



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102947704 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 27

(21) 申请号 201080059368. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 10. 20

G01N 33/569 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/564 (2006. 01)

0918392. 2 2009. 10. 20 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/054753 2010. 10. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/048561 EN 2011. 04. 28

(71) 申请人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 I · 马格丽特伊若斯 R · 瓦莱里奥

S · 阿罕默德 G · 格兰迪

E · 巴尔托利尼

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

权利要求书 2 页 说明书 27 页

序列表 27 页 附图 14 页

(54) 发明名称

基于 A 组链球菌标记的风湿性心脏病的诊断
和治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及鉴定化脓链球菌 (A 组链球菌 :
GAS) 感染相关的风湿性心脏病 (RHD) 病人和鉴定
有发生 GAS 感染相关 RHD 风险的病人的领域。本
发明也提供预防和治疗 GAS 感染相关 RHD 的方法
和组合物。

1. 一种在病人中诊断 GAS 感染相关的风湿性心脏病 (RHD), 或者鉴定一个病人有发生 GAS 感染相关 RHD 风险的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 将病人的生物样品接触至少一个 GAS 抗原, 接触条件适合该生物样品中存在的任何抗体结合至少一个 GAS 抗原, 和

b) 将病人生物样品中抗体与至少一个 GAS 抗原的反应性与健康个体的对照生物样品中抗体与至少一个 GAS 抗原的反应性作比较,

其中, 病人的生物样品的反应性低于健康个体的对照生物样品, 指示了该病人患有 GAS 感染相关的风湿性心脏病 (RHD), 或者该病人有发展 GAS 感染相关 RHD 的风险。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

a) 将病人生物样品接触选自含有以下氨基酸序列组的至少一个 GAS 抗原

SEQ ID NO:1 (GAS5),

SEQ ID NO:2 (GAS5F),

SEQ ID NO:3 (GAS25),

SEQ ID NO:4 (GAS40),

SEQ ID NO:5 (GAS57),

SEQ ID NO:6 (GAS97),

SEQ ID NO:7 (GAS80), 和

SEQ ID NO:8 (SpeA),

或者其功能等价物, 接触条件适合生物样品中存在的任何抗体结合至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物; 和

b) 评价与至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物结合的病人生物样品中任何抗体的反应性,

c) 将步骤 b) 中的反应性与结合至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物的健康个人的对照生物样品中抗体的反应性作比较,

其中, 病人的生物样品的反应性低于健康个体的对照生物样品的反应性, 指示了该病人患有 GAS 感染相关的风湿性心脏病 (RHD), 或者该病人有发展 GAS 感染相关 RHD 的风险。

3. 如权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 步骤 a) 包括将样品接触 1、2、3、4、5、6、7 或者 8 个含氨基酸序列 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 的 GAS 抗原或者其功能等价物。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 a) 包括将样品接触含氨基酸序列 SEQ ID NO:1、2 和 3; SEQ ID NO:1、3 和 4; SEQ ID NO:1、4 和 5; SEQ ID NO:2、3 和 4; SEQ ID NO:2、4 和 5; 或 SEQ ID NO:3、4 和 5 的 3 个 GAS 抗原或者其功能等价物。

5. 如权利要求 2 或 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 a) 包括将样品接触含氨基酸序列 SEQ ID NO:1、2、3 和 4; 或 SEQ ID NO:2、3、4 和 5; SEQ ID NO:1、3、4 和 5 的 4 个 GAS 抗原或者其功能等价物。

6. 如权利要求 2 或 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 a) 包括将样品接触含氨基酸序列 SEQ ID NO:1、2、3、4 和 5 的 5 个 GAS 抗原。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述生物样品是血清样品。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述生物样品取自青少年或者

儿童。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 GAS 抗原在一个或者多个蛋白质阵列上展示。

10. 一个含有至少两个 GAS 抗原或者其功能等价物的蛋白质阵列,所述 GAS 抗原具有选自 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7 或者 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列。

11. 一种试剂盒,所述试剂盒包括一个根据权利要求 10 的蛋白质阵列和使用所述阵列诊断病人患 GAS 感染相关的风湿性心脏病或者有发展 GAS 感染相关风湿性心脏病的风险的说明。

12. 一种治疗或者预防 GAS 感染相关 RHD 的方法,所述方法包括对需要的病人给予选自氨基酸序列 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、7 或者 8 的至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物。

13. 用于治疗或者预防 GAS 感染相关的 RHD 的选自氨基酸序列 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、7 或 8 的至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物。

基于 A 组链球菌标记的风湿性心脏病的诊断和治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及鉴定化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 组链球菌 ;GAS) 感染相关的风湿性心脏病 (RHD) 病人和鉴定有发生 GAS 感染相关 RHD 风险的病人的领域。本发明也提供预防和治疗 GAS 感染相关 RHD 的方法和组合物。

技术背景

[0002] 人类病原 A 组链球菌 (化脓链球菌, GAS) 被广泛认为是常见咽炎的一个主要病因。该种细菌的感染还能造成严重的侵入性疾病和非化脓性自体免疫后遗症。急性风湿热 (ARF) 是一种多焦点的自体免疫疾病, 在没有治疗的 GAS 感染个体中, 发生率是 0.1 - 3%。

[0003] ARF 由 1944 年首次出版的更新的琼斯标准所诊断。根据更新的琼斯标准, 当有两种主要标准 (游走性多关节炎 ; 心脏炎 ; 皮下节结 ; 边缘性红斑 ; 薛登汉氏舞蹈病) 或者一个主要标准加上两个次要标准 (发热 ; 关节痛 ; 红细胞沉降率或者 C 反应蛋白增加 ; 白细胞增多 ; ECG 显示心传导阻滞特征) 时, 以及出现 GAS 感染迹象, 可作出 ARF 诊断。

[0004] ARF 的主要临床后遗症是风湿性心脏病 (RHD)。RHD 能导致严重的心脏病, 伴有心肌炎或者心瓣炎, 造成死亡或者瓣膜换替术。在发展中国家中, 在小于 50 岁的个体中, RHD 是获得性心脏病的主要病因。在发达国家, ARF 和 RHD 由于可以利用抗生素来治疗 GAS 感染而较为少见。但是, 在 1980 年代中期美国的一些地域, 报道了 ARF 和 RHD 的复发, 并且在犹太州盐湖城附近的山区中持续发生。

[0005] 目前, 采用诸如 ECG 和超声波心动图的检测证明一个诊断出 ARF 的病人已经发生了 RHD。至今为止, 还没有对于 GAS 感染产生的患有 RHD 或有发展 RHD 风险的个体的诊断方法。

发明内容

[0006] 本发明涉及到鉴定 GAS 感染引起的患有或者有发生 RHD 风险的个体的方法。本发明也涉及到在这些方法中应用的蛋白质阵列。本发明同时也提供预防和治疗 GAS 感染相关 RHD 的方法和组合物。

[0007] 诊断方法

[0008] 本发明提供了在病人中诊断 GAS 感染相关的风湿性心脏病 (RHD), 或者鉴定一个病人有发生 GAS 相关 RHD 风险的方法, 所述方法包括如下步骤:

[0009] a) 将一个病人的生物样品接触至少一个 GAS 抗原, 接触条件适合该生物样品中存在的任何抗体结合至少一个 GAS 抗原, 并且

[0010] b) 将病人生物样品的抗体对至少一个 GAS 抗原的反应性与健康个体的对照生物样品的抗体对至少一个 GAS 抗原的反应性作比较,

[0011] 其中, 病人生物样品的反应性低于健康个体的对照生物样品指示了该病人患有 GAS 感染相关风湿性心脏病 (RHD), 或者该病人有发展 GAS 感染相关 RHD 的风险。

[0012] 在一方面, 本发明提供了在病人中诊断 GAS 感染相关风湿性心脏病 (RHD), 或者鉴

定一个病人有发生 GAS 感染相关 RHD 风险的方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] a) 将病人的生物样品接触选自含以下氨基酸序列的组的至少一个 GAS 抗原:

[0014] SEQ ID NO:1 (GAS5)

[0015] SEQ ID NO:2 (GAS5F)

[0016] SEQ ID NO:3 (GAS25)

[0017] SEQ ID NO:4 (GAS40)

[0018] SEQ ID NO:5 (GAS57)

[0019] SEQ ID NO:6 (GAS97)

[0020] SEQ ID NO:7 (GAS80),和

[0021] SEQ ID NO:8 (SpeA),

[0022] 或者其功能等价物,接触条件适合所述生物样品中存在的任何抗体结合至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物;

[0023] b) 评价与至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物结合的病人生物样品的任何抗体反应性,和

[0024] c) 将步骤 b) 中的反应性与结合至少一个 GAS 抗原或者其功能等价物的健康个体的对照生物样品的抗体反应性作比较,

[0025] 其中,病人生物样品的反应性低于健康个体的对照生物样品指示了该病人患有 GAS 感染相关风湿性心脏病(RHD),或者该病人有发展 GAS 感染相关 RHD 的风险。

[0026] 术语“风湿性心脏病(RHD)”涵盖了急性风湿热影响心脏的情况,包括二尖瓣和/或动脉瓣的损害,心肌炎和心包炎。

[0027] 对于受 RHD 影响的病人和健康个体的血清样品分析产生令人惊讶的发现,与 RHD 健康个体的血清反应性相比,受 RHD 影响病人的血清显示与某些 GAS 抗原有显著较低的反应性。这些发现提供首要的证据,与 GAS 抗原的反应性能用来区分从健康个体得到的血清和从 RHD 病人得到的血清。具体地说,RHD 病人的血清显示了与下表 1 鉴定的 8 个 GAS 抗原的低反应性:

[0028] 表 1:本发明诊断方法中应用的 GAS 抗原。

[0029]

[0030]

SEQ ID NO	内部 GAS 参考	Spy 号	gi 号
1	GAS5	spy0019	gi-15674263
2	GAS5F	spy0019 (氨基酸 224-398 的片段)	gi-15674263
3	GAS25	spy0167	gi-15674372
4	GAS40	spy0269	gi-15674449
5	GAS57	spy0416	gi-15674549
6	GAS97	spy1801	gi-15675636
7	GAS380	spy1813	gi-15675644
8	SpeA	spyM3_1301	gi-21910837

[0031] 与健康个体的对照样品反应性相比较,病人样品中这 8 个 GAS 抗原低反应性的检测能因此用于诊断 GAS 感染相关 RHD 或者鉴定病人发生 GAS 感染相关 RHD 的风险增加。相反地,检测病人样品中这 8 个 GAS 抗原的抗体反应性与健康个体的对照样品反应性相似,指示了该病人没有 RHD,并且发生 GAS 感染相关 RHD 的风险较低。

[0032] 本发明的方法可以包括将病人样品接触上述的 1、2、3、4、5、6、7 或者所有 8 个 GAS 抗原,或者其功能等价物。

[0033] 病人的生物样品接触两个 GAS 抗原时,所述方法可以包括将样品接触:SEQ ID NO:1 和 2;SEQ ID NO:1 和 3;SEQ ID NO:1 和 4;SEQ ID NO:1 和 5;SEQ ID NO:2 和 3;SEQ ID NO:2 和 4;SEQ ID NO:2 和 5;SEQ ID NO:3 和 4;SEQ ID NO:3 和 5;SEQ ID NO:4 和 5,或者其功能等价物。该方法也可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1 和 6;SEQ ID NO:1 和 7;SEQ ID NO:1 和 8;SEQ ID NO:2 和 6;SEQ ID NO:2 和 7;SEQ ID NO:2 和 8;SEQ ID NO:3 和 6;SEQ ID NO:3 和 7;SEQ ID NO:3 和 8;SEQ ID NO:4 和 6;SEQ ID NO:4 和 7;SEQ ID NO:4 和 8;SEQ ID NO:5 和 6;SEQ ID NO:5 和 7;SEQ ID NO:5 和 8;SEQ ID NO:6 和 7;SEQ ID NO:6 和 8,或 SEQ ID NO:7 和 8,或者其功能等价物。

[0034] 病人的生物样品接触三个 GAS 抗原时,所述方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意三个 GAS 抗原的组合。例如,该方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2 和 3;SEQ ID NO:1、3 和 4;SEQ ID NO:1、4 和 5;SEQ ID NO:2、3 和 4;SEQ ID NO:2、4 和 5;或 SEQ ID NO:3、4 和 5,或者其功能等价物。

[0035] 病人的生物样品接触四个 GAS 抗原时,所述方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意四个 GAS 抗原的组合。例如,该方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2、3 和 4;SEQ ID NO:2、3、4 和 5;SEQ ID NO:1、3、4 和 5,或者其功能等价物。

[0036] 病人的生物样品接触五个 GAS 抗原时,所述方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意五个 GAS 抗原的组合。例如,该方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2、3、4 和 5,或者其功能等价物。

[0037] 病人的生物样品接触 6 个 GAS 抗原时,所述方法可以包括将样品接触 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意六个 GAS 抗原的组合。

[0038] 病人的生物样品接触 7 个 GAS 抗原时,所述方法可以包括将样品接触:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6 和 7;SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、4、5、6、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、3、4、5、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6 和 8,或者其功能等价物。

[0039] 或者,病人的生物样品可接触所有的 8 个 GAS 抗原,即,接触 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8,或者其功能等价物。

[0040] 将结合病人生物样品中 1、2、3、4、5、6、7 或者所有 8 个这些 GAS 抗原或者其功能等价物的抗体反应性与结合健康个体的对照生物样品中这些 GAS 抗原的抗体反应性作比较。将健康个体的对照生物样品接触与病人生物样品相同的 GAS 抗原组合。一般,与这些 GAS 抗原组合结合的抗体的平均反应性已经在健康个体对照生物样品中确定。评价抗体反应性的合适方法在本领域已知,并且在下面有更加详细的描述。

[0041] 抗体检测:

[0042] 上述的发明方法都包括抗体反应性评价,即,检测结合 GAS 抗原的抗体和这些抗体的效价。检测结合抗原的抗体和测定抗体效价的方法为本领域技术人员熟知,并且可使用任何一种这类技术。

[0043] 例如,GAS 抗原(或功能等价物)会在表面的已知位点固定,比如在下述阵列的表面。固定的抗原可以在允许样品中存在的任何抗体结合抗原的条件下,用固定的抗原孵育。合适的孵育期可以约为 1 小时。接着清洗移除任何未结合的抗体,检测结合抗原的抗体可以用结合并识别所结合抗体的实体来实现。

[0044] 例如,在上述任何方法中评价结合 GAS 抗原的任何抗体反应性的步骤可以包括将生物样品和 GAS 抗原接触标记的二抗,如标记的抗 IgG 抗体,接触条件适合二抗与已经结合固定 GAS 抗原的生物样品中任何抗体的结合。

[0045] 二抗如所述抗 IgG 抗体可以标记有一个荧光或者酶标记,从而所述二抗的结合并且因此生物样品中 GAS 抗原的抗体的存在,通过检测所述标记物而测得。标记为荧光标记物时,荧光强度的比较可用于评价相对抗体反应性,并因而确定是否有一个具体病人样品显示了比对照生物样品更低的抗体反应性。背景荧光强度可预期达到大约 5,000。考虑到标准偏差,至少为 15,000 的荧光强度可指示样品中存在结合 GAS 抗原的抗体。至少为 30,000 的荧光强度可视作指示样品中结合 GAS 抗原的抗体的高效价。在本发明的某些方面,15,000-30,000 的荧光强度可因此指示可能与 RHD 相关的低反应性。

[0046] 上述方法可以在蛋白质阵列上操作,如下面更详细描述了的阵列或者使用标准 ELISA 或者斑点杂交技术。

[0047] 生物样品:

[0048] 在发明方法中检测的生物样品可以是任何已知包括针对 GAS 抗原的抗体的样品。合适样品的示例是唾液样品,血液样品或者血清样品。具体地,所述样品可以是血清样品。

[0049] 病人生物样品来自人类病人。人类病人可以是成人,约 12 岁 - 约 18 岁的青少年,或者小于 12 岁的儿童。病人可以显示临床症状,如急性风湿病,包括游走性多关节炎;心脏炎;皮下节结;边缘性红斑;薛登汉氏舞蹈病,发热;关节痛;红细胞沉降率或者 C 反应蛋白增加;白细胞增多;或 ECG 显示心传导阻滞特征。病人可以显示出有 GAS 感染的迹象。在一些病例中,病人可以对现有 GAS 感染和急性风湿病无症状。

[0050] 对照生物样品可以来自于与病人生物样品所处地理位置相同的健康个体。

[0051] 发明的方法可以在体外操作。发明的方法还包括从病人获取生物样品的步骤。

[0052] 蛋白质阵列:

[0053] 为了促进对多个 GAS 抗原的生物样品的同时筛选,本发明方法中使用的 GAS 抗原可以在一个或者多个蛋白质阵列上展示。例如,各 GAS 抗原可在一个单独的阵列上展示或者单个阵列可以同时展示多个 GAS 抗原。根据本发明的另一个方面,提供了蛋白质阵列。这些阵列适用于上述任何方法。

[0054] 发明提供一个蛋白质阵列,该阵列包括至少两个具有选自下组氨基酸序列的 GAS 抗原:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7 或者 SEQ ID NO:8,或者其功能等价物中。

[0055] 该蛋白质阵列可以包括 2、3、4、5、6、7 或者所有 8 个这些 GAS 抗原或者其功能等价物。

[0056] 所述阵列包括两个 GAS 抗原时,其可以包括含以下氨基酸序列的抗原:SEQ ID NO:1 和 2;SEQ ID NO:1 和 3;SEQ ID NO:1 和 4;SEQ ID NO:1 和 5;SEQ ID NO:2 和 3;SEQ ID NO:2 和 4;SEQ ID NO:2 和 5;SEQ ID NO:3 和 4;SEQ ID NO:3 和 5;SEQ ID NO:4 和 5,或者其功能等价物。或者,阵列可包括含以下氨基酸序列的抗原:SEQ ID NO:1 和 6;SEQ ID NO:1 和 7;SEQ ID NO:1 和 8;SEQ ID NO:2 和 6;SEQ ID NO:2 和 7;SEQ ID NO:2 和 8;SEQ ID NO:3 和 6;SEQ ID NO:3 和 7;SEQ ID NO:3 和 8;SEQ ID NO:4 和 6;SEQ ID NO:4 和 7;SEQ ID NO:4 和 8;SEQ ID NO:5 和 6;SEQ ID NO:5 和 7;SEQ ID NO:5 和 8;SEQ ID NO:6 和 7;SEQ ID NO:6 和 8,或 SEQ ID NO:7 和 8,或者其功能等价物。

[0057] 所述阵列包括三个 GAS 抗原时,其可以包括 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意 3 个 GAS 抗原的组合。例如,该阵列可包括的 GAS 抗原具有:SEQ ID NO:1、2 和 3;SEQ ID NO:1、3 和 4;SEQ ID NO:1、4 和 5;SEQ ID NO:2、3 和 4;SEQ ID NO:2、4 和 5;或 SEQ ID NO:3、4 和 5,或者其功能等价物。

[0058] 所述阵列包括四个 GAS 抗原时,其可以包括 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意 4 个 GAS 抗原的组合。例如,该阵列可包括的 GAS 抗原具有:SEQ ID NO:1、2、3 和 4;SEQ ID NO:2、3、4 和 5;SEQ ID NO:1、3、4 和 5,或者其功能等价物。

[0059] 所述阵列包括五个 GAS 抗原时,其可以包括 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意 5 个 GAS 抗原的组合。例如,该阵列可包括的 GAS 抗原具有:SEQ ID NO:1、2、3、4 和 5,或者其功能等价物。

[0060] 所述阵列包括 6 个 GAS 抗原时,其可以包括 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8 中任意 6 个的组合。

[0061] 所述阵列包括 7 个 GAS 抗原时,其可包括的 GAS 抗原具有:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6 和 7;SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、4、5、6、7 和 8;SEQ ID NO:1、2、3、5、

6、7 和 8 ;SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7 和 8 ;SEQ ID NO:1、2、3、4、5、7 和 8 ;SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6 和 8,或者其功能等价物。

[0062] 或者,所述阵列可以包括所有的 8 个 GAS 抗原,即,SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 和 8,或者其功能等价物。

[0063] 蛋白质阵列可以包括另外的 GAS 抗原。

[0064] 本领域已知的任何一种蛋白质阵列可用于本发明方法。蛋白质阵列的生产描述于 Cretich, M., Damin F. 等(Biomolecular Engineering 23,77-88 (2006))和 Zhu, H 和 Snyder, M. (Current Opinion in Chemical Biology,7:55-63 (2003))。

[0065] 例如,蛋白质阵列可以是固定一个或者多个抗原的载玻片。最简单的形式,所述阵列可以是显示一个样品抗原的载玻片,该玻片用来简单方法制备,即用烯丙硫脲(安索格(Ansorge),法尔史提希(Faulstich))涂覆显微镜玻片,向玻片添加包含抗原的试剂并干燥。涂覆有烯丙硫脲的玻片可以从 Telechem 和皮尔斯(Pierce)获得以用于包被抗原。

[0066] 或者,阵列可以显示多个抗原。比如,硝化纤维覆盖的玻片可以用纳升级的多个 GAS 抗原来点样。该阵列可以显示重复的各 GAS 抗原。该阵列上的抗原点直径约为 150 并且包括大约 0.35 的蛋白质。

[0067] 其他蛋白质阵列类型包括三维胶板和微孔阵列。就如对有技术的读者显而易见的,尚未考虑到但是将来会设计出的蛋白质阵列种类,可以被很好地证明适合根据现有发明应用。

[0068] 本发明还提供一个试剂盒,包括根据发明的蛋白质阵列和使用所述阵列诊断病人患有 GAS 感染相关风湿性心脏病或者有发展 GAS 感染相关风湿性心脏病的风险的说明。

[0069] 用于治疗 and 预防 RHD 的方法和组合物

[0070] 目前,抗生素预防(一般是青霉素)推荐用于所有诊断有至少 5 年 ARF 的病人,以降低随后 GAS 感染和发展 RHD 的风险。确定哪个病人有 RHD 危险和哪个病人没有 RHD 危险,可改进已诊断有 ARF 的病人们的医学治疗。

[0071] 发明提供了,当病人由本发明方法鉴定为患 GAS 感染相关 RHD 或者发展 GAS 感染相关 RHD 的风险增加时,病人可以用抗生素来治疗。相反地,当一个病人用本发明方法鉴定为发展 GAS 感染相关 RHD 的风险低时,抗生素治疗可能不是必须的。

[0072] 发明人对于健康个体血清显示与上述 GAS 抗原的高反应性的实现指示 GAS 抗原的抗体可以在预防 RHD 发展中起保护性作用。本发明因此提供了一个组合物,所述组合物包括选自含以下氨基酸序列组的至少一个 GAS 抗原:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8, 或者其功能等价物。本发明也提供了一个组合物,所述组合物包括的至少一个抗体特异性结合选自含以下氨基酸序列组的至少一个 GAS 抗原:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8, 或者其功能等价物。这些组合物可以是免疫原性组合物,如疫苗组合物。

[0073] 根据另一个方面,本发明提供一个治疗或者预防 GAS 感染相关 RHD 的方法,包括对一个有需要病人给予选自含以下氨基酸序列组的至少一个 GAS 抗原:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8,或者其功能等价物。本发明还提供选自含以下氨基酸序列组的至少一个 GAS 抗原:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或 8,或者其功能等价物,用于治疗或者预防 GAS 感染相关的 RHD。本发明还提供使用选自含以下氨基酸序列组的至少一个 GAS 抗原:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8,或者其功能等价物,用于治疗或者预防 GAS 感染相关 RHD 的药物生产。

或者,使用编码这些 GAS 抗原的核酸分子。

[0074] 本发明还提供治疗或者预防 GAS 感染相关 RHD 的方法,包括对一个有需要病人给予特异性结合至少一个 GAS 抗原的至少一个抗体,所述抗原选自含以下氨基酸序列的组: SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8,或者其功能等价物。本发明还提供特异性结合至少一个 GAS 抗原的至少一个抗体用于治疗或者预防 GAS 感染相关的 RHD,所述抗原选自含以下氨基酸序列的组: SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8,或其功能等价物。本发明还提供使用特异性结合至少一个 GAS 抗原的至少一个抗体生产治疗或者预防 GAS 感染相关 RHD 的药物,所述抗原选自含以下氨基酸序列的组: SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7 或者 8,或者其功能等价物。

[0075] 本发明的抗体通常会以 1,100,10,1,100 或者更紧密的亲合性特异性结合 GAS 抗原。术语“抗体”包括完整的免疫球蛋白分子,以及其能结合多肽的片段。它们包括杂交(嵌合)抗体分子[1,2];F(ab')₂和 F(ab) 片段和 Fv 分子;非共价异源二聚体[3,4];单链 Fv 分子(sFv)[5];二聚和三聚抗体片段构建物;微型抗体[6,7];人源化抗体分子[8-10];任何获自此类分子的功能性片段,以及通过非常规方法如噬菌体展示获得的抗体。在一些实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。获取单克隆抗体的方法为本领域熟知。在一些实施方式中,所述抗体是人源化或完全是人的抗体。

[0076] 本发明治疗的组合物和方法可以用上述 1、2、3、4、5、6、7 或者所有 8 个 GAS 抗原,或者与 1、2、3、4、5、6、7 和所有 8 个这种 GAS 抗原特异性结合的抗体。可使用 GAS 抗原和特异性结合这些抗原的抗体的组合。

[0077] 可用本该发明这些方面治疗的组合物和方法的 GAS 抗原组合的实例包括: SEQ ID NO:1 和 2; SEQ ID NO:1 和 3; SEQ ID NO:1 和 4; SEQ ID NO:1 和 5; SEQ ID NO:2 和 3; SEQ ID NO:2 和 4; SEQ ID NO:2 和 5; SEQ ID NO:3 和 4; SEQ ID NO:3 和 5; SEQ ID NO:4 和 5; SEQ ID NO:1 和 6; SEQ ID NO:1 和 7; SEQ ID NO:1 和 8; SEQ ID NO:2 和 6; SEQ ID NO:2 和 7; SEQ ID NO:2 和 8; SEQ ID NO:3 和 6; SEQ ID NO:3 和 7; SEQ ID NO:3 和 8; SEQ ID NO:4 和 6; SEQ ID NO:4 和 7; SEQ ID NO:4 和 8; SEQ ID NO:5 和 6; SEQ ID NO:5 和 7; SEQ ID NO:5 和 8; SEQ ID NO:6 和 7; SEQ ID NO:6 和 8,或 SEQ ID NO:7 和 8; SEQ ID NO:1、2 和 3; SEQ ID NO:1、3 和 4; SEQ ID NO:1、4 和 5; SEQ ID NO:2、3 和 4; SEQ ID NO:2、4 和 5; SEQ ID NO:3、4 和 5; SEQ ID NO:1、2、3 和 4; SEQ ID NO:2、3、4 和 5; SEQ ID NO:1、3、4 和 5; SEQ ID NO:1、2、3、4 和 5; SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6 和 7; SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7 和 8; SEQ ID NO:1、2、4、5、6、7 和 8; SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7 和 8; SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7 和 8; SEQ ID NO:1、2、3、4、5、7 和 8; SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6 和 8,或者其功能等价物。也可以应用结合这些 GAS 抗原组合的抗体。

[0078] 上述的组合物和方法可以普遍用于 GAS 感染的治疗和预防,以及 GAS 感染相关的 RHD 的治疗和预防。

[0079] RHD 治疗和预防的组合物制剂

[0080] 如上所述,本发明组合可用作疫苗。本发明疫苗可以是预防性(即预防感染)或治疗性(即治疗感染)疫苗,但一般是预防性疫苗。

[0081] 因此,组合物可以是药学上可接受的。除抗原外,它们通常还包含其它组分,例如它们一般包含一种或多种药物载体和/或赋形剂。

[0082] 组合物通常以水性形式给予人体。然而在给药前,该组合物可以是非水性形式。例

如,虽然一些疫苗制备成水性形式后以水性形式填装、分销和给药,但其他疫苗在制备过程中冻干,并在使用时重建成水性形式。因此,本发明组合物可干燥,例如冻干制剂。

[0083] 该组合物可含有防腐剂,如硫柳汞或 2- 苯氧乙醇。然而,疫苗优选应基本不含(即小于 $5\mu\text{g/ml}$)含汞物质,如不含硫柳汞。无汞的疫苗更为常见。特别优选不含防腐剂的疫苗。

[0084] 为了提高热稳定性,组合物可包含温度保护剂。这种试剂的更多详情如下所述。

[0085] 为了控制张力,通常包含生理性盐如钠盐。广泛应用氯化钠(NaCl),它的浓度可以是 $1\text{--}20\text{mg/ml}$,例如约 $10\pm 2\text{mg/ml}$ NaCl 。可存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。

[0086] 组合物的渗透压通常为 200mOsm/kg – 400mOsm/kg ,更常为 $240\text{--}360\text{mOsm/kg}$,更典型为 $290\text{--}310\text{mOsm/kg}$ 。

[0087] 组合物可含有一种或多种缓冲剂。典型的缓冲剂包括:磷酸盐缓冲液;Tris 缓冲剂;硼酸盐缓冲剂;琥珀酸盐缓冲剂;组氨酸缓冲剂(具体是有氢氧化铝佐剂);或柠檬酸盐缓冲剂。包含的缓冲剂一般是 $5\text{--}20\text{mM}$ 。

[0088] 组合物的 pH 通常为 $5.0\text{--}8.1$,更常为 $6.0\text{--}8.0$,例如 $6.5\text{--}7.5$,或者 $7.0\text{--}7.8$ 。

[0089] 所述组合物通常无菌。该组合物通常也无热原,如每剂量含有 $<1\text{EU}$ (内毒素单位,标准量度),比如每剂量 $<0.1\text{EU}$ 。该组合物经常不含谷蛋白。

[0090] 所述组合物可含有一次免疫的物质,或者可含有多次免疫的物质(即‘多剂量’药盒)。多剂量配置一般含有防腐剂。作为多剂量组合物中包含防腐剂的替代方案(或补充方案),所述组合物可包含在装有无菌接头以取出物质的容器中。

[0091] 人疫苗的给药剂量体积一般为约 0.5ml ,但可将一半剂量(即约 0.25ml)给予儿童。

[0092] 本发明组合物也可包含一种或多种免疫调节剂。通常,一种或多种免疫调节剂包括一种或多种佐剂。佐剂可包括 TH1 佐剂和 / 或 TH2 佐剂,详述见下。

[0093] 可以用于本发明组合物的佐剂包括但不限于:

[0094] A. 含矿物质的组合物

[0095] 本发明中适合用作佐剂的含有矿物质的组合物包括矿物盐,例如铝盐和钙盐(或其混合物)。钙盐包括磷酸钙(如参考文献 11 公开的“CAP”颗粒)。铝盐包括氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等,所述盐可采用任何合适形式(例如凝胶、结晶、非晶态形式等)。经常采用吸附于这些盐。也可将含有矿物质的组合物制成金属盐的颗粒 [12]。

[0096] 可采用称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规的,但是为方便使用,其不是存在的实际化合物的精确描述(如见参考文献 13 第 9 章)。本发明能使用广泛用作佐剂的“氢氧化物”或者“磷酸盐”佐剂的任何一个。称为“氢氧化铝”的佐剂一般是羟基氧化铝盐(通常至少部分为晶体)。称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝,也常常含有少量硫酸盐(即羟基磷酸硫酸铝)。可通过沉淀获得这些佐剂,沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中羟基的程度。

[0097] 氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态(例如,电子透射显微照片所见的)。氢氧化铝佐剂的 pI 通常约 11,即在生理 pH 下佐剂本身具有表面正电荷。据报道,pH 7.4 时,氢氧化铝佐剂的吸附能力为每 mg Al^{+++} $1.8\text{--}2.6\text{mg}$ 蛋白质。

[0098] 磷酸铝佐剂的 PO_4/Al 摩尔比通常为0.3-1.2,比如0.8-1.2,一般为 0.95 ± 0.1 。磷酸铝通常是无定形的,尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为0.84-0.92的无定形的羟基磷酸铝,包含 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。磷酸铝通常是颗粒(如在透射电子显微镜照片上观察到的板状形态)。抗原吸附后颗粒直径一般是 $0.5\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ (如约 $5\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$)。据报道,pH 7.4时磷酸铝佐剂的吸附容量为每毫克 Al^{+++} 0.7-1.5毫克蛋白质。

[0099] 磷酸铝的零电点(PZC)与磷酸根对羟基的取代程度逆相关,这种取代程度的变化可能取决于用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(更多磷酸根=更酸性PZC)或加入缓冲剂如组氨酸缓冲剂(使PZC碱性更强)改变PZC。本发明所用的磷酸铝的PZC通常为4.0-7.0,如5.0-6.5,例如约为5.7。

[0100] 用于制备本发明组合物的铝盐悬浮液可以但不必需,含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸或Tris缓冲液)。该悬浮液经常为无菌且无热原。悬浮液可含有游离的水性磷酸根离子,如存在浓度为 $1.0\text{-}20\text{mM}$,如 $5\text{-}15\text{mM}$,例如约 10mM 。该悬浮液也可含有氯化钠。

[0101] 本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝的混合物。在这种情况下,磷酸铝比氢氧化铝多,例如重量比为至少2:1,例如 $\geq 5:1$ 、 $\geq 6:1$ 、 $\geq 7:1$ 、 $\geq 8:1$ 、 $\geq 9:1$ 等。

[0102] 给予哺乳动物的组合物中 Al^{+++} 的浓度典型小于 $10\text{mg}/\text{ml}$,例如 $\leq 5\text{mg}/\text{ml}$ 、 $\leq 4\text{mg}/\text{ml}$ 、 $\leq 3\text{mg}/\text{ml}$ 、 $\leq 2\text{mg}/\text{ml}$ 、 $\leq 1\text{mg}/\text{ml}$ 等。优选范围是 $0.3\text{-}1\text{mg}/\text{ml}$ 。优选 $0.85\text{mg}/\text{剂}$ 的最大值。

[0103] 特别优选磷酸铝,尤其是在包含流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)糖抗原的组合物中,典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为0.84-0.92的无定形羟基磷酸铝,含量为 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。可采用低剂量磷酸铝吸附,如每剂量 $50\text{-}100\text{ }\mu\text{g Al}^{3+}$ /偶联物。当组合物中含有一种以上偶联物时,不需要吸附所有偶联物。

[0104] B. 油乳剂

[0105] 适合用作本发明佐剂的油乳剂组合物包含鲨烯-水乳剂,如MF59[参考文献13的第10章;也参见参考文献14](5%鲨烯、0.5%吐温80和0.5%司盘85,用微流化床配制成亚微米颗粒)。也可以使用完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。

[0106] 已知各种水包油乳剂,它们通常包括至少一种油和至少一种表面活性剂,所述油和表面活性剂是可生物降解(可代谢)和生物相容的。乳剂中的油滴直径通常小于 $5\text{ }\mu\text{m}$,理想情况下具有亚微米直径,通过微流化床实现这种小尺寸以提供稳定乳剂。优选尺寸小于 220nm 的液滴,因为其可进行过滤灭菌。

[0107] 所述乳液可以包含如动物(如鱼)或植物来源的油。植物油的来源包括坚果、种籽和谷物。最常见的花生油、大豆油、椰子油和橄榄油是坚果油的示例。可以使用例如获自霍霍巴豆的霍霍巴油。种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻籽油等。在谷物油中,最常见的是玉米油,但也可以使用其它谷类的油,如小麦、燕麦、黑麦、稻、画眉草、黑小麦等。可从坚果和种籽油开始,通过水解、分离和酯化合适物质制备甘油和1,2-丙二醇的6-10碳脂肪酸酯,其不是种籽油中天然产生。来自哺乳动物乳汁的脂肪和油类是可代谢的,因此可以用于实施本发明。获得动物来源纯油所必需的分离、纯化、皂化和其它方法的过程为本领域熟知。大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如,鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和诸如鲸蜡的鲸油是可以用于本文的几种鱼油的示例。通过生化途径用5-碳异戊二烯单位合成许多支链油,其总称为萜类。鲨鱼肝油含有称为角鲨烯的支链不饱和萜类化合物2,6,10,15,19,

23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯,其为本文特别优选。角鲨烯的饱和类似物角鲨烷也是优选的油。包括角鲨烯和角鲨烷在内的鱼油,易于从商业来源获得,或可以通过本领域已知的方法获得。其它优选油是生育酚(见下)。可以使用油的混合物。

[0108] 表面活性剂可以按其‘HLB’(亲水/亲脂平衡)分类。本发明优选的表面活性剂的HLB至少为10,例如至少15,如至少16。可以与本发明一起使用的表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温),特别是聚山梨酯20和聚山梨酯80;以商品名DOWFAX™出售的环氧乙烷(E0)、环氧丙烷(P0)和/或环氧丁烷(B0)的共聚物,如直链EP/P0嵌段共聚物;重复的乙氧基(氧-1,2-乙二基)数量不同的辛苯聚醇,特别感兴趣的是辛苯聚醇9(曲通(Triton)X-100,或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇);(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPALCA-630/NP-40);磷脂,如磷脂酰胆碱(卵磷脂);壬酚乙醇酯,如Tergitol™NP系列;衍生自月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为苳泽(Brij)表面活性剂),如三甘醇单月桂基醚(苳泽30);以及脱水山梨糖醇酯(通常称为司盘(SPAN)),如脱水山梨糖醇三油酸酯(司盘85)和脱水山梨糖醇单月桂酸酯。优选非离子型表面活性剂。乳液中包含的表面活性剂优选吐温80(聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)、司盘85(去水山梨糖醇三油酸酯)、卵磷脂和曲通X-100。

[0109] 可使用表面活性剂的混合物,如吐温80/司盘85混合物。聚氧乙烯去水山梨糖醇酯如聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯(吐温80)和辛苯聚醇如叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(曲通X-100)的组合也适合。另一种有用的组合包含月桂醇聚醚-9加聚氧乙烯去水山梨糖醇酯和/或辛苯聚醇。

[0110] 优选的表面活性剂的含量(重量%)为:聚氧乙烯去水山梨糖醇酯(如吐温80)0.01-1%,特别是约0.1%;辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如曲通X-100或曲通系列的其它去污剂)0.001-0.1%,特别是0.005-0.02%;聚氧乙烯醚(如月桂醇聚醚9)0.1-20%,比如0.1-10%,特别是0.1-1%或约0.5%。

[0111] 优选乳液佐剂的平均液滴大小为 $<1\mu\text{m}$,例如 $\leq 750\text{nm}$ 、 $\leq 500\text{nm}$ 、 $\leq 400\text{nm}$ 、 $\leq 300\text{nm}$ 、 $\leq 250\text{nm}$ 、 $\leq 220\text{nm}$ 、 $\leq 200\text{nm}$ 或更小。可通过某些技术如微流化等方便地获得这些液滴尺寸。

[0112] 本发明所用的具体水包油乳液佐剂包括但不限于:

[0113] • 角鲨烯、吐温80(Tween 80)和司盘(Span)85的亚微米乳液。所述乳液的体积组成可以是约5%角鲨烯、约0.5%聚山梨酯80和约0.5%司盘85。以重量计,这些比例为4.3%角鲨烯、0.5%聚山梨酯80和0.48%司盘85。这种佐剂称为‘MF59’[15-17],参考文献18的第10章和参考文献19的第12章更详细地描述了该佐剂。所述MF59乳液宜包含柠檬酸根离子,例如10mM柠檬酸钠缓冲液。

[0114] • 鲨烯、生育酚和聚山梨酯80(吐温80)的乳液。所述乳液可包含磷酸盐缓冲盐水。其还可包含司盘85(例如1%)和/或卵磷脂。这些乳液可含有2-10%鲨烯、2-10%生育酚和0.3-3%吐温80,鲨烯:生育酚的重量比通常为 ≤ 1 ,因为这能使乳液更稳定。角鲨烯和吐温80的体积比可以约为5:2,或者重量比约为11:5。可通过下述方法制备一种此类乳液:将吐温80溶解于PBS得到2%溶液,然后将90ml该溶液与5g DL- α -生育酚和5ml鲨烯的混合物混合,然后微流体化该混合物。得到的乳液可含有(如)平均直径为100-250nm,经常是约180nm的亚微米油滴。所述乳液也可含有3-脱-O-酰化单磷酸脂质A(3d-MPL)。

此种类型的另一有用乳液可包含（每人剂量）0.5-10mg 鲨烯、0.5-11mg 生育酚和 0.1-4mg 聚山梨酯 80[20]。

[0115] • 鲨烯、生育酚和曲通去污剂（如曲通 X-100）的乳液。该乳液也可包含 3d-MPL（见下）。所述乳液可包含磷酸盐缓冲液。

[0116] • 含有聚山梨酯（如聚山梨酯 80）、曲通去污剂（如曲通 X-100）和生育酚（如琥珀酸 α -生育酚）的乳液。该乳液可包含这三种组分，其质量比约为 75:11:10（如 750 μ g/ml 聚山梨酯 80、110 μ g/ml 曲通 X-100 和 100 μ g/ml 琥珀酸 α -生育酚），这些浓度应包括抗原中这些组分的贡献。所述乳液还可包含鲨烯。该乳液也可包含 3d-MPL（见下）。所述水相可包含磷酸盐缓冲液。

[0117] • 鲨烷、聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 401（“普流罗尼克™ L121”（“Pluronic™ L121”））的乳液。所述乳液可用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水配制。该乳液是一种有用的胞壁酰二肽递送载体，已与苏氨酸-MDP 一起用于“SAF-I”佐剂 [21]（0.05-1%Thr-MDP、5% 鲨烯、2.5% 普流罗尼克（Pluronic）L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80）中。也可不与 Thr-MDP 一起使用，例如用“AF”佐剂 [22]（5% 鲨烯、1.25% 普流罗尼克 L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80）。优选微流体化。

[0118] • 含有鲨烯、水性溶剂、聚氧乙烯烷基醚亲水性非离子型表面活性剂（如聚氧乙烯（12）十六十八醚）和疏水性非离子型表面活性剂（如去水山梨糖醇酯或二缩甘露醇酯，如去水山梨糖醇单油酸酯或‘司盘 80’）的乳液。该乳剂通常为热可逆的和 / 或其中至少 90% 油滴（以体积计）尺寸小于 200nm[23]。该乳液也可含有以下一种或多种物质：糖醇；低温保护剂（例如，糖，如十二烷基麦芽苷和 / 或蔗糖）；和 / 或烷基糖苷。该乳液可包含 TLR4 激动剂 [24]。这类乳液可冻干。

[0119] • 角鲨烯、泊洛沙姆-105 和 Abil-Care 的乳液 [25]。含佐剂疫苗中这些组分的终浓度（重量）是 5% 鲨烯、4% 泊洛沙姆-105（普流罗尼多元醇）和 2%Abil-Care 85（双-PEG/PPG-16/16PEG/PPG-16/16 二甲硅油；辛酸 / 癸酸甘油三酯）。

[0120] • 含有 0.5-50% 油、0.1-10% 磷脂和 0.05-5% 非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献 26 所述，优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。优选亚微米液滴尺寸。

[0121] • 不可代谢油（如轻质矿物油）和至少一种表面活性剂（如卵磷脂、吐温 80 或司盘 80）的亚微米水包油乳液。可包含添加剂，例如 QuilA 皂苷、胆固醇、皂苷-亲脂偶联物（如通过葡萄糖醛酸的羧基将脂族胺加到脱酰基皂苷上而产生的 GPI-0100，如参考文献 27 所述）、二甲基双十八烷基溴化铵和 / 或 N,N-双十八烷基-N,N-双（2-羟乙基）丙二胺。

[0122] • 皂苷（如 QuilA 或 QS21）和固醇（如胆固醇）结合成螺旋胶束的乳液 [28]。

[0123] • 包含矿物油、非离子亲脂性乙氧基化脂肪醇和非离子亲水性表面活性剂（例如，乙氧基化脂肪醇和 / 或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物）的乳液 [29]。

[0124] • 包含矿物油、非离子亲脂水性乙氧基化脂肪醇和非离子亲脂性表面活性剂（例如，乙氧基化脂肪醇和 / 或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物）的乳液 [29]。

[0125] 在一些实施方式中，可在递送时临时将乳液与抗原混合，因此所述佐剂和抗原可单独地保存在包装或分销的疫苗中，以便在使用时配制成最终制剂。在其它实施方式中，在生产过程中将乳液与抗原混合，因此所述组合物以液体佐剂形式包装。所述抗原通常是

水性形式,从而最终通过混合两种液体制备疫苗。所述两种液体的混合体积比可变(例如 5:1-1:5),但通常约为 1:1。上述对具体乳液的说明给出组分浓度时,这些浓度通常用于非稀释组合物,因此与抗原溶液混合后浓度降低。

[0126] 当组合物包含生育酚时,可采用 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 或 ξ 生育酚中的任何一种,但优选 α -生育酚。生育酚可取多种形式,例如不同的盐和 / 或异构体。盐包括有机盐,例如琥珀酸盐、乙酸盐、烟酸盐等。可同时采用 D- α -生育酚和 DL- α -生育酚。用于老年人(如年龄为 60 岁或更大的患者)的疫苗中宜包含生育酚,因为据报道维生素 E 在此患者群体中对免疫应答有正面作用 [30]。它们也具有抗氧化特性,这种特性有助于稳定该乳液 [31]。优选的 α -生育酚是 DL- α -生育酚,此种生育酚的优选盐是琥珀酸盐。发现琥珀酸盐在体内能与 TNF 相关配体协作。

[0127] C. 皂苷制剂 [参考文献 13 的第 22 章]

[0128] 皂苷制剂也可以用作本发明的佐剂。皂苷是在许多种类植物的树皮、叶、茎干、根甚至花中发现的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群体。已广泛研究了作为佐剂的来自皂树 (*Quillaia saponaria* Molina) 树皮的皂苷。皂苷也可购自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜)、满天星 (*Gypsophilla paniculata*) (婚纱花) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) (皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21, 以及脂质制剂如 ISCOM。QS21 以商标 StimulonTM 出售。

[0129] 已采用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术纯化的特定组分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。在一些情况中,所述皂苷是 QS21。制备 QS21 的方法参见参考文献 32。皂苷制剂也可以包含甾醇,如胆固醇 [33]。

[0130] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒 [参考文献 13 的第 23 章]。ISCOM 通常还包含磷脂,如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷均可用于 ISCOM 中。在一些实施方式中,ISCOM 包含 QuilA、QHA 和 QHC 中的一种或多种。参考文献 33-35 中进一步描述了 ISCOM。任选地,ISCOM 可以不含另外的去污剂 [36]。

[0131] 开发基于皂苷的佐剂的综述可参见参考文献 37 和 38。

[0132] D. 病毒体和病毒样颗粒

[0133] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 也可以用作本发明的佐剂。这些结构通常包含一种或多种任选与磷脂组合或一起配制的病毒蛋白质。其通常无病原性,不能复制,且通常不含任何天然病毒基因组。所述病毒蛋白可重组生成或分离自全病毒。这些适用于病毒体或 VLP 的病毒蛋白包括衍生自流感病毒(例如 HA 或 NA)、乙肝病毒(例如核心蛋白或衣壳蛋白)、戊肝病毒、麻疹病毒、辛德比斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺沃克病毒、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA-噬菌体、Q β -噬菌体(如外壳蛋白)、GA-噬菌体、fr-噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty (如反转录转座子 Ty 蛋白 p1) 的蛋白。VLP 在参考文献 39-44 中有进一步描述。病毒体在例如参考文献 45 中有进一步描述。

[0134] E. 细菌或微生物衍生物

[0135] 适用于本发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物,如肠细菌的脂多糖 (LPS) 的无毒衍生物、脂质 A 衍生物、免疫刺激性寡核苷酸和 ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物。

[0136] LPS 的无毒衍生物包括单磷酸脂质 A (MPL) 和 3-O-脱酰基 MPL (3dMPL)。3dMPL 是 3 脱-O-酰基单磷酸脂质 A 与 4、5 或 6 条酰化链的混合物。3 脱-O-酰基单磷酸脂质 A

的优选“小颗粒”形式见参考文献 46 中所述。3dMPL 的这种“小颗粒”小到足以在过滤除菌时通过 0.22 μ m 膜 [46]。其它无毒 LPS 衍生物包括单磷酸脂质 A 模拟物,如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸盐衍生物,例如 RC-529 [47, 48]。

[0137] 脂质 A 衍生物包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 如 OM-174 的脂质 A 衍生物。例如参考文献 49 和 50 中描述了 OM-174。

[0138] 适合用作本发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含 CpG 基序的核苷酸序列(含有通过磷酸键与鸟苷连接的非甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)。含回文或聚(dG)序列的双链 RNA 和寡核苷酸也显示具有免疫刺激作用。

[0139] CpG 可以包含核苷酸修饰 / 类似物,如硫代磷酸酯修饰,可以是双链或单链。参考文献 51、52 和 53 公开了可能的类似物取代,例如用 2' - 脱氧 -7- 脱氮鸟苷取代鸟苷。参考文献 54-59 中进一步讨论了 CpG 寡核苷酸的佐剂作用。

[0140] 所述 CpG 序列可以导向 TLR9, 例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT [60]。CpG 序列可特异性诱导 Th1 免疫应答,如 CpG-A ODN, 或更特异地诱导 B 细胞应答,如 CpG-B ODN。参考文献 61-63 中讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。在一些实施方式中, CpG 是 CpG-A ODN。

[0141] 在其它实施方式中, CpG 寡核苷酸构建成其 5' 端可为受体所识别。任选将两个 CpG 寡核苷酸序列的 3' 端相连接形成“免疫聚体”。参见例如,参考文献 60 和 64-66。

[0142] 有用的 CpG 佐剂是 CpG7909, 也称为 ProMuneTM (科雷制药集团公司 (Coley Pharmaceutical Group, Inc.))。另一种是 CpG1826。作为替代或补充, 为了使用 CpG 序列, 可采用 TpG 序列 [67], 这些寡核苷酸可不含非甲基化 CpG 基序。免疫刺激性寡核苷酸可能富含嘧啶。例如, 它可能含有一个以上连续的胸腺嘧啶核苷酸(例如, 参考文献 67 所公开的 TTTT), 和 / 或它的核苷酸组成中可能含有 >25% 胸腺嘧啶(例如 >35%、>40%、>50%、>60%、>80% 等)。例如, 它可能含有一个以上连续的胞嘧啶核苷酸(例如, 参考文献 67 所公开的 CCCC), 和 / 或它的核苷酸组成中可能含有 >25% 胞嘧啶(例如 >35%、>40%、>50%、>60%、>80% 等)。这些寡核苷酸可不含未甲基化的 CpG 基序。免疫刺激性寡核苷酸通常包含至少 20 个核苷酸。其可包含少于 100 个核苷酸。

[0143] 基于免疫刺激性寡核苷酸的特别有用的佐剂被称为 IC-31TM [68]。因此, 本发明使用的佐剂可以包含 (i) 和 (ii) 的混合物: (i) 含有至少一个(优选多个) CpI 基序(即胞嘧啶与肌苷相连形成二核苷酸)的寡核苷酸(例如 15-40 个核苷酸), 和 (ii) 聚阳离子聚合物, 如含有至少一个(优选多个) Lys-Arg-Lys 三肽序列的寡肽(如 5-20 个氨基酸)。所述寡核苷酸可以是包含 26 聚体序列 5' -(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 427) 的脱氧核苷酸。聚阳离子聚合物可以是含有 11 聚体氨基酸序列 KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 426) 的肽。寡核苷酸和聚合物可形成复合物, 如参考文献 69 和 70 所述。

[0144] 细菌 ADP- 核糖基化毒素及其脱毒衍生物可以用作本发明的佐剂。在一些实施方式中, 所述蛋白衍生自大肠杆菌(大肠杆菌不耐热肠毒素“LT”)、霍乱菌(“CT”)或百日咳菌(“PT”)。参考文献 71 中描述了将脱毒的 ADP- 核糖基化毒素用作粘膜佐剂, 参考文献 72 中描述了将其用作胃肠外佐剂。所述毒素或类毒素通常是全毒素形式, 包含 A 和 B 亚单位。在一些实施方式中, A 亚单位含有脱毒突变; 而 B 亚单位通常未突变。在一些实施方式中, 所述佐剂为脱毒的 LT 突变体, 如 LT-K63、LT-R72 和 LT-G192。参考文献 73-80 中描述了将 ADP- 核糖基化毒素及其脱毒衍生物, 特别是 LT-K63 和 LT-R72 用作佐剂。一种有用的 CT 突

变体是 CT-E29H[81]。通常根据参考文献 82 所述 ADP- 核糖基化毒素的 A 和 B 亚单位的比对对氨基酸取代进行编号,特别通过引用将其全文纳入本文。

[0145] F. 人免疫调节剂

[0146] 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[83] 等)[84]、干扰素(如干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。优选的免疫调节剂是 IL-12。

[0147] G. 生物粘着剂和粘膜粘着剂

[0148] 生物粘着剂和粘膜粘着剂也可以用作本发明的佐剂。合适的生物粘着剂包括酯化透明质酸微球[85]或粘膜粘着剂,如聚(丙烯酸)交联衍生物、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素。壳聚糖及其衍生物也可以用作本发明的佐剂[86]。

[0149] H. 微粒

[0150] 微粒也可以用作本发明的佐剂。微粒(即颗粒直径 $\sim 100\text{nm}$ 至 $\sim 150\mu\text{m}$,一些实施方式中直径为 $\sim 200\text{nm}$ 至 $\sim 30\mu\text{m}$,例如 $\sim 500\text{nm}$ 至 $\sim 10\mu\text{m}$)由可生物降解的无毒材料(例如聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚正酯、聚酐、聚己酸内酯等),优选聚(丙交酯-乙交酯共聚物)形成,并任选经处理而具有带负电表面(例如用 SDS 处理)或带正电表面(例如用阳离子去污剂如 CTAB 处理)。

[0151] I. 脂质体(参考文献 13 的第 13 和 14 章)。

[0152] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子见参考文献 87-89 所述。

[0153] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0154] 适用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯[90]。该类制剂还包括聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂和辛苯糖醇的组合[91],以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种额外非离子表面活性剂如辛苯糖醇的组合[92]。优选的聚氧乙烯醚选自下组:聚氧乙烯-9-月桂醚(月桂醇聚醚 9)、聚氧乙烯-9-硬脂醚、聚氧乙烯-8-硬脂醚、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。

[0155] K. 磷腈

[0156] 可使用磷腈,如参考文献 93 和 94 中所述的聚[二(羧基苯氧基)磷腈](poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene])(“PCPP”)。

[0157] L. 胞壁酰肽

[0158] 适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-D-异谷酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺(正-MDP)和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺 MTP-PE)。

[0159] M. 咪唑并喹诺酮化合物。

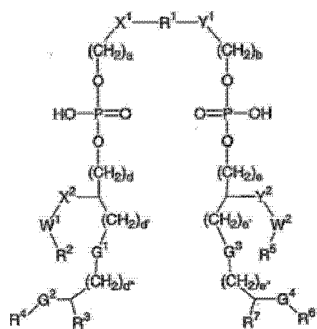
[0160] 适用作本发明佐剂的咪唑并喹诺酮化合物的例子包括咪唑莫特(“R-837”)[95, 96],瑞喹莫德(“R-848”)[97],以及它们的类似物和盐(如盐酸盐)。有关免疫刺激性咪唑喹啉的其它细节可参见参考文献 98-102。

[0161] N. 取代的脲

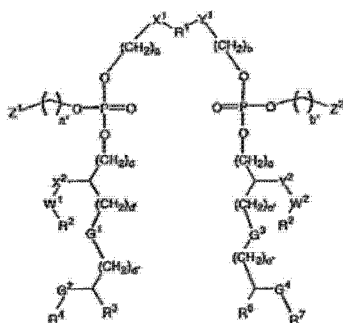
[0162] 用作佐剂的取代的脲包括式 I、II 或 III 的化合物,或其盐:

[0163]

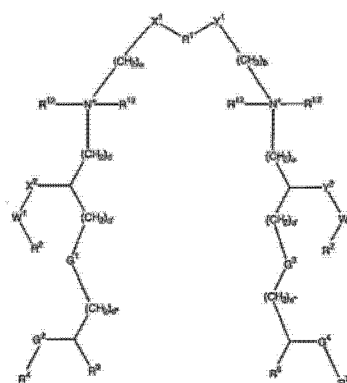
I



II

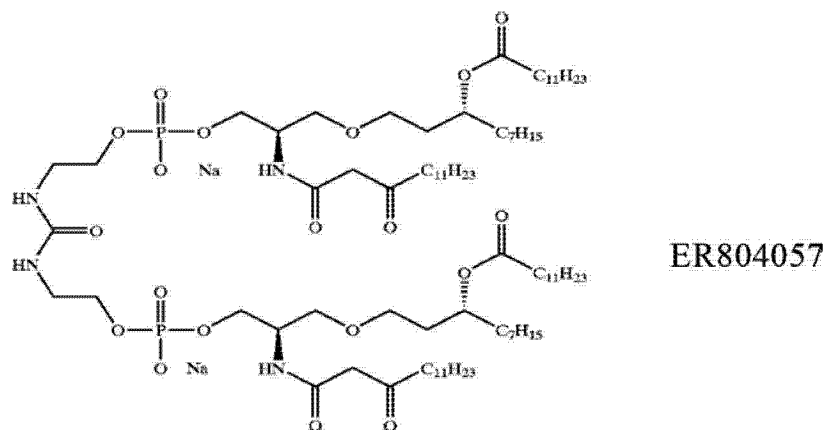


III

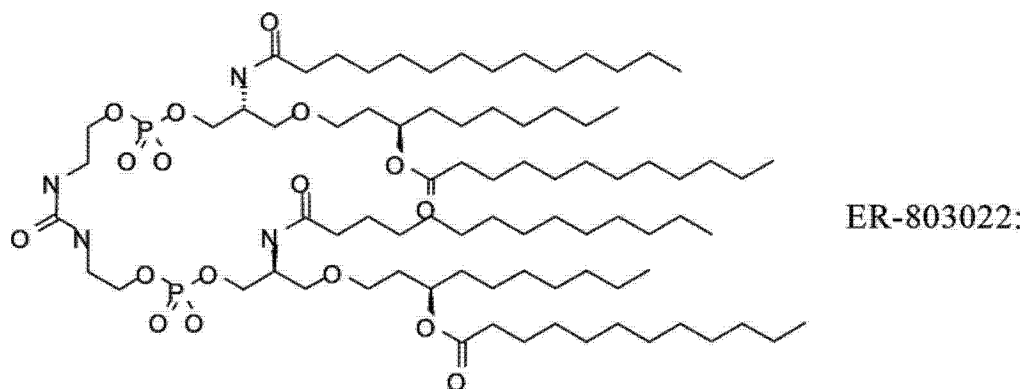


[0164] 如参考文献 103 所述, 例如 ‘ER 803058’、‘ER 803732’、‘ER 804053’、ER 804058’、‘ER 804059’、‘ER 804442’、‘ER 804680’、‘ER 804764’、ER803022 或 ‘ER 804057’, 如:

[0165]



[0166]



[0167] 0. 其他佐剂

[0168] 可用于本发明的其他佐剂包括：

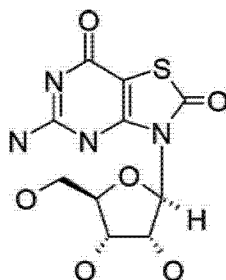
[0169] • 氨烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物, 如 RC529 [104, 105]。

[0170] •缩氨基硫脲化合物,如参考文献 106 所述的化合物。参考文献 106 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- α 方面特别有效。

[0171] •色胺酮化合物,如参考文献107所述的化合物。参考文献107中也描述了配制、制

备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- α 方面特别有效。

[0172] • 核苷类似物, 如: (a) 埃索他宾 (Isatorabine) (ANA-245; 7- 硫杂 -8- 氧代鸟苷):
[0173]



[0174] 及其前药; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) 参考文献 108-110 所公开的化合物。

[0175] • 洛索立宾 (Loxoribine) (7- 烯丙基 -8- 氧代鸟苷) [111]。

[0176] • 参考文献 112 所述化合物, 包括: 酰基嘧啶化合物、吡啶二酮化合物、四氢异喹啉 (THIQ) 化合物、苯并环二酮化合物、氨基氮杂乙基化合物、氨基苯并咪唑喹啉酮 (ABIQ) 化合物 [113, 114], 水合酞酰胺 (hydraphtalamide) 化合物、苯并苯基酮化合物、异恶唑化合物、固醇化合物、喹唑啉酮 (quinazilinson) 化合物、吡咯化合物 [115]、蒽醌化合物、喹啉化合物、三嗪化合物、吡啶嘧啶化合物和吡啶化合物 [116]。

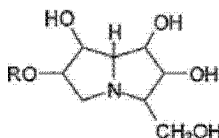
[0177] • 含有连接于含磷酸无环主链的脂质的化合物, 如 TLR4 拮抗剂 E5564 [117, 118]:

[0178] • polyoxidonium 聚合物 [119, 120] 或其它 N- 氧化的聚乙烯 - 嘧啶衍生物。

[0179] • 甲基肌苷 5' - 单磷酸酯 (“MIMP”) [121]。

[0180] • 多聚羟化吡咯双烷类化合物 [122], 如下式化合物:

[0181]

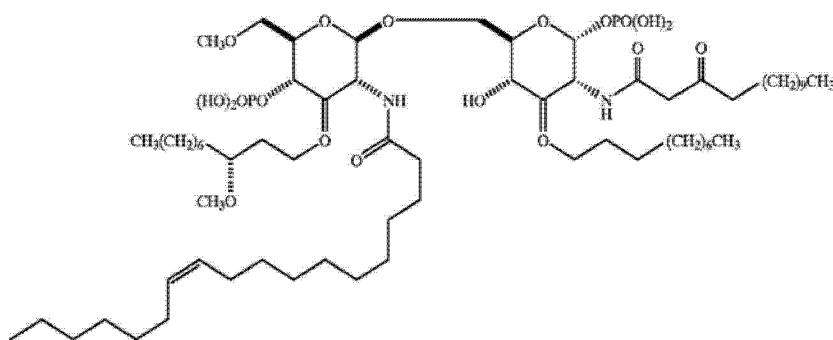


[0182] 式中, R 选自: 氢, 直链或支链、未取代或取代、饱和或不饱和的酰基、烷基 (如环烷基)、烯基、炔基和芳基, 或其药学上可接受的衍生物。例子包括但不限于: 木麻黄 (casuarine)、木麻黄 -6- α -D- 吡喃葡萄糖、3- 表 - 木麻黄、7- 表 - 木麻黄、3, 7- 二表 - 木麻黄等。

[0183] • CD1 配体, 如 α - 糖基神经酰胺 [123-130] (如 α - 半乳糖基神经酰胺)、含植物鞘氨醇的 α - 糖基神经酰胺、OCH、KRN7000 [(2S, 3S, 4R) -1-O- (α -D- 吡喃半乳糖基) -2- (N- 二十六烷酰氨基) -1, 3, 4- 十八烷三醇、CRONY-101、3''-O- 硫代 - 半乳糖基神经酰胺等等。

[0184] • γ 菊糖 [131] 或其衍生物, 如阿尔加穆林 (algaammulin)。

[0185]



[0186] 佐剂组合

[0187] 本发明也可包含以上鉴定的一种或多种佐剂的组合。例如,可将以下佐剂组合物用于本发明:(1)皂苷和水包油乳液[132];(2)皂苷(例如QS21)+无毒LPS衍生物(例如3dMPL)[133];(3)皂苷(例如QS21)+无毒LPS衍生物(如3dMPL)+胆固醇;(4)皂苷(例如QS21)+3dMPL+IL-12(任选+固醇)[134];(5)3dMPL与(例如)QS21和/或水包油乳液的组合[135];(6)SAF,含有10%角鲨烯、0.4%吐温80TM、5%普流罗尼-嵌段聚合物L121和thr-MDP,微流体化形成亚微米乳液或涡旋产生粒度较大的乳液。(7)RibiTM佐剂系统(RAS)(瑞比免疫化学公司(Ribi Immunochem)),含有2%鲨烯、0.2%吐温80和一种或多种细菌细胞壁组分,所述组分选自单磷酸脂质A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS),优选MPL+CWS(DetoxTM);和(8)一种或多种无机盐(如铝盐)+LPS的无毒衍生物(如3dMPL)。

[0188] 用作免疫刺激剂的其它物质参见参考文献13的第7章。

[0189] 使用氢氧化铝和/或磷酸铝佐剂是典型的,抗原通常吸附于这些盐。磷酸钙是另一种典型佐剂。其它佐剂组合包括Th1和Th2佐剂的组合,如CpG和明矾或雷西莫特和明矾。可以使用磷酸铝和3dMPL的组合。

[0190] 本发明组合物可引起细胞介导的免疫应答以及体液免疫应答。此种免疫应答可以诱导长期(如中和性)抗体和细胞介导的免疫,能在接触肺炎球菌时迅速作出反应。

[0191] 通常认为两种T细胞类型CD4和CD8细胞是启动和/或增强细胞介导免疫和体液免疫所必需的。CD8T细胞可表达CD8共受体,通常称为细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。CD8T细胞能够识别MHC I型分子上展示的抗原或与之相互作用。

[0192] CD4T细胞可表达CD4共受体,通常称为T辅助细胞。CD4T细胞能够识别结合于MHC II型分子的抗原性肽。与MHC II型分子相互作用时,CD4细胞可分泌诸如细胞因子等因子。这些分泌的细胞因子可激活B细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞和参与免疫应答的其它细胞。辅助T细胞或CD4+细胞可进一步分成两个功能不同的亚组:即细胞因子和效应功能不同的TH1表型和TH2表型。

[0193] 活化的TH1细胞能增强细胞免疫(包括抗原特异性CTL生产增加),因而对响应胞内感染具有特定价值。活化的TH1细胞可分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- β 中的一种或多种。TH1免疫应答可通过激活巨噬细胞、NK(自然杀伤)细胞和CD8细胞毒性T细胞(CTL)导致局部炎症反应。通过用IL-12刺激B和T细胞的生长,TH1免疫应答也可用于放大免疫应答。TH1刺激的B细胞可分泌IgG2a。

[0194] 活化的TH2细胞提高抗体产量,因此对响应胞外感染具有价值。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免疫应答可引起生成IgG1、IgE、

IgA 和用于未来保护的记忆 B 细胞。

[0195] 增强的免疫应答可包括增强的 TH1 免疫应答和 TH2 免疫应答中的一种或多种。

[0196] TH1 免疫应答可包括 CTL 增加, 与 TH1 免疫应答相关的一种或多种细胞因子(如 IL-2、IFN γ 和 TNF- β) 增加, 活化巨噬细胞增加, NK 活性增加, 或者 IgG2a 产量增加中的一种或多种现象。在一些实施方式中, 提高的 TH1 免疫应答将包括 IgG2a 生成增加。

[0197] 可使用 TH1 佐剂引发 TH1 免疫应答。相对于不用佐剂的抗原免疫, TH1 佐剂通常引起 IgG2a 生成水平增加。适用于本发明的 TH1 佐剂可包括例如, 皂苷制剂、病毒体和病毒样颗粒、肠细菌脂多糖(LPS) 的无毒衍生物、免疫刺激性寡核苷酸。免疫刺激性寡核苷酸, 如含有 CpG 基序的寡核苷酸是本发明所用的典型 TH1 佐剂。

[0198] TH2 免疫应答可包括以下一种或多种: 与 TH2 免疫应答相关的一种或多种细胞因子(如 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-10) 增加, 或者 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞生成增加。在一些实施方式中, 提高的 TH2 免疫应答将包括 IgG1 生成增加。

[0199] 可使用 TH2 佐剂引发 TH2 免疫应答。相对于不用佐剂的抗原免疫, TH2 佐剂通常引起 IgG1 生成水平增加。适用于本发明的 TH2 佐剂包括例如, 含矿物质组合物、油乳剂和 ADP- 核糖基化毒素和其脱毒衍生物。含矿物质组合物如铝盐是本发明使用的典型 TH2 佐剂。

[0200] 在一些实施方式中, 本发明包括含 TH1 佐剂和 TH2 佐剂组合的组合物。通常, 这种组合物引起增强的 TH1 和增强的 TH2 应答, 即 IgG1 和 IgG2a 的生成相对于不用佐剂的免疫均有增加。一般, 相对于用单一佐剂的免疫(即, 相对于只用 TH1 佐剂的免疫或只用 TH2 佐剂的免疫), 包含 TH1 和 TH2 佐剂组合的组合物引起 TH1 和 / 或 TH2 免疫应答增强。

[0201] 所述免疫应答可以是 TH1 免疫应答和 TH2 免疫应答之一或两种。免疫应答可以提供增强的 TH1 应答和增强的 TH2 应答之一或两种。

[0202] 增强的免疫应答可以是全身免疫应答和粘膜免疫应答之一或两种。该免疫应答可以提供增强的全身免疫应答和增强的粘膜免疫应答之一或两种。典型粘膜免疫应答为 TH2 免疫应答。粘膜免疫应答通常包括 IgA 生成增加。

[0203] 可将所述组合物制备为液体溶液或悬浮液形式的注射剂。也可制备适合在注射前溶解或悬浮于液体载剂的固体形式(如冻干组合物或喷雾冻干组合物)。所述组合物可以制备成外用制剂, 例如, 油膏、乳膏或粉末。该组合物可制备成口服给药制剂, 如片剂或胶囊, 喷雾剂, 或糖浆剂(任选调味)。所述组合物可以制备成使用细粉或喷雾的肺部给药制剂, 例如吸入剂。可将所述组合物制备为栓剂或阴道栓。所述组合物可以制成鼻部、耳部或眼部给药制剂, 例如滴剂。组合物可以是药盒形式, 设计成在临给予哺乳动物之前重建的合并组合物。这种药盒可包含一种或多种液体形式的抗原以及一种或多种冻干抗原。

[0204] 临用前制备组合物(例如, 以冻干形式提供组分时) 和以药盒形式提供组合物时, 该药盒可包括两个药瓶, 或者可包括一个填充好的注射器和一个药瓶, 注射器内容物用于在注射前重激活药瓶内容物。

[0205] 用作疫苗的组合物包含免疫有效量的抗原, 以及需要的任何其它组分。“免疫有效量”指在一次剂量或一系列剂量的一部分中给予个体的对治疗或预防有效的量。此量取决于待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗个体的分类组(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、疫苗配配、治疗医生对医学情况的

评估和其它相关因素。预计所述量将落入可通过常规试验测定的较宽范围内。组合物中包含一种以上抗原时,存在的两种抗原的剂量可以相同或不同。

[0206] 如上所述,一种组合物可包含温度保护剂,此种组分可能在含佐剂组合物(特别是含有矿物质佐剂,如铝盐的组合物)中特别有用。如参考文献 136 所述,可将液体温度保护剂加入水性疫苗组合物中以降低其凝固点,例如将凝固点降低至 0℃ 以下。因此,该组合物可以储存于 0℃ 以下但在其凝固点以上,以抑制热降解。温度保护剂也允许冷冻该组合物,同时保护矿物盐佐剂在冻融后不发生团聚或沉降,还可在较高温度,例如 40℃ 以上保护该组合物。可混合初始的水性疫苗与液体温度保护剂使液体温度保护剂占混合物终体积的 1-80%。合适的温度保护剂应该是对人给药安全的、易于混溶 / 可溶于水的、并且不应损害组合物的其他成分(如抗原和佐剂)。例子包括甘油、丙二醇和 / 或聚乙二醇(PEG)。合适 PEG 的平均分子量可以是 200-20,000Da。在一个实施方式中,聚乙二醇的平均分子量可以约为 300Da (‘PEG-300’)。

[0207] 本发明提供包含以下组分的组合物:(i)一种或多种抗原;和(ii)温度保护剂。可通过混合(i)含一种或多种抗原的水性组合物与(ii)温度保护剂形成该组合物。然后,该混合物可储存于,例如 0℃ 以下、0-20℃、20-35℃、35-55℃ 或更高温度。它可以液体或冻结形式储存。该混合物可以是冻干的混合物。或者,可通过混合(i)含一种或多种抗原的干燥组合物与(ii)含温度保护剂的液体组合物来形成该组合物。因此,可利用组分(ii)重建组分(i)。

[0208] 功能等价物

[0209] 用来鉴定可用于上述本发明的方法,蛋白质阵列和医学应用的 GAS 抗原的 SEQ ID NO 是这些 GAS 抗原的全长序列。

[0210] 本发明的方法,蛋白质阵列和医学应用并不局限于使用这些全长 GAS 抗原,还包括任何这些 GAS 抗原的任何“功能等价物”。

[0211] 本文使用的术语“功能等价物”旨在涵盖具有序列列表所示全长序列的 GAS 抗原变体,该抗原保留有对生物样品中存在的全长 GAS 抗原的抗体相互作用的能力,并因此可用于代替全长 GAS 的抗原。

[0212] 术语“功能等价物”因此包括具有序列列表所示序列的全长 GAS 抗原的片段。这些片段可以保留与对结合全长 GAS 抗原的抗体结合的能力。本发明的功能等价物可以结合产生的抗体,与全长 GAS 抗原亲和性至少为 10⁻⁷ 摩尔。

[0213] 该片段包含该全长 GAS 抗原序列中至少 n 个连续氨基酸,其中 n 是 7 个或更多个(如 8、10、12、14、16、18、20、25、24、26、28、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100 个或更多个)。片段可以包括全长 GAS 抗原序列的一个表位。其他有用片段缺少全长序列 C 末端的一个或多个氨基酸(如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多个)和 / 或全长序列 N 末端的一个或多个氨基酸(如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多个)。例如,可以用于本发明方法和阵列的片段包括缺少全长 GAS 存在的前导序列和 / 或跨膜序列的片段。

[0214] 可以用于本发明方法和阵列的其他片段示例包括 N 末端片段。这些片段的示例包括 SEQ ID NO:9 (SEQ ID NO:5 的 N 末端片段)所示氨基酸序列和 SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:4 的 N 末端片段)所示氨基酸序列。

[0215] 术语“功能等价物”也包括有氨基酸替换的全长 GAS 蛋白质变体和这些变体片段。

变体与本文提供的全长 GAS 抗原序列具有 50% 或更高的相同性(例如,60%、65%、70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或更高)。变体可以包括与序列表中给出的 GAS 抗原序列相比保守的氨基酸替换。典型的这种替换是在 Ala, Val, Leu 和 Ile 中;Ser 和 Thr 中;酸性残基 Asp 和 Glu 中;Asn 和 Gln 中;碱性残基 Lys 和 Arg 中;或者芳香基 Phe 和 Tyr 中。

[0216] 术语“功能等价物”也包括含融合蛋白的更长 GAS 抗原变体,所述融合蛋白包括用化学或者遗传学方法在 GAS 抗原上连接一个附加实体。例如,GAS 抗原可以附着一个标记,该标记有助于其在蛋白质阵列上定位或者当它结合抗体时有助于检测。这种标记的示例包括分析检测试剂,例如放射性同位素、荧光标记分子或者酶。或者,GAS 抗原可以融合一个促进其最初纯化的结构域,例如组氨酸或者 GST 结构域。

[0217] 术语“功能等价物”也包括上述 GAS 抗原、变体和片段的模拟物,其在结构上类似于 GAS 抗原并且保留与全长 GAS 抗原的抗体结合的能力。

[0218] 概述

[0219] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”,例如,“包含”X 的组合物可以仅由 X 组成或可以包括其它物质,例如 X+Y。

[0220] 术语“基本上”不排除“完全”,如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。如有需要,“基本上”一词可以从本发明的定义中省略。

[0221] 与数值 x 相关的术语“约”表示例如, $x \pm 10\%$ 。

[0222] 除非另有说明,包括混合两种或多种组分的步骤的过程不要求任何特定的混合顺序。因此,组分可以任何顺序混合。在有三种组分时,可将两种组分相互合并,然后可将所述组合与第三种组分混合等。

[0223] 优选通过 MPSRCH 程序(牛津分子科技公司(Oxford Molecular))执行的 Smith-Waterman 同源性搜索算法,利用仿射缺口搜索测定多肽序列之间的相同性,其中参数为缺口开放罚分=12、缺口延伸罚分=1。

[0224] 附图简要说明

[0225] 图 1. 收集血清的风湿性心脏病(RHD)病人和也门健康血液供体(YHD)的年龄分布。显示为该研究选择的年龄相符血清样品。

[0226] 图 2. 蛋白质微阵列的配置和确认。A,纯化重组 GAS 蛋白的 SDS-PAGE 分析,用考马斯染色。分子量标记物在第一泳道。B,用人血清和 Cy3 标记的抗人体 IgG 和 Cy5 标记的抗人体 IgM 孵育后的芯片的代表性图片。重复的检测抗原以及负和正 IgG 和 IgM 对照突出显示。C,对照人体 IgG 曲线的图示。下图显示由抗人体 IgG-Cy3 孵育呈现的不同 IgG 浓度的芯片图片。D, S 形衍生数据的标准化方法。数据用对照 S 形对照曲线(黑)校正到参考 S 形曲线(红;id,理想 S 形曲线;P 和 P',没有校正的交叉点,Val,和校正的,N (Val),实验和参考 S 形曲线的 MFI 值;HL,对应于 30000 标准化 MFI 值的值;LL 是 15000 的标准化 MFI 值)。

[0227] 图 3. 也门和意大利健康供体血清对 GAS 抗原高反应(MFI>30000)的百分比。抗原以反应的降序表示。

[0228] 图 4. 年龄相符的选定人体免疫血清的 40YHD(图 4 中的深灰色)和 43RHD(图 4 中的浅灰色)免疫反应性的对比。标准化的 FI (MFI)值使用专用软件(TIGR 多实验阅读器(MeV)软件(<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>))进行无监督二维层次聚类以

定义这两个血清组的抗原识别模式,从而鉴定两个主要的高度识别抗原组(图 4A 中的 1 和 2,也在图 4B 中显示)。聚类分析使血清从高反应性(在左侧)向低反应性(在右侧)分布。血清的两个主要组可以区分开,一个高反应组主要包括健康供体的血清(图 4 左侧的 A),而第二组显示低反应性并且主要包括 RHD 病人的血清(图 4 的 B 组)。

[0229] 图 5. 应用 K 均值聚类分析以在 10 个引发类似识别模式的群(KA1 到 KA10)中对芯片内存在的 GAS 抗原分类。鉴定的四个抗原群(编号 KA1, KA5, KA9, KA10)含有比其余群更高免疫荧光值的抗原。在群 KA1 中,反应性最大的血清包括大量 YHD,提示芯片上存在一组抗原,该反应性可以区分获自健康供体和 RHD 病人的血清。

[0230] 图 6. 鉴定能区分健康和 RHD 病人的抗原群。图 6 中的 KA1 群的血清还通过使用一维层次聚类分析,根据它们对不同抗原组的识别概况来分类,从而确定两个血清群 HS1 (紫色盒)和 HS2 (蓝色盒)。图 6B 报道了两个群各自存在或缺失的健康免疫血清和病人免疫血清数量。发现大部分 YHD 在高反应性、蓝色的 HS2 群中,而主要的 RHD 血清出现在低反应性、紫色的 HS1 群中。用此类试验区分两个血清群的能力通过特异性和敏感性来定义(图 6C)。对该具体抗原组,所得特异性和敏感性值为 0.73 和 0.69。图 6C 也显示最大特异性和敏感性(值为 1)的理想理论示例。

[0231] 图 7. 图 6 描述的分析应用到其他抗原群:KA5 (B), KA9 (C), KA10 (D), KA5+M9 (E), GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40 (F), GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57 (G), GAS5+GAS25+GAS40+GAS57 (H), GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57 (I)。显示每一个群的特异性和敏感性值。

具体实施方式

[0232] 导言

[0233] 我们已经开发一个包含有 130 种重组 GAS 蛋白抗原的蛋白质微阵列。该芯片有助于选择在咽炎病人中引起高抗体反应的抗原,并允许揭示 Tic 病患者血清中对 GAS 抗原的高反应,强烈支持易感个体自身抗体的 GAS 抗原依赖性诱导可参与 tic 紊乱的发生(Bombaci M,等 2009 PLoS ONE 4,7: e6332. doi:10.1371)。

[0234] 我们用蛋白质微阵列来分析 RHD 病人和健康供体中 130 种重组 GAS 蛋白的免疫反应,其目的为鉴定抗原识别模式使我们能区分两个群体。该方法可以鉴定出健康供体(而不是 RHD 病人)高度识别的抗原群,这可为诊断试验奠定基础。

[0235] 材料和方法

[0236] 人体血清

[0237] 风湿心脏病患者血清收集自 60 个 11-40 岁的男人或女人,该患者来自一个中东国家(也门),呈现 RHD 临床症状。

[0238] 已知抗 GAS 效价根据许多因素而变化,包括年龄和地域来源。事实上,健康人的抗 GAS 抗体效价在儿童早期低,在 5-15 岁的儿童中上升到峰值,在青春期晚期和成人早期下降,并且在之后趋于平坦。因为这个原因,风湿性心脏病(RHD)血清组和对照也门健康供体(YHD)组的比较用同一年龄范围(17-40 岁)组进行,因此排除没有对照免疫血清可用的 11-16 岁 RHD 病人的血清。用于对比的最终血清数目为 40 种 YHD 和 43 种 RHD。

[0239] 图 1 显示可用的和该研究选择的两个群体的分布分析。

[0240] 另外,收集的 20 个健康意大利人供体(IHD)血清用来与健康也门人作额外对比,考虑到原来西方人群更多使用抗生素预防 GAS 感染。

[0241] 所有的血清样品是在 RHD 诊断或者放血的常规医学对照中获得的剩余物,并由罗马的罗马大学(University La Sapienza)儿童和青少年神经精神医学系提供。

[0242] GAS 蛋白质微阵列

[0243] 通过在硝化纤维芯片上沉积 130 个重组蛋白产生蛋白质阵列,所述蛋白主要选自 GAS SF370 M1 基因组(详细芯片构建见图 2)。

[0244] 芯片用不同的血清孵育,并且通过检测结合到每一个沉降蛋白质微量荧光标记的抗人体 IgG 的总 IgG 和测量所得荧光强度(FI)值来评估反应性。对于各玻片,蛋白 MFI 值标准化成一个 S 形调整的标准 IgG 曲线,所述曲线用作参比(图 2)。

[0245] 当 MFI 值等于或大于 15000,对应于背景值加上 2 个标准偏差时,检测血清的抗原识别认为是正值。MFI 值等于或大于 30000 认为是高反应。阵列用来自病人的 120 种血清(20 种意大利健康供体(IHD)血清,40 种也门健康供体(YHD)血清和 60 种 RHD 也门病人(RHD)血清)探测。

[0246] 结果

[0247] 健康供体血清识别的 GAS 抗原:抗体反应在也门人中比意大利人更高

[0248] 用 40 种来自也门健康血液供体和 20 种来自意大利健康供体的血清来研究属于两个不同地域的人群的抗 GAS 抗体反应。图 3 报道对 GAS 抗原高反应的健康供体血清的百分比。如显示的那样,根据高度识别抗原和高度阳性血清数量,也门人中的背景抗链状球菌反应比意大利人高很多。

[0249] 在健康和 RHD 也门病人中的 GAS 抗原的不同免疫反应性

[0250] 我们对比了年龄相符的选定人体血清的 40 YHD(图 4 中的深灰色)和 43YHD(图 4 中的浅灰色)免疫反应性。标准化的 FI(MFI)值使用专用软件(TIGR 多实验阅读器(MeV)软件(<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>))的无监督二维层次聚类来定义这两个血清组的抗原识别模式。

[0251] 抗体识别概况的聚类观察鉴定了两个主要的高识别抗原的组(图 4 中的 1 和 2)。组 1 包括 GAS5F(假定分泌蛋白),GAS25(链球菌溶血素 O 前体),GAS40(假定表面排斥蛋白),M1,GAS179(假定酯酶),GAS97(免疫原性分泌蛋白前体同源物),GAS193(免疫原性分泌蛋白前体)。组 2 包括 5 个不同的 M 蛋白(M12,M23,M2,M3 和 M9),GAS57(假定细胞壁蛋白酶),GAS380(假定蛋白)和 SpeI。

[0252] 另外,如图 4 所示,此聚类分析把血清从高反应性(在左侧)向低反应性(在右侧)分布。的确,血清的两个主要组可以区分开,高反应组主要包括健康供体的血清(图 4 左侧的 A),而第二组显示低反应并且主要包括 RHD 病人的免疫血清(图 4 的 B 组)。

[0253] 然后我们应用 K 均值聚类分析以在 10 个引发类似识别模式的群(图 5 中 KA1 到 KA10)中对芯片内存在的 GAS 抗原分类。K 均值聚类是一个统计学方法,目的在于把 n 个观察分入 K 个群中,其中每一个观察属于具有最接近平均数的群。这类似于对混合高斯模型的最大期望算法,因为两者都试图找到数据正常群的中心。

[0254] 如图 5 所示,鉴定的 4 个抗原群(编号 KA1, KA5, KA9, KA10)包括具有比其他群更高免疫荧光值的抗原。有趣的是,尽管聚类是一维的,即用于抗原分类但是血清分类,我们

观察到群 KA1 中最大反应性血清包括大量 YHD。此观察提示芯片中存在一个抗原组,其反应性能区分获自健康供体和 RHD 病人的血清。

[0255] 我们然后试图以各精确方式定义抗原组,使得我们能区分健康和心脏病病人。为了这个目的,血清还使用一维层次聚类分析根据其对不同抗原组的识别概况来分类。

[0256] 这种分析首先应用在图 5 的 KA1 群所含抗原组中,使得可以在第一层次水平定义两个血清群, HS1 和 HS2,对应图 6A 中的紫色(HS1)和蓝色(HS2)盒。图 6B 报道了两个群各自存在或缺失健康血清和病人血清的数量。如显示的,发现大部分 YHD 在高反应性、蓝色的 HS2 群中,而主要的 RHD 血清出现在低反应性、紫色的 HS1 群中。用此类试验区分两个血清群的能力通过特异性和敏感性来定义。图 6C 显示最大特异性和敏感性(值为 1)的理想理论示例。如显示的,对该具体抗原组,得到的特异性和敏感性值为 0.73 和 0.69。

[0257] 将同一种分析应用到群 KA5, KA9, KA10, 和 KA5+M9 中的抗原。同一种分析也应用到其他的抗原组,包括 GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40, GAS5+GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57, GAS5+GAS25+GAS40+GAS57, GAS5F+GAS25+GAS40+GAS57。结果总结在图 7A-I 中。

[0258] 如显示的,产生最高特异性和敏感性值的群包括群 KA1 (GAS5, GAS40, GAS5F, GAS57, GAS97, GAS380 和 SpeA) 中的抗原, 和抗原 GAS5、GAS25、GAS40 和 GAS57,而所得最低值用于包括 GAS M 变体的群。

[0259] 讨论

[0260] 我们认为这种使用 GAS5、GAS25、GAS40 和 GAS57 抗原的分析方法可以为更精确诊断 RHD 奠定基础,并且可以预测一个患 ARF 病人是否可能发生 RHD,因此指导医学专业人员决定对 ARF 病人最好的预防治疗。

[0261] 参考文献

[0262] [1]Winter 等, (1991)Nature 349:293-99

[0263] [2]US 4,816,567

[0264] [3]Inbar 等, (1972)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69:2659-62。

[0265] [4]Ehrlich 等 (1980)Biochem 19:4091-96.

[0266] [5]Huston 等, (1988)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5897-83。

[0267] [6]Pack 等 (1992)Biochem 31,1579-84.

[0268] [7]Cumber 等, (1992)J. Immunology 149B,120-26.

[0269] [8]Riechmann 等, (1988)Nature 332:323-27

[0270] [9]Verhoeyan 等, (1988)Science 239:1534-36

[0271] [10]GB 2,276,169.

[0272] [11]美国专利 6355271.

[0273] [12]W000/23105.

[0274] [13]Vaccine Design... (《疫苗设计...》)Powell 和 Newman 编 (1995), ISBN:030644867X, 普莱南(Plenum)

[0275] [14]W096/14837.

[0276] [15]W096/14837.

[0277] [16]Podda 和 Del Giudice(2003)Expert Rev Vaccines 2:197-203

[0278] [17]Podda(2001)Vaccine 19:2673-2680.

- [0279] [18]Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(《疫苗设计:亚基和佐剂方法》)(Powell 和 Newman 编)普莱南出版社(Plenum Press)1995(ISBN 0-306-44867-X)。
- [0280] [19]Vaccine Adjuvants:Preparation Methods and Research Protocols(《疫苗佐剂:制备方法和研究方案》)(Methods in Molecular Medicine《分子医学方法》丛书的第 42 卷)。ISBN:1-59259-083-7。O' Hagan 编。
- [0281] [20]W02004/043774.
- [0282] [21]Allison 和 Byars(1992)Res Immunol 143:519-25.
- [0283] [22]Hariharan 等(1995)Cancer Res. 55:3486-9.
- [0284] [23]US-2007/014805.
- [0285] [24]US-2007/0191314.
- [0286] [25]Suli 等,(2004)Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [0287] [26]W095/11700.
- [0288] [27] 美国专利 6, 080, 725.
- [0289] [28]W02005/097181.
- [0290] [29]W02006/113373.
- [0291] [30]Han 等,(2005)Impact of Vitamin E on Immune Function and InfectiousDiseases in the Aged(维生素E对老年人中免疫功能和感染性疾病的影响),营养、免疫功能和健康欧洲会议,巴黎,2005 年 6 月 9-10 日。
- [0292] [31]US-6630161
- [0293] [32]US 5, 057, 540
- [0294] [33]W096/33739.
- [0295] [34]EP-A-0109942.
- [0296] [35]W096/11711.
- [0297] [36]W000/07621
- [0298] [37]Barr 等,(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [0299] [38]Sjolanderet 等,(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [0300] [39]Niikura 等,(2002)Virology 293:273-280.
- [0301] [40]Lenz 等(2001)J Immunol 166:5346-5355.
- [0302] [41]Pinto 等(2003)J Infect Dis188:327-338.
- [0303] [42]Gerber 等(2001)J Virol75:4752-4760.
- [0304] [43]W003/024480
- [0305] [44]W003/024481
- [0306] [45]Gluck 等,(2002)Vaccine 20:B10-B16.
- [0307] [46]EP-A-0689454.
- [0308] [47]Johnson 等(1999)Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [0309] [48]Evans 等(2003)Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- [0310] [49]Meraldi 等(2003)Vaccine 21:2485-2491.
- [0311] [50]Pajak 等(2003)Vaccine 21:836-842.

- [0312] [51]Kandimalla 等, (2003)Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- [0313] [52]W002/26757.
- [0314] [53]W099/62923.
- [0315] [54]Krieg(2003)Nature Medicine 9:831-835.
- [0316] [55]McCluskie 等 (2002)FEMS Immunology and Medical Microbiology32:179-185.
- [0317] [56]W098/40100.
- [0318] [57]US 6, 207, 646
- [0319] [58]US 6, 239, 116
- [0320] [59]US 6, 429, 199
- [0321] [60]Kandimalla 等 (2003),Biochemical Society Transactions 31(第3部分):654-658。
- [0322] [61]Blackwell 等 (2003)J Immunol 170:4061-4068.
- [0323] [62]Krieg(2002)Trends Immunol23:64-65.
- [0324] [63]W001/95935.
- [0325] [64]Kandimalla 等, (2003)BBRC 306:948-953.
- [0326] [65]Bhagat 等, (2003)BBR C300:853-861.
- [0327] [66]W003/035836.
- [0328] [67]W001/22972.
- [0329] [68]Schellack 等 (2006)Vaccine 24:5361-72.
- [0330] [69]Kamath 等 (2008)Eur J Immunol 38:1247-56.
- [0331] [70]Riedl 等 (2008)Vaccine 26:3461-8.
- [0332] [71]W095/17211.
- [0333] [72]W098/42375.
- [0334] [73]Beignon 等, (2002)Infect Immun. 70:3012-3019.
- [0335] [74]Pizza 等, (2001)Vaccine 19:2534-2541.
- [0336] [75]Pizza 等, (2000)Int J Med Microbiol 290:455-461
- [0337] [76]Scharton-Kersten 等, (2000)Infect Immun. 68:5306-5313.
- [0338] [77]Ryan 等, (1999)Infect Immun. 67:6270-6280.
- [0339] [78]Partidos 等 (1999)Immunol Lett 67:209-216.
- [0340] [79]Peppoloni 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- [0341] [80]Pine 等 (2002)J Control Release 85:263-270.
- [0342] [81]Tebbey 等 (2000)Vaccine 18:2723-34
- [0343] [82]Domenighini 等, (1995)Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [0344] [83]W099/40936.
- [0345] [84]W099/44636.
- [0346] [85]Singh 等 (2001)J Cont Release 70:267-276.
- [0347] [86]W099/27960.
- [0348] [87]US 6, 090, 406

- [0349] [88]US 5,916,588
- [0350] [89]EP-A-0626169.
- [0351] [90]W099/52549.
- [0352] [91]W001/21207.
- [0353] [92]W001/21152.
- [0354] [93]Andrianov 等, (1998)Biomaterials 19:109-115.
- [0355] [94]Payne 等, (1998)Adv DrugDelivery Review 31:185--196.
- [0356] [95]US 4,680,338
- [0357] [96]US 4,988,815
- [0358] [97]W096/15582.
- [0359] [98]Stanley (2002)Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [0360] [99]Wu 等 (2004)Antiviral Res. 64(2):79-83
- [0361] [100]Vasilakos 等 (2000)Cell Immunol. 204(1):64-74.
- [0362] [101] 美国专利 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 和 6924293.
- [0363] [102]Jones (2003)Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [0364] [103]W003/011223
- [0365] [104]Johnson 等 (1999)Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278。
- [0366] [105]Evans 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- [0367] [106]W02004/060308.
- [0368] [107]W02004/064759.
- [0369] [108]US 6,924,271
- [0370] [109]US2005/0070556.
- [0371] [110]US 5,658,731
- [0372] [111] 美国专利 5,011,828.
- [0373] [112]W02004/87153.
- [0374] [113]US 6,605,617
- [0375] [114]W002/18383.
- [0376] [115]W02004/018455.
- [0377] [116]W003/082272.
- [0378] [117]Wong 等, (2003)J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
- [0379] [118]US2005/0215517.
- [0380] [119]Dyakonova 等, (2004)Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.
- [0381] [120]FR-2859633.
- [0382] [121]Signorelli 和 Hadden (2003)Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.
- [0383] [122]W02004/064715.
- [0384] [123]De Libero 等, Nature Reviews Immunology, 2005, 5:485-496

- [0385] [124] 美国专利 5, 936, 076.
- [0386] [125] Oki 等, J. Clin. Investig., 113:1631-1640
- [0387] [126] US2005/0192248.
- [0388] [127] Yang 等, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43:3818-3822
- [0389] [128] W02005/102049.
- [0390] [129] Goff 等, J. Am. Chem., Soc., 2004, 126:13602-13603
- [0391] [130] W003/105769.
- [0392] [131] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
- [0393] [132] W099/11241.
- [0394] [133] W094/00153.
- [0395] [134] W098/57659.
- [0396] [135] 欧洲专利申请 0835318, 0735898 和 0761231
- [0397] [136] W02006/110603.

[0001]

序列表

<110> 诺华有限公司 (NOVARTIS AG)

<120> 诊断和治疗方法

<130> P053675W0

<150> GB 0918392.2

<151> 2009-10-20

<160> 10

<170> SeqWin99 1.02 版本

<210> 1

<211> 398

<212> PRT

<213> 化脓链球菌

<400> 1

Met Lys Lys Arg Ile Leu Ser Ala Val Leu Val Ser Gly Val Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Gln Asp Ser Ile Ile Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Lys Ala Ala
35 40 45

Gln Asn Gln Val Ser Ala Leu Gln Ala Gln Val Ser Ser Leu Gln Ser
50 55 60

Glu Gln Asp Lys Leu Thr Ala Arg Asn Thr Glu Leu Glu Ala Leu Ser
65 70 75 80

Lys Arg Phe Glu Gln Glu Ile Lys Ala Leu Thr Ser Gln Ile Val Ala
85 90 95

Arg Asn Glu Lys Leu Lys Asn Gln Ala Arg Ser Ala Tyr Lys Asn Asn
100 105 110

Glu Thr Ser Gly Tyr Ile Asn Ala Leu Leu Asn Ser Lys Ser Ile Ser
115 120 125

Asp Val Val Asn Arg Leu Val Ala Ile Asn Arg Ala Val Ser Ala Asn
130 135 140

Ala Lys Leu Leu Glu Gln Gln Lys Ala Asp Lys Val Ser Leu Glu Glu

[0002]

145	150	155	160
Lys Gln Ala Ala Asn Gln Thr Ala Ile Asn Thr Ile Ala Ala Asn Met			
165	170	175	
Ala Met Ala Glu Glu Asn Gln Asn Thr Leu Arg Thr Gln Gln Ala Asn			
180	185	190	
Leu Val Ala Ala Thr Ala Asn Leu Ala Leu Gln Leu Ala Ser Ala Thr			
195	200	205	
Glu Asp Lys Ala Asn Leu Val Ala Gln Lys Glu Ala Ala Glu Lys Ala			
210	215	220	
Ala Ala Glu Ala Leu Ala Gln Glu Gln Ala Ala Lys Val Lys Ala Gln			
225	230	235	240
Glu Gln Ala Ala Gln Gln Ala Ala Ser Val Glu Ala Ala Lys Ser Ala			
245	250	255	
Ile Thr Pro Ala Pro Gln Ala Thr Pro Ala Ala Gln Ser Ser Asn Ala			
260	265	270	
Ile Glu Pro Ala Ala Leu Thr Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Gly Pro			
275	280	285	
Gln Thr Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Pro Val Gly Gln Cys Thr			
290	295	300	
Trp Gly Ala Lys Ser Leu Ala Pro Trp Ala Gly Asn Asn Trp Gly Asn			
305	310	315	320
Gly Gly Gln Trp Ala Tyr Ser Ala Gln Ala Ala Gly Tyr Arg Thr Gly			
325	330	335	
Ser Thr Pro Met Val Gly Ala Ile Ala Val Trp Asn Asp Gly Gly Tyr			
340	345	350	
Gly His Val Ala Val Val Val Glu Val Gln Ser Ala Ser Ser Ile Arg			
355	360	365	
Val Met Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Arg Gln Tyr Ile Ala Asp His Arg			
370	375	380	
Gly Trp Phe Asn Pro Thr Gly Val Thr Phe Ile Tyr Pro His			
385	390	395	
<210>	2		
<211>	175		

[0003]

<212> PRT
<213> 化脓链球菌

<400> 2
Ala Ala Ala Glu Ala Leu Ala Gln Glu Gln Ala Ala Lys Val Lys Ala
1 5 10 15
Gln Glu Gln Ala Ala Gln Gln Ala Ala Ser Val Glu Ala Ala Lys Ser
20 25 30
Ala Ile Thr Pro Ala Pro Gln Ala Thr Pro Ala Ala Gln Ser Ser Asn
35 40 45
Ala Ile Glu Pro Ala Ala Leu Thr Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Gly
50 55 60
Pro Gln Thr Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Pro Val Gly Gln Cys
65 70 75 80
Thr Trp Gly Ala Lys Ser Leu Ala Pro Trp Ala Gly Asn Asn Trp Gly
85 90 95
Asn Gly Gly Gln Trp Ala Tyr Ser Ala Gln Ala Ala Gly Tyr Arg Thr
100 105 110
Gly Ser Thr Pro Met Val Gly Ala Ile Ala Val Trp Asn Asp Gly Gly
115 120 125
Tyr Gly His Val Ala Val Val Val Glu Val Gln Ser Ala Ser Ser Ile
130 135 140
Arg Val Met Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Arg Gln Tyr Ile Ala Asp His
145 150 155 160
Arg Gly Trp Phe Asn Pro Thr Gly Val Thr Phe Ile Tyr Pro His
165 170 175

<210> 3
<211> 571
<212> PRT
<213> 化脓链球菌

<400> 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

[0004]

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
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
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
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			

[0005]

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 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

[0006]

```

Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
      565                      570

<210> 4
<211> 873
<212> PRT
<213> 化脓链球菌

<400> 4
Met Asp Leu Glu Gln Thr Lys Pro Asn Gln Val Lys Gln Lys Ile Ala
1          5          10          15

Leu Thr Ser Thr Ile Ala Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly Val Ser His
      20          25          30

Gln Val Lys Ala Asp Asp Arg Ala Ser Gly Glu Thr Lys Ala Ser Asn
      35          40          45

Thr His Asp Asp Ser Leu Pro Lys Pro Glu Thr Ile Gln Glu Ala Lys
      50          55          60

Ala Thr Ile Asp Ala Val Glu Lys Thr Leu Ser Gln Gln Lys Ala Glu
      65          70          75          80

Leu Thr Glu Leu Ala Thr Ala Leu Thr Lys Thr Thr Ala Glu Ile Asn
      85          90          95

His Leu Lys Glu Gln Gln Asp Asn Glu Gln Lys Ala Leu Thr Ser Ala
      100         105         110

Gln Glu Ile Tyr Thr Asn Thr Leu Ala Ser Ser Glu Glu Thr Leu Leu
      115         120         125

Ala Gln Gly Ala Glu His Gln Arg Glu Leu Thr Ala Thr Glu Thr Glu
      130         135         140

Leu His Asn Ala Gln Ala Asp Gln His Ser Lys Glu Thr Ala Leu Ser
      145         150         155         160

Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ser Ala Glu Thr Thr Arg Ala Gln Asp Leu
      165         170         175

Val Glu Gln Val Lys Thr Ser Glu Gln Asn Ile Ala Lys Leu Asn Ala
      180         185         190

Met Ile Ser Asn Pro Asp Ala Ile Thr Lys Ala Ala Gln Thr Ala Asn
      195         200         205

```

[0007]

```

Asp Asn Thr Lys Ala Leu Ser Ser Glu Leu Glu Lys Ala Lys Ala Asp
210                      215                      220

Leu Glu Asn Gln Lys Ala Lys Val Lys Lys Gln Leu Thr Glu Glu Leu
225                      230                      235                      240

Ala Ala Gln Lys Ala Ala Leu Ala Glu Lys Glu Ala Glu Leu Ser Arg
245                      250                      255

Leu Lys Ser Ser Ala Pro Ser Thr Gln Asp Ser Ile Val Gly Asn Asn
260                      265                      270

Thr Met Lys Ala Pro Gln Gly Tyr Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Leu
275                      280                      285

Glu Ala Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Asn Asn Tyr Tyr Lys
290                      295                      300

Glu His Ala Asp Gln Ile Ile Ala Lys Ala Ser Pro Gly Asn Gln Leu
305                      310                      315                      320

Asn Gln Tyr Gln Asp Ile Pro Ala Asp Arg Asn Arg Phe Val Asp Pro
325                      330                      335

Asp Asn Leu Thr Pro Glu Val Gln Asn Glu Leu Ala Gln Phe Ala Ala
340                      345                      350

His Met Ile Asn Ser Val Arg Arg Gln Leu Gly Leu Pro Pro Val Thr
355                      360                      365

Val Thr Ala Gly Ser Gln Glu Phe Ala Arg Leu Leu Ser Thr Ser Tyr
370                      375                      380

Lys Lys Thr His Gly Asn Thr Arg Pro Ser Phe Val Tyr Gly Gln Pro
385                      390                      395                      400

Gly Val Ser Gly His Tyr Gly Val Gly Pro His Asp Lys Thr Ile Ile
405                      410                      415

Glu Asp Ser Ala Gly Ala Ser Gly Leu Ile Arg Asn Asp Asp Asn Met
420                      425                      430

Tyr Glu Asn Ile Gly Ala Phe Asn Asp Val His Thr Val Asn Gly Ile
435                      440                      445

Lys Arg Gly Ile Tyr Asp Ser Ile Lys Tyr Met Leu Phe Thr Asp His
450                      455                      460

Leu His Gly Asn Thr Tyr Gly His Ala Ile Asn Phe Leu Arg Val Asp

```

[0008]

465	470	475	480
Lys His Asn Pro Asn Ala Pro Val Tyr Leu Gly Phe Ser Thr Ser Asn			
	485	490	495
Val Gly Ser Leu Asn Glu His Phe Val Met Phe Pro Glu Ser Asn Ile			
	500	505	510
Ala Asn His Gln Arg Phe Asn Lys Thr Pro Ile Lys Ala Val Gly Ser			
	515	520	525
Thr Lys Asp Tyr Ala Gln Arg Val Gly Thr Val Ser Asp Thr Ile Ala			
	530	535	540
Ala Ile Lys Gly Lys Val Ser Ser Leu Glu Asn Arg Leu Ser Ala Ile			
545	550	555	560
His Gln Glu Ala Asp Ile Met Ala Ala Gln Ala Lys Val Ser Gln Leu			
	565	570	575
Gln Gly Lys Leu Ala Ser Thr Leu Lys Gln Ser Asp Ser Leu Asn Leu			
	580	585	590
Gln Val Arg Gln Leu Asn Asp Thr Lys Gly Ser Leu Arg Thr Glu Leu			
	595	600	605
Leu Ala Ala Lys Ala Lys Gln Ala Gln Leu Glu Ala Thr Arg Asp Gln			
	610	615	620
Ser Leu Ala Lys Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ala Leu His Gln Thr Glu			
625	630	635	640
Ala Leu Ala Glu Gln Ala Ala Ala Arg Val Thr Ala Leu Val Ala Lys			
	645	650	655
Lys Ala His Leu Gln Tyr Leu Arg Asp Phe Lys Leu Asn Pro Asn Arg			
	660	665	670
Leu Gln Val Ile Arg Glu Arg Ile Asp Asn Thr Lys Gln Asp Leu Ala			
	675	680	685
Lys Thr Thr Ser Ser Leu Leu Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ala Leu			
	690	695	700
Gln Ala Lys Gln Ser Ser Leu Glu Ala Thr Ile Ala Thr Thr Glu His			
705	710	715	720
Gln Leu Thr Leu Leu Lys Thr Leu Ala Asn Glu Lys Glu Tyr Arg His			
	725	730	735

[0009]

Leu Asp Glu Asp Ile Ala Thr Val Pro Asp Leu Gln Val Ala Pro Pro
 740 745 750
 Leu Thr Gly Val Lys Pro Leu Ser Tyr Ser Lys Ile Asp Thr Thr Pro
 755 760 765
 Leu Val Gln Glu Met Val Lys Glu Thr Lys Gln Leu Leu Glu Ala Ser
 770 775 780
 Ala Arg Leu Ala Ala Glu Asn Thr Ser Leu Val Ala Glu Ala Leu Val
 785 790 795 800
 Gly Gln Thr Ser Glu Met Val Ala Ser Asn Ala Ile Val Ser Lys Ile
 805 810 815
 Thr Ser Ser Ile Thr Gln Pro Ser Ser Lys Thr Ser Tyr Gly Ser Gly
 820 825 830
 Ser Ser Thr Thr Ser Asn Leu Ile Ser Asp Val Asp Glu Ser Thr Gln
 835 840 845
 Arg Ala Leu Lys Ala Gly Val Val Met Leu Ala Ala Val Gly Leu Thr
 850 855 860
 Gly Phe Arg Phe Arg Lys Glu Ser Lys
 865 870
 <210> 5
 <211> 1647
 <212> PRT
 <213> 化脓链球菌
 <400> 5
 Met Glu Lys Lys Gln Arg Phe Ser Leu Arg Lys Tyr Lys Ser Gly Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Val Leu Ile Gly Ser Val Phe Leu Val Met Thr Thr Thr Val
 20 25 30
 Ala Ala Asp Glu Leu Ser Thr Met Ser Glu Pro Thr Ile Thr Asn His
 35 40 45
 Ala Gln Gln Gln Ala Gln His Leu Thr Asn Thr Glu Leu Ser Ser Ala
 50 55 60
 Glu Ser Lys Ser Gln Asp Thr Ser Gln Ile Thr Leu Lys Thr Asn Arg
 65 70 75 80

[0010]

Glu Lys Glu Gln Ser Gln Asp Leu Val Ser Glu Pro Thr Thr Thr Glu	85	90	95
Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Ser Met Ala Asn Thr Gly Ser Asp Ala	100	105	110
Thr Gln Lys Ser Ala Ser Leu Pro Pro Val Asn Thr Asp Val His Asp	115	120	125
Trp Val Lys Thr Lys Gly Ala Trp Asp Lys Gly Tyr Lys Gly Gln Gly	130	135	140
Lys Val Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Ile Asp Pro Ala His Gln Ser	145	150	155
Met Arg Ile Ser Asp Val Ser Thr Ala Lys Val Lys Ser Lys Glu Asp	165	170	175
Met Leu Ala Arg Gln Lys Ala Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Ser Trp Ile	180	185	190
Asn Asp Lys Val Val Phe Ala His Asn Tyr Val Glu Asn Ser Asp Asn	195	200	205
Ile Lys Glu Asn Gln Phe Glu Asp Phe Asp Glu Asp Trp Glu Asn Phe	210	215	220
Glu Phe Asp Ala Glu Ala Glu Pro Lys Ala Ile Lys Lys His Lys Ile	225	230	235
Tyr Arg Pro Gln Ser Thr Gln Ala Pro Lys Glu Thr Val Ile Lys Thr	245	250	255
Glu Glu Thr Asp Gly Ser His Asp Ile Asp Trp Thr Gln Thr Asp Asp	260	265	270
Asp Thr Lys Tyr Glu Ser His Gly Met His Val Thr Gly Ile Val Ala	275	280	285
Gly Asn Ser Lys Glu Ala Ala Ala Thr Gly Glu Arg Phe Leu Gly Ile	290	295	300
Ala Pro Glu Ala Gln Val Met Phe Met Arg Val Phe Ala Asn Asp Ile	305	310	315
Met Gly Ser Ala Glu Ser Leu Phe Ile Lys Ala Ile Glu Asp Ala Val	325	330	335
Ala Leu Gly Ala Asp Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Thr Ala Asn Gly			

[0011]

	340	345	350
Ala Gln Leu Ser Gly Ser Lys Pro Leu Met Glu Ala Ile Glu Lys Ala			
355	360	365	
Lys Lys Ala Gly Val Ser Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Arg Val			
370	375	380	
Tyr Gly Ser Asp His Asp Asp Pro Leu Ala Thr Asn Pro Asp Tyr Gly			
385	390	395	400
Leu Val Gly Ser Pro Ser Thr Gly Arg Thr Pro Thr Ser Val Ala Ala			
405	410	415	
Ile Asn Ser Lys Trp Val Ile Gln Arg Leu Met Thr Val Lys Glu Leu			
420	425	430	
Glu Asn Arg Ala Asp Leu Asn His Gly Lys Ala Ile Tyr Ser Glu Ser			
435	440	445	
Val Asp Phe Lys Asp Ile Lys Asp Ser Leu Gly Tyr Asp Lys Ser His			
450	455	460	
Gln Phe Ala Tyr Val Lys Glu Ser Thr Asp Ala Gly Tyr Asn Ala Gln			
465	470	475	480
Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Asp Pro Asn Lys Thr			
485	490	495	
Tyr Asp Glu Met Ile Ala Leu Ala Lys Lys His Gly Ala Leu Gly Val			
500	505	510	
Leu Ile Phe Asn Asn Lys Pro Gly Gln Ser Asn Arg Ser Met Arg Leu			
515	520	525	
Thr Ala Asn Gly Met Gly Ile Pro Ser Ala Phe Ile Ser His Glu Phe			
530	535	540	
Gly Lys Ala Met Ser Gln Leu Asn Gly Asn Gly Thr Gly Ser Leu Glu			
545	550	555	560
Phe Asp Ser Val Val Ser Lys Ala Pro Ser Gln Lys Gly Asn Glu Met			
565	570	575	
Asn His Phe Ser Asn Trp Gly Leu Thr Ser Asp Gly Tyr Leu Lys Pro			
580	585	590	
Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly Asp Ile Tyr Ser Thr Tyr Asn Asp Asn			
595	600	605	

[0012]

His Tyr Gly Ser Gln Thr	Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro Gln Ile Ala
610	615 620
Gly Ala Ser Leu Leu Val	Lys Gln Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Asn
625 630	635 640
Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ala Asp Ile Val Lys Asn Leu Leu Met Ser	
645	650 655
Asn Ala Gln Ile His Val Asn Pro Glu Thr Lys Thr Thr Thr Ser Pro	
660	665 670
Arg Gln Gln Gly Ala Gly Leu Leu Asn Ile Asp Gly Ala Val Thr Ser	
675	680 685
Gly Leu Tyr Val Thr Gly Lys Asp Asn Tyr Gly Ser Ile Ser Leu Gly	
690	695 700
Asn Ile Thr Asp Thr Met Thr Phe Asp Val Thr Val His Asn Leu Ser	
705 710	715 720
Asn Lys Asp Lys Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Leu Leu Thr Asp His	
725	730 735
Val Asp Pro Gln Lys Gly Arg Phe Thr Leu Thr Ser His Ser Leu Lys	
740	745 750
Thr Tyr Gln Gly Gly Glu Val Thr Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Thr	
755	760 765
Val Arg Val Thr Met Asp Val Ser Gln Phe Thr Lys Glu Leu Thr Lys	
770	775 780
Gln Met Pro Asn Gly Tyr Tyr Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Arg Asp	
785 790	795 800
Ser Gln Asp Asp Gln Leu Asn Arg Val Asn Ile Pro Phe Val Gly Phe	
805	810 815
Lys Gly Gln Phe Glu Asn Leu Ala Val Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Arg	
820	825 830
Leu Lys Ser Gln Gly Lys Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Glu Ser Gly Pro	
835	840 845
Lys Asp Asp Ile Tyr Val Gly Lys His Phe Thr Gly Leu Val Thr Leu	
850	855 860

[0013]

Gly Ser Glu Thr Asn Val Ser Thr Lys Thr Ile Ser Asp Asn Gly Leu			
865	870	875	880
His Thr Leu Gly Thr Phe Lys Asn Ala Asp Gly Lys Phe Ile Leu Glu			
	885	890	895
Lys Asn Ala Gln Gly Asn Pro Val Leu Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp			
	900	905	910
Asn Asn Gln Asp Phe Ala Ala Phe Lys Gly Val Phe Leu Arg Lys Tyr			
	915	920	925
Gln Gly Leu Lys Ala Ser Val Tyr His Ala Ser Asp Lys Glu His Lys			
	930	935	940
Asn Pro Leu Trp Val Ser Pro Glu Ser Phe Lys Gly Asp Lys Asn Phe			
945	950	955	960
Asn Ser Asp Ile Arg Phe Ala Lys Ser Thr Thr Leu Leu Gly Thr Ala			
	965	970	975
Phe Ser Gly Lys Ser Leu Thr Gly Ala Glu Leu Pro Asp Gly His Tyr			
	980	985	990
His Tyr Val Val Ser Tyr Tyr Pro Asp Val Val Gly Ala Lys Arg Gln			
	995	1000	1005
Glu Met Thr Phe Asp Met Ile Leu Asp Arg Gln Lys Pro Val Leu Ser			
	1010	1015	1020
Gln Ala Thr Phe Asp Pro Glu Thr Asn Arg Phe Lys Pro Glu Pro Leu			
1025	1030	1035	1040
Lys Asp Arg Gly Leu Ala Gly Val Arg Lys Asp Ser Val Phe Tyr Leu			
	1045	1050	1055
Glu Arg Lys Asp Asn Lys Pro Tyr Thr Val Thr Ile Asn Asp Ser Tyr			
	1060	1065	1070
Lys Tyr Val Ser Val Glu Asp Asn Lys Thr Phe Val Glu Arg Gln Ala			
	1075	1080	1085
Asp Gly Ser Phe Ile Leu Pro Leu Asp Lys Ala Lys Leu Gly Asp Phe			
	1090	1095	1100
Tyr Tyr Met Val Glu Asp Phe Ala Gly Asn Val Ala Ile Ala Lys Leu			
1105	1110	1115	1120
Gly Asp His Leu Pro Gln Thr Leu Gly Lys Thr Pro Ile Lys Leu Lys			

[0014]

1125	1130	1135
Leu Thr Asp Gly Asn Tyr Gln Thr Lys Glu Thr Leu Lys Asp Asn Leu 1140	1145	1150
Glu Met Thr Gln Ser Asp Thr Gly Leu Val Thr Asn Gln Ala Gln Leu 1155	1160	1165
Ala Val Val His Arg Asn Gln Pro Gln Ser Gln Leu Thr Lys Met Asn 1170	1175	1180
Gln Asp Phe Phe Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Asn Lys Asp Phe Val 1185	1190	1195
Ala Phe Lys Gly Leu Lys Asn Asn Val Tyr Asn Asp Leu Thr Val Asn 1205	1210	1215
Val Tyr Ala Lys Asp Asp His Gln Lys Gln Thr Pro Ile Trp Ser Ser 1220	1225	1230
Gln Ala Gly Ala Ser Val Ser Ala Ile Glu Ser Thr Ala Trp Tyr Gly 1235	1240	1245
Ile Thr Ala Arg Gly Ser Lys Val Met Pro Gly Asp Tyr Gln Tyr Val 1250	1255	1260
Val Thr Tyr Arg Asp Glu His Gly Lys Glu His Gln Lys Gln Tyr Thr 1265	1270	1275
Ile Ser Val Asn Asp Lys Lys Pro Met Ile Thr Gln Gly Arg Phe Asp 1285	1290	1295
Thr Ile Asn Gly Val Asp His Phe Thr Pro Asp Lys Thr Lys Ala Leu 1300	1305	1310
Asp Ser Ser Gly Ile Val Arg Glu Glu Val Phe Tyr Leu Ala Lys Lys 1315	1320	1325
Asn Gly Arg Lys Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Asp Gly Ile Thr Val 1330	1335	1340
Ser Asp Asn Lys Val Tyr Ile Pro Lys Asn Pro Asp Gly Ser Tyr Thr 1345	1350	1355
Ile Ser Lys Arg Asp Gly Val Thr Leu Ser Asp Tyr Tyr Tyr Leu Val 1365	1370	1375
Glu Asp Arg Ala Gly Asn Val Ser Phe Ala Thr Leu Arg Asp Leu Lys 1380	1385	1390

[0015]

Ala Val Gly Lys Asp Lys Ala Val Val Asn Phe Gly Leu Asp Leu Pro		
1395	1400	1405
Val Pro Glu Asp Lys Gln Ile Val Asn Phe Thr Tyr Leu Val Arg Asp		
1410	1415	1420
Ala Asp Gly Lys Pro Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Tyr Asn Asn Ser Gly		
1425	1430	1435 1440
Asn Ser Leu Ile Leu Pro Tyr Gly Lys Tyr Thr Val Glu Leu Leu Thr		
1445	1450	1455
Tyr Asp Thr Asn Ala Ala Lys Leu Glu Ser Asp Lys Ile Val Ser Phe		
1460	1465	1470
Thr Leu Ser Ala Asp Asn Asn Phe Gln Gln Val Thr Phe Lys Ile Thr		
1475	1480	1485
Met Leu Ala Thr Ser Gln Ile Thr Ala His Phe Asp His Leu Leu Pro		
1490	1495	1500
Glu Gly Ser Arg Val Ser Leu Lys Thr Ala Gln Asp Gln Leu Ile Pro		
1505	1510	1515 1520
Leu Glu Gln Ser Leu Tyr Val Pro Lys Ala Tyr Gly Lys Thr Val Gln		
1525	1530	1535
Glu Gly Thr Tyr Glu Val Val Val Ser Leu Pro Lys Gly Tyr Arg Ile		
1540	1545	1550
Glu Gly Asn Thr Lys Val Asn Thr Leu Pro Asn Glu Val His Glu Leu		
1555	1560	1565
Ser Leu Arg Leu Val Lys Val Gly Asp Ala Ser Asp Ser Thr Gly Asp		
1570	1575	1580
His Lys Val Met Ser Lys Asn Asn Ser Gln Ala Leu Thr Ala Ser Ala		
1585	1590	1595 1600
Thr Pro Thr Lys Ser Thr Thr Ser Ala Thr Ala Lys Ala Leu Pro Ser		
1605	1610	1615
Thr Gly Glu Lys Met Gly Leu Lys Leu Arg Ile Val Gly Leu Val Leu		
1620	1625	1630
Leu Gly Leu Thr Cys Val Phe Ser Arg Lys Lys Ser Thr Lys Asp		
1635	1640	1645

[0016]

<210> 6
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> 化脓链球菌

<400> 6
 Met Asn Lys Asn Lys Leu Leu Arg Val Ala Met Leu Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Thr Ala Glu Ser Met Thr Val Leu Ala Gln Asp Val Met Leu
 20 25 30
 Glu Thr His Lys Ala Thr Thr Asn Glu Thr Ser Asp Ser Ser Ser Lys
 35 40 45
 Glu Glu Asn Asn Lys Asn Ala Ala Pro Thr Thr Ser Asp Lys Thr Asp
 50 55 60
 Gln Gly Pro Leu Asp Ala Ser Ala Glu Thr Asn Ser Asn Ser Leu Val
 65 70 75 80
 Asn Ala Asp Asp Lys Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gln Ser Ala Ile Gly
 85 90 95
 Ser Ser Asp Asn Lys Ala Glu Ala Glu Asn Gln Val Asp Asp Lys Ser
 100 105 110
 Thr Asp His Ser Lys Ser Thr Asp His Ser Lys Pro Thr Asp Gln Pro
 115 120 125
 Lys Pro Ser Pro Ser Lys Val Asp Thr Ala Pro Ala Ser Ser Leu Ser
 130 135 140
 Lys Gln Leu Pro Glu Ala Arg Thr Pro Ile Gln Ser Leu Ser Pro Tyr
 145 150 155 160
 Val Ser Asp Leu Asp Leu Ser Glu Ile Asp Ile Pro Ser Val Asn Thr
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Tyr Val Glu His Trp Ser Gly Lys Asn Ala Tyr Thr His
 180 185 190
 His Leu Leu Ser Arg Arg Tyr Gly Ile Lys Ala Asp Gln Ile Asp Ser
 195 200 205
 Tyr Leu Lys Ser Thr Gly Ile Ala Tyr Asp Ser Thr Arg Ile Asn Gly
 210 215 220
 Glu Lys Leu Leu Gln Trp Glu Lys Lys Ser Gly Leu Asp Val Arg Ala

[0017]

225	230	235	240
Ile Val Ala Ile Ala Met Ser Glu Ser Ser Leu Gly Thr Gln Gly Ile			
245	250	255	
Ala Thr Leu Leu Gly Ala Asn Met Phe Gly Tyr Ala Ala Phe Asp Leu			
260	265	270	
Asp Pro Thr Gln Ala Ser Lys Phe Asn Asp Asp Ser Ala Ile Val Lys			
275	280	285	
Met Thr Gln Asp Thr Ile Ile Lys Asn Lys Asn Ser Asn Phe Ala Leu			
290	295	300	
Gln Asp Leu Lys Ala Ala Lys Phe Ser Arg Gly Gln Leu Asn Phe Ala			
305	310	315	320
Ser Asp Gly Gly Val Tyr Phe Thr Asp Thr Thr Gly Ser Gly Lys Arg			
325	330	335	
Arg Ala Gln Ile Met Glu Asp Leu Asp Lys Trp Ile Asp Asp His Gly			
340	345	350	
Gly Thr Pro Ala Ile Pro Ala Glu Leu Lys Val Gln Ser Ser Ala Ser			
355	360	365	
Phe Ala Ser Val Pro Ala Gly Tyr Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Asp Val			
370	375	380	
Leu Gly Tyr Gln Ala Ser Ser Tyr Ala Trp Gly Gln Cys Thr Trp Tyr			
385	390	395	400
Val Tyr Asn Arg Ala Lys Glu Leu Gly Tyr Gln Phe Asp Pro Phe Met			
405	410	415	
Gly Asn Gly Gly Asp Trp Lys Tyr Lys Val Gly Tyr Ala Leu Ser Lys			
420	425	430	
Thr Pro Lys Val Gly Tyr Ala Ile Ser Phe Ala Pro Gly Gln Ala Gly			
435	440	445	
Ala Asp Gly Thr Tyr Gly His Val Ser Ile Val Glu Asp Val Arg Lys			
450	455	460	
Asp Gly Ser Ile Leu Ile Ser Glu Ser Asn Cys Ile Gly Leu Gly Lys			
465	470	475	480
Ile Ser Tyr Arg Thr Phe Thr Ala Gln Gln Ala Glu Gln Leu Thr Tyr			
485	490	495	

[0018]

```

Val Ile Gly Lys Ser Lys Asn
      500

<210> 7
<211> 995
<212> PRT
<213> 化脓链球菌

<400> 7
Met Asp Lys His Leu Leu Val Lys Arg Thr Leu Gly Cys Val Cys Ala
1          5          10          15

Ala Thr Leu Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr His His Asp Ser Leu Asn
      20          25          30

Thr Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Val Gln Val Gln Lys Gly Leu Pro
      35          40          45

Ser Ile Asp Ser Leu His Tyr Leu Ser Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe
      50          55          60

Lys Glu Glu Leu Ser Lys Ala Gly Gln Glu Ser Gln Lys Val Lys Glu
65          70          75          80

Ile Leu Ala Lys Ala Gln Gln Ala Asp Lys Gln Ala Gln Glu Leu Ala
      85          90          95

Lys Met Lys Ile Pro Glu Lys Ile Pro Met Lys Pro Leu His Gly Ser
      100         105         110

Leu Tyr Gly Gly Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Lys Thr Ser Asp Pro
      115         120         125

Thr Glu Lys Asp Lys Val Asn Ser Met Gly Glu Leu Pro Lys Glu Val
      130         135         140

Asp Leu Ala Phe Ile Phe His Asp Trp Thr Lys Asp Tyr Ser Leu Phe
145          150          155          160

Trp Lys Glu Leu Ala Thr Lys His Val Pro Lys Leu Asn Lys Gln Gly
      165         170         175

Thr Arg Val Ile Arg Thr Ile Pro Trp Arg Phe Leu Ala Gly Gly Asp
      180         185         190

Asn Ser Gly Ile Ala Glu Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Asn Thr Pro Glu
      195         200         205

```

[0019]

Gly Asn Lys Ala Leu Ala Lys Ala Ile Val Asp Glu Tyr Val Tyr Lys 210	215	220	
Tyr Asn Leu Asp Gly Leu Asp Val Asp Val Glu His Asp Ser Ile Pro 225	230	235	240
Lys Val Asp Lys Lys Glu Asp Thr Ala Gly Val Glu Arg Ser Ile Gln 245	250		255
Val Phe Glu Glu Ile Gly Lys Leu Ile Gly Pro Lys Gly Val Asp Lys 260	265		270
Ser Arg Leu Phe Ile Met Asp Ser Thr Tyr Met Ala Asp Lys Asn Pro 275	280		285
Leu Ile Glu Arg Gly Ala Pro Tyr Ile Asn Leu Leu Leu Val Gln Val 290	295		300
Tyr Gly Ser Gln Gly Glu Lys Gly Gly Trp Glu Pro Val Ser Asn Arg 305	310	315	320
Pro Glu Lys Thr Met Glu Glu Arg Trp Gln Gly Tyr Ser Lys Tyr Ile 325		330	335
Arg Pro Glu Gln Tyr Met Ile Gly Phe Ser Phe Tyr Glu Glu Asn Ala 340	345		350
Gln Glu Gly Asn Leu Trp Tyr Asp Ile Asn Ser Arg Lys Asp Glu Asp 355	360		365
Lys Ala Asn Gly Ile Asn Thr Asp Ile Thr Gly Thr Arg Ala Glu Arg 370	375		380
Tyr Ala Arg Trp Gln Pro Lys Thr Gly Gly Val Lys Gly Gly Ile Phe 385	390	395	400
Ser Tyr Ala Ile Asp Arg Asp Gly Val Ala His Gln Pro Lys Lys Tyr 405		410	415
Ala Lys Gln Lys Glu Phe Lys Asp Ala Thr Asp Asn Ile Phe His Ser 420	425		430
Asp Tyr Ser Val Ser Lys Ala Leu Lys Thr Val Met Leu Lys Asp Lys 435	440		445
Ser Tyr Asp Leu Ile Asp Glu Lys Asp Phe Pro Asp Lys Ala Leu Arg 450	455		460
Glu Ala Val Met Ala Gln Val Gly Thr Arg Lys Gly Asp Leu Glu Arg			

[0020]

465	470	475	480
Phe Asn Gly Thr Leu Arg Leu Asp Asn Pro Ala Ile Gln Ser Leu Glu			
485	490	495	
Gly Leu Asn Lys Phe Lys Lys Leu Ala Gln Leu Asp Leu Ile Gly Leu			
500	505	510	
Ser Arg Ile Thr Lys Leu Asp Arg Ser Val Leu Pro Ala Asn Met Lys			
515	520	525	
Pro Gly Lys Asp Thr Leu Glu Thr Val Leu Glu Thr Tyr Lys Lys Asp			
530	535	540	
Asn Lys Glu Glu Pro Ala Thr Ile Pro Pro Val Ser Leu Lys Val Ser			
545	550	555	560
Gly Leu Thr Gly Leu Lys Glu Leu Asp Leu Ser Gly Phe Asp Arg Glu			
565	570	575	
Thr Leu Ala Gly Leu Asp Ala Ala Thr Leu Thr Ser Leu Glu Lys Val			
580	585	590	
Asp Ile Ser Gly Asn Lys Leu Asp Leu Ala Pro Gly Thr Glu Asn Arg			
595	600	605	
Gln Ile Phe Asp Thr Met Leu Ser Thr Ile Ser Asn His Val Gly Ser			
610	615	620	
Asn Glu Gln Thr Val Lys Phe Asp Lys Gln Lys Pro Thr Gly His Tyr			
625	630	635	640
Pro Asp Thr Tyr Gly Lys Thr Ser Leu Arg Leu Pro Val Ala Asn Glu			
645	650	655	
Lys Val Asp Leu Gln Ser Gln Leu Leu Phe Gly Thr Val Thr Asn Gln			
660	665	670	
Gly Thr Leu Ile Asn Ser Glu Ala Asp Tyr Lys Ala Tyr Gln Asn His			
675	680	685	
Lys Ile Ala Gly Arg Ser Phe Val Asp Ser Asn Tyr His Tyr Asn Asn			
690	695	700	
Phe Lys Val Ser Tyr Glu Asn Tyr Thr Val Lys Val Thr Asp Ser Thr			
705	710	715	720
Leu Gly Thr Thr Thr Asp Lys Thr Leu Ala Thr Asp Lys Glu Glu Thr			
725	730	735	

[0021]

Tyr Lys Val	Asp Phe Phe Ser	Pro Ala Asp Lys Thr	Lys Ala Val His
740		745	750
Thr Ala Lys Val	Ile Val Gly Asp Glu Lys Thr	Met Met Val Asn Leu	
755	760	765	
Ala Glu Gly Ala Thr Val	Ile Gly Gly Ser Ala Asp Pro Val Asn Ala		
770	775	780	
Arg Lys Val Phe Asp Gly Gln Leu Gly Ser Glu Thr Asp Asn Ile Ser			
785	790	795	800
Leu Gly Trp Asp Ser Lys Gln Ser Ile Ile Phe Lys Leu Lys Glu Asp			
805	810	815	
Gly Leu Ile Lys His Trp Arg Phe Phe Asn Asp Ser Ala Arg Asn Pro			
820	825	830	
Glu Thr Thr Asn Lys Pro Ile Gln Glu Ala Ser Leu Gln Ile Phe Asn			
835	840	845	
Ile Lys Asp Tyr Asn Leu Asp Asn Leu Leu Glu Asn Pro Asn Lys Phe			
850	855	860	
Asp Asp Glu Lys Tyr Trp Ile Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ala Gln Gly			
865	870	875	880
Glu Arg Ala Thr Ala Phe Ser Asn Thr Leu Asn Asn Ile Thr Ser Lys			
885	890	895	
Tyr Trp Arg Val Val Phe Asp Thr Lys Gly Asp Arg Tyr Ser Ser Pro			
900	905	910	
Val Val Pro Glu Leu Gln Ile Leu Gly Tyr Pro Leu Pro Asn Ala Asp			
915	920	925	
Thr Ile Met Lys Thr Val Thr Thr Ala Lys Glu Leu Ser Gln Gln Lys			
930	935	940	
Asp Lys Phe Ser Gln Lys Met Leu Asp Glu Leu Lys Ile Lys Glu Met			
945	950	955	960
Ala Leu Glu Thr Ser Leu Asn Ser Lys Ile Phe Asp Val Thr Ala Ile			
965	970	975	
Asn Ala Asn Ala Gly Val Leu Lys Asp Cys Ile Glu Lys Arg Gln Leu			
980	985	990	

[0022]

Leu Lys Lys
 995

<210> 8
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 化脓链球菌

<400> 8
 Gln Gln Asp Pro Asp Pro Ser Gln Leu His Arg Ser Ser Leu Val Lys
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln Asn Ile Tyr Phe Leu Tyr Glu Gly Asp Pro Val Thr His
 20 25 30
 Glu Asn Val Lys Ser Val Asp Gln Leu Leu Ser His Asp Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asn Val Ser Gly Pro Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Thr Glu Leu Lys Asn
 50 55 60
 Gln Glu Met Ala Thr Leu Phe Lys Asp Lys Asn Val Asp Ile Tyr Gly
 65 70 75 80
 Val Glu Tyr Tyr His Leu Cys Tyr Leu Cys Glu Asn Ala Glu Arg Ser
 85 90 95
 Ala Cys Ile Tyr Gly Gly Val Thr Asn His Glu Gly Asn His Leu Glu
 100 105 110
 Ile Pro Lys Lys Ile Val Val Lys Val Ser Ile Asp Gly Ile Gln Ser
 115 120 125
 Leu Ser Phe Asp Ile Glu Thr Asn Lys Lys Met Val Thr Ala Gln Glu
 130 135 140
 Leu Asp Tyr Lys Val Arg Lys Tyr Leu Thr Asp Asn Lys Gln Leu Tyr
 145 150 155 160
 Thr Asn Gly Pro Ser Lys Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Pro
 165 170 175
 Lys Asn Lys Glu Ser Phe Trp Phe Asp Phe Phe Pro Glu Pro Glu Phe
 180 185 190
 Thr Gln Ser Lys Tyr Leu Met Ile Tyr Lys Asp Asn Glu Thr Leu Asp
 195 200 205
 Ser Asn Thr Ser Gln Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys

[0023]

210	215	220
<210> 9		
<211> 865		
<212> PRT		
<213> 化脓链球菌		
<400> 9		
Ala Asp Glu Leu Ser Thr Met Ser Glu Pro Thr Ile Thr Asn His Ala		
1 5 10 15		
Gln Gln Gln Ala Gln His Leu Thr Asn Thr Glu Leu Ser Ser Ala Glu		
20 25 30		
Ser Lys Ser Gln Asp Thr Ser Gln Ile Thr Leu Lys Thr Asn Arg Glu		
35 40 45		
Lys Glu Gln Ser Gln Asp Leu Val Ser Glu Pro Thr Thr Thr Glu Leu		
50 55 60		
Ala Asp Thr Asp Ala Ala Ser Met Ala Asn Thr Gly Ser Asp Ala Thr		
65 70 75 80		
Gln Lys Ser Ala Ser Leu Pro Pro Val Asn Thr Asp Val His Asp Trp		
85 90 95		
Val Lys Thr Lys Gly Ala Trp Asp Lys Gly Tyr Lys Gly Gln Gly Lys		
100 105 110		
Val Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Ile Asp Pro Ala His Gln Ser Met		
115 120 125		
Arg Ile Ser Asp Val Ser Thr Ala Lys Val Lys Ser Lys Glu Asp Met		
130 135 140		
Leu Ala Arg Gln Lys Ala Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Ser Trp Ile Asn		
145 150 155 160		
Asp Lys Val Val Phe Ala His Asn Tyr Val Glu Asn Ser Asp Asn Ile		
165 170 175		
Lys Glu Asn Gln Phe Glu Asp Phe Asp Glu Asp Trp Glu Asn Phe Glu		
180 185 190		
Phe Asp Ala Glu Ala Glu Pro Lys Ala Ile Lys Lys His Lys Ile Tyr		
195 200 205		
Arg Pro Gln Ser Thr Gln Ala Pro Lys Glu Thr Val Ile Lys Thr Glu		
210 215 220		

[0024]

Glu Thr Asp Gly Ser His Asp Ile Asp Trp Thr Gln Thr Asp Asp Asp			
225	230	235	240
Thr Lys Tyr Glu Ser His Gly Met His Val Thr Gly Ile Val Ala Gly			
	245	250	255
Asn Ser Lys Glu Ala Ala Ala Thr Gly Glu Arg Phe Leu Gly Ile Ala			
	260	265	270
Pro Glu Ala Gln Val Met Phe Met Arg Val Phe Ala Asn Asp Ile Met			
	275	280	285
Gly Ser Ala Glu Ser Leu Phe Ile Lys Ala Ile Glu Asp Ala Val Ala			
	290	295	300
Leu Gly Ala Asp Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Thr Ala Asn Gly Ala			
	305	310	315
Gln Leu Ser Gly Ser Lys Pro Leu Met Glu Ala Ile Glu Lys Ala Lys			
	325	330	335
Lys Ala Gly Val Ser Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Arg Val Tyr			
	340	345	350
Gly Ser Asp His Asp Asp Pro Leu Ala Thr Asn Pro Asp Tyr Gly Leu			
	355	360	365
Val Gly Ser Pro Ser Thr Gly Arg Thr Pro Thr Ser Val Ala Ala Ile			
	370	375	380
Asn Ser Lys Trp Val Ile Gln Arg Leu Met Thr Val Lys Glu Leu Glu			
	385	390	395
Asn Arg Ala Asp Leu Asn His Gly Lys Ala Ile Tyr Ser Glu Ser Val			
	405	410	415
Asp Phe Lys Asp Ile Lys Asp Ser Leu Gly Tyr Asp Lys Ser His Gln			
	420	425	430
Phe Ala Tyr Val Lys Glu Ser Thr Asp Ala Gly Tyr Asn Ala Gln Asp			
	435	440	445
Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Asp Pro Asn Lys Thr Tyr			
	450	455	460
Asp Glu Met Ile Ala Leu Ala Lys Lys His Gly Ala Leu Gly Val Leu			
	465	470	475
			480

[0025]

Ile Phe Asn Asn Lys Pro Gly Gln Ser Asn Arg Ser Met Arg Leu Thr		
485	490	495
Ala Asn Gly Met Gly Ile Pro Ser Ala Phe Ile Ser His Glu Phe Gly		
500	505	510
Lys Ala Met Ser Gln Leu Asn Gly Asn Gly Thr Gly Ser Leu Glu Phe		
515	520	525
Asp Ser Val Val Ser Lys Ala Pro Ser Gln Lys Gly Asn Glu Met Asn		
530	535	540
His Phe Ser Asn Trp Gly Leu Thr Ser Asp Gly Tyr Leu Lys Pro Asp		
545	550	555
Ile Thr Ala Pro Gly Gly Asp Ile Tyr Ser Thr Tyr Asn Asp Asn His		
565	570	575
Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro Gln Ile Ala Gly		
580	585	590
Ala Ser Leu Leu Val Lys Gln Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Asn Leu		
595	600	605
Pro Lys Glu Lys Ile Ala Asp Ile Val Lys Asn Leu Leu Met Ser Asn		
610	615	620
Ala Gln Ile His Val Asn Pro Glu Thr Lys Thr Thr Thr Ser Pro Arg		
625	630	635
Gln Gln Gly Ala Gly Leu Leu Asn Ile Asp Gly Ala Val Thr Ser Gly		
645	650	655
Leu Tyr Val Thr Gly Lys Asp Asn Tyr Gly Ser Ile Ser Leu Gly Asn		
660	665	670
Ile Thr Asp Thr Met Thr Phe Asp Val Thr Val His Asn Leu Ser Asn		
675	680	685
Lys Asp Lys Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Leu Leu Thr Asp His Val		
690	695	700
Asp Pro Gln Lys Gly Arg Phe Thr Leu Thr Ser His Ser Leu Lys Thr		
705	710	715
Tyr Gln Gly Gly Glu Val Thr Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Thr Val		
725	730	735
Arg Val Thr Met Asp Val Ser Gln Phe Thr Lys Glu Leu Thr Lys Gln		

[0026]

740	745	750
Met Pro Asn Gly Tyr Tyr Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Arg Asp Ser		
755	760	765
Gln Asp Asp Gln Leu Asn Arg Val Asn Ile Pro Phe Val Gly Phe Lys		
770	775	780
Gly Gln Phe Glu Asn Leu Ala Val Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Arg Leu		
785	790	795 800
Lys Ser Gln Gly Lys Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Glu Ser Gly Pro Lys		
805	810	815
Asp Asp Ile Tyr Val Gly Lys His Phe Thr Gly Leu Val Thr Leu Gly		
820	825	830
Ser Glu Thr Asn Val Ser Thr Lys Thr Ile Ser Asp Asn Gly Leu His		
835	840	845
Thr Leu Gly Thr Phe Lys Asn Ala Asp Gly Lys Phe Ile Leu Glu Lys		
850	855	860
Asn		
865		
<210> 10		
<211> 298		
<212> PRT		
<213> 化脓链球菌		
<400> 10		
Ser Val Gly Val Ser His Gln Val Lys Ala Asp Asp Arg Ala Ser Gly		
1 5 10 15		
Glu Thr Lys Ala Ser Asn Thr His Asp Asp Ser Leu Pro Lys Pro Glu		
20 25 30		
Thr Ile Gln Glu Ala Lys Ala Thr Ile Asp Ala Val Glu Lys Thr Leu		
35 40 45		
Ser Gln Gln Lys Ala Glu Leu Thr Glu Leu Ala Thr Ala Leu Thr Lys		
50 55 60		
Thr Thr Ala Glu Ile Asn His Leu Lys Glu Gln Gln Asp Asn Glu Gln		
65 70 75 80		
Lys Ala Leu Thr Ser Ala Gln Glu Ile Tyr Thr Asn Thr Leu Ala Ser		
85 90 95		

[0027]

Ser Glu Glu Thr Leu Leu Ala Gln Gly Ala Glu His Gln Arg Glu Leu		
100	105	110
Thr Ala Thr Glu Thr Glu Leu His Asn Ala Gln Ala Asp Gln His Ser		
115	120	125
Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ser Ala Glu Thr		
130	135	140
Thr Arg Ala Gln Asp Leu Val Glu Gln Val Lys Thr Ser Glu Gln Asn		
145	150	155
Ile Ala Lys Leu Asn Ala Met Ile Ser Asn Pro Asp Ala Ile Thr Lys		
165	170	175
Ala Ala Gln Thr Ala Asn Asp Asn Thr Lys Ala Leu Ser Ser Glu Leu		
180	185	190
Glu Lys Ala Lys Ala Asp Leu Glu Asn Gln Lys Ala Lys Val Lys Lys		
195	200	205
Gln Leu Thr Glu Glu Leu Ala Ala Gln Lys Ala Ala Leu Ala Glu Lys		
210	215	220
Glu Ala Glu Leu Ser Arg Leu Lys Ser Ser Ala Pro Ser Thr Gln Asp		
225	230	235
Ser Ile Val Gly Asn Asn Thr Met Lys Ala Pro Gln Gly Tyr Pro Leu		
245	250	255
Glu Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Ala Ser		
260	265	270
Tyr Asn Asn Tyr Tyr Lys Glu His Ala Asp Gln Ile Ile Ala Lys Ala		
275	280	285
Ser Pro Gly Asn Gln Leu Asn Gln Tyr Gln		
290	295	

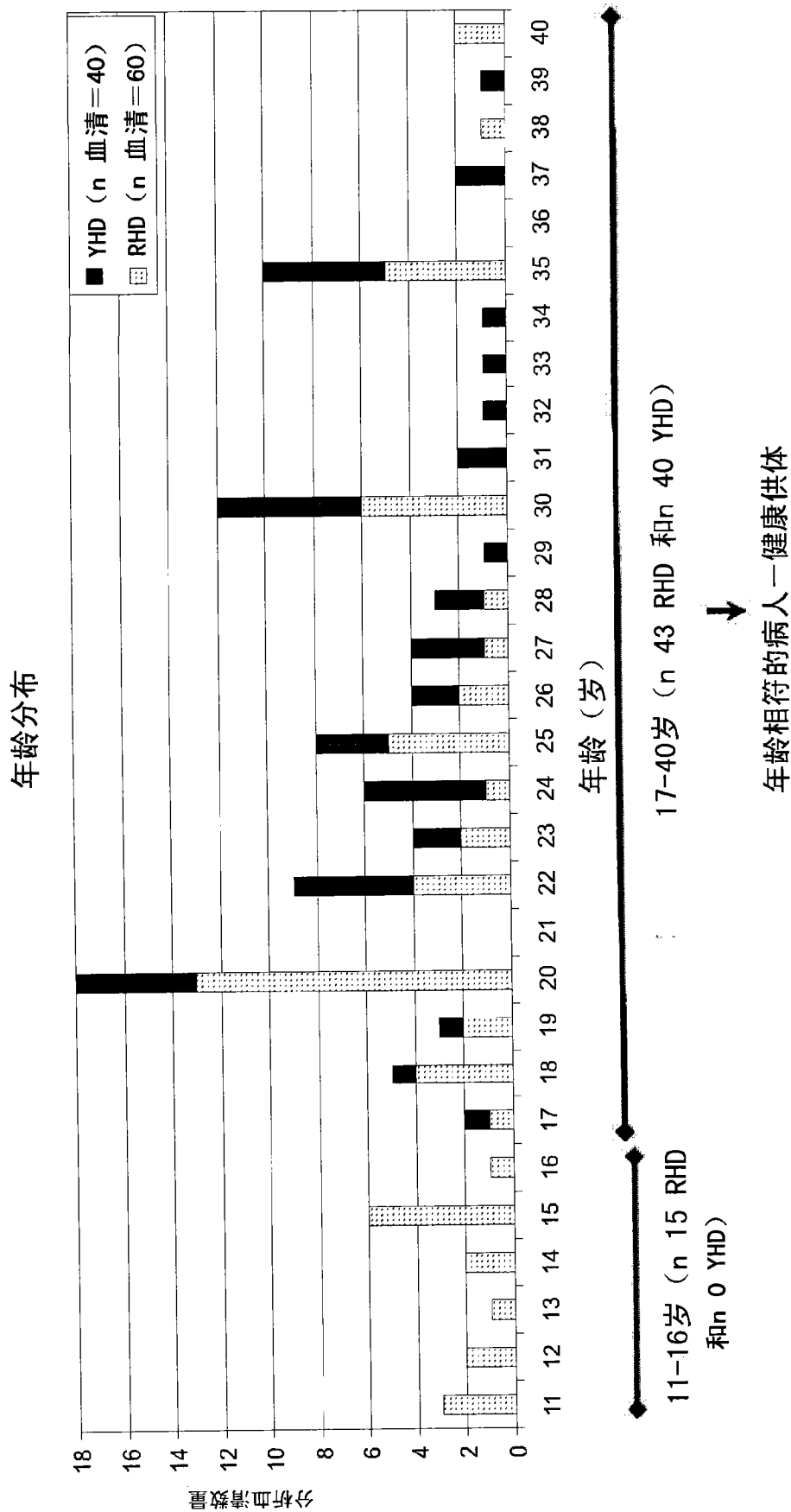


图 1

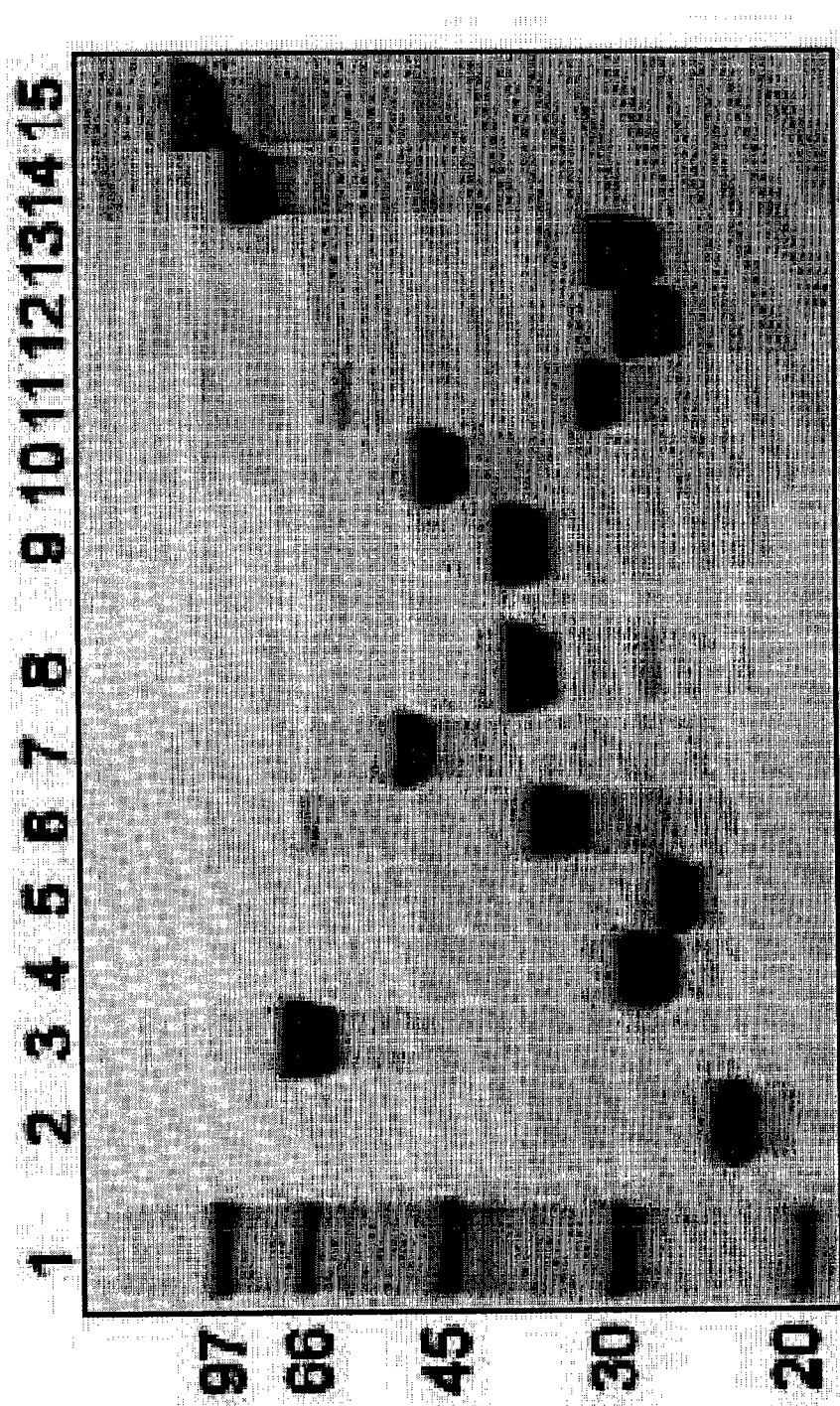


图 2A

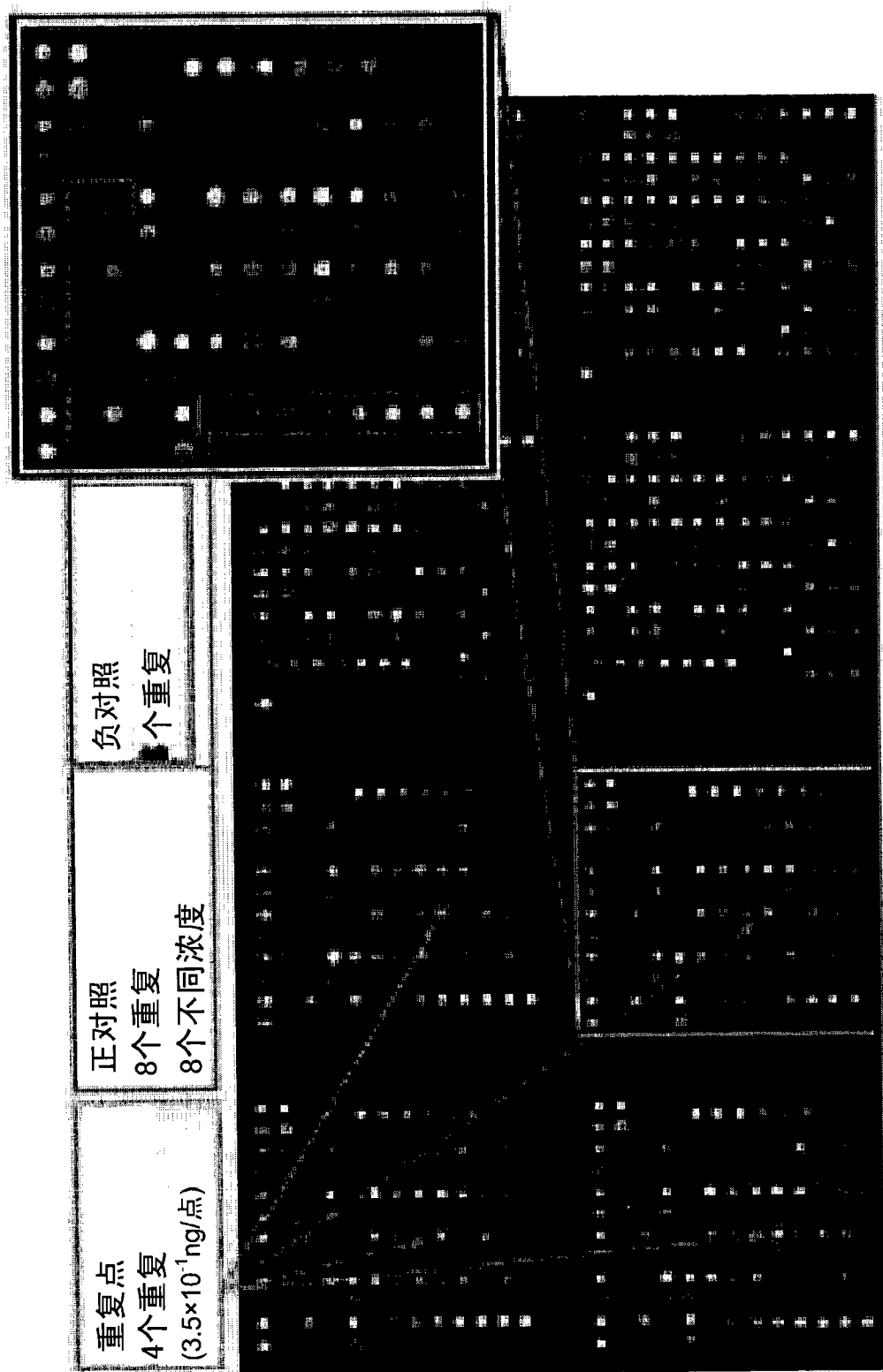


图 2B

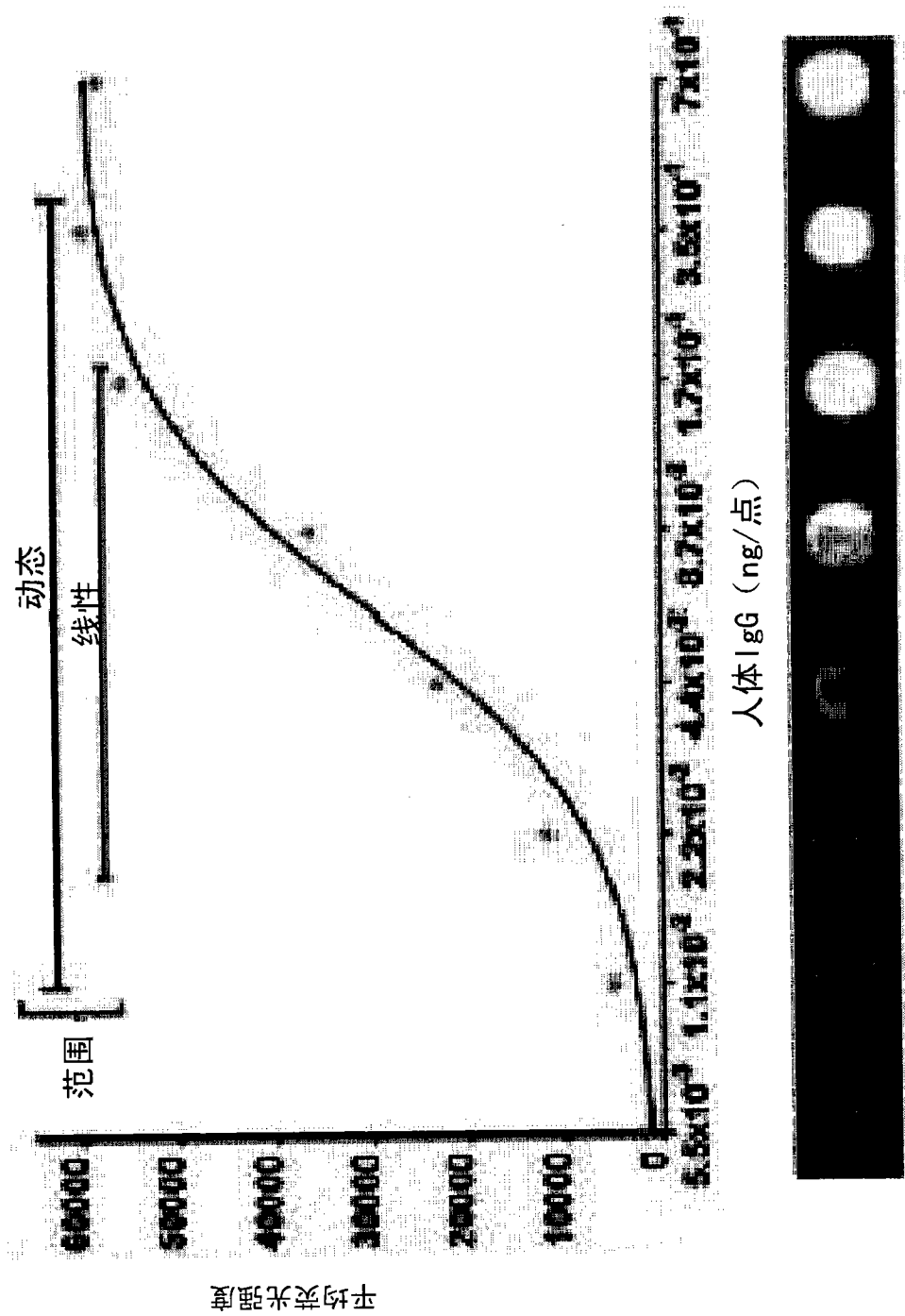


图 2C

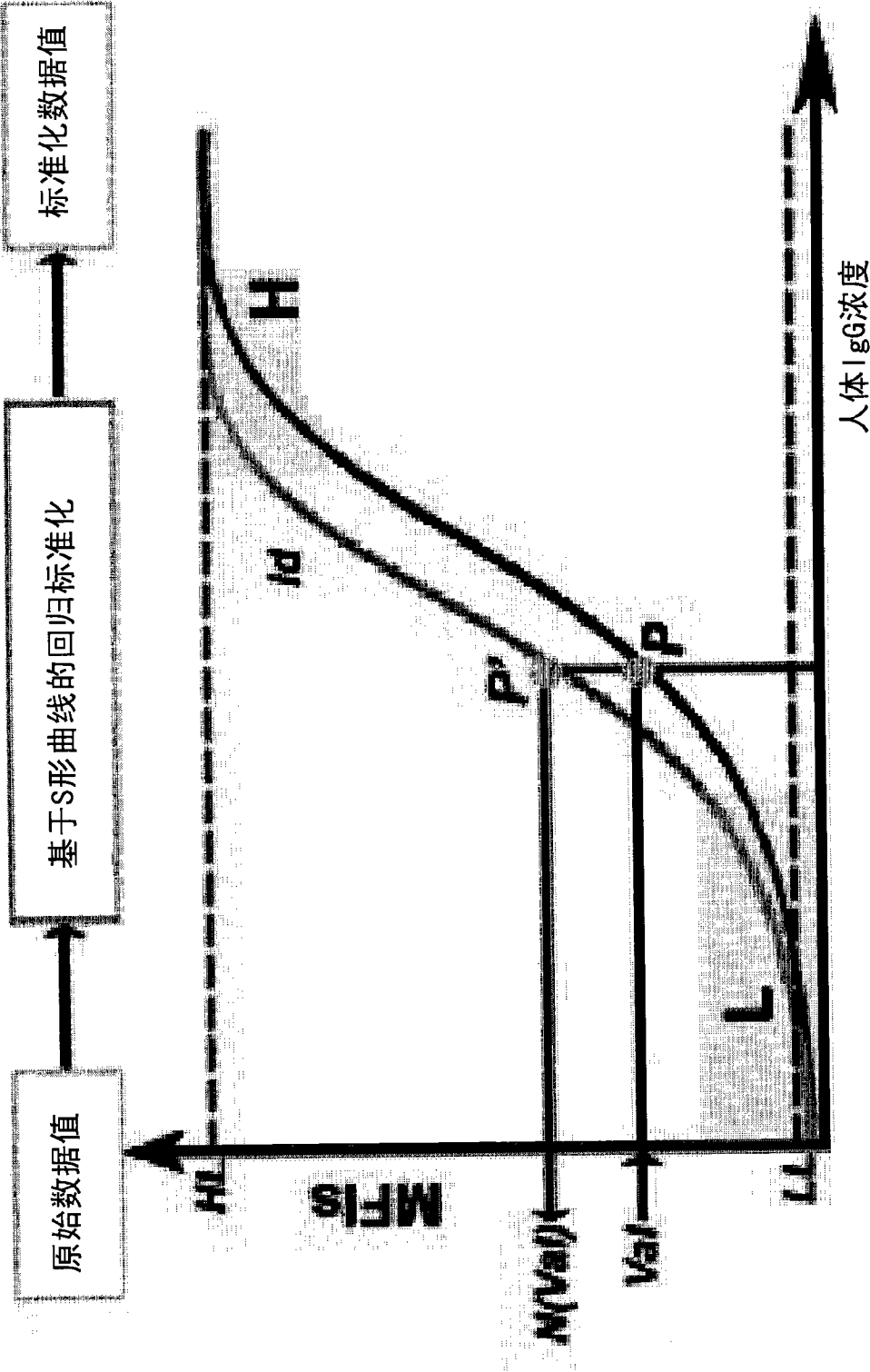


图 2D

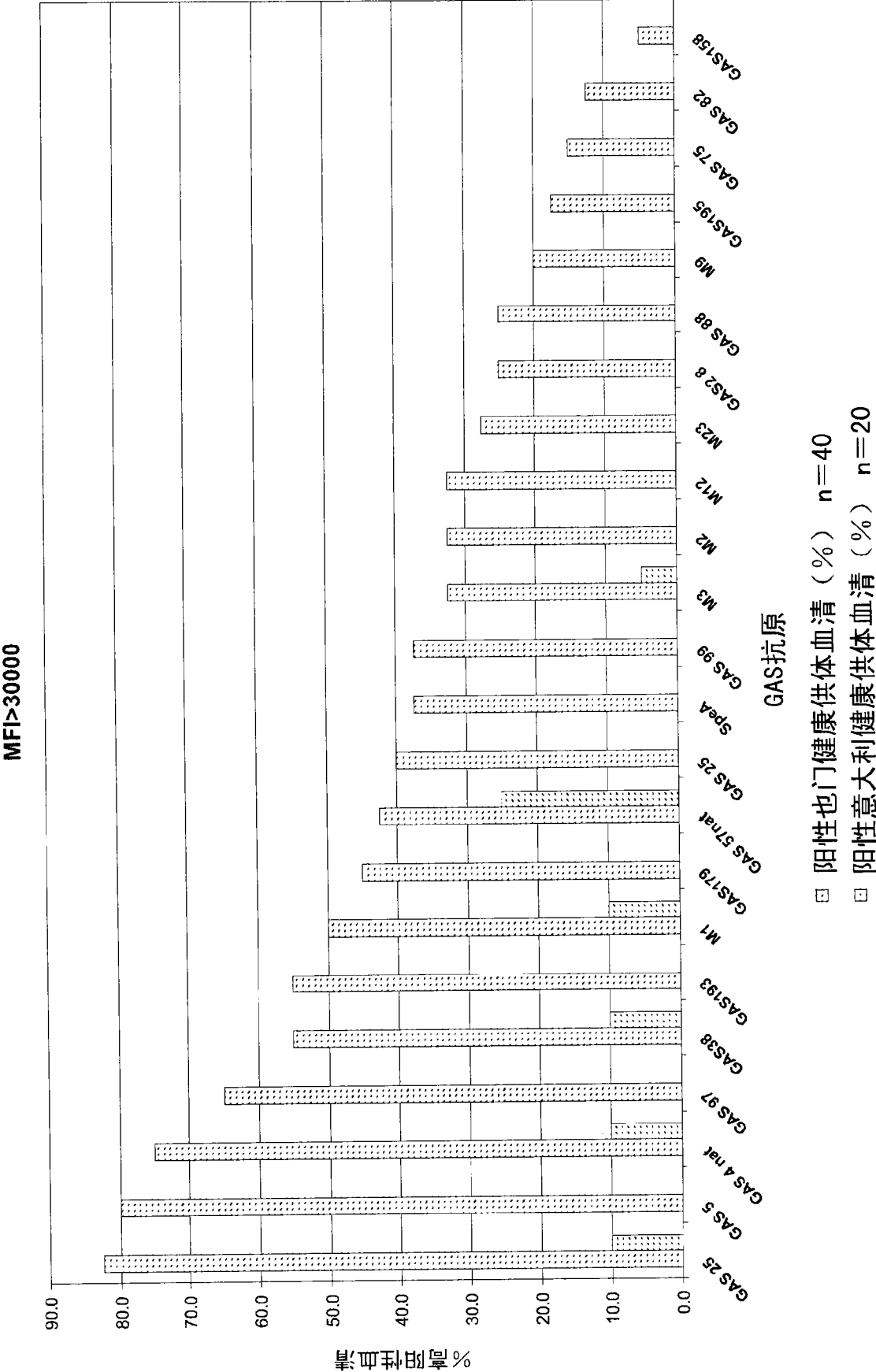


图 3

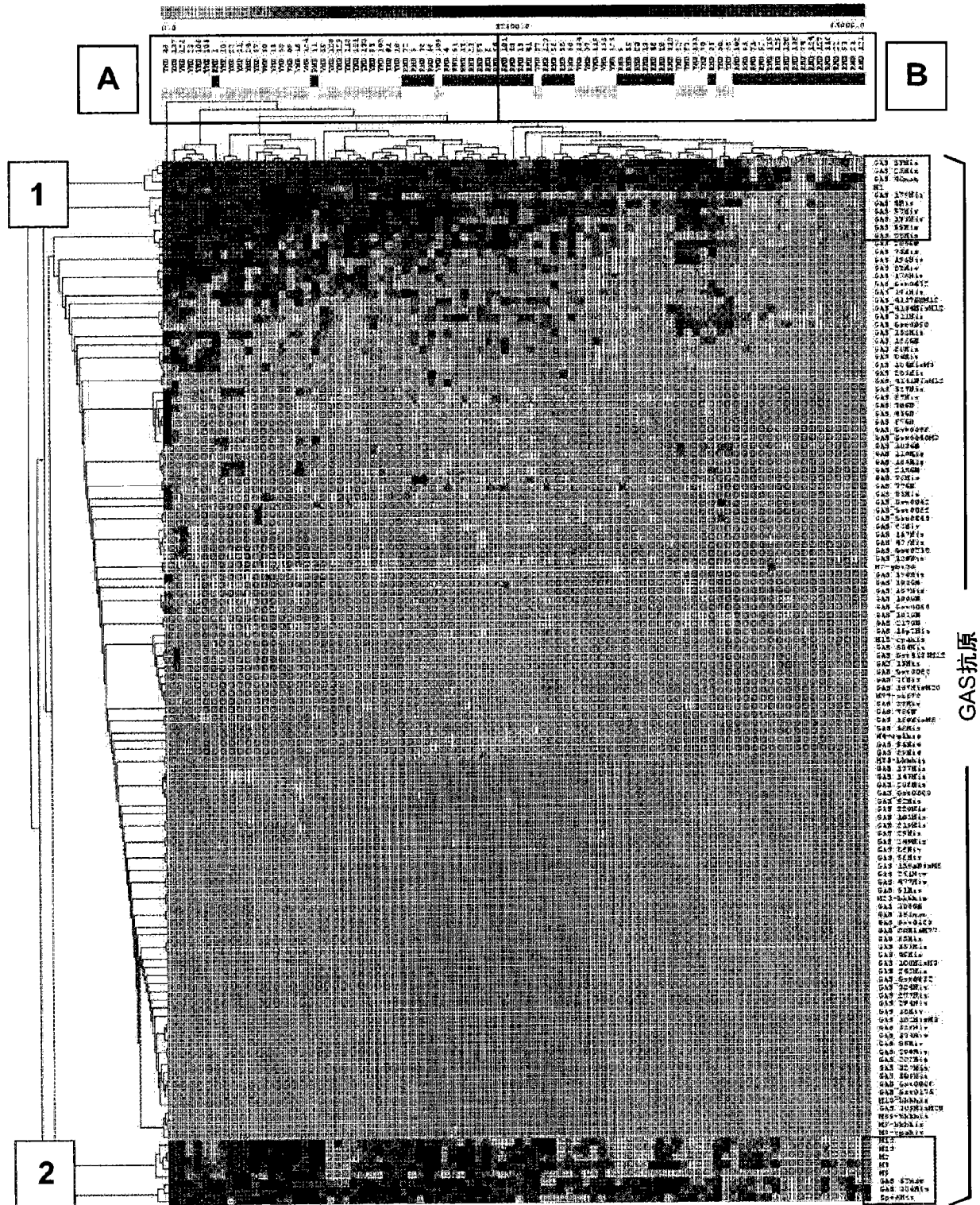


图 4

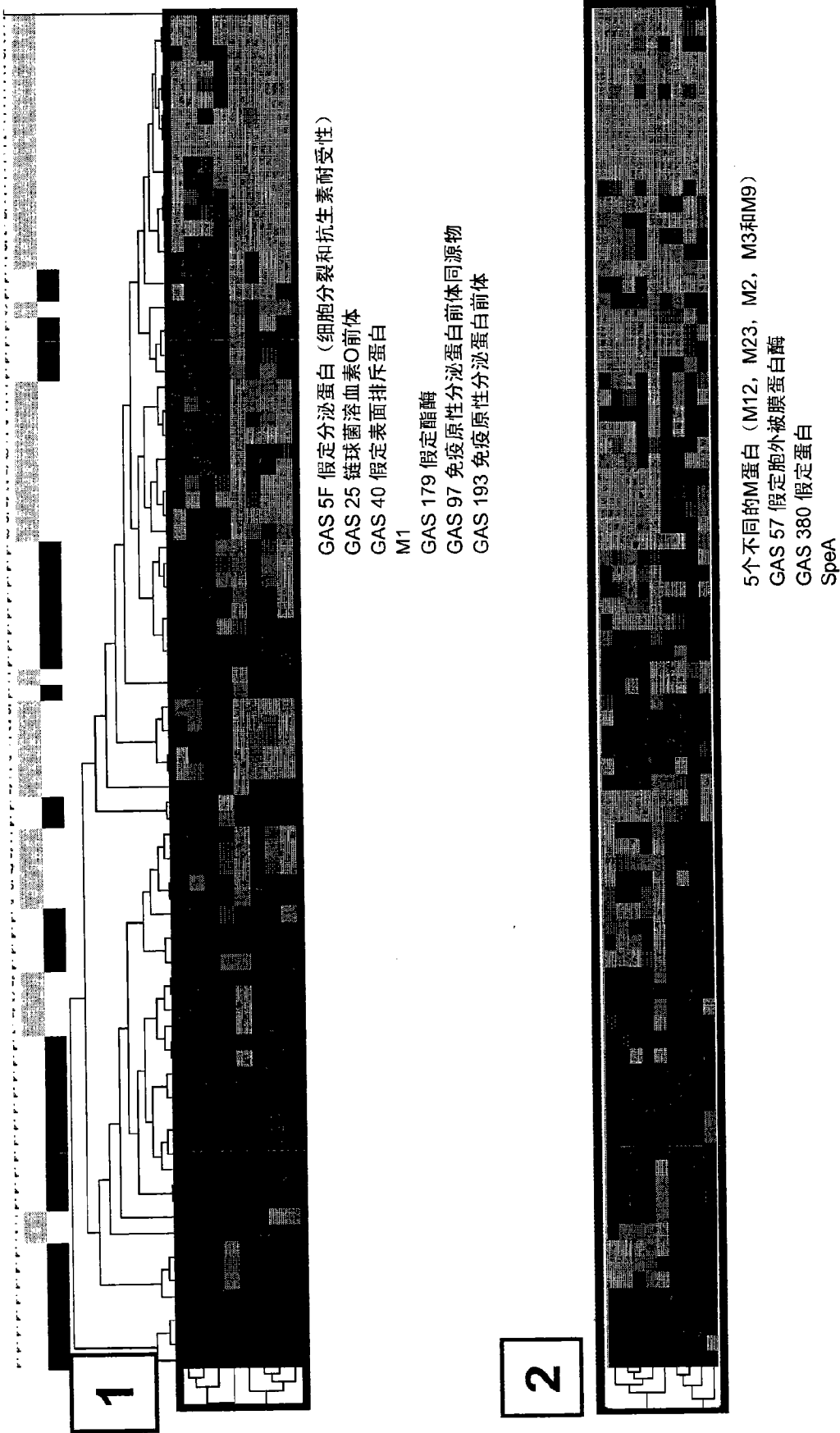


图 4(续)

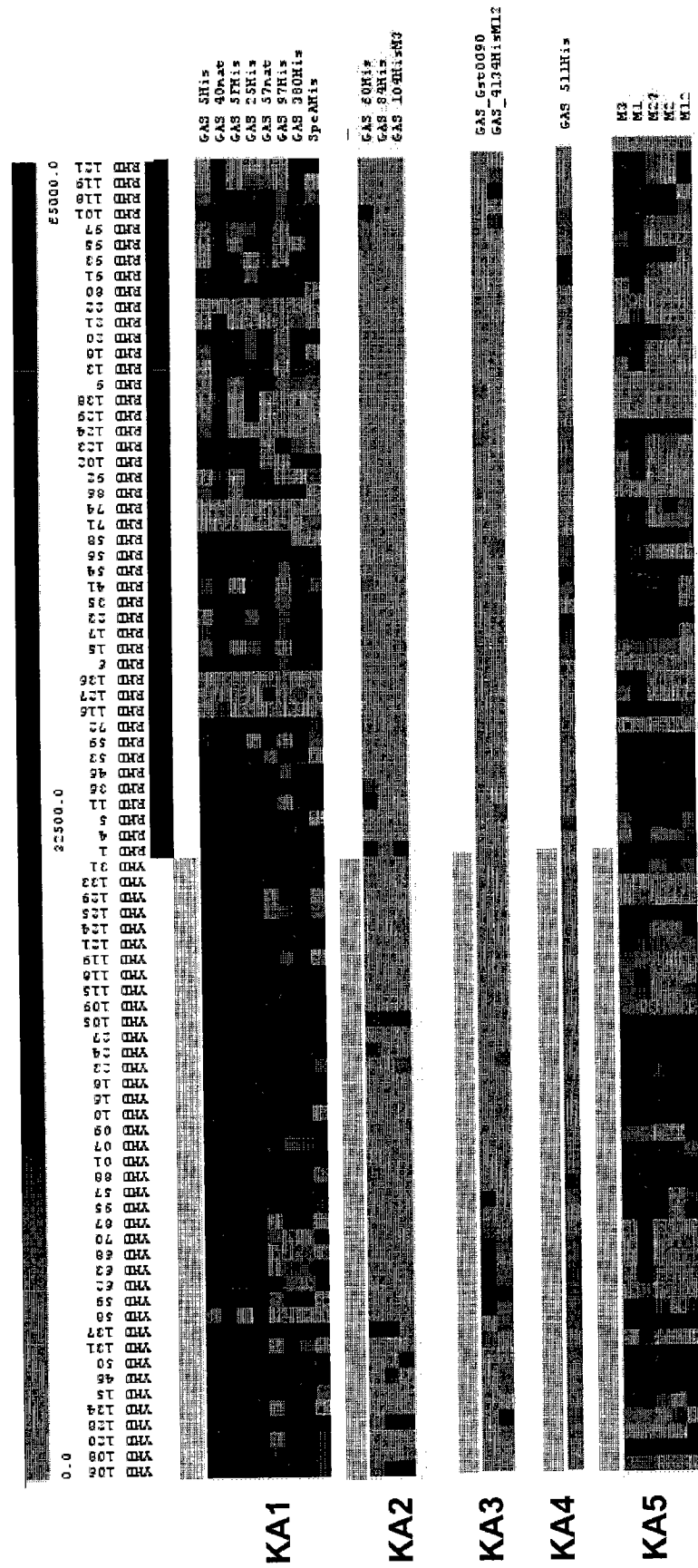


图 5

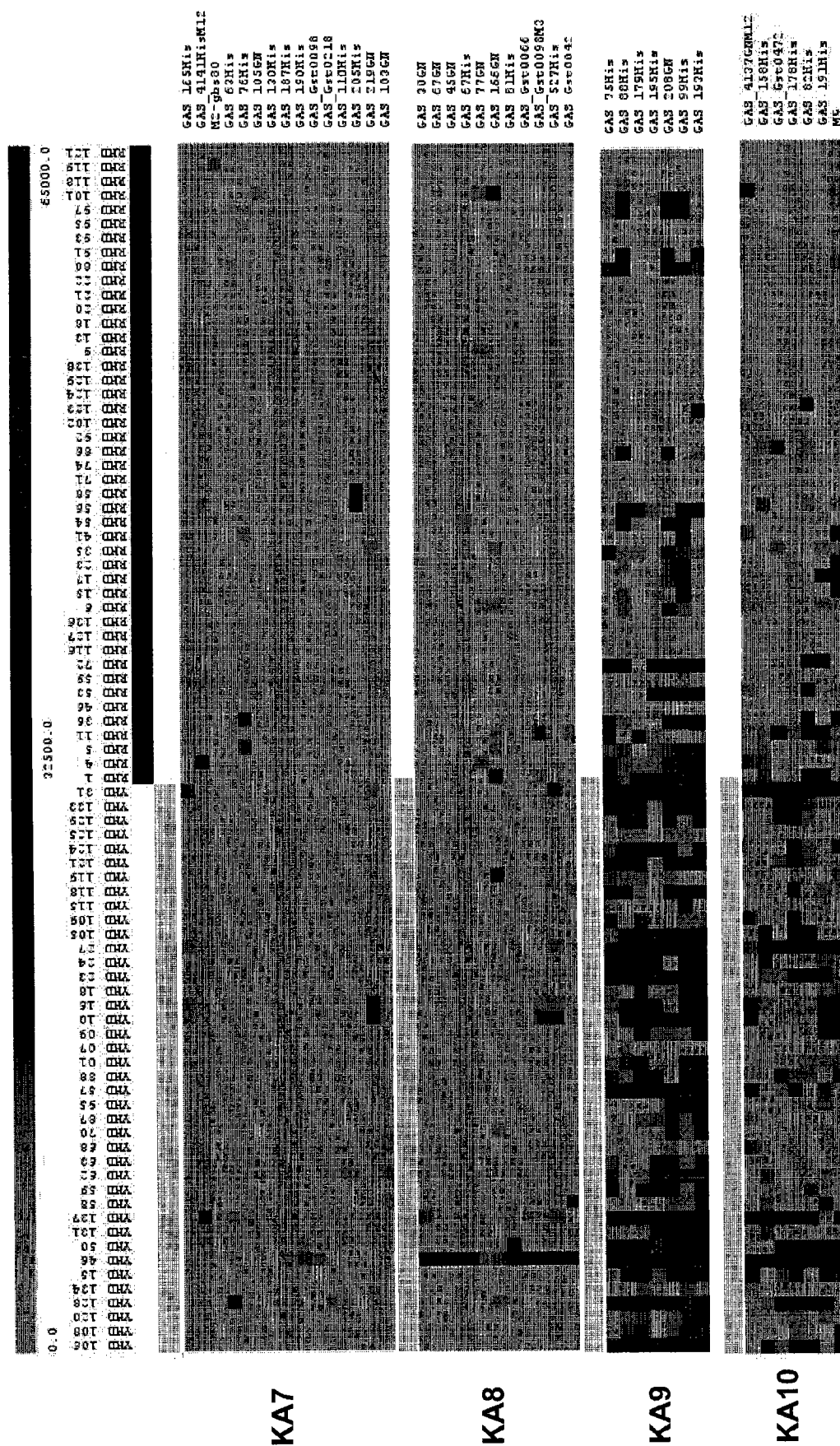


图 5(续)

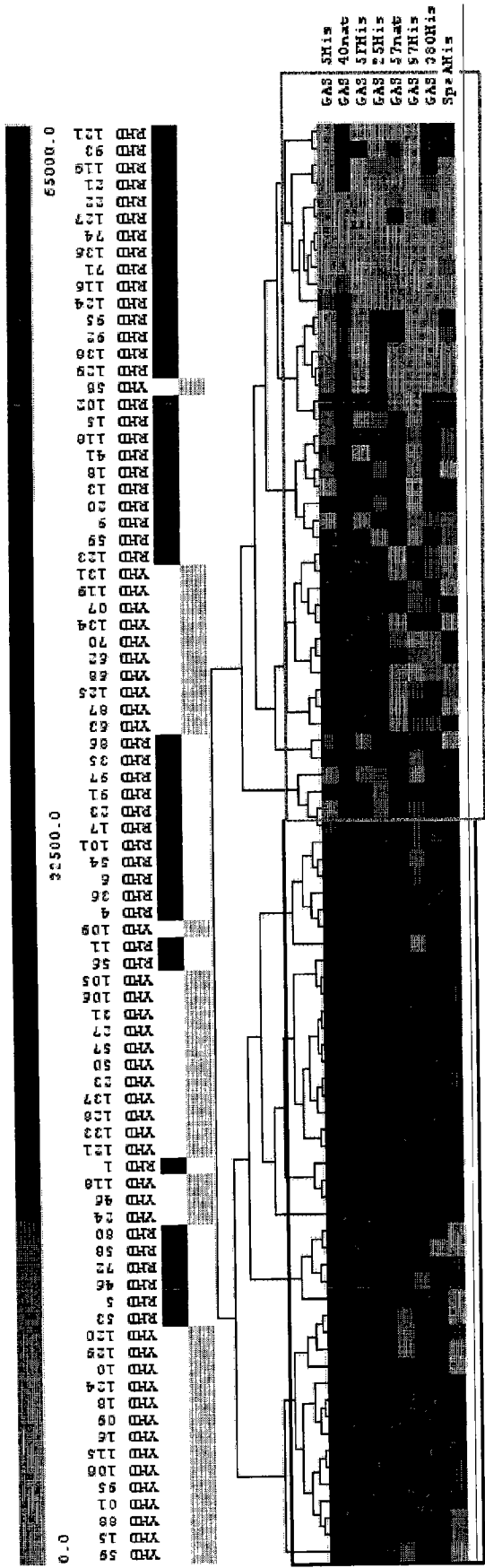
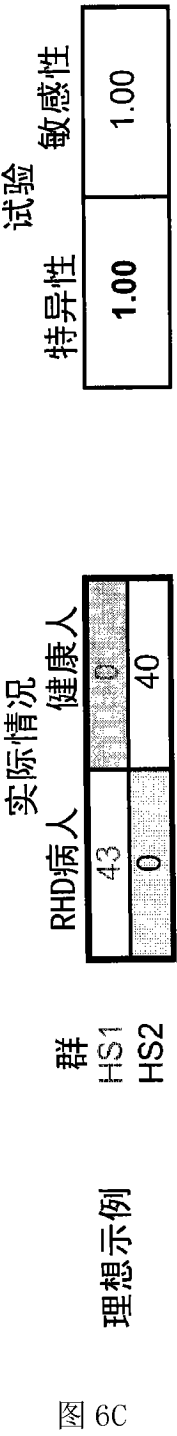
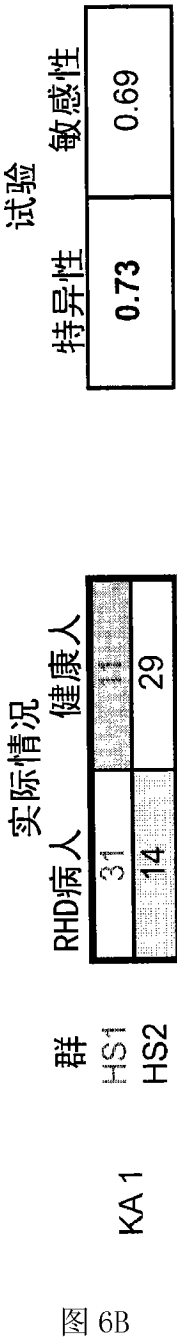


图 6A



		实际情况		试验	
		RHD病人	健康人	特异性	敏感性
A KA 1	群				
	HS1	31	11	0.73	0.69
	HS2	14	29		
B KA 5	群				
	HS1	43	35	0.13	1.00
	HS2	0	5		
C KA 9	群				
	HS1	43	33	0.18	1.00
	HS2	0	7		
D KA 10	群				
	HS1	43	39	0.03	1.00
	HS2	0	1		
E KA 5 + M9	群				
	HS1	43	35	0.13	1.00
	HS2	0	5		

图 7

F	GAS5 GAS5 GAS25 GAS40	群	实际情况		试验	
			RHD病人	健康人	特异性	敏感性
			HS1	35	4	0.90
HS2	10	36				

G	GAS5 GAS5F GAS25 GAS40 GAS57	群	实际情况		试验	
			RHD病人	健康人	特异性	敏感性
			HS1	38	7	0.82
HS2	8	32				

H	GAS5 GAS25 GAS40 GAS57	群	实际情况		试验	
			RHD病人	健康人	特异性	敏感性
			HS1	18	5	0.88
HS2	25	35				

I	GAS5F GAS25 GAS40 GAS57	群	实际情况		试验	
			RHD病人	健康人	特异性	敏感性
			HS1	34	4	0.90
HS2	9	36				

图7(续)