



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117794563 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202280053633.1

(22) 申请日 2022.06.29

(30) 优先权数据

21189283.1 2021.08.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.01.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/067892 2022.06.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/011812 EN 2023.02.09

(71) 申请人 英特维特国际股份有限公司

地址 荷兰博克斯梅尔

(72) 发明人 A·A·C·雅各布斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表19页

(54) 发明名称

用于保护以对抗多种血清型的猪链球菌的疫苗

(57) 摘要

本发明涉及一种用于保护以对抗猪链球菌致病性感染的疫苗,所述疫苗包含猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原和药学上可接受的载体,所述抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。本发明还涉及用于保护猪免受这种感染的方法中的这种抗原,以及保护这种猪的方法。

1. 一种用于保护以对抗猪链球菌致病性感染的疫苗,所述疫苗包含猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原和药学上可接受的载体,所述抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。

2. 根据权利要求1所述的疫苗,其特征在于所述抗原在其氨基酸序列中包含少于三个重复序列。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的疫苗,其特征在于所述抗原在其氨基酸序列中包含两个重复序列。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的疫苗,其特征在于所述IgM蛋白酶抗原是猪链球菌血清型7或猪链球菌血清型1的。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的疫苗,其特征在于所述IgM蛋白酶抗原是猪链球菌血清型7序列型29的,或猪链球菌血清型1序列型13的。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的疫苗,其特征在于所述疫苗还包含血清型9序列型16的猪链球菌菌苗。

7. 一种用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的方法中的猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,所述抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。

8. 根据权利要求7所述的用途的猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,其特征在于所述保护是针对血清型1、2和7中任一种的猪链球菌的致病性感染。

9. 根据权利要求7和8中任一项所述的用途的猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,其特征在于所述方法包括向至多35日龄的猪施用所述猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原。

10. 根据权利要求7和8中任一项所述的用途的猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,其特征在于所述方法包括向母猪施用所述猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,以通过摄入该母猪的初乳来保护猪。

11. 根据权利要求10所述的用途的猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,其特征在于在所述猪服用所述初乳之前向所述母猪施用两次所述猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原。

12. 猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原在制备用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的疫苗中的用途,所述抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。

13. 一种通过向猪施用猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原来保护所述猪免受猪链球菌的致病性感染的方法,所述抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。

用于保护以对抗多种血清型的猪链球菌的疫苗

发明领域

[0001] 本发明涉及保护猪免受多种血清型的猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 细菌的致病性感染, 特别是最普遍的血清型1、2和7, 优选还有血清型9。

[0002] 发明背景

[0003] 猪链球菌 (*S. suis*) 是猪传染性细菌疾病的主要病原体之一。该病原体可引起多种临床综合征, 包括脑膜炎、关节炎、心包炎、多发性浆膜炎、败血病、肺炎和猝死。*S. suis* 是革兰氏阳性兼性厌氧球菌, 最初被定义为兰斯斐尔德 (Lancefield) 类群R、S、R/S或T。后来, 提出了基于位于细胞壁中的类型特异性荚膜多糖抗原的新分型系统。这产生了包含35种血清型的系统 (Rasmussen和Andresen, 1998, “16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotypes”, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1063-1065), 其中血清型1、2、7和9目前是最为普遍的, 特别是在欧洲。然而, 已认识到荚膜血清型是毒力的不良标志物。因此, 开发了一种替代系统来帮助了解*S. suis*感染的流行病学和血清分型方法的生物学相关性, 即所谓的多位点序列分型 (MLST), 如King等在 *Journal of Clinical Microbiology*, 2022年10月, 第3671—3680页 (Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange”) 中所描述的。在该研究中, 鉴定了92种序列型, 其中ST复合物ST1、ST27和ST87 (各自含有多种序列型) 在群中占主导地位。另参见猪链球菌MLST网站 (<https://pubmlst.org/ssuis/>), 其位于牛津大学 (Jolley等, *Wellcome Open Res* 2018, 3:124 (由Wellcome Trust资助的站点)), 其引用了King等的论文并使得能够容易地鉴定任何猪链球菌菌株的序列型。

[0004] 猪群中猪链球菌的控制看起来似乎是困难的。猪链球菌是猪的共生和机会致病病原体。显然, 免疫系统不是在每次感染时都会被触发。其次, 猪链球菌是一种包封良好的病原体, 并使用毒力因子库来逃避宿主免疫系统。总之, 这些特征挑战了对抗这种重要病原体的有效疫苗的开发。几年前发表了一篇综述文章, 该文章综述了针对猪链球菌的现有和探索性疫苗 (Mariela Segura: “*Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress, in Expert Review of Vaccines, 第14卷, 2015, 第12期, 第1587—1608页)。在这篇综述中, 汇集了临床领域信息和实验数据, 并进行了比较, 以概述针对猪链球菌的疫苗开发状况, 如下所述。

[0005] 目前的商业疫苗主要是全细胞疫苗。然而, 现场报告描述了疾病控制和管理的困难, 并且当使用菌苗疫苗时特别是“疫苗失败”是常见的, 尤其是因为异源保护非常差。带菌猪是感染的主要来源, 畜群内疾病的传播涉及垂直和水平传播。在诸如断奶和运输的应激条件下将带菌动物与易感动物混合通常导致临床疾病。早期药物断奶和隔离的早期断奶实践不能消除猪链球菌感染。因此, 预防疾病的有效控制措施将取决于预防/后防 (metaphylactic) 程序 (在允许的情况下) 和疫苗接种。目前, 野外免疫的努力集中在商业或自体菌苗的使用上。这些疫苗策略已经应用于仔猪或母猪。由于与断奶相关的应激以及常见的随后的转运, 从断奶开始以及以后, 仔猪更易受猪链球菌感染。因此, 母猪的产前免疫

通常用于尝试向仔猪传递被动免疫,并在生命早期的这些应激环境下提供针对猪链球菌的保护。此外,母猪疫苗接种成本较低且劳动力密集,因此代表了仔猪疫苗接种的经济替代方案。然而,可获得的结果似乎表明用菌苗接种母猪也是有争议的问题。在许多情况下,接种疫苗的母猪,即使在分娩前接种疫苗两次,对接种疫苗的应答很差或根本没有应答,这导致转移到产仔的母体免疫力低。即使以足够的水平转移母体免疫,在许多情况下,母体抗体太低而不能在4—7周龄的最关键时期提供保护。

[0006] 在仔猪中,自体菌苗经常用于该领域,特别是在欧洲。它们由在具有临床问题的农场分离的毒力菌株制备并施用于同一农场。自体菌苗的缺点之一是缺乏疫苗安全性数据,并且可能发生严重的不良反应。采样错误(由于仅使用一只或两只猪或样本)可能导致无法鉴别与近期爆发相关的菌株或血清型。这种失败在地方性畜群中可能尤其成问题。最后,自体菌苗最重要的困境是它们的实际功效尚未得到充分研究。由于自体疫苗的应用是经验性的,用这些疫苗获得的结果是不一致的并且常常令人失望,这并不令人惊讶。

[0007] 本领域还描述了其他实验疫苗。Kai-Jen Hsueh等展示了(“Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets”, in: BMC Veterinary Research, BMC series-open, inclusive and trusted, 13:15, 2017年1月7日), 菌苗加亚单位可能是母猪成功接种以赋予其仔猪保护性免疫的基础。

[0008] 本领域也考虑了减毒活疫苗。猪链球菌血清型2的非包封的同基因突变体已经清楚地显示是无毒的。然而,基于非包封的血清型2突变体的活疫苗制剂仅诱导针对死亡率的部分保护,并且不能阻止受到野生型菌株攻击的猪的临床症状的发展(Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA等, “Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2.” 在 Vet Microbiol. 2002, 84:155-168中)。

[0009] 在过去的几年中,已经报道了一系列的抗原性或免疫原性猪链球菌分子,并且这些中的大多数已经通过免疫蛋白质组学使用来自感染的猪或人的恢复期血清和/或实验室产生的免疫血清被发现。W02015/181356 (IDT Biologika GmbH) 已经表明,在施用两剂IgM蛋白酶抗原的疫苗接种方案中,IgM蛋白酶抗原(全蛋白或仅代表约35%全蛋白的高度保守的Mac-1结构域)可在仔猪中引发保护性免疫应答,任选地与含有菌苗的初次疫苗接种组合。’356专利申请中建议,由于IgM蛋白酶抗原在大多数(如果不是全部的话)猪链球菌血清型,特别是最流行的血清型1、2、7和9中是高度保守的,所以IgM蛋白酶抗原可用于在猪链球菌血清型,特别是血清型1、2、7和9中获得广泛的交叉保护。

[0010] W02017/005913 (Intervacc AB) 证实了IgM蛋白酶在各种猪链球菌血清型中高度保守的事实,因此,使用该抗原可以得到预期的广泛保护。

[0011] 最近,公开了关于使用IgM蛋白酶抗原,特别是血清型2的IgM蛋白酶抗原来针对其他血清型提供保护的专利申请。这些应用证实了IgM蛋白酶抗原的交叉保护性质。

[0012] 特别是,W02020/094762描述了血清型2的IgM蛋白酶抗原抗血清型14攻击的用途。似乎可以获得非常充分的保护。

[0013] 在W02019/115741中显示,IgM蛋白酶抗原有效地防止血清型9的猪链球菌的致病性感染。然而,保护不是非常高,并且似乎至多处于用普通菌苗疫苗可获得的水平,即在人

工攻击实验中死亡和阳性血液分离减少约50% (不排除在实际中,大部分面临不太激烈的攻击,保护将处于较高水平)。乍一看,这种有些令人失望的保护似乎用IgM蛋白酶抗原获得的抗血清型9的猪链球菌感染的高水平保护相冲突,如由Rieckmann等在Vaccine,3 (2019) 100046 (“Vaccination with the immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, IdeSsuis, leads to protection against a highly virulent serotype 9 strain”)中报道的,同样在人工攻击实验中,以及如W02020/094762中所示的血清型14对猪链球菌的保护。基于现有技术,不能理解针对普通血清型9细菌的相对低水平的保护。

[0014] 尽管预期至少有一些保护作用,但在本领域中没有关于IgM蛋白酶血清型2针对血清型1和7的猪链球菌攻击的保护的可获得数据。

[0015] 发明目的

[0016] 本发明的一个目的是找到一种改进的疫苗,用于提供针对猪链球菌、特别是针对包括至少血清型1、2和7的各种血清型的猪链球菌的(交叉)猪的保护。优选地,疫苗包含来源于少于这三种血清型的抗原,但仍然能够提供至少针对所有这三种血清型,至少针对在野外存在的这些血清型的代表性菌株的足够保护。

[0017] 发明概述

[0018] 为了满足本发明的目的,已经设计了一种疫苗,其包含猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,该抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列,和药学上可接受的载体。

[0019] 本发明基于几个意想不到的发现。首先,似乎由血清型2的IgM蛋白酶提供的异源保护不如基于现有技术教导所预期的那样好,特别是因为IgM蛋白酶在不同血清型的猪链球菌中高度保守。特别地,如最好理解的,在目前已知的所有链球菌血清型中,Mac-1结构域以非常高的同一性水平存在。然而,尽管血清型的IgM蛋白酶抗原对血清型2攻击提供的同源保护作用是极好的,但异源保护,特别是对链球菌血清型1和7的异源保护仍有可能显著改善。另一个意外的发现是血清型7细菌的IgM蛋白酶抗原反过来提供的异源保护非常好,特别是针对血清型1和2。特别是,针对血清型2提供的异源保护水平显著好于血清型2提供的针对血清型7的异源保护的事实是完全出乎意料的。其次,还发现由血清型1细菌的IgM蛋白酶抗原反过来提供的异源保护也是非常好的,特别是针对血清型2和7。特别是,针对血清型2提供的异源保护水平显著优于血清型2提供的针对血清型1的异源保护的事实是完全出乎意料的。

[0020] 上述发现导致评估所用血清型1和7菌株的IgM蛋白酶抗原如何偏离血清型2的IgM蛋白酶抗原。似乎这些细菌的大部分基因组几乎相同。差异似乎在所谓的CNV区域(拷贝数变异区域),其中基因组的部分是重复的(参见实施例1的IgM蛋白酶的基因组结构的细节)。对于本领域已知的血清型2IgM蛋白酶,似乎有四个重复序列,而上述其他两种抗原含有较少的重复序列。由于这是唯一的实质性差异,相信为了获得异源保护,具有少于四个重复序列是有利的。在猪链球菌的血清型中,有多种菌株表达包含少于四个重复序列的IgM蛋白酶。

[0021] 本发明还涉及一种用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的方法中的猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,所述抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列。

[0022] 其次,本发明涉及猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原(该抗原在其氨基酸序列中包含少

于四个重复序列)在制备用于保护猪免受猪链球菌的致病性感染的疫苗中的用途,以及通过向所述猪施用猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原(该抗原在其氨基酸序列中包含少于四个重复序列)来保护所述猪免受猪链球菌致病性感染的方法。

[0023] 定义

[0024] 猪链球菌的IgM蛋白酶抗原是特异性降解猪IgM(而不是猪IgM或猪IgA;Seele at al,in Journal of Bacteriology,2013,195 930-940;和in Vaccine 33:2207-2212;2015年5月5日)的酶,表示为IdeSsuis的蛋白质,或其免疫原性部分(通常具有全长酶的至少约30—35%的长度)。整个酶具有约100—125kDa的重量,相当于约1000—1150个氨基酸,大小取决于猪链球菌的血清型。在W02015/181356中,给出了代表猪链球菌的IgM蛋白酶抗原的几个序列,即SEQ ID NO:1(也并入本申请中)、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:5(这四个序列2、6、7和5未并入本申请中),后者是全长酶的免疫原性部分(表示为Mac-1结构域,即SED ID NO:7的氨基酸80—414)。全长酶的免疫原性部分的其他实例在W02017/005913中给出。IgM蛋白酶的具体实例是根据W02015/1818356的SEQ ID NO:1的蛋白酶或在重叠区中具有至少90%,或甚至91、92、93、94、95、96、97、98、99%直至100%序列同一性的蛋白质。氨基酸序列同一性可以用BLAST程序使用具有默认参数的blastp算法来建立。预期各种血清型的猪链球菌的IgM蛋白酶具有高于75%的序列同一性,特别是预期为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、90、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%至100%。例如为了优化抗原重组生产系统中的产量而制备的人工蛋白质可以导致与整个酶相比更低的氨基酸序列同一性,例如85%、80%、75%、70%、65、60、55或甚至50%,同时保持所需的免疫原性功能,并且在本发明的意义上被理解为猪链球菌的IgM蛋白酶抗原。

[0025] 猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原是包含至少Mac-1结构域、与结构功能相关的区域、CNV区域和任选的细胞粘附区的抗原(参见实施例1的猪链球菌基因组中的这些区域的鉴定)。这可以被认为是全IgM蛋白酶抗原,因为无论如何信号肽被认为在天然存在的(即野生型)分泌酶中缺失,并且细胞粘附区不被认为对于其作为蛋白酶的功能是必需的。

[0026] 疫苗是适于施用于受试者的组合物,其包含免疫学有效量的一种或多种抗原(即能够充分刺激目标受试者的免疫系统以至少减少野生型微生物的攻击的负面影响),通常与药学上可接受的载体组合,其在施用于受试者后诱导用于治疗感染的免疫应答,即有助于预防、改善或治愈感染或由该感染引起的任何疾病或病症。

[0027] 基因组或相应氨基酸序列中的重复是在生物体的基因组或相应氨基酸序列中重复一次或多次的拷贝(完全相同或高度相似,例如同源物)。它是拷贝数变异现象的一部分,其中基因组的部分被重复。通常,相同生物体的不同菌株之间的重复数目不同。拷贝数变异是一种结构变异。它是一种复制事件,通常影响相当数量的碱基对,例如30—400个碱基对,对应于10—130个氨基酸。

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

[0029] 菌苗是用作疫苗的灭活细菌的悬浮液。

[0030] 抗原的组合是在一种疫苗接种策略中这些(各自不同的)抗原的联合使用,通过将不同的抗原加入一种疫苗制剂中或通过使用单独的抗原制剂来同时施用单独的制剂。

[0031] 组合疫苗(即包含抗原的组的疫苗)是同时包含不同抗原的一种(单一)制剂。这些不同的抗原可以在工厂中混合以提供所谓的即用型组合疫苗,或者在施用前或施用过程期间混合(例如,使用具有用于单独抗原的两个单独腔室的装置,这些腔室的内容物在使用用于施用的装置后混合),只要抗原确实最终在相同的制剂中。

[0032] 猪是属于猪科的任何动物。

[0033] 药学上可接受的载体是生物相容的介质,即在施用后在所治疗的受试者中不诱导显著的不良反应,在施用包含载体的组合物后能够将抗原呈递给受试者的免疫系统的介质。这样的药学上可接受的载体可以例如是含有水和/或任何其他生物相容性溶剂的液体或诸如通常用于获得冻干疫苗(基于糖和/或蛋白质)的固体载体,任选地包含免疫刺激剂(也称为佐剂)。任选加入其他物质如稳定剂、粘度调节剂或其他组分,这取决于相应疫苗的预期用途或所需性质。

[0034] 本发明的其他实施方式

[0035] 在根据本发明疫苗的另一个实施方式中,猪链球菌的IgM蛋白酶抗原在其氨基酸序列中包含少于三个重复序列,例如两个重复序列。

[0036] 在另一个实施方式中,全IgM蛋白酶抗原是猪链球菌血清型7或猪链球菌血清型1的。优选地,IgM蛋白酶抗原是猪链球菌血清型7序列型29的,或猪链球菌血清型1序列型13的。

[0037] 在又一个实施方式中,疫苗另外包含血清型9序列型16的猪链球菌菌苗。另一个高度意外的发现是血清型2的IgM蛋白酶抗原,或实际上任何血清型的IgM蛋白酶抗原,针对链球菌血清型9的最流行类型,即链球菌血清型9序列型16几乎不提供任何足够的保护(提供一些保护,但该水平对于商业上成功的疫苗而言并不足够)。乍一看,这一发现似乎与Rieckmann报告的结果相冲突。然而,经仔细核查,在Rieckmann研究中似乎使用了血清型9序列型94的猪链球菌菌株。在W02019/115741中,尽管没有指出,但其使用了序列型16的猪链球菌菌株。这稍后通过根据King等所述的多位点序列分型对所用的攻击菌株进行分型而发现(见上文)。显然,针对后一种类型(血清型9序列型16的猪链球菌)IgM蛋白酶抗原以显著较低的水平提供保护。其原因不完全清楚,但也可能与CNV区域有关。对于血清型9序列型16细菌,该区域是完全不同的,其包含更多的重复序列(约12个),但长度相当小(约12个AA)。针对该细菌攻击的血清型2IgM蛋白酶的低水平保护证实了CNV区域对于(交叉)保护的重要性。在任何情况下,针对猪链球菌的血清型9序列型16细菌缺乏交叉保护是非常不利的,因为在许多国家,尤其是欧洲国家如荷兰,序列型16的猪链球菌是最流行的(高达约95%)猪链球菌血清型9细菌的致病性类型(Willemse等,Scientific Reports,2019,9:15429,“Clonal expansion of a virulent Streptococcus suis serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations”)。因此,尽管全IgM蛋白酶抗原可产生跨血清型的保护作用,但发现有效保护作用存在差距,特别是针对猪链球菌血清型9序列型16。发现通过使用这种猪链球菌细菌的菌苗可以弥补该差距。

[0038] 直到认识到上述内容之后,才可以得出结论,针对野外的血清型1、2、7和9的猪链球菌(因此针对最流行的菌株类型)提供保护的改进疫苗除了本发明的全IgM蛋白酶抗原之外,还应当包括猪链球菌血清型9序列型16的菌苗。尽管存在于该抗原的组合中的全IgM蛋白酶抗原不适于提供针对血清型9序列型16的猪链球菌的充分保护,但其甚至可改善菌苗

的保护。

[0039] 在该实施方式中,通过仅使用两种不同血清型(1或7和9)的两种猪链球菌抗原,可以获得针对至少四种血清型的最流行的猪链球菌细菌的充分保护,当使用血清型2细菌的IgM蛋白酶时,弥补了针对猪链球菌细菌的保护中的任何差距或缺点。这不仅能够获得针对血清型9(包括作为重要代表的序列型16)的猪链球菌的最佳可能的保护,而且能够获得在所有流行血清型(特别是血清型1、2、7和9)获得非常广泛和高水平的保护的方法。

[0040] 在根据本发明用途的另一个实施方式中,该方法包括向至多35日龄的猪施用猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原。

[0041] 在根据本发明用途的另一个实施方式中,该方法包括向母猪施用猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原,以通过摄入该母猪的初乳来保护猪(通常是仔猪)。已知全IgM蛋白酶抗原(参见W02019/193078)在仔猪从接种的母猪摄取初乳时为仔猪提供充分且长期的保护。优选地,猪链球菌的全IgM蛋白酶抗原在猪服用所述初乳之前向母猪施用两次。

[0042] 现在将使用以下具体实施例进一步说明本发明。

实施例

[0043] 实施例1猪链球菌基因组的结构分析。

[0044] 实施例2研究IgM蛋白酶血清型2针对血清型1的交叉保护。

[0045] 实施例3研究IgM蛋白酶血清型2针对血清型7的交叉保护。

[0046] 实施例4研究IgM蛋白酶血清型2针对血清型9序列型16的交叉保护。

[0047] 实施例5研究由血清型1和7的IgM蛋白酶提供的针对血清型1攻击的保护。

[0048] 实施例6研究由血清型1和7的IgM蛋白酶提供的针对血清型2攻击的保护。

[0049] 实施例7研究由血清型1和7的IgM蛋白酶提供的针对血清型7攻击的保护。

[0050] 实施例8研究由菌苗提供的针对血清型9序列型16攻击的保护。

[0051] 实施例1

[0052] 在该实施例中,提供了猪链球菌基因组(即编码IgM蛋白酶的部分)的分析,以显示基因组的该部分是如何构建的。为此,我们使用血清型2细菌的猪链球菌的基因组,如从W02015/181356知晓的,在该专利申请中公开为SEQ ID NO:1。该序列再次作为SEQ ID NO:1包含在本专利的序列表中。使用Needleman-Wunsch比对的序列相似性搜索(参见Needleman,等1970,Laskowski等,1997,Apweiler等,2000;默认设置)。除了蛋白质注释(PDBSum和InterPro)之外,还揭示了IgM蛋白酶基因组的结构,其中5个区域可以被鉴别:

[0053] 区域1(Met1—Thr34):来自位置1的信号序列;

[0054] 区域2(Val35—Glu426):具有预测的水解酶活性的Mac-1结构域;

[0055] 区域3(Thr427—Pro687):与结构功能(例如,涉及适当折叠)和底物结合相关的区域。

[0056] 区域4(Thr688—Ser919):由与带水解酶活性的已知蛋白质序列具有相似性的四个重复序列(1*{Thr688—Ser744}、2*{Thr745—Ser801}、3*{Thr802—Ser858}、4*{Thr859—Ser919})组成的区域;

[0057] 区域5(Thr920—Lys1141):含有指示细胞壁锚定功能的预测的跨膜区域。

[0058] 其他血清型的猪链球菌的结构基本相同,但对于血清型9序列型16,存在显著差异

(如下所示):

[0059] -信号肽在猪链球菌菌株中高度保守;

[0060] -Mac-1结构域始终存在,在所有已知菌株中高度保守,包括血清型9序列型16菌株;

[0061] -与结构功能相关的区域3始终存在,也是高度保守的,但仅为血清型9序列型16的长度的约一半;

[0062] -关于CNV区域,重复序列在不同血清型之间非常相似,尽管数目通常在2和6之间变化。血清型9序列型16具有12个完全不同类型的重复,其与其他血清型的重复相比短得多(即12个AA,而不是约60个),并且可以细分为三种基本上不同的重复;

[0063] -细胞粘附区在不同血清型中也是高度保守的,但实际上与血清型9序列型16菌株的区域没有氨基酸序列同一性。

[0064] 简而言之,在大多数血清型和序列型中,基因组结构基本相同,最显著的差异是CNV区域中的重复数目。血清型9序列型16的基因组的IgM蛋白酶部分就涉及的Mac-1结构域而言高度相似,但剩余部分显著不同。

[0065] 实施例2

[0066] 研究目的

[0067] 从现有技术中已知猪链球菌血清型2的全IgM蛋白酶(SEQ ID NO:1)提供针对同源攻击的优异保护。此外,本领域已知针对血清型9和14的一些交叉保护。在该实施例中,评估了针对血清型1攻击的该抗原实际保护水平。为此,使用了序列型13的菌株,它是常见的细菌类型和在野外的该血清型的良好代表。

[0068] 研究设计

[0069] 开始时,为了评估针对血清型1细菌攻击的保护作用,唯一可用的攻击模型是其中3周龄仔猪被攻击的模型。这意味着为了评价由IgM蛋白酶抗原诱导的保护作用,仔猪自身不能接种疫苗,因为预计产生有效免疫应答的时间太短。因此,为了评估疫苗提供的保护作用,母猪在产前接种疫苗,使得诱导的抗体通过摄取初乳转移到仔猪。本领域已知(US10,751,403)当IgM蛋白酶抗原在接种疫苗的动物自身中提供保护时,它也对接种疫苗的母猪的后代提供优异的保护。换句话说,在该(间接)攻击模型中看到的保护作用是在接种疫苗的动物自身中提供的保护作用的指示,当然还有通过摄取接种疫苗的母猪的初乳给仔猪提供的保护。

[0070] 对于该研究,使用了10头妊娠母猪,分成2组,每组5头母猪。在预期分娩之前6周和2周,一组用亚单位疫苗接种,所述亚单位疫苗包含以80 μ g/剂在水包油佐剂(μ Diluvac Forte, MSD Animal Health)中的血清型2的重组rIdeSsuis IgM蛋白酶抗原(Seele et al: Vaccine33:2207-2212;2015年5月5日,第2.2部分),并且一组留作未接种的对照组。分娩后,在3周龄时,选择来自接种母猪的10只仔猪和来自对照母猪的10只仔猪(每组包含2只仔猪/母猪)进行攻击。使用导管或(如果其不可能)替代地使用经气管注射,用10ml攻击接种物(目标为 5.0×10^{10} CFU/ml)气管内攻击仔猪(2×10^8 ,接种者和对照)。攻击后,每天观察仔猪的猪链球菌感染的临床症状,例如抑郁、运动问题和/或神经症状,并且对于严重病例,使用常规评分系统从0(无症状)到3进行评分。对达到人道终点的动物实施安乐死。在疫苗接种之前和之后(10只母猪)和正好攻击前(20只仔猪)定期收集血清血液用于抗体测定。在攻

击之前和之后定期收集 (20只仔猪) 肝素血液以重新分离攻击菌株。在研究结束时 (即攻击后11天), 将所有存活的仔猪安乐死。

[0071] 结果

[0072] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位 (即局部) 或全身反应, 因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表1所示。

[0073] 表1: 攻击后数据

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

[0075] 结论

[0076] 血清型2的IgM蛋白酶不提供针对血清型1猪链球菌细菌攻击的保护。

[0077] 实施例3

[0078] 研究目的

[0079] 在本实施例中, 评估了用与实施例2中所用相同的抗原 (血清型2的IgM蛋白酶) 针对血清型7攻击的实际保护水平。为此, 使用了序列型29的菌株, 其为常见的细菌类型且代表在野外的该血清型。

[0080] 研究设计

[0081] 与血清型1一样, 为了评估针对血清型7细菌攻击的保护, 唯一可用的攻击模型是其中3.5周龄仔猪被攻击的模型。因此, 在该研究中, 母猪也在产前接种疫苗, 使得诱导的抗体通过摄取初乳转移到仔猪中。

[0082] 对于该研究, 使用了10头妊娠母猪, 分成2组, 每组5头母猪。在预期分娩之前6周和2周, 一组用亚单位疫苗接种, 所述亚单位疫苗包含以80 μ g/剂在水包油佐剂 (μ Diluvac Forte, MSD Animal Health) 中的血清型2的重组rIdeSsuis IgM蛋白酶抗原 (Seele等, Vaccine33:2207-2212; 2015年5月5日, 第2.2部分), 并且一组留作未接种的对照组。分娩后, 在3.5周龄时, 选择10头来自接种母猪的仔猪和10头来自对照母猪的仔猪 (每组包含2只仔猪/母猪) 进行攻击。用10ml攻击接种物 (目标为 1.0×10^9 CFU/ml) 气管内攻击仔猪 (2×10 , 接种者和对照)。攻击后, 每天观察仔猪的猪链球菌感染的临床症状, 例如抑郁、运动问题和/或神经症状, 并且对于严重病例, 使用常规评分系统从0 (无症状) 到3进行评分。对达到人道终点的动物实施安乐死。在疫苗接种之前和之后 (10只母猪) 和正好攻击前 (20只仔猪) 定期收集血清血液用于抗体测定。在攻击之前和之后定期收集 (20只仔猪) 肝素血液以重新分离攻击菌株。在研究结束时 (即攻击后11天), 将所有存活的仔猪安乐死。

[0083] 结果

[0084] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位或全身反应, 因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表2所示。

[0085] 表2: 攻击后数据

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

[0087] 结论

[0088] 血清型2的IgM蛋白酶不提供针对血清型7猪链球菌细菌攻击的保护。

[0089] 实施例4

[0090] 研究目的

[0091] 本研究的目的是测试与实施例2和3中使用的相同抗原(即血清型2的IgM蛋白酶)针对血清型9攻击,特别是针对血清型9序列型16的细菌的攻击的实际保护水平。

[0092] 研究设计

[0093] 使用24只3周龄血清阴性SPF仔猪。将仔猪分成两组(均匀分布在不同的窝中),每组10只仔猪。如实施例2和3所述,第1组在3和5周龄肌内接种疫苗两次,第2组作为未接种的攻击对照组。如本文以上所述,在7周龄时,用猪链球菌血清型9的毒力培养物气管内攻击猪。攻击后,在10天内每天观察仔猪的猪链球菌感染的临床症状,例如抑郁、运动问题和/或神经症状。对已显示出特定临床症状(即运动或神经)症状后达到人道终点的动物实施安乐死而不进行尸检。对达到人道终点但未显示出特定临床症状的动物实施安乐死,并进行尸检,包括细菌学检查,以确认猪链球菌感染。在攻击之前和之后定期收集肝素血液以重新分离攻击菌株。在第一次接种疫苗当天(5周龄),猪对源自血清型2的IgM蛋白酶呈血清阴性。

[0094] 结果

[0095] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表3所示。

[0096] 表3:攻击后数据

[0097]	组别	临床评分	存活时间(天)	攻击后死亡	阳性血液分离
	1	54	3.7	9/12	8/12
	2	45	4.8	8/12	9/12

[0098] 结论

[0099] 血清型2的IgM蛋白酶不提供针对血清型9序列型16猪链球菌细菌攻击的保护。

[0100] 实施例5

[0101] 研究目的

[0102] 在本实施例中,评估血清型1和血清型7猪链球菌菌株的IgM蛋白酶抗原针对血清型1攻击的保护作用。为此,制备对应于如实施例2、3和4中使用的血清型2的IgM蛋白酶的抗原,即使用如本领域中所述的大肠杆菌表达系统(Seele等,见上文)。对于血清型7的IgM蛋白酶抗原所用的序列示于所附SEQ ID NO:2中,而对于血清型1的IgM蛋白酶抗原所用的序列示于所附SEQ ID NO:3中。两个序列都包括紧邻Mac-1区域的CNV区域,并且在该区域中具有两个重复序列。攻击菌株与实施例2中使用的相同。

[0103] 研究设计

[0104] 研究设计与实施例2和3相同,尽管在每种情况下使用3.5周龄的攻击仔猪,并且使用10只仔猪的组。每种血清型的攻击对应于实施例2和3中的攻击。第1组用血清型1的IgM蛋白酶疫苗接种,第2组用血清型7的IgM蛋白酶疫苗接种,并且第3组留下作为攻击对照。

[0105] 结果

[0106] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表4所示。

[0107] 表4:攻击后数据

	组别	临床评分	存活时间 (天)	攻击后死亡	阳性血液分离
[0108]	1	17	8.0	3/10	2/10
	2	27	6.8	4/10	4/10
[0109]	3	52	3.9	8/10	7/10

[0110] 结论

[0111] 从这些数据可以得出结论,血清型1的IgM蛋白酶以及血清型7的IgM蛋白酶针对血清型1菌株的毒力攻击提供保护。血清型1抗原提供的同源保护似乎略好于血清型7抗原提供的异源保护。

[0112] 实施例6

[0113] 研究目的

[0114] 在此实施例中,评估血清型1和血清型7猪链球菌菌株的IgM蛋白酶抗原针对血清型2攻击的保护。为此,使用与实施例5中相同的抗原。攻击菌株是血清型2序列型1菌株,代表在野外的菌株。

[0115] 研究设计

[0116] 研究设计与实施例4基本相同。使用了三只3周龄的仔猪。将仔猪分成三组(均匀分布在不同的窝),每组10只仔猪。第1组和第2组在3和5周龄时分别用亚单位疫苗肌肉内接种两次,而第3组保持未接种。在7周龄时,用猪链球菌血清型2菌株的毒力培养物气管内攻击猪。攻击后的11天期间,每天观察猪的猪链球菌感染的临床症状,例如抑郁、运动问题和/或神经症状。对达到人道终点(HEP)的动物实施安乐死。就在攻击之前,攻击后2天,并且如适用,在HEP当天(就在安乐死前)收集肝素血液以重新分离攻击菌株。

[0117] 在第一次接种疫苗当天,仔猪是血清阴性的或在特异性IgG1抗体ELISA中具有非常低的滴度。接种疫苗后,第1组和第2组显示出对IgM蛋白酶的良好抗体应答,而对照保持在非常低的水平。

[0118] 结果

[0119] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表5所示。由于非猪链球菌的特定原因,第1组中的一只动物在攻击后必须被安乐死。

[0120] 结论

[0121] 从这些数据可以得出结论,血清型1的IgM蛋白酶以及血清型7的IgM蛋白酶针对血清型2菌株的毒力攻击提供保护。

[0122] 表5:攻击后数据

	组别	临床评分	存活时间(天)	攻击后死亡	阳性血液分离
[0123]	1(st1)	13.2	9.0	2/9	2/9
	2(st7)	3.5	10.5	1/10	1/10
	3(-)	61.7	1.4	10/10	10/10

[0124] 实施例7

[0125] 研究目的

[0126] 在本实施例中,评估血清型1和血清型7猪链球菌菌株的IgM蛋白酶抗原针对血清型7攻击的保护。为此,使用与实施例5和6中相同的抗原。攻击菌株是血清型7序列型29菌株,代表在野外的菌株。

[0127] 研究设计

[0128] 研究设计与实施例5相同(除了攻击菌株)。每种血清型的攻击对应于实施例2和3中的攻击。第1组用血清型1的IgM蛋白酶疫苗接种,第2组用血清型7的IgM蛋白酶疫苗接种,第3组留作攻击对照。

[0129] 结果

[0130] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表6所示。

[0131] 表6:攻击后数据

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

[0133] 结论

[0134] 尽管如在先前的研究中一样,攻击似乎毒力较小,但从数据可以得出结论,血清型1的IgM蛋白酶以及血清型7的IgM蛋白酶针对血清型7菌株的毒力攻击提供保护。

[0135] 实施例8

[0136] 研究目的

[0137] 本研究的目的是发现针对血清型9攻击,特别是用血清型9序列型16的细菌(代表在野外循环的菌株)攻击的保护性抗原。所评估的选择是单独的菌苗和与IgM蛋白酶组合的菌苗,其在本领域中被理解为改善菌苗的功效(参见Seele等,Journal of Bacteriology,第930—940页,2013年3月,第195卷第5期,“Identification of a Novel Host-Specific IgM Protease in Streptococcus suis”;并在W02015/181356中证实)

[0138] 研究设计

[0139] 研究设计与实施例4中使用的相同,但是使用非SPF仔猪并分配到三组(均匀分布在不同的窝),每组12只仔猪。第1组在3和5周龄时用含有灭活的血清型9序列型16的猪链球菌的菌苗以 2×10^9 个细胞的水平肌内接种两次。第2组另外含有80 μ g/剂量的实施例2的IgM蛋白酶。两种疫苗都配制在其他实施例中使用的水包油佐剂中。第3组留作未接种的攻击对照组。在7周龄时,如本文以上所述,用猪链球菌血清型9的毒力培养物气管内攻击猪。攻击后的10天期间,每天观察猪的猪链球菌感染的临床症状,例如抑郁、运动问题和/或神经症状。对已经表现出特定临床症状(即运动或神经)后到达人道终点的动物实施安乐死而不进行尸检。对到达人道终点但未显示特定临床症状的动物实施安乐死并进行尸检,包括细菌学检查以确认猪链球菌感染。在攻击之前和之后定期收集肝素血液以重新分离攻击菌株。在第一次疫苗接种当天(5周龄),猪针对源自血清型2的IgM蛋白酶呈血清阴性。

[0140] 结果

[0141] 没有疫苗诱导任何不可接受的部位或全身反应,因此可以认为是安全的。安乐死前期间的攻击后数据如表7所示。由于非猪链球菌的特定原因,第2组中的一只动物在攻击

后必须被安乐死。

[0142] 表7:攻击后数据

[0143]	组别	临床评分	存活时间(天)	攻击后死亡	组别
	1	14.3	9.3	2/12	4/12
	2	14.3	9.4	2/11	2/11
	3	51.8	5.0	8/12	9/12

[0144] 结论

[0145] 针对血清型9序列型16的猪链球菌毒力攻击的保护可由该血清型的菌苗和与IgM蛋白酶组合的菌苗提供。这两种类型的抗原没有负面干扰,符合基于现有技术的预期。

[0146] 基于上述实施例,本发明的目的可通过使用包含少于四个重复序列的全IgM蛋白酶抗原来实现,任选地将IgM蛋白酶与血清型9序列型16的猪链球菌菌苗组合,以获得针对所有四种流行血清型(即血清型1、2、7和9)的充分保护。而且,相信如果需要,也可以组合两种IgM蛋白酶抗原以获得针对血清型1和7攻击的更好保护。而且,尽管不认为满足本发明的目的是必需的,其他抗原,甚至其他猪链球菌抗原也可包括在疫苗中。此外,优选在疫苗中具有作为猪链球菌抗原的至多根据本发明的全IgM蛋白酶抗原,任选不同血清型和血清型9序列型16的菌苗的第二抗原。

序列表

<110> 英特维特国际股份有限公司

<120> 用于保护以对抗多种血清型的猪链球菌的疫苗

<130> 25273 25274 25279

<160> 3

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1141

<212> PRT

<213> 猪链球菌

<400> 1

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

[0001]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

	805	810	815
Ala Thr Pro His Gly Ser Pro Thr Tyr Ile Asp Asn Ser Val Thr Glu			
	820	825	830
Ser Val Ala Thr Pro Leu Glu Lys Asp Ser Ile Gln Ala Gly Glu Thr			
	835	840	845
Glu Ile Ala Glu Pro Thr Ser Ser Glu Ser Thr Ser Val Glu Ala Glu			
	850	855	860
Leu Val Asp Asn Ser Glu Ile His Ala Ala Thr Ser Ser Val Thr Pro			
865	870	875	880
Cys Gly Ser Ser Ala Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Thr Glu Ser Val Ala			
	885	890	895
[0006]			
Thr Pro Leu Glu Lys Asp Ser Ile Gln Thr Gly Asn Thr Glu Ile Ala			
	900	905	910
Glu Pro Thr Ser Ser Lys Ser Thr Asn Val Glu Ala Ala Ser Val Asp			
	915	920	925
Asn Ser Glu Ile His Ala Asp Ala Ser Leu Thr Ala Val Ser Ser Val			
930	935	940	
Asn Leu Asp Asn Pro Val Ile Glu Pro Val Ala Ile Ser Leu Ile Gly			
945	950	955	960
Ser Lys Arg Asp Thr Asn Ala Glu Val Glu Val Ser Ser Leu Ser Lys			
	965	970	975
Arg Glu Val Arg Lys Thr Asn Thr Asp Gly Leu Ile Ser Val Gln Ser			

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

<211> 980

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

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

<400> 2

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

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

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

[0008]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Glu Val Asp Thr Glu Asn Ala Gly Leu Ile Ala Asp Gly Ala Asp
515 520 525

Gln Leu His Phe Pro Val Glu Val Gln Thr Thr Ser Phe Val Glu Ala
530 535 540

Glu Gly Asp Asn Val Phe Glu Gln Glu Ala Asp Thr Leu Pro Ile Ile
545 550 555 560

Ile Glu Asn Lys Asp Glu Phe Gly Ser Glu Leu Ser Arg Asn Met Gln
565 570 575

Thr Ser Glu Thr Asp Ser Leu Val Val Ala Val Glu Glu Asp Val Lys
580 585 590

[0017] Asn Asp Glu Val Ala Gln Val Glu Glu Leu Leu Glu Leu Glu Lys Val
595 600 605

Glu Asn Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Asp Thr Leu Ile Val Glu Gly
610 615 620

Ala Asn Asp Lys Glu Glu Asp Arg Val Glu Ala Val Val Ser Glu Gln
625 630 635 640

Pro Asp Ser Ile Pro His Gln Asn Val Glu Ile Ser Leu Val Glu Pro
645 650 655

Thr Asn Val Glu Thr Glu Ser Val Val Thr Pro Ile Asn Asp Val Ala
660 665 670

Thr Pro His Gly Ser Pro Thr Tyr Ile Asp Asn Ser Val Thr Glu Ser
675 680 685

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

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

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

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

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

[0019]

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

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

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

His His His His
980