



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I477282 B

(45) 公告日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 21 日

(21) 申請案號：101118374

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 23 日

(51) Int. Cl. : A61K39/09 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

C07K14/315 (2006.01)

(71) 申請人：義守大學 (中華民國) I-SHOU UNIVERSITY (TW)

高雄市大樹區學城路 1 段 1 號

(72) 發明人：郭志峰 KUO, CHIH FENG (TW) ; 曹妮娜 TSAO, NINA (TW)

(74) 代理人：黃耀霆

(56) 參考文獻：

Luo, Y-H., et al., "Streptococcal Pyrogenic Exotoxin B Antibodies in a Mouse Model of Glomerulonephritis", *Kidney Int.*, 2007, Vol.72, P.716-724.

Chen, C-Y., et al., "Maturation Processing and Characterization of Streptopain", *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol.278, No.19, P.17336-17343.

審查人員：黃文延

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：9 共 27 頁

(54) 名稱

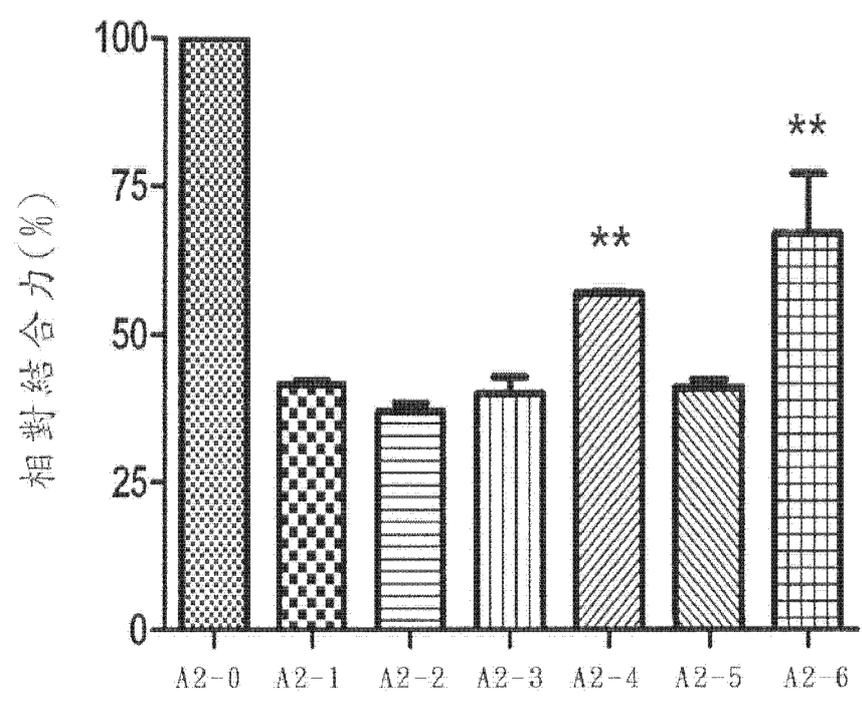
致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗

A PEPTIDE VACCINE FOR STREPTOCOCCAL PYROGENIC EXOTOXIN B

(57) 摘要

一種致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，係包含：一段源自於 A 群鏈球菌之致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段；及一醫藥學上可接受之佐劑。

A peptide vaccine for streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPE B) comprises a peptide is origin from the C terminal of SPE B of *Streptococcus pyogenes*, and a medically acceptable adjuvant.



第 2 圖

## 序列表

<110> 義守大學  
 <120> 致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗  
 <160> 9

<210> 1  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> *Streptococcus pyogenes*  
 <220> 人工序列  
 <400> SEQUENCE: 1

Met	Asn	Lys	Lys	Lys	Leu	Gly	Val	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	1	5	10	15
Leu	Gly	Gly	Phe	Val	Leu	Ala	Asn	Pro	Val	Phe	Ala	Asp	Gln	Asn	16	20	25	30
Phe	Ala	Arg	Asn	Glu	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Ser	Ala	Ile	Thr	Phe	31	35	40	45
Ile	Gln	Lys	Ser	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala	Gly	Ala	Arg	Ser	Ala	Glu	46	50	55	60
Asp	Ile	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Asn	Leu	Gly	Gly	Glu	Leu	Ser	Gly	61	65	70	75
Ser	Asn	Met	Tyr	Val	Tyr	Asn	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Phe	Val	Ile	76	80	85	90
Val	Ser	Gly	Asp	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Ile	Leu	Gly	Tyr	Ser	Thr	91	95	100	105
Ser	Gly	Ser	Phe	Asp	Ala	Asn	Gly	Lys	Glu	Asn	Ile	Ala	Ser	Phe	106	110	115	120
Met	Glu	Ser	Tyr	Val	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	121	125	130	135
Thr	Thr	Tyr	Ala	Gly	Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Gln	Pro	Val	Val	Lys	136	140	145	150

Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Lys	Gly	Ile	His	Tyr	Asn	Gln	Gly	Asn	Pro
151				155					160					165
Tyr	Asn	Leu	Leu	Thr	Pro	Val	Ile	Glu	Lys	Val	Lys	Pro	Gly	Glu
166				170					175					180
Gln	Ser	Phe	Val	Gly	Gln	His	Ala	Ala	Thr	Gly	Cys	Val	Ala	Thr
181				185					190					195
Ala	Thr	Ala	Gln	Ile	Met	Lys	Tyr	His	Asn	Tyr	Pro	Asn	Lys	Gly
196				200					205					210
Leu	Lys	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Asn	Asn	Pro	Tyr	Phe
211				215					220					225
Asn	His	Pro	Lys	Asn	Leu	Phe	Ala	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Gln	Tyr
226				230					235					240
Asn	Trp	Asn	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Ser	Asn
241				245					250					255
Val	Gln	Lys	Met	Ala	Ile	Ser	Glu	Leu	Met	Ala	Asp	Val	Gly	Ile
256				260					265					270
Ser	Val	Asp	Met	Asp	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Ser
271				275					280					285
Ser	Arg	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Gly	Tyr	Asn	Gln
286				290					295					300
Ser	Val	His	Gln	Ile	Asn	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Lys	Gln	Asp	Trp
301				305					310					315
Glu	Ala	Gln	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Pro	Val	Tyr
316				320					325					330
Tyr	Gln	Gly	Val	Gly	Lys	Val	Gly	Gly	His	Ala	Phe	Val	Ile	Asp
331				335					340					345
Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Asn	Phe	Tyr	His	Val	Asn	Trp	Gly	Trp	Gly
346				350					355					360

Gly Val Ser Asp Gly Phe Phe Arg Leu Asp Ala Leu Asn Pro Ser  
 361 365 370 375

Ala Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Phe Asn Gly Tyr Gln  
 376 380 385 390

Ser Ala Val Val Gly Ile Lys Pro  
 391 395 398

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

<220> 人工序列

<400> SEQUENCE: 2

Gly Ile Ser Val Asp Met Asp Tyr Gly Pro Ser Ser Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Arg Val Gln Arg Ala Leu Lys Glu Asn Phe Gly Tyr  
 16 20 25 30

Asn Gln Ser Val His Gln Ile Asn Arg Gly Asp Phe Ser Lys Gln  
 31 35 40 45

Asp Trp Glu Ala Gln Ile Asp Lys Glu Leu Ser Gln Asn Gln Pro  
 46 50 55 60

Val Tyr Tyr Gln Gly Val Gly Lys Val Gly Gly His Ala Phe Val  
 61 65 70 75

Ile Asp Gly Ala Asp Gly Arg Asn Phe Tyr His Val Asn Trp Gly  
 76 80 85 90

Trp Gly Gly Val Ser Asp Gly Phe Phe Arg Leu Asp Ala Leu Asn  
 91 95 100 105

Pro Ser Ala Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Phe Asn Gly  
 106 110 115 120

Tyr Gln Ser Ala Val Val Gly Ile Lys Pro  
 121 125 130

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

&lt;400&gt; SEQUENCE: 3

Ser	Val	His	Gln	Ile	Asn	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Lys	Gln	Asp	Trp
1				5					10					15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

&lt;400&gt; SEQUENCE: 4

Glu	Ala	Gln	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Pro	Val	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

&lt;400&gt; SEQUENCE: 5

Gln	Gly	Val	Gly	Lys	Val	Gly	Gly	His	Ala	Phe	Val	Ile	Asp
1				5					10				14

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

&lt;400&gt; SEQUENCE: 6

Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Asn	Phe	Tyr	His	Val	Asn	Trp	Gly	Trp	Gly
1				5					10					15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

## &lt;400&gt; SEQUENCE: 7

Asn Trp Gly Trp Gly Gly Val Ser Asp Gly Phe Phe Arg Leu Asp  
 1 5 10 15

Ala Leu Asn Pro Ser  
 16 20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

## &lt;400&gt; SEQUENCE: 8

Ala Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Phe Asn Gly Tyr Gln  
 1 5 10 15

Ser Ala Val Val Gly Ile Lys Pro  
 16 20 23

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

&lt;220&gt; 人工序列

## &lt;400&gt; SEQUENCE: 9

Asp Gly Ala Asp Gly Arg Asn Phe Tyr His Val Asn Trp Gly Trp  
 1 5 10 15

Gly Gly Val Ser Asp Gly Phe Phe Arg Leu Asp Ala Leu Asn Pro  
 16 20 25 30

Ser Ala Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Phe Asn Gly Tyr  
 31 35 40 45

Gln Ser Ala Val Val Gly Ile Lys Pro  
 46 50 54















## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種 A 群鏈球菌之胜肽疫苗，特別是關於一種 A 群鏈球菌之致熱原性外毒素 B 的胜肽疫苗。

### 【先前技術】

A 群鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 是重要的人類致病菌，感染後會對生物體造成侵襲性感染症。A 群鏈球菌所引發的侵襲性感染，主要係由於 A 群鏈球菌的致熱原性外毒素 B (Streptococcal pyrogenic exotoxin B, 簡稱 SPE B) 將免疫系統中的備解素 (Properdin) 及補體 (Complement) 分解後，特別係將補體 C3 分解，導致補體系統的下游防禦機制無法被活化，因此下游的殺菌作用 (如嗜中性球) 無法被啟動，生物體無法對抗外來病原菌，生物體受到 A 群鏈球菌的嚴重侵襲，而破壞組織甚至導致生物體死亡。

SPE B 是由 398 個胺基酸所構成，其分子量約為 42 KDa，其中該 SPE B 之 N 端 14 KDa 為 prosegment，其餘 28 KDa 則為具活性的蛋白水解酶 (mSPE B)，幾乎所有的 A 群鏈球菌都具有 *speB* 基因，目前統計至少有 89 種 *speB* alleles。

目前醫學研究上曾嘗試將 SPE B 於第 192 位的胺基酸 (Cys) 進行點突變 (C192S)，使 SPE B 不具有水解蛋白的活性，而能夠維持其 3D 構形做為抗原，誘導生物體內產生抗體，使生物體能夠在下一次接觸到 SPE B 時，仍可

以啟動補體的活化機制，抵禦外來的病原菌。

以該經點突變之整段 SPE B 胜肽片段做為抗原，雖然能夠誘導個體產生 SPE B 抗體，然而，實驗族群中卻有 70% 的個體會因該經點突變之 SPE B 胜肽片段而導致自體免疫反應，發生腎絲球腎炎及風濕性心臟病。因此，以整段 SPE B 片段做為抗原，對生物體造成自體免疫反應的機率甚高，而導致生物體發生腎絲球腎炎或風濕性心臟病，因而無法將 SPE B 實際應用於臨床治療。

### 【發明內容】

本發明之主要目的係提供一種 SPE B 胜肽疫苗，係有效誘導個體產生對抗 SPE B 之抗體者。

本發明之次一目的係提供一種 SPE B 胜肽疫苗，係不會使個體發生腎炎或風濕性心臟病者。

為達到前述發明目的，本發明所運用之技術內容包含有：

一種致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，係包含：一段源自於 A 群鏈球菌之致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段；及一醫藥學上可接受之佐劑。

其中，該致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段可以選自由如 SEQ ID NO：2、6、8 及 9 所示之胺基酸序列所組成之群組；或者該致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段係可以選擇包含如 SEQ ID NO：6 及 8 所示之胺基酸序列。

其中，該 C 端部份胜肽片段與該佐劑的比例為 1 微克：1 微升。

其中，該佐劑可以選擇為福氏完全佐劑或福氏不完全佐劑。

其中，該 A 群鏈球菌為 M49 型或 emm1 型。

其中，該 C 端胜肽片段與一鑰孔血藍蛋白結合。

### 【實施方式】

為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

本發明之 SPE B 胜肽疫苗，係包含一段源自 A 群鏈球菌之 SPE B 的 C 端胜肽片段，及一醫藥學上可接受之佐劑。更詳言之，該 C 端胜肽片段係 SPE B 與補體結合的主要活性片段，其係能夠誘導生物體產生對抗 SPE B 的抗體，使生物體之免疫系統記憶該活性片段，以備二次接觸該 SPE B 時，生物體內能夠及時反應產生抗體，抑制 SPE B 中用以結合補體 C3 的活性位置，如此，可避免生物體的補體免疫機制不會受到 SPE B 的抑制，並且藉由剔除 SPE B 中非活性結合片段之部分，達到減低 SPE B 對生物體產生自體免疫反應的副作用。

請參照第 1 表所示，本發明之較佳實施例中，該 C 端胜肽片段可以選自由如 SEQ ID NO：2、6、8 或 9 所示之胺基酸序列所組成之群組，其中，又以如 SEQ ID NO：6 或 8 所示之胺基酸序列係 SPE B 與補體結合的主要活性片段，因此本發明較佳係以包含如 SEQ ID NO：6 或 8 所示之胺基酸序列做為抗原，係能夠有效引發生物體產生對抗

SPE B 的抗體。

第 1 表：本發明較佳實施例之 C 端胜肽片段

SEQ ID NO	參照 SEQ ID NO：1 之胺基酸位置
1	整段 SPE B 之胜肽片段
2	第 269~398 位胜肽片段
6	第 346~360 位胜肽片段
8	第 376~398 位胜肽片段
9	第 345~398 位胜肽片段

本發明之 SPE B 胜肽疫苗較佳係選擇以一醫藥上可接受之佐劑，該佐劑可以選擇如福氏完全佐劑或福氏不完全佐劑等。本發明較佳係該 C 端部份胜肽片段之重量與該佐劑之體積的比例為 1:1，舉例而言，係以 50 微克之 SPE B 胜肽疫苗之 C 端部份胜肽片段與 50 微升之佐劑混合而製得的 SPE B 胜肽疫苗，該 SPE B 胜肽疫苗係能夠有效引發生物體對 SPE B 產生免疫反應，使生物體內產生抗 SPE B 之抗體。

本發明之 C 端胜肽片段特別係能夠針對 M49 型或 emm1 型 A 群鏈球菌之 SPE B 產生抗體，達到有效保護生物體受 M49 型或 emm1 型 A 群鏈球菌所產生的皮膚潰爛情形，且提高受到 M49 型或 emm1 型 A 群鏈球菌感染的生物體存活率之功效。

為證實本發明所揭示之 C 端胜肽片段確實與補體 C3 之間具有較佳的結合能力，且該 C 端胜肽片段確實能夠有效誘導生物體產生抗 SPE B 之抗體，且不會使生物體發生如腎炎等副作用，遂進行以下試驗 (A) 至 (C)。

### (A) 補體 C3 結合力試驗

為證實本發明之 C 端胜肽片段確實與補體 C3 具有良好結合力，本實施例係取 3 段 SPE B 中不同胜肽片段，第 A1 組之胜肽片段係 SPE B 的整段胜肽片段，其第 192 位為 C192S 之點突變，第 A2 組之胜肽片段係 SPE B 中第 1~268 位之胺基酸序列，第 A3 組係如 SEQ ID NO:2 之胜肽片段，以 ELISA 分析各組胜肽片段與補體 C3 之結合力。

舉例而言，本實施例係將第 A1 至 A3 組胜肽片段之相對應鹼基序列，構築於一表現載體（本實施例係選擇但不限定以 pET24a expression vector 作為合成該等胜肽片段之表現載體），並轉殖到一大腸桿菌中，使大腸桿菌表現出第 A1 至 A3 組胜肽片段，再利用蛋白質層析法（Fast protein liquid chromatography，簡稱 FPLC）純化出各組之胜肽片段。

取 0.2  $\mu\text{g}$  之各組胜肽片段附著於 ELISA 之 96 孔盤中，加入以 GVB/MgEGTA 稀釋的血清進行反應後，加入抗補體 C3 之一級抗體，再和連接 HRP 之二級抗體作用後，以 TMB 呈色，並量測各組的吸光值  $\text{OD}_{650}$  變化，吸光值越高代表其與血清中補體的結合力越高。

由第 1 圖可知，SPE B 與補體 C3 的主要結合片段確實係如 SEQ ID NO:2 所示之胺基酸序列。據此，本實施例如 SEQ ID NO:2 所示之 C 端胜肽片段確實能夠與補體 C3 結合，可作為誘導生物體對 SPE B 產生免疫反應之抗原。

請參照第 2 表及第 2 圖所示，本實施例再將該第

269~398 位之胜肽片段分成 6 小段，各小段胜肽片段可選擇以人工合成方式，或將各小段構築於一表現載體（本實施例係選擇但不限定以 pET42a expression vector 作為合成該等胜肽片段之表現載體，其於各小段胜肽片段上結合一 GST 標籤蛋白，以便後續純化），並轉殖到一大腸桿菌中，使大腸桿菌表現出第 A2-1 至 A2-6 組胜肽片段，再純化出各組之胜肽片段；本實施例較佳係以人工方式獲得該 A2-1 至 A2-6 之胜肽片段。更進一步確認第 A2-1 至 A2-6 組之胜肽片段與補體 C3 的結合強度。

第 2 表：本實施例第 A2-0 至 A2-6 組之胜肽片段

組別	胺基酸位置
A2-0	第 1~396 位整段胜肽片段 (C192S)
A2-1	第 301~315 位胜肽片段 (如 SEQ ID NO: 3)
A2-2	第 316~330 位胜肽片段 (如 SEQ ID NO: 4)
A2-3	第 331~345 位胜肽片段 (如 SEQ ID NO: 5)
A2-4	第 346~360 位胜肽片段 (如 SEQ ID NO: 6)
A2-5	第 356~375 位胜肽片段 (如 SEQ ID NO: 7)
A2-6	第 376~398 位胜肽片段 (如 SEQ ID NO: 8)

由第 2 圖可知，以第 A2-0 組之 OD<sub>650</sub> 為基準，本實施例之第 A2-4 及 A2-6 組的胜肽序列與補體 C3 的相對結合強度較其他組為高，可達到 50% 以上，因此選擇分別以 SEQ ID NO: 6 及 8 之胜肽片段製成胜肽疫苗，進行後續 (B) 小鼠感染試驗。

#### (B) 背部氣囊感染試驗

為證實本發明之 SPE B 部分胜肽片段係能夠有效誘導生物體產生抗 A 群鏈球菌之 SPE B 的抗體，而達到緩解生物體在感染到 A 群鏈球菌後的皮膚潰爛症狀，並增加生物體的存活率。本實施例係將如 SEQ ID NO：6 及 8 所示之胺基酸序列，分別製備成試驗疫苗，以該二試驗疫苗分別免疫實驗小鼠後，以背部氣囊感染模式注射一定量之 A 群鏈球菌，觀察小鼠的背部組織病變及存活率。

舉例而言，本實施例係取 30 隻 BALB/c 小鼠（係購自國家實驗研究院實驗動物中心，簡稱 NLAC），分成三組，其中第 B1 組為未進行免疫的控制組，第 B2 組為施打包含如 SEQ ID NO：6 所示之試驗疫苗之實驗組，第 B3 組為施打包含如 SEQ ID NO：8 所示之試驗疫苗之實驗組。

請參照第 3 表，本實施例如 SEQ ID NO：6 所示胺基酸序列（以下簡稱 SPE B<sub>346~360</sub> 片段）及如 SEQ ID NO：8 所示胺基酸序列（以下簡稱 SPE B<sub>376~398</sub> 片段）係分別與鑰孔血藍蛋白（Keyhole limpet hemocyanin，簡稱 KLH）結合，以提高其抗原性，分別以包含有 KLH 之 SPE B<sub>346~360</sub> 片段及包含有 KLH 之 SPE B<sub>376~398</sub> 片段作為免疫動物的抗原，並將該包含有 KLH 之 SPE B<sub>346~360</sub> 片段及 SPE B<sub>376~398</sub> 片段分別與福氏完全佐劑（簡稱 CFA 佐劑）或福氏不完全佐劑（簡稱 IFA 佐劑）混合，進行後續免疫程序。

第 3 表：本實施例第 B1 至 B3 組之胜肽片段

組別	胜肽片段
B1	無
B2	如 SEQ ID NO：6 所示胺基酸序列+ KLH（以

	下簡稱 KLH-SPE B <sub>346~360</sub> )
B3	如 SEQ ID NO: 8 所示胺基酸序列+ KLH (以下簡稱 KLH-SPE B <sub>376~398</sub> )

本實施例的免疫程序，共進行 3 次免疫注射，舉例而言，本實施例第 B2 組之免疫程序係於第 1 次注射時，施打 50  $\mu\text{g}$  之 KLH-SPE B<sub>346~360</sub> (其與 CFA 佐劑混合)，隔 2 週追加施打 25  $\mu\text{g}$  之 KLH-SPE B<sub>346~360</sub> (其與 IFA 佐劑混合)，共追加注射 2 次，完成免疫程序後，確認第 B2 組之平均效價上升至 10000 (如第 3 圖所示)，隨即進行背部氣囊感染步驟。本實施例之第 B3 組之免疫程序與前述第 B2 組之免疫程序相同，僅將免疫用的胜肽片段換成 KLH-SPE B<sub>376~398</sub>。

本實施例係於每隻實驗小鼠施予  $2\sim 3\times 10^8$  cfu 之 A 群鏈球菌，施打於第 B1 至 B3 組之小鼠背部，該 A 群鏈球菌係由成功大學吳俊忠教授提供之 M49 型 NZ131 菌株，並紀錄 3 天內各小鼠施打菌液的背部組織潰爛面積，以及 14 天內各組的存活率。

由第 4 圖可知，本實施例第 B2 及 B3 組之背部平均潰爛面積明顯低於第 B1 組，代表包含 SPE B<sub>346~360</sub> 或 SPE B<sub>376~398</sub> 之試驗疫苗，確實能夠有效減緩受 A 群鏈球菌感染的患部潰爛程度。

由第 5 圖可知，本實施例第 B1 組在第 4 天已全數死亡，而第 B2 及 B3 組到第 14 天皆存活，其存活率達 100%，代表包含 SPE B<sub>346~360</sub> 或 SPE B<sub>376~398</sub> 之試驗疫苗，確實能夠提高生物的存活率。

本實施例另取 4 組 BALB/c 小鼠（各實驗組為 9 隻，其中未免疫組別為 5 隻），以第 4 表所示之條件進行免疫，再分別施與兩株侵襲型的 A 型鏈球菌—A1 菌株及 A20 菌株（皆由成功大學吳俊忠教授提供之 emm1 型 A 群鏈球菌），每隻實驗小鼠施予  $1 \times 10^8$  cfu 之 A1 菌株或 A20 菌株，並記錄 3 天內的背部潰爛情形及 14 天內的存活率。

第 4 表：本實施例之免疫條件及對應圖式

組別	免疫之胜肽片段	A 群鏈球菌 菌株	對應圖式
B1-1	無	A1	第 6(a)圖
B1-2	KLH-SPE B <sub>376~398</sub>	A1	第 6(b)及 6(c)圖
B2-1	無	A20	第 6(d)圖
B2-2	KLH-SPE B <sub>376~398</sub>	A20	第 6(e)及 6(f)圖
B3-1	無	A1	無
B3-2	KLH-SPE B <sub>346~360</sub>	A1	無
B4-1	無	A20	無
B4-2	KLH-SPE B <sub>346~360</sub>	A20	無

請參照第 6(a)至 6(f)圖，本實施例第 B1-2 及 B2-2 組之背部潰爛情形較第 B1-1 及 B2-1 組緩和，代表本發明第 376~398 位胜肽片段確實對受感染的局部組織具有保護作用；請參照第 7 圖，係本實施例各組之存活率，其中第 B1-2 及 B2-2 組之存活率也較第 B1-1 及 B2-1 組高，至少在第 14 天時實驗組的存活率還能達到 40%。

另外，本實施例再另取 4 組 BALB/c 小鼠（各組 5 隻）

施打本發明第 346~360 位胜肽片段，再進行背部氣囊感染試驗，請參照第 8 圖，在第 14 天時的存活率約為 25%。

由此可知，本發明之 C 端胜肽片段確實能夠提高免疫動物的存活率以及背部的潰爛情形，能夠抑制受 A 型鏈球菌侵襲之進程。

### (C) 腎臟切片鏡檢

根據羅月霞等人於 2007 年 *Kidney international* 期刊發表「Streptococcal pyrogenic exotoxin B antibodies in a mouse model of glomerulonephritis」之內容可知，以 SPE B 整段胜肽片段 (C192S) 對小鼠進行免疫後，實驗小鼠均產生腎炎的副作用。本實施例係將試驗 (B) 結束後的第 B1-1 組 (正常小鼠) 及第 B1-2 組實驗小鼠犧牲，取得其腎臟切片，並以伊紅染色進行鏡檢，比較第 9(a) 及 9(b) 圖之腎臟切片的發炎情形，明顯看出正常小鼠及以 KLH-SPE B<sub>376~398</sub> 誘導免疫小鼠的腎臟沒有發炎現象。

由此可知，本發明之 C 端胜肽片段確實不會使生物體發生自體免疫而導致腎臟發炎。

綜上所述，本發明之 SPE B 胜肽疫苗係藉由主要與補體 C3 結合之 C 端胜肽片段做為一有效抗原，提高生物體對二次感染 A 群鏈球菌的免疫反應，產生對抗 A 群鏈球菌 SPE B 之抗體，以保護生物體的皮膚潰爛情形及提高受感染個體的存活率，且該 C 端胜肽片段不會使生物體產生自體免疫反應而發生腎炎等副作用。

藉此，本發明之 SPE B 胜肽疫苗，係能夠藉由源自於 SPE B 之 C 端胜肽片段，有效誘導個體產生對抗 SPE B 之

抗體，而達到有效保護生物體不受到 A 群鏈球菌侵襲之功效。

本發明之 SPE B 胜肽疫苗，係已去除可能誘導生物體產生自體免疫反應之胜肽片段，達到降低個體發生腎炎或風濕性心臟病的風險之功效。

雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖：本實施例第 A1 至 A3 組以 ELISA 測量吸光值 OD<sub>650</sub> 之長條圖。

第 2 圖：本實施例第 A2-0 至 A2-6 組與補體 C3 之相對結合強度長條圖。

第 3 圖：本實施例第 B1 至 B3 組之免疫效價 XY 分布圖。

第 4 圖：本實施例第 B1 至 B3 組之背部潰爛面積 XY 分布圖。

第 5 圖：本實施例第 B1 至 B3 組之存活率折線圖。

第 6(a)圖：本實施例第 B1-1 組之背部潰爛照片。

第 6(b)圖：本實施例第 B1-2 組之背部潰爛照片（一）。

第 6(c)圖：本實施例第 B1-2 組之背部潰爛照片（二）。

第 6(d)圖：本實施例第 B2-1 組之背部潰爛照片。

第 6(e)圖：本實施例第 B2-2 組之背部潰爛照片（一）。

第 6(f)圖：本實施例第 B2-2 組之背部潰爛照片（二）。

第 7 圖：本實施例第 B1-1、B1-2、B2-1 及 B2-2 組之存活率折線圖。

第 8 圖：本實施例第 B3-1、B3-2、B4-1 及 B4-2 組之存活率折線圖。

第 9(a)圖：本實施例第 B1-1 組之腎臟切片鏡檢照片。

第 9(b)圖：本實施例第 B1-2 組之腎臟切片鏡檢照片。

#### 【主要元件符號說明】

[ 無 ]

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101118374

※申請日：101.5.23

※IPC 分類：

A61K 39/09

A61K 39/39

C07D 14/315

## 一、發明名稱：(中文/英文)

致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗 / A Peptide Vaccine for Streptococcal  
Pyrogenic Exotoxin B

## 二、中文發明摘要：

一種致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，係包含：一段源自於 A 群鏈球菌之致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段；及一醫學上可接受之佐劑。

## 三、英文發明摘要：

A peptide vaccine for streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPE B) comprises a peptide is origin from the C terminal of SPE B of *Streptococcus pyogenes*, and a medically acceptable adjuvant.

## 七、申請專利範圍：

- 1、一種致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，係包含：  
一段源自於 A 群鏈球菌之致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段；及  
一醫藥學上可接受之佐劑；  
其中，該致熱性外毒素 B 的 C 端胜肽片段係選自由如 SEQ ID NO：6 及 8 所示之胺基酸序列所組成之群組。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述之致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，其中，該 C 端部份胜肽片段與該佐劑的比例為 1 微克：1 微升。
- 3、如申請專利範圍第 1 項所述之致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，其中，該佐劑為福氏完全佐劑或福氏不完全佐劑。
- 4、如申請專利範圍第 1 項所述之致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，其中，該 A 群鏈球菌為 M49 型或 emm1 型。
- 5、如申請專利範圍第 1 項所述之致熱原性外毒素 B 胜肽疫苗，其中，該 C 端胜肽片段與一鑰孔血藍蛋白結合。

**四、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 2 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

**五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(無)