



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112851768 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(21) 申请号 202110192031.1

A61K 39/095 (2006.01)

(22) 申请日 2015.07.22

A61P 31/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 37/04 (2006.01)

62/028,123 2014.07.23 US

(62) 分案原申请数据

201580043542.X 2015.07.22

(71) 申请人 奥克兰儿童医院及研究中心

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 P·T·比尔宁克

(74) 专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理

有限公司 11329

代理人 孙涛 肖鹂

(51) Int.Cl.

C07K 14/22 (2006.01)

权利要求书2页 说明书41页

C12N 15/31 (2006.01)

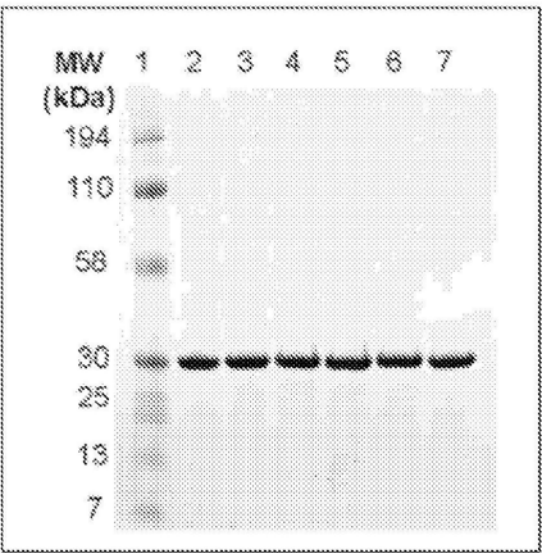
序列表29页 附图21页

(54) 发明名称

因子H结合蛋白变体及其使用方法

(57) 摘要

提供了因子H结合蛋白变体及其使用方法。提供了可以引发对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株杀菌性的抗体的变体因子H结合蛋白、包含所述蛋白质的组合物、以及所述蛋白质的使用方法。



1. 一种因子H结合蛋白 (fHbp) 变体, 其中所述变体包含选自以下至少一种的氨基酸取代:

- a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺 (Q38) 的氨基酸取代;
- b) 在氨基酸92处的谷氨酸 (E92) 的氨基酸取代;
- c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸 (R130G);
- d) 在氨基酸223处的丝氨酸 (S223) 的氨基酸取代; 和
- e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸 (H248L),

其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 1 (SEQ ID NO:1), 其中所述变体包含与SEQ ID NO:1具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H (fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答。

2. 一种因子H结合蛋白 (fHbp) 变体, 其中所述变体包含选自以下的氨基酸取代:

- a) 在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺 (N115I);
- b) 在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸 (D121G);
- c) 在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸 (S128T);
- d) 在131位处的缬氨酸 (V131) 的氨基酸取代;
- e) 在219位处的赖氨酸 (K219) 的氨基酸取代;
- f) 在220位处的甘氨酸 (G220) 的氨基酸取代,

其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2), 其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H (fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

3. 一种因子H结合蛋白 (fHbp) 变体, 其中所述变体包含选自以下的氨基酸取代:

- a) 在92位处的谷氨酸 (E92) 的氨基酸取代;
- b) 在223位处的丝氨酸 (S223) 的氨基酸取代; 和
- c) 在248位处的组氨酸 (H248) 的氨基酸取代,

其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 55 (SEQ ID NO:3), 其中所述变体包含与SEQ ID NO:3具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的小于50%的亲和力结合人因子H (fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

4. 一种免疫原性组合物, 其包含:

- a) 根据权利要求1-3中任一项所述的变体fHbp; 和
- b) 药学上可接受的赋形剂。

5. 一种核酸, 其编码根据权利要求1-3中任一项所述的变体fHbp。

6. 一种重组表达载体, 其包含根据权利要求5所述的核酸。

7. 一种体外宿主细胞, 其包含根据权利要求5所述的核酸或根据权利要求6所述的重组表达载体。

8. 一种在哺乳动物中引发抗体应答的方法, 所述方法包括向哺乳动物施用根据权利要求4所述的免疫原性组合物。

9. 一种因子H结合蛋白 (fHbp) 变体, 其中所述变体包含相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2) 的氨基酸取代L130R和G133D, 其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲力的50%或更小的亲和力结合人因子H (fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

因子H结合蛋白变体及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2015年07月22日、中国申请号为201580043542.X、发明名称为“因子H结合蛋白变体及其使用方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求于2014年7月23日提交的美国临时专利申请No.62/028,123的权益,该申请通过引用的方式整体并入本文。

[0004] 引言

[0005] 脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)是一种革兰氏阴性细菌,其定殖于人类上呼吸道,并且最值得注意的是引起脑膜炎和败血症的世界范围内的偶发性和周期性流行性爆发。2岁以下儿童的侵袭和发病率最高。与其它革兰氏阴性细菌一样,脑膜炎奈瑟氏球菌通常具有细胞质膜、肽聚糖层、与荚膜多糖一起构成细菌壁的外膜、和突出到外部环境中的菌毛。脑膜炎奈瑟氏球菌的包裹菌株是儿童和年轻成人中细菌性脑膜炎和败血症的主要原因。侵袭性脑膜炎奈瑟氏球菌感染的流行和经济重要性推动了对可赋予跨不同株,特别是跨具有不同血清型或血清亚型的遗传多样性血清组B的免疫性的有效疫苗的研究。

[0006] 因子H结合蛋白(fHbp,在本领域中也称为脂蛋白2086(Fletcher等人(2004) *Infect Immun* 72:2088-2100),基因组来源的奈瑟氏球菌抗原(GNA)1870(Masignani等人(2003) *J Exp Med* 197:789-99)或“741”)是在细菌中作为表面暴露的脂蛋白表达的脑膜炎奈瑟氏球菌蛋白。fHbp的一个重要功能是结合人补体因子H(fH),其下调补体激活。fH与细菌表面的结合是病原体在非免疫人血清或血液中存活并逃避先天宿主防御的重要机制。最近,发现人因子H基因簇中的遗传变异影响发展脑膜炎球菌病的易感性(Davila S等人(2010) *Nat Genetics* doi:10.1038/ng.640)。fH与fHbp的结合对人fH和几种非人灵长类动物是特异的,并且可以部分解释为什么脑膜炎奈瑟氏球菌严格地是人类病原体。fHbp出现在由标识(ID)号指定的许多天然序列变体中,如在pubmlst(dot)org/neisseria/fHbp因特网上的fHbp数据库中指定的。

[0007] 仍然需要可引发有效的杀菌性抗体应答的fHbp多肽。

[0008] 概述

[0009] 提供了可以引发对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株具有杀菌性的抗体的变体因子H结合蛋白、包含所述蛋白质的组合物、以及使用所述蛋白质的方法。

[0010] 特征

[0011] 本公开提供了因子H结合蛋白(fHbp) ID 1的变体。本公开提供了fHbp的变体,其中所述变体包含选自以下的至少一种的氨基酸取代:a)在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代;b)在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代;c)在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G);d)在氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代;和e)在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L),其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 1(SEQ ID NO:1),其中所述变体包含与SEQ ID NO:1具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体诱导对哺乳动物宿主中至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答。在一些情

况下,在Q38处的氨基酸取代是Q38R、Q38K、Q38H、Q38F、Q38Y或Q38W。在一些情况下,E92处的氨基酸取代是E92K、E92R、E92H、E92F、E92Y或E92W。在一些情况下,S223处的氨基酸取代是S223R、S223K、S223H、S223F、S223Y或S223W。在一些情况下,变体fHbp还可包含相对于fHbp ID 1的R41S或R41A取代。例如,相对于fHbp ID 1,变体fHbp可以包含R41S或R41A取代和S223处的取代,例如R41S/S223R。在其它情况下,变体fHbp还可包含相对于fHbp ID 1的R41S或R41A取代和H248L取代。在某些情况下,变体fHbp可以包含两个、三个或更多个本文公开的取代。在一个具体的实例中,变体fHbp可以包含相对于fHbp ID 1的以下取代:S223R和H248L。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的25%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的10%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的5%或更小的亲和力结合人fH。

[0012] 本公开提供了fHbp ID 22的变体。本公开提供了fHbp的变体,其中所述变体包含选自以下的至少一种氨基酸取代:a)在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I);b)在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G);c)在氨基酸128处苏氨酸取代丝氨酸(S128T);d)131位处的缬氨酸的氨基酸取代(V131);e)219位处的赖氨酸的氨基酸取代(K219);f)220位处的甘氨酸的氨基酸取代(G220),其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2),其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的25%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的10%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的5%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,V131处的氨基酸取代是V131D、V131E、V131K、V131R、V131H、V131F、V131Y或V131W。在一些情况下,在K219处的氨基酸取代是K219N、K219Q、K219D、K219E、K219F、K219Y或K219W。在一些情况下,G220处的氨基酸取代是G220S、G220N、G220Q、G220D、G220E、G220K、G220R、G220H、G220F、G220Y或G220W。

[0013] 在一些情况下,变体fHbp包括与野生型(WT) fHbp(例如WT fHbp ID 22)的热稳定性相比增加变体fHbp的热稳定性的双重突变。在一些情况下,变体fHbp可包含相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2)的取代L130R和G133D,其中变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答,并且其中所述变体与fHbp ID 22的热稳定性相比具有更高的热稳定性。在一些情况下,变体fHbp可包含取代的组合,如L130R,G133D和选自以下的至少一种氨基酸取代:a)N115I;b)D121G;c)S128T;d)V131;e)K219(例如,K219N);和f)G220(例如,G220S),其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2),其中所述变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。变体fHbp的热稳定性可以比WT fHbp(例如,fHbp ID 22)高至少5℃、10℃、15℃、20℃或更高,例如高5℃-30℃、5℃-25℃、5℃-20℃、10℃-20℃或15℃-20℃。如本文所用,“热稳定性”是指当暴露于较高温度时蛋白质的稳定性;热稳定性变体蛋白质在比野生型蛋白质

更高的温度下保持其构象。例如,包含与野生型(WT) fHbp(例如WT fHbp ID 22)的热稳定性相比增加热稳定性的双重突变的变体fHbp可以在比WT fHbp更高的温度下解折叠。在某些情况下,变体fHbp的N端结构域可以在比WT fHbp(例如,fHbp ID 22)的N端结构域更高的温度下解折叠。

[0014] 本文还公开了fHbp变体,其包含与WT fHbp相比增强热稳定性的突变,并且还包括已知减少fH结合的另外的突变,如US2011/0256180中公开的那些突变。在某些实施方案中,公开了因子H结合蛋白(fHbp)的变体,其中相对于fHbp ID 22(SEQ ID NO:2),所述变体包含氨基酸取代L130R和G133D以及至少一种以下取代:R80A、D211A、E218A、E248A、G236I、T221A和H223A,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲和力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

[0015] 本公开提供了fHbp ID 55的变体。本公开提供了fHbp的变体,其中所述变体包含选自以下的至少一种氨基酸取代:a)在92位处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代;b)在223位处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代;和c)248位处的组氨酸(H248)的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 55(SEQ ID NO:3),其中所述变体包含与SEQ ID NO:3具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的小于50%的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的25%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的10%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的5%或更小的亲和力结合人fH。在一些情况下,E92处的氨基酸取代是E92K,E92R,E92H,E92F,E92Y或E92W。在一些情况下,S223处的氨基酸取代是S223R,S223K,S223H,S223F,S223Y或S223W。在一些情况下,H248处的氨基酸取代是H248L,H248I,H248V,H248D,H248E,H248F,H248Y或H248W。

[0016] 本公开提供了包含本公开的变体fHbp的免疫原性组合物。本公开提供了免疫原性组合物,其包含:a)根据上面段落0006-0010中任一段的变体fHbp;和b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,fHbp变体在由脑膜炎奈瑟氏球菌菌株制备的囊泡制剂中。在一些情况下,药学上可接受的赋形剂包括佐剂;例如,其中佐剂是磷酸铝或氢氧化铝。在一些情况下,药物组合物还包含奈瑟氏球菌表面蛋白A。

[0017] 本公开提供了编码根据上面段落0006-0010中任一段的变体fHbp的核酸。本公开提供了重组表达载体,其包含编码根据上文段落0006-0010中任一段的变体fHbp的核酸。本公开提供了包含编码根据上文段落0006-0010中任一段的变体fHbp的核酸的体外宿主细胞。本公开提供了包含重组表达载体的体外宿主细胞,所述重组表达载体包含编码根据上文段落0006-0010中任一段的变体fHbp的核酸。

[0018] 本公开提供了在哺乳动物中引发抗体应答的方法,所述方法包括对哺乳动物施用上文段落0011的免疫原性组合物。在一些情况下,哺乳动物是人。在一些情况下,抗体应答是对一种或多种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答。

附图说明

[0019] 图1描绘了在聚丙烯酰胺凝胶上用考马斯蓝染色的纯化的重组fHbp ID 1突变体。

泳道1,Kaleidoscope分子量标志物(Bio-Rad Laboratories);2,fHbp ID 1野生型;3,Q38R;4,E92K;5,R130G;6,S223R;7,H248L。

[0020] 图2(小图A和B)描绘了通过ELISA测量的fHbp ID 1突变体与人fH的结合。显示了重复测量的平均值和范围。

[0021] 图3(小图A-E)描绘了通过表面等离子共振测量的fHbp ID 1突变体与人fH的结合。作为参考,ID 1野生型(WT)蛋白的相同数据显示在图3小图A-E的每一个中。

[0022] 图4(小图A-E)描绘了通过ELISA测量的鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)与fHbp ID 1突变体蛋白的结合。显示了重复测量的平均值和范围。

[0023] 图5(小图A和B)描绘了来自用fHbp ID 1突变体免疫的小鼠的血清的杀菌活性。每个符号代表单个小鼠的滴度,并且水平条表示几何平均滴度。图5小图A描绘了来自用fHbp ID 1突变体免疫的野生型小鼠的血清的杀菌活性。图5小图B描绘了来自用fHbp ID 1突变体免疫的人fH转基因小鼠的血清的杀菌活性。

[0024] 图6(小图A和B)描绘了fHbp ID 1单或双重突变体的表征。图6小图A描绘了人fH与fHbp ID 1双重突变体的结合。图6小图B描绘了鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)JAR4与突变体的结合。

[0025] 图7描绘了来自用fHbp ID 1单或双重突变体免疫的野生型小鼠的血清的杀菌活性。每个符号代表单个小鼠的滴度,并且水平条表示几何平均滴度。

[0026] 图8(小图A和B)描绘了fHbp ID 55突变体的表征。图8小图A显示通过ELISA测量的人fH与固定的fHbp ID 55突变体的结合,并且图8小图B显示通过ELISA测量的鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)JAR 41与fHbp突变ID 55蛋白的结合。显示了2至4个重复的平均值和范围。

[0027] 图9描绘了来自用fHbp ID 55突变体免疫的野生型小鼠的血清的杀菌活性。每个符号代表单个小鼠的滴度,并且水平条表示几何平均滴度。

[0028] 图10(小图A和B)描绘了来自用fHbp ID 55免疫的小鼠的血清的杀菌活性。图10小图A描绘了来自用获得许可的Trumenba疫苗或研究性fHbp ID 55突变体S223R免疫的人fH转基因小鼠的血清的杀菌活性。图10小图B描绘了个体转基因小鼠中血清人fH浓度与血清杀菌抗体滴度(圆形符号)之间的关系。为了比较,显示了野生型(WT)小鼠的滴度(正方形)。

[0029] 图11(小图A-D)描绘了fHbp ID 22突变体的表征。图11小图A-C描绘了通过ELISA测量的fHbp ID 22突变体与人fH的结合。显示了2至4个重复的平均值和范围。图11小图D描绘了通过ELISA测量的鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)JAR 4与fHbp突变体ID 22蛋白的结合。fHbp ID 22野生型(WT)和D211A突变体显示为对照。显示了重复测量的平均值和范围。

[0030] 图12(小图A和B)显示了来自用fHbp ID 22突变体免疫的小鼠的血清的杀菌活性。每个符号代表单个小鼠的滴度,并且水平条表示几何平均滴度。图12小图A和B显示了在测试不同fHbp ID 22突变体的两个实验中来自野生型小鼠的血清的杀菌活性。

[0031] 图13描绘了来自用fHbp ID 22突变体免疫的人fH转基因小鼠的血清的杀菌活性。

[0032] 图14描绘了通过差示扫描微量热法测量的fHbp ID 22野生型(WT)和L130R/G133D双重突变体的热解折叠。

[0033] 图15(小图A和B)描绘了fHbp ID 22三重突变体的表征。图15小图A描绘了人fH与fHbp ID 22三重突变体的结合。DM是指L130R/G133D双重突变体。图15小图B描绘了鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)JAR 4与fHbp ID 22三重突变体的结合。

[0034] 图16描绘了来自用fHbp ID 22三重突变体免疫的人fH转基因小鼠的血清的杀菌活性。DM是指L130R/G133D双重突变体。

[0035] 图17提供了具有降低的人fH结合的示例性fHbp突变体的表。

[0036] 图18提供了野生型人因子H的氨基酸序列。

[0037] 图19提供了来自脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的fHbp ID 1, ID 22和ID 55的氨基酸序列。

[0038] 图20-图24提供了fHbp ID 1变体的氨基酸序列。

[0039] 图25-图30提供了fHbp ID 22变体的氨基酸序列。

[0040] 图31-图33提供了fHbp ID 55变体的氨基酸序列。

[0041] 图34-图36提供了fHbp ID 1双重突变体变体的氨基酸序列。

[0042] 图37-图39提供了fHbp ID 22双重突变和三重突变变体的氨基酸序列。

[0043] 图40提供NspA的氨基酸序列。

[0044] 定义

[0045] “因子H结合蛋白”(fHbp), 其在文献中也称为GNA1870, GNA1870, ORF2086, LP2086 (脂蛋白2086) 和“741”是指一类脑膜炎奈瑟氏球菌多肽。它在自然界中被发现为细菌脑膜炎奈瑟氏球菌表面上的脂蛋白。基于氨基酸序列变异性和免疫交叉反应性 (Masignani等人 (2003) J Exp Med 197:789-99), fHbp已经在一些报告中细分为三种fHbp变体组 (称为变体组1 (v.1), 变体组2 (v.2) 和变体组3 (v.3)) (Masignani等人 (2003) J Exp Med 197:789-99) 以及在其它报告中分为亚家族A和B (参见例如Fletcher等人 (2004) Infect Immun 72:2088-2100))。fHbp也可以分为六个最常见的fHbp模块组之一, 称为模块组I至模块组VI, 如Vu等人 (2012) Sci.Reports 2:341的图2中所示。根据pubmlst.org/neisseria/fHbp/网站, 在脑膜炎奈瑟氏球菌中发现的每个独特的fHbp也被分配fHbp肽ID。因为变体2 (v.2) fHbp蛋白 (来自菌株8047, fHbp ID 77) 和变体3 (v.3) fHbp (来自菌株M1239, fHbp ID 28) 的长度分别与菌株MC58的fHbp蛋白 (fHbp ID 1) 相差-1和+7个氨基酸残基, 所以本文中用于指v.2和v.3fHbp蛋白的残基的编号与基于这些蛋白的实际氨基酸序列的编号不同。因此, 例如, 提及v.2或v.3fHbp序列的166位的亮氨酸残基(L) 是指v.2蛋白的165位的残基和v.3蛋白的173位的残基。除非另有说明, fHbp变体中存在的氨基酸取代的编号是参照fHbp ID 1中氨基酸残基的编号。

[0046] 如本文所用, 人因子H (“人fH”) 是指包含如图18 (SEQ ID NO:4) 所示的氨基酸序列的蛋白质及其天然存在的人等位变体。

[0047] 在氨基酸序列或多核苷酸序列 (例如, “来源自” fHbp ID 1的氨基酸序列) 的上下文中的“来源自”意图指多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸 (例如天然存在的fHbp蛋白或编码核酸) 的序列的序列, 并且不意味着对制备蛋白质或核酸的来源或方法的限制。氨基酸序列或多核苷酸序列可以“来源自”的参考多肽和参考多核苷酸的非限制性实例包括天然存在的fHbp, fHbp ID 1和非天然存在的fHbp。在细菌菌株的上下文中, “来源自”是指菌株是通过亲本菌株的体内传代或体外培养获得的, 和/或是通过修饰亲本菌株获得的重组细胞。

[0048] “保守氨基酸取代”是指一种氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代, 所述另一种氨基酸残基共享氨基酸侧链的化学和物理性质 (例如电荷, 大小, 疏水性/亲水性)。“保守取

代”意图包括在以下氨基酸残基组内的取代:gly、ala;val、ile、leu;asp、glu;asn、gln;ser、thr;lys、arg;和phe、tyr。这种取代的指导可以从呈现目标表位的多肽的氨基酸序列的比对中提取。

[0049] 术语“保护性免疫”是指施用于哺乳动物的疫苗或免疫方案诱导免疫应答,其预防由脑膜炎奈瑟氏球菌引起的疾病,延缓由脑膜炎奈瑟氏球菌引起的疾病的发展或降低由脑膜炎奈瑟氏球菌引起的疾病的严重性,或减少或完全消除疾病的症状。保护性免疫可伴随杀菌抗体的产生。应当注意,本领域公认针对脑膜炎奈瑟氏球菌的杀菌抗体的产生作为预测疫苗在人中的保护作用。(Goldschneider等人(1969) J. Exp. Med. 129:1307;Borrow等人(2001) Infect Immun. 69:1568)。

[0050] 短语“由脑膜炎奈瑟氏球菌菌株引起的疾病”涵盖脑膜炎奈瑟氏球菌的人感染中存在的任何临床症状或临床症状的组合。这些症状包括但不限于:由脑膜炎奈瑟氏球菌的致病菌株对上呼吸道(例如鼻咽和扁桃体的粘膜)的定植,细菌穿透进入粘膜和粘膜下血管床,败血症,败血性休克,炎症,出血性皮肤损伤,纤维蛋白溶解和血液凝固的活化,器官功能障碍,如肾,肺和心力衰竭,肾上腺出血和肌肉梗塞,毛细血管渗漏,水肿,外周肢体缺血,呼吸窘迫综合征,心包炎和脑膜炎。

[0051] 在抗原(例如多肽抗原)的上下文中,短语“特异性结合抗体”或“与…特异性免疫反应”是指基于和/或证明样品中存在抗原的结合反应,所述样品也可以包括其它分子的异质群体。因此,在指定的条件下,规定的一种或多种抗体与样品中的一种或多种特定抗原结合,并且不以显著量与样品中存在的其它分子结合。在抗原的表位(例如多肽的表位)的上下文中,“特异性结合抗体”或“与…特异性免疫反应”是指基于和/或证明抗原(例如多肽)中存在表位的结合反应,所述抗原也可以包括其它表位的异质群体,以及异质抗原群体。因此,在指定的条件下,规定的一种或多种抗体与抗原的特定表位结合,并且不以显著量与存在于抗原和/或样品中的其它表位结合。

[0052] 短语“以足以引发免疫应答的量”是指在施用特定抗原制剂之前和之后测量的免疫应答指标之间存在可检测的差异。免疫应答指标包括但不限于:通过测定法如酶联免疫吸附测定(ELISA),杀菌测定,流式细胞术,免疫沉淀,Ouchterlony免疫扩散;例如斑点,蛋白质印迹或抗原阵列的结合检测测定;细胞毒性测定等检测的抗体滴度或特异性。

[0053] “表面抗原”是存在于脑膜炎奈瑟氏球菌(例如外膜,荚膜,菌毛等)的表面结构中的抗原。

[0054] “分离的”是指在与化合物可天然存在的环境不同的环境中的感兴趣的实体。“分离的”意在包括在基本上富集感兴趣的化合物的样品内和/或其中感兴趣的化合物部分或基本上纯化的化合物。在一些情况下,纯化分离的组分(例如,多肽,如本公开的fHbp变体;本公开的核酸;本公开的重组载体),例如,分离的组分是至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%,至少99%或大于99%纯的。

[0055] “富集的”是指非天然操纵(例如,由实验者或临床医生)样品,使得感兴趣的化合物以比起始样品中化合物的浓度大的浓度(例如,大至少3倍,大至少4倍,大至少8倍,大至少64倍或更多)存在,所述起始样品如生物样品(例如,样品,其中化合物天然存在或其中它在施用后存在),或其中制备化合物(例如,如在细菌多肽,抗体,核酸等中一样)。

[0056] 在进一步描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所描述的具体实施方案,因此

当然可以改变。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,并且不旨在限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0057] 在提供值的范围的情况下,应当理解,除非上下文另有明确说明,否则在该范围的上限和下限之间的每个居间值(至下限单位的十分之一),以及任何其它所述的范围或在所述范围内的居间值包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且也包括在本发明内,服从所述范围中任何特别排除的限制。当所述范围包括一个或两个限制时,排除那些所包括的限制中的一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0058] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中,但是现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物通过引用的方式并入本文,以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0059] 必须注意,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一”,“一个/种”和“该/所述”包括复数指示物,除非上下文另有明确指示。因此,例如,提及“因子H结合蛋白”包括多种此类因子H结合蛋白,并且提及“免疫原性组合物”包括提及一种或多种免疫原性组合物及本领域技术人员已知的其等同物,等等。还应注意,权利要求书可以撰写为排除任何任选的要素。因此,本说明书旨在充当使用与权利要求要素的叙述有关的诸如“单独”,“仅”等排他性术语或使用“否定”限制的引用基础。

[0060] 应当理解,为了清楚起见在单独实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为了简明起见,在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合提供。属于本发明的实施方案的所有组合特别地被本发明所涵盖,并且在本文中公开,就像每个组合单独地和明确地公开一样。另外,各种实施方案及其元件的所有子组合也特别地被本发明涵盖,并且在本文中公开,就如同每个此类子组合在本文中单独地和明确地公开一样。

[0061] 提供本文讨论的出版物仅仅是因为它们在本申请的申请日之前的公开。本文中的任何内容不应被解释为承认本发明没有资格由于在先发明而早于这样的公开。此外,提供的出版物的日期可能不同于可能需要独立确认的实际出版日期。

具体实施方式

[0062] 本公开提供了可以引发对脑膜炎奈瑟氏球菌的至少一种菌株具有杀菌性的抗体的变体因子H结合蛋白(fHbp)。本公开提供了包含本公开的变体fHbp的组合物,包括免疫原性组合物。本公开提供了本公开的变体fHbp或包含本公开的变体fHbp的组合物的使用方法。

[0063] 变体FHBP

[0064] 本公开提供了变体fHbp,其在氨基酸序列上与野生型脑膜炎奈瑟氏球菌fHbp的差异为1至10个氨基酸(例如从1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸),10个氨基酸至15个氨基酸,15个氨基酸至20个氨基酸,20个氨基酸至30个氨基酸,30个氨基酸至40个氨基酸或40个氨基酸至50个氨基酸,使得与参考fHbp相比,变体fHbp表现出与人因子H(fH)的亲和力降低,并且其中变体fHbp当施用于哺乳动物宿主时诱导对一种或多种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性免疫应答。在一些情况下,变体fHbp在氨基酸序列上与参考野生型脑膜炎奈瑟氏

球菌fHbp的差异不超过1至10个酸取代。在一些情况下,变体fHbp在氨基酸序列上与参考野生型脑膜炎奈瑟氏球菌fHbp仅相差一个氨基酸取代。

[0065] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与参考fHbp序列具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;其中变体fHbp相对于参考fHbp序列包含一个或多个氨基酸取代,使得变体fHbp表现出为参考fHbp对人fH的结合亲和力的85%或更小的对人fH的亲合力,例如变体fHbp表现出为参考fHbp对人fH的亲合力的结合亲和力的约85%至约75%,约75%至约65%,约65%至约55%,约55%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%或约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%的对人fH的亲合力;并且当施用于哺乳动物宿主(例如人;或非人动物模型)时,变体fHbp诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性免疫应答。

[0066] 当参考fHbp处于其天然构象时,本公开的变体fHbp保持与人fH结合的参考(例如野生型)fHbp的基本上相同的构象。本公开的变体fHbp是否保持结合人fH的参考(例如野生型)fHbp的基本上相同的构象可以使用当野生型fHbp处于其天然构象时结合野生型fHbp的抗体来确定。这样的抗体包括例如JAR 41;JAR 4;和JAR 31。参见,例如Vu等人(2012) Sci.Reports 2:341。产生JAR 4单克隆抗体的杂交瘤具有美国典型培养物保藏中心(ATCC)编号PTA-8943;也参见USPN 8,470,340。例如,在一些情况下,本公开的变体fHbp保留与JAR 4的结合;例如本公开的变体fHbp保留参考fHbp(例如fHbp ID 1,fHbp ID 22或fHbp ID 55)在其天然构象中对JAR 4的结合的至少75%,至少80%,至少85%,至少90%或至少95%。

[0067] fHbp ID的变体1

[0068] 来源本公开的变体fHbp的“参照fHbp”在一些情况下是fHbp ID 1.fHbp ID 1的氨基酸序列如下所示。

[0069] fHbp ID 1:

[0070] CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAQQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:1) .

[0071] 在一些情况下,本公开的变体fHbp是变体组1fHbp。在一些情况下,本公开的变体fHbp是变体组1fHbp,并且是模块组I fHbp。在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;其中变体fHbp相对于fHbp ID 1包含一个或多个氨基酸取代,使得变体fHbp展示为fHbp ID 1对人fH的结合亲和力的85%或更小的对人fH的亲合力,例如变体fHbp表现出为fHbp ID 1对人fH的亲合力的结合亲和力的约85%至约75%,约75%至约65%,约65%至约55%,约55%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%的对人fH的亲合力;并且当施用于哺乳动物宿主(例如人;或非人动物模型)时,变体fHbp诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性免疫应答。

[0072] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%,至少85%,

至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中基于fHbp ID1的编号，所述变体fHbp包含选自以下至少一种的氨基酸取代：a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代；b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代；c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G)；d) 氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；和e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)。

[0073] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代。在一些情况下，变体fHbp包含Q38R取代。具有带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如赖氨酸，组氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可在该位置取代。因此，在一些情况下，变体fHbp包含Q38K取代，Q38H取代，Q38F取代，Q38Y取代或Q38W取代。作为一个实例，本公开的变体fHbp可以包含图20所示和SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

[0074] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代。在一些情况下，fHbp变体包含E92K取代。具有带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如精氨酸，组氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可以在该位置取代。因此，例如，在一些情况下，fHbp变体包含E92R取代，E92H取代，E92F取代，E92Y取代或E92W取代。作为一个实例，本公开的变体fHbp可以包含图21所示和SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0075] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含氨基酸130处的用甘氨酸取代精氨酸(R130G)。例如，本公开的变体fHbp可以包含图22所示和SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。具有带负电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如天冬氨酸，

谷氨酸, 苯丙氨酸, 酪氨酸或色氨酸也可以在R130处取代。因此, 例如, 在一些情况下, 本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%, 至少85%, 至少90%, 至少95%, 至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如, 约50%至约45%, 约45%至约35%, 约35%至约25%, 约25%至约15%, 约15%至约10%, 约10%至约5%, 约5%至约2%, 约2%至约1%, 或约1%至约0.1%, 或小于0.1%)的亲合力结合人fH, 其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答, 并且其中变体fHbp包含R130D取代, R130E取代, R130F取代, R130Y取代或R130W取代。

[0076] 在一些情况下, 本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%, 至少85%, 至少90%, 至少95%, 至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如, 约50%至约45%, 约45%至约35%, 约35%至约25%, 约25%至约15%, 约15%至约10%, 约10%至约5%, 约5%至约2%, 约2%至约1%, 或约1%至约0.1%, 或小于0.1%)的亲合力结合人fH, 其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答, 并且其中变体fHbp包含氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代。在一些情况下, fHbp变体包含S223R取代。具有带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸, 如赖氨酸, 组氨酸, 苯丙氨酸, 酪氨酸或色氨酸也可在该位置取代。因此, 例如, 在一些情况下, fHbp变体包含S223K取代, S223H取代, S223F取代, S223Y取代或S223W取代。作为一个实例, 本公开的变体fHbp可以包含图23所示和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0077] 在一些情况下, 本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%, 至少85%, 至少90%, 至少95%, 至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如, 约50%至约45%, 约45%至约35%, 约35%至约25%, 约25%至约15%, 约15%至约10%, 约10%至约5%, 约5%至约2%, 约2%至约1%, 或约1%至约0.1%, 或小于0.1%)的亲合力结合人fH, 其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答, 并且其中变体fHbp包含氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)。例如, 本公开的变体fHbp可以包含图24所示并且在SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。具有非极性, 带负电荷或芳族侧链的其它氨基酸, 如异亮氨酸, 缬氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 苯丙氨酸, 酪氨酸或色氨酸也可以在H248处取代。因此, 在一些情况下, 本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%, 至少85%, 至少90%, 至少95%, 至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID1对人fH的亲合力的50%或更小(例如, 约50%至约45%, 约45%至约35%, 约35%至约25%, 约25%至约15%, 约15%至约10%, 约10%至约5%, 约5%至约2%, 约2%至约1%, 或约1%至约0.1%, 或小于0.1%)的亲合力结合人fH, 其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答, 并且其中变体fHbp包含H248I取代, H248V取代, H248D取代, H248E取代, H248F取代, H248Y取代或H248W取代。

[0078] 氨基酸取代的组合

[0079] 在一些情况下, 本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%, 至少85%, 至少90%, 至少95%, 至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如, 约50%至约45%, 约45%至约35%,

约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%）的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中基于fHbp ID1的编号，所述变体fHbp包含选自以下的两个或更多的氨基酸取代：a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代；b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代；c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G)；d) 氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；和e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)。

[0080] 可以包括取代的组合，其中两个取代在不同的结构域中，并且各自独立地降低fH与fHbp的结合(例如，在N-末端结构域中的一个取代，与C端结构域中的氨基酸取代组合)。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在N-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在C-末端结构域内的第二氨基酸取代。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在N-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在N-末端结构域内的第二氨基酸取代。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在C-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在C-末端结构域内的第二氨基酸取代。

[0081] 例如，在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID1对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中基于fHbp ID 1的编号，所述变体fHbp包含：a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代和b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含：a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代，和c) 在氨基酸130用甘氨酸取代精氨酸(R130G)；或其中变体fHbp包含a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代和d) 在氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代，和e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)。

[0082] 作为另外的非限制性实例，在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，其中基于fHbp ID 1的编号，所述变体fHbp包含：b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代和c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G)；或其中变体fHbp包含b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代和d) 在氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代和e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)；或其中所述变体fHbp包含c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G)，和d) 在氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G)，和e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)；或其中变体fHbp包含d) 氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代和e) 在氨基酸

248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L)。

[0083] 作为另外的非限制性实例,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中基于fHbp ID 1的编号,所述变体fHbp包含:i) Q38R取代;和ii) R130G取代。

[0084] 本文还提供了变体fHbp蛋白,其包含相对于如上所述的fHbp ID1的氨基酸序列的一个或多个取代,并且还包含取代R41S。示例性变体fHbp包含相对于fHbp ID 1的R41S取代和在S223处的取代,例如R41S/S223R,或者相对于fHbp ID 1的R41S取代和H248L取代。在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:1具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中基于fHbp ID 1的编号,所述变体fHbp包含两个或更多个以下氨基酸取代:a) 在氨基酸41处用丝氨酸取代精氨酸(R41S);b) 在氨基酸223处用精氨酸取代丝氨酸(S223R);c) 在氨基酸248处用亮氨酸取代组氨酸(H248L)。

[0085] 本文还公开了变体fHbp蛋白,其包含相对于如上所述的fHbp ID 1的氨基酸序列的一个或多个取代,并且还包含US2011/0256180中公开的取代,其通过引用的方式整体并入本文。

[0086] fHbp ID 22的变体

[0087] 来源本公开的变体fHbp的“参照fHbp”在一些情况下是fHbp ID 22。fHbp ID 22的氨基酸序列如下所示。

[0088] fHbp ID 22:

[0089] CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGT YHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:2)。

[0090] 在一些情况下,本公开的变体fHbp是变体组2fHbp。在一些情况下,本公开的变体fHbp是变体组2fHbp,并且是模块组III fHbp。在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;其中变体fHbp相对于fHbp ID 22包含一个或多个氨基酸取代,使得变体fHbp表现出为fHbp ID 22对人fH结合亲和力的85%或更少的对人fH的亲合力,如变体fHbp表现出为fHbp ID 22对人fH亲和力的结合亲和力的约85%至约75%,约75%至约65%,约65%至约55%,约55%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%或约2%至约1%,或约1%至约

0.1%，或小于0.1%的对人fH的亲合力；并且当施用于哺乳动物宿主（例如人；或非人动物模型）时，变体fHbp诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性免疫应答。

[0091] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小（例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%）的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中相对于fHbp ID 22的氨基酸序列，变体fHbp包含选自以下至少一种的氨基酸取代：a) 在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺（N115I）；b) 在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸（D121G）；c) 在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸（S128T）；d) 131位处的缬氨酸（V131）的氨基酸取代；e) 219位处的赖氨酸（K219）的氨基酸取代；f) 220位处的甘氨酸（G220）的氨基酸取代。如本文所述，氨基酸残基的编号基于fHbp ID 1的编号。

[0092] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小（例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%）的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺（N115I）。例如，本公开的变体fHbp可以包含图25所示和SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。具有非极性，带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如缬氨酸，亮氨酸，赖氨酸，精氨酸，组氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可以在N115处取代。因此，例如，在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小（例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%）的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp相对于fHbp ID 22的氨基酸序列包含N115V取代，N115L取代，N115K取代，N115R取代，N115H取代，N115F取代，N115Y取代或N115W取代。

[0093] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小（例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%）的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸（D121G）。例如，本公开的变体fHbp可以包含图26所示和SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。具有非极性，带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，赖氨酸，精氨酸，组氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可

在D121处取代。因此,例如,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp相对于fHbp ID 22的氨基酸序列包含D121L取代,D121I取代,D121V取代,D121K取代,D121R取代,D121H取代,D121F取代,D121Y取代或D121W取代。

[0094] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp包含在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T)。例如,本公开的变体fHbp可以包含图27所示和SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在S128也可以取代具有极性,带电荷或芳族侧链的其它氨基酸,如甲硫氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,天冬氨酸,谷氨酸,赖氨酸,精氨酸,组氨酸,苯丙氨酸,酪氨酸或色氨酸。因此,例如,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中相对于fHbp ID 22的氨基酸序列,变体fHbp包含S128M取代,S128N取代,S128D取代,S128E取代,S128K取代,S128R取代,S128H取代,S128F取代,S128Y取代或S128W取代。

[0095] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp包含在131位处的缬氨酸(V131)的氨基酸取代。在一些情况下,fHbp变体包含V131D取代。具有带电荷或芳族侧链的其它氨基酸,如谷氨酸,赖氨酸,精氨酸,组氨酸,苯丙氨酸,酪氨酸或色氨酸也可以在该位置处取代。因此,例如,在一些情况下,fHbp变体包含V131E取代,V131K取代,V131R取代,V131H取代,V131F取代,V131Y取代或V131W取代。作为一个实例,本公开的变体fHbp可以包含相对于fHbp ID 22的氨基酸序列的图28所示和SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。

[0096] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,

至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含219位处的赖氨酸(K219)的氨基酸取代。在一些情况下，fHbp变体包含K219N取代。具有极性，带负电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如谷氨酰胺，天冬氨酸，谷氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可在该位置处取代。因此，例如，在一些情况下，fHbp变体包含K219Q取代，K219D取代，K219E取代，K219F取代，K219Y取代或K219W取代。作为一个实例，本公开的变体fHbp可以包含图29所示和SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0097] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含220位处的甘氨酸(G220)的氨基酸取代。在一些情况下，fHbp变体包含G220S取代。具有极性，带电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如天冬酰胺，谷氨酰胺，天冬氨酸，谷氨酸，赖氨酸，精氨酸，组氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可以在该位置处取代。因此，例如，在一些情况下，fHbp变体包含G220N取代，G220Q取代，G220D取代，G220E取代，G220K取代，G220R取代，G220H取代，G220F取代，G220Y取代或G220W取代。例如，本公开的变体fHbp可以包含图30所示和SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0098] 氨基酸取代的组合

[0099] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中相对于fHbp ID 22的氨基酸序列，所述变体fHbp包含选自以下的两个或更多个的氨基酸取代：a) 在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I)；b) 在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G)；c) 在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T)；d) 131位处的缬氨酸(V131)的氨基酸取代；e) 219位处的赖氨酸(K219)的氨基酸取代；f) 220位处的甘氨酸(G220)的氨基酸取代。如本文所述，残基的编号基于fHbp ID 1中氨基酸的编号。

[0100] 可以包括取代的组合，其中两个取代在不同的结构域中，并且各自独立地降低fH与fHbp的结合(例如，在N末端结构域中的一个取代，与C末端结构域中的氨基酸取代组合)。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在N-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在C-末端结构域内的第二氨基酸取代。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在N-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在N-末端结构域内的第二氨基酸取代。在一些情况下，在一些情况下，本

公开的变体fHbp包含在C-末端结构域内的第一氨基酸取代;和在C-末端结构域内的第二氨基酸取代。

[0101] 例如,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,其中相对于fHbp ID 22的氨基酸序列,基于fHbp ID 1的氨基酸序列的取代的残基的编号,所述变体fHbp包含:a)在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I),和b)在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G);或其中变体fHbp包含:a)在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I),和c)在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T);或其中变体fHbp包含:a)在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I),和d)在131位处的缬氨酸(V131)的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:a)在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I),和e)219位处的赖氨酸(K219)的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:a)在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I),和f)220位处的甘氨酸(G220)的氨基酸取代。

[0102] 作为另外的非限制性实例,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中相对于fHbp ID 22的氨基酸序列,所述变体fHbp包含:b)在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G),和c)在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T);或其中变体fHbp包含:b)在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G),和d)在131位处的缬氨酸(V131)的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:b)在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G),和e)219位处的赖氨酸(K219)的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:b)在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G),和f)220位处的甘氨酸(G220)的氨基酸取代。取代的残基的编号是基于fHbp ID 1的氨基酸序列的编号。

[0103] 作为另外的非限制性实例,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中相对于fHbp ID 22的氨基酸序列,所述变体fHbp包含:c)在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T),和d)在位置131处的缬氨酸(V131)的氨基酸替换;或其中变体fHbp包含:c)在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T),和e)219位处的赖氨酸(K219)的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:c)在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T),和f)

220位处的甘氨酸 (G220) 的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:d) 131位处的缬氨酸 (V131) 的氨基酸取代和e) 219位处的赖氨酸 (K219) 的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:d) 131位处的缬氨酸 (V131) 的氨基酸取代和f) 220位处的甘氨酸 (G220) 的氨基酸取代;或其中变体fHbp包含:e) 219位处的赖氨酸 (K219) 的氨基酸取代和f) 220位处的甘氨酸 (G220) 的氨基酸取代。取代的残基的编号是基于fHbp ID 1的氨基酸序列的编号。

[0104] 可以包括取代的组合,其中两个取代在不同的结构域中,并且各自独立地降低fH与fHbp的结合(例如,来自N-末端结构域的一个(例如,N115I,D121G,S128T或V131D)与来自C末端结构域的一个(例如,D211A,K219N,G220S)组合)。

[0105] 例如,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中所述变体fHbp包含:i) N115I取代;和ii) D211A取代。

[0106] 作为另一个实例,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp包含:i) N115I取代;和ii) K219N取代。

[0107] 作为另一个实例,在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲合力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp包含:i) N115I取代;和ii) G220S取代。

[0108] 本文中公开了与野生型fHbp ID22相比具有增加的热稳定性的变体fHbp多肽。在一些情况下,变体fHbp可以包含相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2) 的取代L130R和G133D,其中变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲合力结合人因子H (fH),其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答,并且所述变体具有比WT fHbp ID 22更高的热稳定性。变体fHbp的热稳定性可以比WT fHbp (例如fHbp ID 22) 高至少5°C,10°C,15°C,20°C,或更高,例如高5°C-30°C,5°C-25°C,5°C-20°C,10°C-20°C或15°C-20°C。如本文所用,“热稳定性”是指当暴露于较高温度时蛋白质的稳定性;热稳定性变体蛋白质在比野生型蛋白质更高的温度下保持其构象。例如,包含与野生型 (WT) fHbp (例如WT fHbp ID 22) 的热稳定性相比增加热稳定性的双重突变的变体fHbp可以在比WT fHbp更高的温度下解折

叠。在某些情况下,变体fHbp的N端结构域可以在比WT fHbp(例如,fHbp ID 22)的N端结构域更高的温度下解折叠。

[0109] 在某些实施方案中,公开了因子H结合蛋白(fHbp)的变体,其中相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2),所述变体包含氨基酸取代L130R和G133D以及至少一个以下取代:R80A, N115I, D121G, S128T, V131, D211A, E218A, K219(例如, K219N), G220(例如G220S), E248A, G236I, T221A和H223A,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲和力的50%或更低的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

[0110] 在一些情况下,变体fHbp可包括取代的组合,如L130R, G133D和选自以下的至少一种氨基酸取代:a) N115I; b) D121G; c) S128T; d) V131D; e) K219(例如, K219N); 和f) G220(例如, G220S),其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2),其中所述变体fHbp包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲和力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

[0111] 在某些实施方案中,公开了因子H结合蛋白(fHbp)的变体,其中相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2),所述变体包含氨基酸取代L130R和G133D和至少一个以下取代:R80A, D211A, E218A, E248A, G236I, T221A, 和H223A,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲和力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

[0112] 示例性变体fHbp包括多肽,其具有与SEQ ID NO:2具有大于85%的氨基酸序列同一性(例如,至少90%同一性,至少95%,至少96%同一性,至少97%同一性,至少98%同一性,至少99%同一性)的氨基酸序列,并且相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含以下取代:L130R和G133D; L130R, G133D和K219N; 或L130R, G133D, 和G220S。

[0113] 本文中公开了变体fHbp蛋白,其包含相对于如上所述的fHbp ID 22的氨基酸序列的一个或多个取代,并且还包含US2011/0256180中公开的取代,其通过引用的方式整体并入本文。

[0114] fHbp ID 55的变体

[0115] 来源本公开的变体fHbp的“参照fHbp”在一些情况下是fHbp ID 55。fHbp ID 55的氨基酸序列如下所示。

[0116] fHbp ID 55:

[0117] CSSGGGGSGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTSLAQGAEKTYGNGDSL NTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRRFRIGDIAGEHT SFDKLPKDV MATYRGTA FGSDDAGGKLT YTI DFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISG SVLYN QDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVETANGIHHIGLA AKQ (SEQ ID NO:3)。

[0118] 在一些情况下,本公开的变体fHbp是变体组I fHbp。在一些情况下,本公开的变体fHbp是变体组II fHbp,并且是模块组IV fHbp。

[0119] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:3具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;其中变体fHbp

相对于fHbp ID 55包含一个或多个氨基酸取代,使得变体fHbp表现出fHbp ID 55对人fH的结合亲和力的85%或更小的对人fH的亲和力,例如变体fHbp表现出fHbp ID 55对人fH的亲和力的结合亲和力的约85%至约75%,约75%至约65%,约65%至约55%,约55%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%的对人fH的亲和力;并且当施用于哺乳动物宿主(例如人;或非人动物模型)时,变体fHbp诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性免疫应答。

[0120] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID N0:3具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲和力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中相对于fHbp ID 55的氨基酸序列,所述变体fHbp包含选自以下至少一种的氨基酸取代:a) 92位处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代;b) 223位处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代;和c) 在248位处的组氨酸(H248)的氨基酸取代,其中氨基酸残基的编号基于fHbp ID 1的编号。

[0121] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID N0:3具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲和力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp包含位置92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代。在一些情况下,fHbp变体包含E92K取代。具有带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸,如精氨酸,组氨酸,苯丙氨酸,酪氨酸或色氨酸也可以在该位置处取代。因此,例如,在一些情况下,fHbp变体包含E92R取代,E92H取代,E92F取代,E92Y取代或E92W取代。作为一个实例,本公开的变体fHbp可以包含图31所示和SEQ ID N0:16所示的氨基酸序列。

[0122] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID N0:3具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲和力的50%或更小(例如,约50%至约45%,约45%至约35%,约35%至约25%,约25%至约15%,约15%至约10%,约10%至约5%,约5%至约2%,约2%至约1%,或约1%至约0.1%,或小于0.1%)的亲和力结合人fH,其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答,并且其中变体fHbp包含位置223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代。在一些情况下,fHbp变体包含S223R替换。具有带正电荷或芳族侧链的其它氨基酸,如赖氨酸,组氨酸,苯丙氨酸,酪氨酸或色氨酸也可在该位置处取代。因此,例如,在一些情况下,fHbp变体包含S223K取代,S223H取代,S223F取代,S223Y取代或S223W取代。作为一个实例,本公开的变体fHbp可以包含图32所示和SEQ ID N0:17所示的氨基酸序列。

[0123] 在一些情况下,本公开的变体fHbp包含与SEQ ID N0:3具有至少80%,至少85%,

至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中变体fHbp包含248位的组氨酸(H248)的氨基酸取代。在一些情况下，fHbp变体包含H248L取代。具有非极性，带负电荷或芳族侧链的其它氨基酸，如异亮氨酸，缬氨酸，天冬氨酸，谷氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸也可在该位置处取代。因此，例如，在一些情况下，fHbp变体包含H248I取代，H248V取代，H248D取代，H248E取代，H248F取代，H248Y取代或H248W取代。作为一个实例，本公开的变体fHbp可以包含图33所示和SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0124] 氨基酸取代的组合

[0125] 在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:3具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中相对于fHbp ID 55，所述变体fHbp包含两个或更多个选自以下的氨基酸取代：a) 92位处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代；b) 223位处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；和c) 在248位处的组氨酸(H248)的氨基酸取代，其中残基的编号基于fHbp ID 1的序列中氨基酸的编号。

[0126] 可以包括取代的组合，其中两个取代在不同的结构域中，并且各自独立地降低fH与fHbp的结合(例如，在N-末端结构域中的一个取代，与C结构域中的氨基酸取代的组合)。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在N-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在C-末端结构域内的第二氨基酸取代。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在N-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在N-末端结构域内的第二氨基酸取代。在一些情况下，本公开的变体fHbp包含在C-末端结构域内的第一氨基酸取代；和在C-末端结构域内的第二氨基酸取代。

[0127] 例如，在一些情况下，本公开的变体fHbp包含与SEQ ID NO:3具有至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的50%或更小(例如，约50%至约45%，约45%至约35%，约35%至约25%，约25%至约15%，约15%至约10%，约10%至约5%，约5%至约2%，约2%至约1%，或约1%至约0.1%，或小于0.1%)的亲合力结合人fH，其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答，并且其中相对于fHbp ID 55，变体fHbp包含：a) 92位处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代和b) 223位处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含：a) 92位处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代和c) 248位处的组氨酸(H248)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含：b) 223位处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代和c) 248位处的组氨酸(H248)的氨基酸取代；或其中变体fHbp包含：a) 92位处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代和b) 223位处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代，和c)，在248位处的组氨酸(H248)的氨基酸取代，其中残基的编号基于fHbp ID 1的序列中氨基酸的编号。

[0128] 本文还公开了变体fHbp蛋白，其包含相对于如上所述的fHbp ID 55的氨基酸序列

的一个或多个取代,并且还包含US2011/0256180中公开的取代,其通过引用的方式整体并入本文。

[0129] 融合多肽

[0130] 本公开的变体fHbp可以是融合多肽,例如包含如上所述的变体fHbp和异源多肽(例如,融合配偶体)的多肽。融合配偶体可以在变体fHbp的N末端,在变体fHbp的C末端,或在fHbp内的内部位点。

[0131] 合适的融合配偶体包括赋予体内增强的稳定性(例如,增加的血清半衰期)的肽和多肽;提供易于纯化,例如(His)_n,例如6His等;提供融合蛋白从细胞的分泌;提供表位标签,例如GST,血凝素(HA;例如YPYDVDPYA;SEQ ID NO:26),FLAG(例如DYKDDDDK;SEQ ID NO:27),c-myc(例如EQKLISEEDL;SEQ ID NO:28)等;提供可检测信号,例如产生可检测产物的酶(例如β-半乳糖苷酶,萤光素酶)或可自身检测的蛋白质,例如绿色荧光蛋白,黄色荧光蛋白等;提供多聚化,例如多聚化结构域,例如免疫球蛋白的Fc部分;等等。

[0132] 产生方法

[0133] 本公开的fHbp可以通过任何合适的方法产生,包括重组和非重组方法(例如化学合成)。当使用重组技术产生主题fHbp时,所述方法可涉及任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞,其可以是原核或真核细胞,通常是细菌或酵母宿主细胞,更通常是细菌细胞。将遗传物质引入宿主细胞的方法包括例如转化,电穿孔,接合,磷酸钙方法等。可以选择转移的方法以提供引入的编码fHbp的核酸的稳定表达。编码fHbp的核酸可以作为可遗传的游离元件(例如质粒)提供或者可以是基因组整合的。

[0134] 本公开提供了包含编码本公开的fHbp变体的核苷酸序列的核酸(包括分离的核酸)。在一些实施方案中,编码fHbp变体的核苷酸序列可操作地连接于转录控制元件,例如启动子。在一些情况下,启动子是组成性的。在一些情况下,启动子是诱导型的。在一些情况下,启动子适合用于原核宿主细胞(例如,在原核宿主细胞中有活性)。在一些情况下,启动子适合用于真核宿主细胞(例如,在真核宿主细胞中有活性)。

[0135] 在一些情况下,包含编码本公开的fHbp变体的核苷酸序列的核酸存在于表达载体中。本公开提供了包含编码本公开的fHbp变体的核苷酸序列的重组表达载体(例如,分离的重组表达载体)。在一些实施方案中,编码fHbp变体的核苷酸序列可操作地连接于转录控制元件,例如启动子。在一些情况下,启动子是组成性的。在一些情况下,启动子是诱导型的。在一些情况下,启动子适合用于原核宿主细胞(例如,在原核宿主细胞中有活性)。在一些情况下,启动子适合用于真核宿主细胞(例如,在真核宿主细胞中有活性)。

[0136] 用于转移编码fHbp的核酸的合适载体可以在组成上不同。整合载体可以是条件性复制或自杀质粒,噬菌体等。构建体可以包括各种元件,包括例如启动子,可选择的遗传标志物(例如赋予抗生素(例如卡那霉素,红霉素,氯霉素或庆大霉素)抗性的基因),复制起点(促进宿主细胞,例如细菌宿主细胞中的复制)等。载体的选择将取决于多种因素,例如其中需要增殖的细胞类型和增殖的目的。某些载体可用于扩增和制备大量的期望的DNA序列。其它载体适于在培养物中的细胞中表达。其它载体适合于在整个动物中的细胞中转移和表达。合适载体的选择完全在本领域的技术内。许多此类载体可商购获得。

[0137] 在一个实例中,载体是基于附加体质粒的表达载体,所述附加体质粒含有可选择的药物抗性标志物和提供在不同宿主细胞(例如在大肠杆菌和脑膜炎奈瑟氏球菌二者中)

中自主复制的元件。这种“穿梭载体”的一个实例是质粒pFP10 (Pagotto等人 (2000) Gene 244:13-19)。

[0138] 构建体(重组载体)可以通过例如将目标多核苷酸插入构建体主链中来制备,其通常依靠DNA连接酶附着到载体中切割的限制酶位点进行。或者,可以通过同源重组或位点特异性重组插入期望的核苷酸序列。通常,通过在期望的核苷酸序列的侧翼上附着与载体的同源区域来完成同源重组,而位点特异性重组可以通过使用促进位点特异性重组的序列(例如cre-lox,att位点,等等)来实现。可以通过例如寡核苷酸的连接或通过使用包含同源性区域和期望的核苷酸序列的一部分二者的引物的聚合酶链式反应来添加包含此类序列的核酸。

[0139] 载体可以在宿主细胞中提供染色体外维持,或者可以提供整合到宿主细胞基因组中。载体充分描述于本领域技术人员熟知的许多出版物中,包括例如Short Protocols in Molecular Biology, (1999) F. Ausubel等人编, Wiley&Sons。载体可以提供编码主题fHbp的核酸的表达,可以提供用于增殖主题核酸,或两者。

[0140] 可以使用的载体的实例包括但不限于来源自重组噬菌体DNA,质粒DNA或粘粒DNA的载体。例如,可以使用质粒载体如pBR322,pUC19/18,pUC118,119和M13 mp系列载体。pET21也是可以使用的表达载体。噬菌体载体可以包括λgt10,λgt11,λgt18-23,λZAP/R和EMBL系列噬菌体载体。可以利用的其它载体包括但不限于pJB8,pCV 103,pCV 107,pCV 108,pTM,pMCS,pNNL,pHSG274,COS202,COS203,pWE15,pWE16和charomid 9系列载体。

[0141] 对于主题fHbp的表达,可以采用表达盒。因此,本公开提供了包含主题核酸的重组表达载体。表达载体提供转录和翻译调节序列,并且可提供诱导型或组成性表达,其中编码区在转录起始区,以及转录和翻译终止区的转录控制下可操作地连接。这些控制区可以是来源主题fHbp的fHbp天然的,或可以源自外源来源。通常,转录和翻译调节序列可以包括但不限于启动子序列,核糖体结合位点,转录起始和终止序列,翻译起始和终止序列,以及增强子或激活子序列。启动子可以是组成性或诱导型,并且可以是强的组成性启动子(例如T7等)。

[0142] 表达载体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点,以提供编码感兴趣的蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中有效的选择标志物,以促进含有载体的细胞的选择。另外,表达构建体可以包括另外的元件。例如,表达载体可以具有一个或两个复制系统,因此允许其维持在生物体中,例如在用于表达的哺乳动物或昆虫细胞中和在用于克隆和扩增的原核宿主中。此外,表达构建体可以含有选择标志物基因以允许选择转化的宿主细胞。选择基因是本领域熟知的,并且将随所用的宿主细胞而变化。

[0143] 应当注意,本公开的fHbp可以包含另外的元件,如可检测标记物,例如放射性标记物,荧光标记物,生物素标记物,免疫学可检测标记物(例如血凝素标记物,多组氨酸标签)等。可以通过各种方法(例如,亲和捕获等)提供fHbp的额外元件以促进分离(例如,生物素标签,免疫可检测标签)。主题fHbp可以任选地通过共价或非共价附着固定在支持物上。

[0144] fHbp的分离和纯化可以根据本领域已知的方法完成。例如,可以通过免疫亲和纯化从经遗传修饰以表达fHbp的细胞的裂解物中或从合成反应混合物中分离fHbp,所述免疫亲和纯化通常涉及使样品与抗fHbp抗体(例如抗fHbp单克隆抗体抗体(mAb),如本领域已知的JAR 4MAb或其它合适的JAR MAb)接触,洗涤以除去非特异性结合的物质,以及洗脱特异

性结合的fHbp。分离的fHbp可以通过透析和蛋白质纯化方法中通常使用的其它方法进一步纯化。在一个实例中，fHbp可以使用金属螯合色谱分离。

[0145] 宿主细胞

[0146] 许多合适的宿主细胞中的任何一种可以用于fHbp的产生。一般而言，本文所述的fHbp可根据常规技术在原核生物或真核生物，例如细菌，如大肠杆菌或奈瑟氏球菌（例如脑膜炎奈瑟氏球菌）中表达。因此，本公开进一步提供了遗传修饰的体外宿主细胞，其含有编码主题fHbp的核酸。用于产生（包括大规模生产）主题fHbp的宿主细胞可以选自多种可用的宿主细胞中的任一种。用于表达的宿主细胞的实例包括原核或真核单细胞生物体的那些，如细菌（例如大肠杆菌菌株），酵母（例如酿酒酵母，毕赤酵母属物种等），并且可以包括最初来源于高等生物体，如昆虫，脊椎动物，例如哺乳动物的宿主细胞。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞（例如，美国典型培养物保藏中心（ATCC）编号CCL-2），CHO细胞（例如ATCC编号CRL9618，CCL61，CRL9096），293细胞（例如ATCC No. CRL-1573），Vero细胞，NIH 3T3细胞（例如ATCC No. CRL-1658），Huh-7细胞，BHK细胞（例如ATCC No. CCL10），PC12细胞（ATCC No. CRL1721），COS细胞，COS-7细胞（ATCC No. CRL1651），RAT1细胞，小鼠L细胞（ATCC No. CCL1.3），人胚胎肾（HEK）细胞（ATCC No. CRL1573），HLHepG2细胞等）。在一些情况下，细菌宿主细胞和酵母宿主细胞对于主题fHbp生产是特别感兴趣的。

[0147] 主题fHbp可以以基本上纯的或基本上分离的形式（即，基本上不含其它奈瑟氏球菌或宿主细胞多肽）或基本上分离的形式制备。主题fHbp可以存在于相对于可能存在的其它组分（例如，其它多肽或其它宿主细胞组分）富集多肽的组合物中。可以提供纯化的主题fHbp，使得多肽存在于基本上不含其它表达的多肽的组合物中，例如，由其它表达的多肽构成的组合物的小于90%，通常小于60%，更通常小于50%。

[0148] 用于囊泡生成的宿主细胞

[0149] 当要在膜囊泡中提供主题fHbp（如下文更详细讨论的）时，遗传修饰奈瑟氏球菌宿主细胞以表达主题fHbp。可以经修饰以产生主题fHbp，并且任选地产生或可以经修饰以产生其它感兴趣的抗原，如PorA的多种奈瑟氏球菌属物种菌株的任一种可以用于本文公开的方法中。

[0150] 提供奈瑟氏球菌菌株的遗传修饰和期望多肽的表达的方法和载体是本领域已知的。载体和方法的实例可以在W0 02/09746和O'Dwyer等人（2004）Infect Immun 72:6511-80中找到。强启动子，特别是组成性强启动子是特别感兴趣的。启动子的实例包括porA，porB，lbpB，tbpB，p110，hpuAB，lgtF，opa，p110，lst，hpuAB和rmp的启动子。

[0151] 致病性奈瑟氏球菌或源自致病性奈瑟氏球菌的菌株，特别是对于人致病性或源自对于人致病性或共生的菌株的菌株，对于用于膜囊泡产生是特别感兴趣的。奈瑟氏球菌的实例包括脑膜炎奈瑟氏球菌（*N.meningitidis*），浅黄奈瑟氏球菌（*N.flavescens*），淋病奈瑟氏球菌（*N.gonorrhoeae*），乳糖奈瑟氏球菌（*N.lactamica*），多糖奈瑟氏球菌（*N.polysaccharea*），灰色奈瑟氏球菌（*N.cinerea*），粘液奈瑟氏球菌（*N.mucosa*），淡黄色奈瑟氏球菌（*N.subflava*），干燥奈瑟氏球菌（*N.sicca*）、长形奈瑟氏球菌（*N.elongata*）等。

[0152] 脑膜炎奈瑟氏球菌菌株对于表达主题fHbp的遗传修饰和对于在囊泡产生中的用途是特别感兴趣的。用于囊泡产生的菌株可以根据可能期望的许多不同特征来选择。例如，可以根据以下选择菌株：期望的PorA类型（“血清亚型”），荚膜组，血清型等；减少的荚膜多

糖产生;等等。例如,产生菌株可以产生任何期望的PorA多肽,并且可以表达一种或多种PorA多肽(天然或由于遗传工程)。菌株的实例包括产生赋予P1.7,16;P1.19,15;P1.7,1;P1.5,2;P1.22a,14;P1.14;P1.5,10;P1.7,4;P1.12,13;以及此类PorA多肽的变体的血清亚型的PorA多肽的那些,所述变体可保留或不可保留与血清亚型分型中使用的常规血清学试剂的反应性。还感兴趣的是根据PorA可变区(VR)分型表征的PorA多肽(参见例如Russell等人(2004) *Emerging Infect Dis* 10:674-678;Sacchi CT等人(1998) *Clin Diagn Lab Immunol* 5:845-55;Sacchi等人(2000) *J. Infect Dis* 182:1169-1176)。已经鉴定了大量不同的VR类型,其可以分类为VR1和VR2家族“原型”。在neisseria.org/nm/typing/pora上可以找到描述此命名及其与以前的分型方案的关系的web可访问的数据库。在Russell等人(2004) *Emerging Infect Dis* 10:674-678中提供了某些PorA VR1和VR2类型的比对。

[0153] 或者或另外,产生菌株可以是荚膜缺陷型菌株。荚膜缺陷型菌株可以提供基于泡囊的疫苗,其提供在施用疫苗的受试者中引发显著的自身抗体应答(例如,由于产生与宿主细胞表面上的唾液酸交叉反应的抗体)的降低的风险。如本文所用,“荚膜缺陷型”或“荚膜多糖缺陷型”是指细菌表面上的荚膜多糖水平低于天然存在的菌株的水平,或者当菌株经遗传修饰时,其水平低于来源荚膜缺陷型菌株的亲本菌株的水平。荚膜缺陷型菌株包括表面荚膜多糖产量降低至少10%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,75%,80%,85%,90%或更多的菌株,并且包括其中在细菌表面上检测不到荚膜多糖的菌株(例如,通过使用抗荚膜多糖抗体的全细胞酶联免疫吸附测定(ELISA))。

[0154] 荚膜缺陷型菌株包括由于天然存在的或重组产生的遗传修饰而荚膜缺陷的那些。天然存在的荚膜缺陷菌株(参见例如Dolan-Livengood等人(2003) *J. Infect. Dis.* 187:1616-28),以及鉴定和/或产生荚膜缺陷型菌株的方法(参见例如Fisseha等人(2005) *Infect. Immun.* 73:4070-4080;Stephens等人(1991) *Infect Immun* 59:4097-102;Frosch等人(1990) *Mol Microbiol.* 4:1215-1218)是本领域中已知的。

[0155] 修饰奈瑟氏球菌宿主细胞以提供荚膜多糖的减少的产生可以包括修饰参与荚膜合成的一个或多个基因,其中所述修饰提供例如相对于修饰前的亲本细胞的降低的荚膜多糖水平。此类遗传修饰可以包括使得菌株荚膜变为缺陷(例如,由于一个或多个荚膜生物合成基因中的一个或多个插入,缺失,取代等)的一个或多个荚膜生物合成基因中的核苷酸和/或氨基酸序列的变化。荚膜缺陷型菌株可以缺乏一种或多种荚膜基因或对于一种或多种荚膜基因是非功能的。

[0156] 特别感兴趣的是唾液酸生物合成缺陷的菌株。此类菌株可以提供具有引发与人唾液酸抗原交叉反应的抗唾液酸抗体的降低风险的囊泡的产生,并且可以进一步提供改善的制造安全性。具有唾液酸生物合成缺陷(由于天然存在的修饰或工程化修饰)的菌株在唾液酸生物合成途径中的许多不同基因中的任一个中可以有缺陷的。特别感兴趣的是在由N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸2-差向异构酶基因(称为synX AAF40537.1或siaA AAA20475)编码的基因产物中有缺陷的菌株,其中该基因失活的菌株是特别感兴趣的。例如,在一个实施方案中,通过破坏功能性synX基因产物的产生来产生荚膜缺陷型菌株(参见例如Swartley等人(1994) *J Bacteriol.* 176:1530-4)。

[0157] 荚膜缺陷型菌株也可以使用非重组技术从天然存在的菌株产生,例如通过使用杀菌性抗荚膜抗体来选择具有降低水平的荚膜多糖的菌株。

[0158] 当本公开涉及使用两种或更多种菌株(例如,产生含有来自不同菌株的主题fHbp呈递泡囊的抗原组合物)时,可以选择菌株,以在一种或多种菌株特征方面不同,例如,以提供在所使用的主题fHbp, PorA等中不同的囊泡。

[0159] 囊泡的制备

[0160] 本公开涵盖的抗原性组合物通常包括从表达主题fHbp的奈瑟氏球菌细胞制备的囊泡。如本文中提及,“囊泡”意图涵盖外膜囊泡以及微囊泡(其也称为水泡)。

[0161] 抗原组合物可以含有从脑膜炎奈瑟氏球菌的培养菌株的外膜制备的外膜囊泡(OMV),所述脑膜炎奈瑟氏球菌经遗传修饰以表达主题fHbp。OMV可以从在肉汤或固体培养基培养物中培养的脑膜炎奈瑟菌获得,优选通过从培养基中分离细菌细胞(例如通过过滤或通过使细胞沉淀的低速离心等),裂解细胞(例如,例如通过加入去污剂,渗透压休克,超声处理,空化,均质化等),并将外膜级分与细胞质分子分离(例如通过过滤;或通过外膜和/或外膜囊泡的差异沉淀或聚集,或通过使用特异性识别外膜分子的配体的亲和分离方法;或通过沉淀外膜和/或外膜囊泡等的高速离心);外膜级分可用于产生OMV。

[0162] 抗原性组合物可以含有包含主题fHbp的微囊泡(MV)(或“水泡”),其中在培养经遗传修饰以表达主题fHbp的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的培养过程中释放MV或水泡。例如,可以通过在肉汤培养基中培养脑膜炎奈瑟氏球菌菌株,从培养基中分离全细胞(例如通过过滤,或通过低速离心,其仅使细胞而非水泡等沉淀),然后收集存在于无细胞培养基中的MV(例如通过过滤,MV的差异沉淀或聚集,或通过使水泡沉淀的高速离心等)。用于产生MV的菌株通常可以基于培养物中产生的水泡量来选择(例如,细菌可以以合理数量培养以提供适于在本文所述的方法中分离和施用的水泡)。在PCT公开号W0 01/34642中描述了产生高水平水泡的示例性菌株。除了水泡产生之外,还可以基于NspA产生来选择用于MV产生的菌株,其中产生更高水平的NspA的菌株可能是特别感兴趣的(对于具有不同NspA产生水平的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的实例,参见例如Moe等人(1999 *Infect. Immun.* 67:5664)。用于在产生水泡中的用途的其它感兴趣的菌株包括具有灭活的GNA33基因的菌株,所述基因编码细胞分离,膜结构和毒力所需的脂蛋白(参见,例如,Adu-Bobie等(2004) *Infect Immun.* 72:1914-1919)。

[0163] 本公开的抗原性组合物可以含有来自一个菌株或来自2、3、4、5或更多种菌株的囊泡,所述菌株可以彼此同源或异源,通常是异源的。例如,菌株相对于PorA和/或来源主题fHbp的fHbp可以是同源或异源的。囊泡可以由表达多于一种主题fHbp(例如,1、2、3或更多种主题fHbp)的菌株制备,所述主题fHbp可以由来自不同变体(v.1, v.2或v.3)或子变体(例如, v.1, v.2或v.3的子变体)的fHbp氨基酸序列组成。

[0164] 抗原性组合物可以包含呈现相同或不同主题fHbp的OMV和MV的混合物,其中主题fHbp可以任选地呈现来自fHbp变体和/或子变体的不同组合的表位,并且其中OMV和/或MV可以是来自相同或不同的菌株。来自不同菌株的囊泡可以作为混合物施用,或者可以连续施用。

[0165] 当期望时(例如,当用于产生囊泡的菌株与内毒素或特定高水平的内毒素相关时),任选地对囊泡进行处理以降低内毒素,例如降低施用后的毒性。尽管如下讨论不太期望,内毒素的减少可以通过用合适的去污剂(例如BRIJ-96,脱氧胆酸钠,月桂酰肌氨酸钠,Empigen BB, Triton X-100,非离子型去污剂TWEEN 20(脱水山梨醇单月桂酸酯聚氧乙烯

(sorbitan monolaurate polyoxyethylene)), 非离子型去污剂TWEEN 80, 浓度为0.1-10%, 例如0.5-2%, 和十二烷基硫酸钠(SDS))。当使用去污剂提取时, 优选使用脱氧胆酸盐以外的去污剂。

[0166] 抗原性组合物的囊泡可以在没有去污剂的情况下制备, 例如不使用脱氧胆酸盐。尽管去污剂处理可用于去除内毒素活性, 但其可通过在囊泡产生期间提取而耗尽天然fHbp脂蛋白和/或主题fHbp(包括脂化的fHbp)。因此, 可能特别期望使用不需要去污剂的技术来降低内毒素活性。在一种方法中, 使用相对低的内毒素(脂多糖, LPS)生产菌的菌株, 以避免在用于人之前从最终制剂中除去内毒素的需要。例如, 囊泡可以从奈瑟氏球菌突变体制备, 其中减少或消除疫苗(例如Rmp)中可能不需要的脂寡糖或其它抗原。

[0167] 囊泡可以从含有导致脂质A的降低或检测不到的毒性活性的遗传修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株制备。例如, 此类菌株可以在脂质A生物合成中遗传修饰(Steeghs等人(1999) *Infect Immun* 67:4988-93; van der Ley等人(2001) *Infect Immun* 69:5981-90; Steeghs等人(2004) *J Endotoxin Res* 10:113-9; Fissaha等人(2005) *Infect Immun* 73:4070)。免疫原性组合物可以通过LPS的修饰来解毒, 如分别由lpxL1或lpxL2编码的酶的下调和/或失活。在lpxL1突变体中制备的五酰化脂质A的产生表明由lpxL1编码的酶在GlcN II的2'位置将C12添加到N-连接的3-OH C14。在lpxL2突变体中发现的主要脂质A种类是四酰化的, 表明由lpxL2编码的酶添加另一个C12, 即, 添加到GlcN I的2位处的N-连接的3-OH C14。导致减少(或无)这些基因的表达(或这些基因的产物的活性降低或没有活性)的突变导致脂质A的毒性活性改变(van der Ley等人(2001) *Infect Immun* 69:5981-90)。四酰化(lpxL2突变体)和五酰化(lpxL1突变体)脂质A的毒性低于野生型脂质A。脂质A 4'-激酶编码基因(lpxK)中的突变也降低脂质A的毒性活性。用于产生囊泡(例如, MV或OMV)的特别感兴趣的是脑膜炎奈瑟氏球菌菌株, 其经遗传修饰以提供减少的或检测不到的功能性LpxL1编码的蛋白质, 例如, 其中奈瑟氏球菌细菌(例如脑膜炎奈瑟氏球菌菌株)被遗传修饰以提供lpxL1基因的基因产物的降低的活性或无活性。例如, 奈瑟氏球菌细菌可以被遗传修饰以具有lpxL1基因敲除, 例如, 其中lpxL1基因被破坏。参见例如美国专利公开号2009/0035328。奈瑟氏球菌细菌可以被遗传修饰以提供lpxL2基因的基因产物的降低的活性或无活性。奈瑟氏球菌细菌可以被遗传修饰以提供lpxL1基因和lpxL2基因的基因产物的活性降低或无活性。与对于LPS产生而言野生型的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株相比, 此类囊泡提供了降低的毒性, 同时保留主题fHbp的免疫原性。

[0168] LPS毒性活性也可以通过在涉及多粘菌素B抗性的基因/基因座中引入突变来改变(这种抗性已经与在脂质A的4'磷酸上添加氨基阿拉伯糖相关)。这些基因/基因座可以是编码UDP-葡萄糖脱氢酶的pmrE, 或许多肠杆菌科(enterobacteriaceae)共有的抗微生物肽抗性基因的区域, 其可能参与氨基阿拉伯糖的合成和转移。存在于该区域中的基因pmrF编码多萜醇磷酸甘露糖基转移酶(Gunn J.S., Kheng, B.L., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I. 1998. *Mol. Microbiol.* 27:1171-1182)。

[0169] PhoP-PhoQ调节系统(其是磷酸中继(phospho-relay)双组分调节系统(例如PhoP组成性表型, PhoPc))中的突变, 或低Mg⁺⁺环境或培养条件(其激活PhoP-PhoQ调节系统)导致4'-磷酸酯上的氨基阿拉伯糖的添加和2-羟基肉豆蔻酸酯代替肉豆蔻酸酯(肉豆蔻酸酯的羟基化)。该修饰的脂质A显示刺激人内皮细胞的E-选择蛋白表达和从人单核细胞分泌TNF

的降低的能力。

[0170] 多粘菌素B抗性菌株也适合使用,因为此类菌株已显示具有降低的LPS毒性(参见例如van der Ley等(1994)于:Proceedings of the ninth international pathogenic Neisseria conference.The Guildhall,Winchester,England)。或者,可以将模拟多粘菌素B的结合活性的合成肽添加到抗原组合物以降低LPS毒性活性(参见,例如,Rustici等人(1993)Science 259:361-365;Porro等人(1998)Prog Clin Biol Res.397:315-25)。

[0171] 内毒素也可以通过选择培养条件来减少。例如,在每升培养基中含有0.1mg-100mg氨基阿拉伯糖的生长培养基中培养菌株提供降低的脂质毒性(参见例如W0 02/097646)。

[0172] 组合物和配制剂

[0173] 为了方便起见,本文中使用“组合物”,“抗原组合物”,“抗原性组合物”或“免疫原性组合物”,一般指包含如本文中公开的主题fHbp的组合物,所述主题fHbp可任选是缀合的,以进一步增强免疫原性。本公开特别涵盖用于引发抗体的组合物,例如针对脑膜炎奈瑟氏球菌的抗体,例如针对脑膜炎奈瑟氏球菌的杀菌性抗体。抗原性组合物可以含有1、2或更多种不同的主题fHbp。当有多于一种类型的fHbp时,每种主题fHbp可以呈现来自fHbp变体和/或子变体的不同组合的表位。

[0174] 抗原性组合物含有免疫有效量的主题fHbp,并且根据需要还可包含其它相容性组分。本公开的组合物可以含有作为低fH结合剂的fHbp。该组合物含有一种或多种fHbp,其中至少一种fHbp是低fH结合物。当组合物中存在多于一种fHbp时,每种fHbp可以是不同的(例如在氨基酸序列和/或缀合中)。

[0175] 在一些情况下,本公开的抗原性组合物仅包含本公开的一种fHbp变体。在一些情况下,本公开的抗原性组合物包含本公开的两种或更多种不同的fHbp变体。作为非限制性实例,在一些情况下,本公开的抗原组合物包含:

[0176] 1) fHbp ID 1的第一变体,其中第一fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);和fHbp ID 1的第二变体,其中第二fHbp ID 1变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);

[0177] 2) fHbp ID 1的第一变体,其中第一fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);和fHbp ID 1的第二变体,其中第二fHbp ID 1变体包含在R130处的氨基酸取代(例如,R130G);

[0178] 3) fHbp ID 1的第一变体,其中第一fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);和fHbp ID 1的第二变体,其中第二fHbp ID 1变体包含在S223处的氨基酸取代(例如,S223R);

[0179] 4) fHbp ID 1的第一变体,其中第一fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);和fHbp ID 1的第二变体,其中第二fHbp ID 1变体包含H248处的氨基酸取代(例如H248L);

[0180] 5) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在N115处的氨基酸取代(例如,N115I);和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);

[0181] 6) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在D121处的氨基酸取代(例如,D121G);和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);

[0182] 7) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在S128处的氨基酸取代(例如,

S128T);和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含H248处的氨基酸取代(例如H248L);

[0183] 8) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在V131处的氨基酸取代(例如V131D);和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);

[0184] 9) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在K219处的氨基酸取代(例如,K219N);和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);

[0185] 10) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在G220处的氨基酸取代(例如,G220S);和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含在Q38处的氨基酸取代(例如,Q38R);

[0186] 11) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在N115处的氨基酸取代(例如,N115I);和fHbp ID 55的变体,其中fHbp ID 55变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);

[0187] 12) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在D121处的氨基酸取代(例如,D121G);和fHbp ID 55的变体,其中fHbp ID 55变体包含S223处的氨基酸取代(例如,S223R);

[0188] 13) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在S128处的氨基酸取代(例如,S128T);和fHbp ID 55的变体,其中fHbp ID 55变体包含H248处的氨基酸取代(例如H248L);

[0189] 14) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在V131处的氨基酸取代(例如V131D);和fHbp ID 55的变体,其中fHbp ID 55变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);

[0190] 15) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在K219处的氨基酸取代(例如,K219N);和fHbp ID 55的变体,其中fHbp ID 55变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);

[0191] 16) fHbp ID 22的变体,其中fHbp ID 22变体包含在G220处的氨基酸取代(例如,G220S);和fHbp ID 55的变体,其中fHbp ID 55变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);

[0192] 17) fHbp ID 1的第一变体,其中第一fHbp ID 1变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);和fHbp ID 1的第二变体,其中第二fHbp ID 1变体包含H248处的氨基酸取代(例如H248L);

[0193] 18) fHbp ID 1的第一变体,其中第一fHbp ID 1变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);和fHbp ID 1的第二变体,其中第二fHbp ID 1变体包含在S223处的氨基酸取代(例如,S223R);

[0194] 19) fHbp ID 22的第一变体,其中第一fHbp ID 22变体包含在N115处的氨基酸取代(例如,N115I);和fHbp ID 22的第二变体,其中第二fHbp ID 22变体包含在D211处的氨基酸取代(例如,D211A);

[0195] 20) fHbp ID 22的第一变体,其中第一fHbp ID 22变体包含在N115处的氨基酸取代(例如,N115I);和fHbp ID 22的第二变体,其中第二fHbp ID 22变体包含在K219处的氨基酸取代(例如,K219 N);

[0196] 21) fHbp ID 22的第一变体,其中第一fHbp ID 22变体包含在N115处的氨基酸取代(例如,N115I);和fHbp ID 22的第二变体,其中第二fHbp ID 22变体包含在G220处的氨

基酸取代(例如,G220S);

[0197] 22) fHbp ID 22的第一变体,其中第一fHbp ID 22变体包含在D121处的氨基酸取代(例如,D121G);和fHbp ID 22的第二变体,其中第二fHbp ID 22变体包含在G220处的氨基酸取代(例如,G220S);

[0198] 23) fHbp ID 22的第一变体,其中第一fHbp ID 22变体包含在S128处的氨基酸取代(例如,S128T);和fHbp ID 22的第二变体,其中第二fHbp ID 22变体包含在G220处的氨基酸取代(例如,G220S);

[0199] 24) fHbp ID 22的第一变体,其中第一fHbp ID 22变体包含V131处的氨基酸取代(例如V131D);和fHbp ID 22的第二变体,其中第二fHbp ID 22变体包含在G220处的氨基酸取代(例如,G220S);

[0200] 25) fHbp ID 55的第一变体,其中第一fHbp ID 55变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);和fHbp ID 55的第二变体,其中第二fHbp ID 55变体包含在S223处的氨基酸取代(例如,S223R);

[0201] 26) fHbp ID 55的第一变体,其中第一fHbp ID 55变体包含在E92处的氨基酸取代(例如,E92K);和fHbp ID 55的第二变体,其中第二fHbp ID 55变体包含H248处的氨基酸取代(例如H248L);

[0202] 27) fHbp ID 22的变体,其包含氨基酸取代:L130R和G133D,和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含S223处的氨基酸取代(例如S223R);

[0203] 28) fHbp ID 22的变体,其包含氨基酸取代:L130R和G133D,和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含在H248处的氨基酸取代(例如H248L);

[0204] 29) fHbp ID 22的变体,其包含氨基酸取代:L130R,G133D和K219N,和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含S223处的氨基酸取代(例如S223R)或H248(例如H248L);或

[0205] 30) fHbp ID 22的变体,其包含氨基酸取代:L130R,G133D和G220S,和fHbp ID 1的变体,其中fHbp ID 1变体包含S223处的氨基酸取代(例如S223R)或H248(例如H248L)。

[0206] 本公开涵盖的免疫原性组合物包括但不限于包含以下的组合物:

[0207] 1) 本公开的至少一种变体fHbp;和

[0208] 2) NspA;

[0209] 其中fHbp和/或NspA可以作为重组蛋白和/或在基于囊泡的组合物(例如,OMV或MV)中提供。应当注意,当组合物包含NspA和fHbp二者时,通过施用组合物引起的抗体的杀菌性活性可以源自针对一种或两种抗原的抗体的协作。本公开提供的免疫原性组合物的实例包括:

[0210] a) 免疫原性组合物,其包含如上所述的fHbp变体(例如,其中变体fHbp引发对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答);

[0211] b) 免疫原性组合物,其包含如上所述的fHbp变体(例如,其中变体fHbp引发对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答);和重组NspA蛋白;

[0212] c) 免疫原性组合物,其包含从遗传修饰的奈瑟氏球菌宿主细胞获得的天然OMV,所述宿主细胞用编码本公开的变体fHbp的核酸进行遗传修饰,使得编码的变体fHbp由遗传修饰的宿主细胞产生,其中所述OMV包含编码的变体fHbp;和

[0213] d) 免疫原性组合物,其包含从遗传修饰的奈瑟氏球菌宿主细胞获得的天然OMV,所

述宿主细胞用编码本公开的变体fHbp的核酸进行遗传修饰,使得编码的非天然存在的fHbp由遗传修饰的宿主细胞产生,其中所述OMV包含编码的变体fHbp;并且其中奈瑟氏球菌宿主细胞还产生更高水平的NspA,使得OMV还包含NspA。例如,奈瑟氏球菌宿主细胞可以是经遗传修饰以实现增加的NspA表达的细胞。

[0214] “免疫有效量”是指以单剂,作为一系列相同或不同抗原性组合物的一部分向个体施用所述量有效引发抗体应答,其有效治疗或预防由例如奈瑟氏球菌属,特别是脑膜炎奈瑟氏球菌感染,更特别是B型脑膜炎奈瑟氏球菌感染引起的症状或疾病。此量随待治疗的个体的健康和身体状况,年龄,个体免疫系统产生抗体的能力,期望的保护程度,疫苗的配制剂,治疗临床医生对医疗状况的评估,和其它相关因素而变化。预期所述量将落在可以通过常规试验确定的相对宽的范围。

[0215] NspA多肽的氨基酸序列是本领域中已知的。参见例如WO 96/29412;和Martin等人(1997) J. Exp. Med. 185:1173; GenBank登录号U52066;和GenBank登录号AAD53286。“NspA多肽”可包含与在图40中所描绘并且SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的约75个氨基酸至约100个氨基酸,约100个氨基酸至约150个氨基酸或约150个氨基酸至约174个氨基酸的连续区段具有至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约98%,至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。“NspA多肽”可以包含与图40中描绘和SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列的氨基酸20至174的约75个氨基酸至约100个氨基酸,或约100个氨基酸至约155个氨基酸的连续区段具有至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约98%,至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,NspA多肽缺少信号序列;在其它情况下(例如,为了在宿主细胞中表达),NspA多肽包含信号序列。

[0216] 剂量方案可以是单剂日程表或多剂日程表(例如,包括加强剂量),其中在不同时间施用抗原性组合物的单位剂型。如本文所用,术语“单位剂型”是指适合作为人和动物受试者的单位剂量的物理上分散的单位,每个单位以足以产生期望的效果的量含有预定量的本公开的抗原组合物,所述组合物与药学上可接受的赋形剂(例如,药学上可接受的稀释剂,载体或赋形剂)联合提供。抗原性组合物可以与其它免疫调节剂联合施用。

[0217] 抗原性组合物可以在药学上可接受的赋形剂中提供,所述赋形剂可以是溶液,如无菌水溶液,通常是盐水溶液,或者它们可以以粉末形式提供。若期望的话,此类赋形剂可以是基本上惰性的。

[0218] 在一些实施方案中,主题免疫原性组合物包含存在于囊泡中的主题fHbp。在一些实施方案中,主题免疫原性组合物包含MV中存在的主题fHbp。在一些实施方案中,主题免疫原性组合物包含存在于OMV中的主题fHbp。在一些实施方案中,主题免疫原性组合物包含MV和OMV的混合物,其包含主题fHbp。上文描述了囊泡,如MV和OMV。

[0219] 抗原性组合物可以进一步含有佐剂。可用于人的已知合适的佐剂的实例包括但不限于铝佐剂(例如磷酸铝或氢氧化铝),MF59(4.3%w/v角鲨烯,0.5%w/v Tween 80TM, 0.5%w/v Span 85),含CpG的核酸(其中胞嘧啶是未甲基化的),QS21,MPL,3DMPL,来自Aquilla的提取物,ISCOMS,LT/CT突变体,聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒,Quil A,白细胞介素等。对于实验动物,可以使用弗氏佐剂(弗氏不完全佐剂;完全弗氏佐剂),N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP),N-乙酰基-去甲-胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺(CGP11637,称为去甲-MDP)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺

基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 19835A,称为MTP-PE)和RIBI,其在2%角鲨烯/Tween 80乳剂中含有从细菌提取的三种组分,即单磷酰脂质A,海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)。可以通过测量针对免疫原性抗原或其抗原性表位的抗体的量来确定佐剂的有效性。

[0220] 用于增强组合物有效性的其它示例性佐剂包括但不限于:(1)水包油乳液配制剂(具有或不具有其它特异性免疫刺激剂,如胞壁酰肽(见下文)或细菌细胞壁组分),如例如(a)含有5%角鲨烯,0.5%Tween 80和0.5%Span 85(任选地含有MTP-PE)的MF59(WO 90/14837;Vaccine design中的第10章:the subunit and adjuvant approach,Powell和Newman编,Plenum Press 1995),其使用微流化器配制成亚微米颗粒,(b)含有10%角鲨烷,0.4%Tween 80、5%普朗尼克(pluronic)封闭聚合物L121和thr-MDP的SAF,其微流化为亚微米乳液或涡旋以产生较大粒度的乳液,和(c)含有2%角鲨烯,0.2%Tween 80和一个或多个细菌细胞壁,如单磷脂A(MPL),海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)的RIBI佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem,Hamilton,Mont.),例如MPL+CWS(Detox™);(2)可以使用皂苷佐剂,如QS21或Stimulon™(Cambridge Bioscience,Worcester,Mass.)或由其产生的颗粒,例如ISCOM(免疫刺激复合物),所述ISCOMS可以不含额外的去污剂,例如WO 00/07621;(3)完全弗氏佐剂(CFA)或不完全弗氏佐剂(IFA);(4)细胞因子,如白细胞介素(例如IL-1,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-12(WO99/44636)等),干扰素(例如γ干扰素),巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),肿瘤坏死因子(TNF)等;(5)单磷酰脂质A(MPL)或3-O-脱酰化MPL(3dMPL),例如GB-2220221,EP-A-0689454,任选在基本上不存在明矾中在与肺炎球菌糖一起使用时,例如WO 00/56358;(6)3dMPL与例如QS21和/或水包油乳液的组合,例如,EP-A-0835318,EP-A-0735898,EP-A-0761231;(7)包含CpG基序的寡核苷酸(参见例如WO 98/52581),例如含有至少一个CG二核苷酸的寡核苷酸,其中胞嘧啶是未甲基化的;(8)聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯(参见例如WO 99/52549);(9)聚氧乙烯脱水山梨醇酯表面活性剂与辛苯聚醇(octoxynol)的组合(WO 01/21207)或聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂与至少一种别的非离子型表面活性剂,如辛苯聚醇的组合(WO 01/21152)(10)皂苷和免疫刺激性寡核苷酸(例如CpG寡核苷酸)(WO 00/62800);(11)免疫刺激剂和金属盐颗粒,例如WO 00/23105;(12)皂苷和水包油乳剂,例如WO 99/11241;(13)皂苷(例如QS21)+3dMPL+IM2(任选地+固醇),例如WO 98/57659;(14)充当免疫刺激剂以增强组合物功效的其它物质。胞壁酰肽包括N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸基-D-异谷氨酸(thr-MDP),N-25乙酰基-去甲胞壁酰-L-丙氨酸基-D-异谷氨酸胺(去甲-MDP),N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酸胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰--sn-甘油基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺MTP-PE)等。适合于对人施用的佐剂是特别感兴趣的。在一些情况下,佐剂是铝盐佐剂(例如磷酸铝或氢氧化铝)。

[0221] 抗原组合物可以含有其它组分,如药物级的甘露醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,滑石,纤维素,葡萄糖,蔗糖,镁,碳酸盐等。根据需要,组合物可含有药学上可接受的辅助物质,以接近生理条件,如pH调节和缓冲剂,毒性调节剂等,例如乙酸钠,氯化钠,氯化钾,氯化钙,乳酸钠等。

[0222] 配制剂中主题fHbp的浓度可以广泛地变化(例如,按重量计,从小于约0.1%,例如,处于或至少约2%至多达20%至50%或更多),并且将通常主要基于根据所选择的具体施用模式和患者需要的液体体积,粘度和基于患者的因素进行选择。

[0223] 含有fHbp的配制剂可以以溶液, 悬浮液, 片剂, 丸剂, 胶囊, 粉末, 凝胶, 乳膏, 洗剂, 软膏剂, 气雾剂等的形式提供。认识到口服施用可能需要保护组合物免于消化。这通常通过将组合物与使其抗酸和酶水解的试剂结合或通过组合物包装在有适当抗性的载体中来实现。防止消化的方法是本领域中熟知的。

[0224] 还可以提供含fHbp的配制剂, 以便在施用后增加fHbp的血清半衰期。例如, 当将分离的fHbp配制用于注射时, fHbp可以在脂质体制剂中提供, 制备为胶体或用于延长血清半衰期的其它常规技术。多种方法可用于制备脂质体, 如例如Szoka等人, Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467 (1980), 如美国专利号4,235,871、4,501,728和4,837,028。制剂还可以以受控释放或缓慢释放形式提供。

[0225] 诱导免疫应答的方法

[0226] 本公开提供了在哺乳动物宿主中诱导对至少一种奈瑟氏球菌菌株的免疫应答的方法。所述方法通常涉及向有需要的个体施用有效量的主题免疫原性组合物。

[0227] 通常将含有fHbp的抗原性组合物施用于处于获得奈瑟氏球菌疾病风险的人类受试者, 以预防或至少部分阻止疾病及其并发症的发展。足以实现这点的量定义为“治疗有效剂量”。对治疗施加有效的量将取决于例如抗原性组合物, 施用方式, 患者的体重和一般健康状况, 以及主治内科医生的判断。可以根据患者需要和耐受的剂量和频率以及施用途径施用单剂或多剂的抗原性组合物。

[0228] 含有fHbp的抗原性组合物通常以有效引发宿主中的免疫应答, 特别是体液免疫应答, 例如杀菌性抗体应答的量施用。如上所述, 免疫的量将变化, 并且通常可以为每70kg患者约1 μ g至100 μ g, 通常为5 μ g至50 μ g/70kg。基本上较高的剂量(例如10mg至100mg或更多)可以适合于口服, 鼻或局部给药途径。初始施用之后可以加强免疫相同的含有不同fHbp的抗原性组合物。在一些情况下, 疫苗接种涉及至少一种加强剂, 在一些情况下包括两种加强剂。

[0229] 一般而言, 免疫可以通过任何合适的途径施用, 包括在含或不含添加的赋形剂的情况下口服, 鼻内, 鼻咽, 胃肠外, 肠内, 胃, 局部, 经皮, 皮下, 肌肉内, 以片剂, 固体, 粉末, 液体, 气雾剂形式, 局部或全身施用组合物。用于制备可胃肠外施用的组合物的实际方法是本领域技术人员已知或显而易见的, 并且在例如Remington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)的出版物中更详细地描述。

[0230] 抗fHbp免疫应答可以通过已知的方法评估(例如通过在初始免疫之前和之后从个体获得血清, 并证明个体免疫状态的变化, 例如免疫沉淀测定, ELISA或杀菌测定, 蛋白质印迹测定或流式细胞术测定等)。

[0231] 本公开的变体fHbp是否在哺乳动物宿主中引起对脑膜炎奈瑟氏球菌的一种或多种菌株的杀菌应答可以使用任何公知的测定法来确定。例如, 可以使用人fH转基因小鼠, 其中小鼠表达人fH(例如, 人fH以约100 μ g/ml或大于100 μ g/ml的浓度存在于小鼠血清中)。将本公开的变体fHbp施用于人fH转基因小鼠。在一段时间后, 测试来自小鼠的血清的针对一种或多种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌活性。合适的对照包括例如fHbp ID 1。合适的测定法的实例描述于Vu等人(2012) Sci.Reports 2:341。

[0232] 可以将抗原性组合物施用于就脑膜炎奈瑟菌而言免疫学活性的哺乳动物宿主(例如人受试者)。在一个具体的实施方案中, 受试者是约5岁以下, 优选地约2岁龄以下的人儿

童,并且抗原性组合物在以下时间中的任何一个或多个时间施用:出生后的2周,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月,或1年或15、18或21个月,或2、3、4或5岁龄。

[0233] 通常可能期望在疾病症状的第一种体征之前或在可能或实际暴露于感染或疾病(例如,由于奈瑟氏球菌的暴露或感染)的第一种体征时启动免疫。

[0234] 实施例

[0235] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开和描述,并且不旨在限制本发明人视为其发明的范围,它们也不旨在表示以下实验是所进行的全部或唯一的实验。已经做出努力以确保关于使用的数字(例如量,温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是以摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。可以使用标准缩写,例如bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌内的(地);i.p.,腹膜内的(地);s.c.,皮下的(地);等等。

[0236] 实施例1:fHbp ID 1突变体的鉴定和表征

[0237] 材料和方法

[0238] 文库筛选

[0239] 通过易错聚合酶链式反应(PCR)产生随机突变fHbp文库,随后将PCR产物克隆到pET28表达质粒中,所述pET28表达质粒包括允许在大肠杆菌上表面展示的信号序列。使用荧光激活的细胞分选来分离具有人fH的低结合和对照抗fHbp单克隆抗体的高结合的突变体克隆,其确保fHbp突变体的充分表达和正确折叠。将收集的细胞铺于琼脂平板(含有50μg/ml硫酸卡那霉素的LB琼脂)上,在37℃下温育过夜。使用单个大肠杆菌菌落作为PCR扩增的模板,并且纯化DNA扩增子(PCR纯化试剂盒;Qiagen),并经受使用与T7启动子和T7终止子退火的引物进行的fHbp基因的DNA测序。筛选随机突变体fHbp文库的方法具有鉴定以下的潜力:1)影响fH结合的位置,其不能从单独的晶体结构预测;和2)除丙氨酸以外的取代,其在丙氨酸取代不会导致fH结合的充分降低的情况下影响fH的结合。

[0240] 选择突变体以进一步研究

[0241] 在与fH片段的复合的fHbp的晶体结构中检查从FACS实验鉴定的氨基酸取代的位置。选择与fH结合界面接近(<5Å)的突变体进行位点特异性诱变。通过位点特异性诱变重演文库突变体是创建可溶性重组fHbp蛋白以进一步表征所必需的。该方法还除去了非期望的二级突变,其存在于许多分选的克隆中并且远离fH结合位点。用Phusion定向诱变试剂盒(Thermo Scientific,Inc.)构建位点特异性突变体。

[0242] 可溶性突变体fHbp的表达和纯化

[0243] 在大肠杆菌中表达可溶性重组fHbp,并且如前所述制备裂解物。通过使用HiTrap螯合HP柱(5ml;GE Life Sciences,Inc.)和Akta Purifier色谱系统(GE Life Sciences)的镍亲和色谱纯化fHbp。根据柱制造商的方案制备用于使用咪唑梯度的结合和洗脱的缓冲液。将含有纯化的fHbp的级分合并,针对含有3%蔗糖的PBS透析,并在使用前储存在-80℃。

[0244] 对于小鼠免疫原性研究,使用具有HiTrap SP HP柱(5ml;GE Life Sciences)的离子交换色谱进行第二纯化步骤。结合和洗脱缓冲液是分别含有150mM和750mM NaCl的25mM MES,pH 5.5。使用由结合和洗脱缓冲液形成的线性梯度从SP柱洗脱结合的fHbp。将含有纯化的fHbp的级分组合,针对含有3%蔗糖的PBS透析,并在使用前储存在-80℃。

[0245] 人因子H (fH) 的纯化

[0246] 在fHbp亲和柱上纯化人fH。通过使用制造商的方案将5mg fHbp ID 1偶联至NHS-活化的HP柱(5ml;GE Life Sciences)来制备柱。将来自健康个体供体的人血清在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中1:1稀释。将血清施加于柱,并用10个体积的PBS(即50ml)洗涤柱。用5个柱体积的0.1M甘氨酸-HCl,pH2.7洗脱结合的fH。将洗脱级分收集在含有50μl 1M TRIS-HCl,pH9.0的管中。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(4-12%NuPAGE;Invitrogen)鉴定含有fH的级分。使用1x MES运行缓冲液(Invitrogen)在200V下进行电泳45分钟。通过用考马斯G-250(SimplyBlue SafeStain;Invitrogen)染色显现蛋白质。汇集含有fH的级分,并针对PBS透析,并在使用前将fH的等份试样储存在-30℃。

[0247] fHbp突变体的表征

[0248] SDS-PAGE。通过使用4-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶(NuPAGE;Invitrogen,Inc.)的SDS-PAGE评估纯化的fHbp突变体蛋白的大小和纯度。将2μg的每种蛋白质上样到凝胶上。如上对fH所述进行SDS-PAGE。

[0249] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)使fH结合至fHb。用2μg/ml纯化的重组野生型fHbp(阳性对照)或突变体fHbp(实验)涂覆96孔微量滴定板(Immulon 2HB;Thermo Scientific)的孔。用含有1%BSA(Lifeblood Medical,Inc.)或5%脱脂奶粉(Carnation;Nestle,Inc.)的PBS封闭对孔的非特异性结合。向稀释缓冲液(含有0.1%Tween-20、0.01%叠氮化钠和1%BSA的PBS)中的纯化人fH的5倍连续稀释液(范围为25至0.0016μg/ml)加入孔中,并且在室温下温育2小时。用含有0.1%Tween-20(Sigma)和0.01%叠氮化钠(Sigma)的PBS洗涤三次后,用稀释缓冲液中的绵羊抗人fH(1:7,000;Abcam,Inc.)检测结合的fH。将板在室温下温育1小时。再次洗涤孔后,用稀释缓冲液中与碱性磷酸酶缀合的驴抗绵羊IgG(1:5,000;Sigma-Aldrich,Inc.)检测结合的一抗。将板在室温下温育1小时,并再次洗涤孔。用在底物缓冲液(50mM碳酸钠,1mM MgCl₂,pH 9.8)中的磷酸酶底物(1mg/ml磷酸对硝基苯酯;Sigma)显色ELISA。在室温下温育30分钟后,在UV-VIS读板仪(Spectromax 190;Molecular Devices,Inc.)中测量405nm处的吸光度。

[0250] 通过ELISA使抗fHbp单克隆抗体结合至fHbp。用fHbp涂覆微量滴定板的孔,并如上文针对fH ELISA所述进行封闭和洗涤。加入在稀释缓冲液中的25至0.0016μg/ml的鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)的5倍连续稀释液,并且将板在室温下温育1小时。在洗涤孔后,用与碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠IgG(1:5,000;Sigma-Aldrich)检测一抗。如上所述开发和读取ELISA。

[0251] 通过表面等离子共振(SPR)使fH结合至fHbp。在Biacore X100Plus仪器(GE Life Sciences)上进行SPR实验。使用胺偶联试剂盒(GE Life Sciences)将3000个响应单位的纯化的人fH偶联至CM5芯片(GE Life Sciences)。将fH固定在流动池2中,并且在流动池1中进行空白固定(无fH)作为参考。进行由含有3mM EDTA和0.05%表面活性剂P-20(GE Life Sciences)的HEPES缓冲盐水组成的三个启动循环和用100mM甘氨酸,3M NaCl,pH 2.0再生以使芯片表面条件化。注射范围为100至1nM(野生型)或316至3.16nM的纯化的重组fHbp的稀释液150秒。监测解离300秒,并用Biacore X100评估软件分析数据。

[0252] 小鼠免疫原性。用吸附有氢氧化铝的fHbp疫苗免疫野生型CD-1小鼠(N=14至21)的组。每剂疫苗在10mM组氨酸,150mM NaCl,pH6.5中含有10μg fHbp和600μg Alhydrogel

(Brenntag Biosector)。间隔三周给予两剂,并且在第二剂后三周通过心脏穿刺收集血液。处理血液以获得血清,将其保持在-80℃长期储存(>2周)或4℃短期储存(<2周)。

[0253] 首先筛选人fH转基因BALB/c小鼠,以使用fHbp ELISA和纯化的人fH的标准曲线鉴定血清人fH浓度>240μg/ml的动物。使用固定在板上的纯化的fHbp ID 1进行ELISA,并且检测fH的一抗和二抗与上述相同(参见“通过ELISA使fH结合至fHbp”)。

[0254] 用吸附有氢氧化铝(与上述野生型CD-1小鼠相同量的抗原和佐剂)的fHbp疫苗免疫转基因小鼠(N=11至21)组。以三周的间隔施用三剂,并在第三剂疫苗后三周收集血液。如上所述处理和储存血清。

[0255] 血清杀菌抗体(SBA)应答。针对具有与相应疫苗抗原相比相同或紧密匹配的fHbp序列的脑膜炎球菌菌株测量人补体介导的SBA应答。在常规弗朗茨(Frantz)培养基中生长细菌(Frasch等人,“Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease.”于Methods in Molecular Medicine,v.66.Meningococcal Vaccines:Methods and Protocols.中由Pollard,A J.和Maiden,M.C.编Humana Press Inc.Totowa,NJ),其含有4mM乳酸盐和0.02mM CMP-NANA至指数中期(OD_{620 nm}=0.6)。将细菌在含有1%BSA(Equitech Bio.)的Dulbecco氏PBS中以1:25,000稀释。人补体来自没有内在杀菌抗体的供体,并使用HiTrap Protein G柱(5ml;GE Life Sciences)耗尽IgG抗体。每个反应物含有25%人补体、约400cfu的细菌和测试抗血清或对照抗体的稀释液。将SBA滴度计算为血清稀释度,其导致在37℃下温育60分钟后相对于阴性对照孔的cfu的50%减少。蛋白质纯化:在大肠杆菌中表达具有C末端六组氨酸标签的重组fHbp,并通过金属螯合物色谱(HiTrap螯合HP;GE Life Sciences),然后通过离子交换色谱(HiTrap SP;GE Life Sciences)纯化。使用MES运行缓冲液(Invitrogen)在4-12%NuPAGE凝胶(Invitrogen)上分离蛋白质(各2μg),并用考马斯蓝染色(Simply Blue Safe Stain;Invitrogen)显色。

[0256] 结果

[0257] 开发了基于随机突变体文库的方法来鉴定具有降低的人fH结合的fHbp突变体。该方法能够鉴定可能不能基于单独的结构信息预测的导致fH结合减少的突变,并且能够在任何给定位置处产生多个氨基酸取代。这种方法与在选定位置处的丙氨酸取代的常见方法形成对比,所述常见方法有时导致fH结合的少量减少。

[0258] 使用随机突变体文库方法,我们鉴定了五种有希望的新型fHbp ID 1突变体。图1中显示了纯化的重组突变体fHbp ID 1抗原Q38R、E92K、R130G、S223R和H248L。

[0259] 图1:fHbp ID 1突变体的纯度。在大肠杆菌中表达具有C末端六组氨酸标签的重组fHbp,并通过金属螯合物色谱(HiTrap Chelating HP;GE Life Sciences),然后通过离子交换色谱(HiTrap SP;GE Life Sciences)纯化。使用MES运行缓冲液(Invitrogen)在4-12%NuPAGE凝胶(Invitrogen)上分离蛋白质(各2μg),并用考马斯蓝染色(Simply Blue Safe Stain;Invitrogen)显色。泳道1,Kaleidoscope分子量标志物(Bio-Rad Laboratories);2,fHbp ID 1野生型;3,Q38R;4,E92K;5,R130G;6,S223R;7,H248L。

[0260] 这些突变体表现出范围为约10倍(R130G)至约20倍(Q38R)至约100倍(E92K、S223R和H248L)的fH结合降低(图2)。

[0261] 图2小图A和B。通过ELISA使fHbp ID 1突变体结合至fH。用纯化的重组ID 1野生型(WT)或六种不同的突变体蛋白之一涂覆微量滴定板的孔。将不同浓度的纯化的人fH加入孔

中。用绵羊抗人fH (Abcam) 和与碱性磷酸酶缀合的驴抗绵羊IgG (Sigma) 检测结合的fH。A, 阳性对照fHbp ID 1野生型 (WT) 蛋白, 具有人fH的高结合。阴性对照fHbp ID 1R41S突变体, 具有fH的低结合。B, 具有减少的fH结合的新型fHbp ID 1突变体。R130G突变体显示中等的fH结合, Q38R显示低结合, 并且E92K、S223R和H248L显示显著低于R41S结合的结合。显示了重复测量的平均值和标准偏差。

[0262] 从表面等离子共振实验获得了fH与突变体蛋白的结合减少的类似模式, 其中R130G和Q38R突变体显示一些结合, 而其它三个突变体显示不可检测的结合 (图3小图A和B)。

[0263] 图3小图A-E。通过表面等离子共振得到的fHbp ID 1突变体的fH结合。将3000个响应单位的纯化的人fH偶联到CM5芯片 (GE Life Sciences), 并注射316nM纯化的重组fHbp 150秒。用于参考, 在每个图中显示了ID 1野生型 (WT) 蛋白的相同数据。观察到与ELISA中相同的结合模式 (图2, 上文); R130G突变体的对fH的中等结合, Q38R的低结合和E92K、S223R和H248L的非常低的结合。所有实验采用HBS-EP运行缓冲液和Biacore X100 Plus表面等离子共振仪。用Biacore X100评估软件分析数据。

[0264] 所有五种突变体fHbp ID 1蛋白保留了被抗fHbp单克隆抗体识别的构象性表位。五种抗fHbp单克隆抗体与野生型或突变体fHbp的浓度依赖性结合显示于图4中。

[0265] 图4小图A-E。如通过ELISA测量的鼠抗fHbp单克隆抗体与fHbp突变体蛋白的结合。抗fHbp单克隆抗体的类似的浓度依赖性结合表明野生型和突变体fHbp以相似的量存在于微量滴定板的孔中, 并且突变体fHbp保留由五种不同单克隆抗体识别的构象性表位。二抗是与碱性磷酸酶 (Sigma) 缀合的山羊抗小鼠IgG。显示了重复测量的平均值和标准偏差。

[0266] 突变体蛋白也保留类似于野生型fHbp ID 1的热稳定性, 除了E92K突变体, 其具有稍微降低的稳定性。最后, 当针对血清群B菌株H44/76进行测试时, 突变体在野生型CD-1小鼠中引发相似的杀菌性抗体应答 (图5小图A-B)。

[0267] 图5小图A和B。小鼠中对fHbp ID 1突变体的杀菌性抗体应答。图5小图A, 用两剂的以三周间隔给予的纯化的重组fHbp (10 μ g/剂量) 腹膜内免疫12至14只野生型小鼠的组。在第二剂后三周获得血清。使用IgG耗尽的人血清作为补体来源和血清群B菌株H44/76作为测试菌株来测量血清杀菌活性。H44/76表达fHbp ID 1, 其与对照fHbp ID 1WT疫苗匹配。每个符号代表单个小鼠的滴度, 并且水平条表示几何平均滴度。WT组和每个突变体组之间的差异没有统计学显著差异 (通过t检验, $p>0.4$)。图5小图B, 用三剂以三周间隔给予的纯化的重组fHbp (每剂10 μ g) 腹膜内免疫14至15只人fH转基因小鼠的组。在第三剂后三周获得血清。如上对野生型小鼠所述测量血清杀菌活性。

[0268] 图6小图A和B。通过ELISA使人fH结合至fHbp ID 1单突变体和双重突变体。如上对于图2小图A-B所述进行实验。图7。小鼠中对fHbp ID 1单突变体和双重突变体的杀菌性抗体应答。对20只野生型小鼠的组进行免疫, 并如上文针对图5小图A所述测定血清杀菌性抗体应答。

[0269] 实施例2: fHbp ID 55突变体的表征

[0270] 材料和方法

[0271] 如实施例1所述进行实验。

[0272] 结果

[0273] 也在fHbp ID 55中构建在fHbp ID 1中鉴定的三种有希望的突变体; 这些包括

E92K、S223R和H248L。所有三种fHbp ID 55突变体都显著降低了fH的结合(图8小图A)。突变体保留了构象完整性,如通过鼠抗fHbp单克隆抗体JAR 41的结合所判断的(图8小图B)。

[0274] 图8小图A和B.fHbp ID 55突变体的fH结合。A.通过ELISA得到的fH与固定的fHbp ID 55突变体的结合。如图2的图例中所述进行实验。显示了二至四次重复的平均值和范围。B.抗-fHbp单克隆抗体(mAb)JAR41的浓度依赖性结合表明重组fHbp以相似的量存在于微量滴定板的孔中,并且保留了由JAR41(N-末端结构域;Vu等人(2012)Sci.Reports,同上)识别的表位区域中的构象。二抗是与碱性磷酸酶(Sigma)缀合的山羊抗小鼠IgG。

[0275] 图9.野生型小鼠中对fHbp ID 55突变体的杀菌性抗体应答。对12只小鼠的组进行免疫,并如上文针对图5小图A所述测定血清杀菌性抗体应答。针对表达fHbp ID 55的菌株H44/76的突变体测量杀菌活性。

[0276] 图10A,人fH转基因小鼠对fHbp ID 55S223R突变体的杀菌性抗体应答。使用三剂纯化的重组fHbp(12 μ g/剂量)或含有总共12 μ g fHbp的经许可的Trumenba(Pfizer)疫苗的人剂量的十分之一免疫11至12只转基因小鼠的组。免疫转基因小鼠,并如上文对于图5小图B所述测定血清杀菌性抗体应答。图10小图B,野生型和人fH转基因小鼠中与血清人fH浓度相关的对Trumenba的杀菌性抗体应答。如前所述(Beernink等人(2011)Journal of Immunology 186(6):3606-14)通过ELISA测量血清人fH浓度。

[0277] 实施例3:fHbp ID 22突变体的鉴定和表征

[0278] 材料和方法

[0279] 如实施例1中所述进行实验。

[0280] 结果

[0281] 使用fHbp ID 22(其在变体组2(亚家族A)中)进行具有减少的fH结合的随机fHbp突变体的独立搜索。该筛选产生了六个有希望的新型突变体(图17)。通过ELISA使fH结合至ID 22野生型和前述D211A突变体示于图11小图A中。与六种新型突变体ID 22蛋白的fH结合示于图11小图B中。

[0282] 图11小图A-D.fHbp ID 22文库突变体的fH结合。图11小图A,具有人fH的高结合的阳性对照fHbp ID 22野生型(WT)蛋白。具有fH的低结合的阴性对照fHbp ID 22D211A突变体。图11小图B,具有fH结合减少的新型fHbp ID 22突变体。所有突变体显示低结合,并且V131D显示与D211A类似的非常低的结合。如图2的图例中所述进行实验。显示了2至4个重复的平均值和范围。图11小图C,fH浓度高达100 μ g/ml的fHbp ID 22突变体子集的fH结合。图11小图D,抗-fHbp单克隆抗体JAR4与突变体的子集(与图11小图C中使用的相同的符号)的结合。新型突变体K219N保留JAR4结合,而G220S突变体具有降低的JAR4结合。所有突变体具有与另一抗fHbp单克隆抗体JAR31的正常结合(数据未显示)。显示了重复测量的平均值和标准偏差。

[0283] 野生型CD-1小鼠对新型突变体V131D和K219N以及对照野生型ID 22蛋白和先前表征的突变体D211A的杀菌性抗体应答显示于图12中。

[0284] 图12小图A-B.野生型小鼠中对fHbp ID 22文库突变体的杀菌性抗体应答。选择具有人fH的低结合的文库突变体用于免疫。使用以三周的间隔给予的两剂的纯化的重组fHbp(10 μ g/剂量)对10至21只小鼠的组进行免疫。在第二剂后三周获得血清。使用IgG耗尽的人血清作为补体源和血清群B菌株CH597作为测试菌株测量血清杀菌活性。该菌株表达fHbp

ID 23, 其与对照fHbp ID 22WT疫苗紧密匹配。图12小图A, 测试新型突变体V131D和K219N的实验。D211A突变体用作不降低免疫原性的对照突变体fHbp疫苗。每个符号代表单个小鼠的滴度, 并且水平条表示几何平均滴度。图12小图B, 测试新型突变体D121G、S128T、F129S和G220S的第二实验。除了V131D的适度损失之外, 对于新型突变体fHbp没有观察到免疫原性的显著损失。

[0285] 图13。人fH转基因小鼠中对fHbp ID 22文库突变体K219N的杀菌性抗体应答。对照突变体D211A给出更高的应答, 并且K219N突变体产生类似于fHbp ID 22野生型(WT)抗原的应答。

[0286] 图14。通过差示扫描微量热法测量的fHbp ID 22的热稳定性。fHbp ID 22野生型(WT, 实线)在38(N-末端)和81°C(C-末端结构域)经历解折叠转化。与ID 22WT相比, fHbp ID 22L130R/G133D双重突变体表现出高19°C的N末端结构域热稳定性。

[0287] 图15小图A-B。fHbp ID 22三重突变体, 其组合稳定取代L130R和G133D(双重突变体, DM)与文库来源的突变体以降低fH结合。A, fH对fHbp ID 22三重突变体的结合。B, 对照鼠抗fHbp单克隆抗体(mAb)JAR4结合(与小图A中相同的符号。所有稳定的突变体比fHbp ID 22WT更好地结合JAR 4。

[0288] 图16。人fH转基因小鼠中对fHbp ID 22三重突变体的杀菌性抗体应答。所测试的两种突变体分别将稳定性双重突变体(DM)与K219N和G220S组合。三重突变体引起比对照ID 22WT抗原高8倍和18倍的应答。

[0289] 在图17中的表中呈现上文所述的示例性fHbp ID 1和ID 22突变体的概述。

[0290] 本发明涉及下述实施方案。

[0291] 1. 一种因子H结合蛋白(fHbp)变体, 其中所述变体包含选自以下至少一种的氨基酸取代:

[0292] a) 在氨基酸38处的谷氨酰胺(Q38)的氨基酸取代;

[0293] b) 在氨基酸92处的谷氨酸(E92)的氨基酸取代;

[0294] c) 在氨基酸130处用甘氨酸取代精氨酸(R130G);

[0295] d) 在氨基酸223处的丝氨酸(S223)的氨基酸取代; 和

[0296] e) 在氨基酸248处用组氨酸取代亮氨酸(H248L),

[0297] 其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 1(SEQ ID NO:1), 其中所述变体包含与SEQ ID NO:1具有至少80%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导对至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答。

[0298] 2. 根据实施方案1所述的变体fHbp, 其中在Q38处的氨基酸取代是Q38R、Q38K、Q38H、Q38F、Q38Y或Q38W。

[0299] 3. 根据实施方案1所述的变体fHbp, 其中在E92处的氨基酸取代是E92K、E92R、E92H、E92F、E92Y或E92W。

[0300] 4. 根据实施方案1所述的变体fHbp, 其中在S223处的氨基酸取代是S223R、S223K、S223H、S223F、S223Y或S223W。

[0301] 5. 根据实施方案1所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的25%或更小的亲和力结合人fH。

[0302] 6. 根据实施方案1所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的10%或更小的亲合力结合人fH。

[0303] 7. 根据实施方案1所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 1对人fH的亲合力的5%或更小的亲合力结合人fH。

[0304] 8. 根据实施方案1-7中任一项所述的变体fHbp, 其还包含选自由R41S和R41A组成的组的氨基酸取代。

[0305] 9. 根据实施方案1-8中任一项所述的变体fHbp, 其还包含以下氨基酸取代: S223R和H248L。

[0306] 10. 一种因子H结合蛋白(fHbp)变体, 其中所述变体包含选自以下的氨基酸取代:

[0307] a) 在氨基酸115处用异亮氨酸取代天冬酰胺(N115I);

[0308] b) 在氨基酸121处用甘氨酸取代天冬氨酸(D121G);

[0309] c) 在氨基酸128处用苏氨酸取代丝氨酸(S128T);

[0310] d) 在131位处的缬氨酸(V131)的氨基酸取代;

[0311] e) 在219位处的赖氨酸(K219)的氨基酸取代;

[0312] f) 在220位处的甘氨酸(G220)的氨基酸取代,

[0313] 其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2), 其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲合力结合人因子H(fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

[0314] 11. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的25%或更小的亲合力结合人fH。

[0315] 12. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的10%或更小的亲合力结合人fH。

[0316] 13. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的5%或更小的亲合力结合人fH。

[0317] 14. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其中在V131处的氨基酸取代是V131D、V131E、V131K、V131R、V131H、V131F、V131Y或V131W。

[0318] 15. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其中在K219处的氨基酸取代是K219N、K219Q、K219D、K219E、K219F、K219Y或K219W。

[0319] 16. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其中在G220处的氨基酸取代是G220S、G220N、G220Q、G220D、G220E、G220K、G220R、G220H、G220F、G220Y或G220W。

[0320] 17. 根据实施方案10-16中任一项所述的变体fHbp, 其还包含以下取代: L130R和G133D, 其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 22。

[0321] 18. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其包含取代: L130R、G133D和N115I。

[0322] 19. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其包含取代: L130R、G133D和D121G。

[0323] 20. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其包含取代: L130R、G133D和K219N或取代L130R、G133D和D211A。

[0324] 21. 根据实施方案10所述的变体fHbp, 其包含取代: L130R、G133D和G220S。

[0325] 22. 一种因子H结合蛋白(fHbp)变体, 其中所述变体包含选自以下的氨基酸取代:

- [0326] a) 在92位处的谷氨酸 (E92) 的氨基酸取代;
- [0327] b) 在223位处的丝氨酸 (S223) 的氨基酸取代;和
- [0328] c) 在248位处的组氨酸 (H248) 的氨基酸取代,
- [0329] 其中所述氨基酸取代相对于fHbp ID 55 (SEQ ID NO:3), 其中所述变体包含与SEQ ID NO:3具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的小于50%的亲合力结合人因子H (fH), 并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。
- [0330] 23. 根据实施方案22所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的25%或更小的亲合力结合人fH。
- [0331] 24. 根据实施方案22所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的10%或更小的亲合力结合人fH。
- [0332] 25. 根据实施方案22所述的变体fHbp, 其中所述变体fHbp以fHbp ID 55对人fH的亲合力的5%或更小的亲合力结合人fH。
- [0333] 26. 根据实施方案22所述的变体fHbp, 其中在E92处的氨基酸取代是E92K、E92R、E92H、E92F、E92Y或E92W。
- [0334] 27. 根据实施方案22所述的变体fHbp, 其中在S223处的氨基酸取代是S223R、S223K、S223H、S223F、S223Y或S223W。
- [0335] 28. 根据实施方案22所述的变体fHbp, 其中在所述H248处的氨基酸取代是H248L、H248I、H248V、H248D、H248E、H248F、H248Y或H248W。
- [0336] 29. 一种免疫原性组合物, 其包含:
- [0337] a) 根据实施方案1-28中任一项所述的变体fHbp; 和
- [0338] b) 药学上可接受的赋形剂。
- [0339] 30. 根据实施方案29所述的免疫原性组合物, 其中所述变体fHbp在由脑膜炎奈瑟氏球菌菌株制备的囊泡制剂中。
- [0340] 31. 根据实施方案29或实施方案30所述的免疫原性组合物, 其中所述药学上可接受的赋形剂包含佐剂。
- [0341] 32. 根据实施方案29-31中任一项所述的免疫原性组合物, 其还包含奈瑟氏球菌表面蛋白A。
- [0342] 33. 根据实施方案31所述的免疫原性组合物, 其中所述佐剂是磷酸铝或氢氧化铝。
- [0343] 34. 一种核酸, 其编码根据实施方案1-28中任一项所述的变体fHbp。
- [0344] 35. 一种重组表达载体, 其包含根据实施方案34所述的核酸。
- [0345] 36. 一种体外宿主细胞, 其包含根据实施方案34所述的核酸或根据实施方案35所述的重组表达载体。
- [0346] 37. 一种在哺乳动物中引发抗体应答的方法, 所述方法包括向哺乳动物施用根据实施方案29-33中任一项所述的免疫原性组合物。
- [0347] 38. 根据实施方案37所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。
- [0348] 39. 根据实施方案37所述的方法, 其中所述抗体应答是对一种或多种脑膜炎奈瑟氏球菌菌株的杀菌性抗体应答。
- [0349] 40. 一种因子H结合蛋白 (fHbp) 变体, 其中所述变体包含相对于fHbp ID 22 (SEQ

ID NO:2)的氨基酸取代L130R和G133D,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体fHbp以fHbp ID 22对人fH的亲合力的50%或更小的亲和力结合人因子H(fH),并且其中所述变体在哺乳动物宿主中诱导杀菌性抗体应答。

[0350] 41.根据实施方案40所述的变体fHbp,其中所述变体还包含一种或多种以下取代:R80A、D211A、E218A、E248A、G236I、T221A和H223A。

[0351] 42.根据实施方案40所述的变体fHbp,其中所述变体还包含取代R80A。

[0352] 43.根据实施方案40或42中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体还包含取代D211A。

[0353] 44.根据实施方案40或43中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体还包含取代E218A。

[0354] 45.根据实施方案40或44中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体还包含取代E248A。

[0355] 46.根据实施方案40或45中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体还包含取代G236I。

[0356] 47.根据实施方案40或46中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体还包含取代T221A和H223A。

[0357] 48.根据实施方案40-47中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0358] 49.根据实施方案40-47中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0359] 50.根据实施方案40-47中任一项所述的变体fHbp,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2具有大于99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0360] 尽管已经参考本发明的具体实施方案描述了本发明,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下,可以进行各种改变并且可以替换等同物。另外,可以进行许多修改以使特定情况、材料、物质组成、过程、一个或多个过程步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改都在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> P·T·比尔宁克

<120> 因子H结合蛋白变体及其使用方法

<130> CHOR-076W0

<150> US 62/028,123

<151> 2014-07-23

<160> 28

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 255

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌

<400> 1

```

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

```

195	200	205
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu		
210	215	220
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
245	250	255
<210> 2		
<211> 254		
<212> PRT		
<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌		
<400> 2		
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu		
1	5	10
Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln		
20	25	30
Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu		
35	40	45
Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn		
50	55	60
Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg		
65	70	75
Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe		
85	90	95
Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu		
100	105	110
Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser		
115	120	125
Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu		
130	135	140
Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp		
145	150	155
Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly		
165	170	175
Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu		
180	185	190
Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu		
195	200	205
Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala		

210	215	220
Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys		
225	230	235
Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln		240
	245	250
<210> 3		
<211> 260		
<212> PRT		
<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌		
<400> 3		
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp		
1	5	10
Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys		
	20	25
Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn		30
	35	40
Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn		45
	50	55
Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg		60
65	70	75
Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu		
	85	90
Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr		95
	100	105
Ala Leu Gln Thr Glu Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Glu Lys Met		
	115	120
Val Ala Lys Arg Arg Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr		125
	130	135
Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr		140
145	150	155
Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp		
	165	170
Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro		175
	180	185
Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys		190
	195	200
His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys		205
	210	215
Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala		220

225	230	235	240
Gly Ser Ala Glu Val	Glu Thr Ala Asn Gly	Ile His His Ile	Gly Leu
	245	250	255
Ala Ala Lys Gln			
260			
<210> 4			
<211> 1231			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 4			
Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys			
1	5	10	15
Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile			
20	25	30	
Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala			
35	40	45	
Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met			
50	55	60	
Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys			
65	70	75	80
Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe			
85	90	95	
Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr			
100	105	110	
Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu			
115	120	125	
Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val			
130	135	140	
Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser			
145	150	155	160
Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe			
165	170	175	
Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys			
180	185	190	
Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile			
195	200	205	
Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys			
210	215	220	
Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly			

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

Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Val Cys Gly Tyr Asn Gly Trp Ser Asp			
545	550	555	560
Leu Pro Ile Cys Tyr Glu Arg Glu Cys Glu Leu Pro Lys Ile Asp Val			
	565	570	575
His Leu Val Pro Asp Arg Lys Lys Asp Gln Tyr Lys Val Gly Glu Val			
	580	585	590
Leu Lys Phe Ser Cys Lys Pro Gly Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser			
	595	600	605
Val Gln Cys Tyr His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys			
	610	615	620
Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Leu Asn Gly Asn			
625	630	635	640
Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu			
	645	650	655
Tyr Tyr Cys Asn Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly Pro Asn Lys Ile Gln			
	660	665	670
Cys Val Asp Gly Glu Trp Thr Thr Leu Pro Val Cys Ile Val Glu Glu			
	675	680	685
Ser Thr Cys Gly Asp Ile Pro Glu Leu Glu His Gly Trp Ala Gln Leu			
	690	695	700
Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Phe Asn Cys Ser			
705	710	715	720
Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly			
	725	730	735
Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys Lys			
	740	745	750
Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys			
	755	760	765
Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys			
	770	775	780
Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu			
785	790	795	800
Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Pro Gln			
	805	810	815
Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly			
	820	825	830
Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly			
	835	840	845
Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys			

850	855	860
Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr		
865	870	875
Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys		880
	885	890
Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu		895
	900	905
Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly		910
	915	920
Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His		925
	930	935
Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe		940
945	950	955
Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu		960
	965	970
Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu		975
	980	985
Pro Ser Phe Glu Asn Ala Ile Pro Met Gly Glu Lys Lys Asp Val Tyr		990
	995	1000
Lys Ala Gly Glu Gln Val Thr Tyr Thr Cys Ala Thr Tyr Tyr Lys		1005
	1010	1015
Met Asp Gly Ala Ser Asn Val Thr Cys Ile Asn Ser Arg Trp Thr		1020
	1025	1030
Gly Arg Pro Thr Cys Arg Asp Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr		1035
	1040	1045
Val Gln Asn Ala Tyr Ile Val Ser Arg Gln Met Ser Lys Tyr Pro		1050
	1055	1060
Ser Gly Glu Arg Val Arg Tyr Gln Cys Arg Ser Pro Tyr Glu Met		1065
	1070	1075
Phe Gly Asp Glu Glu Val Met Cys Leu Asn Gly Asn Trp Thr Glu		1080
	1085	1090
Pro Pro Gln Cys Lys Asp Ser Thr Gly Lys Cys Gly Pro Pro Pro		1095
	1100	1105
Pro Ile Asp Asn Gly Asp Ile Thr Ser Phe Pro Leu Ser Val Tyr		1110
	1115	1120
Ala Pro Ala Ser Ser Val Glu Tyr Gln Cys Gln Asn Leu Tyr Gln		1125
	1130	1135
Leu Glu Gly Asn Lys Arg Ile Thr Cys Arg Asn Gly Gln Trp Ser		1140
	1145	1150
		1155

Glu	Pro	Pro	Lys	Cys	Leu	His	Pro	Cys	Val	Ile	Ser	Arg	Glu	Ile	
1160						1165					1170				
Met	Glu	Asn	Tyr	Asn	Ile	Ala	Leu	Arg	Trp	Thr	Ala	Lys	Gln	Lys	
1175						1180					1185				
Leu	Tyr	Ser	Arg	Thr	Gly	Glu	Ser	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Arg	
1190						1195					1200				
Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	His	Thr	Leu	Arg	Thr	Thr	Cys	
1205						1210					1215				
Trp	Asp	Gly	Lys	Leu	Glu	Tyr	Pro	Thr	Cys	Ala	Lys	Arg			
1220						1225					1230				
<210> 5															
<211> 255															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成多肽															
<400> 5															
Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu
1			5					10					15		
Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys	Gly	Leu	Gln
			20					25					30		
Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Arg	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys	Leu	Lys	Leu
			35					40					45		
Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp	Ser	Leu	Asn
			50					55				60			
Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Ser	Arg	Phe	Asp	Phe	Ile	Arg
65					70					75				80	
Gln	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu	Phe
				85						90				95	
Gln	Val	Tyr	Lys	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Gln	Thr	Glu
			100					105					110		
Gln	Ile	Gln	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Ala	Lys	Arg	Gln
			115					120					125		
Phe	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ser	Phe	Asp	Lys	Leu
			130					135					140		
Pro	Glu	Gly	Gly	Arg	Ala	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe	Gly	Ser	Asp
145					150					155				160	
Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe	Ala	Ala	Lys	Gln
				165						170				175	

Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
180	185	190
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
195	200	205
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu		
210	215	220
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
245	250	255

<210> 6

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

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

Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
180	185	190
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
195	200	205
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu		
210	215	220
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
245	250	255

<210> 7

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

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

Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Ser	Pro	Glu	Leu	Asn	Val	Asp
180				185				190							
Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	His	Ala	Val	Ile
195				200				205							
Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ser	Leu
210				215				220							
Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ala	Glu	Val
225				230				235				240			
Lys	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala	Lys	Gln	
245				250				255							

<210> 8

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

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

Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
180	185	190
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
195	200	205
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Arg Leu		
210	215	220
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
245	250	255

<210> 9

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

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

Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
180	185	190
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
195	200	205
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu		
210	215	220
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg Leu Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
245	250	255

<210> 10

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

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

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 11

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

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

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 12

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

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

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 13

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

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

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 14

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

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

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Asn Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 15

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

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

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Ser Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 16

<211> 260

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

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

Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro
 180 185 190
 Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys
 195 200 205
 His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys
 210 215 220
 Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu
 245 250 255
 Ala Ala Lys Gln
 260

<210> 17

<211> 260

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

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

Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp
 165 170 175
 Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro
 180 185 190
 Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys
 195 200 205
 His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys
 210 215 220
 Gly Ser Tyr Arg Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu
 245 250 255
 Ala Ala Lys Gln
 260

<210> 18

<211> 260

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

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

Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp
 165 170 175
 Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro
 180 185 190
 Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys
 195 200 205
 His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys
 210 215 220
 Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile His Leu Ile Gly Leu
 245 250 255
 Ala Ala Lys Gln
 260

<210> 19

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

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

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu		
130	135	140
Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp		
145	150	155
Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln		
	165	170
Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
	180	185
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
	195	200
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Arg Leu		
	210	215
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
	245	250
		255

<210> 20

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

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

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu		
130	135	140
Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp		
145	150	155
Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln		
	165	170
Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
	180	185
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
	195	200
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu		
	210	215
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg Leu Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
	245	250
		255

<210> 21

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

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

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu		
130	135	140
Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp		
145	150	155
Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln		
	165	170
Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp		
	180	185
Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile		
	195	200
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Arg Leu		
	210	215
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val		
225	230	235
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg Leu Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln		
	245	250
		255

<210> 22

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

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

Phe Arg Val Ser Asp Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu		
130	135	140
Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp		
145	150	155
Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly		
	165	170
Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu		
	180	185
Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu		
	195	200
Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala		
	210	215
Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys		
225	230	235
Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln		
	245	250

<210> 23

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu		
1	5	10
Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln		
	20	25
Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu		
	35	40
Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn		
	50	55
Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg		
65	70	75
Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe		
	85	90
Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu		
	100	105
Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser		
	115	120

125

Phe Arg Val Ser Asp Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu		
130	135	140
Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp		
145	150	155
Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly		
	165	170
Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu		
	180	185
Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu		
	195	200
Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Asn Gly Thr Tyr His Leu Ala		
	210	215
Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys		
225	230	235
Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln		
	245	250

<210> 24

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu		
1	5	10
Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln		
	20	25
Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu		
	35	40
Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn		
	50	55
Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg		
65	70	75
Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe		
	85	90
Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu		
	100	105
Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser		
	115	120

125

Phe	Arg	Val	Ser	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	His	Thr	Ala	Phe	Asn	Gln	Leu
130						135					140				
Pro	Ser	Gly	Lys	Ala	Glu	Tyr	His	Gly	Lys	Ala	Phe	Ser	Ser	Asp	Asp
145					150					155					160
Pro	Asn	Gly	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Ile	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Gln	Gly
				165					170					175	
Tyr	Gly	Arg	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Thr	Pro	Glu	Gln	Asn	Val	Glu	Leu
			180					185					190		
Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu	Lys	Ser	His	Ala	Val	Ile	Leu
			195				200					205			
Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Glu	Lys	Ser	Thr	Tyr	His	Leu	Ala
			210			215					220				
Leu	Phe	Gly	Asp	Arg	Ala	Gln	Glu	Ile	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Val	Lys
225					230					235					240
Ile	Arg	Glu	Lys	Val	His	Glu	Ile	Gly	Ile	Ala	Gly	Lys	Gln		
				245					250						

<210> 25

<211> 174

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏球菌

<400> 25

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

Ala Gly Tyr Arg Tyr Asn Tyr Ile Gly Lys Val Asn Thr Val Lys Asn
145 150 155 160

Val Arg Ser Gly Glu Leu Ser Val Gly Val Arg Val Lys Phe
165 170

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 26

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

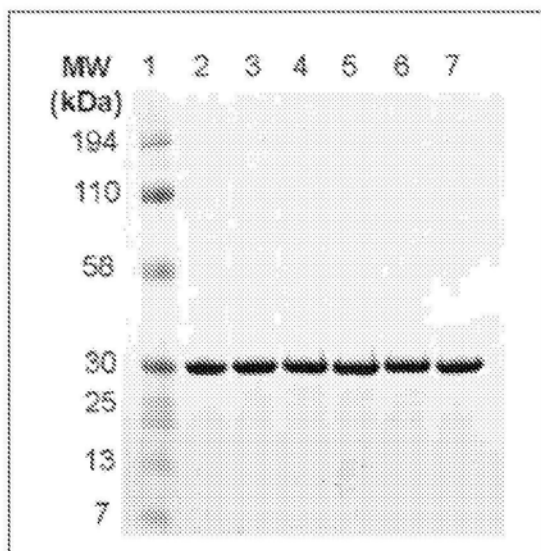


图1

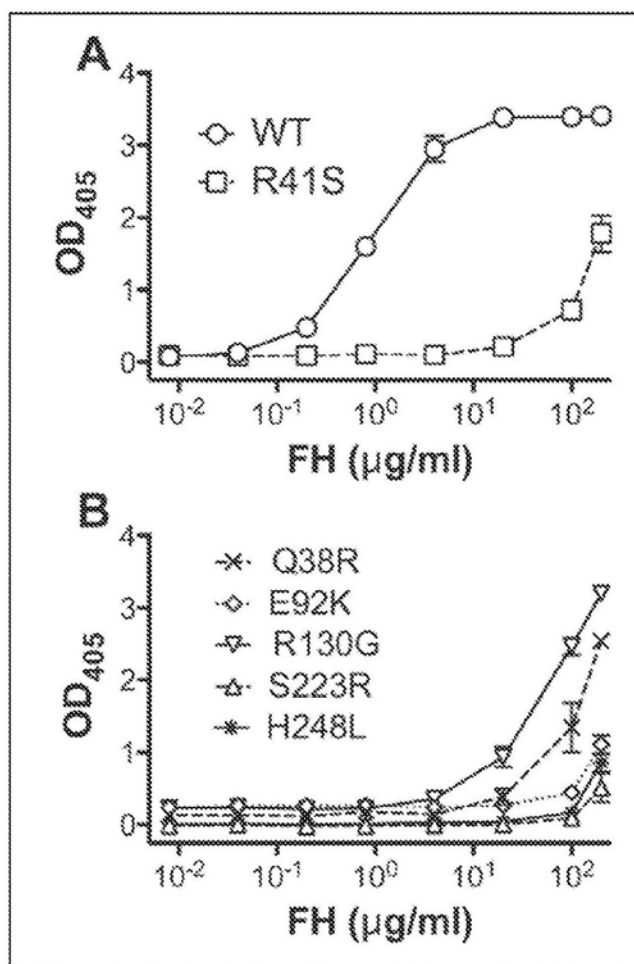


图2A-2B

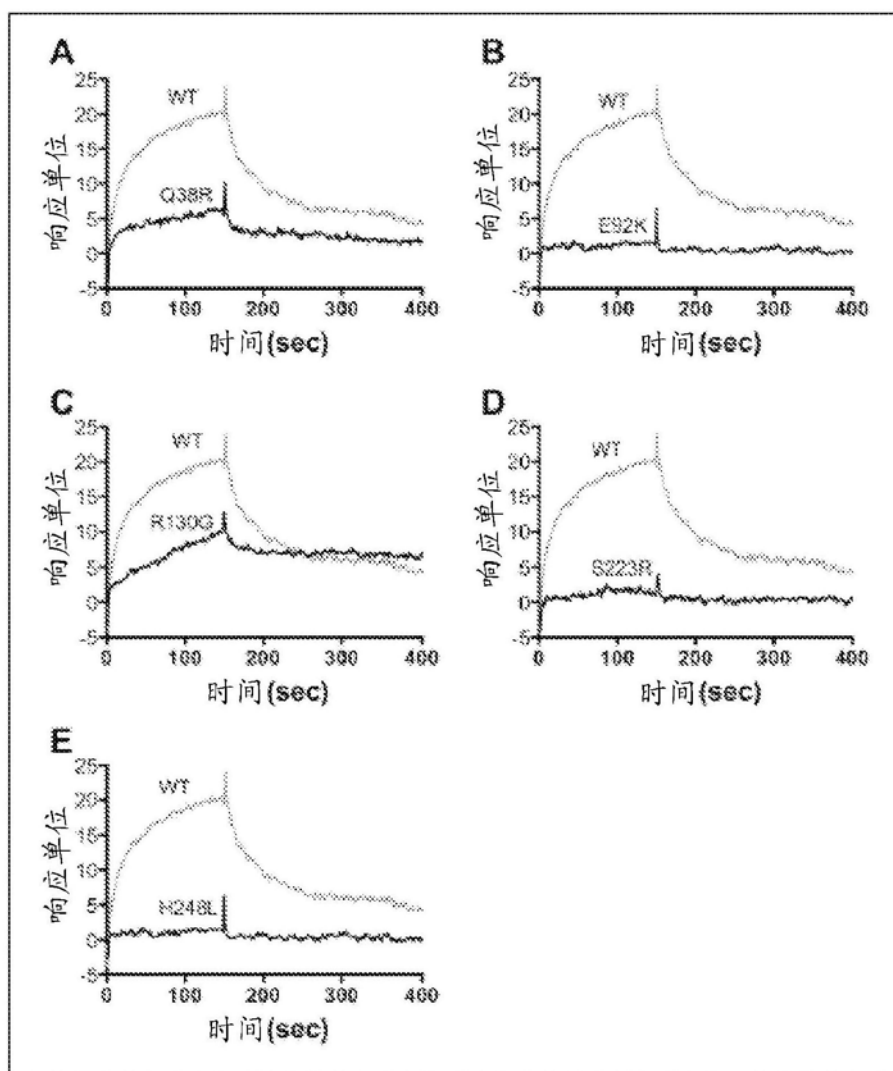


图3A-3E

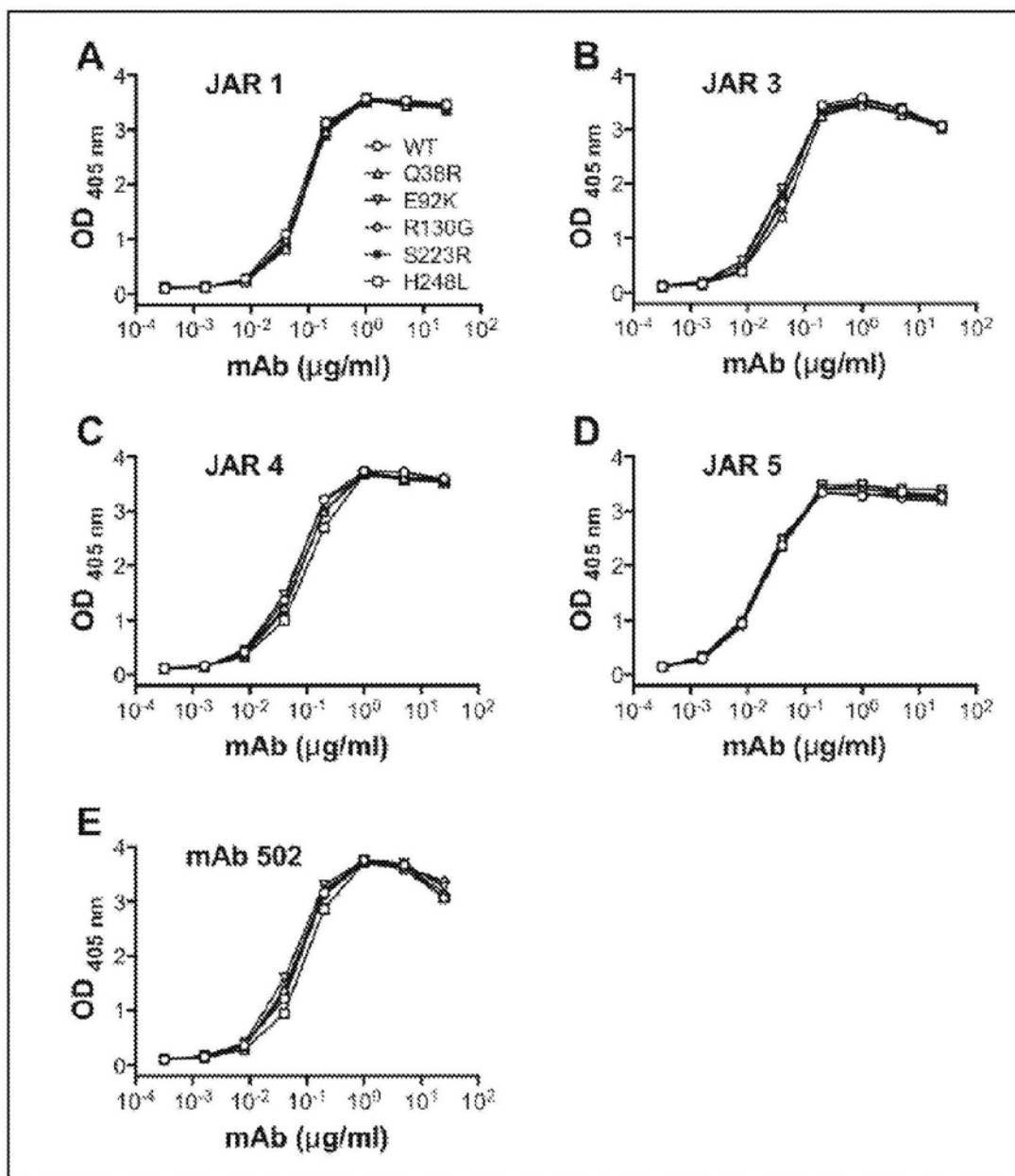


图4A-4E

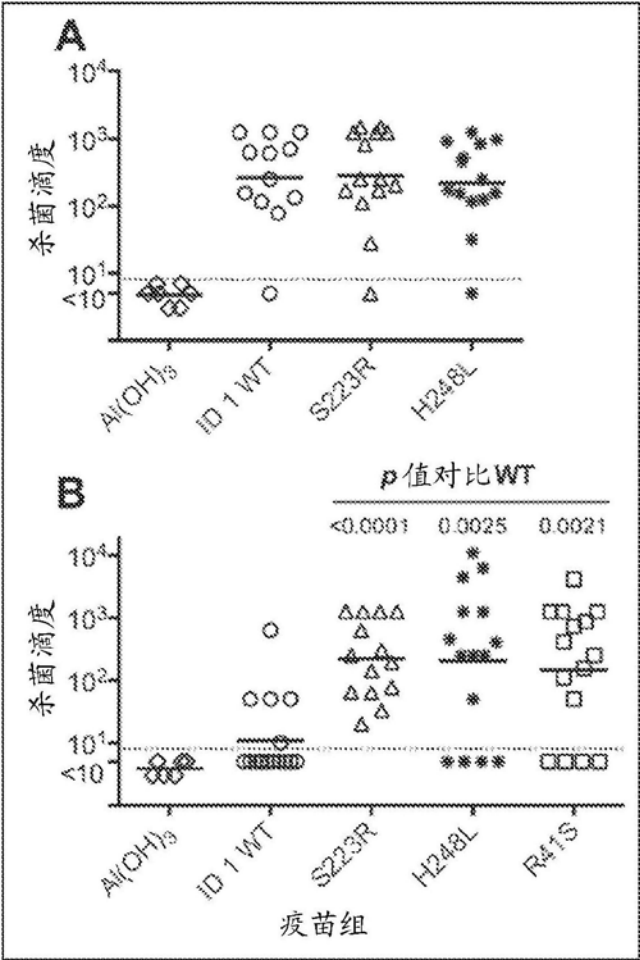


图5A-5B

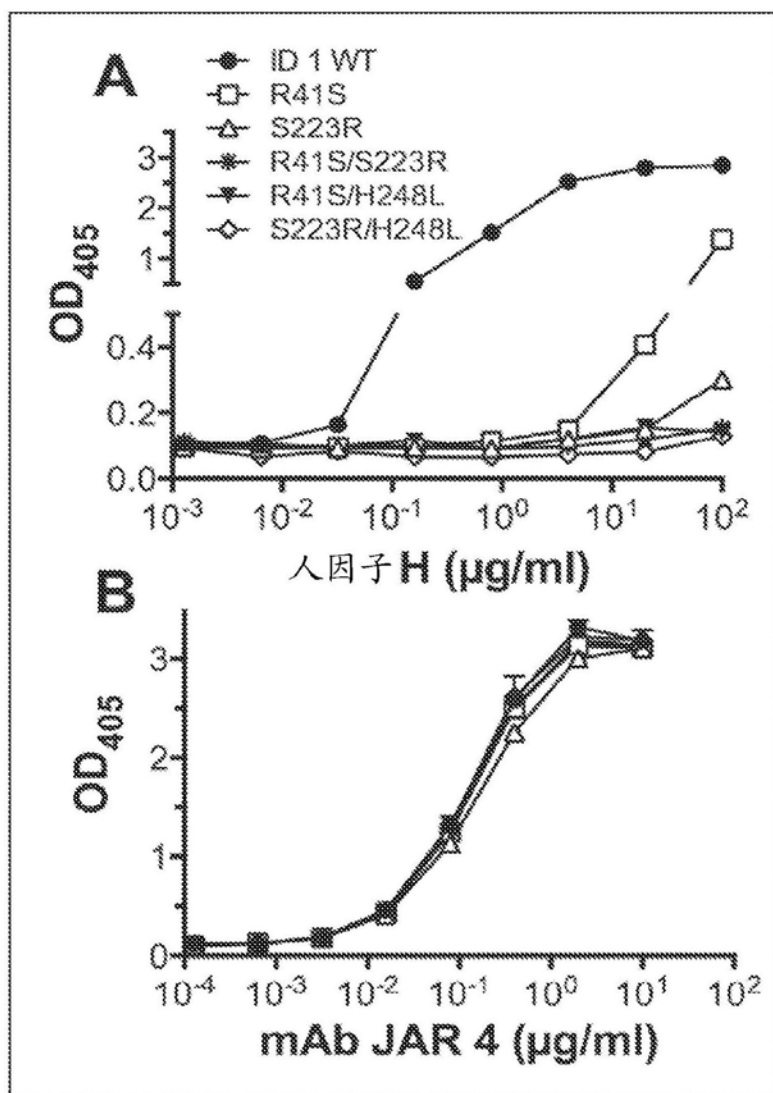


图6A-6B

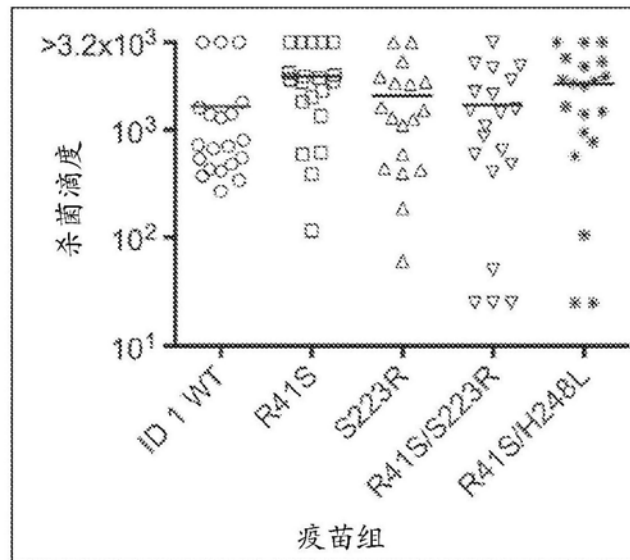


图7

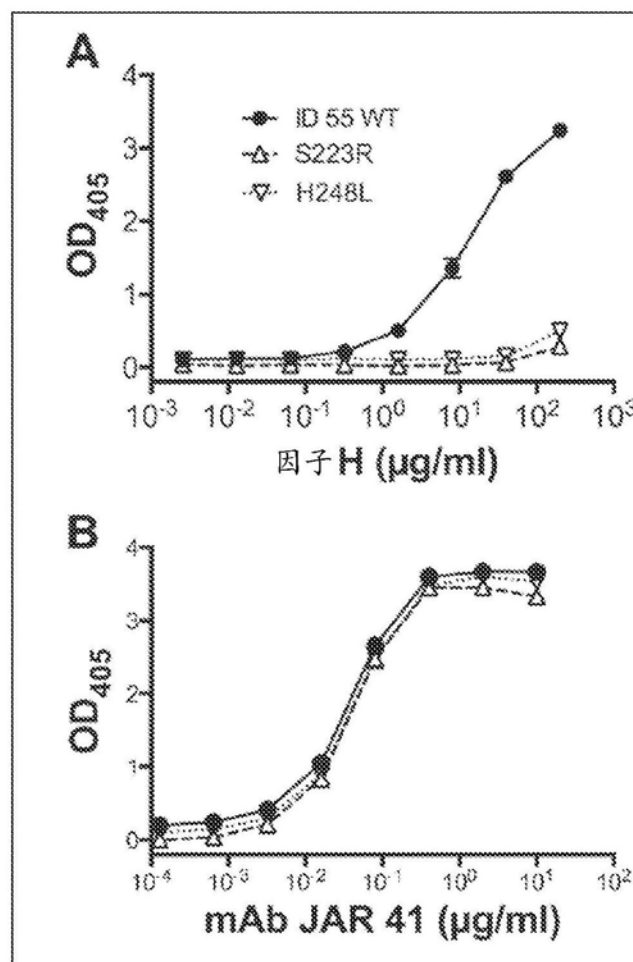


图8A-8B

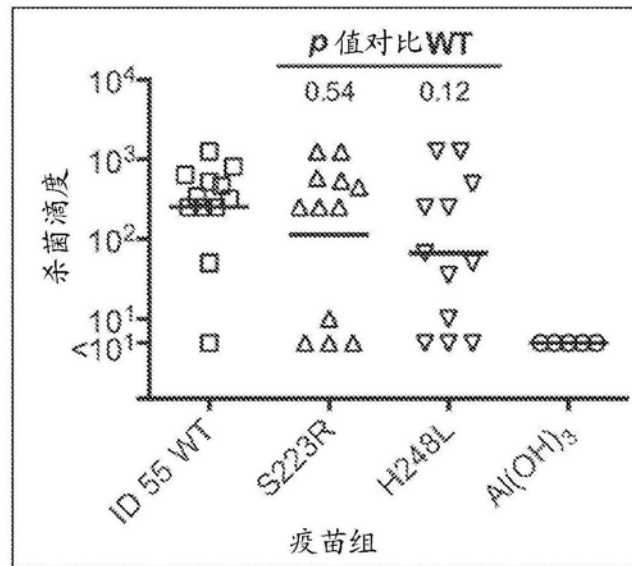


图9

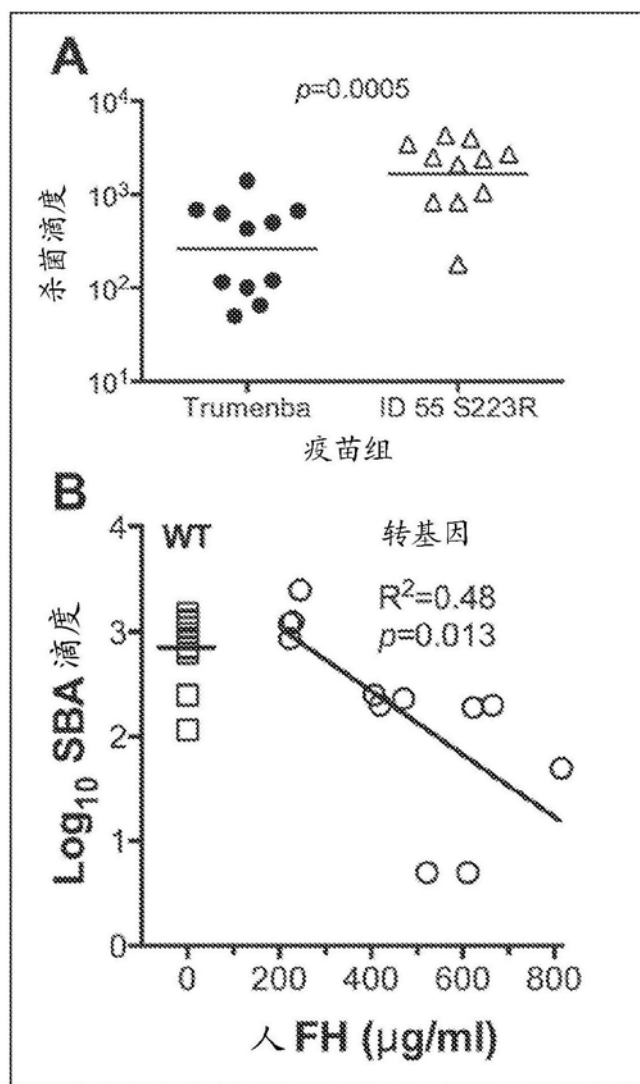


图10A-10B

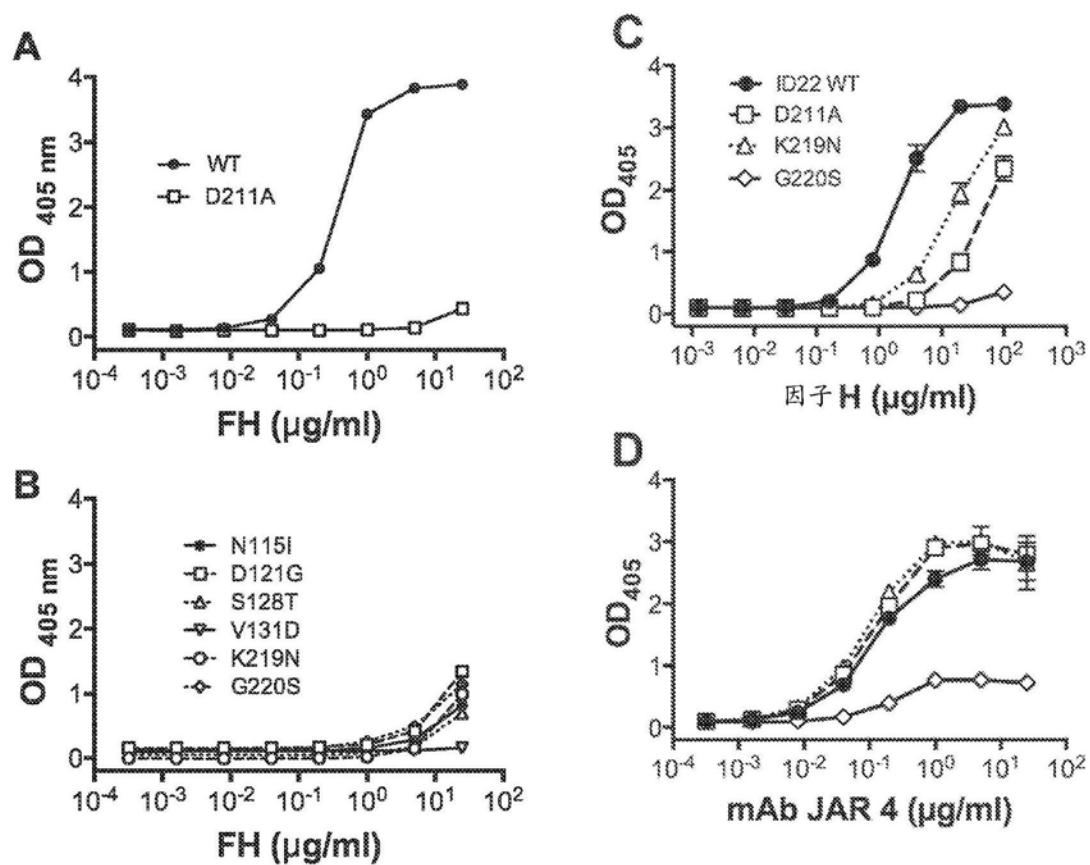


图11A-11D

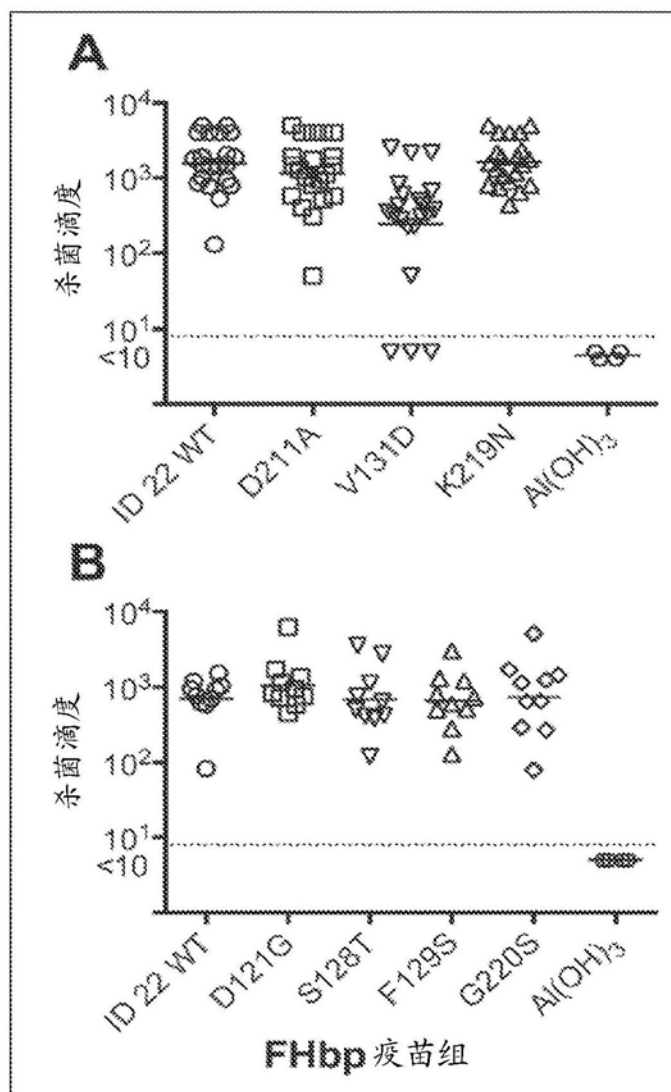


图12A-12B

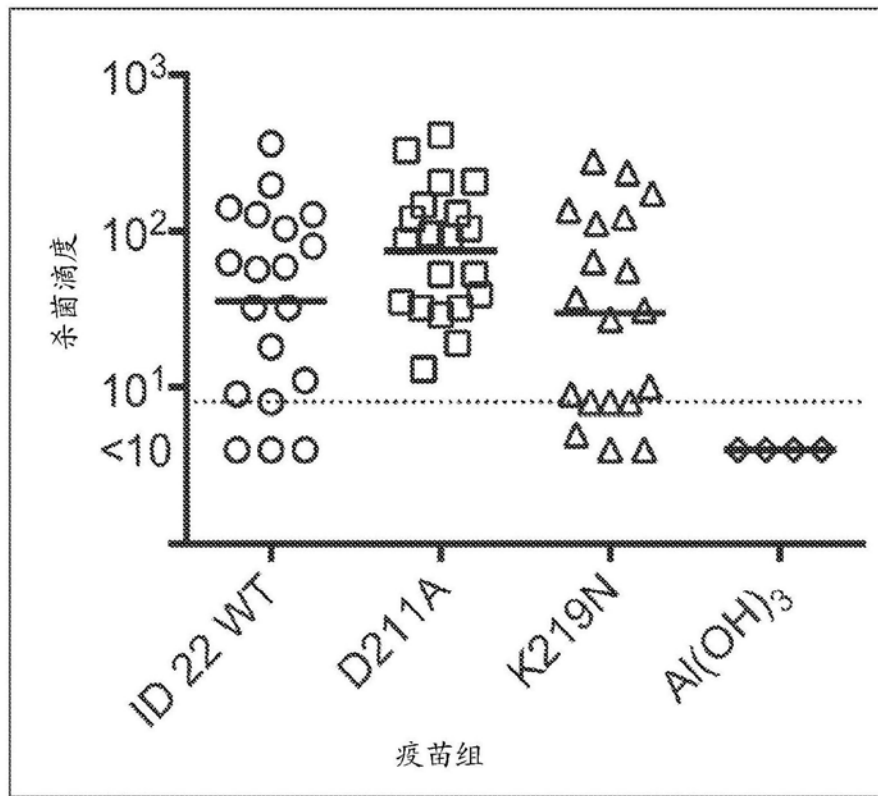


图13

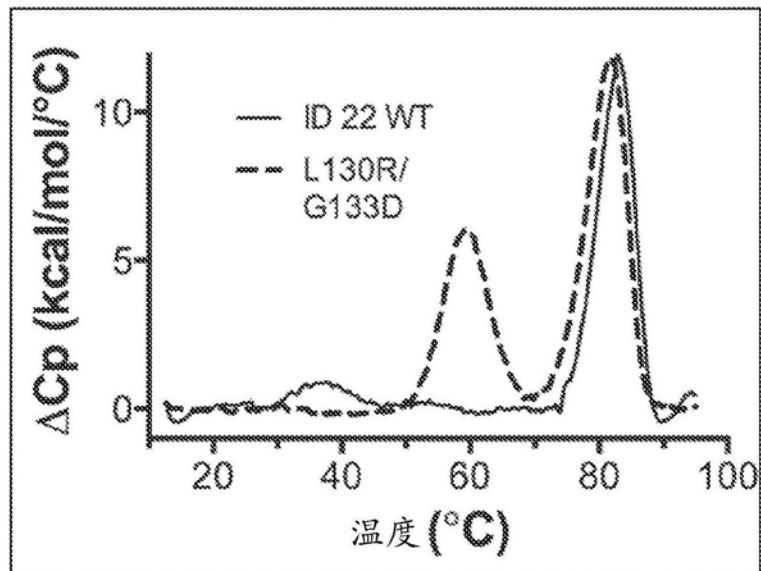


图14

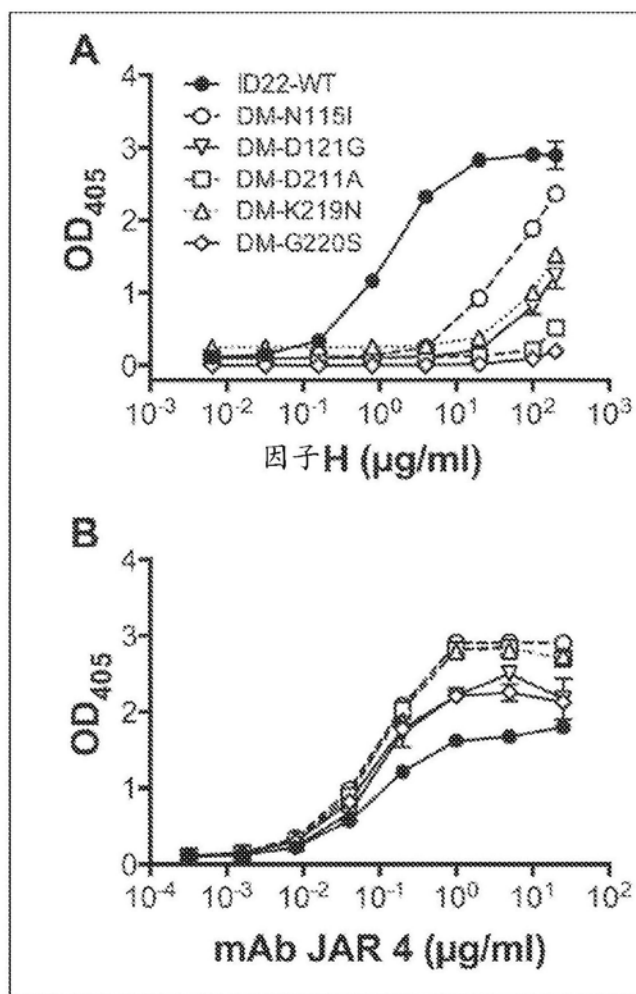


图15A-15B

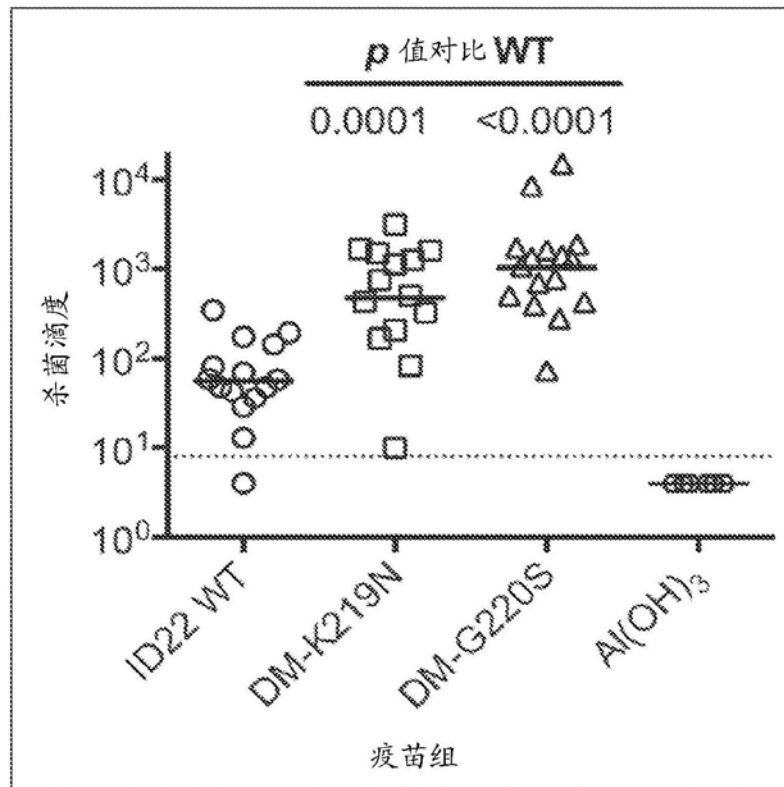


图16

ID 1 中的残基	位置 ^a	文库突变体中的 残基	变体组间 保守的残基	其它变体组中的 可替代的残基	与FH的 氢键	报告为接触 残基的位置 ^b	Ala突变体的 倍数变化 ^{c,d}
Q	38	R	否	D	是	是 ^e	n/d
E	92	K	否	A	否	否	n/d
R	130	G	否	L	是	是 ^e	90.8
S	223	R	否	H	否	否	12
H	248	L	否	E	否	否	96
ID 22 中的残基	位置 ^a	文库突变体中的 残基	变体组间 保守的残基	其它变体组中的 可替代的残基 ^e	与FH的 氢键	报告为接触 残基的位置 ^b	Ala突变体的 倍数变化 ^{c,d}
N	115	I	否	Q	是	是	n/d
D	121	G	否	G	否	否	n/d
S	128	I	否	Q, R	是	是	>100
V	131	D	否	I	否	否	115
K	219	N	是	n/a	否	否	n/d
G	220	S	是	n/a	否	否	n/d

^a位置根据成熟的FHbp ID 1序列，投石的半胱氨酸为第1位。
^b由Schneider等人(Nature 2009;458:890-3)报告为接触残基的位置
^c由Johnson等人(PLoS Pathog 2012;8:e1002981)测试为用于FH结合的丙氨酸突变体的位置
^dn/d,未进行
^en/a,不适用

图17

人因子H

```

MRLAKIICLMLWAICVAEDCNELFPRRNTTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLG 60
NVIMVCRKGEWVALNPLRKQKRPCGHPGDTPEFTTTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQL 120
LGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNS 180
GYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCWEISCKSPDVINGSPISQKIYKENERFQYKCNMG 240
YEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPLRKHRTGDEITYQCRNGFYP 300
ATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCYDEH 360
FETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY 420
ALPKAQTITVTTCMENGWSPTPRCIRVKTCSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLG 480
YVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHDGY 540
ESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGEVLKFSCKPG 600
FTIVGPNSVQCYHFGLSPLDLPICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCN 660
PRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCS 720
ESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCVADKLKCKSSNLIILEEHLKNKKEFDHNSNIYR 780
CRGKEGWIHTVCINGRWDPVNCMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTTLNRYDGEKVSVLCQ 840
ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCWEKIPCSQPPQIEHGTINSRSSQESYAHGTKLSYT 900
CEGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVYKCF 960
EGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIIPMGEKKDVYKAGEQVYTCAT 1020
YYKMDGASNVTCINSRWTRPTCRDITSCVNPPTVQNAYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSP 1080
YEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQN 1140
LYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFV 1200
CKRGYRLSSRSHTLRITTCWDGKLEYPTCAKR 1231 (SEQ ID NO:4)

```

图18

	1	10	20	30	40	50	
ID_1	CS-----	SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLD	SVRKNEKKLKLAAQGAEK	55			
ID_22	CS-----	SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLD	QSVRKNEKKLKLAAQGAEK	55			
ID_55	CS	SGGGGSGGGVTTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED	SISQNGTLTLAQGAEK	60			
	60	70	80	90	100	110	
ID_1	TYGNGDSLNTGKLKNDKVS	RDFIRQIEVDGQLITL	SGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQ	115			
ID_22	TYGNGDSLNTGKLKNDKVS	RDFIRQIEVDGQLITLES	SGEFQIYKQDHS	AVVALQIEKI	115		
ID_55	TYGNGDSLNTGKLKNDKVS	RDFIRQIEVDGQLITL	SGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ	120			
	120	130	140	150	160	170	
ID_1	DSEHSGKMVAKRQF	IGDIAGEHTS	FDKLP	EGGRATYRGTA	FGSDDAGGKLT	YIDFAAK	175
ID_22	NPKI	SLINQ	FL	SGLGGEHTAFNQL	PSG-KAEYHGKAF	SDDPNGLHYSIDFTKK	174
ID_55	DPEHSEKRMVAKRR	FRIGDIAGEHTS	FDKLP	KDVMATYRGTA	FGSDDAGGKLT	YIDFAAK	180
	180	190	200	210	220	230	
ID_1	QGNKIEHLKSP	ELNVDLAAADIKPDGKR	HAVISGSVLYNQAEKGSY	LGIFGGKAQ	QEV	235	
ID_22	QGYGRIEHLKTP	EQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGE	TYHLALFGDRAQ	EIA	234		
ID_55	QGHKIEHLKSP	ELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSY	LGIFGGERKAQ	QEV	240		
	240	250					
ID_1	GSAEVKTVNGIR	IGLAAKQ	255 (SEQ ID NO:1)				
ID_22	GSATVKIREKVHEIGI	AGKQ	254 (SEQ ID NO:2)				
ID_55	GSAEVETANGIH	IGLAAKQ	260 (SEQ ID NO:3)				

图19

fHbp ID1 Q38R 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDRSVRKNEKLKLAAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTA
FQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDA
GGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:5)

图20

fHbp ID1 E92K 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLKSGEFQVYKQSHSALTA
FQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDA
GGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:6)

图21

fHbp ID1 R130G 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTA
FQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFGIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDA
GGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:7)

图22

fHbp ID1 S223R 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTA
FQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDA
GGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYRLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:8)

图23

fHbp ID1 H248L 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTA
FQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDA
GGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRLIGLAAKQ (SEQ ID NO:9)

图24

fHbp ID22 N115I 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:10)

图25

fHbp ID22 D121G 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVA
LQIEKINNPDKIGSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:11)

图26

fHbp ID22 S128T 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRTFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:12)

图27

fHbp ID22 V131D 变体

CSSGGGGVAAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFLDSGLGGEHTAFNQLPSGKA EYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:13)

图28

fHbp ID22 K219N 变体

CSSGGGGVAAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKA EYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEENG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:14)

图29

fHbp ID22 G220S 变体

CSSGGGGVAAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKA EYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKS
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:15)

图30

fHbp ID55 E92K 变体

CSSGGGGSGGGGV TADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED SISQNGTLTL SA
QGA EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLKSGEFQVYKQSHS
ALTALQTEQE QDPEHSEK MVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDV MATYRGTA FG
SDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSP ELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVL
YNQDEKGSYSLGIFGEKAQE VAGSAE VETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO:16)

图31

fHbp ID55 S223R 变体

CSSGGGGSGGGGV TADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTL
SAQGA EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHS
ALTALQTEQE QDPEHSEK MVAKR RFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTA
FGSDDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGS
VLYNQDEKGSY RLGIFGEKAQE VAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO:17)

图32

fHbp ID55 H248L 变体

CSSGGGGSGGGGV TADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTL
SAQGA EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHS
ALTALQTEQE QDPEHSEK MVAKR RFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTA
FGSDDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGS
VLYNQDEKGSY SLGIFGEKAQE VAGSAEVETANGI HLIGLAAKQ (SEQ ID NO:18)

图33

fHbp ID1 R41S/S223R 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSV SKNEKLKLAQA
GA EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHS
ALTALQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTA
FGSDDAGGKLT YTIDFAAKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGS
VLYNQAEKGSY RLGIFGGKAQE VAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:19)

图34

fHbp ID1 R41S/H248L 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSV SKNEKLKLAQA
GA EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHS
ALTALQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTA
FGSDDAGGKLT YTIDFAAKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGS
VLYNQAEKGSY SLGIFGGKAQE VAGSAEVKTVNGIR LLIGLAAKQ (SEQ ID NO:20)

图35

fHbp ID 1 S223R/H248L 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTA
FQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDA
GKLTITIDFAAKQGGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQ
AEKGSYRLGIFGGKAQEVAAGSAEVKTVNGIRLIGLAAKQ (SEQ ID NO:21)

图36

fHbp ID22 L130R/G133D (稳定性双重突变体“DM”)变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:22)

图37

fHbp ID22 L130R/G133D/K219N (DM-K219N) 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEENG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:23)

图38

fHbp ID22 L130R/G133D/G220S (DM-G220S) 变体

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKS
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:24)

图39

NspA

GenBank 登录号 AAD53286

```
1 mkkalatlia lalpaaalae gasgfyvqad aahakasssl gsakgfspri sagyrindlr
61 favdytrykn ykapstdfk1 ysigasaiyd fdtqspvkpy lgarlslnra svdlggdsdf
121 sqtsiglgvl tgvsyavtpn vdlidagyryn yigkvntvkn vrsgeisvgv rvkf
(SEQ ID NO:25)
```

图40