约 200ml),该柱之前已经用 30mM TRIS,pH 8.0 平衡。收集流出液。收集含 GAS25 蛋白的流分并用 10mM 磷酸钠,pH 6.8 透析。通过 Bradford 法确定蛋白质浓度。

[0383] 缓冲液 A :30mM TRIS, pH 8.0

[0384] 缓冲液 B :30mM TRIS, 1M NaCl, pH 8.0

[0385] 平衡和加载 :0% B

[0386] 梯度 :0-25% B 5CV-25% B 2CV

[0387] 洗涤 :100% B 2CV+3CV

[0388] 流速 :20 毫升 / 分钟

[0389] 流分体积 :14ml

[0390] 羟基磷灰石层析

[0391] 将之前获得的收集物加载到用 10mM 磷酸钠,pH 6.8 平衡过的 CHT20 柱上。收集流出液。

[0392] 缓冲液 A :10M 磷酸钠, pH 6.8

[0393] 缓冲液 B :500M 磷酸钠, pH 6.8

[0394] 洗涤 :8CV

[0395] 洗涤 :30% B 6CV

[0396] 梯度 :30-100% B(10CV)

[0397] 洗涤 :100% B

[0398] 流速 :5 毫升 / 分钟。

[0399] 流分体积 :5ml

[0400] 在还原和非还原条件下将等分流分加载到 12% Criterion 凝胶上。收集含 GAS25 蛋白的流分并通过 Bradford 法确定蛋白质浓度。

[0401] 凝胶过滤层析

[0402] 用 Amicon 滤器浓缩收集物以使体积 < 10ml。将浓缩材料加载到用至少 3-4 柱体积 PBS 平衡的 HiLoad Superdex 20026/60 上。

[0403] 缓冲液 :PBS

[0404] 洗脱 :等度洗脱

[0405] 流速 :2.5 毫升 / 分钟。

[0406] 流分体积 :5ml

[0407] 收集含 GAS25 蛋白的流分并通过 Bradford 法确定蛋白质浓度。还通过 UV 测量估算蛋白质浓度,吸光度 0.1% (= 1g/l) 1.119。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质纯度(图 11)。

[0408] 实施例 4.

[0409] 溶血试验

[0410] 定量溶血试验方案

[0411] 用 PBS+0.5% BSA 在 U 形底 96 孔板中制备毒素的连续稀释液。用 PBS 将 1ml 绵羊血洗涤三次（在 3000x g 离心），并将血细胞悬浮于 5ml PBS。在 50 μl 各毒素稀释液中加入等体积悬浮液并在 37℃ 培育 30 分钟。用 2% 曲通 (Triton) 水溶液得到 100% 溶血，并将 +0.5% BSA 用作阴性对照。平板然后在 1,000x g 离心 5 分钟，并将上清液小心转移到 96 孔平底板中。在 540nm 读取吸光度。

[0412] 比较含有野生型 SLO 和 SLO 突变体 P427L 的大肠杆菌提取物

[0413] 采用 PCR 从 SF370M1 基因组扩增 SLO P427L 编码基因并克隆入能够在大肠杆菌 BL21DE3 中表达带 His 标签的蛋白质的载体 pET21b+。用表达类似量的野生型和突变型链球菌溶血素 O 蛋白的大肠杆菌可溶性提取物（见图 5）进行溶血试验以比较两种抗原的溶胞特性。实验结果示于图 2，该图证明，突变蛋白的毒性比野生型低至少 100 倍。

[0414] 比较纯化的野生型 SLO 和 SLO 突变体 P427L

[0415] 按照带 His 标签的重组蛋白的标准纯化方法纯化 SLO P427L 突变体（图 3）。用不同浓度的纯化野生型和突变型蛋白质重复溶血试验以证实溶胞活性的降低（图 4）。

[0416] 含有带 His 标签的和无标签的野生型 SLO 和 SLO 突变体 P427L 的大肠杆菌提取物的溶血活性

[0417] 我们比较了用不带 His 标签 (BL21DE3, 诺瓦基公司, 编号 71382-pET24) 的野生型重组 SLO(rSLO) 和不带 His 标签 (BL21DE3, 诺瓦基公司, 编号 71382-pET24) 的 P427L 突变 rSLO 转化的大肠杆菌裂解物的溶血活性。用不带插入物的 pET24 转化的大肠杆菌 BL21DE3( 诺瓦基公司, 编号 71382) 用作阴性对照。阳性对照为含 2% 曲通水溶液的低渗溶液。阴性对照为蛋白质稀释缓冲液 (PBS, 含 0.5% BSA, pH 7.4),

[0418] 测量上清液在 540nm 的吸光度 ( $A_{540nm}$ ) 确定溶血作用。以 50% 最大  $A_{540nm}$  的稀释度计算为滴度。

[0419] 结果见表 3、4 和图 6。这些数据证明，在相同条件下，突变体 P427L 的溶血能力比野生型 SLO 低 1000 倍。

[0420] 表 3.

[0421]

大肠杆菌	CFU/ml
阴性对照	$3.9 \times 10^8$
野生型 rSLO( 无标签 )	$1.2 \times 10^9$
P427L rSLO( 无标签 )	$1.03 \times 10^9$

[0422] 表 4.

[0423]

	rSLO 野生型 ( 无标签 )	rSLO P427L 无标签
滴度 (OD = 50% 溶血 )	50,000	48

滴度 Wt/P427L	1042	
-------------	------	--

[0424] 比较野生型 SLO 和各种 SLO 突变体

[0425] 将野生型 SLO 的溶血活性与几种不同 SLO 突变体的溶血活性进行比较。结果示于下面的图 13 和表 5。1 溶血单位 (HU) 定义为获得用 2% 曲通处理血细胞所得最大裂解的 50% 所需的毒素量。

[0426] 表 5.

[0427]

蛋白质	HU/mg	HU/mg-SLO/ 突变体
rSLO WT	22760	1
C530G	620	37
W535F	160	146
W535F-D482N	<< 20	>> 1000
P427L	约 20	约 1000
ala248	<< 20	>> 1000
阴性对照	<< 20	>> 1000

[0428] 由于蛋白质纯度不同,用黑体表示的每毫克突变体的溶血单位是高出预计的;然而,显然的是,(1) 突变体 W535F 的溶血低于突变体 C530G;(2) 突变体 P427L 的溶血比野生型低大约 1000 倍,并比其他两种突变体 W535F 和 C530G 低大约 6-25 倍;和 (3) 突变体  $\Delta$  A248 的溶血显然低于野生型。

[0429] 胆固醇的作用

[0430] 使细胞在 30 °C 生长,并用 1mM IPTG 在 25 °C 诱导,  $OD_{600nm}$  约为 0.4-0.6,之后用 PBS-BSA 0.5% 将大肠杆菌裂解物或含 200mg/ml 胆固醇的大肠杆菌裂解物连续稀释 2-5 倍,测定其溶血活性。50 微升 2% 绵羊红细胞 PBS 溶液用等体积裂解细菌获得的蛋白质制品处理,诱导 3 小时后用裂解缓冲液 (B-PER 溶液 -PIERCE-1mM  $MgCl_2$ 、100K 单位 /ml DNA 酶 (西格玛公司) 和溶菌酶 (西格玛公司) 处理 30-40 分钟。然后将不溶性部分离心 (15 分钟, 21000xg, 4 °C), 并将上清液 (大肠杆菌裂解物) 转移到含终浓度 5mM DTT 的新的离心管中。

[0431] 在该条件下,在稀释因子达到 100 倍之前胆固醇不抑制野生型或突变型 SLO;因此对突变体诱导的裂解没有影响。相反,野生型诱导的裂解大大降低。阴性对照诱导的裂解不受胆固醇影响,说明胆固醇诱导的抑制是特异性的。参见表 6 和图 7。

[0432] 表 6.

[0433]

	rSLO 野生型 (无标签)	rSLO P427L 无标签
滴度 (OD = 50%溶血)	400	40
滴度 Wt/P427L	10	

[0434] 实施例 5.

[0435] 溶血的抑制

[0436] 方案

[0437] 在 U 形底 96 孔板中用 PBS+0.5% BSA 制备野生型或突变型 SLO 蛋白免疫 (不含佐剂或含 Alum 或 MF59™ 作为佐剂) 的小鼠的连续 2 倍稀释血清。仅用 PBS 或仅用佐剂适当免疫的小鼠血清用作阴性对照。加入等体积的用 PBS+0.5% BSA 配制的 50-100ng/ml (3.5-7HU) 毒素溶液,并在搅拌下将平板室温培育 20 分钟 (800rpm)。培育后将 50ml 该溶液转移到新的 96 孔板,加入等体积绵羊红细胞悬液 (用 PBS 洗涤三次) 并在 37℃ 培育 30 分钟。平板然后在 1,000xg 离心 5 分钟,并将上清液小心转移到 96 孔平底平板中,并在 540nm 阅读吸光度。在下述结果中,抑制滴度表示为使曲通诱导的溶血作用降低 50% 的血清稀释度。

[0438] 野生型 SLO 抗血清对 SLO 溶血作用的抑制

[0439] 抗野生型 SLO 抗血清对 SLO 溶血作用的抑制显示于图 14、图 15、图 16 和表 7-9。抗 SLO 血清的滴度介于 1/7,000 和 1/14,000 之间 (算术平均值, 1/12,167 ± 2,714)。阴性对照血清 (弗氏佐剂) 的滴度介于 1/375 和 1/4,000 之间 (算术平均值, 1/1,854 ± 1,384)。

[0440] 表 7 (显示于图 15)。

测试血清的算术平均值-%溶血		
稀释因子/血清	抗 SLO 血清	阴性对照血清
125		9
250		10
500		19
1,000	2	38
2,000	2	69
4,000	2	84
8,000	19	93
16,000	78	97
32,000	99	
64,000	97	
128,000	100	

[0441] 表 8.

[0442] 表 8.

[0443]

抗 SLO 血清 (弗氏佐剂)		阴性对照血清 (弗氏佐剂)	
血清	50%溶血抑制	血清	50%溶血抑制
A	14,000	1	4,000
B	7,000	2	1,500
C	12,000	3	375
D	12,000	4	3,000
E	14,000	5	1,500
F	14,000	6	750

[0444] 表 9 (显示于图 16)

[0445]

ng/ml SLO	%溶血
1.6	4
3.1	3
6.3	6
12.5	30
25	94
50	100
100	100
200	100

[0446] 野生型 SLO、化学去毒的野生型 SLO 和 SLO 突变体的溶血活性的滴定

[0447] 野生型 SLO、化学去毒的野生型 SLO 和 SLO 突变体 (P427L ;P427L+W535F) 的溶血活性的滴定显示于图 17-19 以及表 10。

[0448] 表 10 (显示于图 18)。

[0449]

蛋白质	HU/mg	HU/mg-SLO/ 突变体
SLO 野生型 无标签	728, 307	1
SLO P427L 无标签	711	1, 024
SLO P427L+W535F 无标签	< 22 (刺激 10)	> 33. 000
SLO 野生型 无标签	45, 511	
SLO 野生型 无标签, 去毒	<< 89	>> 511

[0450] 突变型 SLO 蛋白抗血清对 SLO 溶血作用的抑制

[0451] 突变型 SLO 蛋白抗血清对 SLO 溶血作用的抑制显示于图 20-22 以及表 11-13。使用 50ng/ml (3.5HU) 毒素,使 SLO 突变体 W535-P427L 的 SLO 溶血活性降低 50%所需的血清稀释度分别为,使用明矾佐剂为 1/17,860,使用 MF59™ 佐剂为 1/7991。阴性对照(仅佐剂)的滴度为 1/1,000 (Alum) 和 1/125 (MF59™)。

[0452] 表 11(显示于图 20)。

50 ng/ml (3.5 HU) 野生型 SLO	
佐剂	特异性抑制/非特异性抑制
明矾	18
MF™59	64

[0454] 表 12(显示于图 21)

100 ng/ml (37 HU) 野生型 SLO	
佐剂	特异性抑制/非特异性抑制
明矾	>227
MF™59	>117

[0456] 表 13(显示于图 22)

[0457]

ng/ml SLO	%溶血
1.6	3.5
3.1	5.8
6.3	13
12.5	42
25	86
50	100
100	100
200	100

[0458] 都采用明矾佐剂,使野生型和 SLO 突变体 W535-P427L 的 SLO 溶血活性降低 50%所需的血清稀释度的比较显示于图 25。使用 100ng/ml (7HU) 毒素,使 SLO 突变体 W535-P427L 的 SLO 溶血活性降低 50%所需的血清稀释度分别为 1/12000,对比的血清稀释度为 1/8750+/-1500。阴性对照(仅佐剂)的稀释度约为 1/50。

[0459] 实施例 6.

[0460] 体内保护实验

[0461] 给 40 只小鼠腹膜内施用纯化的 SLO P427L 蛋白和弗氏佐剂。然后用 3348M1 GAS

毒株鼻内攻击小鼠。表 14 报道了三次独立实验的数据,显示所有实验都始终获得 100% 保护。

[0462] 表 14. 小鼠的感染存活率

抗原	存活小鼠%		
	实验 1	实验 2	实验 3
GAS25 Pro247Leu	100	100	100
大肠杆菌污染物 (阴性对照)	10	10	10
同源 M1 蛋白 (阳性对照)	100	90	90

[0464] 在第 0、21 和 35 天用 20  $\mu$ g 重组蛋白免疫每组 10-20 只小鼠。阴性对照组的小鼠仅用 GST 或用大肠杆菌污染物免疫,这取决于所用 GAS 重组蛋白的形式。第三次免疫两周后取血样。之前数天用  $10^8$  cfu (50  $\mu$ l) M1 3348GAS 毒株攻击免疫的小鼠。监测小鼠存活情况 10-14 天。检测从不同组获得的免疫血清对完整 SLO 重组蛋白的免疫原性 (蛋白质印迹分析)。结果列于表 15 和表 16。

[0465] 表 15.

[0466]

蛋白质	小鼠数	存活%	阴性对照存活%
GAS25_Pro247Leu His	10	90	30
GAS25_Pro247Leu His	10	100	20
GAS25_Pro247Leu His	10	80	30
GAS25_WT	20	95	15
GAS25_WT	10	100	40

[0467] 表 16.

[0468]

蛋白质	小鼠数	存活%	阴性对照存活%
rSLO WT 带有 his 标签	20	100	45
C530G 带有 his 标签	20	100	45
W535F 带有 his 标签	20	100	45
W535F-D482N 带有 his 标签	20	100	45
P427L 带有 his 标签	20	95	45
$\Delta$ ala248 带有 his 标签	20	100	45

[0469] SLO 突变体 P427L-W535F 对 GAS M1 毒株鼻内攻击的保护

[0470] 用 SLO 突变体 P427L-W535F (有明矾或 MF59 作为佐剂) 腹膜内免疫 30 只小鼠, 并用 GAS M1 毒株鼻内攻击。结果见图 26。用 SLO 突变体 P427L-W535F 和明矾免疫的小鼠对 GAS M1 毒株鼻内攻击的保护作用为 77%, 相比之下阴性对照小鼠 (仅用佐剂免疫) 为 3%。用 SLO 突变体 P427L-W535F 和 MF59 免疫的小鼠对 GAS M1 毒株鼻内攻击的保护作用为 90%, 相比之下阴性对照小鼠 (仅用佐剂免疫) 为 10%。这些保护水平与用野生型 SLO 免疫的小鼠的保护水平相当。

[0471] 实施例 7.

[0472] 方案

[0473] 静脉注射 SLO. 将野生型或突变型 SLO 的 PBS 溶液稀释于 PBS+2mMDTT 溶液, 然后取 100  $\mu$  l 注射入小鼠的尾静脉。观察小鼠 2-3 天。注射野生型 SLO 通常导致在数分钟内死亡。

[0474] 体内致死率抑制实验. 对于免疫血清介导的致死率抑制作用, 将 10  $\mu$  g/ 小鼠野生型 SLO (100  $\mu$  g/ml, PBS 溶液, 2mM DTT) 与抗 SLO 血清或对照血清 (从仅用佐剂免疫的小鼠获得) 室温旋转培育 20 分钟。培育后通过尾静脉静脉内注射将样品接种到小鼠体内。观察小鼠 2-3 天。

[0475] 野生型 SLO 和突变型 SLO P427L-W535F 的结果示于表 17。

[0476] 表 17.

野生型 SLO		P427L-W535F	
$\mu$ g/小鼠	死亡/处理的	$\mu$ g/小鼠	死亡/处理的
		100	0/4
50	4/4	50	0/4
10	8/8	10	0/8
2	0/4		
0.4	0/4		
0.04	0/4		

[0477] 用剂量为 10  $\mu$  g/ 小鼠的野生型 SLO 作为阳性对照, 以仅注射弗氏佐剂的作为阴性对照, 评价急性体内毒性。将 10  $\mu$  g/ 小鼠野生型 SLO 与野生型 SLO 抗血清或与对照血清一起培育并如上所述接种到小鼠体内。结果见表 18。

[0479] 表 18.

野生型 SLO (10 $\mu$ g/小鼠)		
血清	血清稀释度	死亡/处理的
无		8/8
野生型 SLO	1/5	0/4
野生型 SLO	1/10	0/4
野生型 SLO	1/20	4/4
野生型 SLO	1/50	4/4
野生型 SLO	1/100	4/4
阴性对照	1/5	4/4

[0480] 如上所述进行的另一组实验的结果示于表 19 和 20。用 5 或 10  $\mu$  g/ 小鼠野生型

SLO 评价体内急性毒性。具体地说,将 10  $\mu$ g/小鼠野生型 SLO 与从 GAS25P427L-W535F 免疫小鼠获得的血清或仅 PBS(无血清)一起预培育。此外,将 5  $\mu$ g/小鼠野生型 SLO 与从 GAS25 P427L-W535F 免疫小鼠获得的血清或从 PBS+佐剂(明矾)免疫小鼠获得的血清(作为阴性对照血清)一起预培育。

[0482] 这些结果证明,野生型 SLO 的致死剂量被抗-SLO P427L-W535F 血清中和,但相同稀释度的阴性对照血清无此效果。

[0483] 表 19.

野生型 SLO (10 $\mu$ g/小鼠)		
血清	血清稀释度	死亡/处理的
无	---	4/4
抗-SLO P427L-W535F, 明矾佐剂	1/5	0/4

[0485] 表 20.

野生型 SLO (5 $\mu$ g/小鼠)		
血清	血清稀释度	死亡/处理的
抗-SLO P427L-W535F, 明矾佐剂	1/5	0/4
阴性对照(仅明矾)	1/5	4/4

[0487] 实施例 8.

[0488] 用 SLO P427L-W535F 免疫使小鼠能抵抗静脉内注射野生型 SLO

[0489] 用使用明矾作为佐剂的野生型 SLO 或 SLO 突变体 P427L-W535F(用 2mg/ml 氢氧化铝调配 20  $\mu$ g 蛋白)腹膜内免疫 5 周龄小鼠三次(第 0 天、第 21 天和第 35 天)。仅用佐剂免疫的小鼠作为阴性对照。在第 55 天给小鼠静脉内注射不同浓度的用 PBS, 2mM DTT 配制的野生型 SLO 溶液并监测至少 72 小鼠。结果见表 21。

[0490] 表 21.

[0491]

	注射到小鼠尾静脉的野生型无标签 SLO 的剂量			
	2.5 $\mu$ g/小鼠	5 $\mu$ g/小鼠	10 $\mu$ g/小鼠	20 $\mu$ g/小鼠
	存活 (处理小鼠的数量)	存活 (处理小鼠的数量)	存活 (处理小鼠的数量)	存活 (处理小鼠的数量)
佐剂(明矾)	100% (4)	0% (12)	未检测	未检测
野生型 SLO 无标签	未检测	100% (8)	100% (4)	100% (4)
SLO P427L-W535F 无标签	未检测	100% (8)	100% (4)	100% (4)

[0492] 5  $\mu$ g/小鼠的野生型 SLO 对于仅用佐剂免疫的小鼠是致死的;这些小鼠在注射 SLO 后数分钟内死亡。然而,即便 20  $\mu$ g/小鼠的相同的野生型 SLO 制品也不会杀死用野生型 SLO 或用 P427L-W535F SLO 突变体免疫的小鼠。

[0001]

## 序列表

<110> G. 本斯 (Bensi, Giuliano)  
 I. 马格里特 伊 若斯 (Margarit Y Ros, Immaculada)  
 E. 恰洛特 (Chiarot, Emiliano)  
 G. 格兰迪 (Grandi, Guido)  
 M. 斯卡塞利 (Scarselli, Maria)

<120> 链球菌溶血素 O 的突变形式

<130> P052158W0

<140> US 12/339,365  
 <141> 2008-12-19

<150> US 61/016,193  
 <151> 2007-12-21

<150> US 61/088,381  
 <151> 2008-08-13

<160> 59

<170> FastSEQ Windows 版本 4.0

<210> 1  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 1  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala  
 180 185 190  
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly  
 195 200 205  
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn

[0002]

210	215	220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr		
225	230	235
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met		240
	245	250
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys		255
	260	265
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly		270
	275	280
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val		285
	290	300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val		305
	310	315
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro		320
	325	330
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu		335
	340	345
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala		350
	355	360
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu		365
	370	375
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu		380
	385	390
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile		395
	405	410
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser		415
	420	425
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn		430
	435	440
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys		445
	450	455
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu		460
	465	470
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys		475
	485	490
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr		495
	500	505
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg		510
	515	520
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu		525
	530	535
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser		540
	545	550
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys		555
	565	570

<210> 2  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 2  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu

[0003]



Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Met	Ala	Arg
		515					520					525			
Glu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Trp	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys	Val	Ile	Asp	Glu
	530					535					540				
Arg	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Asn	Val	Asn	Ile	Ser	Gly	Ser
545					550					555					560
Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Lys					
				565					570						

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 571

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

&lt;400&gt; 3

Met	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Gly	Leu
1			5						10					15	
Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ala	Glu
			20					25					30		
Ser	Asn	Lys	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu
		35					40						45		
Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Lys	Ala	Gly	Gln
	50					55					60				
Lys	Met	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile	Lys	Leu	Ala	Pro
65					70					75					80
Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu
				85					90					95	
Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	Lys
			100					105						110	
Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Lys	Asn	Gly
		115					120						125		
Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val	Lys	Lys	Ala	Asp
		130					135					140			
Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	Asn	Thr	Thr	Pro
145					150					155					160
Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ala
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn	Lys	Pro	Asp	Ala
			180					185					190		
Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly
		195					200						205		
Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asn
	210					215					220				
Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp	His	Asp	Asn	Tyr
225					230					235					240
Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	Thr	Glu	Ser	Met
				245					250					255	
Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Asn	Ser	Lys
			260					265						270	
Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Gly
		275					280						285		
Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Thr	Val
	290					295					300				
Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	Val
305					310					315					320
Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	Glu	Ala	Pro	Pro

[0005]

325 330 335  
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430  
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Ser Glu Tyr Val Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 4  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 4  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro

[0006]

```

145          150          155          160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
165          170          175
Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
180          185          190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
195          200          205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
210          215          220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
225          230          235          240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
245          250          255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
260          265          270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
275          280          285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
290          295          300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
305          310          315          320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
325          330          335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
340          345          350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
355          360          365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
370          375          380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
385          390          395          400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
405          410          415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
420          425          430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
435          440          445
Arg Ser Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
450          455          460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
465          470          475          480
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
485          490          495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
500          505          510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
515          520          525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
530          535          540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
545          550          555          560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
565          570

```

<210> 5  
<211> 571  
<212> PRT

[0007]

<213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

&lt;400&gt; 5

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1      5      10      15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
 20      25      30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Thr Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
 35      40      45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln
 50      55      60
Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
 65      70      75      80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
 85      90      95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100     105     110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115     120     125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130     135     140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145     150     155     160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Met Thr Tyr Pro Ala
 165     170     175
Ala Leu Gln Leu Ala Asp Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180     185     190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195     200     205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210     215     220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225     230     235     240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245     250     255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260     265     270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275     280     285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290     295     300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
 305     310     315     320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
 325     330     335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
 340     345     350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
 355     360     365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
 370     375     380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
 385     390     395     400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405     410     415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420     425     430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn

```

[0008]

```

          435          440          445
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
   450          455          460
Ile Asn Leu Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
   465          470          475          480
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
          485          490          495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
          500          505          510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
          515          520          525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
          530          535          540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
   545          550          555          560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
          565          570

```

<210> 6

<211> 571

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 6

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
  1          5          10          15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
          20          25          30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
          35          40          45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln
          50          55          60
Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
   65          70          75          80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
          85          90          95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
          100          105          110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
          115          120          125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
          130          135          140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
   145          150          155          160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Met Thr Tyr Pro Ala
          165          170          175
Ala Leu Gln Leu Ala Asp Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
          180          185          190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
          195          200          205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
          210          215          220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
   225          230          235          240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
          245          250          255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys

```

[0009]

Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly  
 260 265 270  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val  
 290 295 300  
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro  
 325 330 335  
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430  
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 7  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 7  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Val Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu

[0010]





370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430  
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 9  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 9  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala  
 180 185 190  
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly

[0013]

```

          195                200                205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
  210                215                220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
  225                230                235
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
          245                250                255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
          260                265                270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
          275                280                285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
  290                295                300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
  305                310                315
Thr Phe Lys Asp Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
          325                330                335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
          340                345                350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
          355                360                365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
  370                375                380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
  385                390                395
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
          405                410                415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
          420                425                430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
          435                440                445
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
          450                455                460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
  465                470                475
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
          485                490                495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
          500                505                510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
          515                520                525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
          530                535                540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
  545                550                555
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
          565                570

```

<210> 10  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 10  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu

[0014]



485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 11

<211> 571

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 11

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala  
 180 185 190  
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly  
 195 200 205  
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn  
 210 215 220  
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met  
 245 250 255  
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys  
 260 265 270  
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val  
 290 295 300  
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val

[0016]

305 310 315 320  
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro  
 325 330 335  
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430  
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Thr Ser Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 12

<211> 571

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 12

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

[0017]

130	Lys Phe Ile Val Ile	135	Glu Arg Lys Lys Lys	140	Asn Ile Asn Thr Thr Pro
145	Val Asp Ile Ser Ile	150	Ile Asp Ser Val Thr	155	Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
		165		170	
Ala Leu Gln Leu Ala	Asn Lys Gly Phe Thr	175	Glu Asn Lys Pro Asp Ala		
		180		185	
Val Val Thr Lys Arg	Asn Pro Gln Lys Ile His	190	Ile Asp Leu Pro Gly		
		195		200	
Met Gly Asp Lys Ala	Thr Val Glu Val Asn Asp	205	Pro Thr Tyr Ala Asn		
		210		215	
Val Ser Thr Ala Ile	Asp Asn Leu Ile Asn Gln	220	Trp His Asp Asn Tyr		
225		230		235	
Ser Gly Gly Asn Thr	Leu Pro Ala Arg Thr	240	Gln Tyr Thr Glu Ser Met		
		245		250	
Val Tyr Ser Lys Ser	Gln Ile Glu Ala Leu Asn	255	Val Asn Ser Lys		
		260		265	
Ile Leu Asp Gly Thr	Leu Gly Ile Asp Phe Lys	270	Ser Ile Ser Lys Gly		
		275		280	
Glu Lys Lys Val Met	Ile Ala Ala Tyr Lys Gln	285	Ile Phe Tyr Thr Val		
		290		295	
Ser Ala Asn Leu Pro	Asn Asn Pro Ala Asp	300	Val Phe Ala Lys Ser Val		
305		310		315	
Thr Phe Lys Glu Leu	Gln Arg Lys Gly Val Ser	320	Asn Glu Ala Pro Pro		
		325		330	
Leu Phe Val Ser Asn	Val Ala Tyr Gly Arg Thr	335	Val Phe Val Lys Leu		
		340		345	
Glu Thr Ser Ser Lys	Ser Asn Asp Val Glu Ala	350	Ala Phe Ser Ala Ala		
		355		360	
Leu Lys Gly Thr Asp	Val Lys Thr Asn Gly Lys	365	Tyr Ser Asp Ile Leu		
		370		375	
Glu Asn Ser Ser Phe	Thr Ala Val Val Leu Gly	380	Gly Gly Asp Ala Ala Glu		
385		390		395	
His Asn Lys Val Val	Thr Lys Asp Phe Asp Val	400	Ile Arg Asn Val Ile		
		405		410	
Lys Asp Asn Ala Thr	Phe Ser Arg Lys Asn Pro	415	Ala Tyr Pro Ile Ser		
		420		425	
Tyr Thr Ser Val Phe	Leu Lys Asn Asn Lys Ile	430	Ala Gly Val Asn Asn		
		435		440	
Arg Thr Glu Tyr Val	Glu Thr Thr Ser Thr Glu	445	Tyr Thr Ser Gly Lys		
		450		455	
Ile Asn Leu Ser His	Gln Gly Ala Tyr Val Ala	460	Gln Tyr Glu Ile Leu		
465		470		475	
Trp Asp Glu Ile Asn	Tyr Asp Asp Lys Gly Lys	480	Glu Val Ile Thr Lys		
		485		490	
Arg Arg Trp Asp Asn	Asn Trp Tyr Ser Lys Thr	495	Ser Pro Phe Ser Thr		
		500		505	
Val Ile Pro Leu Gly	Ala Asn Ser Arg Asn Ile	510	Arg Ile Met Ala Arg		
		515		520	
Glu Cys Thr Gly Leu	Ala Trp Glu Trp Trp Arg	525	Lys Val Ile Asp Glu		
		530		535	
Arg Asp Val Lys Leu	Ser Lys Glu Ile Asn Val	540	Asn Ile Ser Gly Ser		
545		550		555	
Thr Leu Ser Pro Tyr	Gly Ser Ile Thr Tyr Lys	560			
		565		570	

&lt;210&gt; 13

[0018]

<211> 551  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)  
 <400> 13  
 Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315 320  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr

[0019]



<213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

&lt;400&gt; 15

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315 320  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln

[0021]

435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu  
 530 535 540  
 Glu His His His His His His  
 545 550

<210> 16

<211> 551

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 16

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285

[0022]

Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315 320  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln  
 435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu  
 530 535 540  
 Glu His His His His His His  
 545 550

<210> 17

<211> 550

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 17

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

[0023]

130	135	140
Thr Tyr Pro Ala Ala	Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn	
145	150	155
Lys Pro Asp Ala Val	Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile	160
	165	170
Asp Leu Pro Gly Met Gly	Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro	175
	180	185
Thr Tyr Ala Asn Val Ser	Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp	190
	195	200
His Asp Asn Tyr Ser Gly	Gly Asn Thr Leu Pro Arg Thr Gln Tyr Thr	205
	210	215
Glu Ser Met Val Tyr Ser	Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val	220
225	230	235
Asn Ser Lys Ile Leu Asp	Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile	240
	245	250
Ser Lys Gly Glu Lys Lys	Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe	255
	260	265
Tyr Thr Val Ser Ala Asn	Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp	270
	275	280
Lys Ser Val Thr Phe Lys	Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu	285
	290	295
Ala Pro Pro Leu Phe Val	Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe	300
305	310	315
Val Lys Leu Glu Thr Ser	Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe	320
	325	330
Ser Ala Ala Leu Lys Gly	Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser	335
	340	345
Asp Ile Leu Glu Asn Ser	Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp	350
	355	360
Ala Ala Glu His Asn Lys	Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg	365
	370	375
Asn Val Ile Lys Asp Asn	Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr	380
385	390	395
Pro Ile Ser Tyr Thr Ser	Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly	400
	405	410
Val Asn Asn Arg Thr Glu	Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr	415
	420	425
Ser Gly Lys Ile Asn Leu	Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr	430
	435	440
Glu Ile Leu Trp Asp Glu	Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val	445
	450	455
Ile Thr Lys Arg Arg Trp	Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro	460
465	470	475
Phe Ser Thr Val Ile Pro	Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile	480
	485	490
Met Ala Arg Glu Cys Thr	Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val	495
	500	505
Ile Asp Glu Arg Asp Val	Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile	510
	515	520
Ser Gly Ser Thr Leu Ser	Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu Glu	525
	530	535
His His His His His	His	540
545	550	

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 551

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

[0024]

```

<400> 18
Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1          5          10          15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20          25          30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35          40          45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50          55          60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65          70          75          80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85          90          95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
 100          105          110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
 115          120          125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130          135          140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
 145          150          155          160
Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165          170          175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180          185          190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195          200          205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210          215          220
Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225          230          235          240
Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245          250          255
Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260          265          270
Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275          280          285
Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290          295          300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305          310          315          320
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325          330          335
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
 340          345          350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 355          360          365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370          375          380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala
 385          390          395          400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
 405          410          415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
 420          425          430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
 435          440          445

```

[0025]

Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu  
 530 535 540  
 Glu His His His His His His  
 545 550

<210> 19

<211> 551

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 19

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn

[0026]

```

290          295          300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
305          310          315
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
          325          330
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
          340          345
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
          355          360          365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
          370          375          380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala
385          390          395
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
          405          410
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
          420          425          430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
          435          440          445
Tyr Glu Ile Leu Trp Asn Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
          450          455          460
Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
465          470          475
Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
          485          490          495
Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys
          500          505          510
Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
          515          520          525
Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
          530          535          540
Glu His His His His His His
545          550

```

- <210> 20
- <211> 543
- <212> PRT
- <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

```

<400> 20
Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
1          5          10
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
          20          25          30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
          35          40          45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
          50          55          60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
65          70          75          80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
          85          90          95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
          100          105          110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
          115          120          125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
130          135          140

```

[0027]

Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315 320  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln  
 435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 530 535 540

<210> 21

<211> 571

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 21

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu

[0028]



465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 22  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 22  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala  
 180 185 190  
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly  
 195 200 205  
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn  
 210 215 220  
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met  
 245 250 255  
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys  
 260 265 270  
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val  
 290 295 300

[0030]

Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro  
 325 330 335  
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430  
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 23  
 <211> 570  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 23  
 Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp

[0031]

130	135	140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro		
145	150	155
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala		
	165	170
Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala		
	180	185
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly		
	195	200
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn		
	210	215
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr		
225	230	235
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met Val		
	245	250
Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys Ile		
	260	265
Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly Glu		
	275	280
Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val Ser		
	290	295
Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val Thr		
305	310	315
Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro Leu		
	325	330
Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu Glu		
	340	345
Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala Leu		
	355	360
Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu Glu		
	370	375
Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu His		
385	390	395
Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile Lys		
	405	410
Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser Tyr		
	420	425
Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn Arg		
	435	440
Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys Ile		
	450	455
Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu Trp		
465	470	475
Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys Arg		
	485	490
Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr Val		
	500	505
Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg Glu		
	515	520
Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu Arg		
	530	535
Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser Thr		
545	550	555
Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys		
	565	570

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 571

[0032]

&lt;212&gt; PRT

<213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

&lt;400&gt; 24

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu  
 35 40 45  
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys  
 100 105 110  
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly  
 115 120 125  
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp  
 130 135 140  
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala  
 180 185 190  
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly  
 195 200 205  
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn  
 210 215 220  
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met  
 245 250 255  
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys  
 260 265 270  
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val  
 290 295 300  
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro  
 325 330 335  
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu  
 385 390 395 400  
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile  
 405 410 415  
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser  
 420 425 430

[0033]

Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys  
 450 455 460  
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Asn Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys  
 485 490 495  
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr  
 500 505 510  
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg  
 515 520 525  
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 565 570

<210> 25

<211> 543

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 25

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile

[0034]

260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala  
 385 390 395  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln  
 435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 530 535 540

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 543

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

&lt;400&gt; 26

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

[0035]

Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315 320  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln  
 435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys  
 530 535 540

<210> 27

<211> 543

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

[0036]

```

<400> 27
Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1      5      10
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
      20      25      30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
      35      40      45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
      50      55      60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
      65      70      75      80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
      85      90      95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
      100      105
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
      115      120      125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
      130      135      140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
      145      150      155      160
Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
      165      170      175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
      180      185      190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
      195      200      205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
      210      215      220
Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
      225      230      235      240
Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
      245      250      255
Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
      260      265      270
Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
      275      280      285
Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
      290      295      300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
      305      310      315      320
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
      325      330      335
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
      340      345      350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
      355      360      365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
      370      375      380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
      385      390      395      400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
      405      410      415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
      420      425      430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
      435      440      445
Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu

```

[0037]

450						455						460					
Val	Ile	Thr	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Asn	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ser		
465					470					475					480		
Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg		
				485					490					495			
Ile	Met	Ala	Arg	Glu	Gly	Thr	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys		
			500					505					510				
Val	Ile	Asp	Glu	Arg	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Asn	Val	Asn		
		515				520						525					
Ile	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Lys			
530						535					540						

<210> 28  
 <211> 1632  
 <212> DNA  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 28  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtagc aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaagtc agaagacaaa aaaagagcgc aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300  
 gaaaccattg aaaatittgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggt tgaggccaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggttaatac gcttctgcc 660  
 agaacacaaat aactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720  
 gtaaatagca aaatcctaga tggtagctta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaagg 780  
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatTTTTT acaccgtatc agcaaacctt 840  
 cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900  
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960  
 tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtcagct 1020  
 ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080  
 tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140  
 tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200  
 tatcctatct catacaccag tgtttctct aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260  
 agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtacctta gtggaaaaat taacctgtct 1320  
 catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380  
 aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440  
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgat catggctaga 1500  
 gagtgcactg gcttagcttg ggaatggtgg cgaaaagiga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560  
 ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620  
 acttataagt ag 1632

<210> 29  
 <211> 1632  
 <212> DNA  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 29  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtagc aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaagtc agaagacaaa aaaagagcgc aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300

[0038]



<210> 31  
 <211> 1632  
 <212> DNA  
 <213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

<400> 31  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggg 300  
 gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttcctgcc 660  
 agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720  
 gttaatagca aaatcttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780  
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatTTTTT acaccgtatc agcaaacctt 840  
 cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900  
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960  
 tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020  
 ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatatctg atatcttaga aaatagctca 1080  
 tttacagctg tcgtttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140  
 tttgtgta ttagaacgt tatcaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200  
 tatcctatct catacaccag tgttttctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260  
 agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtactacta gtggaaaaat taacctgtct 1320  
 catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380  
 aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440  
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500  
 gagtgcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560  
 ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620  
 acttataagt ag 1632

<210> 32  
 <211> 1632  
 <212> DNA  
 <213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

<400> 32  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggg 300  
 gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttcctgcc 660  
 agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720  
 gttaatagca aaatcttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780  
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatTTTTT acaccgtatc agcaaacctt 840  
 cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900  
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960

[0040]

tttgtcaaac tagaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020  
 ctaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatatcttg atatcttaga aaatagctca 1080  
 ttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140  
 ttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200  
 tatectattt catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260  
 agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320  
 catcaaggcg cgtatgttc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380  
 aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440  
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500  
 gagggcactg gcttagcttg ggaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560  
 ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620  
 acttataagt ag 1632

- <210> 33
- <211> 1632
- <212> DNA
- <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 33  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300  
 gaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaagggtt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggg tgagggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatac gcttctgcc 660  
 agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgagc agctctaaat 720  
 gttaatagca aaatcttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780  
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatTTTTT acaccgtatc agcaaacctt 840  
 cctaataatc ctgcggtatg gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900  
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactgtt 960  
 ttgtcaaac tagaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020  
 ctaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatatcttg atatcttaga aaatagctca 1080  
 ttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140  
 ttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200  
 tatectattt catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260  
 agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320  
 catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380  
 aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440  
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500  
 gagggcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560  
 ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620  
 acttataagt ga 1632

- <210> 34
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 34  
 gtgctgcta gcaatcgaa caacaaaaac actgc 35

- <210> 35
- <211> 42

[0041]

<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 35	42
gcattcgatc ctcgagctac ttataagtaa tcgaaccata tg	
<210> 36	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 36	45
gctaccttca gtagaaaaa cctagcttat cctatttcat acacc	
<210> 37	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 37	45
ggtgatgaa ataggataag ctaggttttt tctactgaag gtagc	
<210> 38	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 38	41
gcattcgatc ctcgagctta taagtaatcg aaccatattg g	
<210> 39	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 39	42
gagtgcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tc	
<210> 40	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 40	42
gatcactttt cgccaccatt cgaaagctaa gccagtgcac tc	
<210> 41	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 41	55
gttgctcaat atgaaatcct ttggaatgaa atcaattatg atgacaaagg aaaag	
<210> 42	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	

[0042]

<400> 42 cttttccttt gcatcataa ttgatttcat tccaaagat tcatattga gcaac	55
<210> 43 <211> 42 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 43 ccgtatcatg gctagagagg gcactggctt agcttgggaa tg	42
<210> 44 <211> 42 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 44 cattccaag ctaagccagt gccctctcta gccatgatac gg	42
<210> 45 <211> 30 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 45 gtgctgcta gcaatcgaa caaacaaaac	30
<210> 46 <211> 34 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 46 ggtctcgag tcacttataa gtaatcgaac cata	34
<210> 47 <211> 42 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 47 ccgtatcatg gctagagagg gcactggctt agctttcgaa tg	42
<210> 48 <211> 42 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 48 cattcgaaag ctaagccagt gccctctcta gccatgatac gg	42
<210> 49 <211> 45 <212> DNA <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)	
<400> 49	

[0043]

ctggtggtaa tacgcttctt agaacacaat atactgaatc aatgg	45
<210> 50	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 ( <i>S. pyogenes</i> )	
<400> 50	
ccattgattc agtatattgt gttctaggaa gcgtattacc accag	45
<210> 51	
<211> 1656	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 ( <i>S. pyogenes</i> )	
<400> 51	
atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60	
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120	
atgcttaact ctaacgatat gattaagcct gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180	
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240	
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300	
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360	
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420	
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480	
aaaccagacg cggtagtac caagegaaac ccacaaaaaa tccatattga ttaccaggt 540	
atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600	
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatac gcttcctgcc 660	
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaagc agctctaaat 720	
gttaatagca aatccttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780	
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaattttt acaccgtatc agcaaaccct 840	
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagaggt gcaacgaaaa 900	
ggtgtcagca atgaagctcc gccactctt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960	
tttgtaaac tagaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020	
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080	
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagc 1140	
tttgatgta ttagaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaaccagct 1200	
tatctatctt catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260	
agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtactacta gtggaaaaat taacctgtct 1320	
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380	
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440	
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500	
gagtgcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560	
ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620	
acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga	1656
<210> 52	
<211> 1656	
<212> DNA	
<213> 酿脓链球菌 ( <i>S. pyogenes</i> )	
<400> 52	
atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60	
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120	
atgcttaact ctaacgatat gattaagcct gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180	
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240	
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300	
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360	
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420	

[0044]

```

gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagegaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatac gcttcctgcc 660
agaacacaat aactgaatec aatggtatat tctaagtcac agattgaagc agctcctaat 720
gtaatatagc aatcttaga  tggacttta  ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatTTTTT acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgCGGatgt gTTTgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactgtt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaaccagct 1200
tatcctatTT catacaccag tgttttctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacctta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttgga atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaagaa aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cgttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagtgactcg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656
    
```

<210> 53  
 <211> 551  
 <212> PRT  
 <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 53  
 Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile  
 115 120 125  
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg  
 130 135 140  
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile  
 165 170 175  
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp  
 195 200 205  
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn  
 225 230 235 240

[0045]

Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe  
 275 280 285  
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val  
 305 310 315 320  
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr  
 340 345 350  
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln  
 435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu  
 530 535 540  
 Glu His His His His His His  
 545 550

<210> 54

<211> 551

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 54

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu  
 20 25 30  
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu  
 65 70 75 80

[0046]

Ile	Asn	Asp	Lys	Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu
				85					90					95	
Ala	Lys	Asn	Gly	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val
			100					105					110		
Lys	Lys	Ala	Asp	Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile
		115				120					125				
Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg
	130					135				140					
Thr	Tyr	Pro	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn
					150					155					160
Lys	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile
				165					170					175	
Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro
			180					185					190		
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp
		195					200					205			
His	Asp	Asn	Tyr	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr
	210					215					220				
Thr	Glu	Ser	Met	Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn
	225				230					235					240
Val	Asn	Ser	Lys	Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser
				245					250					255	
Ile	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile
			260					265						270	
Phe	Tyr	Thr	Val	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe
		275					280					285			
Asp	Lys	Ser	Val	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn
	290					295					300				
Glu	Ala	Pro	Pro	Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val
	305				310					315					320
Phe	Val	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala
				325					330					335	
Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr
			340					345					350		
Ser	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly
		355					360					365			
Asp	Ala	Ala	Glu	His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile
	370					375					380				
Arg	Asn	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Leu	Ala
	385				390					395					400
Tyr	Pro	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala
			405						410					415	
Gly	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr
				420					425					430	
Thr	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln
		435					440					445			
Tyr	Glu	Ile	Leu	Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu
	450					455					460				
Val	Ile	Thr	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Asn	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ser
					470					475					480
Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg
				485						490					495
Ile	Met	Ala	Arg	Glu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys
				500				505					510		
Val	Ile	Asp	Glu	Arg	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Asn	Val	Asn
		515					520					525			
Ile	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Lys	Leu
		530					535					540			

[0047]

Glu His His His His His His  
545 550

<210> 55  
<211> 551  
<212> PRT  
<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

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

[0048]

Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr  
 420 425 430  
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln  
 435 440 445  
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu  
 450 455 460  
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg  
 485 490 495  
 Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys  
 500 505 510  
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn  
 515 520 525  
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu  
 530 535 540  
 Glu His His His His His His  
 545 550

- <210> 56
- <211> 1656
- <212> DNA
- <213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 56  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatattatc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300  
 gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga ttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggt tgaggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatac gttcctgcc 660  
 agaacacaaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720  
 gttaatagca aaatcttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780  
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840  
 cctaataatc ctgaggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900  
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960  
 tttgtcaaac tagaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020  
 ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatattctg atatcttaga aatagctca 1080  
 tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140  
 tttgatgta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200  
 tatcctatct catacaccag tgttttctt aaaaataata aaatgctggg tgtcaataac 1260  
 agaactgaat acgttgaac aacatctacc gactacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320  
 catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380  
 aaaggaaaag aagtattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440  
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catgctaga 1500  
 gactgcactg gcttagcttg ggaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560  
 ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620  
 acttataagc tcgaccacca ccaccaccac cactga 1656

[0049]

<210> 57  
 <211> 1656  
 <212> DNA  
 <213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

<400> 57  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300  
 gaaaccattg aaaatittgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgtaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttcctgca 660  
 agaacacaat aactgaatc aatggatata tctaagtcac agattgaagc agctctaaat 720  
 gtaaatagca aatcttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780  
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaattttt acaccgtatc agcaaacctt 840  
 cctaataatc ctgaggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900  
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960  
 tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020  
 ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatattctg atatcttaga aaatagctca 1080  
 tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140  
 tttgtgta ttgaaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacccagct 1200  
 tatectatit catacaccag tgttttctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260  
 agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtactacta gtggaaaaat taacctgtct 1320  
 catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380  
 aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440  
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500  
 gagggcactg gcttagcttg ggaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560  
 ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620  
 acttataage tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656

<210> 58  
 <211> 1653  
 <212> DNA  
 <213> 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)

<400> 58  
 atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60  
 caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120  
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180  
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240  
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300  
 gaaaccattg aaaatittgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360  
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420  
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480  
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540  
 atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600  
 attgataatc ttgtaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttcctaga 660  
 acacaatata ctgaatcaat ggtatattct aagtcacaga ttgaagcagc tctaaatggt 720  
 aatagcaaaa tcttagatgg tacttttagc attgatttca agtcgattc aaaagggtgaa 780  
 aagaagggtg tgattgcagc atacaagcaa attttttaca cgtatcagc aaaccttctt 840  
 aataatctg cggatgtgtt tgataaatcg gtgaccttta aagagttgca acgaaaaggt 900  
 gtcagcaatg aagctccgcc actctttgtg agtaacgtag cctatggctg aactgttttt 960

[0050]

```

gtcaactag aaacaagttc taaaagtaat gatgttgaag cggcctttag tgcagctcta 1020
aaaggaacag atgttaaaac taatggaaaa tattctgata tcttagaaaa tagctcattt 1080
acagctgtcg ttttaggagg agatgctgca gagcacaata aggtagtcac aaaagacttt 1140
gatgttatta gaaacgttat caaagacaat gctaccttca gtagaaaaaa cccagcttat 1200
cctatttcat acaccagtgt tttccttaa aataataaaa ttgcgggtgt caataacaga 1260
actgaatacg ttgaacaac atctaccgag tacactagtg gaaaaattaa cctgtctcat 1320
caaggcgcgt atgttgctca atatgaaatc ctttgggatg aaatcaatta tgatgacaaa 1380
ggaaaagaag tgattacaaa acgacgttgg gacaacaact ggtatagtaa gacatcacca 1440
tttagcacag ttatcccact aggagcfaat tcacgaaata tccgtatcat ggctagagag 1500
tgcactggct tagcttggga atggtgccga aaagtgatcg acgaaagaga tgtgaaactg 1560
tctaaagaaa tcaatgtcaa tatctcagga tcaaccttga gcccatatgg ttcgattact 1620
tataagctcg agcaccacca ccaccaccac tga 1653

```

<210> 59

<211> 1653

<212> DNA

<213> 酿脓链球菌 (S. pyogenes)

<400> 59

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggtt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggttaatac gcttcctaga 660
acacaatata ctgaatcaat ggtatattct aagtcacaga ttgaagcagc tctaaatggt 720
aatagcaaaa tcttagatgg tacttttagc attgatttca agtcgatttc aaaaggtgaa 780
aagaaggatg tgattgcagc atacaagcaa attttttaca cgtatcagc aaaccttct 840
aataatcctg cggatgtgtt tgataaatcg gtgaccttta aagagttgca acgaaaaggt 900
gtcagcaatg aagctccgcc actctttgtg agtaacgtag cctatggctg aactgttttt 960
gtcaaaactg aaacaagttc taaaagtaat gatgttgaag cggcctttag tgcagctcta 1020
aaaggaacag atgttaaaac taatggaaaa tattctgata tcttagaaaa tagctcattt 1080
acagctgtcg ttttaggagg agatgctgca gagcacaata aggtagtcac aaaagacttt 1140
gatgttatta gaaacgttat caaagacaat gctaccttca gtagaaaaaa cccagcttat 1200
cctatttcat acaccagtgt tttccttaa aataataaaa ttgcgggtgt caataacaga 1260
actgaatacg ttgaacaac atctaccgag tacactagtg gaaaaattaa cctgtctcat 1320
caaggcgcgt atgttgctca atatgaaatc ctttgggatg aaatcaatta tgatgacaaa 1380
ggaaaagaag tgattacaaa acgacgttgg gacaacaact ggtatagtaa gacatcacca 1440
tttagcacag ttatcccact aggagcfaat tcacgaaata tccgtatcat ggctagagag 1500
tgcactggct tagcttggga atggtgccga aaagtgatcg acgaaagaga tgtgaaactg 1560
tctaaagaaa tcaatgtcaa tatctcagga tcaaccttga gcccatatgg ttcgattact 1620
tataagctcg agcaccacca ccaccaccac tga 1653

```