



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1674933 B

(45) 授权公告日 2012.09.26

(21) 申请号 03818648.9

(22) 申请日 2003.07.31

(30) 优先权数据

0218037.0 2002.08.02 GB

0218051.1 2002.08.02 GB

0218035.4 2002.08.02 GB

0218036.2 2002.08.02 GB

0220199.4 2002.08.30 GB

0220197.8 2002.08.30 GB

0225524.8 2002.11.01 GB

0225531.3 2002.11.01 GB

0230170.3 2002.12.24 GB

0230168.7 2002.12.24 GB

0230164.6 2002.12.24 GB

0305028.3 2003.03.05 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.02.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2003/008571 2003.07.31

(87) PCT申请的公布数据

W02004/014418 EN 2004.02.19

(73) 专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72) 发明人 F·-X·J·贝尔泰 R·比曼斯

P·德诺埃 C·费龙 C·戈拉

J·普尔曼 V·魏南茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 曹雯 王景朝

(51) Int. Cl.

A61K 39/095 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0152885 A, 2001.07.21,

W0 0109350 A, 2001.02.08,

W0 0025811 A, 2000.05.11,

W0 0071725 A, 2000.01.13,

W0 9931132 A, 1999.06.24,

W0 9802547 A, 1998.01.22,

W0 0155182 A, 2001.08.02,

审查员 温庭江

权利要求书 11 页 说明书 45 页 附图 9 页

(54) 发明名称

疫苗组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗 and 预防奈瑟氏球菌病的免疫原性组合物和疫苗。本发明的免疫原性组合物含有选自包括粘附素、自体转运蛋白、毒素、铁获得蛋白和膜相关蛋白(优选整合外膜蛋白)在内的至少两个不同种类抗原的抗原组合。这种抗原组合能以抗奈瑟氏球菌生活周期不同方面的免疫反应为目标,产生更有效的免疫反应。

1. 一种包括至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原和至少一种不同抗原的免疫原性组合物,其中所述至少一种不同抗原选自下列种类:

- a) 至少一种奈瑟氏球菌粘附素;
- b) 至少一种奈瑟氏球菌毒素;
- c) 至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白;或
- d) 至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白,

其中,所述抗原当存在于外膜小泡中时,已在外膜小泡中被上调。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫原性组合物,其中所述至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA;所述至少一种不同抗原选自下列种类:

a) 选自 FhaB、NspA、PilC、Hsf、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB 0995、NMB 1119 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌粘附素;

b) 选自 FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT 的至少一种奈瑟氏球菌毒素;

c) 选自 TbpA 高、TbpA 低、TbpB 高、TbpB 低、LbpA、LbpB、P2086、HpuA、HpuB、Lipo28、Sibp、FbpA、BfrA、BfrB、Bcp、NMB 0964 和 NMB 0293 的至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白;或

d) 选自 PilQ、OMP 85、FhaC、NspA、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、HpuB、TspA、TspB、TdfH、PorB、HimD、HisD、GNA 1870、OstA、HlpA、MltA、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA 和 PldA 的至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫原性组合物,其是亚单位组合物。

4. 根据权利要求 3 所述的免疫原性组合物,其中所述至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原包含 Hsf 的过客结构域,所述至少一种不同抗原选自以下列表:FhaB、NspA、Hap 的过客结构域、OMP 85 的表面外露结构域、FrpA、FrpC、TbpB、LbpB、PldA、PilC 和 Lipo28。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫原性组合物,它包括外膜小泡制品,其中所述抗原在外膜小泡中已被上调。

6. 根据权利要求 5 所述的免疫原性组合物,其中所述至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原包含 Hsf,所述至少一种不同抗原选自以下列表:NspA、Hap、OMP 85、HpuA、HpuB、TspA、TspB、FhaC、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、TbpB、LbpB、PilQ、NM-ADPRT、P2086、TdfH、PorB、MafA、MafB、HimD、HisD、GNA 1870、OstA、HlpA、MltA 和 PldA;

其中 Hsf 和所述至少一种不同抗原在外膜小泡中被上调。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫原性组合物,它包括具有一种或多种抗原的亚单位组合物,和具有在外膜小泡中已被上调的至少一种抗原的外膜小泡制品。

8. 根据权利要求 7 所述的免疫原性组合物,它包括亚单位组合物和外膜小泡制品,

其中所述亚单位组合物包括选自以下列表的至少一种抗原:FhaB、NspA、Hsf 的过客结构域、Hap 的过客结构域、OMP 85 的表面外露结构域、FrpA、FrpC、TbpB、LbpB、PilC、Lipo28;且

其中所述外膜小泡制品具有在外膜小泡中已被上调的至少一种抗原,并包括选自以下列表的至少一种上调抗原,其不同于所述亚单位组合物中的所述至少一种抗原:NspA、Hsf、Hap、OMP 85、AspA、HpuA、HpuB、TspA、TspB、FhaC、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、TbpB、LbpB、PilQ、NM-ADPRT、P2086、TdfH、PorB、MafA、MafB、HimD、HisD、GNA 1870、OstA、HlpA、MltA 和

PLdA。

9. 根据权利要求 5-8 中任一项所述的免疫原性组合物,它包括权利要求 5 或 6 的至少两种不同的外膜小泡制品。

10. 根据权利要求 1-2、5-9 中任一项所述的免疫原性组合物,其中 NspA 被进一步选择。

11. 根据权利要求 1-2、5-10 中任一项所述的免疫原性组合物,其中 Omp85 被进一步选择。

12. 根据权利要求 1-2、5-11 中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原包含 Hsf,所述至少一种不同抗原包含 TbpA(高)。

13. 根据权利要求 1-2、5-12 中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原包含 Hsf,所述至少一种不同抗原包含 TbpA(低)。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的免疫原性组合物,还包含选自 Hap、LbpB、OMP 85 和 FrpA 的一种或多种的附加抗原。

15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

FhaB ;以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp 26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、Hsf、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP 85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 Na dA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NspA ;以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp 26、NMB 0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原 ;和

TbpA(低) ;以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

TbpA(高) ;以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

LbpB; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

OMP85; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、FrpA、FrpC、FrpA/C、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB 0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

FrpA; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp 26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、FrpC、FrpA/C、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

FrpC; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

PilQ; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、MltA、HimD、

HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

HlpA; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

MltA; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

26. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

GNA 1870; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NM-ADPRT; 以及

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

MafA; 以及

选自 PilC、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

MafB ;以及

选自 PilC、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NMB0315 ;以及

选自 PilC、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NMB1119 ;以及

选自 PilC、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、HisD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

HisD ;以及

选自 PilC、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

LbpA ;以及

选自 PilC、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的免疫原性组合物,包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NMB 0995 ;以及

选自 PilC、MafB、Omp26、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、OstA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

Lipo28 ; 以及

选自 PilC、MafB、Omp26、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、HimD、OstA、TspA、TspB、P2086、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

HimD ; 以及

选自 PilC、MafB、Omp26、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、PldA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、OstA、TspA、TspB、P2086、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NMB1313 ; 以及

选自 PilC、MafB、Omp26、FhaC、FbpA、Bcp、NMB1124、NMB1162、NMB 1220、NMB 1953、HtrA、PldA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、OstA、TspA、TspB、P2086、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

38. 根据权利要求 1-37 中任一项所述的免疫原性组合物, 包含选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白抗原;

NMB1953 ; 以及

选自 PilC、MafB、Omp26、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、HtrA、PldA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、OstA、TspA、TspB、P2086、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB1119、TdfH、PorB 以及 VapD 的至少一种其它抗原。

39. 根据权利要求 5-38 中任一项所述的免疫原性组合物, 其中衍生外膜小泡制品的宿主细胞已被工程改造以下调一种或多种 lgtB 或 lgtE 的表达。

40. 根据权利要求 5-39 中任一项所述的免疫原性组合物, 其中衍生外膜小泡制品的宿主细胞不能合成荚膜多糖且未经工程改造或已被工程改造以下调一种或多种 siaD、ctrA、ctrB、ctrC、ctrD、synA(相当于 synX 和 siaA) 或 synB(相当于 siaB) 和 synC(相当于 siaC) 的表达。

41. 根据权利要求 5-40 中任一项所述的免疫原性组合物, 其中衍生外膜小泡制品的宿主细胞已被工程改造以下调一种或多种 OpC、OpA 或 PorA, 优选 PorA 的表达。

42. 根据权利要求 5-41 中任一项所述的免疫原性组合物, 其中衍生外膜小泡制品的宿主细胞已被工程改造以下调 FrpB 的表达。

43. 根据权利要求 5-42 中任一项所述的免疫原性组合物, 其中衍生外膜小泡制品的宿主细胞已被工程改造以下调 msbB 和 / 或 htrB, 优选 msbB 的表达。

44. 根据权利要求 5-43 中任一项所述的免疫原性组合物, 其中所述外膜小泡制品包括与外膜蛋白缀合的 LPS。

45. 根据权利要求 44 所述的免疫原性组合物, 其中 LPS 与 OMP 在外膜小泡制品中原位

缀合。

46. 根据权利要求 1-45 中任一项所述的免疫原性组合物,它包括从脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*) 衍生的抗原,优选血清组 B。

47. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的免疫原性组合物,它包括从淋病奈瑟氏球菌衍生的抗原。

48. 根据权利要求 1-47 中任一项所述的免疫原性组合物,其中所有奈瑟氏球菌抗原均来源于脑膜炎奈瑟氏球菌,优选血清组 B。

49. 根据权利要求 1-48 中任一项所述的免疫原性组合物,它还包括一种或多种细菌荚膜多糖或低聚糖。

50. 根据权利要求 49 所述的免疫原性组合物,其中所述荚膜多糖或低聚糖来源于选自脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 A、C、Y 和 W-135,流感嗜血杆菌 b(*Haemophilus influenzae* b),肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*), A 组链球菌, B 组链球菌,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) 的细菌。

51. 根据权利要求 49 或 50 所述的免疫原性组合物,其中所述荚膜多糖或低聚糖与蛋白缀合。

52. 根据权利要求 1-51 中任一项所述的免疫原性组合物,它包括佐剂。

53. 根据权利要求 52 所述的免疫原性组合物,它包括铝盐,优选磷酸铝。

54. 根据权利要求 52 或 53 所述的免疫原性组合物,它包括 3D-MPL。

55. 一种包括权利要求 1-54 中任一项的免疫原性组合物以及药学上可接受载体的疫苗。

56. 一种包括一个或多个多核苷酸的疫苗,所述多核苷酸编码至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白和至少一种不同的蛋白,它的表达由真核启动子驱动,其中所述至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 和 NadA,所述至少一种不同蛋白选自下列种类:

a) 选自 FhaB、NspA、PilC、Hsf、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB 1119 和 NadA 的至少一种奈瑟氏球菌粘附素;

b) 选自 FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD 和 NM-ADPRT 的至少一种奈瑟氏球菌毒素;

c) 选自 TbpA 高、TbpA 低、TbpB 高、TbpB 低、LbpA、LbpB、P2086、HpuA、HpuB、Lipo28、Sibp、FbpA、BfrA、BfrB、Bcp、NMB0964 和 NMB0293 的至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白;或

d) 选自 PilQ、OMP85、FhaC、NspA、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、HpuB、TspA、TspB、TdfH、PorB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、MltA、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA 和 PldA 的至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白,优选整合外膜蛋白。

57. 权利要求 55 或 56 的疫苗制备用于治疗或预防奈瑟氏球菌感染的药物的用途。

58. 根据权利要求 57 所述的用途,其中脑膜炎奈瑟氏球菌感染被预防或治疗。

59. 根据权利要求 57 所述的用途,其中淋病奈瑟氏球菌感染被预防或治疗。

60. 一种衍生权利要求 5-54 的外膜小泡制品的基因工程改造的奈瑟氏球菌菌株。

61. 一种制备权利要求 1-54 中任一项的免疫原性组合物的方法,包括将至少两种来源于奈瑟氏球菌的抗原混合在一起的步骤。

62. 一种制备权利要求 5-54 中任一项的免疫原性组合物的方法,包括分离奈瑟氏球菌

培养物中的外膜小泡的步骤。

63. 根据权利要求 62 所述的方法,还包括将至少两种外膜小泡制品混合的步骤。

64. 根据权利要求 62 或 63 所述的方法,其中所述外膜小泡是通过用 0-0.5%浓度的 DOC 提取而分离的。

65. 根据权利要求 64 所述的方法,其中所述外膜小泡是通过用 0.02% -0.4%、0.04% -0.3%、0.06% -0.2%、0.08% -0.15%的 DOC 提取而分离的。

66. 一种制备权利要求 55 的疫苗的方法,包括将权利要求 1-54 中任一项的免疫原性组合物与药学上可接受的载体混合的步骤。

67. 一种制备用于预防或治疗奈瑟氏球菌感染的免疫球蛋白的方法,包括用权利要求 55 的疫苗使受体免疫,以及从受体中分离免疫球蛋白的步骤。

68. 一种通过权利要求 67 的方法制备的免疫球蛋白。

69. 一种药物组合物,其包括权利要求 68 的免疫球蛋白和药学上可接受载体。

70. 权利要求 69 的药物制品在制备用于治疗或预防奈瑟氏球菌病的药物的用途。

71. 权利要求 15 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

FhaB ;和

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

72. 权利要求 16 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

NspA ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、Hsf、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、NadA、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

73. 权利要求 18 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

TbpA(高) ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

74. 权利要求 19 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

LbpB ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

75. 权利要求 20 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

OMP85 ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、PldA、LbpA、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

76. 权利要求 22 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

FrpC ;和

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

77. 权利要求 26 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

GNA1870 ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

78. 权利要求 35 的免疫原性组合物,包含

Hsf ;

Lipo28 ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

79. 权利要求 15 的免疫原性组合物,包含

NadA ;

FhaB ;和

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

80. 权利要求 16 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

NspA ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、Hsf、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、NadA、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

81. 权利要求 18 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

TbpA(高) ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

82. 权利要求 19 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

LbpB ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、AspA、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

83. 权利要求 20 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

OMP85 ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、PldA、LbpA、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

84. 权利要求 22 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

FrpC ;和

选自 PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、Hap、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

85. 权利要求 26 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

GNA1870 ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、MafB、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、NMB1119、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

86. 权利要求 35 的免疫原性组合物, 包含

NadA ;

Lipo28 ;和

选自 FhaB、PilC、MafA、Omp26、NMB0995、FhaC、FbpA、Bcp、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、LbpB、FrpA、FrpC、FrpA/C、OMP85、PldA、LbpA、TbpA(低)、TbpA(高)、TbpB(低)、TbpB(高)、HpuA、HpuB、PilQ、MltA、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、NspA、TspA、TspB、P2086、Sibp、NMB0964、NMB0293、NMB0315、TdfH、PorB、NM-ADPRT 和 VapD 的至少一种其它抗原。

87. 权利要求 5 的免疫原性组合物, 其中所述抗原已在外膜小泡中通过亲代奈瑟氏球菌菌株在铁有限条件下生长而被上调。

88. 权利要求 7 的免疫原性组合物, 其中所述在外膜小泡中被上调的至少一种抗原抗原已通过亲代奈瑟氏球菌菌株在铁有限条件下生长而被上调。

## 疫苗组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及奈瑟氏球菌 (Neisserial) 免疫原性组合物和疫苗, 它们的制备方法以及这种组合物在药物中的用途。更具体而言, 它涉及包括抗原组合的疫苗组合物, 正如在保护测定法或血清杀菌测定法中所测量的那样, 其具有可使本发明的疫苗引发令人惊讶的良好免疫反应的性质。

### [0002] 背景

[0003] 细菌中的奈瑟氏球菌菌株是很多人类病变的病原体, 因此需要研制出可抗这些病原体的有效疫苗。特别是, 淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 所引起的病变可通过接种疫苗而治疗。

[0004] 淋病奈瑟氏球菌是淋病的病原体, 淋病是全世界所报道的最常见的性传播疾病之一, 据估计每年有六千两百万个病例发病 (Gerbase 等人, 1998 Lancet 351 ; (Suppl 3) 2-4)。淋病的临床表现包括泌尿生殖道、咽喉或直肠粘膜炎症以及新生儿眼睛感染。妇女淋球菌 (gonococcal) 感染上升可导致不孕、宫外孕、慢性盆腔炎和输卵管 - 卵巢脓肿形成。败血症、关节炎、心内膜炎和脑膜炎均与并发性淋病有关。

[0005] 大量淋球菌菌株对抗生素产生耐药性导致发病率以及与淋病有关的并发症增加。用抗生素治疗淋病的吸引人的替代方案是利用接种疫苗而预防淋病。目前还没有抗淋病奈瑟氏球菌感染的疫苗。

[0006] 脑膜炎奈瑟氏球菌是一种重要的病原体, 特别是在儿童和年轻人中。败血症和脑膜炎是侵入性脑膜炎球菌病 (IMD) 的最严重威胁生命的形式。这种疾病由于其较高的发病率和死亡率已经成为全世界的健康问题。

[0007] 根据荚膜多糖的抗原差异, 已经鉴定出了 13 种脑膜炎奈瑟氏球菌血清组, 最普遍的是 A、B 和 C, 它们导致全世界 90% 的该疾病。血清组 B 是欧洲、美国和拉丁美洲几个国家中脑膜炎球菌病的最普遍原因。

[0008] 已经研制出了基于血清组 A、C、W 和 Y 的荚膜多糖的疫苗, 它们表现出可控制脑膜炎球菌病的暴发 (Peltola 等人, 1985 Pediatrics 76 ; 91-96)。然而, 血清组 B 的免疫原性较差, 且仅主要诱导 IgM 同种型的短暂抗体反应 (Ala' Aldeen D 和 Cartwright K 1996, J. Infect. 33 ; 153-157)。因此, 目前还没有能够抗导致绝大多数温带国家中大多数该疾病的血清组 B 脑膜炎球菌的广泛有效的疫苗。尤为严重的是血清型 B 疾病在欧洲、澳洲和美洲的发生率日益增加, 主要是在 5 岁以下的儿童中。抗血清组 B 脑膜炎球菌的疫苗的研制提出了一个特有的困难, 即由于多糖荚膜与人神经细胞粘着分子的免疫学相似性导致其免疫原性较差。将疫苗生产的方案集中于脑膜炎球菌外膜的表面外露结构, 但却被菌株之间这些抗原的显著变异所阻碍。

[0009] 进一步的研究采用由外膜小泡构成的疫苗, 其包括很多构成细菌膜正常内含物的蛋白。这些的其中之一是抗脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 和 C 的 VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> Cuban 疫苗 (Rodriguez 等人, 1999 Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94 ; 433-440)。设计这种疫苗用来抗古巴的侵入性脑膜炎球菌病, 这种病不能通过使用荚膜多糖 AC 疫苗进行的

接种程序而被消除。流行的血清组是 B 和 C,且 VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> 疫苗已经可以成功控制暴发,据估计该疫苗抗脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株的效能为 83% (Sierra 等人,1990 In *Neisseria*, Walter Gruyter, Berlin, m. Atchman 等人 (eds) p 129-134, Sierra 等人,1991, NIPH Ann 14 ;195-210)。该疫苗可有效抗特异性暴发,然而所引发的免疫反应不能抗脑膜炎奈瑟氏球菌的其它菌株。

[0010] 随后在拉丁美洲,在由同源和异源血清组 B 脑膜炎球菌菌株引起的流行病过程中进行的功效研究已在年龄稍大的儿童和成人中表现出一些功效,但它的有效性在感染危险最大的、年龄较小的儿童中明显偏低 (Milagres 等人,1994, *Infect. Immun.* 62 ; 4419-4424)。这种疫苗在具有多菌株地方病的国家,如 UK 效果怎样还不肯定。对抗异源菌株的免疫原性的研究仅证实了有限的交叉反应性血清杀菌活性,特别是在婴儿中 (Tappero 等人,1999, *JAMA* 281 ;1520-1527)。

[0011] 第二种外膜小泡疫苗是在挪威,使用在挪威的纳维亚流行的那些普遍血清型 B 分离物研制的 (Fredriksen 等人,1991, NIPH Ann,14 ;67-80)。该疫苗已在临床试验中进行了测试,并发现 29 个月后,它具有 57% 的保护功效 (Bjune 等人,1991, *Lancet*, 338 ; 1093-1096)。

[0012] 然而,外膜小泡在疫苗中的使用与某些问题有关。例如,OMV 包括有毒的脂多糖且它们可包括免疫显性抗原,这些抗原或者是菌株特异性的,或者是可变表达的。已经描述过的几个方法都可用于克服外膜小泡制品疫苗的一些问题。WO 01/09350 描述了例如通过降低毒性并修饰外膜小泡上存在的抗原而解决某些问题的方法。

[0013] WO 01/52885 描述了把外膜小泡与其它抗原组合在一起的可能性且包括了超过 2,000 种潜在的奈瑟氏球菌蛋白列表,从该列表可推测研制出对更宽血清型范围都具有功效的疫苗。

[0014] 目前所用的抗-脑膜炎球菌疫苗存在着多种问题。基于蛋白的外膜疫苗倾向于特异性且仅对少数菌株有效。多糖疫苗也是次最优的,这是因为它们倾向于引发较差且短暂的免疫反应,特别是对血清组 B (Lepow 等人 1986 ;Peltola 1998, *Pediatrics* 76 ;91-96)。

[0015] 奈瑟氏球菌感染提出了一个重要的保健问题,即对淋病奈瑟氏球菌而言,还没有可用的疫苗,或对脑膜炎奈瑟氏球菌而言,仅有有限的抗异源菌株的功效和能力的疫苗。显然需要研制抗奈瑟氏球菌感染更好的疫苗,它们能够改善目前所用疫苗的功效并抗更大范围的菌株。

[0016] 附图描述

[0017] 图 1.- 对由 *tbpA* 和 *hsf* 表达被上调的重组脑膜炎奈瑟氏球菌菌株制备的 OMV 中的 *TbpA* 和 *Hsf* 的检测。通过用考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 分析 (4-20% 梯度凝胶) 分离 OMV 制品 (10  $\mu$ g)。

[0018] 图 2.- 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中产生的重组 *Hsf* 过客 (passenger) 结构域的检测, 10  $\mu$ g 纯化的 *Hsf* 过客蛋白 (第 2 和 3 道) 通过 12% SDS-PAGE 凝胶上分离,并与分子量标记 (第 1 道) 相比较。

[0019] 图 3.- *Hap* 过客纯度的分析,这是通过 (A) 考马斯染色, (B) 银染, (C) 抗-His 5 蛋白质印迹和 (D) 抗-大肠杆菌检测的。10  $\mu$ g 纯化抗原是在 4-20% 丙烯酰胺梯度凝胶上通过 SDS-PAGE 分离的。

[0020] 图 4.- 从脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 FAM20 分离的 FrpA 和 FrpC 蛋白共有的序列相似性区。(A) 脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 FAM20 RTX 蛋白 FrpA 和 FrpC 的结构域组成。(B) 从脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76 获得的 FrpA/C 扩增产物。

[0021] 图 5.- 重组 Frp23(具有 23 个重复单位的 FrpA/C 保守区) 抗原在大肠杆菌中的表达。用对照载体 (pET24d) 或重组构建体 (分别为 Frp3、Frp13 和 Frp23) 转化的大肠杆菌 BL21DE3 的非诱导 (NI) 和诱导 (I) 的总细胞提取物的 SDS-PAGE 分析。用考马斯蓝 (A) 将凝胶染色或将凝胶转移到硝化纤维素上并用抗 -His6 小鼠血清进行免疫检测。

[0022] 图 6.- 在大肠杆菌中表达的 FHAB 2/3<sup>rd</sup> 片段的优选 DNA 序列。

[0023] 图 7.- 来源于诱导大肠杆菌 B121DE3 提取物的重组 FHAB 2/3<sup>rd</sup> 的纯化。(A) 纯化过程中的主要步骤。(B) 对在纯化过程不同步骤采样的蛋白级分进行的 SDS-PAGE 分析。

[0024] 图 8.- 针对脑膜炎奈瑟氏球菌的 FHAB 2/3<sup>rd</sup>、Hap、Hap 过客结构域、Hsf 和 Hsf 过客结构域抗原的抗 - 血清的粘附阻断活性。

[0025] 图 9.- 表示 Hsf、TbpA 和 NspA 在来源于不同脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的外膜小泡制品中的表达水平的考马斯蓝染色凝胶。第 1 道 - 分子量标记;第 2 道 - 从荚膜多糖被下调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡;第 3 道 - 从荚膜多糖和 PorA 被下调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡;第 4 道 - 从荚膜多糖和 PorA 被下调且 NspA 被上调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡;第 5 道 - 从荚膜多糖和 PorA 被下调且 Hsf 被上调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡;第 6 道 - 从荚膜多糖和 PorA 被下调且 TbpA 被上调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡;第 7 道 - 从荚膜多糖和 PorA 被下调且 TbpA 和 Hsf 被上调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡;第 8 道 - 从荚膜多糖和 PorA 被下调且 TbpA 和 NspA 被上调的菌株 H44/76 制备的外膜小泡。

[0026] 详述

[0027] 本发明公开了奈瑟氏球菌抗原的特定组合,当它们组合在一起时,可使疫苗抗奈瑟氏球菌感染的功效令人惊讶地提高。

[0028] 奈瑟氏球菌感染要经历若干不同的阶段。例如,脑膜炎球菌的生活周期包括鼻咽定居、粘膜附着、进入血流、在血液中增殖、诱导中毒性休克、穿过血 / 脑屏障并在脑脊液和 / 或脑脊膜中增殖。细菌表面上的不同分子参与感染周期的不同阶段。通过使用有效量参与奈瑟氏球菌感染的不同过程特定抗原的组合产生免疫反应,可获得具有令人吃惊的较高功效的奈瑟氏球菌疫苗。

[0029] 具体而言,来源于不同种类的特定抗原的组合可引发针对感染多个阶段的免疫反应,在这些不同种类的特定抗原中,有些参与附着到宿主细胞,有些参与铁的获得,有些是自体转运蛋白而有些是毒素。抗原的这种组合可令人吃惊地提高(优选协同提高)疫苗抗奈瑟氏球菌感染的功效,其中以最佳方式通过免疫反应针对细菌的不止一个功能。

[0030] 疫苗的功效可通过多种测定法评价。在动物模型中进行的保护测定法是本领域熟知的。此外,血清杀菌测定法(SBA)是最普遍认可的免疫学标记,以评价脑膜炎球菌疫苗的功效(Perkins 等人, J Infect Dis. 1998, 177 :683-691)。

[0031] 抗原的某些组合(例如,某些自体转运蛋白和某些铁获得蛋白的组合)可导致动物模型测定法中的保护提高和 / 或协同产生更高的 SBA 效价。不希望受到理论的束缚,抗原的这种协同组合可通过抗原组合所产生免疫反应的许多特性实现。抗原本身在奈瑟氏球菌细胞上通常是表面外露的,倾向于保守且未以最佳杀菌反应所需的充足量存在于表面细

胞上,该最佳杀菌反应由单独抗该抗原引起的抗体产生。将本发明抗原组合起来生产的制剂可导致杀菌抗体的有利组合,这些杀菌抗体与奈瑟氏球菌细胞的相互作用超出了临界阈值。在这种临界水平下,足量性质良好的抗体与细菌表面结合,从而通过补体有效杀死细菌并因此见到更高水平的杀菌作用。

[0032] 因为血清杀菌测定法(SBA)可密切反映疫苗候选物的功效,因此通过抗原组合获得的良好SBA效价可很好地表征包括该抗原组合的疫苗的保护功效。本发明涉及分离的或与另一抗原共同富含于混合物中的两种抗原组合的用途。当组合在一起时,这种抗原组合有利地相互作用,且优选协同引发杀菌活性更高的免疫反应(正如在血清杀菌测定法或SBA中所测量的那样),且优选高于由抗原单独引发的加成反应,更优选高于由至少1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9个因子,最优选由至少10个因子引发的加成反应。

[0033] 本发明的其它优点在于免疫原性组合物中来源于不同蛋白家族的本发明抗原组合可抗更大范围的菌株。

[0034] 本发明涉及包括很多(两种或多种)蛋白的免疫原性组合物,所述蛋白选自至少两个不同种类的蛋白,它们在奈瑟氏球菌中具有不同的功能。这种蛋白种类的例子是粘附素、自体转运蛋白、毒素、整合外膜蛋白和Fe获得蛋白。本发明的疫苗组合在抗同源奈瑟氏球菌菌株(衍生抗原的菌株)且还优选在抗异源奈瑟氏球菌菌株的疫苗功效方面显示出令人吃惊的提高。

[0035] 本发明提供免疫原性组合物,它包括至少或恰好两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种不同的抗原,这些抗原选自下列至少或恰好两个、三个、四个或全部五个选自下述种类的抗原:

[0036] • 至少一种奈瑟氏球菌粘附素;

[0037] • 至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白;

[0038] • 至少一种奈瑟氏球菌毒素;

[0039] • 至少一种奈瑟氏球菌Fe获得蛋白;

[0040] • 至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白(优选外膜蛋白,特别是整合外膜蛋白)。

[0041] 优选,本发明提供包括至少或恰好两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种不同奈瑟氏球菌抗原的免疫原性组合物。最优选这些抗原选自下列的至少或恰好两组、三组、四组或五组选自下述蛋白:

[0042] • 选自FhaB、NspA、PilC、Hsf、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB 0995、NMB 1119和NadA的至少一种奈瑟氏球菌粘附素;

[0043] • 选自Hsf、Hap、IgA蛋白酶、AspA和NadA的至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白;

[0044] • 选自FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT、以及LPS免疫型L2和LPS免疫型L3之一或两者的至少一种奈瑟氏球菌毒素;

[0045] • 选自TbpA、TbpB、LbpA、LbpB、HpuA、HpuB、Lipo28(GNA2132)、Sibp、NMB0964、NMB0293、FbpA、Bcp、BfrA、BfrB和P2086(XthA)的至少一种奈瑟氏球菌Fe获得蛋白;或

[0046] • 选自PilQ、OMP85、FhaC、NspA、TbpA、LbpA、TspA、TspB、TdfH、PorB、MltA、HpuB、HimD、His D、GNA1870、OstA、HlpA(GNA1946)、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA和PldA的至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白,优选外膜蛋白,优选整合外膜蛋白。

[0047] 本发明的抗原都是分离的,即它们被人工改变。优选,它们被纯化至某种程度,最

优选超过 40、50、60、70、80、90、95 或 99% 纯度（与本发明免疫原性组合物的其它组分组合前）。

[0048] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌粘附素和至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白且任选包括奈瑟氏球菌毒素、奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白或奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）。优选所述抗原选自上述抗原。

[0049] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌粘附素和至少一种奈瑟氏球菌毒素且任选包括奈瑟氏球菌自体转运蛋白、奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白或奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）。优选所述抗原选自上述抗原。

[0050] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌粘附素和至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白且任选包括奈瑟氏球菌毒素、奈瑟氏球菌自体转运蛋白或奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）。优选所述抗原选自上述抗原。

[0051] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌粘附素和至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）且任选包括奈瑟氏球菌毒素、奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白或奈瑟氏球菌自体转运蛋白。优选所述抗原选自上述抗原。

[0052] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白和至少一种奈瑟氏球菌毒素且任选包括奈瑟氏球菌粘附素、奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白或奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）。优选所述抗原选自上述抗原。

[0053] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白和至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白且任选包括奈瑟氏球菌粘附素、奈瑟氏球菌毒素或奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）。优选所述抗原选自上述抗原。

[0054] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌自体转运蛋白和至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）且任选包括奈瑟氏球菌粘附素、奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白或奈瑟氏球菌毒素。优选所述抗原选自上述抗原。

[0055] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌毒素和至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白且任选包括奈瑟氏球菌粘附素、奈瑟氏球菌自体转运蛋白或奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）。优选所述抗原选自上述抗原。

[0056] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌毒素和至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）且任选包括奈瑟氏球菌粘附素、奈瑟氏球菌自体转运蛋白或奈瑟氏球菌毒素。优选所述抗原选自上述抗原。

[0057] 优选本发明的免疫原性组合物包括至少一种奈瑟氏球菌 Fe 获得蛋白和至少一种奈瑟氏球菌膜相关蛋白（优选整合外膜蛋白）且任选包括奈瑟氏球菌粘附素、奈瑟氏球菌自体转运蛋白或奈瑟氏球菌毒素。优选所述抗原选自上述抗原。

[0058] 优选在本发明的免疫原性组合物中提供全部 5 组抗原。

[0059] 当具体提到蛋白时，优选是天然、全长的蛋白及其天然变体（即，从奈瑟氏球菌，优选脑膜炎球菌菌株获得的天然蛋白），它还可包括其抗原性片段（特别是在亚单位疫苗中）。这些是含有或包括从蛋白氨基酸序列上连续获取的至少 10 个氨基酸，优选 20 个氨基酸，更优选 30 个氨基酸，更优选 40 个氨基酸或最优选 50 个氨基酸的片段（此处常常具体描述的）。此外，抗原性片段是指与抗奈瑟氏球菌全长蛋白产生的抗体或通过用奈瑟氏球菌感染哺乳动物宿主产生的抗体进行免疫反应的片段。抗原性片段还包括当以有效剂量施用

时,可针对奈瑟氏球菌感染引发保护性免疫反应的片段,更优选它可防止脑膜炎奈瑟氏球菌和/或淋病奈瑟氏球菌感染,最优选它可防止脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 感染。

[0060] 本发明还包括本发明奈瑟氏球菌蛋白的重组融合蛋白,或其片段。这些可将不同的奈瑟氏球菌蛋白或其片段组合在同一多肽中。可选择性地,本发明还包括奈瑟氏球菌蛋白或其片段的个体融合蛋白,即具有异源序列,如 T-细胞表位或纯化标记的供给者,例如:β-半乳糖苷酶、谷胱甘肽-S-转移酶、绿色荧光蛋白(GFP)、附加表位如 FLAG、myc 标记、聚组氨酸、或病毒表面蛋白如流感病毒血细胞凝集素、破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197 的融合蛋白。

[0061] 本发明的抗原

[0062] NMB 参照符号是指可从 [www.neisseria.org](http://www.neisseria.org) 访问的序列参照符号。

[0063] 1. 粘附素

[0064] 粘附素包括 FhaB(WO 98/02547)、NadA(J. Exp. Med(2002) 195:1445;NMB 1994)、也可称作 NhhA 的 Hsf(NMB 0992)(WO99/31132)、Hap(NMB1985)(WO 99/55873)、NspA(WO 96/29412)、MafA(NMB 0652) 和 MafB(NMB 0643)(Annu Rev Cell Dev Biol. 16: 423-457(2000);Nature Biotech 20:914-921(2002))、Omp26(NMB 0181)、NMB 0315、NMB 0995、NMB 1119 和 PilC(Mol. Microbiol. 1997, 23:879-892)。这些是参与奈瑟氏球菌与宿主细胞表面结合的蛋白。Hsf 是粘附素的其中一个例子,同时也是自体转运蛋白。因此本发明的免疫原性组合物可包括 Hsf 与其它自体转运蛋白的组合,其中 Hsf 发挥其粘附素的作用。这些粘附素可来源于脑膜炎奈瑟氏球菌或淋病奈瑟氏球菌或其它奈瑟氏球菌菌株。本发明还包括来源于奈瑟氏球菌的其它粘附素。

[0065] FhaB

[0066] 此抗原已在 WO 98/02547 SEQ ID NO:38(核苷酸 3083-9025)中描述-还可参见 NMB 0497。本发明人已经发现 FhaB 在诱导单独的抗-粘附抗体方面特别有效,且特别是与本发明其它抗原组合时。虽然可使用全长 FhaB,本发明人已经发现特定的 C-末端截短物至少令人惊讶地有效且优选甚至在对交叉-菌株的作用方面更有效。已经有利地显示出这种截短物更易克隆。本发明的 FhaB 截短物通常与 FhaB 分子的 N-末端三分之二,优选位于 1200-1600 位置、更优选 1300-1500 位置、最优选 1430-1440 位置的新的 C-末端相对应。具体的实施方案在 1433 或 1436 处具有 C-末端。因此,本发明的这种 FhaB 截短物和包括这种截短物的疫苗是本发明的独立方面而且是本发明组合免疫原性组合物的组分。N-末端还可被截短达 10、20、30、40 或 50 个氨基酸。

[0067] 2. 自体转运蛋白

[0068] 自体转运蛋白通常由信号序列、过客结构域和用于附着外膜的锚定结构域组成。自体转运蛋白的例子包括 Hsf(WO 99/31132)(NMB0992)、HMW、Hia(van Ulsen 等人, Immunol. Med. Microbiol. 200132:53-64)、Hap(NMB1985)(WO 99/55873;van Ulsen 等人, Immunol. Med. Microbiol. 200132:53-64)、UspA、UspA 2、NadA(NMB1994)(Comanducci 等人, J. Exp. Med. 2002 195:1445-1454)、AspA(Infection and Immunity 2002, 70(8): 4447-4461;NMB 1029)、Aida-1 样蛋白、SSh-2 和 Tsh。NadA(J. Exp. Med(2002) 195:1445)是自体转运蛋白的另一个例子,同时也是粘附素。本发明的免疫原性组合物因此包括 NadA 与粘附素的组合,其中 NadA 作为自体转运蛋白发挥作用。这些蛋白可来源于脑膜炎奈瑟氏

球菌或淋病奈瑟氏球菌或其它奈瑟氏球菌菌株。本发明还包括来源于奈瑟氏球菌的其它自体转运蛋白。

[0069] Hsf

[0070] Hsf 具有与自体转运蛋白共用的结构。例如,来源于脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76 的 Hsf 由氨基酸 1-51 组成的单一序列、表面外露且包括可变区(氨基酸 52-106、121-124、191-210 和 230-234)的成熟蛋白(氨基酸 52-479)氨基末端的头区、颈区(氨基酸 480-509)、疏水的  $\alpha$ -螺旋区(氨基酸 518-529)和其中 4 个跨膜链跨越外膜的锚定结构域(氨基酸 539-591)。

[0071] 虽然全长 Hsf 可用于本发明的免疫原性组合物中,但是各种 Hsf 截短物和缺失物也可有利地使用,这取决于疫苗的类型。

[0072] 当 Hsf 用于亚单位疫苗中时,优选使用可溶性过客结构域的一部分;例如氨基酸 52-479 的完全结构域,最优选其保守部分,例如氨基酸 134-479 的特别有利的序列。Hsf 的优选形式可被截短,以缺失在 W0 01/55182 中公开的蛋白可变区。优选的变体可包括在 W0 01/55182 中限定的 1、2、3、4、或 5 个可变区的缺失。在 N 或 C 末端的任何一端或两端,上述序列和下面描述的那些可被伸展或截短达 1、3、5、7、10 或 15 个氨基酸。

[0073] Hsf 的优选片段因此包括 Hsf 的整个头区,优选包含氨基酸 52-473。Hsf 的其它优选片段包括表面外露的头区,它包括一个或多个下列氨基酸序列:52-62、76-93、116-134、147-157、157-175、199-211、230-252、252-270、284-306、328-338、362-391、408-418、430-440 和 469-479。

[0074] 当 Hsf 存在于外膜小泡制品中时,它可被表达为全长蛋白或优选被表达为由氨基酸 1-51 和 134-591 的融合体组成的有利变体(产生氨基酸序列 134-C 末端的成熟外膜蛋白)。Hsf 的优选形式可被截短,从而缺失 W0 01/55182 中公开的蛋白可变区。优选的变体可包括在 W001/55182 中限定的 1、2、3、4、或 5 个可变区的缺失。优选第一和第二个可变区缺失。优选的变体是使氨基酸序列 52-237 或 54-237 之间的残基缺失,更优选使氨基酸 52-133 或 55-133 之间的残基缺失。所述成熟蛋白可缺少信号肽。

[0075] Hap

[0076] 对来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的 Hap-样蛋白进行的计算机分析显示出至少 3 个结构域。以来源于菌株 H44/76 的 Hap-样序列为例,包含氨基酸 1-42 的结构域 1编码自体转运蛋白家族特征性的 sec 依赖性信号肽,包含氨基酸 43-950 的结构域 2编码很可能表面外露且易进入免疫系统的过客结构域,包含残基 951-C 末端(1457)的结构域 3被预测编码可能装配成桶-样结构且被锚定在外膜中的  $\beta$ -链。因为结构域 2 可能是表面外露、良好保守的(在所有试验菌株中超过 80%)且可作为亚单位抗原在大肠杆菌中产生,因此它代表了目标疫苗候选物。因为结构域 2 和 3 很可能是表面外露且良好保守的(Pizza 等人, (2000), Science 287:1816-1820),因此它们代表了目标疫苗候选物。结构域 2 被称作过客结构域。

[0077] 本发明的免疫原性组合物可包括全长 Hap 蛋白,优选被掺入到 OMV 制品中。本发明的免疫原性组合物还可包括 Hap 的过客结构域,在菌株 H44/76 中,其由氨基酸残基 43-950 组成。Hap 的这一片段可特别有利地用于本发明的亚单位组合物中。在 N 或 C 末端的任何一端或两端,Hap 过客结构域的上述序列可被伸展或截短达 1、3、5、7、10、15、20、25、或 30 个氨基酸。

### [0078] 3. 铁获得蛋白

[0079] 铁获得蛋白包括 TbpA (NMB 0461) (WO 92/03467, US 5912336, WO93/06861 和 EP 586266)、TbpB (NMB 0460) (WO 93/06861 和 EP586266)、LbpA (NMB 1540) (Med Microbiol (1999) 32 :1117)、LbpB (NMB 1541) (WO/99/09176)、HpuA (U73112. 2) (Mol Microbiol. 1997, 23 ;737-749)、HpuB (NC. 003116. 1) (Mol Microbiol. 1997, 23 ;737-749)、也被称作 XthA 的 P2086 (NMB 0399) (13<sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference 2002)、FbpA (NMB0634)、FbpB、BfrA (NMB 1207)、BfrB (NMB 1206)、也被称作 GNA2132 的 Lipo28 (NMB 2132)、Sibp (NMB 1882)、HmbR、HemH、Bcp (NMB 0750)、Iron(III)ABC 转运蛋白 - 通透酶蛋白 (Tettelin 等人, Science 287 ;1809-1815 2000)、Iron(III)ABC 转运蛋白 - 周质 (Tettelin 等人, Science 287 ;1809-1815 2000)、TonB 依赖性受体 (NMB 0964 和 NMB0293) (Tettelin 等人, Science 287 ;1809-1815 2000) 和转铁蛋白结合蛋白相关蛋白 (Tettelin 等人, Science 287 ;1809-1815 2000)。这些蛋白可来源于脑膜炎奈瑟氏球菌、淋病奈瑟氏球菌或其它奈瑟氏球菌菌株。本发明还包括来源于奈瑟氏球菌的其它铁获得蛋白。

### [0080] TbpA

[0081] TbpA 与 TbpB 相互作用在奈瑟氏球菌外膜上形成蛋白复合体,其结合转铁蛋白。在结构上, TbpA 包括具有 TonB 箱的胞内 N- 末端结构域和活塞结构域,该活塞结构域为多个由短胞内环和较长的胞外环连接的跨膜  $\beta$  链。

[0082] 已经区别了 TbpB 的两个家族,它们分别具有较高的分子量和较低的分子量。TbpB 的高和低分子量形式与 TbpA 的不同家族结合,可以同源性为基础区别该不同家族。尽管它们的分子量相似,但还是将它们称作高分子量和低分子量家族,这是因为它们与 TbpB 的高或低分子量形式结合 (Rokbi 等人, FEMS Microbiol. Lett. 100 ;51, 1993)。术语 TbpA(高) 和 TbpA(低) 用于表示 TbpA 的这两种形式,且与 TbpB 相似。本发明的免疫原性组合物可包括来源于脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 A、B、C、Y 和 W-135 的 TbpA 和 TbpB 以及来源于包括淋病奈瑟氏球菌在内的其它细菌的铁获得蛋白。转铁蛋白结合蛋白 TbpA 和 TbpB 已经被分别称作 Tbp1 和 Tbp2 (Cornelissen 等人, Infection and Immunity 65 ;822, 1997)。

[0083] TbpA 包括若干不同的区。例如,就来源于脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76 的 TbpA 而言,氨基末端的 186 个氨基酸形成内部球状结构域,22 个  $\beta$  链跨越膜,形成  $\beta$  桶结构。这些是由短胞内环和较大的胞外环连接的。胞外环 2、3 和 5 具有最高程度的序列变异性且环 5 是表面外露的。环 5 和 4 参与配体结合。

[0084] TbpA 的优选片段包括 TbpA 的胞外环。使用来源于脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76 的 TbpA 序列,这些环与环 1 的氨基酸 200-202、环 2 的氨基酸 226-303、环 3 的氨基酸 348-395、环 4 的氨基酸 438-471、环 5 的氨基酸 512-576、环 6 的氨基酸 609-625、环 7 的氨基酸 661-671、环 8 的氨基酸 707-723、环 9 的氨基酸 769-790、环 10 的氨基酸 814-844 和环 11 的氨基酸 872-903 相对应。在序列对比后,在其它 Tbp 蛋白中的相应序列也可构成优选片段。最优选的片段可包括构成 Tbp 的环 2、环 3、环 4 或环 5 的氨基酸序列。

[0085] 当本发明的免疫原性组合物包括 TbpA 时,它优选同时包括 TbpA(高) 和 TbpA(低)。

[0086] 虽然优选 TbpA 存在于 OMV 疫苗中,但它也可以是亚单位疫苗的一部分。例如,可被引入到本发明免疫原性组合物中的分离的铁获得蛋白也是本领域熟知的 (WO 00/25811)。

它们可在细菌宿主中表达,使用洗涤剂提取(例如 2% Elugent)并通过亲和层析或使用本领域熟知的标准柱层析技术纯化(Oakhill 等人, Biochem J. 2002 364 ;613-6)。

[0087] 当 TbpA 存在于 OMV 疫苗中时,它的表达可通过此处讨论的基因技术上调,或可优选通过亲代菌株在下述铁有限条件下生长而被上调。该方法还可导致可变铁-调节蛋白,特别是 FrpB 的上调,其可变为免疫显性的且它因此可按下面所述有利地下调这种蛋白(特别是 FrpB)的表达(且优选使编码这种蛋白的基因缺失),以确保本发明的免疫原性组合物引发抗存在于大范围奈瑟氏球菌菌株中的抗原的免疫反应。它优选具有存在于免疫原性组合物中的 TbpA(高)和 TbpA(低),且优选这是通过将来源于表达 TbpA 可选择形式的两种菌株的 OMV 混合获得的。

#### [0088] 4. 毒素

[0089] 毒素包括 FrpA(NMB 0585 ;NMB 1405)、FrpA/C(见下面的定义)、FrpC(NMB 1415 ;NMB 1405)(WO 92/01460)、NM-ADPRT(NMB 1343)(13<sup>th</sup>International Pathogenic Neisseria Conference 2002 Massignani 等人, p135)、VapD(NMB 1753)、脂多糖(LPS;也被称作脂低聚糖或 LOS)免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3。FrpA 和 FrpC 所含的区在这两个蛋白之间是保守的且所述蛋白的优选片段是含有该保守片段的多肽,优选含有 FrpA/C 序列的氨基酸 227-1004。这些抗原可来源于脑膜炎奈瑟氏球菌或淋病奈瑟氏球菌或其它奈瑟氏球菌菌株。本发明还包括来源于奈瑟氏球菌的其它毒素。

[0090] 在可选择性的实施方案中,毒素可包括参与毒性调节的抗原,例如在脂多糖合成中起作用的 OstA。

#### [0091] FrpA 和 FrpC

[0092] 脑膜炎奈瑟氏球菌编码两种 RTX 蛋白,它们被称作 FrpA 和 FrpC,是在铁有限条件下分泌的(Thompson 等人, (1993) J. Bacteriol. 175 :811-818 ;Thompson 等人, (1993) Infect. Immun. 61 :2906-2911)。RTX(重复毒素)蛋白家族在靠近它们的 C-末端处共有下列一致序列的一系列 9 个氨基酸重复单位:Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly(Asn/Asp)Asp Xaa(LXGGXGN<sub>D</sub>DX)。大肠杆菌 HlyA 中的重复单位被认为是 Ca<sup>2+</sup> 结合的位点。正如在图 4 中所描绘的,脑膜炎球菌 FrpA 和 FrpC 蛋白,正如在菌株 FAM20 中所表征的,在它们的中心和 C-末端区共有广泛的氨基酸相似性但在 N-末端的相似性(如果有的话)非常有限。此外,由于 9 个氨基酸基序的重复(在 FrpA 中重复 13 次、在 FrpC 中重复 43 次),在 FrpA 和 FrpC 之间保守的区显示出某些多态性。

[0093] 本发明的免疫原性组合物可包括全长 FrpA 和 / 或 FrpC 或优选,含有在 FrpA 和 FrpC 之间保守的序列的片段。所述保守序列是由 9 个氨基酸的重复单位构成的。本发明的免疫原性组合物优选包括多于 3 个重复单位、多于 10 个重复单位、多于 13 个重复单位、多于 20 个重复单位或多于 23 个重复单位。

[0094] 这种截短物具有较之全长分子更有利的性质且包含这种抗原并被掺入到本发明的免疫原性组合物中的疫苗形成本发明的独立方面。

[0095] 在 FrpA 和 FrpC 之间保守的序列被命名为 FrpA/C,且当 FrpA 或 FrpC 形成本发明免疫原性组合物的组分时,可有利地使用 FrpA/C。FrpA 序列的氨基酸 277-1004 是优选的保守区。在 N 或 C 末端的任何一端或两端,上述序列可被伸展或截短达 1、3、5、7、10、15、20、25、或 30 个氨基酸。

[0096] LPS

[0097] LPS(脂多糖,也被称作 LOS-脂低聚糖)是奈瑟氏球菌外膜上的内毒素。已知 LPS 的多糖部分可诱导杀菌抗体。

[0098] LPS 低聚糖部分内的异质性在不同的奈瑟氏球菌菌株之间产生结构和抗原多样性(Griffiss 等人, *Inf. Immun.* 1987 ;55 :1792-1800)。这已被用于将脑膜炎球菌菌株细分成 12 个免疫型(Scholtan 等人, *J Med Microbiol* 1994, 41 :236-243)。免疫型 L3、L7 和 L9 在免疫学方面是相同的且在结构上是相似的(或甚至是相同的)并因此已被命名为 L3、7、9(或,为了本说明书的目的,统称为“L3”)。脑膜炎球菌 LPS L3、7、9(L3)、L2 和 L5 可通过唾液酸化,或通过加入胞苷 5' - 一磷酸 -N- 乙酰基神经氨酸而被修饰。虽然 L2、L4 和 L6 LPS 在免疫学方面是可区别的,但它们在结构上相似,且在此处提到 L2 时, L4 或 L6 在本发明的范围内可被任选替代。见 M. P. Jennings 等人, *Microbiology* 1999, 145, 3013-3021 和 *Mol Microbiol* 2002, 43 :931-43, 其中进一步举例说明了 LPS 的结构和异质性。

[0099] 当 LPS, 优选脑膜炎球菌 LPS 包括在本发明的疫苗中时, 优选且有利地存在免疫型 L2 和 L3 之一或两者。LPS 优选存在于外膜小泡中(优选用低百分比的洗涤剂, 更优选 0-0.5%、0.02-0.4%、0.04-0.3%、0.06-0.2%、0.08-0.15% 或 0.1%, 最优选脱氧胆酸盐[DOC] 提取小泡时), 还可以是亚单位疫苗的一部分。LPS 可使用熟知的过程, 包括热水-苯酚过程分离(Wesphal 和 Jann Meth. Carbo. Chem. 5 ;83-91 1965)。还可见 Galanos 等人, *Eur J Biochem* 9 :245-249, 和 Wu 等人, 1987, *Anal Bio Chem* 160 :281-289。LPS 可简单使用或与 T- 细胞表位的来源, 如破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM-197 或 OMV 外膜蛋白缀合使用。使分离的 LOS 缀合的技术也是已知的(见, 例如, EP941738, 其引入此处作为参考)。

[0100] 当 LOS(特别是本发明的 LOS) 存在于疱制剂中时, 优选通过使 LOS 与也存在于疱制剂上的一种或多种外膜蛋白(例如, 脑膜炎球菌中的 PorA 或 PorB) 缀合的方法使 LOS 原位缀合。

[0101] 该方法可有利地提高疱制剂内 LOS 抗原的稳定性和/或免疫原性(提供 T- 细胞帮助)和/或抗原性- 因此以其保护性最强的构象为非 T- 依赖性低聚糖免疫原提供 T- 细胞帮助- 如在其天然环境中的、脑膜炎球菌外膜表面上的 LOS。此外, LOS 在疱内的缀合可导致 LOS 解毒(脂类 A 部分被稳定埋藏在外膜中, 因此很少引起毒性)。因此, 这里提到的从 htrB<sup>-</sup> 或 msbB<sup>-</sup> 突变体中分离疱, 或通过向组合物中加入多粘菌素 B 的无毒肽功能性等价物的解毒方法(见 WO 93/14115、WO 95/03327、Velucchi 等人, (1997) *J Endotoxin Res* 4 :1-12, 和 EP 976402, 多粘菌素 B 的无毒肽功能性等价物的进一步描述- 特别是(序列 KTKCKFLKKC, 其中 2 个半胱氨酸形成二硫键)肽 SAEP 2 的使用)可能并不是必需的(但其可被加入到组合中用于增加安全性)。因此, 本发明人已经发现包括疱的组合物可形成用于治疗或预防由衍生疱的生物所引起疾病的疫苗基础, 其中存在于疱中的 LOS 已以疱内模式与同时存在于疱中的外膜蛋白缀合, 其中这种疫苗基本上是无毒的且能够诱导抗其天然环境中的 LOS 的 T- 依赖性杀菌反应。

[0102] 本发明因此进一步提供这种疱内 LOS 缀合的脑膜炎球菌疱制品。

[0103] 这种疱制品是否可从正极讨论的细菌(见 WO 01/09350) 中被分离出来, 然后经过已知的缀合化学过程使 LOS 低聚糖部分上的基团(例如, NH<sub>2</sub> 或 COOH) 与疱外膜蛋白上的基团(例如, NH<sub>2</sub> 或 COOH) 缀合还在讨论。可使用利用戊二醛、甲醛、或戊二醛/ 甲醛混

合物的交联技术,但优选使用选择性更强的化学过程如 EDAC 或 EDAC/NHS(J. V. Staros, R. W. Wright 和 D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156 : 220-222(1986) ;和 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson(1996)pp173-176)。可使用的、能够在 LOS 与蛋白分子之间生成共价键的其它缀合化学过程或处理在 EP 941738 中描述。

[0104] 优选胞制品在没有荚膜多糖存在的条件下缀合。所述胞可从不(按照下面所述天然地或经由突变)产生荚膜多糖的菌株中分离,或可从绝大多数且优选全部污染荚膜多糖中纯化。以这种方式,胞内 LOS 缀合反应更加有效。

[0105] 优选存在于胞中的超过 10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 95% 的 LOS 是交联的/缀合的。

[0106] 胞内缀合应优选整合下列方法的 1、2 或全部 3 个步骤:缀合 pH 应大于 pH 7.0, 优选大于或等于 pH 7.5(最优选在 pH 9 下);在反应过程中应当维持 1-5%、优选 2-4%、最优选约 3% 蔗糖的条件;在缀合反应中应当将 NaCl 降到最低,优选 0.1M、0.05M、0.01M、0.005M、0.001M、且最优选根本不存在。所有这些方法特征可确保在整个缀合过程中胞均保持稳定且保持在溶液中。

[0107] EDAC/NHS 缀合方法是胞内缀合的优选方法。EDAC/NHS 优于甲醛,甲醛可交联至非常高的程度,由此不利地影响滤过率。EDAC 与羧酸(如 LOS 中的 KDO)反应,产生活性酯中间体。在有胺亲核试剂(如外膜蛋白,如 PorB 中的赖氨酸)存在的条件下,酰胺键是用异脲副产物的释放形成的。然而,EDAC-介导的反应的效能可通过 Sulfo-NHS 酯中间体的形成而增加。Sulfo-NHS 酯在水溶液中存在的时间比 EDAC 单独与羧酸盐反应形成的活性酯要长。因此,更高产率酰胺键的形成可使用这种两阶段方法实现。EDAC/NHS 缀合在 J. V. Staros, R. W. Wright 和 D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156 : 220-222(1986) ;和 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson(1996)pp 173-176 中讨论。优选在反应中使用 0.01-5mg EDAC/mg 胞、更优选 0.05-1mg EDAC/mg 胞。所用 EDAC 的量取决于存在于样品中的 LOS 量,而其又依次取决于用于提取胞的脱氧胆酸盐(DOC)%。在低% DOC(例如,0.1%)下,使用较大用量的 EDAC(1mg/mg 及以上),然而在高% DOC(例如 0.5%)下,使用较小用量的 EDAC(0.025-0.1mg/mg)以避免太多胞间交联。

[0108] 因此本发明的方法优选是用于产生胞内缀合 LOS(优选脑膜炎球菌)的方法,该方法包括在有 EDAC/NHS 存在、pH 7.0-pH 9.0(优选约 pH 7.5)、1-5%(优选约 3%)蔗糖、且任选在基本上没有 NaCl(如上所述)的条件下使胞缀合,并分离反应混合物中缀合胞的步骤。

[0109] 所述反应随后使用抗-LOS(例如,抗-L2 或抗-L3)mAb 在反应混合物的蛋白质分离凝胶上进行,其显示随着反应时间的进行,胞中 LOS 的比例增大,LOS 的分子量增加。

[0110] 使用这种技术可回收的胞产率 99%。

[0111] 人们发现 EDAC 是一种极好的胞内交联剂,这是因为它可使 LOS 与 OMP 充分交联,用于提高 LOS T-依赖性免疫原性,但不会使它交联至非常高的程度而导致如滤过率较差、聚集和胞间交联的问题发生。所产生的胞的形态学与未缀合的胞相似(利用电子显微镜)。

此外,上述方案可避免发生过度交联(其可降低天然存在于胞表面上的保护性 OMP,例如 TbpA 或 Hsf 的免疫原性)。

[0112] 优选衍生胞的脑膜炎球菌是不能产生荚膜多糖的突变株(例如,下述突变株的其中一种,特别是 *siaD*<sup>-</sup>)。还优选可有效抗脑膜炎球菌病的免疫原性组合物同时包含 L2 和 L3 胞,其中 L2 和 L3 LOS 均与胞外膜蛋白缀合。此外,优选胞内缀合胞中的 LOS 结构与从 *lgtB*<sup>-</sup> 脑膜炎球菌菌株衍生的一致(如下所述)。最优选免疫原性组合物包括胞内缀合的胞:来源于不能产生荚膜多糖且是 *lgtB*<sup>-</sup> 的突变脑膜炎球菌菌株;包含来源于不能产生荚膜多糖的突变脑膜炎球菌菌株的 L2 和 L3 胞;包含来源于 *lgtB*<sup>-</sup> 突变脑膜炎球菌菌株的 L2 和 L3 胞;或最优选包含来源于不能产生荚膜多糖且是 *lgtB*<sup>-</sup> 的突变脑膜炎球菌菌株的 L2 和 L3 胞。

[0113] 可用于本发明的一般 L3 脑膜炎球菌菌株是 H44/76menB 菌株。一般的 L2 菌株是 B16B6 menB 菌株或 39E 脑膜炎球菌 C 型菌株。

[0114] 如上所述,本发明的胞已通过缀合作用被解毒至一定程度,且无需进一步解毒,然而进一步的解毒方法可用于增加安全性,例如,使用来源于 *htrB*<sup>-</sup> 或 *msbB*<sup>-</sup> 脑膜炎球菌菌株的胞或向胞组合物中加入多粘菌素 B 的无毒肽功能性等价物[与脂类 A 具有较高亲和性的分子](优选 SEAP 2)(如上所述)。

[0115] 在上述方法中,提供脑膜炎球菌泡及含有胞的免疫原性组合物,其具有重要的抗原 LOS,该抗原基本上无毒,没有自身免疫性问题,具有 T- 依赖性特征,存在于其天然环境中,且能够诱导抗超过 90% 脑膜炎球菌菌株的杀菌抗体反应(在 L2+L3 组合物的情况下)。

[0116] 优选胞内 LOS 缀合应整合下列方法的 1、2、或全部 3 个步骤:缀合 pH 应大于 pH 7.0,优选大于或等于 pH 7.5(最优选在 pH 9 下);在反应过程中应当维持 1-5%、优选 2-4%、最优选约 3% 蔗糖的条件;在缀合反应中应当将 NaCl 降到最低,优选 0.1M、0.05M、0.01M、0.005M、0.001M、且最优选根本不存在。所有这些方法特征可确保在整个缀合过程中胞保持稳定且保持于溶液中。

[0117] 虽然可通过各种技术和化学过程使 LOS 与外膜蛋白在胞内缀合,但 EDAC/NHS 缀合方法是胞内缀合的优选方法。EDAC/NHS 优于甲醛,甲醛可交联至非常高的程度,由此对滤过率有不利的影响。EDAC 与羧酸反应,产生活性酯中间体。在有胺亲核试剂存在的条件下,酰胺键是用异脲副产物的释放形成的。然而,EDAC- 介导的反应的效能可通过 Sulfo-NHS 酯中间体的形成而增加。Sulfo-NHS 酯在水溶液中存在的时间比 EDAC 单独与羧酸盐反应形成的活性酯要长。因此,更高产率酰胺键的形成可使用这种两阶段方法实现。EDAC/NHS 缀合在 J. V. Staros, R. W. Wright 和 D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical chemistry* 156:220-222(1986); 和 *Bioconjugates Techniques*. Greg T. Hermanson(1996) pp173-176 中讨论。

[0118] 因此本发明的方法优选是用于产生胞内缀合 LOS(优选脑膜炎球菌)的方法,该方法包括在有 EDAC/NHS 存在、pH 7.0-pH 9.0(优选约 pH 7.5)的 pH、1-5%(优选约 3%)蔗糖、且任选基本上没有 NaCl(如上所述)的条件下使胞缀合,以及从反应混合物中分离缀合胞的步骤。

[0119] 所述反应随后使用抗 -LOS(例如,抗 -L2 或抗 -L3)mAb 在反应混合物的分离凝胶

上进行,其显示随着反应时间的进行,胞中 LOS 的比例增大,LOS 的分子量增加。

[0120] 使用这种技术可回收的胞产率 99%。

[0121] 人们发现 EDAC 是一种极好的胞内交联剂,这是因为它可使 LOS 与 OMP 充分交联,用于提高 LOS T- 依赖性免疫原性,但不会使它交联至非常高的程度而导致如滤过率较差和胞间交联的问题发生。此外,应当避免过度交联,从而避免天然存在于胞表面上的保护性 OMP,例如 Tbp 免疫原性的任何降低。

[0122] 5. 整合外膜蛋白

[0123] 奈瑟氏球菌蛋白的其它种类也可以是包括在本发明奈瑟氏球菌疫苗中的候选物,且能够以令人吃惊的有效方式与其它抗原组合。膜相关蛋白、特别是整合膜蛋白且最有利地是外膜蛋白,特别是整合外膜蛋白可用于本发明的组合物中。这种蛋白的例子是也被称作 Omp1A 的 P1d A(NMB 0464)(W000/15801),其是奈瑟氏球菌磷脂酶外膜蛋白。其它例子是 TspA(NMB 0341)(Infect. Immun. 1999,67 ;3533-3541)和 TspB(T- 细胞刺激蛋白)(WO 00/03003 ;NMB 1548、NMB 1628 或 NMB1747)。其它例子包括 PilQ(NMB 1812)(WO 99/61620)、也被称作 D15- 的 OMP85(NMB0182)(W000/23593)、NspA(U52066)(W096/29412)、FhaC(NMB 0496 或 NMB 1780)、PorB(NMB 2039)(Mol. Biol. Evol. 12 ;363-370,1995)、HpuB(NC. 003116. 1)、TdfH(NMB1497)(Microbiology 2001,147 ; 1277-1290)、OstA(NMB0280)、也被称作 GNA33 和 Lipo30 的 MltA(NMB0033)、HtrA(NMB 0532 ; W099/55872)、HimD(NMB 1302)、HisD(NMB 1581)、GNA 1870(NMB 1870)、HlpA(NMB 1946)、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB1953、HtrA、TbpA(NMB 0461)(WO 92/03467)(还可见上面的铁获得蛋白)和 LbpA(NMB 1541)。

[0124] OMP85

[0125] 本发明的免疫原性组合物可包括全长 OMP85,优选作为 OMV 制品的一部分。OMP85 的片段也可用于本发明的免疫原性组合物中,特别是,优选将由氨基酸残基 1-475 或 50-475 组成的 OMP85 表面外露结构域掺入到本发明免疫原性组合物的亚单位组分中。在 N 或 C 末端的任何一端或两端,OMP85 的表面外露结构域的上述序列可被伸展或截短达 1、3、5、7、10、15、20、25、或 30 个氨基酸。优选删除 OMP85 片的信号序列。

[0126] OstA

[0127] OstA 可在脂多糖的合成中发挥作用且可被认为是毒性调节剂。OstA 可选择性地包括在毒素类中,其中毒素种类被扩大至包括毒性调节剂以及毒素。

[0128] 免疫原性组合物

[0129] 免疫原性组合物是包括至少一种抗原的组合物,当给予宿主时,所述抗原能够产生免疫反应。优选,这种免疫原性制品能够产生抗奈瑟氏球菌,优选抗脑膜炎奈瑟氏球菌或淋病奈瑟氏球菌感染的保护性免疫反应。

[0130] 本发明涉及包括至少两种抗原的免疫原性组合物,其优选可引发协同杀菌、保护性或粘附阻断反应的一种或多种。

[0131] 本发明的 SBA 杀菌测定法

[0132] 这种协同反应可通过由抗原组合引发的 SBA 来表征,抗原组合引发的 SBA 较之由每个抗原单独引发的 SBA 要高至少 50%、2 倍、3 倍、优选 4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍且最优选 10 倍。优选 SBA 是相对于衍生抗原的同源性菌株测量的,且优选是相对于一组异源

性菌株测量的。(见下面代表性小组,例如属于 A-4 聚簇的 BZ10(B:2b:P1.2);属于 ET-37 复合体的 B16B6(B:2a:P1.2);和 H44/76(B:15:P1.7,16))。SBA 是最普遍认可的免疫学标记,可评价脑膜炎球菌疫苗的功效(Perkins 等人, J Infect Dis. 1998, 177 :683-691)。令人满意的 SBA 可通过任何已知方法测定。SBA 可利用从动物模型或人类受试者获得的血清进行(见实施例 17-20)。

[0133] 用人血清进行 SBA 的优选方法如下。在第一次接种前、第二次接种后 2 个月和第三次接种后 1 个月(1 年中进行 3 次接种是一般的人类初次接种程序,例如在第 0、2 和 4 个月或第 0、1、或 6 个月时给予)采集血液样品。这种人类初次接种程序可对 1 岁以下的婴儿进行(例如,与 Hib 接种同时进行),或也可给 2-4 岁的儿童或青少年接种以测试这种初次接种程序的 SBA。如果适合,可在初次接种后 6-12 个月以及激发剂量后 1 个月再次采集血液样品。

[0134] 如果在(初次接种程序的)第三支疫苗给药后一个月(在 2-4 岁儿童或青少年中,但优选在生命第一年的婴儿中),抗衍生本发明抗原的脑膜炎球菌菌株的 SBA(抗体稀释度)效价(与接种前效价相比)增加 4 倍的受试者百分比超过 30%、优选超过 40%、更优选超过 50%、最优选超过 60% 受试者,那么对于具有同源杀菌活性的抗原或胞制品而言, SBA 是令人满意的。

[0135] 当然,如果它也可相对于衍生它的脑膜炎球菌菌株引发令人满意的 SBA 的话,则具有异源杀菌活性的抗原或胞制品也可构成具有同源杀菌活性的胞制品。

[0136] 如果在(初次接种程序的)第三支疫苗给药后一个月(在 2-4 岁儿童或青少年中,但优选在生命第一年的婴儿中),抗脑膜炎球菌 3 种异源菌株的 SBA(抗体稀释度)效价(与接种前效价相比)增加 4 倍的受试者百分比超过 20%、优选超过 30%、更优选超过 35%、最优选超过 40% 受试者,那么对于具有异源杀菌活性的抗原或胞制品而言, SBA 是令人满意的。这种试验是具有异源杀菌活性的抗原或胞制品是否可诱导抗各种脑膜炎球菌菌株的交叉杀菌抗体的良好表征。所述三种异源菌株应当优选具有彼此不同且优选与制备或衍生具有异源杀菌活性的抗原或胞制品的菌株不同的电泳型(ET)-复合体或多基因座序列分型(MLST)模式(见 Maiden 等人, PNAS USA 1998, 95 :3140-5)。本领域技术人员应当能够很容易地测定具有不同 ET-复合体的三种菌株,其可反映在脑膜炎球菌之间,特别是脑膜炎球菌 B 型菌株之间观察到的基因多样性,这些菌株被认为是重要疾病负担的原因和/或代表认可的 MenB 剧毒谱系(见 Maiden 等人, 见上)。例如,可使用的三种菌株是下列:属于 A-4 聚簇的 BZ10(B:2b:P1.2);属于 ET-37 复合体的 B16B6(B:2a:P1.2);和属于 ET-5 复合体的 H44/76(B:15:P1.7,16),或属于同一 ET/聚簇的任何其它菌株。这种菌株可用于测试从例如属于 ET-S 复合体的脑膜炎球菌菌株 CU385(B:4:P1.15)制备或衍生的、具有异源杀菌活性的抗原或胞制品。可使用的其它样品菌株来源于谱系 3 流行性克隆(例如, NZ124[B:4:P1.7,4])。另一 ET-37 菌株是 NGP165(B:2a:P1.2)。

[0137] 测量 SBA 活性的方法是本领域已知的。例如,可使用的方法在 W099/09176 的实施例 10C 中描述。在一般情况中,所试验的菌株培养物是在生长的对数期(优选在铁缺失的条件中-通过向生长培养基中加入铁螯合剂如 EDDA)生长的。可将其悬浮在具有 BSA 的培养基(如具有 0.3% BSA 的 Hanks 培养基)中,以便获得调至约 20000CFU/ml 的试验细胞悬浮液。一系列反应混合物可通过将一系列 2 倍稀释的试验血清(优选在 56℃ 热灭活

30 分钟) [例如, 50  $\mu$  l/ 孔体积] 和 20000CFU/ml 试验的脑膜炎球菌菌株悬浮液 (例如, 25  $\mu$  l/ 孔体积) 混合而制备。应培养 (例如, 37°C 15 分钟) 并振摇 (例如, 210rpm) 反应小瓶。此外, 终反应混合物 [例如, 100  $\mu$  l 体积] 还可包含补体源 [如, 25% 终体积的预试幼兔血清], 并按照上面所述培养 [例如, 37°C 60 分]。无菌的聚苯乙烯 U- 底 96- 孔微量滴定平板可用于该测定法。可使用多道移液器从每个孔中采集等分试样 [例如, 10  $\mu$  l], 滴在 Mueller-Hinton 琼脂平板 (优选含有 1% Isovitalex 和 1% 热灭活的马血清) 上并培养 (例如, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中培养 18 小时)。优选, 单独的菌落高达 80CFU/ 等分试样。将下列三种试验样品用作对照: 缓冲液 + 细菌 + 补体; 缓冲液 + 细菌 + 灭活补体; 血清 + 细菌 + 灭活补体。SBA 效价可使用程序直接计算, 该程序可对数据进行加工从而得到稀释度的测量值, 该测量值与通过回归计算得到的 50% 细胞死亡相对应。

#### [0138] 动物保护测定法

[0139] 可选择性地, 协同反应可通过抗原组合在动物保护测定法中的功效而表征。例如, 可使用实施例 12 或 13 中描述的测定法。优选, 与单独使用抗原, 特别是抗原的次优剂量相比, 通过抗原组合而得到保护的动物数量明显增加。

[0140] 用于防止淋病奈瑟氏球菌感染的成功疫苗可能需要不止一个下列要素: 血清和 / 或粘膜抗体的产生以促进补体介导的淋球菌死亡, 和 / 或通过白细胞如多形核白细胞提高吞噬作用并杀死微生物, 和 / 或防止淋球菌附着于宿主组织; 诱导细胞介导的免疫反应, 它们也可参与保护。

[0141] 本发明疱疹病疫苗制品功效的提高可通过分析诱导的血清和 / 或粘膜抗体免疫反应来评价, 它们具有抗粘附和 / 或调理性和 / 或杀菌活性, 如其他人所述 (McChesney D 等人, Infect. Immun. 36 :1006, 1982 ;Boslego J 等人; Efficacy trial of a purified gonococcal pilus vaccine, in Program and Abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984 ;Siegel M 等人, J. Infect. Dis 145 :300, 1982 ;dela Pas, Microbiology, 141 (Pt4) :913-20, 1995)。

[0142] 近来描述了由淋病奈瑟氏球菌所致的生殖器感染小鼠模型 (Plante M, J. Infect. Dis. , 182 :848-55, 2000)。本发明疱疹病疫苗功效的提高还可通过其防止或降低淋病奈瑟氏球菌在这种小鼠感染模型中定居的能力而评价。

#### [0143] 粘附阻断测定法

[0144] 可选择性地, 协同反应可通过抗原组合在粘附阻断测定法中的功效而表征。例如, 可使用实施例 11 中描述的测定法。优选与使用抗单独抗原产生的抗血清, 特别是次优剂量的抗体相比, 由抗抗原组合产生的抗血清诱导的阻断程度显著提高。

#### [0145] 亚单位组合物

[0146] 本发明的免疫原性组合物可以是一种亚单位组合物。亚单位组合物是在将组分混合形成抗原性组合物之前, 其中组分已经被分离并纯化到至少 50%、优选至少 60%、70%、80%、90% 纯度的组合物。

[0147] 本发明的免疫原性亚单位组合物优选包括选自下列的至少 2 种抗原: FhaB、PilC、Hsf、Hap、NadA、OMP85、IgA 蛋白酶、AspA、AspA 的过客结构域、Hsf 的过客结构域、Hap 的过客结构域、FrpA、FrpC、TbpA、TbpB、LbpA、LbpB、HpuA、HpuB、TspA、TspB、PldA、PilQ、FhaC、

NspA、和 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

[0148] 亚单位组合物可以是水溶性蛋白的水溶液。它们可包含洗涤剂、优选非-离子、两性离子或离子洗涤剂,以便使抗原的疏水部分溶解。它们可包含脂类,这样就可形成脂质体结构,使抗原以跨越脂膜的结构呈递。

#### [0149] 外膜小泡制品

[0150] 脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B(menB) 分泌足量的外膜泡从而使得能够以工业规模制造它们。外膜小泡还可经由用洗涤剂提取细菌细胞的方法制备(见例如,EP 11243)。

[0151] 本发明的免疫原性组合物还可包括具有至少两种抗原的外膜小泡制品,所述抗原已被上调,或者被重组上调或通过其它方式被上调,包括在铁-缺失条件下生长。在这种外膜小泡制品中被上调的抗原的例子包括:NspA、Hsf、Hap、OMP85、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、TbpB、LbpB、PilQ、AspA、TdfH、PorB、HpuB、P2086、NM-ADPRT、MafA、MafB 和 PldA。这种制品还可任选包括 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

[0152] 来源于奈瑟氏球菌菌株的泡制品的制备可通过本领域技术人员熟知的任何方法获得。优选使用在 EP 301992、US5,597,572、EP 11243 或 US 4,271,147、Frederikson 等人(NIPH Annals[1991],14:67-80)、Zollinger 等人,(J. Clin. Invest. [1979],63:836-848)、Saunders 等人,(Infect. Immun. [1999],67:113-119)、Drabick 等人(Vaccine[2000],18:160-172)或 W001/09350(实施例 8)中公开的方法。通常,使用洗涤剂,优选脱氧胆酸盐提取 OMV,且核酸被任选酶促除去。纯化是通过超速离心后,任选接着进行大小排阻层析实现的。如果包括本发明 2 种或多种不同的泡,则它们可在单一容器中组合形成本发明的多价制品(虽然制品也被认为是多价的,如果本发明的不同泡是处于单独容器中的单独组合物,但它们是在同一时间[由同一医师]给予宿主的)。OMV 制品通常是通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤而灭菌的,且优选贮存在蔗糖溶液(例如 3%)中,该蔗糖溶液已知可使泡制品溶解。

[0153] 蛋白在外膜小泡制品内的上调可通过将基因的附加拷贝插入到衍生 OMV 制品的奈瑟氏球菌菌株中而获得。可选择性地,可将衍生 OMV 制品的奈瑟氏球菌菌株中的基因启动子交换成较强的启动子。这种技术在 W001/09350 中描述。与从未修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌(例如菌株 H44/76)衍生的 OMV 中存在的蛋白水平相比,蛋白的上调将导致 OMV 中存在的蛋白水平更高。优选所述水平要高 1.5、2、3、4、5、7、10 或 20 倍。

[0154] 当 LPS 是 OMV 中的附加抗原时,使用低浓度提取洗涤剂(例如,脱氧胆酸盐或 DOC)的方案可优选用于 OMV 制备方法中,以便保持高水平的结合 LPS 而特别除去有毒的结合较差的 LPS。所用 DOC 的浓度优选 0-0.5% DOC、0.02-0.4% DOC、0.04-0.3% DOC,更优选 0.06%-0.2% DOC 或 0.08-0.15% DOC,最优选约或准确的 0.1% DOC。

[0155] “强的启动子序列”是指增加编码目标抗原的基因转录的调节控制元件。

[0156] “上调表达”是指相对于未修饰(即天然存在的)泡而言,可提高目标抗原表达的任何方式。应当了解‘上调’的量取决于特定的目标抗原,但不会超出破坏泡的膜完整性的量。抗原的上调是指较之未修饰的泡高至少 10% 的表达。优选高至少 50%。更优选高至少 100%(2 倍)。最优选高 3、4、5、7、10、20 倍。可选择性地或附加地,上调表达是指就代谢或营养变化而言表达是非-条件性的,特别是在 TbpA、TbpB、LbpA 和 LbpB 的情况下。优选当从在铁有限条件中生长的细菌中衍生泡时,评价表达水平(例如在有铁螯合剂存在的

条件下)。

[0157] 又为了清楚的目的,术语‘将细菌菌株进行改造以产生较少所述抗原’或下调是指相对于未修饰的(即天然存在的胞)而言,优选通过缺失使目标抗原表达(或功能性基因产物的表达)降低的任何方式,这样表达较之未修饰的胞要低至少10%。优选低至少50%且最优选完全缺乏。如果下调蛋白是酶或功能性蛋白,则下调可通过引入一次或多次突变而获得,导致酶或功能活性降低10%、20%、50%、80%或优选100%。

[0158] 调节奈瑟氏球菌蛋白表达所需的改造步骤可以以本领域技术人员已知的各种方式进行。例如,可插入序列(例如,启动子或开放阅读框),并通过转座子插入技术破坏启动子/基因。例如,上调基因的表达时,可经由转座子将强启动子插入到基因起始密码子的直到2kb上游(更优选200-600bp上游,最优选约400bp上游)。还可利用点突变或缺失(特别是对基因的下调表达而言)。

[0159] 然而,这种方法可能相当不稳定或不确定,且因此优选改造步骤是经由同源重组事件进行。优选,该事件发生在细菌染色体上至少30个核苷酸的序列(诱重组区)和在菌株内转化的载体上至少30个核苷酸的序列(第二诱重组区)之间。优选该区是40-1000个核苷酸,更优选100-800个核苷酸,最优选500个核苷酸。这些诱重组区应当足够相似,这样它们就能够在十分严格的条件下彼此杂交。

[0160] 用于进行此处所述基因修饰事件的方法(如通过重组事件将基因上调或下调并将其它基因序列引入到奈瑟氏球菌基因组中)在W001/09350中描述。可在奈瑟氏球菌中被整合的一般强启动子是porA、porB、lgtF、Opa、p110、lst、和hpuAB。PorA和PorB是优选的组成型强启动子。已经确定了PorB启动子活性包含在与PorB起始密码子上游的核苷酸1-250相对应的片段中。

[0161] 通过在铁有限培养基中生长而上调抗原的表达

[0162] 本发明外膜小泡制品中某些抗原的上调优选通过分离在铁有限条件下生长的奈瑟氏球菌亲代菌株中的外膜小泡而实现。培养基中低浓度的铁将导致参与铁获得的蛋白表达增加,包括TbpA、TbpB、LbpA、LbpB、HpuA、HpuB和P2086。这些蛋白的表达由此被上调而无需重组修饰所涉及的基因,例如通过插入较强的启动子或插入基因的附加拷贝。本发明还包括通过在铁有限培养基中生长而上调铁获得蛋白,其中所述基因也已被重组修饰。

[0163] 铁有限是通过向培养基中加入铁螯合剂而实现的。适宜的铁螯合剂包括2,2-双吡啶,EDDHA(乙二胺-二(o-羟基苯乙酸))和Desferal(甲磺酸去铁胺,Sigma)。Desferal是优选的铁螯合剂且以10-100  $\mu$ M、优选25-75  $\mu$ M、更优选50-70  $\mu$ M、最优选60  $\mu$ M的浓度加入到培养基中。培养基的铁内含物主要来源于酵母提取物和大豆胨组分,且存在的用量可根据批次而变化。因此,在不同批的培养基中,不同浓度的Desferal对于获得铁获得蛋白的上调是最佳的。本领域技术人员应当能够很容易地测定最佳浓度。在基础条件下,应向培养基中加入充足的铁螯合剂,从而上调所需铁-调节蛋白的表达,但也不能过量而不利地影响细菌的生长。

[0164] 优选将通过在铁有限条件下生长的铁获得蛋白的上调与其它抗原的重组上调组合,从而获得本发明的外膜小泡。

[0165] 可变和非-保护性免疫显性抗原的下调/除去

[0166] 在细菌菌株中,很多表面抗原都是可变的且因此只能抗一组有限的紧密相关的菌

株。本发明一方面涉及本发明的外膜小泡,其中其它蛋白的表达减少,或优选编码可变表面蛋白的基因缺失。这种缺失导致产生疱的细菌菌株当以疫苗形式给药时,抗各种菌株交叉反应性的潜能更强,这是由于保守蛋白(留存在外膜上)对接种者的免疫系统施加了更强的影响。可在本发明疱免疫原性组合物中被下调的奈瑟氏球菌中这种可变抗原的例子包括 PorA、PorB、Opa。

[0167] 可被下调或切断的其它类型基因是在体内可被细菌很容易地接通(表达)或切断的基因。因为由这种基因编码的外膜蛋白并不总是存在于细菌上,因此这种蛋白在疱制品中的存在还可由于上述原因而对疫苗有效性有害。下调或缺失的优选例子是奈瑟氏球菌 Opc 蛋白。由含 Opc 的疱疫苗诱导的抗 -Opc 免疫性仅具有有限的保护能力,这是因为感染生物很容易变为 Opc<sup>-</sup>。

[0168] 例如,这些可变或非-保护基因的表达可被下调,或最终被切断。如此则具有将免疫系统集中于更好抗原上的优点,所述抗原仅少量存在于疱外表面上。下调还指表面外露的,上述外膜蛋白的可变免疫显性环可被改变或缺失,从而产生免疫显性较低的外膜蛋白。

[0169] 下调表达的方法在 W001/09350 中公开。在本发明的疱免疫原性组合物中被下调的优选蛋白组合包括 PorA 与 OpA、PorA 与 OpC、OpA 与 OpC、PorA 与 OpA 与 OpC。

[0170] 已知有 4 种不同的 Opa 基因存在于脑膜炎球菌基因组(Aho 等人,1991 Mol. Microbiol. 5:1429-37)中,因此当提到 Opa 的表达被下调时,它是指优选存在于脑膜炎球菌中的 1、2、3 或(优选)全部 4 种基因都被下调。这种下调通常可按照 W001/09350 所述基因工程进行或通过查找很容易发现的、天然的、稳定的脑膜炎球菌菌株而进行,它们自 Opa 基因座的表达较低或没有。这种菌株可使用 Poolman 等人(1985 J. Med. Micro. 19:203-209)描述的技术发现,其中 Opa<sup>-</sup>细胞具有与表达 Opa 的细胞不同的表型,这可通过在平板上或显微镜下观察细胞外观而见到。一旦找到,在进行发酵以使 Opa 缺失后,通过在细胞内含物上进行蛋白质印迹而显示出该菌株是稳定的 Opa<sup>-</sup>。

[0171] 当外膜小泡中某些抗原的上调是通过在铁有限条件下生长而实现的时,可变蛋白 FrpB(Microbiology 142:3269-3274, (1996); J. Bacteriol. 181:2895-2901(1999))也可被上调。本发明人已经发现,按照 W001/09350 所述通过下调全部蛋白的表达或通过使 FrpB 可变区缺失而在这些环境下下调 FrpB 表达是有利的。如此可确保由免疫原性组合物引发的免疫反应针对存在于大范围菌株中的抗原。在本发明的疱免疫原性组合物中, FrpB 的下调优选与 PorA 和 OpA、PorA 和 OpC、OpA 和 OpC、PorA 和 OpA 和 OpC 的下调组合。

[0172] 在本发明可选择性的实施方案中,外膜小泡中的 FrpB 被下调,所述外膜小泡是从不是在铁有限条件下生长的奈瑟氏球菌菌株制备的。

#### [0173] LPS 解毒

[0174] 本发明免疫原性组合物中的疱可经由 W001/09350 公开的 LPS 解毒方法解毒。本发明 LPS 解毒的具体方法包括使 W001/09350 中公开的 htrB 和/或 msbB 酶被下调/缺失。奈瑟氏球菌的 msbB 和 htrB 基因还分别被称作 lpxL1 和 lpxL2(W000/26384)且这些基因的缺失突变是通过失去一个仲酰基链的 msbB<sup>-</sup>突变 LOS 和失去两个仲酰基链的 htrB<sup>-</sup>突变 LOS 而从表型方面表征的。WO 93/14155 和 WO 95/03327 描述了可用于本发明组合物中的多粘菌素 B 的无毒肽功能性等价物。

[0175] 这种方法优选与疱提取方法组合,疱提取方法包括使用低水平的 DOC、优选

0-0.3% DOC、更优选 0.05% -0.2% DOC、最优选约或准确的 0.1% DOC。

[0176] LPS 解毒的其它方法包括如上所述向疱制品中加入多粘菌素 B 的无毒肽功能性等价物（优选 SAEP 2）。

[0177] 交叉反应性多糖

[0178] 将细菌外膜疱从有荚膜的革兰氏阴性菌中分离出来常常导致荚膜多糖的共-纯化。在某些情况下,这种“污染”材料可显示有用,这是因为多糖可提高由其它疱组分产生的免疫反应。然而在其它情况下,污染性多糖材料在细菌疱制品中的存在可证明对疱在疫苗中的应用有害。例如,已经显示出至少在脑膜炎奈瑟氏球菌的情况下,血清组 B 荚膜多糖不会带来保护免疫性且很容易在人类中诱导不利的自身免疫反应。因此,可将本发明的外膜小泡从细菌菌株中分离出来用于疱的生产,其已被改造成没有荚膜多糖。这样一来疱即适用于人类。这种疱制品的特别优选的例子是来源于没有荚膜多糖的脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 的疱制品。

[0179] 这可通过使用修饰的疱产生菌株实现,其中荚膜生物合成和/或输出所需的基因已损坏。编码荚膜多糖生物合成或输出的基因的灭活可通过（优选使用上述同源重组技术）使控制区、编码区或两者突变（点突变、缺失或插入）,或通过降低这种基因酶功能的任何其它方式而实现。此外,荚膜生物合成基因的灭活还可通过反义过量表达或转座子诱变而实现。优选方法是使多糖生物合成及输出所需的脑膜炎奈瑟氏球菌 Lps 基因的一部分或全部缺失。就该目的而言,置换质粒 pMF121（在 Frosh 等人,1990, Mol. Microbiol. 4 : 1215-1218 中所述）可用于传递使 cpsCAD(+galE) 基因聚簇缺失的突变。

[0180] 已经对抗 L3 或 L2LPS 所产生抗体的安全性产生了疑问,这是由于与存在于人鞘糖脂中的乳-N-neotetraose 低聚糖基团 (Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc  $\beta$  1-) 相似的结构的存在。尽管已经有很多人安全接种了脱氧胆酸盐提取的含有残余量 L3 LPS 的小泡疫苗 (G. Bjune 等人, Lancet (1991), 338, 1093-1096 ;GVG. Sierra 等人, NIPH ann (1991), 14, 195-210), LOS 糖末端部分的缺失可有利地防止与存在于人组织表面的结构的任何交叉反应。在优选实施方案中, lgtB 基因的灭活产生中间体 LPS 结构,其中缺少末端半乳糖残基和唾液酸（突变留下 L2 和 L3LOS 中的 4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc  $\beta$  1- 结构）。这种中间体可在 L3 和 L2 LPS 菌株中获得。LPS 的可选择性且不太优选的（短的）版本可通过关闭 lgtE 基因获得。LPS 的其它选择性且不太优选的版本可通过关闭 lgtA 基因获得。如果选择这种 lgtA<sup>-</sup> 突变,优选还可关闭 lgtC 表达从而防止形成非免疫原性 L1 免疫型。

[0181] LgtB<sup>-</sup> 突变体是最优选的,这是因为本发明人已经发现这是用于解决安全性问题同时仍然保留可诱导杀菌抗体反应的 LPS 保护性低聚糖表位的最佳截短。

[0182] 因此,还包含 L2 或 L3 制品（纯化的或在分离的疱中）的本发明免疫原性组合物或脑膜炎球菌疱制品通常有利地来源于奈瑟氏球菌菌株（优选脑膜炎球菌）,它们已被基因工程改造成永久性下调来源于 lgtB、lgtA 或 lgtE 基因的功能性基因产物的表达,优选通过切断基因,最优选通过使基因启动子和/或开放阅读框的全部或部分缺失。

[0183] 当本发明上述免疫原性组合物来源于脑膜炎球菌 B 菌株时,还优选除去荚膜多糖（其还包含人-样糖结构）。虽然可将很多基因切断以实现此目的,但本发明人有利地显示优选已将疱产生菌株进行基因工程改造以永久下调 siaD 基因的功能性基因产物的表达（即,下调  $\alpha$ -2-8 聚唾液酸转移酶的活性）,优选通过切断基因,最优选通过使基因启动子

和 / 或开放阅读框的全部或一部分缺失。这种灭活在 WO 01/09350 中描述。siaD( 也被称作 synD) 突变是多种突变中最有利的,可除去荚膜多糖的人-相似表位,这是因为突变中仅有一种对 LOS 保护性表位的生物合成没有作用,因此在最终使用 LOS 作为保护性抗原的方法中是有利的,且对细菌生长的作用最小。因此本发明的优选方面是上述疱免疫原性制品,其来源于 lgtE<sup>-</sup>siaD<sup>-</sup>、lgtA<sup>-</sup>siaD<sup>-</sup> 或优选 lgtB<sup>-</sup>siaD<sup>-</sup> 脑膜炎球菌 B 突变株。所述菌株本身是本发明的另一方面。

[0184] 虽然由于上述原因 siaD<sup>-</sup> 突变是优选的,但也可使用切断脑膜炎球菌 B 荚膜多糖合成的其它突变。因此,可将疱产生菌株进行基因工程改造以永久下调来源于下列一种或多种基因的功能性基因产物的表达:ctrA、ctrB、ctrC、ctrD、synA( 相当于 synX 和 siaA)、synB( 相当于 siaB) 或 synC( 相当于 siaC) 基因,优选通过切断基因,最优选通过使基因启动子和 / 或开放阅读框的全部或一部分缺失。lgtE<sup>-</sup> 突变可与这些突变的一种或多种组合。优选 lgtB<sup>-</sup> 突变与这些突变的一种或多种组合。因此本发明另一方面是上述疱免疫原性制品,其来源于脑膜炎球菌 B 的这种组合突变株。所述菌株本身是本发明的另一方面。

[0185] 含有各种 lgt 基因,包括 lgtB 和 lgtE 的奈瑟氏球菌基因座及其序列是本领域已知的(见 M. P. Jennings 等人, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 和其中引证的参考文献,以及 J. Exp. Med. 180 :2181-2190[1994])。

[0186] 当把全长(未-截短的)LOS 用于终产品中时,希望 LOS 没有被唾液酸化(因为这种 LOS 可产生抗绝大多数危险的、侵入性脑膜炎球菌 B 菌株的免疫反应,所述菌株也未被唾液酸化)。在这种情况下,使用具有缺失 synA( 相当于 synX 和 siaA)、synB( 相当于 siaB) 或 synC( 相当于 siaC) 基因的荚膜阴性菌株是有利的,这是因为这种突变也可导致 menB LOS 不能被唾液酸化。

[0187] 在疱制品中,特别是在用低浓度 DOC 提取的制品中,可使用 LPS 作为本发明免疫原性组合物中的抗原。然而,可有利地将 lgtE、lgtA( 特别是与 lgtC 组合)、或优选 lgtB 基因 / 基因产物的酶功能下调 / 缺失 / 灭活,以便除去人样乳-N-neotetraose 结构。包含用于生物合成 LPS 低聚糖结构的 lgt 基因的奈瑟氏球菌基因座(及其序列)是本领域已知的(Jennings 等人, Microbiology 1999 145 :3013-3021 和其中引证的参考文献,以及 J. Exp. Med. 180 :2181-2190[1994])。优选 lgtB( 或功能性基因产物)被下调 / 缺失,这是因为它可留下完整的 LPS 保护性表位。

[0188] 在本发明的脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 疱制品中,siaD 和 lgtB 的下调 / 缺失是优选的,(虽然,在脑膜炎球菌 B 疱产生菌株中也可使用 lgtB<sup>-</sup> 与 ctrA<sup>-</sup>、ctrB<sup>-</sup>、ctrC<sup>-</sup>、ctrD<sup>-</sup>、synA<sup>-</sup>( 相当于 synX<sup>-</sup> 和 siaA<sup>-</sup>)、synB<sup>-</sup>( 相当于 siaB<sup>-</sup>) 或 synC<sup>-</sup>( 相当于 siaC<sup>-</sup>) 中任何一个的组合),得到具有最佳安全性和 LPS 保护性表位保留的疱制品。

[0189] 本发明的另一方面是上述疱免疫原性制品,其来源于脑膜炎球菌 B 的这种组合突变株。所述菌株本身是本发明的另一方面。

[0190] 本发明的免疫原性组合物可包括至少 1、2、3、4 或 5 种不同的外膜小泡制品。当包括两种或多种 OMV 制品时,本发明至少一个抗原在各 OMV 中被上调。这种 OMV 制品可来源于相同种类和血清组的奈瑟氏球菌菌株或优选来源于不同种类、血清组、血清型、亚血清型或免疫型的奈瑟氏球菌菌株。例如,免疫原性组合物可包括一种或多种外膜小泡制品,其含有免疫型 L2 的 LPS 和含有免疫型 L3 的 LPS 的一种或多种外膜小泡制品。L2 或 L3 OMV 制

品优选来源于稳定的菌株,其在 LPS 低聚糖合成基因座具有最小的相变异性。

**[0191] 与亚单位组合物组合的外膜小泡**

**[0192]** 本发明的免疫原性组合物还可包括亚单位组合物和外膜小泡。有若干抗原由于它们的溶解性而特别适于包括在亚单位组合物中。这种蛋白的例子包括:FhaB、NspA、Hsf 的过客结构域、Hap 的过客结构域、AspA 的过客结构域、AspA、OMP85、FrpA、FrpC、TbpB、LbpB、PilQ。外膜小泡制品具有选自下列的至少一种不同抗原,其在外膜小泡中已被重组上调:NspA、Hsf、Hap、OMP85、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、TbpB、LbpB、NadA、TspA、TspB、PilC、PilQ、TdfH、PorB、HpuB、P2086、NM-ADPRT、MafA、MafB 和 PldA;且任选包括 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

**[0193] 本发明具体的免疫原性组合物**

**[0194]** 在下列具体组合中,当抗原组合存在于泡中时,这种抗原组合应如上所述被上调。

**[0195]** 本发明特别优选的实施方案包括自体转运蛋白和铁获得蛋白,更优选 Hsf 和 TbpA(高)和/或 TbpA(低)。这种免疫原性组合物可优选进一步包括 OMP 85、FrpA、FrpC、LbpA、LbpB、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB 0293、TspA、NadA、TspB、PilQ、FhaC、NspA、PldA、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、FhaB、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、TdfH、PorB、HpuB、P2086、NM-ADPRT、VapD 和 Hap 中的至少一种。所有上述免疫原性组合物还可包括 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

**[0196]** 本发明的另一优选实施方案包括 Hsf 和选自下列的至少一种其它抗原:FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、TbpA、P2086、HpuA、HpuB、Lipo28、Sibp、Hap、AspA、IgA 蛋白酶、OMP85、NspA、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、FhaC、NadA、PldA、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 FhaB。所有上述免疫原性组合物还可包括 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 Hsf 和 OMP85(任选与 Hap、FrpA 或 LbpB 的一个或多个);Hsf 和 Hap(任选与 FrpA、LbpB 或 OMP85 的一个或多个);Hsf 和 FrpA(任选与 Hap、LbpB 或 OMP85 的一个或多个);Hsf 和 LbpB(任选与 Hap、OMP85 或 FrpA 的一个或多个)。由于 Hsf 既是粘附素又是自体转运蛋白,因此特别优选的组合包括 Hsf、OMP85、TbpA、LPS 免疫型 L2 和/或 L3,优选在多价泡制品中,其具有所提供的所有 5 组抗原的成员。优选 TbpA(低)和 TbpA(高)均存在。

**[0197]** 本发明的另一免疫原性组合物包括 FhaB 和选自下列的至少一种其它抗原:FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、HpuA、HpuB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、TdfH、PorB、PldA、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、NadA、PldA、TbpA、Hsf、TspA 和 TspB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 FhaB 和 Hsf(任选与 OMP85、LbpB、Hap 或 FrpA 的一个或多个);FhaB 和 OMP85(任选与 LbpB、Hap 或 FrpA 的一个或多个);FhaB 和 LbpB(任选与 Hap 或 FrpA 的一个或多个);FhaB 和 Hap(任选与 FrpA)。优选组合包括 FhaB、LbpB、Hsf(作为 OMP)和 FrpA,其具有所提供的所有 5 组抗原的成员。

**[0198]** 本发明的另一免疫原性组合物包括 NspA 和选自下列的至少一种其它抗原:FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、TbpA、HpuA、HpuB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、Hap、OMP85、PilQ、AspA、IgA 蛋白酶、NadA、PldA、Hsf、Hap、TspA、TspB、TdfH、PorB、和 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 NspA 和 Hsf(任选与 OMP85、

Hap、LbpA 或 TbpA 的一个或多个) ;NspA 和 OMP85( 任选与 Hap、LbpA 或 TbpA 的一个或多个) ;NspA 和 Hap( 任选与 LbpA 或 TbpA 的一个或多个) ;NspA 和 LbpA( 任选与 TbpA)。特别优选的组合包括 NspA、Hsf、TbpA、LPS 免疫型 L2 和 / 或 L3, 优选在多价疫苗制品中, 其具有所提供的全部 5 组抗原的成员。优选 TbpA( 低) 和 TbpA( 高) 均存在。

[0199] 本发明没有要求保护具有 WO 00/25811 中所公开的抗原的个别组合的免疫原性组合物。优选, 如果它们的抗原内含物仅由转铁蛋白结合蛋白和 NspA 组成( 或在疫苗中, 上调的或富集的抗原内含物仅由转铁蛋白结合蛋白和 NspA 组成), 则这类免疫原性组合物或疫苗不包括在本发明内, 然而可包括由 NspA 以及 TbpA( 高) 和 TbpA( 低) 组成或包括 NspA 以及 TbpA( 高) 和 TbpA( 低) 的特定抗原( 或上调的抗原) 组合。任选地, 没有要求保护包括转铁蛋白结合蛋白和 NspA 的组合( 亚单位) 或上调( 疫苗) 的组合物或疫苗。

[0200] 本发明另一免疫原性组合物包括 NadA 和选自下列的至少一种其它抗原: FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、TbpA、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、Hap、OMP85、NspA、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、HpuA、HpuB、AspA、IgA 蛋白酶、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

[0201] 本发明另一免疫原性组合物包括 TbpA( 低) 和选自下列的至少一种抗原: FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、IgA 蛋白酶、NspA、HpuA、HpuB、Hap、OMP85、NspA( 当与 TbpA( 高) 组合时)、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、MafA、MafB、AspA、NadA、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 haB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 TbpA( 低) 和 Hsf 和 LbpA; TbpA( 低) 和 OMP85( 任选与 LbpA 和 Hap 之一或两者); TbpA( 低) 和 LbpA 和 Hap。

[0202] 本发明另一免疫原性组合物包括 TbpA( 高) 和选自下列的至少一种其它抗原: FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、Hap、OMP85、NspA( 当与 TbpA( 低) 组合)、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB 1119、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、MafA、MafB、AspA、IgA 蛋白酶、PldA、FhaB、NadA、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 FhaB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 TbpA( 高) 和 Hsf 和 LbpA; TbpA( 高) 和 OMP85( 任选与 LbpA 和 Hap 之一或两者); TbpA( 高) 和 LbpA 和 Hap。

[0203] 本发明另一免疫原性组合物包括 LbpA 和选自下列的至少一个其它抗原: FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、TbpB、Hap、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB 1119、NadA、PldA、TbpA、Hsf、TspA、TspB、MafA、MafB、IgA 蛋白酶、AspA、FhaB、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、TdfH、PorB 和 FhaB 以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 LbpA 和 Hsf( 任选与 Hap)。

[0204] 本发明另一免疫原性组合物包括 LbpB 和选自下列的至少一个其它抗原: FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpA、TbpB、Hap、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB 1119、NadA、PldA、TbpA、Hsf、TspA、TspB、MafA、MafB、IgA 蛋白酶、AspA、FhaB、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、TdfH、PorB 和 FhaB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 LbpB 和 Hsf( 任选与 OMP85、Hap 或 FrpA 的一个或多个); LbpB 和 OMP85( 任选与 Hap 或 FrpA 的一个或多个); LbpB 和 Hap( 任选与 FrpA)。

[0205] 本发明另一免疫原性组合物包括 OMP85 和选自下列的至少一个其它抗原: FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、TbpA、HpuA、HpuB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、

NMB0293、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、Hsf、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、MafA、MafB、NadA、PldA、Hsf、TspA、TspB、PilQ、TdfH、PorB 和 FhaB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。优选组合包括 OMP85 和 Hsf( 任选与 LbpA 或 NspA 的一个或多个) ; OMP85 和 LbpA( 任选与 Hap 和 NspA 的一个或多个) ; OMP85 和 Hap( 任选与 NspA) 。

[0206] 本发明另一免疫原性组合物包括 Hap 和选自下列的至少一个其它抗原 :FrpA、FrpC、NM-ADPRT、VapD、LbpB、LbpA、TbpB、TbpA、HpuA、HpuB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、NspA、IgA 蛋白酶、AspA、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、MafA、MafB、NadA、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 FhaB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

[0207] 本发明另一免疫原性组合物包括 FrpA 和选自下列的至少一个其它抗原 :LbpB、LbpA、TbpA、TbpB、HpuA、HpuB、P2086、Lipo 28、Sibp、NMB0964、NMB0293、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、TspA、TspB、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、NadA、FhaB、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、MafA、MafB、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 FhaB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

[0208] 本发明另一免疫原性组合物包括 FrpC 和选自下列的至少一个其它抗原 :LbpB、LbpA、TbpA、TbpB、HpuA、HpuB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、TspA、TspB、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、NadA、FhaB、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、MafA、MafB、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 FhaB、以及 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者。

[0209] 本发明另一免疫原性组合物包括 LPS 免疫型 L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者以及选自下列的至少一个其它抗原 :LbpB、LbpA、TbpA、TbpB、HpuA、HpuB、P2086、Lipo28、Sibp、NMB0964、NMB0293、PilQ、HimD、HisD、GNA1870、OspA、HlpA、TspA、TspB、Hap、IgA 蛋白酶、AspA、NadA、FhaB、OMP85、NspA、PilC、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119、MafA、MafB、PldA、Hsf、TspA、TspB、TdfH、PorB 和 FhaB。

[0210] 本发明免疫原性组合物中的优选抗原组合包括如下组合, 该组合包含铁获得蛋白、自体转运蛋白和 FhaB ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 PilC ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 NadA ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 FrpA ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 PilQ ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 TspA ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 TspB ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 NspA ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 FrpC ; 更优选包含铁获得蛋白、自体转运蛋白和 Hap ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 FrpA/C ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 LbpB ; 铁获得蛋白、自体转运蛋白和 OMP85 (D15) 。最优选, 掺入 OMP85 (D15) 作为外膜小泡制品的一部分。

[0211] 包含 LPS 的本发明免疫原性组合物优选具有与 T- 辅助细胞表位来源, 优选蛋白缀合的 LPS, 且就 OMV 中的 LPS 而言, 优选外膜蛋白。特别优选的实施方案包括已经与 OMP 在外膜小泡制品中 ( 如上所述 ) 原位 ( 优选胞内 ) 缀合的 LPS。

[0212] 本发明的免疫原性组合物可包括来源于脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 A、B、C、Y、W-135 或淋病奈瑟氏球菌的抗原 ( 蛋白、LPS 和多糖 ) 。

[0213] 优选本发明的免疫原性组合物或疫苗不由 WO 00/71725 第 3 页第 18 行 - 第 52 页第 2 行表中所列的 SEQ ID 的特定组合和 / 或 WO 00/71725 中实施例 1-11 描述的任何单个

组合组成和 / 或含有这些组合。

[0214] 优选, 本发明不要求保护 WO 01/52885 中公开的个别组合。

[0215] 其它组合

[0216] 本发明的免疫原性组合物还可包括细菌荚膜多糖或低聚糖。荚膜多糖或低聚糖可来源于下列一种或多种: 脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 A、C、Y、和 / 或 W-135、流感嗜血杆菌 b (*Haemophilus influenzae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、A 组链球菌、B 组链球菌、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)。

[0217] 本发明另一方面是含有本发明抗原性组合物和其它抗原的疫苗组合物, 其可有利地用于抗某些疾病状况, 包括与病毒或革兰氏阳性菌有关的那些。

[0218] 在其中一个优选组合中, 本发明的抗原性组合物是用下列脑膜炎球菌荚膜多糖或低聚糖的 1、2、3 或优选全部 4 种配制的, 其可以是简单的或与蛋白载体: A、C、Y 或 W-135 缀合的。优选本发明的免疫原性组合物是用 A 和 C; 或 C; 或 C 和 Y 配制的。这种含有源自脑膜炎奈瑟氏球菌, 优选血清组 B 的蛋白的疫苗可被有利地用作通用的脑膜炎球菌疫苗。

[0219] 在另一优选实施方案中, 本发明的抗原性组合物, 优选简单或缀合的脑膜炎球菌荚膜多糖或低聚糖 A、C、Y 或 W-135 的 1、2、3 或全部 4 种配制 (如上所述) 的, 是用缀合的流感嗜血杆菌 b 荚膜多糖或低聚糖, 和 / 或一种或多种简单或缀合的肺炎球菌荚膜多糖或低聚糖配制的。任选地, 所述疫苗还可包括一种或多种蛋白抗原, 它们可保护宿主免受肺炎链球菌感染。这种疫苗可被有利地用作通用脑膜炎疫苗。

[0220] 在又一优选实施方案中, 本发明的免疫原性组合物是用来源于脑膜炎奈瑟氏球菌、流感嗜血杆菌 b、肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌中一种或多种的荚膜多糖或低聚糖配制的。肺炎球菌的荚膜多糖抗原优选选自血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F (最优选选自 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F)。进一步优选的实施方案包括流感嗜血杆菌的 PRP 荚膜多糖。进一步优选实施方案包括金黄色葡萄球菌的 5 型、8 型或 336 荚膜多糖。进一步优选实施方案包括表皮葡萄球菌的 I 型、II 型或 III 型荚膜多糖。进一步优选实施方案包括 B 组链球菌的 Ia 型、Ic 型、II 型或 III 型荚膜多糖。进一步优选实施方案包括 A 组链球菌的荚膜多糖, 优选还包括至少一种 M 蛋白且更优选多种类型的 M 蛋白。

[0221] 本发明这种荚膜多糖可与载体蛋白如破伤风类毒素、破伤风类毒素片段 C、白喉类毒素、CRM197、肺炎球菌溶血素、蛋白 D (US6342224) 非-缀合或缀合。所述多糖缀合物可通过任何已知的偶联技术制备。例如, 可经由硫醚键使多糖偶联。这种缀合方法依靠用 1- 氰基 -4- 二甲氨基四氟硼酸吡啶鎓 (CDAP) 活化多糖而形成氰酸酯。活化多糖可因此与载体蛋白上的氨基直接偶联或经由间隔基团偶联。优选, 使用包括形成硫醚键的杂络合化学过程使氰酸酯与己二胺偶联, 使氨基-衍生的多糖与载体蛋白偶联。这种缀合物在 PCT 公开申请 W093/15760 Uniformed Services University 中描述。

[0222] 缀合物还可通过如 US 4365170 (Jennings) 和 US4673574 (Anderson) 中描述的直接还原胺化方法制备。其它方法在 EP-0-161-188、EP-208375 和 EP-0-477508 中描述。其它方法包括通过碳二亚胺缩合使己二酸酐肼 (ADH) 衍生的溴化氰活化的多糖与蛋白载体偶联 (Chu C. 等人, *Infect. Immunity*, 1983 245-256)。当包括低聚糖时, 优选使它们缀合

在一起。

[0223] 优选的肺炎球菌蛋白抗原是在肺炎球菌外表面上暴露的那些肺炎球菌蛋白（在肺炎球菌至少部分生活周期内能够由宿主免疫系统识别），或是由肺炎球菌分泌或释放的蛋白。最优选，所述蛋白是毒素、粘附素、2-组分信号转导蛋白、或肺炎链球菌的脂蛋白，或其片段。特别优选的蛋白包括，但不限于：肺炎球菌溶血素（优选通过化学处理或突变解毒）[Mitchell 等人, *Nucleic Acids Res.* 1990 年 7 月 11 日：18(13)：4010 “Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.”, Mitchell 等人, *Biochim Biophys Acta* 1989 年 1 月 23 日；1007(1)：67-72, “Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*：rapid purification and biological properties.”, W096/05859 (A. Cyanamid)、W090/06951 (Paton 等人)、W099/03884 (NAVA)]；PspA 及其跨膜缺失变体 (US 5804193-Briles 等人)；PspC 及其跨膜缺失变体 (W0 97/09994-Briles 等人)；PsaA 及其跨膜缺失变体 (Berry 和 Paton, *Infect Immun* 1996 年 12 月；64(12)：5255-62, “Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*”)；肺炎球菌胆碱结合蛋白及其跨膜缺失变体；CbpA 及其跨膜缺失变体 (W0 97/41151、W0 99/51266)；甘油醛-3-磷酸-脱氢酶 (*Infect. Immun.* 1996 64：3544)；HSP70 (W096/40928)；PcpA (Sanchez-Beato 等人, *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164：207-14)；M 样蛋白 (EP 0837130) 和粘附素 18627 (EP 0834568)。进一步优选的肺炎球菌蛋白抗原是 W0 98/18931 中公开的那些，特别是 W0 98/18930 和 PCT/US 99/30390 中选择的那些。

[0224] 本发明的免疫原性组合物/疫苗还可任选包括由其它革兰氏阴性菌，例如粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*) 或流感嗜血杆菌制备的外膜小泡制品。

[0225] 粘膜炎莫拉氏菌胞制品

[0226] 本发明的免疫原性组合物还可包括来源于粘膜炎莫拉氏菌的 OMV 制品。如 W0 01/09350 所述，基因工程改造的 OMV 制品可来源于粘膜炎莫拉氏菌。优选将下列基因（编码保护性抗原）的一种或多种上调：OMP106 (W097/41731 和 W096/34960)、HasR (PCT/EP99/03824)、PilQ (PCT/EP99/03823)、OMP85 (PCT/EP00/01468)、lipo06 (GB9917977.2)、lipo10 (GB9918208.1)、lipo11 (GB 9918302.2)、lipo18 (GB 9918038.2)、P6 (PCT/EP99/03038)、ompCD、CopB (Helminen ME 等人, (1993) *Infect. Immun.* 61：2003-2010)、D15 (PCT/EP99/03822)、Omp1A1 (PCT/EP99/06781)、Hly3 (PCT/EP99/03257)、LbpA 和 LbpB (W0 98/55606)、TbpA 和 TbpB (W0 97/13785 和 W0 97/32980)、OmpE、UspA1 和 UspA2 (W093/03761)、和 Omp21。作为可被异源引入到其他革兰氏阴性菌中的基因，它们也是优选的。

[0227] 优选将下列基因的一个或多个下调：CopB、OMP106、OmpB1、TbpA、TbpB、LbpA、和 LbpB。

[0228] 优选将下列基因的一个或多个下调：htrB、msbB 和 lpxK。

[0229] 优选将下列基因的一个或多个上调：pmrA、pmrB、pmrE、和 pmrF。

[0230] 流感嗜血杆菌胞制品

[0231] 本发明的免疫原性组合物还可包括来源于流感嗜血杆菌的 OMV 制品。如

W001/09350 所述, 基因工程改造的 OMV 制品可来源于流感嗜血杆菌。优选将下列基因(编码保护性抗原)的一个或多个上调: D15(W094/12641)、P6(EP 281673)、TbpA(W096/40929、W095/13370)、TbpB(W096/40929; W095/13370)、P2、P5(WO 94/26304)、OMP26(W097/01638)、HMW1、HMW2、HMW3、HMW4、Hia、Hsf、Hap、Hin47、和 Hif(该操纵子中的所有基因均应被上调以将菌毛蛋白上调)。作为可被异源引入到其他革兰氏阴性菌中的基因, 它们也是优选的。

[0232] 优选将下列基因的一个或多个下调: P2、P5、Hif、IgA1-蛋白酶、HgpA、HgpB、HMW1、HMW2、Hxu、htrB、msbB 和 lpxK。

[0233] 优选将下列基因的一个或多个上调: pmrA、pmrB、pmrE、和 pmrF。

[0234] 本发明的免疫原性组合物/疫苗还可任选包括抗白喉、破伤风和百日咳鲍特氏菌(*Bordetella pertussis*) 感染中一种或多种的抗原。百日咳鲍特氏菌组分可被杀死, 无论是全细胞百日咳鲍特氏菌(Pw) 还是无细胞的百日咳鲍特氏菌(Pa), 其包含来源于 PT、FHA 和 69kDa pertactin 的至少一种抗原(优选 2 或所有 3 种)。通常, 提供抗白喉和破伤风保护的抗原是白喉类毒素和破伤风类毒素。类毒素是化学灭活的毒素或通过引入点突变而灭活的毒素。

[0235] 免疫原性组合物/疫苗还可任选地包括一种或多种保护宿主免受非-分型(non-typeable) 流感嗜血杆菌、RSV 感染的抗原和/或一种或多种可保护宿主免受流感病毒感染的抗原。这种疫苗可有利地用作通用中耳炎疫苗。

[0236] 优选的非分型流感嗜血杆菌蛋白抗原包括丝束蛋白(US 5766608) 和含有来自丝束蛋白的肽的融合蛋白(例如, LB1 融合蛋白)(US5843464-Ohio State Research Foundation)、OMP26、P6、蛋白 D、TbpA、TbpB、Hia、Hmw1、Hmw2、Hap、和 D15。

[0237] 优选的流感病毒抗原包括完整的、活的或灭活的病毒、脱落流感病毒, 其在卵或 MDCK 细胞中生长, 或非洲绿猴肾细胞株系细胞或完整的流感病毒体(如 R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920 所述) 或其纯化或重组蛋白, 如 HA、NP、NA、或 M 蛋白、或其组合。

[0238] 优选的 RSV(呼吸道合胞病毒) 抗原包括 F 糖蛋白、G 糖蛋白、HN 蛋白、M 蛋白或其衍生物。

[0239] 本发明的免疫原性组合物可包括粘膜炎莫拉氏菌蛋白, 包括 TbpA(W097/13785; W099/52947)、TbpB(W097/13785; W099/52947; Mathers 等人, FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19; 231-236; Myers 等人 Infect Immun 1998 66; 4183-4192)、LbpA、LbpB(Du 等人, Infect Immun 1998 66; 3656-3665)、UspA1、UspA2(Aebi 等人, Infect Immun. 1997 65; 4367-4377)、OMP106(US6214981)、Ton-B 依赖性受体(WO 00/78968)、CopB(Sethi 等人, Infect. Immun. 1997 65; 3666-3671)、和 HasR 受体(W000/78968); 流感嗜血杆菌的蛋白包括 HMW(St Geme 等人, Infect Immun 1998 66; 364-368)、Hia(St Geme 等人, J. Bacteriol. 2000 182; 6005-6013)、Tbp1(W096/40929; W095/13370)、Tbp2(W096/40929; W095/13370; Gray-Owen 等人, Infect Immun 1995 63; 1201-1210)、LbpA、LbpB(Schryvers 等人, 1989, 29; 121-130)、HasR、Ton B- 依赖性受体(Fleishmann 等人, Science 1995 269; 496-512)、血红蛋白-结合蛋白、HhuA(Cope 等人, Infect Immun 2000 68; 4092-4101)、HgpA(Maciver 等人, Infect Immun 1996 64; 3703-3712)、HgbA、HgbB 和 HgbC(Jin 等人, Infect Immun 1996 64; 3134-3141)、HxuA(Cope 等人, Mol Microbiol 1994 13; 863-873)、HxC(Cope 等人, Infect Immun 2001 69; 2353-2363); 来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的蛋白, 包括 Tbp1、

Tbp2、FbpA、FbpB、BfrA、BfrB(Tettelin 等人, Science 2000287 ;1809-1815)、LbpA、LbpB 和 HmbR。

[0240] 疫苗制剂

[0241] 本发明的优选实施方案是还可含有药学上可接受赋形剂或载体的本发明免疫原性组合物的疫苗制剂。

[0242] 来源于上述任何一种修饰菌株的外膜小泡制品的制备可通过本领域技术人员熟知的任何一种方法实现。优选使用 EP 301992、US5,597,572、EP 11243 或 US 4,271,147 中公开的方法。更优选使用 WO 01/09350 中描述的方法。

[0243] 疫苗制品通常在疫苗设计中描述 (“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York)。

[0244] 本发明的疫苗制剂中可向本发明的抗原性组合物施加佐剂。适宜的佐剂包括铝盐如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝,但还可以是钙盐(特别是碳酸钙)、铁盐或锌盐,或可以是酰化酪氨酸或酰化糖,阳离子或阴离子衍生的多糖或聚磷腈的不溶性悬浮液。

[0245] 可使用的适宜 Th1 佐剂系统包括单磷酸基脂类 A,特别是 3-脱-O-酰化单磷酸基脂类 A 和单磷酸基脂类 A、优选 3-脱-O-酰化单磷酸基脂类 A(3D-MPL)与铝盐(优选磷酸铝)的组合。增强的系统包括单磷酸基脂类 A 和皂苷衍生物的组合,特别是 WO 94/00153 中公开的 QS21 与 3D-MPL 的组合,或如 WO 96/33739 中公开的反应原性较低的组合物,其中用胆固醇猝灭 QS21。WO 95/17210 中描述了特别有效的、包含 QS21 3D-MPL 和生育酚的水包油乳液的佐剂,且其是优选的制剂。

[0246] 所述疫苗可包括皂苷,更优选 QS21。它还可包括水包油乳液和生育酚。含有寡核苷酸的未甲基化的 CpG(WO 96/02555)是 TH1 反应的优选诱导剂,且适用于本发明。

[0247] 本发明的疫苗制品可用于保护或治疗易感染的哺乳动物,其中经由全身或粘膜途径给予所述疫苗。这些给药可包括经由肌内、腹膜内、皮内或皮下途径注射;或经由粘膜给予口腔/消化、呼吸、泌尿生殖道。因此本发明其中一个方面是使人类宿主免疫而抗革兰氏阴性菌感染所引起的疾病的方法,该方法包括给予所述宿主免疫保护剂量的本发明 OMV 制品。

[0248] 选择每个疫苗剂型中的抗原量,其可诱导免疫保护反应且没有一般疫苗的明显的副作用。这种量可根据所用的特定免疫原以及如何提供而变化。通常预期每个剂型包含 1-100  $\mu$ g 蛋白抗原或 OMV 制品,优选 5-50  $\mu$ g,且最一般 5-25  $\mu$ g。

[0249] 特定疫苗的最佳用量可通过标准研究确定,该标准研究包括观察受试者中的适宜免疫反应。初次接种后,受试者可接受一次或若干次适当间隔的加强免疫。

[0250] 本发明的疫苗优选是免疫保护性且无毒的,并适于儿童和青少年使用。

[0251] 给儿科使用时,它是指小于 4 岁的儿童。

[0252] 免疫保护性是指令人满意地满足上述 SBA 和/或动物保护模型和/或粘附阻断测定法。

[0253] 无毒是指通过熟知的 LAL 和热原性测定法测量,疫苗中的内毒素活性水平不大于令人满意的水平。

[0254] 本发明的多核苷酸

[0255] “多核苷酸”通常是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未修饰的

RNA 或 DNA 或修饰的 RNA 或 DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的 DNA,单链和双链区混合的 DNA,单链和双链的 RNA,单链和双链区混合的 RNA,包含单链或,更通常双链或单链与双链区混合的 DNA 和 RNA 的杂交分子。此外“多核苷酸”是指包含 RNA 或 DNA 或同时包含 RNA 与 DNA 的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰碱基的 DNA 或 RNA,和具有由于稳定性或其它原因而被修饰的主链的 DNA 或 RNA。“修饰”碱基包括,例如,三苯甲基化的碱基和特殊碱基如肌苷。已经对 DNA 和 RNA 进行了各种修饰;因此,“多核苷酸”包括一般天然存在的多核苷酸的化学、酶或代谢修饰形式,以及病毒和细胞特征性的 DNA 和 RNA 的化学形式。“多核苷酸”还包括相对较短的多核苷酸,通常被称作寡核苷酸。

[0256] 本发明另一方面涉及免疫/疫苗制剂,其包含一种或多种多核苷酸。这种技术是本领域已知的,见,例如 Wolff 等人,Science(1990)247:1465-8。

[0257] 这种疫苗包含编码与上述本发明蛋白组合相对应的多种蛋白的一种或多种多核苷酸。

[0258] 来源于这种多核苷酸的蛋白的表达将受到真核启动子的控制,该启动子能够驱动在哺乳动物细胞内表达。此外所述多核苷酸可包含编码其它抗原的序列。可驱动表达的真核启动子的例子包括来源于病毒的病毒启动子,包括腺病毒启动子、逆转录病毒启动子。可选择性地,哺乳动物启动子可用于驱动表达。

[0259] 本发明其它方面

[0260] 本发明另一方面包括用于治疗或预防奈瑟氏球菌病的方法,包括在宿主需要时,给予其保护剂量(或有效量)的本发明疫苗。脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 A、B、C、Y 或 W135 和 / 或淋病奈瑟氏球菌感染可被有利地预防或治疗。

[0261] 本发明还包括本发明疫苗在制备用于治疗或预防奈瑟氏球菌感染的药物中的用途。此外奈瑟氏球菌感染包括由脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 A、B、C、Y、W-135 和 / 或淋病奈瑟氏球菌引起的感染。

[0262] 本发明另一方面是可衍生本发明外膜小泡(如上所述,具有本发明重组上调的至少两种蛋白)的基因工程改造的奈瑟氏球菌菌株。这种奈瑟氏球菌菌株可以是脑膜炎奈瑟氏球菌或淋病奈瑟氏球菌。

[0263] 所述菌株还可被改造(如上所述)以下调其它奈瑟氏球菌蛋白的表达,包括 LgtB、LgtE、SiaD、OpC、OpA、PorA、FrpB、msbB 和 HtrB 中 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个的表达。用于下调的优选组合包括至少 LgtB 和 SiaD 的下调(优选缺失)、至少 PorA 和 OpC 的下调、至少 PorA 和 OpA 的下调以及至少 PorA、OpA 和 OpC 的下调。

[0264] 本发明另一方面是制备本发明免疫原性组合物或疫苗的方法。这些方法包括将至少两种来源于奈瑟氏球菌的分离抗原或蛋白混合在一起的步骤,其可以以来源于本发明奈瑟氏球菌菌株的疱形式存在,从而制备本发明的免疫原性组合物,另一制备本发明疫苗的方法包括将本发明的免疫原性组合物与药学上可接受的载体组合的步骤。

[0265] 也包括在本发明中的制备本发明免疫原性组合物的方法包括分离奈瑟氏球菌培养物中的外膜小泡的步骤。这种方法可包括将至少两种外膜小泡制品混合的又一步骤,优选其中至少一种外膜小泡制品包含免疫型 L2 的 LPS 且至少一种外膜小泡制品包含免疫型 L3 的 LPS。本发明还包括这种方法,其中所述外膜小泡制品是通过用 0-0.5% 浓度的 DOC 提取而分离的。0.3%-0.5% 浓度的 DOC 用于将 LPS 含量减到最小。在 OMV 制品中,其中 LPS

作为抗原是保守的,0-0.3%、优选0.05%-0.2%、最优选约0.1%浓度的DOC用于提取。

**[0266] 血影细胞或被杀死的全细胞疫苗**

[0267] 本发明人预期对胞制品和疫苗的上述改进可很容易地扩展至血影细胞或被杀死的全细胞制品和疫苗(具有相同的优点)。可从其制备胞制品的本发明修饰的革兰氏阴性菌菌株还可用于制备血影细胞和被杀死的全细胞制品。从革兰氏阴性菌菌株制备血影制品(具有完整外膜的空细胞)是本领域熟知的(见例如WO 92/01791)。杀死全细胞以制备用于疫苗中的灭活细胞制品的方法也是熟知的。术语‘胞[或OMV]制品’和‘胞[或OMV]疫苗’以及本文所描述的方法因此,因本发明目的起见,可分别应用于本发明的术语‘血影制品’和‘血影疫苗’和‘被杀死的全细胞制品’和‘被杀死的全细胞疫苗’。

**[0268] 抗体和被动免疫**

[0269] 本发明另一方面是制备用于预防或治疗奈瑟氏球菌感染的免疫球蛋白的方法,包括用本发明疫苗使受体免疫并分离受体中免疫球蛋白的步骤。通过该方法制备的免疫球蛋白是本方面的另一方面。包含本发明免疫球蛋白以及药学上可接受载体的药物组合物是本发明的另一方面,其可制备用于治疗或预防奈瑟氏球菌病的药物。用于治疗或预防奈瑟氏球菌感染的方法是本发明的另一方面,该方法包括给予患者有效量的本发明的药物制品。

[0270] 用于多克隆抗体产生的接种物通常是通过将抗原性组合物分散在适于人类使用的生理学耐受的稀释剂,如生理盐水或其它佐剂中,从而形成含水组合物而制备的。将免疫刺激量的接种物给予哺乳动物,然后使接种的哺乳动物维持一段时间,这段时间足以使抗原性组合物诱导保护性抗体。

[0271] 可通过熟知的技术,如亲和层析分离抗体至所需的程度(Harlow和Lane Antibodies;a laboratory manual 1988)。

[0272] 抗体可包括来源于通常使用的各种动物,例如,山羊、灵长类动物、驴、猪、马、豚鼠、大鼠或人的抗血清制品。给所述动物抽血并回收血清。

[0273] 按照本发明生产的免疫球蛋白可包括完整的抗体、抗体片段或亚片段。抗体可以是任何种类,例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的完整免疫球蛋白,嵌合抗体或对本发明两种或多种抗原具有双重特异性的杂交抗体。它们还可以是片段,例如F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv等,包括杂交片段。免疫球蛋白还包括天然的、合成的或基因工程改造的蛋白,它们可通过与特异性抗原结合形成复合体而像抗体一样发挥作用。

[0274] 可将本发明的疫苗给予受体,然后受体作为免疫球蛋白的来源发挥作用,该免疫球蛋白是在应答特异性疫苗的攻击时产生的。然后经由常规的血浆分离方法从如此治疗过的受试者所捐献的血浆中获得超免疫球蛋白。将所述超免疫球蛋白给予另一受试者,从而产生抗或治疗奈瑟氏球菌感染的抗性。本发明的超免疫球蛋白特别用于治疗或预防儿童、无免疫应答个体或在需要治疗而对个体在应答接种免疫时没时间产生抗体的奈瑟氏球菌病。本发明另一方面是一种药物组合物,它包含对本发明免疫原性组合物至少两种组分具有反应性的两种或多种单克隆抗体(或其片段;优选人或人源化的),该药物组合物可用于治疗或预防革兰氏阴性菌,优选奈瑟氏球菌,更优选脑膜炎奈瑟氏球菌或淋病奈瑟氏球菌,最优选脑膜炎奈瑟氏球菌血清组B所引起的感染。

[0275] 这种药物组合物包括单克隆抗体,它们可以是任何种类,例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的完整免疫球蛋白,嵌合抗体或对本发明两种或多种抗原具有特异性的杂交抗体。

它们还可以是片段,例如 F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv 等,包括杂交片段。

[0276] 制备单克隆抗体的方法是本领域熟知的,且包括脾细胞与骨髓瘤细胞的融合体 (Kohler 和 Milstein 1975 Nature 256 ;495 ;Antibodies-a laboratory manual Harlow and Lane 1988)。可选择性地,单克隆 Fv 片段可通过筛选适宜的噬菌体展示库而获得 (Vaughan TJ 等人,1998 Nature Biotechnology 16 ;535)。利用已知方法,单克隆抗体可以是人源化的或部分人源化的。

[0277] 本专利说明书中引证的所有参考文献或专利申请均引入此处作为参考。

[0278] 本发明人指出此处每个例子中的术语“包括 (comprising)”、“包括 (comprise)”和“包括 (comprises)”可分别任选用“由的组成 (consisting of)”、“由的组成 (consist of)”和“由的组成 (consists of)”替代。

[0279] 本发明的工业应用方法

[0280] 除非另有详细描述,下面的实施例是使用本领域那些技术人员熟知且常规的标准技术进行的。实施例仅是举例说明,而不是对本发明的限制。

[0281] 实施例 1 :构建用于外膜小泡制品中的脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 的方法

[0282] W001/09350 提供用于制备外膜小泡并处理衍生外膜小泡的细菌菌株的详细方法。当外膜小泡保留有脂蛋白如 TbpB 或脂多糖时,优选使用低水平或不使用脱氧胆酸盐的分离方法。

[0283] 实施例 2 :Hsf 蛋白抗原在缺少功能性 cps 基因但表达 PorA 的重组脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株中的上调

[0284] 如 W001/09350 实施例中所述,在某些国家,porA 在外膜小泡中的存在可能是有利的,且可增强重组改良泡的疫苗功效。在下列实施例中,我们使用修饰的 pCMK(+) 载体上调 Hsf 蛋白抗原在缺少功能性 cps 基因但表达 PorA 的菌株中的表达。原始的 pCMK(+) 载体包括在表达 lacI<sup>q</sup> 的大肠杆菌宿主中被抑制,但在脑膜炎奈瑟氏球菌中是转录活性的嵌合 porA/lacO 启动子。在修饰的 pCMK(+) 中,天然的 porA 启动子用于驱动 hsf 基因的转录。编码 Hsf 的基因是使用下表中提供的 HSF01-NdeI 和 HSF 02-NheI 寡核苷酸引物进行 PCR 扩增的。由于 HSF01-NdeI 引物的序列,所表达 Hsf 蛋白的 5' 末端包括两个甲硫氨酸残基。PCR 扩增所用的条件是由供应商描述的那些 (HiFi DNA 聚合酶,Boehringer Mannheim, GmbH)。热循环如下:25 次 (94℃ 1 分钟,48℃ 1 分钟,72℃ 3 分钟) 和 1 次 (72℃ 10 分钟,4℃ 直到回收)。随后在 pCMK(+) 送递载体相应限制位点中克隆相应的扩增子。在该重组质粒中,即所设计的 pCMK(+)-Hsf 中,我们通过重组 PCR 策略使存在于嵌合 porA/lacO 启动子中的 lacO 缺失。pCMK(+)-Hsf 质粒被用作模板以使下列 2 个单独的 DNA 片段 PCR 扩增:

[0285] - 片段 1 包括 porA 5' 诱重组区,卡那霉素抗性基因和 porA 启动子。所用的寡核苷酸引物 RP1 (SacII) 和 RP2 在下表中提供。RP1 引物与紧在 lac 操纵子上游的序列同源。

[0286] - 片段 2 包括来源于 porA 基因的 Shine-Dalgarno 序列、hsf 基因和 porA3' 重组区。所用的寡核苷酸引物 RP3 和 RP4 (ApaI) 在下表中提供。RP3 引物与紧在 lac 操纵子下游的序列同源。片段 1 的 3' 末端和片段 2 的 5' 末端具有 48 个碱基重叠。将各 500ng PCR(1 和 2) 用于使用引物 RP1 和 RP4 进行的终 PCR 反应。将所得的终扩增子亚克隆到用 SacII 和 ApaI 限制酶切的 pSL1180 载体中。使用 QIAGEN maxiprep 试剂盒大规模纯化修饰质粒 pCMK(+)-Hsf,并将 2 μg 该材料用于转化缺少功能性 cps 基因的脑膜炎奈瑟氏球菌血

清组 B 菌株。为了维持 porA 的表达,通过 PCR 和蛋白质印迹筛选方法的组合来选择单一交换产生的整合。将通过 porA<sup>-</sup> 特异性 PCR 和蛋白质印迹被证实为阳性的卡那霉素抗性克隆在 -70℃ 以甘油原液贮存用于进一步的研究。将细菌 (相当于约  $5 \times 10^8$  个细菌) 重悬浮于 50  $\mu$ l PAGE-SDS 缓冲液中,冷冻 (-20℃) / 沸腾 (100℃) 3 次,然后通过 PAGE-SDS 电泳在 12.5% 凝胶上分离。Hsf 的表达是在来源于 NmB[Cps<sup>-</sup>, PorA<sup>+</sup>] 或 NmB[Cps<sup>-</sup>, PorA<sup>+</sup>, Hsf<sup>+</sup>] 的全细胞细菌溶菌产物 (WCBL) 中检测的。考马斯染色可检测出 Hsf 表达的显著增加 (相当于内源性 Hsf 水平)。该结果证实修饰 pCMK(+)-Hsf 载体是功能性的且可成功用于上调外膜蛋白的表达,不会消除主要 PorA 外膜蛋白抗原的产生。

[0287] 这项工作中使用的寡核苷酸

[0288]

| 寡核苷酸        | 序列                                                                               | 备注 (s)                 |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Hsf01-Nde   | 5' -GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA<br>AAT ATA CCG C-3'                              | NdeI 克隆位点              |
| Hsf 02-Nhe  | 5' -GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT<br>GAT AAC CGA C-3'                              | Nhe I 克隆位点             |
| GFp-mut-Asn | 5' -AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA<br>GGA GAA GAA CTT TTC-3'                        | AsnI 克隆位点<br>与 NdeI 相容 |
| GFP-Spe     | 5' -GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG<br>AGC TCA TCC ATG-3'                            | SpeI 克隆位点<br>与 NdeI 相容 |
| Rp1(SacII)  | 5' -TCC CCG CGG GCC GTC TGA ATA<br>CAT CCC GTC-3'                                | SacII 克隆位点             |
| RP2         | 5' -CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA<br>ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG<br>TCT TCA-3' |                        |
| RP3         | 5' -AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC<br>TCA AA TTA CAA AAG GAA GCC CAT<br>ATG-3'      |                        |
| RP4(ApaI)   | 5' -GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA<br>CGG CGC AGC AGG-3'                            | ApaI 克隆位点              |

[0289] 实施例 3:利用启动子置换上调脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 的 tbpA 基因

[0290] 实验的目的是用较强的 porA 启动子置换 tbpA 基因的内源性启动子区,以上调 TbpA 抗原的产生。就该目的而言,启动子置换质粒是用大肠杆菌克隆方法构建的。位于 tbpA 编码区上游的 DNA 区 (731bp) 是在脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 ATCC 13090 的私立 Incyte PathoSeq 数据库中发现的。该 DNA 包含编码 TbpB 抗原的序列。所述基因是在操纵

子中组织的。TbpB 基因将缺失并被 CmR/porA 启动子弹夹置换。就该目的而言,与 tbpB 基因的 509bp 5'侧翼区、2139bp 的 tbpB 编码序列、87bp 的基因间序列以及 tbpA 编码序列的前 483 个核苷酸相对应的 3218bp 的 DNA 片段是用含有吸收序列和 NheI 及 HindIII 限制位点(下划线)的寡核苷酸 BAD16(5'-GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTAGAG TTT CAA AAT TTA TTC-3')和 BAD17(5'-GGC CAA GCT TCA GAC GGCGTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC-3',)从脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 基因组 DNA 扩增的。用 High Pure Kit(Boehringer Mannheim, 德国)纯化该 PCR 片段并将其直接克隆到 pGemT 载体(Promega, 美国)中。使该质粒进行循环 PCR 诱变(Jones 和 Winistofer(1992))以便(i)插入适宜的限制位点,使 CmR/PorA 启动子盒克隆和(ii)使 209bp 的 tbpB 5'侧翼序列和 tbpB 编码序列缺失。循环 PCR 是用含有适宜限制位点 XmaI、BglIII 和 XhoI(下划线)的 BAD18(5'-TCC CCC GGG AAG ATCTGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3')和 BAD 19(5'-GGA AGA TCT CCGCTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATTTGT TCC G-3')寡核苷酸进行的。CmR/PorA 启动子弹夹是使用含有适宜限制位点 XmaI、SpeI、BglIII 和 XhoI(下划线)的引物 BAD21(5'-GGAAGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3')和 BAD20(5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3'),按照先前所述从 pUC D15/Omp 85 质粒扩增的。将该 PCR 片段克隆到循环 PCR 质粒中。该质粒用于转化脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B[cps-]和[cps-porA-]菌株。通过在 tbpA 上游区中进行双重交换进行整合可将 porA 启动子直接插入到 tbpA ATG 的上游。

**[0291] 实施例 4:两种抗原:TbpA 和 Hsf 的表达被上调的脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株的构建**

[0292] 实验目的是同时上调 TbpA 和 Hsf 在同一脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株中的表达。TbpA 的产生是通过用较强的 porA 启动子置换其内源性启动子区而被上调的(启动子置换)。在本文中,位于 tbpA 上游的 tbpB 基因缺失,且 TbpB 蛋白不再存在于外膜中。Hsf 的表达是通过在 porA 基因座插入相应基因的第二个拷贝(同源重组)而被上调的(基因递送)。两种菌株已经在 W001/09350 独立专利中描述。两种策略中所用的选择标记(Cm<sup>R</sup>或 Kan<sup>R</sup>)可使两种整合到同一染色体中。

[0293] 通过 Qiagen Genomic 尖端 500-G 方案从重组 Nm. Bcps-/TbpA+/PorA+ 菌株提取总基因组 DNA。用 DraIII 限制酶限制酶切 10 μg DNA,并用于通过经典转化方案转化脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B。用于转化的细胞是重组 NmB cps-/Hsf+/PorA+(通过 1 次交换到 porA 基因座中而进行的同源重组)或重组 NmB cps-/Hsf+/PorA-(通过 2 次交换到 porA 基因座中而进行的等位基因交换/同源重组)。将它们平板接种在含 200 μg/ml 卡那霉素的 GC 琼脂上过夜,在 GC 液体培养基 10mMgCl<sub>2</sub> 中被稀释到 DO<sub>650</sub> = 0.1,并在用力搅拌的条件下与 10 μg DraIII 限制酶切的基因组 DNA 于 37°C 温育 6 小时。在含有 200 μg/ml 卡那霉素和 5 μg/ml 氯霉素的 GC 培养基上选择由于双重交换事件(PCR 筛选)产生的重组脑膜炎奈瑟氏球菌,并分析 TbpA 和 Hsf 在 OMV 制品中的表达。如图 1 所示,与从对照 NmB cps- 菌株制备的 OMV 相比,从 TbpA/Hsf 重组 NmB 菌株制备的 OMV 中的 TbpA 和 Hsf 产生显著增加。各蛋白在双重重组体中的过量表达水平可与在相应的单一重组体中获得的表达水平相比较。TbpA 和 Hsf 的过量表达水平是在 PorA+ 和 PorA- 菌株中比较的(没有给出数据)。这些数据共同证实了:(i)TbpA 和 Hsf 在脑膜炎奈瑟氏球菌中的表达可共同且相伴地被上调,且

(ii) 可获得富含 TbpA 和 Hsf 的重组泡并用于免疫。

**[0294] 实施例 5 :两种抗原 :TbpA 和 NspA 的表达被上调的脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株的构建**

[0295] 实验目的是同时上调 TbpA 和 NspA 在同一脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株中的表达。TbpA 的产生是通过用较强的 porA 启动子置换其内源性启动子区而被上调的(启动子置换)。NspA 的表达是通过在 porA 基因座插入相应基因的第二个拷贝(同源重组)而被上调的(基因送递)。两种菌株已经在独立专利 W001/09350 描述。两种策略中所用的选择标记( $\text{Cm}^R$  或  $\text{Kan}^R$ )可使两种整合到同一染色体中。

[0296] 通过 Qiagen Genomic 尖端 500-G 方案从重组 NmB cps-/TbpA+/PorA+ 菌株提取总基因组 DNA。用 AatII 限制酶限制酶切  $10\ \mu\text{g}$  DNA,并用于通过经典转化方案转化脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B。用于转化的细胞是重组 NmB cps-/NspA+/PorA+。将它们平板接种在含  $200\ \mu\text{g/ml}$  卡那霉素的 GC 琼脂上过夜,在 GC 液体培养基  $10\text{mM MgCl}_2$  中被稀释到  $\text{DO}_{650} = 0.1$ ,并在用力搅拌的条件下与  $10\ \mu\text{g}$  AatII 限制酶切的基因组 DNA 于  $37^\circ\text{C}$  温育 6 小时。在含有  $200\ \mu\text{g/ml}$  卡那霉素和  $5\ \mu\text{g/ml}$  氯霉素的 GC 培养基上选择由于双重交换事件(PCR 筛选)产生的重组脑膜炎奈瑟氏球菌,并分析 TbpA 和 NspA 在 OMV 制品中的表达。与从对照 NmB cps- 菌株制备的 OMV 相比,从 TbpA/NspA 重组 NmB 菌株制备的 OMV 中的 TbpA 和 NspA 产生显著增加。各蛋白在双重重组体中的过量表达水平可与在相应的单一重组体中获得的表达水平相比较。这些数据共同证实了:(i) TbpA 和 NspA 在脑膜炎奈瑟氏球菌中的表达可共同且相伴地被上调,且(ii) 可获得富含 TbpA 和 NspA 的重组泡并用于免疫。

**[0297] 实施例 6 :两种抗原 :NspA 和 D15/Omp85 的表达被上调的脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株的构建**

[0298] 实验的是同时上调 NspA 和 D15/Omp85 在同一脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株中的表达。D15/Omp85 的产生是通过用较强的 porA 启动子置换其内源性启动子区而被上调的(启动子置换)。NspA 的表达是通过在 porA 基因座插入相应基因的第二个拷贝(同源重组)而被上调的(基因送递)。两种菌株已经在独立专利 W001/09350 中描述。两种策略中所用的选择标记( $\text{Cm}^R$  或  $\text{Kan}^R$ )可使两种整合组合到同一染色体中。

[0299] 通过 Qiagen Genomic 尖端 500-G 方案从重组 NmB cps-/D15-Omp85/PorA+ 菌株提取总基因组 DNA。用 AatII 限制酶限制酶切  $10\ \mu\text{g}$  DNA,并用于通过经典转化方案转化脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B。用于转化的细胞是重组 NmB cps-/NspA+/PorA-。将它们平板接种在含  $200\ \mu\text{g/ml}$  卡那霉素的 GC 琼脂上过夜,在 GC 液体培养基,  $10\text{mM MgCl}_2$  中被稀释到  $\text{DO}_{650} = 0.1$ ,并在用力搅拌的条件下与  $10\ \mu\text{g}$  AatII 限制酶切的基因组 DNA 于  $37^\circ\text{C}$  温育 6 小时。在含有  $200\ \mu\text{g/ml}$  卡那霉素和  $5\ \mu\text{g/ml}$  氯霉素的 GC 培养基上选择由于双重交换事件(PCR 筛选)产生的重组脑膜炎奈瑟氏球菌,并分析 NspA 和 D15/Omp85 在 OMV 制品中的表达。与从对照 NmB cps- 菌株制备的 OMV 相比,从 NspA/D15-Omp85 重组 NmB 菌株制备的 OMV 中的 NspA 和 D15/Omp85 产生显著增加。各蛋白在双重重组体中的过量表达水平可与在相应的单一重组体中获得的表达水平相比较。这些数据共同证实了:(i) NspA 和 Omp85 在脑膜炎奈瑟氏球菌中的表达可共同且相伴地被上调,且(ii) 可获得富含 NspA 和 Omp85 的重组泡并用于免疫。

**[0300] 实施例 7 :重组 Hsf 形式在大肠杆菌中的产生和纯化**

[0301] 对来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的 Hsf- 样蛋白进行的计算机分析揭示了至少 4 个结构域。将来源于菌株 H44/76 的 Hsf 序列作为参考, 包含氨基酸 1-51 的结构域 1 编码自体转运蛋白家族特征性的 sec- 依赖性信号肽, 包含氨基酸 52-473 的结构域 2 编码很可能是表面外露的且易进入免疫系统的过客结构域, 包含氨基酸 474-534 的结构域 3 编码蛋白低聚所需的推定卷曲螺旋结构域及绞链(颈部)区, 包含残基 535-C 末端的结构域 4 被预测编码可能装配成桶-样结构且被锚定在外膜中的  $\beta$ -链(Henderson 等人, (1998), Trends Microbiol. 6 :370-378 ;Hoiczky 等人, (2000), EMBO 22 :5989-5999)。因为结构域 2 和 3 很可能是表面外露的, 且很好保守的(在所测试的所有菌株中超过 80% ;如 Pizza 等人, (2000), Science 287 :1816-1820 所述), 它们代表了目标疫苗候选物。就该目的而言, 结构域 2(被称作 Hsf 过客结构域)和结构域 2+3(被称作 Hsf 颈部区+卷曲螺旋结构域)在大肠杆菌中表达并被纯化。编码氨基酸 52-473(Hsf 过客)和 52-534(Hsf+cc)的 DNA 片段是用加入末端 RcaI(正向引物)和 XhoI(反向引物)限制位点的寡核苷酸进行 PCR 扩增的。纯化的扩增子是用 RcaI/XhoI 在供应商建议的条件下消化的;且随后被克隆到 pET24d(Novagen Inc., Madison WI) 大肠杆菌表达载体的 NcoI(与 rcaI 相容)/XhoI 位点中。选择重组质粒并用于制备纯化重组质粒。进行表达研究时, 将这些载体(pET-Hsfpas 和 pET-Hsfnc)引入到大肠杆菌菌株 B121DE3(Novagen)中, 其中, T7 聚合酶的基因受到异丙基- $\beta$ -D 硫代半乳糖苷(IPTG)-可调节的 lac 启动子的控制。Novablue (DE3) [pET-24b/BASB029] 大肠杆菌重组菌株的液体培养物(700ml)是在 37°C 搅拌下生长的, 直到 600nm 的光密度(OD600)达到 0.6。在该时间点, 加入 IPTG 至 1mM 终浓度, 使培养物再生长 4 小时。然后 10,000rpm 离心该培养物, 将沉淀在 -20°C 冷冻至少 10 小时。融化后, 在细胞溶解之前, 22°C 下, 利用 Rannie 破裂器通过两种途径将沉淀(680ml 培养物)重悬浮于 pH7.0 的 20mM 磷酸盐缓冲液中 30 分钟。4°C 下, 15,000rpm(Bec kman J2-HS 离心机, JA-20 转子)离心溶解的细胞 30 分钟使其成为沉淀。将上清液上样到在 pH8.0 的 20mM Tris-HCl 缓冲液中平衡的 Q- 琼脂糖快速流动柱(Pharmacia)上。流过后, 用 5 倍柱体积的 pH8.0 的 20mM Tris-HCl 缓冲液洗涤柱子。利用溶于 pH8.0 的 20mM Tris-HCl 缓冲液中的 250mM NaCl 溶液洗脱柱上的重组蛋白。收集抗原阳性级分, 并相对于 pH7.0 的 20mM 磷酸盐缓冲液透析过夜。然后将 0.5M NaCl 和 20mM 咪唑加入到透析样品中。然后将样品应用在 Ni-NTA 琼脂糖柱(Qiagen)上, 该柱是在含 500mM NaCl 和 pH7.0 的 20mM 咪唑的 20mM 磷酸盐缓冲液中平衡的。流过后, 用 5 倍柱体积积含 500mM NaCl 和 20mM 咪唑的 pH7.0 的 20mM 磷酸盐缓冲液洗涤柱子。用溶于 pH7.0 的 20mM 磷酸盐缓冲液中的 100mM 咪唑溶液洗脱污染物。用溶于 pH7.0 的 20mM 磷酸盐缓冲液中的 250mM 咪唑溶液洗脱重组蛋白。收集抗原阳性级别并相对于含 150mM NaCl 的 pH6.8 的 10mM 磷酸盐缓冲液透析。如图 2 所示, 从柱上洗脱富集的(据估计在 CBB 染色的 SDS-PAGE 中的纯度高于 90%)Hsf- 样过客蛋白, 它们迁移到约 47kDa(估计的相对分子量)处。该多肽对 5- 组氨酸基序产生的小鼠单克隆抗体是反应性的。这些数据共同表明 Hsf 过客及 Hsf ncc 基因可以以重组形式在大肠杆菌中表达并纯化。

#### [0302] 实施例 8 :重组 Hap 过客在大肠杆菌中的产生和纯化

[0303] 对来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的 Hap- 样蛋白进行的计算机分析揭示了至少 3 个结构域。将来源于菌株 H44/76 的 Hap- 样序列作为参考, 包含氨基酸 1-42 的结构域 1 编码自体转运蛋白家族特征性的 sec- 依赖性信号肽, 包含氨基酸 43-950 的结构域 2 编码很可能

是表面外露的且易进入免疫系统的过客结构域,包含氨基酸 951-C 末端 (1457) 的结构域 3 被预测编码可能装配成桶-样结构且被锚定在外膜中的  $\beta$ -链。因为结构域 2 很可能是表面外露的,且很好保守的(在所测试的所有菌株中超过 80%)并可能作为亚单位抗原在大肠杆菌中产生,所以它代表了目标疫苗候选物。因为结构域 2 和 3 很可能是表面外露的,且很好保守的(在所测试的所有菌株中超过 80%;如 Pizza 等人, (2000), Science 287: 1816-1820 所述),所以它们代表了目标疫苗候选物。就该目的而言,结构域 2(被称作 Hap 过客结构域)在大肠杆菌中表达并被纯化。编码氨基酸 43-950(Hap 过客)的 DNA 片段是用加入末端 NcoI(正向引物)和 XhoI(反向引物)限制位点的寡核苷酸进行 PCR 扩增的。纯化的扩增子是用 NcoI/XhoI 在供应商建议的条件下消化的;且随后被克隆到 pET24d(Novagen Inc., Madison WI) 大肠杆菌表达载体的 NcoI/XhoI 位点中。选择重组质粒并大规模纯化。进行表达研究时,将这些载体(pET-Hap pass)引入到大肠杆菌菌株 BL21DE3(Novagen)中,其中,T7 聚合酶的基因受到异丙基- $\beta$ -D 硫代半乳糖苷(IPTG)-可调节的 lac 启动子的控制。

[0304] 在发酵罐中培养大肠杆菌 BL21[pET-Hap pass]:将主接种物的等分试样级分(100  $\mu$  l)在 FEC013AA 平板(大豆胨 A3 20g/L、酵母提取物 5g/L、NaCl 5g/L、琼脂 18g/L、蒸馏水加到 1L)上扩散,并在 37°C 下生长 20 小时。收获菌苔并重悬浮于含 0.9% NaCl 的无菌水中。该溶液用于以批量模式在 20L 发酵罐中的 FEC011AC 培养基(大豆胨 24g/L、酵母提取物 48g/L、 $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/L、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/2\text{H}_2\text{O}$  0.45g/L、甘油(87%)40g 和蒸馏水加到 1L)上接种。维持温度(30°C)、pH(6.8, NaOH 25%/  $\text{H}_3\text{PO}_4$  25%)、压力(500mbar)恒定,以 20L/分换气。在这些条件中,通过调整搅拌速度(100-1000rpm)将溶解的氧压维持在 20%。生长 8 小时后加入诱导物(IPTG, 1mM) ( $\text{OD} = 27.8$ )。6 小时 ( $\text{OD} = 49.2$ ) 和 16H30 ( $\text{OD} = 48.6$ ) 后收集样品(6L),离心收获生物量,并在 -20°C 贮存相应的颗粒状物。

[0305] Hap 过客的纯化:

[0306] HAP 过客是以批量模式自发酵罐纯化的。开发了纯化流程(见下面)。

[0307] 弗氏压碎器

[0308] (Tris 50mM/EDTA 5mM, pH 8.0)

↓

[0310] 10000rpm 30 分钟(JA10)

↓

[0312] 将沉淀溶于 Pi 20mM/ 尿素 8M, pH7.0

[0313] 室温搅拌 1h

↓

[0315] 10000rpm 30 分钟(JA10)

↓

[0317] SP- 琼脂糖 • XL

[0318] Pi 20mM/ 尿素 8M ;洗脱液 +/-50mMNaCl

↓

[0320] 螯合琼脂糖 -FF- $\text{Cu}^{++}$

[0321] Pi 20mM/NaCl 0.5M/ 尿素 8M ;洗脱液 +/-100mM 咪唑

[0322] ↓  
[0323] 透析  
[0324] (PBS pH6.8/ 精氨酸 0.5M)  
[0325] ↓  
[0326] 无菌过滤

[0327] 细胞破裂后,在离心沉淀中回收大量 Hap 过客。用 8M 尿素进行溶解。尽管有 N-末端 His-尾部,IMAC 作为第一步是无效的,但第一步后仍在 SP-XL 阳离子交换器上进行。在该 SP-琼脂糖-XL 上,在线性 NaCl (0-250mM) 梯度的中点定量洗脱蛋白。IMAC 是用  $\text{Cu}^{++}$ -上样的螯合琼脂糖 FF 进行的,如同 FHAb。该时间,与 FHAb 相反,IMAC 显示重要的纯化因子。在 SDS-PAGE 上,IMAC 之后 HAP2/3 似乎是纯的。然而在 0-200mM 咪唑梯度下,HAP2/3 的峰非常宽,因此我们试图通过咪唑步骤 (10mM-100mM) 洗脱;然而就纯度而言,梯度模式似乎更有效。作为最后一步,我们试验了通过凝胶渗透作用进行尿素-精氨酸缓冲液交换,然而在这种情况下,蛋白有两个洗脱峰。这两个峰在 SDS-PAGE 上显示出可比较的分布;因此假设是由于 HAP 过客的部分重折叠。然后我们进行最后一步的经典透析用于缓冲液交换。SDS-PAGE 分析显示终材料的良好纯度 (见图 3)。HAP 过客纯度是通过 WB 抗-his 进一步证实的。它由抗-大肠杆菌识别。分子量为 96.1KD。

#### [0328] 实施例 9:重组 FrpA/C 形式在大肠杆菌中的产生和纯化

[0329] 脑膜炎奈瑟氏球菌编码两种 RTX 蛋白,它们被称作 FrpA 和 FrpC,是在铁有限条件下分泌的 (Thompson 等人, (1993) J. Bacteriol. 175:811-818;Thompson 等人, (1993) Infect. Immun. 61:2906-2911)。RTX (重复毒素) 蛋白家族在靠近它们的 C-末端处共有具有如下一致序列的一系列 9 个氨基酸的重复:Leu Xaa Gly Gly XaaGly (Asn/Asp) AspXaa. (LXGGXGN<sub>D</sub>DX)。大肠杆菌 HlyA 中的重复单位被认为是  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点。如图 4 所示,在菌株 FAM20 中表征的脑膜炎球菌 FrpA 和 FrpC 蛋白在它们的中心和 C-末端区共有广泛的氨基酸相似性,但 N-末端的氨基酸相似性非常有限 (如果有的话)。此外,在 FrpA 和 FrpC 之间保守的区显示出某些多态性,这是由于 9 氨基酸基序的重复 (在 FrpA 中 13 次,在 FrpC 中 43 次)。为了评价 FrpA 和 FrpC 的疫苗潜能,我们在大肠杆菌中重组生产了在 FrpA 和 FrpC 之间保守的蛋白区。就该目的而言,包括氨基酸 277-1007 的 DNA 片段 (关于脑膜炎奈瑟氏球菌 FAM20 肽序列) 是用正向引物 FrpA-19 (5'-CTCGAGACCATGGGCAAA TATCATGTCTACGACCCCCTCGC-3') 和反向引物 FrpA-18 (3'-GTG CATAGTGTCAGAGTTTTGTGTCGACGTCGTAATTATAGACC-3') 从脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B H44/76 基因组进行 PCR 扩增的。获得分别为约 1530bp (3 个重复单位)、约 2130bp (13 个重复单位) 和 2732bp (23 个重复单位) 的 3 个扩增子并用 NcoI 和 SalI 限制性内切酶消化。然后将这些片段插入到 pET24d 的 NcoI/XhoI (与 SalI 相容) 位点中,并选择重组质粒 (分别为 pET-Frp3、pET-Frp13 和 pET-Frp23) 用于转化大肠杆菌 BL21DE3 细胞。如图 5 所示,所有这 3 个构建体均可在诱导后产生重组 FrpA/C 保守结构域。此外,增加重复单位的数量可增加重组蛋白的溶解性,这是通过细胞分级分离分析测定的 (没有给出数据)。

[0330] 包含 23 个九肽 LXGGXGN/DDX 重复的 FrpA/C 保守结构域 (总计 911aa) 的纯化:培养 3.5 升大肠杆菌 B121DE3[pET-FrD23] 并在 OD 达到 0.6 时,通过加入 2mM IPTG 而诱导 4 小时。离心收获细胞并将相应的沉淀压碎,离心澄清,并将相应的上清液上样在  $\text{Ni}^{2+}$ -离子

金属亲和柱上 (Ni-NTA- 琼脂糖, Qiagen GmbH)。咪唑用于洗脱, 且最终通过相对于 pH6.8 的 10mM 磷酸钠、150mM NaCl 进行广泛透析而被除去。

[0331] 实施例 10 : 重组 FhaB 形式在大肠杆菌中的产生和纯化

[0332] 截短的 FhaB 自脑膜炎奈瑟氏球菌克隆

[0333] 基因组 DNA 是用 QIAGEN 基因组 DNA 提取试剂盒 (Qiagen GmbH) 从脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株 H44/76 的  $10^{10}$  个细胞中提取的。然后使该材料 (1  $\mu$ g) 经过聚合酶链反应 DNA 扩增, 其中使用下列 FhaB 基因的特异性引物: JKP: 5' AAT GGA ATA CAT ATG AAT AAA GGT TTA CATCGC ATT ATC3' 和 57JKP 5' CCA ACT AGT GTT TTT CGC TAC TTG GAG CTGT3'。得到编码所述蛋白前 1433 个 N- 末端氨基酸的约 4200bp 的 DNA 片段, 用 NdeI/SpeI 限制性内切酶消化并使用标准分子生物学技术 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harborpress 1989) 插入到 pMG MCS 的相应位点中 (pMG 衍生物, Proc Natl Acad Sci USA 1985 年 1 月; 82(1): 88-92)。克隆 FhaB 片段的 DNA 序列是用 Big DyeCycle 测序试剂盒 (Perkin-Elmer) 和 ABI 373A/PRISM DNA 测序仪测定的 (见图 1)。然后使重组 pMG-FhaB 质粒 (1  $\mu$ g) 经历聚合酶链反应 DNA 扩增, 其中使用 FhaB 特异性引物 (XJKP035' AATGGAATACATATGAATAAAGGTTTACATCG CATTATCTTTAG3' 和 XJKP57025' GGGGCCACTCGAGGTTTTTCGCTACTTGGAGCTGTTTCAG ATAGG3')。获得 4214bp 的 DNA 片段, 利用 NdeI/XhoI 限制性内切酶消化并使用标准分子生物学技术 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harborpress 1989) 插入到 pET-24b 克隆 / 表达载体 (Novagen) 的相应位点中。含有截短 FhaB (pET24b/FhaB2/3) 的重组 pET-24b 的证实性测序是使用 Big Dyes 试剂盒 (Applied biosystems) 进行的并在由供应商描述的条件下, 在 ABI 373/A DNA 测序仪上进行分析。所得核苷酸序列在图 6 中给出。

[0334] 重组截短的 FhaB 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

[0335] pET24b/FhaB2/3 克隆 / 表达载体的构建在上面描述。该载体携带从与 6 个组氨酸残基片段融合的菌株 H44/76 中分离出来的截短 FhaB 基因 (在重组产品的 C- 末端), 其受到强噬菌体 T7 基因 10 启动子的控制。进行表达研究时, 该载体被引入到大肠杆菌菌株 Novablue (DE3) (Novagen) 中, 其中, T7 聚合酶的基因受到异丙基 -  $\beta$ -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) - 可调节的 lac 启动子的控制。Novablue (DE3) [pET24b/FhaB2/3] 大肠杆菌重组菌株的液体培养物 (100ml) 在 37°C 搅拌下生长, 直到 600nm (OD600) 的光密度达到 0.6。在该时间点, 加入 IPTG 到 1mM 终浓度, 并使培养物再生长 4 小时。然后 10,000rpm 离心培养物并将沉淀在 -20°C 冷冻至少 10 小时。融化后, 25°C 下将沉淀重悬浮于缓冲液 A (6M 盐酸胍、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.01M Tris, pH 8.0) 中 30 分钟, 3 次通过针, 并离心澄清 (20000rpm, 15 分钟)。然后以 1ml/ 分钟的流速将样品上样到  $\text{Ni}^{2+}$ - 上样的 Hitrap 柱 (Pharmacia Biotech) 上。流过之后, 用 40ml 缓冲液 B (8M 尿素、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.01M Tris, pH 8.0)、40ml 缓冲液 C (8M 尿素、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.01M Tris, pH 6.3) 连续洗涤柱子。然后用 30ml 含有 500mM 咪唑的缓冲液 D (8M 尿素、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.01M Tris, pH 6.3) 将柱上的重组蛋白 FhaB2/3/His6 洗脱下来, 并收集 3ml- 大小的级分。如图 7 所示, 从柱上洗脱下迁移到大约 154kDa (估计的相对分子量) 处的高度富聚的 FhaB-2/3/His6 蛋白。该多肽对 5- 组氨酸基序的小鼠单克隆抗体是反应性的。这些数据共同表明 FhaB2/3 可以以重组形式在大肠杆菌中表达并纯化。

[0336] 用重组 FhaB2/3/His 给小鼠免疫

[0337] 将在大肠杆菌中表达的部分纯化的重组 FhaB2/3/His6 蛋白在第 0、14 和 29 天三次注射到 Balb/C 小鼠中 (10 只动物 / 组)。用大约 5  $\mu$ g 抗原以两种不同制剂通过皮下途径给动物注射 : 或者吸附在 100  $\mu$ g AlPO<sub>4</sub> 上或在 SBAS2 乳液中配制 (每个剂量的 SBAS2 乳液含 5  $\mu$ g MPL 和 5  $\mu$ g QS21)。此外, 还在实验中加入由仅用 SBAS2 乳液免疫的小鼠组成的阴性对照组。在第 29 天 (II 后 15 天) 和第 35 (III 后 6 天) 给小鼠采血以检测特异性抗 -FhaB 抗体。通过对纯化重组 FhaB2/3/His 进行 ELISA 而测量混合血清 (10 只小鼠 / 组) 的特异性抗 -FhaB 抗体。

[0338] 实施例 11 : 抗 FHA、Hap 和 Hsf 抗原产生的小鼠和兔血清的粘附阻断活性

[0339] 与脑膜炎球菌 FHAB- 样、Hsf- 样和 Hap- 样同源的蛋白先前已被描述为重要的毒性决定因素并介导百日咳鲍特氏菌 (FHA) 和流感嗜血杆菌 (Hap 和 Hsf) 的细菌粘附。已知与上皮和内皮细胞的粘附对于脑膜炎球菌的鼻咽定居和穿透血脑屏障而言至关重要。因此, 阻碍脑膜炎球菌粘附提供了一种很有价值的方法, 以控制脑膜炎球菌定居和感染。在这里我们测试了针对脑膜炎球菌 FHAB2/3<sup>rd</sup>、Hap- 样和 Hsf- 样抗原的抗 - 血清是否能够阻碍脑膜炎奈瑟氏球菌与内皮细胞的粘附。使用下列实验过程 :

[0340] HUVEC 粘附的抑制 : 本研究中所用的脑膜炎球菌试验菌株是菌株 NmA8013 的无荚膜、无菌毛的 Opa- 和 Opc- 衍生物。37°C 下, 将脑膜炎球菌细胞 (NmA 8013 衍生物的 2.10E5 集落形成单位 (CFU)) 在由 40  $\mu$ l RPMI、50  $\mu$ l 胎牛血清和 50  $\mu$ l 血清组成的培养基中培养 30 分钟以测试粘附阻断性。然后将该混合物放在含人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 汇合单层的孔中, 其中的培养基之前已被除去。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下培养细菌和 HUVEC 细胞 4 小时。然后用新鲜的 RPMI 血清洗涤细胞单层 3 次, 随后刮平板。然后连续稀释并将细胞溶解产物接种在 GC 平板上, 测定与 HUVEC 相关的 CFU。37°C 培养平板 48 小时, 以回收并使细胞相关脑膜炎球菌生长。

[0341] 小鼠和兔血清的抗重组 FHAB2/3<sup>rd</sup>、Hap 和 hsf 抗原的粘附 - 阻断活性 : 抗 -FHA 2/3、抗 -Hsf 全长 (W099/58683 中所述) 和抗 -Hap 全长 (W099/55873) 抗体, 以及针对相应的 Hsf 和 Hap 过客结构域的抗 - 血清可阻碍脑膜炎球菌与内皮 HUVEC 细胞粘附。图 8 举例说明与单独的佐剂相比, 由在 AlPO<sub>4</sub> 中配制的 FHA 2/3 诱导的特异性抗体能够抑制脑膜炎奈瑟氏球菌 B 与 HUVEC 细胞粘附。与单独的 SBAS2 佐剂相比 (没有抗原, 4 组), 抗 -FHA 2/3 abs (SBAS2 制剂) 仍然是有效的, 但效力低于 AlPO<sub>4</sub>。单独的 SBAS2 佐剂 (没有抗原) 不能诱导可阻碍粘附的抗体。与 4 组相比, 抗 -Hap 抗体 (1 组) 可能具有轻微的抑制作用。在 5 组中, 当试验抗 -FHA 2/3、抗 -Hsf 和抗 -Hap 抗体的混合物时, 粘附的抑制强于单独的抗 -FHA 2/3, 表明抗 -Hap 和抗 -Hsf 抗体产生了协同作用。在第二组抑制实验 (图 2) 中, 与阴性对照相比 (3 和 4 组), 针对抗 OMV 过量表达 Hsf (作为候选蛋白) 的特异性兔抗血清能够部分抑制脑膜炎奈瑟氏球菌 B 固定在内皮细胞上。该兔抗血清已被证实包含非常高的特异性抗 -Hsf 抗体效价。针对 rec Hsf (Hsf 过客和 Hsf 全长) 的抗体也能够抑制细菌在 HUVEC 细胞上的粘附。用小鼠血清 (5-6 组) 和用兔血清 (激光扩展 (laserextend)) (7-8 组) 都是这样的。在该第二个实验中, 证实了已经在第一个实验中测试的特异性抗 -rec FHA2/3 抗体 (1 组) 具有非常高的抑制作用。这些结果表明这些特异性抗原 (Hap、FHA2/3 和 Hsf), 无论分离的还是组合的, 都是目标疫苗抗原。

[0342] 实施例 12 :在小鼠攻击模型中重组 OMV 的保护作用

[0343] 在 Balb/C 小鼠中评价在致命攻击后若干重组 OMV 的保护作用。这种活性免疫模型包括在通过皮下途径进行一系列免疫后,将来源于若干菌株的脑膜炎球菌(悬浮于缺铁 TSB 培养基中)腹膜内注射到成年 Balb/C 或 OF1 小鼠(6-8 周大)中。用作外部铁来源的铁葡聚糖似乎是维持菌血症所必需的且导致感染动物死亡。虽然该小鼠 IP 模型已经显示出可有效评价毒力、免疫保护和铁在感染中的作用,但它们不会进入在人类菌血症和脑膜炎之前发生的咽运阶段。该模型已经用于筛选过量表达 NspA、TbpA、或 Hsf 的若干 OMV 候选物。在下列实验中,在第 0、14 和 28 天,通过皮下途径用 3 (PV00N049)-5  $\mu$ g (PV00N035 和 PV00N043 实验)过量表达 Hsf、NspA 或 TbpA 的 rec OMV 给 Balb/C(近交)或 OF1(远交)小鼠免疫接种 3 次 OMV 是在 A1(OH)<sub>3</sub>(100  $\mu$ g A1(OH)<sub>3</sub>/动物)(PV00N035 和 PV00N043)或在 AlPO<sub>4</sub>(100  $\mu$ g AlPO<sub>4</sub>/动物)上配制的。然后在第 28 天(II 后 14 天)和第 35 天(III 后 7 天)给所述动物采血,用于特异性 Ab 评价。第 35 天,在攻击前 1 小时,腹膜内注射 10mg 铁葡聚糖。用 H44/76(B:15:P1.7,16)或 CU-385(B:4:P1.19,15)菌株攻击,约 1.10e7CFU/动物(见准确攻击剂量结果的表)。使用 CU-385 菌株进行的异源菌株较之使用同源菌株更为严格。记录第 1-5 天的死亡率。之后的表 1 举例说明与较小扩展(lesser extend)中 OMV porA(-)以及 OMV porA(+)相比,使用 OMV TbpA(+) (1/10 和 3/5 的 porA(-)与 9/10 和 3/5 的 porA(+))、OMV NspA(+) (4/10 和 4/5) 和 OMV Hsf(+) (3/10、2/10 和 3/5) 观察到了更好的保护。这是我们在三个实验中共同得到的观察结果。这些数据支持了在胞表面表达的 TbpA、Hsf 和 NspA 抗原对未来 menB 疫苗是重要的。

[0344] 表 1 :重组外膜小泡小鼠模型中的保护活性。该表概括了在 3 个实验过程中获得的结果(PV00N35、PV00N043 和 PV00N049)

[0345] OMVs( 胞 )

[0346]

| Rec OMVs<br>(H44/76 背景 =<br>porA P1.17, 16) | 存活率 (第 天)<br>活性小鼠保护           |                              |                               | 免疫<br>特异性 Abs<br>通过 Elisa<br>平均值-<br>仅有 PV00N049 |
|---------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                             | PV00N035<br>在 OP1 小鼠中         | PV00N043<br>在 Balb/c<br>小鼠中  | PV00N049<br>在 OP1 小鼠中         |                                                  |
|                                             | Challenge strain (+)          |                              |                               |                                                  |
|                                             | H44/76<br>(B:15:P1.7,<br>1.27 | H44/76<br>(B:15:P1.7,<br>1.0 | CU-385<br>(B:4:P1.19,1<br>1.1 |                                                  |
| OMV porA(-)                                 | 1/10                          | 0/10                         | 1/5                           | /                                                |
| OMV porA(+)                                 | 2/10                          | 9/10                         | 4/5                           | /                                                |
| OMV TbpA porA(+)                            | NT                            | 9/10                         | 3/5                           | <                                                |
| OMV TbpA porA (-)                           | NT                            | 1/10                         | 3/5                           | <                                                |
| OMV NspA porA (-)                           | 1/10                          | 4/10                         | 4/5                           | 155 - (<                                         |
| OMV Hsf PorA(-)                             | 3/10                          | 2/10                         | 3/5                           | 7802 - (3496)                                    |
| OMV Hsf PorA(+)                             | NT                            | 9/9                          | NT                            | /                                                |
| 没有抗原                                        | 0/10                          | 0/10                         | 1/5                           | /                                                |

[0347] NT :没有测试

[0348] 实施例 13 :在小鼠攻击模型中重组亚单位抗原的保护作用

[0349] 进行致死攻击后,在 Balb/C 小鼠中评价若干重组纯化蛋白的保护作用。这种活性

免疫模型包括在通过皮下途径进行一系列免疫后,将来源于若干菌株的脑膜炎球菌(悬浮于缺铁的 TSB 培养基中)腹膜内注射到成年 Balb/C 或 OF1 小鼠(6-8 周大)中。

[0350] 用作外部铁来源的铁葡聚糖似乎是维持菌血症所必需的且导致感染动物死亡。虽然该小鼠 IP 模型已经显示出可有效评价毒力、免疫保护和铁在感染中的作用,但它们不会进入在人类菌血症和脑膜炎前发生的咽运阶段。该模型已经用于筛选若干 menB 亚单位疫苗候选物,如重组 FrpC、TbpA、FHA2/3 和 Hap 分子。

[0351] 在该实验中,在第 0、14 和 28 天,通过皮下途径,在有 10  $\mu$ g MPL(每只动物)存在时,用在  $\text{AlPO}_4$ (100  $\mu$ g) 上配制的 5  $\mu$ g(PV00N050 实验)这些蛋白给 OF1(远交)小鼠免疫接种 3 次。

[0352] 然后在第 28 天(II 后 14 天)和第 35 天(III 后 7 天)给所述动物采血,用于特异性 Ab 评价,同时,在第 35 天攻击它们。攻击那天,在攻击前 1 小时,腹膜内注射 10mg 铁葡聚糖。用 CU-385(B:4:P1.19,15)菌株进行攻击,在这种情况下其是异源的,事实上,除了 TbpA 序列来自 B16B6 菌株(B:2a:P1.2)之外,所述抗原序列均来自 H44/76(B:15:P1.7,16)。

[0353] 表 2 所列结果表明在该模型中,FrpC、TbpA、FHAB2/3<sup>rd</sup>、Hap 诱导显著保护:攻击之后,5 只小鼠中有 2-4 只存活,而只使用佐剂仅仅 1/5 存活。除了一组之外,在所有组中,特异性抗体的效价均较高(特异性抗-TbpA 效价适中)。所有这些数据支持了以亚单位抗原、分离或组合形式提供的 FrpC、FrpA、FrpA/C 保守结构域、TbpA、FHAB2/3<sup>rd</sup>、Hap 可用于研制 menB 疫苗。

[0354] 表 2:重组外膜小泡的小鼠模型中的保护活性。该表概括了在其中一个实验过程中获得的结果(PV00N050)。

[0355] 亚单位抗原

[0356]

| Rec亚单位<br>抗原<br>(来源于H44/76 Ag序列) | 存活率(第5天)<br>活性小鼠保护模型                 | 免疫<br>特异性Abs<br>通过Elisa<br>平均值-(GMT) |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                                  | 在(OF1小鼠中)                            |                                      |
|                                  | 攻击菌株(+剂量)                            |                                      |
|                                  | CU-385<br>(B:4:P1.19,15)<br>1.4 10e7 |                                      |
| FrpC Co2++ 治疗                    | 3/5                                  | 31477 - (27068)                      |
| FHAB 2/3 重折叠                     | 2/5                                  | 98200 - (73220)                      |
| FHAB 2/3 non 重折叠                 | 3/5                                  | 55939 - (35347)                      |
| Hap N-ter                        | 4/5                                  | 9960 - (12811)                       |
| recTbpA on SBAS4                 | 3/5                                  | 875 - (520)                          |
| SBAS4                            | 1/5                                  | /                                    |

[0357] 实施例 14:表示疫苗抗原组合的协同作用的方法

[0358] 在检测疫苗候选物这种组合的协同作用方面,可单独或组合测试所得到的不同重组 OMV(OMVs porA(+) rmp-LbpB、OMVsporA(-) TbpA(+) Hsf(+), OMVs porA(-) TbpA(+), OMVsporA(-) NspA(+), OMVs porA(-) Hsf(+), OMVsporA(-) TbpA(+) NspA(+)) 以从统计学上确定最佳组合。这项工作还可用亚单位抗原的组合、以及亚单位抗原+重组 OMV 的组合进行。给 32 组 5 只 OF1 小鼠/组注射并测试小鼠模型中的血清杀菌和调理活性,主动和被动

保护（如果需要使用次优量的各抗原）。如果组合免疫后所产生的保护水平高于各抗原的总和，则表示抗原组合的协同作用。

**[0359] 实施例 15 :外膜小泡考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 的 Hsf 和 TbpA 含量分析**

[0360] 将 15  $\mu$ g 溶于外膜小泡制品中的蛋白在含有  $\beta$ -巯基乙醇的样品缓冲液中稀释，其中 Hsf 或 TbpA 或 Hsf 与 TbpA 两个被上调，并在 95℃ 下加热 10 分钟。然后使样品通过 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶 (Novex4-20% Tris-甘氨酸 1.5mm 2Dwell SDS Page)，并在考马斯蓝中染色 1 小时，并通过若干次脱色洗涤而脱色。结果在图 9 中表示，其表明在来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜小泡制品中，Hsf 和 TbpA 水平明显更高，其中它们的表达水平已得到提高。

**[0361] 实施例 16 :Hsf 和 / 或 TbpA 被上调的 OMV 的免疫原性**

[0362] 在第 0、21 和 28 天，通过肌肉途径用 OMV 给 20 只小鼠的组免疫 3 次。每次接种包括 5  $\mu$ g (蛋白含量) 在含 MPL 的  $\text{AlPO}_4$  上配制的 OMV。所述 OMV 来源于脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76，其被改造成荚膜多糖和 PorA 被下调。比较其中的 Hsf、TbpA、Hsf 和 TbpA 两个被上调或均未被上调的 OMV。在第 41 天，采集血液样品，通过 ELISA 或血清杀菌测定法进行分析。

**[0363] 检测抗 Hsf 抗体的 ELISA**

[0364] 4℃ 下，用 100  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml 溶于 PBS 中的特异性抗原覆盖 96 孔微量平板 (Nunc, Maxisorb) 过夜。用 150mM NaCl 0.05% Tween 20 洗涤后，在室温振摇下，用 100  $\mu$ l 1% 的 PBS-BSA 使平板饱和 30 分钟。在每个步骤之间（室温下振摇进行 30 分钟，并使用 0.2% PBS-BSA 作为稀释缓冲液），通过用 NaCl-Tween 20 洗涤除去过量试剂。向每个微量孔中加入 100  $\mu$ l 稀释的血清样品。结合抗体是由生物素化的抗-小鼠 Ig (Prosan) (1/2000) 识别的。抗原-抗体复合体是通过与链霉抗生物素-生物素化的过氧化物酶缀合物 (Amersham) (1/4000) 温育而显示的。邻苯二胺/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (4mg/10ml 柠檬酸盐缓冲液 0.1M pH4.5+5  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 用于显示测定。通过加入 50  $\mu$ l 1N HCl 而终止反应前，在黑暗中室温温育平板 15 分钟。阅读 490nm 处的吸光度。

[0365]

|                          | 滴定中点 (混合血清) |
|--------------------------|-------------|
| g1, 疱 TbpA-HSF, IM       | 15471       |
| g2, 疱 TbpA, IM           | 15.41       |
| g3, 疱 HSF, IM            | 14508       |
| g4, 疱 CPS(-) PorA(-), IM | -           |
| g5, MPL/AIP04, IM        | -           |

[0366] 上表所示结果表明抗 Hsf 的较高和相等的抗体效价是通过用其中 Hsf 或 Hsf 和 TbpA 两个均被上调的 OMV 免疫而提高的。事实上，在用单独的佐剂或其中 Hsf 或 TbpA 均未被上调或只有 TbpA 被上调的 OMV 接种后产生的血清中没有检测到抗 Hsf 的抗体。

**[0367] 实施例 17 :抗 Hsf 和 / 或 TbpA 被上调的 OMV 产生的抗血清的血清杀菌活性**

[0368] 在使用同源菌株 H44/76 或异源菌株 Cu385 的测定法中比较用 OMV 接种的小鼠抗血清的血清杀菌活性，其中 OMV 中的 Hsf、TbpA、Hsf 和 TbpA 两个被上调或未被上调。血清

杀菌测定法已经显示出与保护作用的良好关联且因此是候选组合物在引发保护性免疫反应方面有效程度的良好指征。

[0369] 在 37℃ +5% CO<sub>2</sub> 下,在 MH+1% Polyvitex+1% 马血清培养皿上过夜培养脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 野生型菌株 (H44/76 菌株 = B:15 P1. 7, 16L3, 7, 9 和 CU385 菌株 = B:4 P1. 19, 15 L3, 7, 9)。37℃ 振摇下,在补充了 50 μM Desferal (铁螯合剂) 的液体 TSB 培养基中将它们传代培养 3 小时,以在 470nm 处达到约 0.5 的光密度。

[0370] 56℃ 下,将混合或单独的血清灭活 40 分钟。在 0.3% HBSS-BSA 中 1/100 稀释血清样品,然后在 50 μl 体积的圆底微量平板中连续稀释 2 倍 (稀释 8 次)。

[0371] 将适宜 OD 的细菌在 0.3% HBSS-BSA 中稀释,得到 1.3 10e4CFU/ml。将 37.5 μl 该稀释液加入到血清稀释液中,并在 37℃ 振摇下培养微量平板 15 分钟。然后,将 12.5 μl 兔补体加入到各孔中。37℃ 振摇培养 1 小时后,将微量平板放在冰上停止杀死。

[0372] 使用倾斜方法,将每孔 20 μl 涂在 MH+1% Polyvitex+1% 马血清培养皿中,37℃ +CO<sub>2</sub> 培养过夜。计算 CFU 和杀死的百分比。血清杀菌效价是达到 ≥ 50% 杀死的最后稀释度。

|            |     |        |     |       |
|------------|-----|--------|-----|-------|
|            |     | H44/76 |     | CU385 |
| [0374] OMV | GMT | 反应者 %  | GMT | 反应者 % |
| [0375]     |     |        |     |       |

|                       |      |      |      |     |
|-----------------------|------|------|------|-----|
| CPS(-)PorA(-)         | 93   | 30%  | 58   | 5%  |
| CPS(-)PorA(-)Hsf      | 158  | 40%  | 108  | 20% |
| CPS(-)PorA(-)TbpA     | 327  | 60%  | 147  | 30% |
| CPS(-)PorA(-)Hsf-TbpA | 3355 | 100% | 1174 | 80% |

[0376] 与上表所示那些相似的结果是在两个其它相似的实验中获得的。

[0377] 对同源菌株和异源的杀菌效价 (GMT) 显著增加是在用其中 Hsf 和 TbpA 被上调的 OMV 接种后见到的。通过比较,在用 Hsf 或 TbpA 上调的 OMV 接种的小鼠上测量的杀菌 GMT 与使用对照 OMV 接种小鼠获得的那些相似。

[0378] 双重上调的益处还可很清楚地产生显著水平杀菌抗体的小鼠百分比方面观察到 (效价大于 1/100),特别是使用异源菌株的实验。

[0379] 实施例 18:混合抗-Hsf 和抗-TbpA 血清对杀菌活性的作用

[0380] 在第 0、21 和 28 天,通过肌肉途径用 OMV 给 20 只小鼠的组免疫 3 次。每次接种包括 5 μg (蛋白含量) 在含 MPL 的 AlPO<sub>4</sub> 上配制的 OMV。所述 OMV 来源于脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76,其被改造成荚膜多糖和 PorA 被下调。用其中没有蛋白上调的对照 OMV 给其中一组小鼠免疫。在第二组中,Hsf 表达被上调,在第三组中,TbpA 表达被上调,在第四组中,Hsf 和 TbpA 的表达均被上调。

[0381] 混合血清,即或者使用同组小鼠的血清或混合从其中 Hsf 单独或 TbpA 单独被上调的组中分离的血清。测量各组混合血清的血清杀菌活性,结果在下表提供。

[0382]

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 在来源于用下列免疫的小鼠混合血清上进行 SBA | SBA 效价 |
| TbpA-Hsf 胞              | 774    |
| TbpA 胞                  | 200    |
| Hsf 胞                   | 50     |
| CPS(-)PorA(-) 胞         | 50     |
| 混合抗 -TbpA+ 抗 -Hsf 血清    | 1162   |

[0383] 上表中的结果表明将抗 -Hsf 和抗 -TbpA 抗血清混合在一起可导致较之任何一种抗血清单独获得的更高的血清杀菌活性。协同作用似乎是由于抗 Hsf 和 TbpA 抗体的同时存在而获得的。

[0384] 实施例 19:截短的 Hsf 蛋白可与 TbpA 协同组合

[0385] 一系列截短的 Hsf 构建体是用标准分子生物学方法制备的。这些包括编码包含 Hsf 信号序列的氨基酸 1-54 和 Hsf 氨基酸 134-592 的构建体 (Tr1Hsf)。第二个截短的 Hsf 包括 Hsf 信号序列的氨基酸 1-53,接着是 Hsf 的氨基酸 238-592(Tr2Hsf)。将这两个截短的 Hsf 构建体和全长 Hsf 引入到脑膜炎奈瑟氏球菌 B 菌株 MC58 siaD<sup>-</sup>、Opc<sup>-</sup>、PorA<sup>-</sup> 中 - 这样它们的表达将被上调,且外膜小泡是用上述方法生产的。

[0386] 外膜小泡制品吸附在 Al(OH)<sub>3</sub> 上,并在第 0、21 和 28 天注射到小鼠中。在第 42 天,给小鼠采血并制备血清。将所述血清与从用上调的 TbpA OMV 免疫的小鼠的血清混合,并按照上面所述进行血清杀菌测定。

[0387] 结果

[0388]

血清杀菌效价

[0389] 组

H44/76

CU385

[0390]

|                                  |       |       |
|----------------------------------|-------|-------|
| MC58 PorA+siaD <sup>+</sup>      | 25600 | 25600 |
| MC58 PorA-siaD-Hsf               | 1530  | 800   |
| MC58 PorA-siaD-Tr1Hsf            | 1015  | 1360  |
| MC58 PorA-siaD-Tr2Hsf            | 50    | 50    |
| 阴性对照                             | 50    | 50    |
| TbpA+MC58 PorA+siaD <sup>+</sup> | 25600 | 24182 |
| TbpA+MC58 PorA-siaD-Hsf          | 2595  | 1438  |
| TbpA+MC58 PorA-siaD-Tr1Hsf       | 4383  | 2891  |
| TbpA+MC58 PorA-siaD-Tr2Hsf       | 1568  | 742   |
| TbpA+ 阴性对照                       | 778   | 532   |

[0391] 上表所示结果表明第一次截短 (Tr1Hsf) 可引发免疫反应,其能够与抗 TbpA 的抗血清组合产生较之使用全长 Hsf 更高的血清杀菌活性。然而,截短的程度十分重要,且在

Tr2 中产生的截短物与全长 Hsf 相比,具有有害作用。相对于所用的两种菌株,均可见到 Tr1Hsf 的杀菌活性提高。

[0392] 实施例 20 :抗 TbpA、Hsf 和第三种脑膜炎球菌蛋白抗体的血清杀菌活性

[0393] 将上述其中 PorA 和荚膜多糖被下调的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H66/76 用作使用上述方案上调 TbpA 和 Hsf、LbpB、D15、PilQ 或 NspA 的背景菌株。外膜小泡是从上述各菌株制备的。重组 FHAb、FrpC、FrpA/C 和 Hap 是用此前所述技术和本领域已知的技术制备的(如 PCT/EP99/02766、W092/01460 和 W098/02547 中所述)。

[0394] 外膜小泡制品和重组蛋白吸附到 Al(OH)<sub>3</sub> 上,并在第 0、21 和 28 天注射到小鼠中。第 42 天,给小鼠采血并制备血清。将抗 TbpA 和 Hsf 上调的 OMV 的血清和来源于用含上调的 LbpB、D15、PilQ 或 NspA 或重组 FHAb、FrpC、FrpA/C 或 Hap 的 OMV 接种的小鼠血清混合,并按照上面所述进行血清杀菌测定。

[0395] 结果

[0396] 结果在下表中给出。在使用同源 H44/76 菌株的测定法中,除了 FrpC 之外,加入抗第三脑膜炎球菌抗原的抗体不会产生较之使用单独的抗 TbpA 和 Hsf 抗体所产生的更高的血清杀菌效价。

[0397] 然而,抗第三种抗原抗体的加入在使用异源菌株的血清杀菌测定法中是有利的。抗 D15(OMP85)、Hap、FrpA/C 和 LbpB 的抗体可特别有效地增加抗 CU385 菌株的血清杀菌效价。

| [0398]        | 血清杀菌效价 |       |
|---------------|--------|-------|
|               | H44/76 | CU385 |
| [0399] 抗血清混合物 |        |       |
| [0400]        |        |       |

|                       |      |      |
|-----------------------|------|------|
| 抗-TbpA-Hsf 和 非免疫血清    | 5378 | 2141 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-FHA    | 5260 | 2563 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-Hap    | 4577 | 5150 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-FrpA/C | 5034 | 4358 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-LbpB   | 5400 | 4834 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-D15    | 4823 | 4657 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-PilQ   | 4708 | 2242 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-NspA   | 4738 | 2518 |
| 抗-TbpA-Hsf 和 抗-FrpC   | 6082 | 2300 |

[0401] 实施例 21 :外膜小泡中的 FrpB KO 对它们在同源和异源菌株中引发杀菌免疫反应的能力的作用

[0402] 按照 W001/09350 所述,使用 0.1% DOC 提取,将 H44/76 脑膜炎奈瑟氏球菌的两种菌株用于制备外膜小泡制品,这样 LOS 含量大约为 20%。菌株 B1733 是 siaD(-)、PorA(-),具有 Tr1 Hsf(实施例 19)的上调且 lgtB 被敲除。菌株 B1820 B1733 是 siaD(-)、PorA(-),具有 Tr1 Hsf 的上调,且 lgtB 被敲除,FrpB 也被敲除。两种菌株都是在补充了 60 μ M Desferal 的培养基中培养的,这样就可使铁调节的蛋白如 LbpA/B 和 TbpA/B 被上调。

[0403] 疱制品吸附在 Al(OH)<sub>3</sub> 上,并在第 0 和 21 天,将 5 μ g 肌肉注射到 30 只小鼠的组中。在第 28 天采集血液样品。

[0404] 按照实施例 17 所述,在 3 种 L3 菌株(同源野生型菌株 H44/76 和两种异源 L3 菌株;NZ124 和 M97250687)上进行血清杀菌测定法。

[0405] 结果

| 用于接种的 疱 | H44/76 |       | M97250687 |       | NZ124 |       |
|---------|--------|-------|-----------|-------|-------|-------|
|         | GMT    | SC    | GMT       | SC    | GMT   | SC    |
| B1733   | 1518   | 30/30 | 151       | 11/30 | 70    | 4/29  |
| B1820   | 781    | 19/30 | 1316      | 24/30 | 276   | 19/30 |

[0407] GMT 表示 SBA 中的血清几何平均效价。

[0408] SC 表示小鼠血清转变数(SBA 效价  $> 1/100$ )。

[0409] 所述结果清楚地表明 FrpB KO(B 1820) 疱较之 FrpB(+) 疱(B1733) 可诱导更好的异源交叉-杀菌反应。在菌株 M97250687 和 NZ124 中, SBA 效价更高且血清转变小鼠的比例更高。当 FrpB 缺失时, 同源性菌株的结果不是很好。这些数据表明 FrpB 驱动免疫反应, 但因为该外膜蛋白是高度可变的, 因此抗该蛋白的抗体仅能诱导杀死同源菌株。

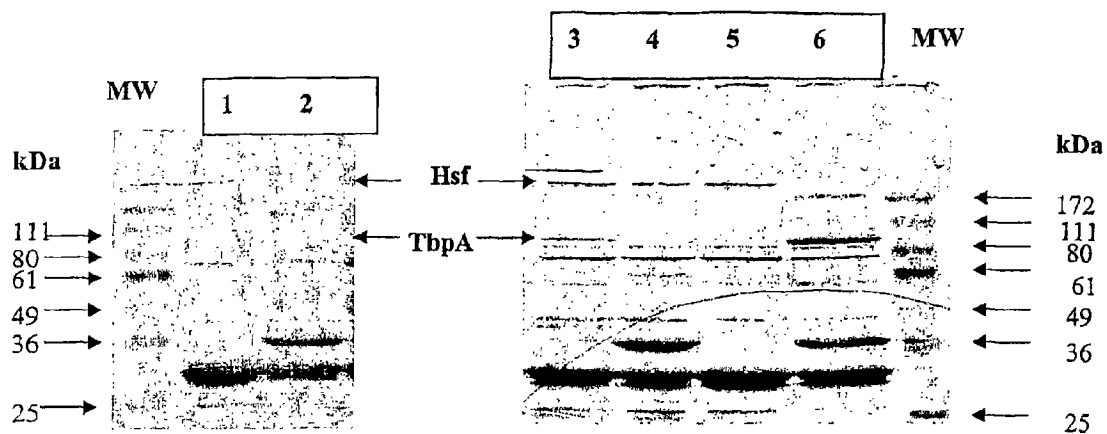


图 1

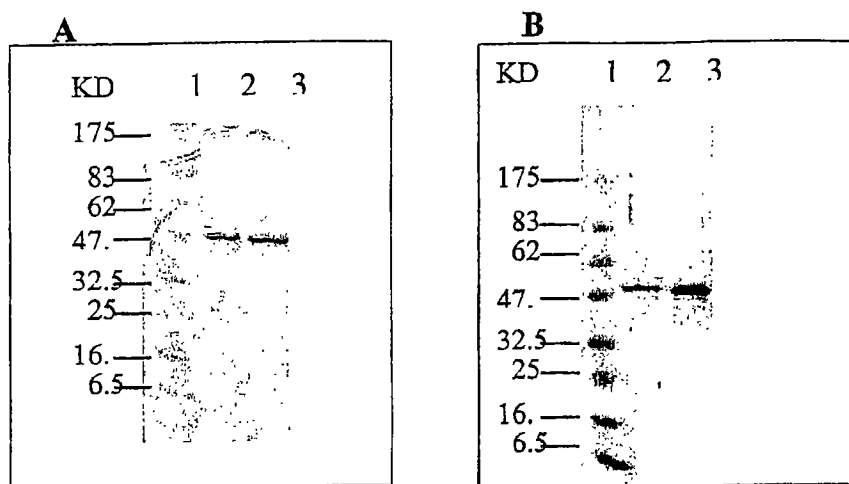


图 2

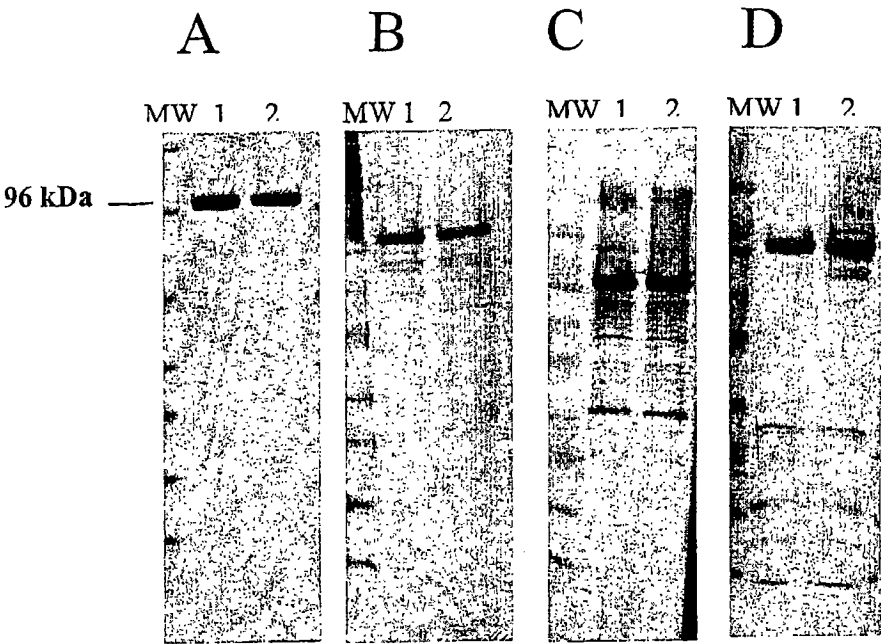


图 3

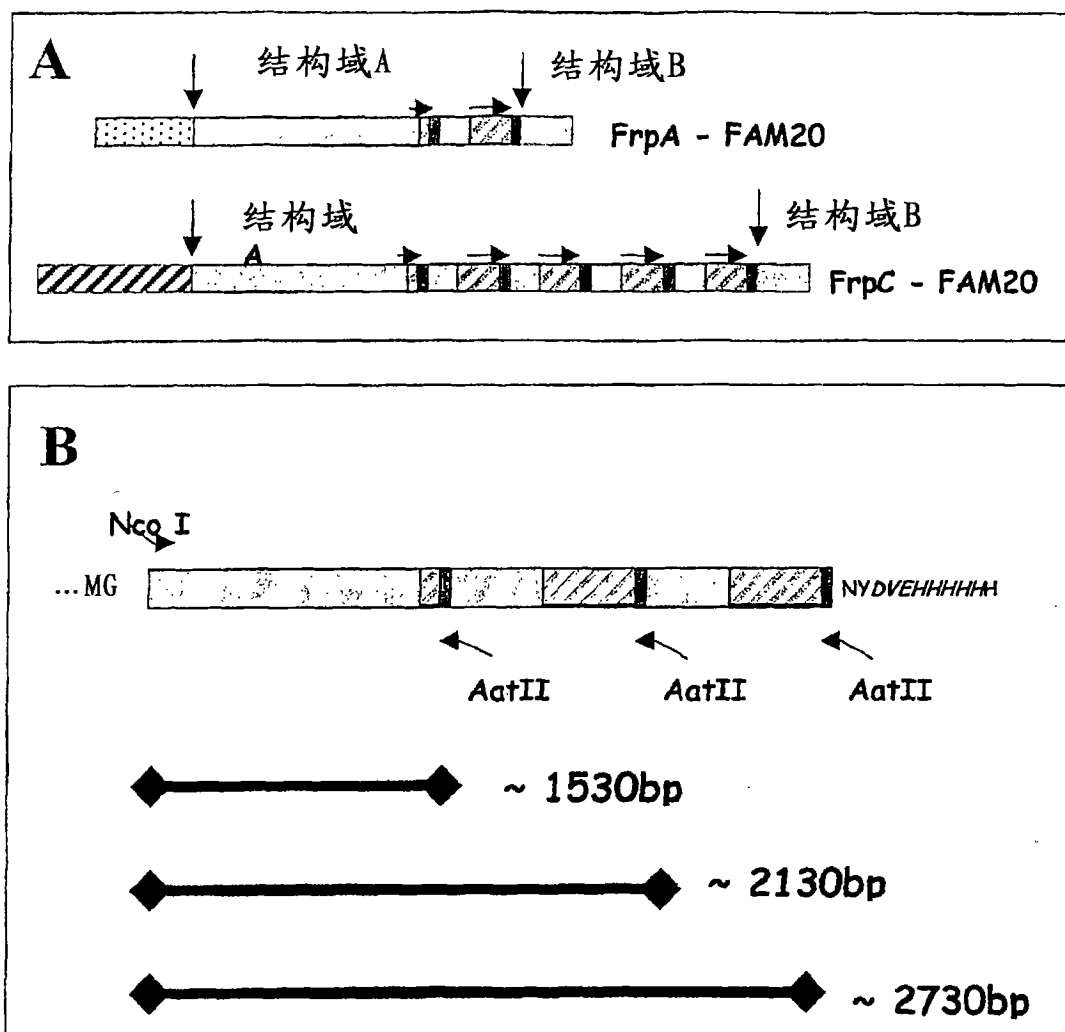


图 4

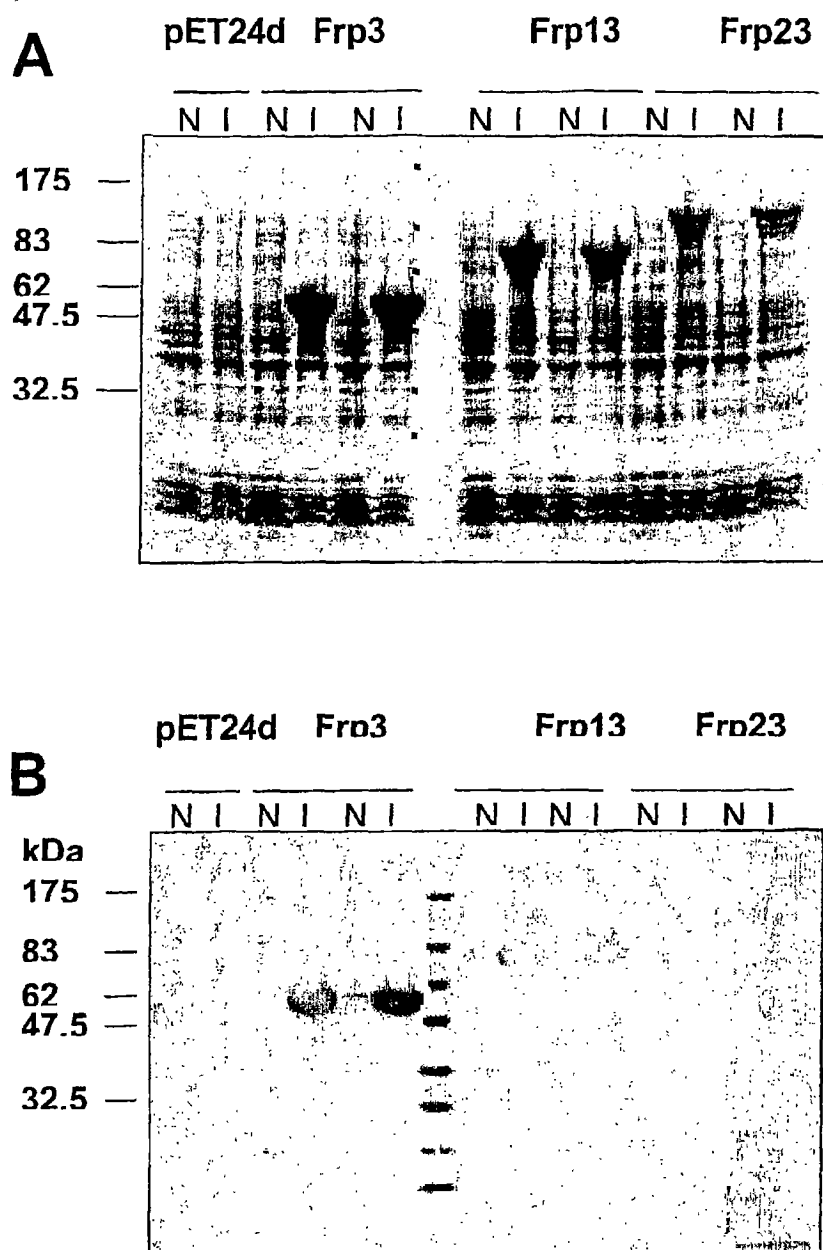


图 5

5' -

ATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTTAGTAAAAAGCACAGCACCATGGTTGCAGTAGCCGAAACT  
GCCAACAGCCAGGGCAAAGGTAAACAGGCAGGCAGTTTCGGTTTCTGTTTCACTGAAAACCTTCAGGCGAC  
CTTTGCGGCAAACCTCAAACCACCCCTTAAACCTTTGGTCTGCTCTTTGGTTTCCCTGAGTATGTTATG  
CCTGCCCATGCCCCAAATTACCACCGACAAATCAGCACCTAAAAACCAGCAGGTCGTTATCCTTAAACCC  
AACACTGGTGCCCCCTTGGTGAATATCCAACTCCGAATGGACGCGGATTGAGCCACAACCGCTATACG  
CAGTTTGATGTTGACAACAAAGGGGCAGTGTTAAACAACGACCGTAACAATAATCCGTTTGTGGTCAAA  
GGCAGTGCGCAATTGATTTTGAACGAGGTACGCGGTACGGCTAGCAAACCTCAACGGCATCGTTACCGTA  
GGCGGTCAAAAGGCCGACGTGATTATTGCCAACCCCAACGGCATTACCGTTAATGGCGGCGGCTTTAAA  
AATGTCGGTGGGGCATCTTAACACCGGTGCGCCCCAAATCGGCAAAGACGGTGCACTGACAGGATTT  
GATGTGCGTCAAGGCACATTGACCGTAGGAGCAGCAGGTTGGAATGATAAAGGCGGAGCCGACTACACC  
GGGGTACTTGCTCGTGCACTTGCTTTGCAGGGGAAATTACAGGGTAAAAACCTGGCGGTTTCTACCGGT  
CCTCAGAAAGTAGATTACGCCAGCGGCGAAATCAGTGCAGGTACGGCAGCGGGTACGAAACCGACTATT  
GCCCTTGATACTGCCGCACTGGGCGGTATGTACGCCGACAGCATCACACTGATTGCCAATGAAAAGGC  
GTAGGCGTCAAAAATGCCGGCACACTCGAAGCGGCCAAGCAATTGATTGTGACTTCGTGAGGCCGCATT  
GAAAACAGCGGCCGCATCGCCACCACTGCCGACGGCACCGAAGCTTCACCGACTTATCTCTCCATCGAA  
ACCACCGAAAAGGAGCGGCAGGCACATTTATCTCCAATGGTGGTCGGATCGAGAGCAAAGGCTTATTG  
GTTATTGAGACGGGAGAAGATATCAGCTTGCGTAACGGAGCCGTGGTGCAGAATAACGGCAGTCGCCCCA  
GCTACCACGGTAITAAATGCTGGTCATAATTTGGTGATTGAGAGCAAACTAATGTGAACAATGCCAAA  
GGCCCGGCTACTCTGTGCGCCGACGGCCGTACCGTCATCAAGGAGGCCAGTATTGAGACTGGCACTACC  
GTATACAGTTCCAGCAAAGGCAACGCCGAATTAGGCAATAACACACGCATTACCGGGGAGATGTTACC  
GTATTATCCAACGGCACCATCAGCAGTTCCGCCGTAATAGATGCCAAAGACACCGCACACATCGAAGCA  
GGCAAACCGCTTTCTTTGGAAGCTTCAACAGTTACCTCCGATATCCGCTTAAACGGAGGCAGTATCAAG  
GGCGGCAAGCAGCTTGCTTTACTGGCAGACGATAACATTACTGCCAAAACCTACCAATCTGAATACTCCC  
GGCAATCTGTATGTTTCATACAGGTAAAGATCTGAATTTGAATGTTGATAAAGATTTGTCTGCCGCCAGC  
ATCCATTTGAAATCGGATAACGCTGCCCATATTACCGGCACCGAGTAAAACCCCTACTGCCCTCAAAGAC  
ATGGGTGTGGAGGCAGGCTCGCTGAATGTTACCAATACCAATCTGCGTACCAACTCGGGTAATCTGCAC  
ATTCAGGCAGCCAAAGGCAATATTCAGCTTCGCAATACCAAGCTGAACGCAGCCAAGGCTCTCGAAACC  
ACCGCATTGCAGGGCAATATCGTTTCAGACGGCCTTCATGCTGTTTCTGCAGACGGTCATGTATCCTTA  
TTGGCCAACGGTAATGCCGACTTTACCGGTCAATACCCCTGACAGCCAAGGCCGATGTCAATGCAGGA  
TCGGTTGGTAAAGGCCGTCTGAAAGCAGACAATACCAATATCACTTCATCTTCAGGAGATATTACGTTG  
GTTGCCGGCAACGGTATTGAGCTTGGTGACGGAAAACAACGCAATTCATCAACGGAAAACACATCAGC  
ATCAAAAACAACGGTGGTAATGCCGACTTAAAAACCTTAACGTCCATGCCAAAAGCGGGGCATTGAAC  
ATTCAATCCGACCGGGCATTGAGCATAGAAAATACCAAGCTGGAGTCTACCCATAATACGCATCTTAAT  
GCACAACACGAGCGGGTAACGCTCAACCAAGTAGATGCCTACGCACACCGTCATCTAAGCATTACCGGC  
AGCCAGATTTGGCAAAACGACAAACTGCCTTCTGCCAACAAGCTGGTGGCTAACGGTGTATTGGCACTC  
AATGCGCGCTATTCCAAATTGCCGACAACACCACGCTGAGAGCGGGTGCAATCAACCTTACTGCCGGT  
ACCGCCCTAGTCAAGCGCGGCAACATCAATTGGAGTACCGTTTCGACCAAAACTTTGGAAGATAATGCC  
GAATTAACCATTTGGCCGACGGCTGAATATTGAAGCAGGTAGCGGCACATTAACCATCGAACCTGCC

图 6

AACCGCATCAGTGCGCATACCGACCTGAGCATCAAAACAGGCGGAAAATTGCTGTTGTCTGCAAAAGGA  
GGAAATGCAGGTGCGCCTAGTGCTCAAGTTTCTCTCAITGGAAGCAAAAGGCAATATCCGTCTGGTTACA  
GGAGAAACAGATTTAAGAGGTTCTAAAATTACAGCCGGTAAAACTTGTTGTGCGCCACCACCACAAAGGC  
AAGTTGAATATCGAAGCCGTAAACAACCTCATTTCAGCAATTATTTTCTACACAAAAGCGGCTGAACTC  
AACC AAAATCCAAAGAATTGGAACAGCAGATTGCGCAGTTGAAAAAAGCTCGCCTAAAAGCAAGCTG  
ATTCCAACCTTGCAAGAAGAACGCGACCGTCTCGCTTCTATATTCAAGCCATCAACAAGGAAGTTAAA  
GGTAAAAACCCAAAGGCAAAGAATACCTGCAAGCCAAGCTTTCTGCACAAAATATTGACTTGATTTC  
GCACAAGGCATCGAAATCAGCGGTTCCGATATTACCGCTTCCAAAAAAGTGAACCTTCACGCCGCGAGGC  
GTATTGCCAAAGGCAGCAGATTCAGAGGCGGCTGCTATTCTGATTGACGGCATAACCGACCAATATGAA  
ATTGGCAAGCCCACCTACAAGAGTCACTACGACAAAGCTGCTCTGAACAAGCCTTCACGTTTGACCGGA  
CGTACAGGGGTAAGTATTCATGCAGCTGCGGCACCTCGATGATGCACGTATTATTATCGGTGCATCCGAA  
ATCAAAGCTCCCTCAGGCAGCATAGACATCAAAGCCATAGTGATATTGTACTGGAGGCTGGACAAAAC  
GATGCCTATACCTTCTTAAAAACCAAAGGTAAAAGCGGCAAAATCATCAGAAAAACCAAGTTTACCAGC  
ACCCGCGACCACCTGATTATGCCAGCCCCCGTCGAGCTGACCGCCAACGGCATAACGCTTCAGGCAGGC  
GGCAACATCGAAGCTAATACCACCCGCTTCAATGCCCTGCAGGTAAAGTTACCCTGGTTGCGGGTGAA  
GAGCTGCAACTGCTGGCAGAAGAAGGCATCCACAAGCACGAGTTGGATGTCCAAAAAGCCCGCTTT  
ATCGGCATCAAGGTAGGCAAGAGCAATTACAGTAAAAACGAACTGAACGAAACCAAATTGCCTGTCCGC  
GTCGTGCCCCAAACTGCAGCCACCCGTTTAGGCTGGGATACCGTGCTCGAAGGTACCGAATTCAAACC  
ACGCTGGCCGGTGCGGACATTCAGGCAGGTGTAGGCGAAAAGCCCGTGCCGATGCGAAAATTATCCTC  
AAAGGCATTGTGAACCGTATCCAGTCGGAAGAAAAATTAGAAACCAACTCAACCGTATGGCAGAAACAG  
GCCGGACGCGGCAGCACTATCGAAACGCTGAACTGCCAGCTTCGAAAGCCCTACTCCGCCCCAACTG  
ACCGCCCCCGGTGGCTATATCGTCGACATTCCGAAAGGCAATTTGAAAACCGAAATCGAAAAGCTGGCC  
AAACAGCCCGAGTATGCCTATCTGAAACAGCTCCAAGTAGCGAAAAACACTAGTGGCCACCATCACCAT  
CACCATTA STOP -3'

图 6(续)

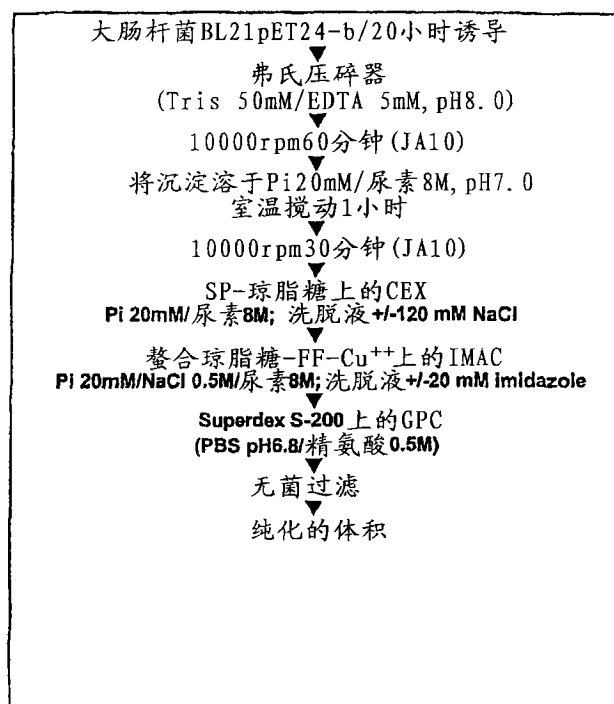
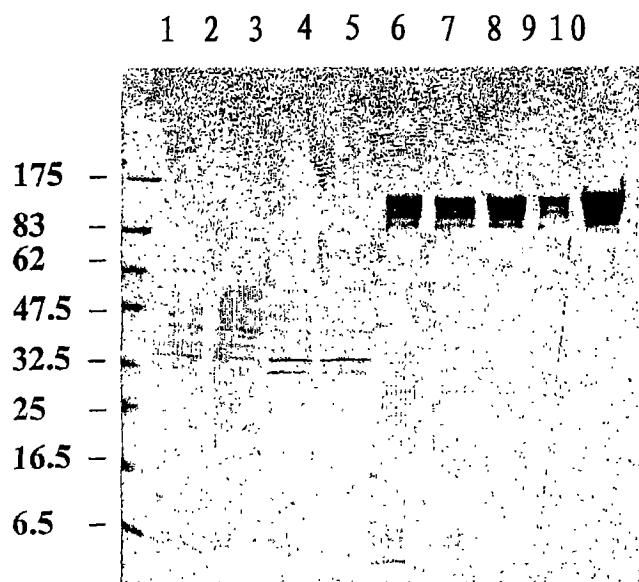
**A****B**

图 7

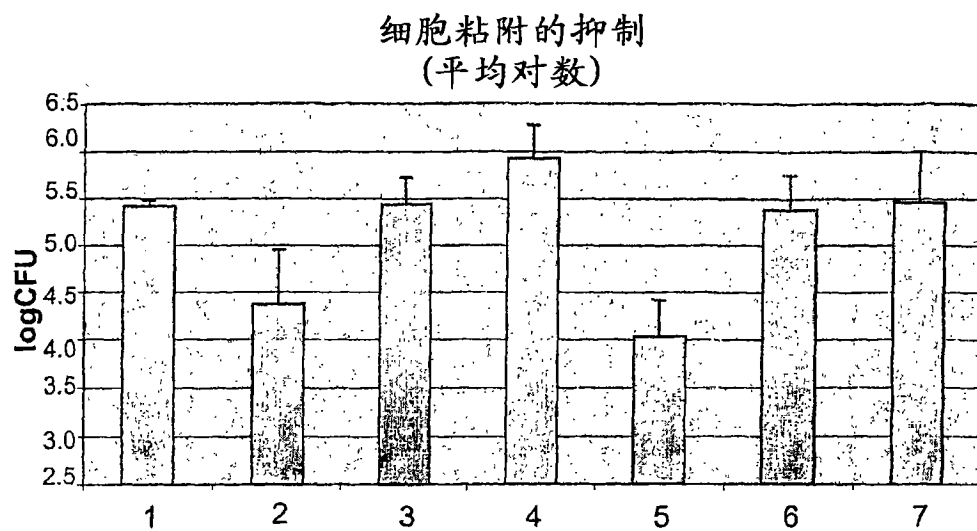


图 8A

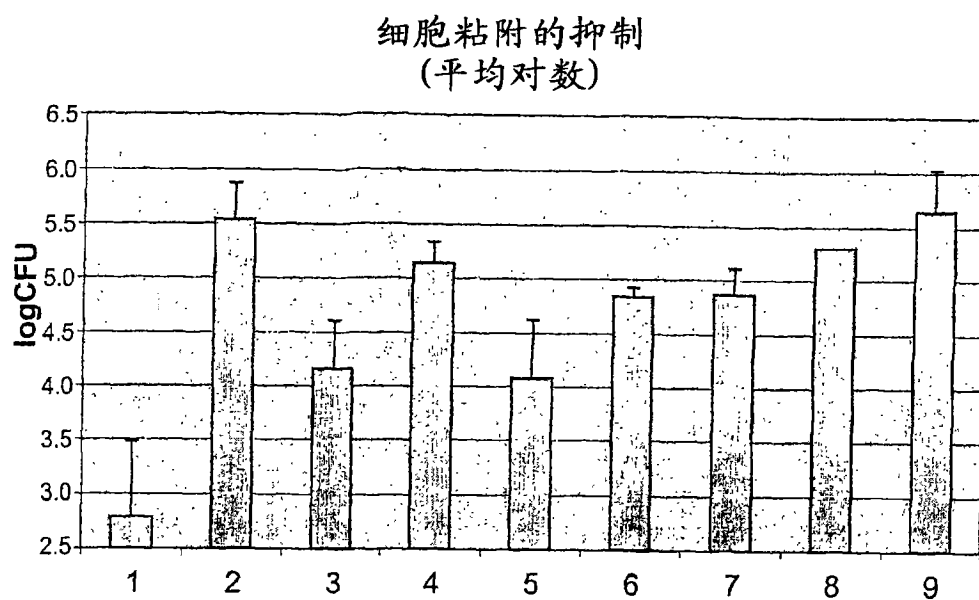


图 8B

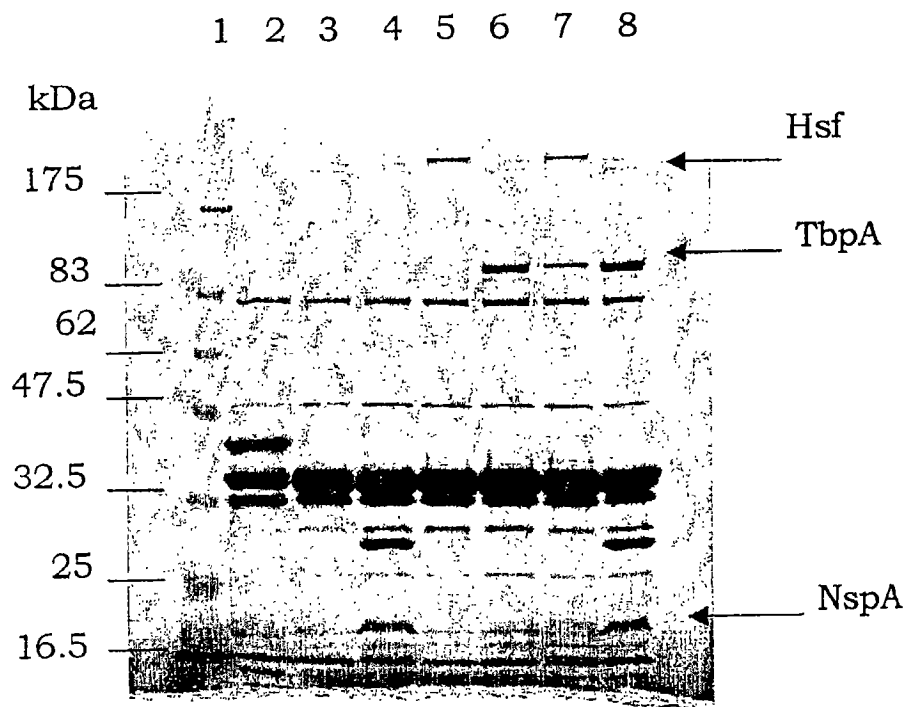


图 9