

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780047494.7

[43] 公开日 2010 年 1 月 20 日

[11] 公开号 CN 101631858A

[22] 申请日 2007.12.21

[21] 申请号 200780047494.7

[30] 优先权

[32] 2006.12.22 [33] US [31] 60/876,486

[86] 国际申请 PCT/US2007/026238 2007.12.21

[87] 国际公布 WO2008/079372 英 2008.7.3

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.22

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 加里·W·兹络特尼克

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
代理人 刘国伟

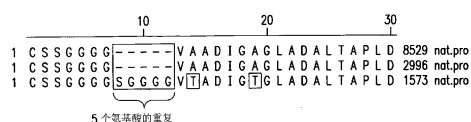
权利要求书 6 页 说明书 71 页 序列表 12 页
附图 21 页

[54] 发明名称

用于预防和治疗脑膜炎球菌疾病的新颖免疫原性组合物

[57] 摘要

本发明涉及奈瑟菌 (Neisseria) ORF2086 蛋白，其为可自奈瑟菌菌株分离或重组制备的交叉反应性免疫原性蛋白质，包括其免疫原性部分、其生物相等物、与上述物质免疫特异性结合的抗体和编码上述每一者的核酸序列；以及所述蛋白质在免疫原性组合物中有效抵抗脑膜炎奈瑟菌 (Neisseria meningitidis) 血清群 B 感染的用途。



1. 一种聚核苷酸，其包含：
 - (a)与 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性的核苷酸序列；或
 - (b)编码包含与 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列与 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性。
3. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中的任一者。
4. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列编码包含与 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列的多肽。
5. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列编码包含 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者的多肽。
6. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列与 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中的任一者具有至少约 95%序列一致性。
7. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中的任一者。
8. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列编码包含与 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的氨基酸序列具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列的多肽。
9. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列编码包含 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的多肽。
10. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列与 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中的任一者具有至少约 95%序列一致性。
11. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列编码包含 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中任一者的多肽。
12. 根据权利要求 1 所述的聚核苷酸，其中所述核苷酸序列编码包含与 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列的多

肽。

13. 根据权利要求1所述的聚核苷酸,其中所述核苷酸序列编码包含 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的多肽。
14. 根据权利要求1所述的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸编码可激发对抗脑膜炎奈瑟菌 (*N. meningitidis*) 血清群 B 的抗体的多肽。
15. 根据权利要求1所述的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸编码可激发对抗脑膜炎奈瑟菌 血清群 B 亚族 A 的抗体的多肽。
16. 根据权利要求1所述的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸编码可激发对抗脑膜炎奈瑟菌 血清群 B 亚族 B 的抗体的多肽。
17. 根据权利要求1至16中任一权利要求所述的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸为重组 聚核苷酸。
18. 根据权利要求1到16中任一权利要求所述的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸自天然 来源分离。
19. 一种载体,其包含根据权利要求1至18中任一权利要求所述的聚核苷酸。
20. 根据权利要求19所述的载体,其中所述载体为质粒。
21. 根据权利要求19所述的载体,其中所述载体为噬体 (phage)。
22. 根据权利要求19所述的载体,其中所述载体为噬菌体。
23. 根据权利要求19所述的载体,其中所述载体为温和噬体。
24. 一种重组细胞,其包含根据权利要求19-23中任一权利要求所述的载体。
25. 根据权利要求24所述的重组细胞,其中所述重组细胞为杂交瘤。
26. 根据权利要求24所述的重组细胞,其中所述重组细胞为三体杂交瘤 (trioma)。
27. 一种多肽,其包含:
 - (a)与 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的氨基酸序 列;
 - (b)由与 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的核苷酸 序列编码的氨基酸序列;
 - (c)至少一个(a)或(b)中所述的氨基酸序列的免疫原性部分;或
 - (d)至少一种(a)或(b)中所述的氨基酸序列或(c)中所述的免疫原性部分的生物相等 物。
28. 根据权利要求27所述的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中 任一者具有至少 95%序列一致性的氨基酸序列。

29. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含由与 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。
31. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含由 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者的核酸序列编码的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的氨基酸序列。
33. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的氨基酸序列。
34. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含由与 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。
35. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含由 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中任一者的核酸序列编码的氨基酸序列。
36. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的氨基酸序列。
37. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列。
38. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含由与 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。
39. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽包含由 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中任一者的核酸序列编码的氨基酸序列。
40. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其进一步包含至少一种 Por A、Por B、转铁蛋白结合蛋白或不透明蛋白 (Opc)。
41. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其进一步包含奈瑟菌种 (*Neisseria species*) 的至少一种其它表面抗原, 所述其它表面抗原为非 ORF2086 蛋白。
42. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽具有如质谱法所测量约 26,000 至约 30,000 的分子量。
43. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽具有如以 10%-20% SDS 聚丙烯酰胺凝胶所测量约 28-35 kDa 的分子量。
44. 根据权利要求 27 所述的多肽, 其中所述多肽为非脂质化蛋白质。

45. 根据权利要求 27 所述的多肽，其中所述多肽为重组蛋白质。
46. 根据权利要求 27 所述的多肽，其中所述多肽自原生奈瑟菌种分离。
47. 一种抗体，其包含以下任一者：
 - (a)与包含偶数 SEQ ID NO:2-12 中任一者的氨基酸序列的多肽免疫特异性结合的多肽；或
 - (b)至少一个(a)中所述的多肽的免疫原性部分；或
 - (c)至少一种(a)中所述的多肽或一个(b)中所述的免疫原性部分的生物相等物。
48. 根据权利要求 47 所述的抗体，其中至少一种抗体为单克隆抗体。
49. 一种组合物，其包含根据权利要求 1-48 中任一权利要求所述的聚核苷酸、载体、重组细胞、多肽或抗体。
50. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述组合物另外包含医药学上可接受的缓冲剂、稀释剂、佐剂或载剂。
51. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述组合物另外包含载剂。
52. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述组合物另外包含佐剂。
53. 根据权利要求 52 所述的组合物，其中所述佐剂包含液体。
54. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述多肽为脂蛋白。
55. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述组合物另外包含多糖。
56. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述组合物包含另一种肽、多肽或与所述多肽形成结合物的蛋白质。
57. 根据权利要求 56 所述的组合物，其中所述另一种肽、多肽或蛋白质形成诱发哺乳动物对两种或两种以上细菌的免疫反应的结合物。
58. 根据权利要求 49 所述的组合物，其中所述组合物另外包含编码另一种肽、多肽或蛋白质的核酸序列。
59. 一种组合物，其包含：
 - (a)第一聚核苷酸，其包含与 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中任一者具有至少约 95% 序列一致性，或与编码 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的氨基酸序列的核苷酸序列具有至少约 95%序列一致性的核苷酸序列；和
 - (b)第二聚核苷酸，其包含与 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性，或与编码 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列的核苷酸序列具有至少约 95%序列一致性的核苷酸序列。
60. 根据权利要求 59 所述的组合物，其中所述第一聚核苷酸包含 SEQ ID NO:1-5 的奇

数序列中的任一者。

61. 根据权利要求 59 所述的组合物，其中所述第二聚核苷酸序列包含 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中的任一者。
62. 一种组合物，其包含：
 - (a)第一多肽，其包含与 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列；
 - (b)第二多肽，其包含与 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列。
63. 根据权利要求 62 所述的组合物，其中所述第一多肽包含 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的氨基酸序列。
64. 根据权利要求 62 所述的组合物，其中所述第二多肽包含 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列。
65. 一种组合物，其由包含以下步骤的方法制备：

自奈瑟菌种分离和纯化或重组制备以下任一者：

 - (a)包含偶数 SEQ ID NO:2-12 中任一者的氨基酸序列的多肽；
 - (b)由包含奇数 SEQ ID NO:1-11 中任一者的核酸序列的聚核苷酸编码的多肽；
 - (c)(a)或(b)中所述的多肽的免疫原性部分；或
 - (d)(a)或(b)中所述的多肽或(c)中所述的免疫原性片段的生物相等物。
66. 一种根据权利要求 49-65 中任一权利要求所述的组合物的用途，其用于制备用于诱发哺乳动物免疫反应的药物。
67. 根据权利要求 66 所述的用途，其中非经肠投与所述组合物。
68. 根据权利要求 66 所述的用途，其中经粘膜投与所述组合物。
69. 一种根据权利要求 49-65 中任一权利要求所述的组合物的用途，其用于有效抵抗哺乳动物细菌性脑膜炎的药物中。
70. 根据权利要求 69 所述的组合物的用途，其中非经肠投与所述组合物。
71. 根据权利要求 69 所述的组合物的用途，其中经粘膜投与所述组合物。
72. 根据权利要求 69 所述的组合物的用途，其中通过皮下或肌肉内注射投与所述组合物。
73. 一种制备组合物的方法，其包含：

在宿主细胞中表达编码本文中所述的多肽中任一者的核酸序列。
74. 根据权利要求 73 所述的方法，其中在活体内表达所述核酸序列。

-
75. 根据权利要求 73 所述的方法，其中在活体外表达所述核酸序列。
76. 根据权利要求 73 所述的方法，其进一步包含使 P4 前导序列与所述核酸序列结合以表达所述多肽。
77. 一种制备抗体组合物的方法，其包含：
在将包含本文中所述的多肽、蛋白质、免疫原性部分或生物相等物中任一者的组合物引入动物后自所述动物回收抗体。
78. 一种诱发哺乳动物免疫反应的方法，其包含：
向所述哺乳动物投与有效量的一种或一种以上根据权利要求 49-65 所述的组合物。
79. 根据权利要求 78 所述的方法，其中非经肠投与所述组合物。
80. 根据权利要求 78 所述的方法，其中经粘膜投与所述组合物。
81. 一种预防或治疗哺乳动物细菌性脑膜炎的方法，其包含：
向所述哺乳动物投与有效量的一种或一种以上根据权利要求 49-65 所述的组合物。
82. 根据权利要求 81 所述的方法，其中非经肠投与所述组合物。
83. 根据权利要求 81 所述的方法，其中经粘膜投与所述组合物。
84. 根据权利要求 81 所述的方法，其中通过皮下或肌肉内注射投与所述组合物。

用于预防和治疗脑膜炎球菌疾病的新颖免疫原性组合物

技术领域

本发明涉及奈瑟菌 ORF2086 蛋白(亚族 A 和亚族 B),其可自诸如奈瑟菌种(*Neisseria species*) 的细菌菌株分离,包括脑膜炎奈瑟菌(血清群 A、B、C、D、W-135、X、Y、Z 和 29E)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和乳糖奈瑟菌(*Neisseria lactamica*)的菌株,以及所述蛋白质的免疫原性部分和/或生物相等物。本发明还涉及与所述蛋白质、免疫原性部分和/或生物相等物免疫特异性结合的抗体。此外,本发明涉及经分离聚核苷酸,其包含编码上述蛋白质、免疫原性部分、生物相等物和/或抗体中任一者的核酸序列。另外,本发明涉及免疫原性组合物和其在预防、治疗和/或诊断由脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*)引起的脑膜炎球菌感染和尤其由脑膜炎奈瑟菌血清群 B 引起的脑膜炎球菌疾病中的用途,以及用于制备所述组合物的方法。本发明涉及重组形式和自天然来源分离的形式两者,以及脂质化和非脂质化形式两者。

背景技术

脑膜炎球菌性脑膜炎是一种尽管可利用抗生素但仍可在数小时内致儿童和年轻成人死亡的致命性疾病。比萨(Pizza)等人,2000,科学(*Science*)287:1816-1820。脑膜炎的特征为脑膜炎,从而产生剧烈头痛、发热、食欲不振、光声不耐受、肌肉僵硬,尤其在颈部,且在严重情况下出现痉挛、呕吐和谵妄,导致死亡。脑膜炎球菌性脑膜炎的症状突然出现且在脑膜炎球菌性败血症伴随其特征性出血性皮疹时达到顶点。如果存在任何存活机会,那么快速诊断和立即用大剂量抗生素治疗至关重要。2000. 贝藤医学词典(*Bantam Medical Dictionary*), 第三版 302。

脑膜炎球菌性脑膜炎由脑膜炎奈瑟菌(脑膜炎球菌),一种革兰氏阴性(Gram-negative)有荚膜细菌引起,已将其分为若干病原性血清群,包括 A、B、C、D、W-135、X、Y、Z 和 29E。在全世界,脑膜炎奈瑟菌的血清群 B 菌株为脑膜炎球菌疾病的主要病因。举例来说,据医学文献报导,血清群 B 造成居住于美国和欧洲的婴儿和儿童中约 50%的细菌性脑膜炎。目前不存在预防由脑膜炎奈瑟菌血清群 B 引起的脑膜炎球菌疾病的疫苗。

自三十多年前古得施奈德(Goldschneider)等人的工作以来,开发用于预防血清群 B 脑膜炎球菌疾病的免疫原性组合物已对研究人员提出挑战。古得施奈德(Goldschneider)

等人, 1969, 实验医学杂志 (*J. Exp. Med.*) 129(6):1307-26; 古得施奈德 (Goldschneider) 等人, 1969, 实验医学杂志 (*J. Exp. Med.*) 129(6):1327-48; 古茨克里奇 (Gotschlich) 等人, 1969, 实验医学杂志 (*J. Exp. Med.*) 129(6):1385-95; 和古茨克里奇 (Gotschlich) 等人, 1969, 实验医学杂志 (*J. Exp. Med.*) 129(6):1367-84。不同于在二次大战后在北美实际上已消失的血清群 A 疾病, 由血清群 B 和 C 生物体引起的疾病仍在大部分经济发达地区地方性流行, 阿克特曼 M. (Achtman M.), 1995, 微生物学前沿 (*Trends in Microbiology*) 3(5):186-92。疾病的发病率在小于 1/100,000 (在此情况下少见地方性流行病) 至 200/100,000 (在疾病流行期间人群处于高风险) 范围内变化。

已开发出对抗脑膜炎奈瑟菌血清群 A 和 C 的基于多糖结合物的疫苗且似乎在预防疾病方面有效。目前, 可利用由来自血清群 A、C、Y 和 W-135 的荚膜多糖制成的免疫原性组合物。恩布罗奇 (Ambrosch) 等人, 1983, 新四价的免疫原性和副作用 (Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent)。世界卫生组织公报 (*Bulletin of the World Health Organization*) 61(2):317-23。然而, 此免疫原性组合物引起 T 细胞非依赖性免疫反应, 在幼儿中并不有效, 且不覆盖引起超过 50% 脑膜炎球菌疾病的血清群 B 菌株。

其它人也已试图使用荚膜多糖开发免疫原性组合物。最近, 通过将血清群 C 荚膜物质与蛋白质结合所制备的用于血清群 C 疾病的免疫原性组合物已在欧洲许可使用。然而, 血清群 B 荚膜可能不适合作为疫苗候选物, 因为荚膜多糖包含与使人类神经组织发育的碳水化合物部分具有相似性的聚唾液酸。这一糖部分被视为自体抗原且因此在人体内具有弱免疫原性。

外膜蛋白 (OMP) 已开发作为用于血清群 B 疾病的替代疫苗抗原。与 PorA 的两个可变区结合的单克隆抗体定义用于脑膜炎球菌的血清亚型分类方案。PorA 蛋白因此用作脑膜炎球菌菌株的血清亚型分类抗原 (阿卜杜拉希 (Abdillahi) 等人, 1988, 微生物发病机理 (*Microbial Pathogenesis*) 4(1):27-32) 且正在积极地作为血清群 B 免疫原性组合物的组份加以研究 (波尔曼 (Poolman), 1996, 先进实验医学生物学 (*Adv. Exp. Med. Biol.*) 397:73-7), 因为其可引起杀菌性抗体产生 (索克昂恩 (Saukkonen), 1987, 微生物发病机理 (*Microbial Pathogenesis*) 3(4):261-7)。认为杀菌性抗体为保护的指示物且任何新免疫原性组合物候选物应引起这些功能性抗体产生。

对人类以及动物的研究表明血清亚型分类抗原 PorA 引起杀菌性抗体产生。然而, 对 PorA 的免疫反应通常具有血清亚型特异性。具体来说, 血清亚型分类数据表明由 PorA 制成的免疫原性组合物可能需要每一血清亚型的 PorA 由所述免疫原性组合物涵盖, 或许

多达六至九种。因此，将需要 6-9 种 PorA 来涵盖 70-80%的血清群 B 菌株。因此，此蛋白质的可变性质需要多价疫苗组合物来预防足够多的脑膜炎球菌血清亚型临床分离株。

开发用于血清群 B 脑膜炎球菌的免疫原性组合物如此困难，使得最近若干小组已对来自代表血清群 A 和 B 两者的菌株的基因组进行测序以帮助鉴别新免疫原性组合物候选物。泰特林 (Tettelin)，2000，*科学 (Science)*，287(5459):1809-15；比萨 (Pizza) 等人，2000，*科学 (Science)* 287:1816-1820。甚至用奈瑟菌基因组的知识鉴别新免疫原性组合物候选物仍由于目前并不存在足够数学算法而成为挑战性过程。事实上，最新报导表明尽管鉴别数百个含有理论跨膜域的开放阅读框架 (“ORF”)，但表达、纯化和诱导表面反应性和功能活性抗体的问题已将研究者导向仅七种候选物用于血清群 B 脑膜炎球菌免疫原性组合物。参见同前。其中一者为先前所已知。

因此，对具有以下特征的免疫原性组合物仍存在需要：(1)激发针对多个奈瑟菌菌株的杀菌性抗体；(2)与多个菌株的表面反应；(3)赋予对抗活攻毒的被动保护；和/或(4)防止定植。

发明内容

本发明的一实施例提供一种聚核苷酸，其包含：(a)与 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性的核苷酸序列；或(b)编码包含与 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列。

本发明的另一实施例提供一种包含本发明聚核苷酸的载体。

本发明的另一实施例提供一种包含本发明载体的重组细胞。

本发明的又一实施例提供一种多肽，其包含：(a)与 SEQ ID NO:2-12 的偶数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的氨基酸序列；(b)由与 SEQ ID NO:1-11 的奇数序列中任一者具有至少 95%序列一致性的核苷酸序列编码的氨基酸序列；(c)至少一个(a)或(b)中所述的氨基酸序列的免疫原性部分；或(d)至少一种(a)或(b)中所述的氨基酸序列或(c)中所述的免疫原性部分的生物相等物。

本发明的又一实施例提供一种抗体，其包含以下任一者：(a)与包含偶数 SEQ ID NO:1-12 中任一者的氨基酸序列的多肽免疫特异性结合的多肽；或(b)至少一个(a)中所述的蛋白质的免疫原性部分；或(c)至少一种(a)中所述的蛋白质或(b)中所述的免疫原性片段的生物相等物。

本发明的又一实施例提供一种组合物，其包含本发明的聚核苷酸、载体、重组细胞、

多肽或抗体。

本发明的又一实施例提供一种组合物，其包含：(a)第一聚核苷酸，其包含与 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性或与编码 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的氨基酸序列的核苷酸序列具有至少约 95%序列一致性的核苷酸序列；和 (b)第二聚核苷酸，其包含与 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性或与编码 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列的核苷酸序列具有至少约 95%序列一致性的核苷酸序列。

本发明又一实施例提供一种组合物，其包含：(a)第一多肽，其包含与 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列；和 (b)第二多肽，其包含与 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者具有至少约 95%序列一致性的氨基酸序列。

本发明的又一实施例提供一种通过包含以下操作的方法所制备的组合物：自奈瑟菌种分离和纯化或重组制备以下任一者：(a)包含偶数 SEQ ID NO:2-12 中任一者的氨基酸序列的多肽；(b)由包含奇数 SEQ ID NO:1-11 中任一者的核酸序列的聚核苷酸编码的多肽；(c)至少一个(a)或(b)中所述的蛋白质的免疫原性部分；或(d)至少一种(a)或(b)中所述的蛋白质或(c)中所述的免疫原性片段的生物相等物。

本发明的又一实施例提供本发明组合物在制备用于诱发哺乳动物免疫反应的药中的用途。

本发明的又一实施例提供本发明组合物在有效抵抗哺乳动物细菌性脑膜炎的药物中的用途。

本发明的又一实施例提供一种制备组合物的方法，其包含在宿主细胞中表达编码本文中所述的任何多肽的核酸序列。

本发明的又一实施例提供一种制备抗体组合物的方法，其包含在将包含本文中所述的蛋白质、免疫原性部分或生物相等物中任一者的组合物引入动物体内后自所述动物回收抗体。

本发明的又一实施例提供一种诱发哺乳动物免疫反应的方法，其包含向所述哺乳动物投与有效量的一种或一种以上本发明的组合物。

本发明的又一实施例提供一种预防或治疗哺乳动物细菌性脑膜炎的方法，其包含向所述哺乳动物投与有效量的一种或一种以上本发明的组合物。

附图说明

图 1A 描绘 SDS-PAGE 凝胶，其描绘自用于鉴别能够激发对抗异源菌株的杀菌性抗

体的奈瑟菌膜蛋白提取物的实验获得的蛋白质部分的两种主要蛋白质。

图 1B 描绘来自通过以蛋白酶消化和逆相 N 末端测序来分析 TMAE 流过组份而鉴别两种主要蛋白质的实验的结果。

图 2 描绘 rLP2086 的纯化流程和如由 SDS-PAGE 所测定的均质性。

图 3 描绘来自通过以 LC-MS/MS 和相应 SDS-PAGE 来分析 TMAE 流过组份而鉴别两种主要蛋白质和一种次要蛋白质的实验的结果。

图 4 为重组表达 2086 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶。

图 5 为如本文实例中所述的质粒 pPX7340 的示意图。

图 6 为如本文实例中所述的质粒 pPX7328 的示意图。

图 7 为如本文实例中所述的质粒 pPX7343 的示意图。

图 8 说明来自各种菌株的 2086 基因的 N 末端区域。

图 9A 为展示鉴别奈瑟菌菌株中的免疫原性组份的初始步骤的流程图。

图 9B 为展示鉴别奈瑟菌菌株中的免疫原性组份的最后步骤的流程图。

图 10A 为驱动 P4 信号/ORF2086 融合蛋白的表达以表达如本文实例中所述的脂质化形式 rP2086 的 pBAD 阿拉伯糖可诱导启动子的示意图。

图 10B 为用于重组表达非脂质化形式 ORF2086 的 pET9a-T7 载体的示意图。

图 11A 为表示表达 rLP2086 蛋白的大肠杆菌 B (*E. coli* B) 的全细胞溶菌液的照片。

图 11B 展示表达 rP2086 蛋白的大肠杆菌 B 的全细胞溶菌液。

图 12 为展示根据本发明的实施例将 ORF2086 蛋白的亚族和群结构化的系统发生树。

图 13 为 rLP2086 亚族 A 抗血清的全细胞 ELISA 数据的图解说明。

图 14 为 rLP2086 亚族 B 抗血清的全细胞 ELISA 数据的图解说明。

图 15 为 rLP2086 混合研究-WCE 效价的结果的图解说明。

图 16 为 rLP2086/rPorA 混合研究-WCE 效价的结果的图解说明。

图 17 为展示 rLP2086 小鼠抗血清对 P2086 亚族 B 脑膜炎奈瑟菌全细胞溶菌液的反应性的西方印迹法 (Western Blot)。

图 18 为展示 rLP2086 小鼠抗血清对 P2086 亚族 A 脑膜炎奈瑟菌和乳糖奈瑟菌 (*N. lactamica*) 全细胞溶菌液的反应性的西方印迹法。

序列概述

SEQ ID NO:1, 当与原生前导序列组合时编码来自 CDC1135 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

SEQ ID NO:2, 使用原生前导序列制备的来自 CDC1135 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:3, 当与 P4 前导序列组合时编码来自 CDC1135 的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

SEQ ID NO:4, 使用 P4 前导序列制备的来自 CDC1135 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:5, 编码来自 CDC1135 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

SEQ ID NO:6, 来自 CDC1135 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:7, 当与原生前导序列组合时编码来自 CDC1127 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

SEQ ID NO:8, 使用原生前导序列制备的来自 CDC1127 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:9, 当与 P4 前导序列组合时编码来自 CDC1127 的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

SEQ ID NO:10, 使用 P4 前导序列制备的来自 CDC1127 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:11, 编码来自 CDC1127 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

SEQ ID NO:12, 来自 CDC1127 菌株的成熟 2086 蛋白的氨基酸序列。

具体实施方式

本发明提供奈瑟菌 ORF2086 蛋白 (“2086 蛋白”), 包括 2086 亚族 A 蛋白质和 2086 亚族 B 蛋白质。2086 蛋白中的每一者为可自原生奈瑟菌菌株分离的蛋白质, 所述菌株包括脑膜炎奈瑟菌 (血清群 A、B、C、D、W-135、X、Y、Z 和 29E)、淋病奈瑟菌和乳糖奈瑟菌的菌株。2086 蛋白也可使用重组技术制备。

根据各种实施例, 本发明提供 2086 蛋白、其免疫原性部分和/或其生物相等物、与上述任一者免疫特异性结合的抗体和包含编码上述任一者的核酸序列的聚核苷酸。本发明包括组合物、免疫原性组合物和其于预防、治疗和/或诊断脑膜炎球菌感染和尤其由脑膜炎奈瑟菌引起的脑膜炎球菌疾病中的用途, 以及用于制备所述组合物的方法。本文中的 2086 蛋白包括重组形式和自天然来源分离的形式, 以及脂质化和非脂质化形式两者。

本发明意外且有利地提供具有以下功能的组合物: (1) 激发针对多种奈瑟菌菌株的杀菌性抗体, 诸如脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌和/或乳糖奈瑟菌的菌株; (2) 与多种菌株的表

面反应；(3)赋予针对活功毒的被动保护；和/或(4)防止定植，以及使用所述组合物的方法和制备所述组合物的方法。下文描述本发明的各种实施例。

如本文中所述，通过使细胞分级分离、差示清洁剂提取、蛋白质纯化与抗血清制备和利用多种菌株的杀菌活性检定组合来鉴别自脑膜炎奈瑟菌分离的基于奈瑟菌种 ORF2086 蛋白（也称为“2086 蛋白”或“ORF2086”蛋白质，在本文中可互换使用，或对于非脂质化蛋白称为 P2086 和对于蛋白质的脂质化型式称为 LP2086）的新免疫原性组合物候选物。作为上文引用的参考文献中所揭示的可能免疫原性组合物和诊断法的替代，本发明涉及通过使用蛋白质、其免疫原性部分和其生物相等物来治疗和/或预防脑膜炎球菌感染的组合物和方法，以及编码所述多肽、部分和相等物的基因，和与所述物质免疫特异性结合的抗体。

如本文所使用，术语“非菌株特异性”是指抗原激发有效抵抗脑膜炎奈瑟菌的一种以上菌株（例如异源性脑膜炎球菌菌株）的免疫反应的抗原的特征。如本文中所使用，术语“交叉反应性”可与术语“非菌株特异性”互换使用。如本文所使用，术语“免疫原性非菌株特异性脑膜炎奈瑟菌抗原”描述可自脑膜炎奈瑟菌分离的抗原，尽管其也可自另一细菌（例如其它奈瑟菌菌株，诸如淋球菌菌株）分离或使用重组技术制备。

本发明的 2086 蛋白包括脂质化和非脂质化蛋白质。此外，本发明也涵盖对应于各蛋白质的未成熟蛋白质或前蛋白作为中间化合物/组合物的用途。

本发明也提供根据本发明的实施例与上述免疫原性试剂免疫特异性结合的抗体。此外，本发明涉及包含编码上述任一者的核酸序列的经分离聚核苷酸。另外，本发明提供组合物和/或免疫原性组合物和其于预防、治疗和/或诊断脑膜炎球菌性脑膜炎、尤其血清群 B 脑膜炎球菌疾病中的用途，以及用于制备所述组合物的方法。

本发明的组合物具有高度免疫原性且能够激发杀菌性抗体的产生。这些抗体对血清群、血清型和血清亚型异源性脑膜炎球菌菌株有交叉反应性。因此，本发明组合物通过展现激发针对异源性奈瑟菌菌株的杀菌性抗体的能力而克服先前脑膜炎奈瑟菌疫苗尝试的缺点。因此，本发明尤其有利地提供可与较少组份混配以激发与先前所用试剂相当的保护的免疫原性组合物。本文中的组合物或免疫原剂（例如（但不限于）多肽、免疫原性部分或片段和生物相等物等）可单独或其它抗原或试剂组合使用以激发防止脑膜炎球菌感染和疾病的免疫性保护，以及激发防止由其它病原体引起的感染和/或疾病的免疫性保护。此举使用于通过减少对抗多种菌株所需的抗原数目来对抗脑膜炎球菌感染的免疫原性组合物的设计简单化。事实上，经纯化的 2086 蛋白将显著和出乎意料地减少提供

足以造成脑膜炎球菌疾病的菌株的免疫原性覆盖所需的蛋白质数目。2086 蛋白可在大肠杆菌 (*E. coli*) 中以脂蛋白形式 (其为所述蛋白质的野生型形式) 以比在原生脑膜炎球菌中高得多的水平重组表达。

以下已公开国际专利申请案是以引用的方式全部并入本文中: PCT/US02/32369 (于 2003 年 8 月 7 日以 WO 03/063766 公开) 和 PCT/US04/11901 (于 2004 年 11 月 4 日以 WO 04/094596 公开)。

尽管 2086 蛋白并不大量存在于野生型菌株中, 但其为杀菌性抗体的目标。不同于回应 PorA 所产生的那些抗体, 这些抗体能够杀死表达异源性血清亚型的菌株。

针对 2086 蛋白的抗体也被动保护大鼠幼仔免受脑膜炎球菌攻毒。2086 蛋白的重组表达使得能够使用 2086 蛋白作为预防脑膜炎球菌疾病的免疫原性组合物。在临床试验中所有最新脑膜炎球菌免疫原性组合物候选物为含有许多不同蛋白质的复杂混合物或外膜蛋白制剂。提供血清亚型特异性的 PorA 蛋白将需要在免疫原性组合物中包含 6 至 9 种变体以提供疾病相关血清亚型的约 70-80% 覆盖率。相比之下, 本文中清楚地证明, 在西欧和美国, 仅针对单一 2086 蛋白的抗血清能够杀死造成约 65% 的疾病分离株的六种血清亚型代表物。因此, 经纯化的 2086 蛋白具有减少提供足以造成脑膜炎球菌疾病的血清亚型的免疫原性组合物覆盖率所需的蛋白质数目的潜力。

蛋白质、免疫原性部分和生物相等物

本发明提供的 2086 蛋白为经分离的蛋白质或多肽。术语“经分离”意思是自天然状态通过人工改变。如果“经分离”的组合物或物质在自然界中存在, 那么其已自其原始环境变化或移除, 或两者。举例来说, 当所述术语在本文中采用时, 天然存在于活动物中的多肽或聚核苷酸并非“经分离”, 但自其天然状态的共存物质分离的相同多肽或聚核苷酸是“经分离”的。因此, 如本文所使用, 术语“经分离蛋白质”包含自天然来源分离的蛋白质和使用重组技术制备的蛋白质, 以及与其它抗原和/或诸如医药学上可接受的载体、缓冲剂、佐剂等的添加剂组合时的所述蛋白质。

根据本发明的一实施例, 2086 蛋白的特征为免疫原性、非病原性和非菌株特异性。2086 蛋白高度可变且因此可经历氨基酸残基的插入、取代和/或缺失而不损害蛋白质的免疫原性。2086 蛋白可分为两种亚族, 亚族 A 和亚族 B。

来自亚族 A 的 2086 蛋白包含 SEQ ID NO:2-6 的偶数序列中任一者的氨基酸序列或由包含 SEQ ID NO:1-5 的奇数序列中任一者的核苷酸序列的聚核苷酸编码的氨基酸序列。来自亚族 B 的 2086 蛋白包含 SEQ ID NO:8-12 的偶数序列中任一者的氨基酸序列或由包

含 SEQ ID NO:7-11 的奇数序列中任一者的核苷酸序列的聚核苷酸编码的氨基酸序列。

本发明的多肽序列可与参考序列（例如偶数 SEQ ID NO:2-12）一致，即 100%一致，或与参考序列相比其可包括许多氨基酸改变致使一致性%小于 100%。所述改变包括至少一个氨基酸缺失，包括保守和非保守取代的取代，或插入。改变可存在于参考多肽序列的胺基或羧基末端位置或那些末端位置之间的任何地方，个别地散布于参考氨基酸序列的氨基酸中或以一个或一个以上连续组散布于参考氨基酸序列中。

因此，本发明也提供具有与序列表中所含的氨基酸序列（即偶数 SEQ ID NO:2-12）一致的序列的蛋白质。根据本发明的各种实施例，2086 序列具有与 SEQ ID NO:2-12 的偶数氨基酸序列中的任一者具有高于至少约 95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或更高一致性的序列。这些序列包括（但不限于）突变体和等位基因变异体。

在本发明的优选实施例中，2086 蛋白或其它 2086 多肽（例如免疫性部分和生物相等物）产生针对脑膜炎球菌的同源菌株和至少一种异源菌株的杀菌性抗体。具体地说，针对 2086 多肽的抗体被动地保护大鼠幼仔免受脑膜炎球菌的攻毒，诸如鼻内攻毒。在其它优选实施例中，2086 多肽对于大鼠幼仔展现针对同源菌株和至少一种异源菌株的此类保护。所述多肽可选自上述序列概述，如偶数 SEQ ID NO: 2-12 中所阐明，或所述多肽可为所列多肽的任何免疫性片段或生物相等物。优选地，多肽选自上述序列概述中的偶数 SEQ ID NO: 2-12 中的任一者。

本发明也涉及 2086 多肽的等位基因或其它变异体，其为生物相等物。合适的生物相等物将展现以下能力：(1)激发针对同源菌株和至少一种异源性奈瑟菌菌株和/或淋球菌菌株的杀菌性抗体；(2)与同源菌株和至少一种异源性奈瑟菌和/或淋球菌菌株的表面反应；(3)赋予针对活攻毒的被动保护；和/或(4)防止定植。

合适的生物相等物与本文中所示的 2086 多肽（即，偶数 SEQ ID NO: 2-12）的一者具有至少约 95%、96%、97%、98%、99%或 99.9%相似性，条件是相等物能够激发与本发明的 2086 蛋白中的一者实质上相同的免疫原性特性。

或者，生物相等物与偶数 SEQ ID NO: 2-12 的 2086 蛋白中的一者具有实质上相同的免疫原性特性。根据本发明的实施例，生物相等物与偶数 SEQ ID NO: 2-12 具有相同的免疫原性特性。

通过产生本发明的蛋白质的变异体和修饰来获得生物相等物。通过插入、缺失或取代一个或一个以上氨基酸来改变氨基酸序列而获得蛋白质的这些变异体和修饰物。例如通过取代来修饰氨基酸序列，以产生具有实质上相同或改良品质的多肽。引入改变的一

优选方法包含通过定点突变诱发使多肽的核酸序列产生预定突变。

修饰和变化可在本发明多肽的结构中产生且仍获得具有脑膜炎奈瑟菌免疫原性的分子。举例来说，但不加以限制，在序列中可以某些氨基酸取代其它氨基酸（包括非保守和保守取代）而不明显损失免疫原性。因为是多肽的相互作用能力和性质定义多肽的生物功能活性，所以许多氨基酸序列取代可在多肽序列（或当然其基础 DNA 编码序列）中进行且仍然获得具有类似特性的多肽。本发明涵盖对本文中多肽的结构以及编码所述多肽的核酸序列的任何变化，其中多肽保留免疫原性。因此，基于本文中提供的指导，所属领域的一般技术人员能够容易地修饰所揭示的多肽和聚核苷酸。

举例来说，已鉴别出可允许取代或缺失的某些可变区。根据本发明的一实施例，如先前论述的 2086 一致序列展示 2086 家族蛋白质的保守和非保守区域。

在作出所述变化时，可利用所属领域的技术人员已知的任何技术。举例来说，在不希望施加限制的情况下，可考虑氨基酸的亲水性指数。亲水性氨基酸指数在赋予多肽相互作用生物功能中的重要性在所属领域中通常已知。凯特（Kyte）等人 1982. 分子生物学杂志 (*J. Mol. Bio.*) 157:105-132。

类似氨基酸的取代也可根据亲水性进行，尤其在由其产生的生物功能等效多肽或肽意欲用于免疫学实施例中的情况下。以引用的方式并入本文中的美国专利第 4,554,101 号陈述，受制于相邻氨基酸的亲水性的多肽的最大局部平均亲水性与其免疫原性有关，即与多肽的生物学特性有关。

多肽的生物相等物也可使用位点特异性突变诱发来制备。位点特异性突变诱发为适用于通过特异性突变诱发基础 DNA 来制备来源于其序列的第二代多肽或生物功能等效多肽或肽的技术。当氨基酸取代合乎需要时，所述变化可为合乎需要的。所述技术进一步提供通过将一个或一个以上核苷酸序列变化引入 DNA 中来制备和测试序列变异体（例如并有上述考虑的一种或一种以上）的现成能力。位点特异性突变诱发允许通过使用编码具有所需突变的 DNA 序列的特定寡核苷酸序列，以及足够多的相邻核苷酸来产生突变体，以提供具有足够尺寸和序列复杂性的引物序列从而在所跨越的缺失接合点两侧形成稳定双链体。通常，约 17 至 25 个核苷酸长度的引物优选，其中在所改变序列的接合点的两侧有约 5 至 10 个残基。

一般来说，位点特异性突变诱发的技术在所属领域中众所周知。如应了解，所述技术通常采用可以单链和双链形式两者存在的噬载体。通常，通过首先获得在序列中包括编码所选脑膜炎奈瑟菌多肽序列的全部或一部分的 DNA 序列的单链载体来执行根据

本文的定点突变诱发。制备（例如合成）具有所需突变型序列的寡核苷酸引物。接着将此引物退火为单链载体，且通过使用诸如*大肠杆菌 DNA* 聚合酶 I（Klenow 片段）的酶延长，以便完成带突变链的合成。因此，形成异源双链体，其中一条链编码原始非突变序列且第二链带有所需突变。接着使用此异源双链体载体来转化诸如*大肠杆菌*细胞的适当细胞且选择包括带有突变的重组载体的克隆。市售试剂盒与所有必需试剂一起供给，寡核苷酸引物除外。

2086 多肽包括包含与具有来自偶数 SEQ ID NO 2-12 中的一者的氨基酸序列的 2086 蛋白具有实质上序列相似性和/或生物等效性的任何蛋白质或多肽。另外，本发明的 2086 多肽不限于特定来源。因此，本发明提供多种来源的多肽的一般检测和分离。同样，如所属领域的技术人员所众所周知，2086 多肽可基于本文中提供的指导或以所属领域中已知的任何其它合成方式重组制备。

本发明预期可有利地裂解 2086 多肽为片段以供进一步结构或功能分析，或产生诸如 2086 相关多肽和 2086 特异性抗体的试剂所用。此举可通过用诸如胞内蛋白酶 glu-C（柏林格尔公司，印第安纳州印第安纳波利斯（Boehringer, Indianapolis, IN））的肽酶处理经纯化或未经纯化的脑膜炎奈瑟菌多肽来完成。用 CNBr 处理为可自天然脑膜炎奈瑟菌 2086 多肽产生肽片段的另一种方法。重组技术也可用于产生 2086 蛋白的特定片段。

作为本文中所使用的术语，“变异体”为分别不同于参考聚核苷酸或多肽但保留基本特性的聚核苷酸或多肽。聚核苷酸的典型变异体在核苷酸序列方面不同于另一参考聚核苷酸。变异体的核苷酸序列变化可能或可能不改变由参考聚核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。如下所论述，核苷酸变化可产生由参考序列所编码的多肽中的氨基酸取代、添加、缺失、融合和截短。多肽的典型变异体在氨基酸序列方面不同于另一参考多肽。通常，差异为有限的以便参考多肽和变异体的序列总体上极其类似且在许多区域一致（即生物学上等效）。变异体和参考多肽可在氨基酸序列方面因一个或一个以上呈任何组合形式的取代、添加、缺失而不同。取代或插入的氨基酸残基可能或可能不为由遗传密码所编码的氨基酸残基。聚核苷酸或多肽的变异体可天然存在，诸如等位基因变异体，或其可为未知天然存在的变异体。聚核苷酸和多肽的非天然存在变异体可通过突变诱发技术或通过直接合成来制造。

如所属领域中所已知，“一致性”为两个或两个以上多肽序列或两个或两个以上聚核苷酸序列之间通过比较所述序列所确定的关系。在所属领域中，“一致性”也任选意指多肽或聚核苷酸序列之间的序列相关程度，如通过所述序列串之间的匹配度所确定。“一致

性”和“相似性”可易于通过已知方法计算，所述方法包括（但不限于）以下文献中所述的那些方法：计算分子生物学（Computational Molecular Biology），莱斯克 A. M. (Lesk, A. M.) 编，牛津大学出版社（Oxford University Press），纽约（New York），1988；生物计算：信息学和基因组计划（Biocomputing: Informatics and Genome Projects），史密斯（Smith, D. W.）编，学术出版社（Academic Press），纽约（New York），1993；序列数据的计算机分析（Computer Analysis of Sequence Data, Part I），格里芬 A. M. (Griffin A. M.) 和格里芬 H. G. (Griffin H. G.)，编，胡玛娜出版社（Humana Press），新泽西（New Jersey），1994；分子生物学中的序列分析（Sequence Analysis in Molecular Biology），冯海因里奇 G. (von Heinje, G.)，学术出版社（Academic Press），1987；和序列分析入门（Sequence Analysis Primer），格里布斯科夫 M. (Gribskov, M.) 和德维吕 J. (Devereux, J.) 编，M 斯托克顿出版社（Stockton Press），纽约（New York），1991；和卡芮罗 H. (Carillo, H.) 和里普曼 D. (Lipman, D.)，SIAM J. 应用数学 (Applied Math)。，48:1073 (1988)。测定一致性的优选方法经设计以得到所测试序列之间的最大匹配。测定一致性和相似性的方法以公开可用的计算机程序编码。测定两个序列之间的一致性和相似性的优选计算机程序方法包括（但不限于）GCG 程序包（德维吕 J. (Devereux, J.) 等人 1984）、BLASTP、BLASTN 和 FASTA（阿尔舒尔 S. F. (Altschul, S. F.) 等人，1990）。BLASTX 程序可公开得自 NCBI 和其它来源（BLAST 手册（BLAST Manual），阿尔舒尔 S. (Altschul, S.) 等人，NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894；阿尔舒尔 S. (Altschul, S.) 等人，1990）。众所周知史密斯华特曼（Altschul, S.）算法也可用于测定一致性。

举例来说，在不欲受到限制的情况下，本发明的氨基酸序列可与参考序列偶数 SEQ ID NO: 2-12 一致；即 100%一致，或其与参考序列相比可包括许多氨基酸改变，致使一致性%小于 100%。所述改变选自由至少一个氨基酸缺失、包括保守和非保守取代的取代或插入组成的群组，且其中所述改变可存在于参考多肽序列的胺基或羧基末端位置或那些末端位置之间的任何地方，个别地散布于参考序列的氨基酸中或以一个或一个以上连续组散布于参考序列中。对于给定一致性%的氨基酸改变的数目可通过使偶数 SEQ ID NO:2-12 中氨基酸的总数乘以各别一致性百分数的数值百分数（除以 100）且接着自偶数 SEQ ID NO:2-12 的任一者中氨基酸的所述总数减去所述乘积，或：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y),$$

其中 n_a 为氨基酸改变的数目， x_a 为偶数 SEQ ID NO:2-12 中氨基酸的总数，且 y 例

如对于 70%为 0.70, 对于 80%为 0.80, 对于 85%为 0.85 等, 且其中将 x_a 与 y 的任何非整数乘积舍至最接近整数, 随后将其自 x_a 减去。

在优选实施例中, 上述多肽选自偶数 SEQ ID NO 2-12 中所列举的蛋白质, 诸如 2086 蛋白的成熟加工形式。2086 蛋白或相等物等可为脂质化或非脂质化蛋白质。

ORF 2086 可与原生 ORF 2086 信号序列一起在 *大肠杆菌* 中表达。然而, 需要找出改良蛋白质表达的手段。根据本发明的一实施例, 前导序列产生脂质化形式的蛋白质。举例来说, 下文描述使用未分型的 *流感嗜血杆菌* (*Haemophilus influenzae*) P4 蛋白质的信号序列来增强表达。

细菌脂蛋白的加工开始于合成含有信号序列的前驱体或前脂蛋白, 而所述信号序列含有一致脂蛋白加工/修饰位点。这一前脂蛋白最初穿过革兰氏阳性菌 (Gram positive bacteria) 内膜上或革兰氏阳性菌 (Gram positive bacteria) 膜上的常见 Sec 系统。在前脂蛋白由 Sec 系统定位于膜中后, 信号肽酶 II 在一致位点裂解前脂蛋白且使暴露的 N 末端半胱氨酸残基甘油酸化和酰化。早矢仕 (Hayashi) 等人 1990. 细菌中的脂蛋白 (Lipoproteins in bacteria). *生物能学生物膜杂志* (*J. Bioenerg. Biomembr.*) 六月; 22(3):451-71; 奥德加 (Oudega) 等人 1993. 大肠杆菌 SecB、SecA 和 SecY 蛋白为一种小型脂蛋白细菌素释放蛋白的表达和膜插入所需 (*Escherichia coli* SecB, SecA, and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein). *细菌学杂志* (*J. Bacteriol.*) 三月; 175(5):1543-7; 桑卡兰 (Sankaran) 等人 1995. 细菌脂蛋白的修饰 (Modification of bacterial lipoproteins). *酶学方法* (*Methods Enzymol.*) 250:683-97。

在革兰氏阴性菌中, 取决于脂蛋白位置 2 处的分选信号, 脂质化蛋白质向外膜的转运由具有膜特异性的独特 ABC 转运体系统介导。药师 (Yakushi) 等人 2000. 介导经脂质修饰蛋白质从膜剥离的新颖 ABC 转运体 (A new ABC transporter mediating the detachment of lipid modified proteins from membranes). *自然细胞生物学* (*Nat Cell Biol.*) 四月; 2(4):212-8。

与细菌脂蛋白和其信号序列的融合已用于在细菌表面上呈递重组蛋白质。美国专利第 5,583,038 号和第 6,130,085 号。交换脂蛋白信号序列可增加脂蛋白的产生。德 (De) 等人 2000. 表达于大肠杆菌中的肺炎链球菌棕榈酸化肺炎球菌表面粘附素 A 的纯化和表征 (Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesin A expressed in *Escherichia coli*). *疫苗* (*Vaccine*) 三月

6;18(17):1811-21。

已知蛋白质的细菌脂质化作用增强或改良蛋白质的免疫反应。埃尔蒂尔 (Erdile) 等人 1993. 连接脂质在博氏疏螺旋体 OspA 中的作用 (Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA). 传染免疫学 (Infect. Immun). 一月; 61(1):81-90; 施纳普 (Snapper) 等人 1995. 在针对 T 细胞非依赖性 II 型抗原的体液免疫反应中细胞脂蛋白可取代细胞因子 (Bacterial lipoproteins may substitute for cytokines in the humoral immune response to T cell-independent type II antigens). 免疫学杂志 (J. Immunol). 十二月 15; 155(12):5582-9. 然而, 细菌脂蛋白表达可因加工的严格性而变复杂。波立特 (Pollitt) 等人 1986. 大肠杆菌主要外膜脂蛋白信号肽裂解位点的氨基酸取代的作用 (Effect of amino acid substitutions at the signal peptide cleavage site of the *Escherichia coli* major outer membrane lipoprotein). 生物化学杂志 (J. Biol. Chem). 二月 5 日; 261(4):1835-7; 伦 (Lunn) 等人 1987. 前脂蛋白信号肽突变对大肠杆菌中杂交前脂- β -内酰胺酶分泌的影响 (Effects of prolipoprotein signal peptide mutations on secretion of hybrid prolipo-beta-lactamase in *Escherichia coli*). 生物化学杂志 (J. Biol. Chem). 一月 15 日; 262(17):8318-24; 克莱恩 (Klein) 等人 1988. 细菌脂蛋白的信号序列的独特特性 (Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins). 蛋白质工程 (J. Biol. Chem). 四月; 2(1):15-20. 细菌脂蛋白表达也因诸如毒性和低表达量的其它问题而变复杂。戈麦斯 (Gomez) 等人 1994. 核苷酸, 枯草芽孢杆菌脂蛋白 LplA 在大肠杆菌中表达时引起细胞溶解 (Nucleotide The *Bacillus subtilis* lipoprotein LplA causes cell lysis when expressed in *Escherichia coli*). 微生物学 (Microbiology). 八月; 140 (Pt 8):1839-45; 汉森 (Hansson) 等人 1995. 截短和全长形式的莱姆病包柔氏螺旋体外表面蛋白 A 在大肠杆菌中的表达 (Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface protein A in *Escherichia coli*). 蛋白质实验纯化 (Protein Expr. Purif). 二月; 6(1):15-24; 药师 (Yakushi) 等人 1997. 错定位大外膜脂蛋白与大肠杆菌的肽聚糖之间的共价连接的致死性 (Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*). 细菌学杂志 (J. Bacteriol.). 五月; 179(9):2857-62。

未分型流感嗜血杆菌细菌表达称为 P4 的脂蛋白 (也称为蛋白质“e”)。P4 蛋白质的重组形式使用原生 P4 信号序列在大肠杆菌中高度表达。美国专利第 5,955,580 号。当在大肠杆菌中用原生 P4 信号序列取代表达载体中的原生 ORF 2086 信号序列时, ORF2086 的表达量增加。

使用异源 P4 信号序列增加表达的这一概念可扩展至其它细菌脂蛋白。具体地说, 对

细菌基因组进行分析使得许多可能受关注的 ORF 得以鉴别。在诸如大肠杆菌的异源宿主细胞中表达具有原生信号序列的各 ORF 的尝试引起使用多种信号序列中固有的多种问题，包括稳定性、兼容性等等。为将这些问题减至最少，使用 P4 信号序列表达各相关 ORF。如上文所述，P4 信号序列改良异源 2086 ORF 的表达。通过使相关 ORF 的原生信号序列缺失，且将 P4 信号序列接合至 ORF 来建构表达载体。接着用表达载体转化、转染或感染合适宿主细胞，且 ORF 的表达与使用 ORF 的原生信号序列相比有所增加。

在宿主细胞中非脂质化形式由缺乏原始前导序列的蛋白质或由经不指定脂肪酸酰化位点的序列的一部分置换的前导序列产生。

除非另外明确指出，否则本发明的各种形式的 2086 蛋白在本文中称为“2086”蛋白质。同样，除非另有指出，否则“2086 多肽”是指如上所述的 2086 蛋白以及其免疫原性部分或生物相等物。

如以 10%至 20%梯度 SDS 聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）所测量，全长经分离和经纯化脑膜炎奈瑟菌 2086 蛋白具有约 28 至 35 kDa 的表观分子量。更具体地说，如通过质谱法所测量，此蛋白质具有约 26,000 至 30,000 道尔顿的分子量。

优选地，使用 2086 多肽和编码所述多肽的核酸来预防或改善由脑膜炎奈瑟菌和/或其它菌种引起的感染。

抗体

包括 SEQ ID NO: 2-12 的氨基酸序列的本发明蛋白质、其片段和其类似物或表达其的细胞也用作免疫原以产生对本发明的多肽具有免疫特异性的抗体。本发明包括针对免疫特异性多肽的抗体和使用所述抗体来检测脑膜炎奈瑟菌的存在、提供被动保护或测量所述多肽在细胞、细胞或组织提取物或生物流体中的量或浓度的用途。

本发明抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体和抗独特型抗体。多克隆抗体为来源于用抗原免疫的动物的血清的抗体分子的异质群体。单克隆抗体为针对特定抗原的抗体的实质上均质群体。单克隆抗体可通过所属领域的技术人员已知的方法获得，例如科勒尔（Kohler）和米尔斯坦恩（Milstein），1975，自然（*Nature*）256:495-497 和美国专利第 4,376,110 号。所述抗体可属于任何免疫球蛋白种类，包括 IgG、IgM、IgE、IgA、GILD 和其任何亚类。

嵌合抗体为不同部分来源于不同动物物种的分子，诸如具有来源于鼠类单克隆抗体的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的那些抗体。嵌合抗体和其制备方法在所属领域中已知（卡比利（Cabilly）等人，1984，美国国家科学院院刊（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）

81:3273-3277; 莫里森 (Morrison) 等人, 1984, *美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* 81:6851- 6855; 波利安 (Boulianne) 等人, 1984, *自然 (Nature)* 312:643-646; 卡比利 (Cabilly) 等人, 欧洲专利申请案 125023 (于 1984 年 11 月 14 日公开); 塔尼古奇 (Taniguchi) 等人, 欧洲专利申请案 171496 (于 1985 年 2 月 19 日公开); 莫里森 (Morrison) 等人, 欧洲专利申请案 173494 (于 1986 年 3 月 5 日公开); 纽博格 (Neuberger) 等人, PCT 申请案 WO 86/ 01533 (于 1986 年 3 月 13 日公开); 库多 (Kudo) 等人, 欧洲专利申请案 184187 (于 1986 年 6 月 11 日公开); 莫里森 (Morrison) 等人, 欧洲专利申请案 173494 (于 1986 年 5 月 5 日公开); 萨哈根 (Sahagan) 等人, 1986, *免疫学杂志 (J. Immunol)* .137:1066-1074; 洛宾逊 (Robinson) 等人, PCT/US86/02269 (于 1987 年 5 月 7 日公开); 刘 (Liu) 等人, 1987, *美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* 84:3439-3443; 孙 (Sun) 等人, 1987, *美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* 84:214-218; 贝特 (Better) 等人, 1988, *科学 (Science)* 240:1041-1043)。这些参考文献以引用的方式全部并入本文中。

抗独特型 (抗 Id) 抗体为识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定子的抗体。抗 Id 抗体通过用制备抗 Id 所针对的单克隆抗体免疫作为单克隆抗体的来源的相同物种和遗传型的动物 (例如小鼠品系) 来制备。经免疫的动物将通过产生这些同型决定子的抗体 (抗 Id 抗体) 来识别和应答免疫抗体的独特型决定子。

因此, 对抗本发明多肽所产生的单克隆抗体可用于在合适动物体内诱导抗 Id 抗体。来自所述经免疫小鼠的脾细胞可用于产生分泌抗 Id 单克隆抗体的抗 Id 杂交瘤。此外, 可使抗 Id 抗体与诸如匙孔螺血蓝蛋白 (KLH) 的载体偶合且用于免疫其它 BALB/c 小鼠。来自这些小鼠的血清将含有具有对 R-PTPase 抗原决定基有特异性的最终 mAb 的结合特性的抗 Id 抗体。因此抗 Id 抗体具有其独特型抗原决定基, 或在结构上类似于所评估的抗原决定基的“独特位 (idiotope)”, 诸如**化脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)** 多肽。

术语“抗体”也欲包括完整分子以及片段两者, 所述片段诸如 Fab、单链抗体和能够结合抗原的抗体的其它抗原识别片段。Fab 片段缺乏完整抗体的 Fc 片段, 自循环更快速清除, 且可具有比完整抗体少的非特异性组织结合 (华尔 (Wahl) 等人, 1983, *核酸医学杂志 (J. Nucl. Med.)* 24:316-325)。应了解, Fab 和适用于本发明的抗体的其它片段可用于根据用于完整抗体分子的方法检测和量化**脑膜炎奈瑟菌**多肽。

诸如抗独特型 (“抗 Id”) 抗体的本发明抗体可用于治疗或预防哺乳动物宿主体内的**奈瑟菌**感染的方法, 其包含投与免疫有效量的对如上所述的多肽有特异性的抗体。抗 Id

抗体也可用作“免疫原”以诱发另一动物体内的免疫反应，从而产生所谓抗抗 Id 抗体。抗抗 Id 可与诱导抗 Id 的原始 mAb 在抗原决定基方面一致。因此，通过使用针对 mAb 的独特型决定子的抗体，有可能鉴别表达具有一致特异性的抗体的其它克隆。

以多种方式使用抗体，例如用于证实蛋白质已表达，或确认蛋白质在何处表达。经标记抗体（例如用于 FACS 的荧光标记）可与完整细菌一起培养且细菌表面上标记的存在证实例如蛋白质的位置。

对抗本发明多肽产生的抗体可通过使用常规方案向动物投与多肽或带有抗原决定基的片段、类似物或细胞来获得。对于制备单克隆抗体来说，使用提供由连续细胞系培养物所产生的抗体的任何技术。

聚核苷酸

如同本发明的蛋白质，本发明的聚核苷酸可包含与奇数 SEQ ID NO:1-11 的参考序列中任一者一致的核酸序列，即 100%一致，或与参考序列相比其可包括多达许多核苷酸改变。所述改变选自由至少一个核苷酸缺失、包括转换和易位的取代或插入组成的群组，且其中所述改变可存在于参考核苷酸序列的 5'或 3'末端位置或那些末端位置之间的任何地方，个别地散布于参考序列的核苷酸中或以一个或一个以上连续组散布于参考序列中。核苷酸改变的数目通过将奇数 SEQ ID NO:1-11 的任一者中核苷酸总数乘以各别一致性百分数的数值百分数（除以 100）且自所述序列中核苷酸的所述总数减去所述乘积来测定。

举例来说，在不欲受到限制的情况下，经分离的脑膜炎奈瑟菌聚核苷酸包含与奇数 SEQ ID NO:1-11 的任何核酸序列具有至少 95%一致性的聚核苷酸序列；其简并变异体或其片段，其中所述聚核苷酸序列可在奇数 SEQ ID NO:1-11 的核酸序列的整个聚核苷酸区域中包括至多 n_n 个核酸改变，其中 n_n 为改变的最大数目且由下式计算：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y),$$

其中 x_n 为奇数 SEQ ID NO:1-11 的任一者的核酸的总数且 y 的值为 0.95，其中将 x_n 与 y 的任何非整数乘积舍至最接近整数，随后自 x_n 减去所述乘积。当然， y 也可具有对于 95%为 0.95 的值等。编码包含偶数 SEQ ID NO:2-12 的任一者的氨基酸序列的多肽的聚核苷酸序列的改变可在此编码序列中产生无义、错义或移框突变且由此在所述改变后改变由所述聚核苷酸编码的多肽。

本发明的特定实施例涉及编码 2086 蛋白的聚核苷酸（本文中称为“2086 聚核苷酸”或“ORF2086 聚核苷酸”）和对抗 2086 蛋白产生的抗体。在优选实施例中，本发明的经

分离聚核苷酸为包含与选自奇数 SEQ ID NO:1-11 的一者的核苷酸序列具有至少约 95%一致性的核苷酸序列的聚核苷酸、其简并变异体或其片段。如本文所定义,“简并变异体”定义为由于遗传密码的简并性而不同于展示于奇数 SEQ ID NO:1-11 中的核苷酸序列,但仍然编码与由展示于奇数 SEQ ID NO: 1-11 中的核苷酸序列所编码蛋白质相同的 2086 蛋白(例如偶数 SEQ ID NO: 2-12)的聚核苷酸。

在其它实施例中,聚核苷酸为选自奇数 SEQ ID NO: 1-11 的一者的核苷酸序列、其简并变异体或其片段的互补序列。在其它实施例中,聚核苷酸选自由 DNA、染色体 DNA、cDNA 和 RNA 组成的群组且可进一步包含异源核苷酸。

应了解,2086 聚核苷酸可自天然、合成或半合成来源获得;此外,核苷酸序列可为天然存在的序列,或其可通过包括单个或多个碱基取代、缺失、插入和颠倒的突变而与所述天然存在的序列相关,条件是包含所述序列的核酸分子始终能够表达为如上所述的 2086 免疫原性多肽。核酸分子可为 RNA、DNA、单链或双链、线性或共价闭合环形。核苷酸序列可具有相邻于其定位的表达控制序列,所述控制序列通常来源于异源来源。通常,本发明的核酸序列的重组表达将在核酸序列的末端使用终止密码子序列,诸如 TAA。

本发明也包括能够在低严谨条件下、更优选严谨条件且最优选高严谨条件下与本文所述的聚核苷酸杂交的聚核苷酸。严谨条件的实例在以下严谨条件表中展示:高严谨条件为至少如例如条件 A-F 般严谨的那些;严谨条件为至少如例如条件 G-L 般严谨;和低严谨条件为至少如例如条件 M-R 般严谨。

表 I
严谨条件

严谨条件	聚核苷酸杂交	杂交长度(bp) ^I	杂交温度和缓冲液 ^H	洗涤温度和缓冲液 ^H
A	DNA:DNA	> 50	65EC; 1×SSC -或- 42EC; 1×SSC, 50%甲酰胺	65EC; 0.3×SSC
B	DNA:DNA	< 50	T _B ; 1×SSC	T _B ; 1×SSC
C	DNA:RNA	> 50	67EC; 1×SSC -或- 45EC; 1×SSC, 50%甲酰胺	67EC; 0.3×SSC
D	DNA:RNA	< 50	T _D ; 1×SSC	T _D ; 1×SSC
E	RNA:RNA	> 50	70EC; 1×SSC -或- 50EC; 1×SSC, 50%甲酰胺	70EC; 0.3×SSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F ; 1×SSC	T _F ; 1×SSC
G	DNA:DNA	> 50	65EC; 4×SSC -或- 42EC; 4×SSC, 50%甲酰胺	65EC; 1×SSC
H	DNA:DNA	< 50	T _H ; 4×SSC	T _H ; 4×SSC

严谨条件	聚核苷酸杂交	杂交长度(bp) ^I	杂交温度和缓冲液 ^H	洗涤温度和缓冲液 ^H
I	DNA:RNA	> 50	67EC; 4×SSC -或- 45EC; 4×SSC, 50%甲酰胺	67EC; 1×SSC
J	DNA:RNA	< 50	T _J ; 4×SSC	T _J ; 4×SSC
K	RNA:RNA	> 50	70EC; 4×SSC -或- 50EC; 4×SSC, 50%甲酰胺	67EC; 1×SSC
L	RNA:RNA	< 50	T _L ; 2×SSC	T _L ; 2×SSC
M	DNA:DNA	> 50	50EC; 4×SSC -或- 40EC; 6×SSC, 50%甲酰胺	50EC; 2×SSC
N	DNA:DNA	< 50	T _N ; 6×SSC	T _N ; 6×SSC
O	DNA:RNA	> 50	55EC; 4×SSC -或- 42EC; 6×SSC, 50%甲酰胺	55EC; 2×SSC
P	DNA:RNA	< 50	T _P ; 6×SSC	T _P ; 6×SSC
Q	RNA:RNA	> 50	60EC; 4×SSC -或- 45EC; 6×SSC, 50%甲酰胺	60EC; 2×SSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R ; 4×SSC	T _R ; 4×SSC

bp^I: 所述杂交长度为杂交聚核苷酸的杂交区域的预期长度。当将聚核苷酸与未知序列的目标聚核苷酸杂交时, 杂交长度假定为杂交聚核苷酸的长度。当使已知序列的聚核苷酸杂交时, 杂交长度可通过比对聚核苷酸的序列和鉴别最优序列互补的区域来测定。

缓冲液^H: 在杂交和洗涤缓冲液中, SSPE (1×SSPE 为 0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄ 和 1.25 mM EDTA, pH 7.4) 可替代 SSC (1×SSC 为 0.15 M NaCl 和 15 mM 柠檬酸钠); 完成杂交后执行洗涤历时 15 分钟。

T_B 至 T_R: 用于预期长度小于 50 个碱基对的杂交物的杂交温度应比杂交物的熔融温度 (T_m) 低 5-10EC, 其中 T_m 根据下列方程式测定。对于长度小于 18 个碱基对的杂交物来说, T_m(EC)=2(A 的#+T 碱基)+4(G 的#+C 碱基)。对于长度介于 18 与 49 个碱基对之间的杂交物来说, T_m(EC)=81.5+16.6(log₁₀[Na⁺])+0.41(%G+C) - (600/N), 其中 N 为杂交物中碱基的数目, 且[Na⁺]为杂交缓冲液中钠离子的浓度 (对于 1×SSC 来说[Na⁺]=0.165 M)。

用于聚核苷酸杂交的严谨条件的其它实例在萨姆布鲁克 J. (Sambrook J.), E.F.福里什 (E.F. Fritsch), 和 T.马尼亚迪斯 (T. Maniatis), 1989, 分子克隆: 实验手册 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*), 冷泉港实验出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港 (Cold Spring Harbor), NY, 第 9 和 11 章, 和当代分子生物学方案 (*Current Protocols in Molecular Biology*), 1995, F.M.奥舒贝尔 (F.M. Ausubel) 等人, 编, 约翰威立父子公司 (John Wiley & Sons), 第 2.10 和 6.3-6.4 小节中提供, 所述文献以引用的方式并入本文中。

本发明也提供与这些聚核苷酸完全互补的聚核苷酸且也提供反义序列。也称为反义寡核苷酸的本发明的反义序列包括阻断编码本发明多肽的聚核苷酸表达的内部产生和外部投与的序列。本发明的反义序列包含（例如）约 15-20 个碱基对。反义序列可经设计（例如）以通过防止启动子与上游非翻译序列结合或通过经由防止核糖体结合而防止编码本发明多肽的转录物翻译来抑制转录。

本发明的聚核苷酸可以许多方式制备（例如通过化学合成、自 DNA 文库、自生物体自身）且可采用各种形式（例如单链、双链、载体、探针、引物）。术语“聚核苷酸”包括 DNA 和 RNA，以及其类似物，诸如含有经修饰主链的那些。

根据本发明的其它实施例，本发明的聚核苷酸包含 DNA 文库，诸如 cDNA 文库。

融合蛋白

本发明也涉及融合蛋白。“融合蛋白”是指由两个常常无关的融合基因或其片段编码的蛋白质。举例来说，融合蛋白包含免疫球蛋白分子的恒定区的各种部分以及另一免疫原性蛋白质或其部分。在许多情况下，采用免疫球蛋白 Fc 区作为融合蛋白的一部分对于用于治疗和诊断是有利的，从而产生（例如）改良的药物动力学特性（参见例如，EP 0 232 262 A1）。另一方面，对于一些用途来说，将需要能够在表达、检测和纯化融合蛋白后删除 Fc 部分。本发明的 2086 聚核苷酸用于重组产生本发明的多肽，聚核苷酸可包括单独的成熟多肽的编码序列，或与其它编码序列同处于阅读框架中的成熟多肽的编码序列，所述其它编码序列诸如编码前导或分泌序列、前蛋白或原蛋白或前原蛋白序列或其它融合肽部分的那些序列。举例来说，可编码有助于纯化 2086 多肽或融合多肽的标志物序列（参见根茨（Gentz）等人，1989，以引用的方式全部并入本文中）。因此，本发明的一实施例涵盖编码允许表达产物的 His 标签纯化的融合多肽的聚核苷酸的制备。聚核苷酸也可含有非编码 5'和 3'序列，诸如转录、非翻译序列、拼接和多聚腺嘌呤信号。所述融合多肽可由用如下文所述的重组 DNA 克隆媒剂转化/转染或感染的宿主细胞产生且其随后可自宿主细胞分离以提供实质上不含其它宿主细胞蛋白质的融合多肽。

免疫原性组合物

本发明的一方面提供免疫原性组合物，其包含至少一种 2086 蛋白或编码所述蛋白质的核酸。上述物质具有以下能力：(1)激发针对多种菌株的杀菌性抗体；(2)与多种菌株的表面反应；(3)赋予针对活攻毒的被动保护；和/或(4)防止定植。所述免疫原性组合物的调配物为所属领域的技术人员所众所周知。在某些实施例中，本发明的组合物包括医药学上可接受的载剂和/或稀释剂。合适的医药学上可接受的载剂和/或稀释剂包括任何和所有

常规溶剂、分散介质、填充剂、固体载剂、水溶液、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的医药学上可接受的载剂包括（例如）水、生理食盐水、磷酸盐缓冲生理食盐水、右旋糖、甘油、乙醇等中的一种或一种以上，以及其组合。医药学上可接受的载剂可进一步包含少量助剂物质，诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其增强抗体的存放期或有效性。医药学上可接受的载剂的制备和用途在所属领域中众所周知。除非任何常规介质或试剂与活性成份不兼容，否则涵盖其在本发明的免疫原性组合物中的用途。根据本发明的某些实施例，医药学上可接受的载剂为载体蛋白。

载体蛋白

载体蛋白优选为无毒且不具反应原性且可以足够量和纯度获得的蛋白。载体蛋白应服从标准结合程序。在本发明的一特定实施例中，将 CRM₁₉₇ 用作载体蛋白。

CRM₁₉₇（维斯，桑福德，北卡罗莱纳（Wyeth, Sanford, NC））为自生长于酪蛋白氨基酸和基于酵母提取物的培养基中的白喉棒状杆菌（*Corynebacterium diphtheria*）菌株 C7（ β 197）的培养物分离的白喉毒素的无毒变异体（即类毒素）。通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换色谱纯化 CRM₁₉₇。获得 CRM₁₉₇ 的另一方法在美国专利第 4,925,792 号中描述。或者，根据美国专利第 5,614,382 号重组制备 CRM₁₉₇。其它白喉类毒素也适于用作载体蛋白。

在其它实施例中，本发明的载体蛋白为无酶促活性链球菌 C5a 肽酶（SCP）（例如，美国专利第 6,270,775 号、第 6,355,255 号和第 6,951,653 号中所述的 SCP 变异体的一种或一种以上）。

其它合适载体蛋白包括灭活细菌毒素，诸如破伤风类毒素、百日咳类毒素、霍乱类毒素（例如国际 PCT 公开案第 WO 2004/083251 号中所述的 CT E29H）、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、大肠杆菌 DnaK 蛋白和来自绿脓杆菌（*Pseudomonas aeruginosa*）的外毒素。也可使用细菌外膜蛋白，诸如外膜复合物 c（OMPC）、孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌溶血素毒素（例如美国专利第 5,565,204 号）、肺炎球菌溶血素类毒素（例如国际 PCT 公开案第 WO 2005/108580 号）、肺炎球菌表面蛋白 A（PspA）、肺炎球菌粘附素蛋白（PsaA）或流感嗜血杆菌蛋白 D。也可使用细菌热休克蛋白，诸如分枝杆菌 hsp-70。也可使用其它蛋白，诸如表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）蛋白 SdrG、SitC 和铬铁合金结合蛋白和金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）蛋白 ClfA、ClfB 和 FnbA。诸如卵白蛋白、匙孔螺血蓝蛋白（KLH）、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）、牛血清白蛋白（BSA）、半乳糖激酶（galK）、泛素、 β -半乳糖苷酶、流行性感 NS1 蛋白或结核菌素的经纯化蛋

白衍生物 (PPD) 的其它蛋白也可用作载体蛋白。也可使用例如来自轮状病毒 VP6 或来自噬菌体 Q β 的类病毒粒子。

佐剂

在某些实施例中, 本文中所述的免疫原性组合物也包含一种或一种以上佐剂。佐剂为与免疫原或抗原一起投与时可增强免疫反应的物质。许多细胞因子或淋巴因子已显示具有免疫调节活性, 因此可用作佐剂, 包括 (但不限于) 介白素 1- α 、1- β 、2、4、5、6、7、8、10、12 (参见例如美国专利第 5,723,127 号)、13、14、15、16、17 和 18 (和其突变形式); 干扰素- α 、 β 和 γ ; 颗粒球-巨噬细胞群落刺激因子 (GM-CSF) (参见例如美国专利第 5,078,996 号和 ATCC 寄存编号 39900); 巨噬细胞群落刺激因子 (M-CSF); 颗粒球群落刺激因子 (G-CSF); 和肿瘤坏死因子 α 和 β 。适用于本文中所述的免疫原性组合物的其它佐剂包括: 趋化因子, 包括 (但不限于) MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 和 RANTES; 粘着分子, 诸如选择素, 例如 L-选择素、P-选择素和 E-选择素; 类粘蛋白分子, 例如 CD34、GlyCAM-1 和 MadCAM-1; 整合素家族的成员, 诸如 LFA-1、VLA-1、Mac-1 和 p150.95; 免疫球蛋白超家族的成员, 诸如 PECAM、ICAM (例如 ICAM-1、ICAM-2 和 ICAM-3)、CD2 和 LFA-3; 共刺激分子, 诸如 CD40 和 CD40L; 生长因子, 包括血管生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、B7.2、PDGF、BL-1 和血管内皮生长因子; 受体分子, 包括 Fas、TNF 受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2 和 DR6; 和卡斯蛋白酶 (Caspase) (ICE)。

用于增强免疫反应的合适佐剂进一步包括 (但不限于) MPL™ (3-O-脱酰化单磷酸脂质 A, 考利克萨, 汉密尔顿, 明尼苏达 (Corixa, Hamilton, MT)), 其在美国专利第 4,912,094 号中描述。也适于用作佐剂的为合成脂质 A 类似物或胺基烷基葡萄糖胺磷酸盐化合物 (AGP), 或其衍生物或类似物, 其可从考利克萨 (明尼苏达汉密尔顿) 获得, 其在美国专利第 6,113,918 号中描述。一种所述 AGP 为 2-[(R)-3-四癸酰氧基四癸酰基胺基]乙基 2-脱氧基-4-O-磷酸基-3-O-[(R)-3-四癸酰氧基四癸酰基]-2-[(R)-3-四癸酰氧基四癸酰基-胺基]-b-D-葡萄糖吡喃糖苷, 其也称为 529 (原先称为 RC529)。此 529 佐剂调配为水性形式 (AF) 或稳定乳液 (SE)。

其它佐剂包括胞壁酰肽, 诸如 N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏胺酰基-D-异谷胺酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-非胞壁酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'二软脂酰基-sn-甘油酰基-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (MTP-PE); 水包油乳液, 诸如 MF59 (国际 PCT 公开案第 WO 90/14837 号)

(含有 5%角鲨烯、0.5%吐温 80(Tween 80)和 0.5% Span 85(任选含有各种量的 MTP-PE), 使用诸如型号 110Y 微流化床装置(微流体公司, 牛顿, 马萨诸塞(Microfluidics, Newton, MA))的微流化床装置调配为次微米粒子)和 SAF(含有 10%角鲨烯、0.4%吐温 80、5%泊洛尼克(pluronic)嵌段共聚物 L121 和 thr-MDP, 微流体化为次微米乳液或涡动产生较大粒度乳液); 不完全费氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA); 铝盐(明矾), 诸如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝; 爱菲金(Amphigen); 阿夫立定(Avridine); L121/角鲨烯; D-丙交酯-聚丙交酯/糖苷; 泊洛尼克多元醇; 杀死的**博德氏杆菌(Bordetella)**; 皂角苷, 诸如在美国专利第 5,057,540 号中描述的 Stimulon™ QS-21(抗基因, 福莱明汉姆, 马萨诸塞(Antigenics, Framingham, MA.))、在美国专利第 5,254,339 号中描述的 ISCOMATRIX(CSL 有限公司, 帕克维尔, 澳大利亚(CSL Limited, Parkville, Australia)) 和免疫刺激复合物(ISCOMS); **结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)**; 细菌脂多糖; 合成聚核苷酸, 诸如含有 CpG 基元的寡核苷酸(例如美国专利第 6,207,646 号); IC-31(细胞间 AG 公司, 维也纳, 奥地利(Intercell AG, Vienna, Austria)), 在欧洲专利第 1,296,713 号和第 1,326,634 号中描述; 百日咳毒素(PT)或其突变体、霍乱毒素或其突变体(例如国际 PCT 公开案第 WO 00/18434 号、第 WO 02/098368 号和第 WO 02/098369 号); 或**大肠杆菌**不耐热肠毒素(LT), 尤其 LT-K63、LT-R72、PT-K9/G129; 参见例如, 国际 PCT 公开案第 WO 93/13302 号和第 WO 92/19265 号。

投药方式

所述免疫原性组合物可非经肠投与, 例如通过注射, 经皮下或经肌肉内投与, 以及经口或经鼻内投与。用于肌肉内免疫的方法由沃尔夫(Wolff)等人和塞达哈(Sedegah)等人描述。其它投药方式利用(例如, 但不限于)口服调配物、肺用调配物、栓剂和经皮施用。口服调配物例如包括所述通常所用的赋形剂, 例如(但不限于)医药等级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁和其类似物。

本发明的免疫原性组合物可以 ISCOMS(免疫刺激复合物)的形式传递, ISCOMS 含有 CTB、脂质体或封装于诸如丙烯酸酯或聚(DL-丙交酯-共-糖苷)的化合物中以形成适于吸收尺寸的微球体。本发明的蛋白质也可并入油性乳液中。

多种抗原

包括本发明的蛋白质、聚核苷酸和相等物的免疫原性试剂可以免疫原性组合物中的溶胶活性免疫原形式投与, 或另外组合物可包括其它活性免疫原, 包括其它**奈瑟菌属**免疫原性多肽或一种或一种以上其它微生物病原体(例如(但不限于)病毒、朊病毒、细

菌或真菌)的免疫活性蛋白质或荚膜多糖。组合物可包含一种或一种以上所需蛋白质、片段或所选适应症所需的医药化合物。以相同方式,利用免疫原性组合物中的一种或一种以上核酸的本发明的组合物也可包括编码如上所述的相同各种蛋白质组的核酸。

本发明涵盖任何多抗原或多价免疫原性组合物。举例来说,本发明的组合物可包含两种或两种以上 2086 蛋白的组合,2086 蛋白与一种或一种以上 Por A 蛋白质的组合,2086 蛋白与脑膜炎球菌血清群 A、C、Y 和 W135 多糖和/或多糖结合物的组合,2086 蛋白与脑膜炎球菌和肺炎球菌组合的组合,或上述任一者以适合于粘膜传递的形式的组合。所属领域的技术人员能够容易地调配所述多抗原或多价免疫组合物。

本发明也涵盖多免疫疗法,其中适用于对抗病原体的任何组合物可组合于其中或与本发明的组合物组合。举例来说,但不限于,可向患者投与本发明的免疫原性组合物和作为多免疫疗法的一部分的用于免疫抵抗肺炎链球菌(*S. Pneumoniae*)的另一免疫组合物。所属领域的技术人员能够容易地选择免疫原性组合物与本发明的免疫原性组合物联合使用以实现开发和实施多免疫疗法的目的。

本发明的特定实施例涉及一种或一种以上本发明的多肽或编码其的核酸在组合物中或作为治疗疗法的一部分用于预防或改善肺炎链球菌感染的用途。吾人可将 2086 多肽或 2086 聚核苷酸与任何免疫原性组合物组合以用于抵抗肺炎链球菌感染。吾人也可将 2086 多肽或 2086 聚核苷酸与任何其它基于蛋白质或多糖的脑膜炎球菌疫苗组合。

2086 多肽、片段和相等物可用作结合物免疫原性组合物的一部分;其中一种或一种以上蛋白质或多肽与载体结合以产生具有抵抗若干血清型和/或抵抗若干疾病的免疫原性特性的组合物。或者,2086 多肽中的一者可用作其它免疫原性多肽的载体蛋白。

本发明也涉及一种诱发哺乳动物体内的免疫反应的方法,其包含向所述哺乳动物提供本发明的免疫原性组合物的步骤。所述免疫原性组合物为在所治疗动物或人类体内具有抗原性使得所述组合物中所含的免疫有效量的多肽引起对抗脑膜炎奈瑟菌感染的所需免疫反应的组合物。优选实施例涉及一种治疗(包括改善)或预防脑膜炎奈瑟菌感染的方法,其包含向人类投与免疫有效量的组合物。

如本文所使用,词组“免疫有效量”是指将所述量以单次剂量或作为一系列剂量的部分投与哺乳动物宿主(优选人类),足以至少使所治疗个体的免疫系统产生降低细菌感染的临床影响的反应。此可在预防感染的最小细菌负荷降低的范围内。理想地,所治疗个体将不展现细菌感染的更严重临床表现。剂量的量可视个体的特定情况而变化。此量可以常规试验或者通过所属领域的技术人员已知的方法测定。

本发明的另一特定方面涉及使用表达本发明的蛋白质或其免疫原性部分的载体或质粒作为免疫原性组合物。因此，本发明的另一方面提供一种诱发哺乳动物体内的免疫反应的方法，其包含向哺乳动物提供表达至少一种经分离 2086 多肽的载体或质粒。本发明的蛋白质可使用活载体，尤其使用活重组细菌、病毒或含有表达作为外来多肽的多肽或免疫原性部分所必需的遗传物质的其它活试剂传递至哺乳动物。

根据本发明的另一实施例，提供一种诊断哺乳动物的细菌性脑膜炎的方法，其包含：检测哺乳动物体内或来自所述哺乳动物的组织样品中免疫复合物的存在，使所述哺乳动物或组织样品与包含抗体的抗体组合物接触，所述抗体与至少一种包含偶数 SEQ ID NO: 2-12 的任一者的氨基酸序列的多肽免疫特异性结合；其中使哺乳动物或组织样品与所述抗体组合物在适于形成所述免疫复合物的条件下接触。

病毒和非病毒载体

优选载体、尤其用于活体外和活体内细胞检定的载体为病毒载体，诸如慢病毒、反转录病毒、疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘疮病毒、杆状病毒和具有所需细胞向性的其它重组病毒。因此，编码 2086 蛋白或其免疫原性片段的核酸可使用病毒载体或经由直接引入 DNA 而活体内、离体或活体外引入。在目标组织中的表达可通过使转基因载体靶向特定细胞，诸如用病毒载体或受体配体，或通过使用组织特异性启动子或两者来实现。目标基因传递在 PCT 公开案第 WO 95/28494 号中描述，所述案以引用的方式全部并入本文中。

常用于活体内或离体靶向和治疗程序的病毒载体为基于 DNA 的载体和反转录病毒载体。用于建构和使用病毒载体的方法在所属领域中已知（例如米勒（Miller）和罗斯曼（Rosman），*生物技术（BioTechniques）*，1992，7:980-99）。优选地，病毒载体有复制缺陷，即其不能在目标细胞中自主复制。优选地，复制缺陷病毒为最小病毒，即其仅保留其封装基因组以产生病毒粒子所必需的基因组的序列。

DNA 病毒载体包括减毒或缺陷 DNA 病毒，诸如（但不限于）单纯疱疹病毒（HSV）、乳头瘤病毒、E-B 病毒（Epstein Barr virus, EBV）、腺病毒、腺相关病毒（AAV）等。优选全部或几乎全部缺乏病毒基因的缺陷病毒。缺陷病毒在引入细胞中后不具感染性。缺陷病毒载体的使用允许向特定限定区域的细胞投药，而不考虑载体会感染其它细胞。因此，可明确靶向特定组织。特定载体的实例包括（但不限于）缺陷疱疹病毒 1（HSV1）载体（卡普立特（Kaplitt）等人，*分子细胞神经科学（Molec. Cell. Neurosci.）*，1991，2:320-330）、缺乏糖蛋白 L 基因的缺陷疱疹病毒载体或其它缺陷疱疹病毒载体（PCT 公

开案第 WO 94/21807 号和第 WO 92/05263 号); 减毒腺病毒载体, 诸如由斯坦福-皮埃尔科德 (Stratford-Perricaudet) 等人 (临床研究杂志 (*J. Clin. Invest.*), 1992, 90:626-630; 也参见拉萨莱 (La Salle) 等人, *科学 (Science)*, 1993, 259:988-990) 描述的载体; 和缺陷腺相关病毒载体 (萨姆尔斯基 (Samulski) 等人, 病毒学杂志 (*J. Virol.*), 1987, 61:3096-3101; 萨姆尔斯基 (Samulski) 等人, 病毒学杂志 (*J. Virol.*), 1989, 63:3822-3828; 莱布克斯基 (Lebkowski) 等人, 分子细胞生物学 (*Mol. Cell. Biol.*), 1988, 8:3988-3996), 上述文献中的每一者均以引用的方式全部并入本文中。

各种公司商业上生产病毒载体, 所述公司包括 (但不限于) 鸟基因公司 (Avigen, Inc.) (阿拉米达, 加利福尼亚 (Alameda, CA); AAV 载体)、细胞基因检定公司 (Cell Genesys) (福斯特市, 加利福尼亚 (Foster City, CA); 反转录病毒、腺病毒、AAV 载体和慢病毒载体)、克隆技术公司 (Clontech) (反转录病毒和杆状病毒载体)、新基因公司 (Genovo, Inc.) (沙伦山, 宾夕法尼亚 (Sharon Hill, PA); 腺病毒和 AAV 载体)、基因载体公司 (Genvec) (腺病毒载体)、基因简介公司 (IntroGene) (来顿, 荷兰 (Leiden, Netherlands); 腺病毒载体)、分子医学公司 (Molecular Medicine) (反转录病毒、腺病毒、AAV 和疱疹病毒载体)、诺尔根公司 (Norgen) (腺病毒载体)、牛津生物医学公司 (Oxford BioMedica) (牛津, 英国 (Oxford, United Kingdom); 慢病毒载体) 和转基因公司 (Transgene) (斯特拉斯堡, 法国 (Strasbourg, France); 腺病毒、痘疮、反转录病毒和慢病毒载体), 其以引用的方式全部并入本文中。

腺病毒载体。腺病毒为可经修饰以将本发明的核酸有效传递至多种细胞类型中的真核 DNA 病毒。存在腺病毒的多种血清型。在这些血清型中, 在本发明的范围内优选使用 2 型或 5 型人类腺病毒 (Ad 2 或 Ad 5) 或动物来源的腺病毒 (参见 PCT 公开案第 WO 94/26914 号)。在本发明的范围内可使用的那些动物来源的腺病毒包括犬、牛、鼠 (实例: Mav1, 贝尔德 (Beard) 等人, 病毒学 (*Virology*), 1990, 75-81)、绵羊、猪、鸟和猿 (实例: SAV) 来源的腺病毒。优选地, 动物来源的腺病毒为犬腺病毒, 更优选为 CAV2 腺病毒 (例如曼哈顿 (Manhattan) 或 A26/61 病毒株, 例如 ATCC VR-800)。各种复制缺陷腺病毒和最小腺病毒载体已有所描述 (PCT 公开案第 WO 94/26914 号、第 WO 95/02697 号、第 WO 94/28938 号、第 WO 94/28152 号、第 WO 94/12649 号、第 WO 95/02697 号、第 WO 96/22378 号)。根据本发明的复制缺陷重组腺病毒可通过所属领域的技术人员已知的任何技术制备 (莱福莱罗 (Levrero) 等人, 基因 (*Gene*), 1991, 101:195; 欧洲公开案第 EP 185 573 号; 格雷厄姆 (Graham), *欧洲分子生物学组织期刊 (EMBO J.)*, 1984, 3:2917;

格雷厄姆 (Graham) 等人, 基因病毒学杂志 (*J. Gen. Virol.*), 1977, 36:59)。回收重组腺病毒且使用所属领域的一般技术人员众所周知的标准分子生物技术将其纯化。

腺相关病毒。腺相关病毒 (AAV) 为相对小尺寸的 DNA 病毒, 其可以稳定和位点特异性方式整合至其所感染的细胞的基因组中。其能够感染广泛范围的细胞, 而不诱导对细胞生长、形态或分化的任何影响, 且其似乎并不参与人类病状。已克隆、测序且表征 AAV 基因组。使用来源于 AAV 的载体在活体外和活体内转移基因已有所描述 (参见, PCT 公开案第 WO 91/18088 号和第 WO 93/09239 号; 美国专利第 4,797,368 号和第 5,139,941 号; 欧洲公开案第 EP 488 528 号)。根据本发明的复制缺陷重组 AAV 可通过将含有两侧为两个 AAV 反向末端重复 (ITR) 区的相关核酸序列的质粒和带有 AAV 包装基因 (rep 和 cap 基因) 的质粒共转染至经人类辅助病毒 (例如腺病毒) 感染的细胞系中。接着通过标准技术纯化所产生的 AAV 重组体。

反转录病毒载体。在本发明的另一实施例中, 核酸可引入反转录病毒载体中, 例如以下文献中所述: 美国专利第 5,399,346 号; 曼恩 (Mann) 等人, 细胞 (*Cell*), 1983, 33:153; 美国专利第 4,650,764 号和第 4,980,289 号; 玛尔科维茨 (Markowitz) 等人, 病毒学杂志 (*J. Virol.*), 1988, 62:1120; 美国专利第 5,124,263 号; 欧洲公开案第 EP 453 242 号和第 EP 178 220 号; 波恩斯坦 (Bernstein) 等人, 遗传工程学 (*Genet. Eng.*), 1985, 7:235; 麦克科米克 (McCormick), 生物技术 (*BioTechnology*), 1985, 3:689; PCT 公开案第 WO 95/07358 号; 和郭 (Kuo) 等人, 血液 (*Blood*), 1993, 82:845, 其每一者均以引用的方式全部并入本文中。反转录病毒为感染分裂细胞的整合病毒。反转录病毒基因组包括两个 LTR、一个包装序列和三个编码区 (*gag*、*pol* 和 *env*)。在重组反转录病毒载体中, *gag*、*pol* 和 *env* 基因通常整个或部分缺失, 且经置换为相关异源性核酸序列。这些载体可自不同类型的反转录病毒建构, 所述反转录病毒诸如 HIV、MoMuLV (“鼠莫洛尼白血病病毒 (murine Moloney leukaemia virus)”)、MSV (“鼠莫洛尼肉瘤病毒 (murine Moloney sarcoma virus)”)、HaSV (“哈维肉瘤病毒 (Harvey sarcoma virus)”)、SNV (“脾坏死病毒”)、RSV (“劳斯肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus)”) 和弗氏病毒 (Friend virus)。合适的包装细胞已在先前技术中描述, 尤其细胞系 PA317 (美国专利第 4,861,719 号); PsiCRIP 细胞系 (PCT 公开案第 WO 90/02806 号) 和 GP+envAm-12 细胞系 (PCT 公开案第 WO 89/07150 号)。另外, 重组反转录病毒载体可在 LTR 中含有抑制转录活性的修饰以及可包括 *gag* 基因的一部分的广泛包装序列 (本德尔 (Bender) 等人, 病毒学杂志 (*J. Virol.*), 1987, 61:1639)。通过所属领域的一般技术人员已知的标准技术纯化重组反转录病毒载体。

反转录病毒载体可经建构以充当感染性粒子或经历单轮转染。在前一种情况下，病毒经修饰以保留除造成致癌转化特性的那些基因外的其所有基因，且表达异源基因。非感染性病毒载体经操纵以破坏病毒包装信号，但保留包装经工程化以含有异源基因和包装信号的共引入病毒所需的结构基因。因此，所产生的病毒粒子并不能够产生额外病毒。

反转录病毒载体也可通过 DNA 病毒引入，此允许一个反转录病毒复制循环且放大转染效率（参见 PCT 公开案第 WO 95/22617 号、第 WO 95/26411 号、第 WO 96/39036 号和第 WO 97/19182 号）。

慢病毒载体。在本发明的另一实施例中，慢病毒载体可用作在包括大脑、视网膜、肌肉、肝和血液的若干组织类型中直接传递和持续表达转基因的试剂。所述载体可有效转导这些组织中的分裂和非分裂细胞，且实现相关基因的长期表达。关于评论，参见纳尔蒂尼（Naldini），当代理论生物技术（*Curr. Opin. Biotechnol.*），1998, 9:457-63；也参见佐福里（Zufferey）等人，病毒学杂志（*J. Virol.*），1998, 72:9873-80。可获得慢病毒包装细胞系且通常在所属领域中已知。其促进用于基因治疗的高效价慢病毒载体的产生。一实例为四环素可诱导的 VSV-G 假型慢病毒包装细胞系，其可产生效价大于 106 IU/mL 的病毒粒子历时至少 3 至 4 天（凯夫里（Kafri）等人，病毒学杂志（*J. Virol.*），1999, 73: 576-584）。由可诱导的细胞系产生的载体可按活体外和活体内有效转导非分裂细胞的需

要来浓缩。

非病毒载体。在本发明的另一实施例中，载体可通过以裸 DNA 形式的脂质转染或用其它转染促进剂（肽、聚合物等）在活体内引入。合成阳离子脂质可用于制备活体内转染编码标记的基因的脂质体（费尔那（Felgner）等人，美国国家科学院院刊（*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*），1987, 84:7413-7417；费尔那（Felgner）和林古德（Ringold），科学（*Science*），1989, 337:387-388；参见 Mackey, 等人，美国国家科学院院刊（*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*），1988, 85:8027-8031；乌尔默（Ulmer）等人，科学（*Science*），1993, 259:1745-1748）。用于转移核酸的适用脂质化合物和组合物在 PCT 专利公开案第 WO 95/18863 号和第 WO 96/17823 号和美国专利第 5,459,127 号中描述。脂质可出于靶向的目的与其它分子化学偶合（参见马吉（Mackey）等人，见上）。例如激素或神经传递质和诸如抗体的蛋白质的目标肽或非肽分子可与脂质体化学偶合。

其它分子也适用于促进核酸的活体内转染，诸如阳离子寡肽（例如 PCT 专利公开案第 WO 95/21931 号）、来源于 DNA 结合蛋白的肽（例如 PCT 专利公开案第 WO 96/25508 号）或阳离子聚合物（例如 PCT 专利公开案第 WO 95/21931 号）。

也有可能以裸 DNA 质粒形式活体内引入载体。用于疫苗目的或基因治疗的裸 DNA 载体可通过所属领域中已知的方法引入所需宿主细胞中, 所述方法例如电穿孔、微量注射、细胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸钙沉淀、使用基因枪或使用 DNA 载体转运体(例如, 吴(Wu)等人, *生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)*, 1992, 267:963-967; 吴(Wu)和吴(Wu), *生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)*, 1988, 263:14621-14624; 加拿大专利申请案第 2,012,311 号; 威廉姆斯(Williams)等人, 美国国家科学院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*), 1991, 88:2726-2730)。也可使用受体介导的 DNA 传递方法(库里尔(Curiel)等人, 人类基因理论(*Hum. Gene Ther.*), 1992, 3:147-154; 吴(Wu)和吴(Wu), *生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)*, 1987, 262:4429-4432)。美国专利第 5,580,859 号和第 5,589,466 号揭示在哺乳动物体内在无转染促进剂情况下外源 DNA 序列的传递。最近, 已描述称为电转染的相对低压高效的活体内 DNA 转移技术(米尔(Mir)等人, 苏联科学院(*C.P. Acad. Sci.*), 1988, 321:893; PCT 公开案第 WO 99/01157 号; 第 WO 99/01158 号; 第 WO 99/01175 号)。因此, 本发明的其它实施例涉及一种诱发人类体内的免疫反应的方法, 其包含向所述人类投与适量编码本发明的 2086 多肽的 DNA 分子, 任选连同转染促进剂, 其中所述多肽在表达时保留免疫原性且在并入免疫原性组合中且投与人类时提供保护而在随后用奈瑟菌属病原体(诸如脑膜炎奈瑟菌)感染人类后不诱发疾病增强。转染促进剂在所属领域中已知且包括布比卡因(bupivacaine)和其它局部麻醉剂(例如参见美国专利第 5,739,118 号)和阳离子多元胺(如在国际专利申请案 WO 96/10038 中所公开), 所述专利以引用的方式并入本文中。

本发明也涉及对如上所述的 2086 多肽具有特异性的抗体, 其可为单克隆或多克隆抗体。所述抗体可通过所属领域的技术人员众所周知的方法产生。

细菌表达系统和质粒

本发明也提供一种重组 DNA 分子, 诸如载体或质粒, 其包含具有启动子序列和起始子序列的表达控制序列和编码本发明的多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列位于启动子和起始子序列的 3'端。在另一方面中, 本发明提供一种能够表达 2086 多肽的重组 DNA 克隆载体, 其包含具有启动子序列和起始子序列的表达控制序列和编码 2086 多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列位于启动子和起始子序列的 3'端。在另一方面中, 提供一种含有如上所述的重组 DNA 克隆载体和/或重组 DNA 分子的宿主细胞。合适的表达控制序列和宿主细胞/克隆载体组合在所属领域中众所周知, 且例如在萨姆布鲁克(Sambrook)等人(1989)中描述。

在表达本发明的所需多肽的重组 DNA 克隆载体和/或宿主细胞通过用含有相应 2086 聚核苷酸的质粒转化、转染或感染所述克隆载体或宿主细胞来建构后，在表达多肽的条件下培养克隆载体或宿主细胞。接着通过所属领域的技术人员众所周知的技术分离实质上不含污染宿主细胞组份的多肽。

本发明包括以下实例以证明本发明的优选实施例。所属领域的技术人员应了解，以下实例中所揭示的技术代表发明者所发现在实施本发明时运作良好的技术，且因此可视为构成用于其实施的优选方式。然而，鉴于本发明的揭示内容，所属领域的技术人员应了解可在不悖离本发明的精神和范围情况下在所揭示的特定实施例中作出许多改变且仍然获得类似或相似结果。

实例

实例 1

能够激发抵抗异源菌株的杀菌性抗体的奈瑟菌膜蛋白提取物的鉴别：

参看下表 II，已展示 LOS（脂寡糖）空乏的外膜蛋白制剂激发杀菌性抗体。这些抗体常常针对各别菌株的 PorA。来自血清群 B 脑膜炎球菌菌株 8529 (B:15:P1.7b,3) 的 LOS 空乏外膜制剂在此方式中非比寻常，因为其出乎意料地激发针对若干异源菌株的杀菌性抗体。

表格 II

抵抗脑膜炎奈瑟菌的不同菌株的抗 SOMP 的 BC 活性

抗血清第 6 周	H44/76	5315	H355	M982	880049	8529*	NMB
血清亚型	P1.7,16	P1.5	P1.15	P1.9	P1.4	P1.3	P1.5,2
sOMP H44/76 25 µg QS-21 20 µg	1,000	< 50	< 50	< 50	< 50	980	< 50
sOMP 5315 25 µg QS-21 20 µg	50	< 50	< 50	< 50	< 50	2170	< 50
sOMP H355 25 µg QS-21 20 µg	< 50	< 50	450	< 50	< 50	860	< 50
sOMP M982 25 µg QS-21 20 µg	92	< 50	< 50	300	< 50	1100	< 50
sOMP 880049 25 µg QS-21 20 µg	50	< 50	< 50	< 50	< 50	1190	< 50
sOMP 8529 25 µg QS-21 20 µg	1,000	< 50	450	50	215	>4050 (81.7)	< 50
sOMP 2996 25 µg QS-21 20 µg	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	790	148
全细胞对照 血清 25 µg	450	50	100	500	150	>1350 (66.0)	952

3DMPL 25 µg							
-------------	--	--	--	--	--	--	--

为促进负责激发异源杀菌性抗体的抗原的分离和表征，吾人设法鉴别何种清洁剂最优地提取抗原。

菌株和培养条件

将来自冷冻小瓶的脑膜炎奈瑟菌菌株 8529 于 GC 盘上划线。(所述脑膜炎球菌菌株 8529 来源于 The RIVM (比尔特芬, 荷兰 (Bilthoven, The Netherlands))。将所述盘于 36 °C/5% CO₂ 下培养 7.5 h。使用若干菌落接种于含有 50 mL 改良福朗茨 (Frantz) 培养基 +GC 补充剂的烧瓶中。将所述烧瓶于 36 °C 下于空气震荡器中培养且以 200 RPM 搅拌 4.5 h。使用 5 mL 接种于含有 450 mL 改良福朗茨培养基 +GC 补充剂的费氏烧瓶 (Fernbach flask) 中。将所述烧瓶于 36 °C 下于空气震荡器中培养且以 100 RPM 搅拌 11 h。使用全部 450 mL 接种于 10 L 发酵槽中的 8.5 L 改良福朗茨培养基 +GC 补充剂中。

改良福朗茨培养基的组成:

谷氨酸	1.3 g/L
半胱氨酸	0.02
磷酸氢二钠, 7 水合物	10
氯化钾	0.09
氯化钠	6
氯化铵	1.25
透析酵母提取物 (YE)	40 ml

(25% YE 溶液相对于 5 体积的 dH₂O 透析过夜, 接着高压釜处理)

GC 补充剂 100×, 过滤器灭菌

右旋糖	400 g/L
谷氨酸	10
辅羧化酶	0.02
硝酸铁	0.5

在发酵期间控制以下参数: 温度=36 °C; pH=7.4; 溶解氧=20%。添加若干滴 P-2000 消泡剂以控制发泡。使培养物生长至稳定期。在 OD₆₅₀=5.25 时通过离心收获细胞。通常自约 8.5 L 培养物收获总共 100-300 克湿细胞糊状物。

来自激发异源杀菌性抗体的脑膜炎球菌的外膜蛋白部分 (fraction) 的部分纯化:
将 100 gms 湿重的细胞悬浮于五倍湿重体积中(含有 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、

1 mM Na₂EDTA) 且通过于约 18,000 psi 下流过装备有腔室的 110Y 流化床装置来溶胞。使细胞溶菌液澄清且通过于 10℃ 下以 300,000×g 离心 1 小时来分离细胞包膜。通过用均质器悬浮, 接着如上离心来用相同缓冲液将细胞包膜洗涤 2 次。接着用 320 mL 于 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、1 mM MgCl₂ 中的 1% (w/v) 曲通 (Triton) X-100 提取细胞包膜。参看下表 III, 使用曲通 X-100 和两性洗涤剂 (Zwittergent) 3-14 连续差示清洁剂提取, 接着免疫小鼠, 允许吾人判定曲通提取物最优地提取相关候选物。接着通过在 BioRad Rotaphor 装置中的制备型等电点聚焦 (IEF) 来将激发抵抗表 III 中所列的 5 种菌株中的 4 种的杀菌性抗体反应的此曲通 X-100 提取物分级分离。两性电解质浓度为与 1% pH 4-6 混合的 1% pH 3-10。如表 III 中所示, 发现若干部分激发异源杀菌性反应。如杀菌检定所测定, 集中于 5.5-7.8 的 pH 值范围内的自 IEF 获得的部份激发对大多数菌株的异源性反应。浓缩汇集的 IEF 部份且通过乙醇沉淀移除两性电解质。通过使在约 5.5-7.8 的 pH 值范围内获得的一些蛋白吸附于阴离子交换柱上且比较用已吸附和未吸附的蛋白免疫小鼠后获得的杀菌活性来达成进一步纯化。再次参看表 II, 虽然许多蛋白吸附于阴离子交换树脂上, 但未由管柱吸附的蛋白激发更多异源杀菌性抗体。

表 III

方法	部分	BC ₅₀ 目标菌株				
		H44/76	880049	H355	539*	M982
LOS 空乏	sOMP	1,000	215	450	NC	50
清洁剂 提取	细胞质提取物	200	NT	NT	NT	NT
	TX-100	>800	>800	>800	>800	<25
	两性洗涤剂 3-12	400	>25	100	400	<25
	两性洗涤剂 3-14	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14+NaCl	<25	NT	NT	NT	NT
	十二烷基肌氨酸钠	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14+加热	<25	NT	NT	NT	NT
制备型	部分 1-3(pH 2.3-3.9)	50	NT	NT	NT	NT
IEF	部分 4(pH 4.1)	>800	<25	100	<25	NT
	部分 5(pH 4.3)	>800	<25	100	200	NT
	部分 6(pH 4.5)	400	NT	NT	NT	NT
	部分 7(pH 4.8)	<25	NT	NT	NT	NT
	部分 8-9(pH 5.0-5.3)	<25	NT	NT	NT	NT
	部分 10-17(pH 5.5-7.8)	>800	200	<800	<800	NT
阴离子 交换	已吸附	400	NT	100	100	NT
	未吸附	>6,400	NT	<800	<800	NT

NT: 未测试

*临床分离株 539 为 8529 的同源菌株, 自相同大量繁殖中分离

如图 1A 中所示, 如通过 SDS-PAGE 所测定, 两种主要蛋白质存在于未吸附部分中。为鉴别这些蛋白质, 执行两种类型的分析。一种分析为执行有限蛋白水解降解 (参见图 1A 和图 1B), 接着分离肽且直接进行蛋白质测序。另一种分析为执行 SDS-PAGE, 接着凝胶切取、蛋白水解消化和 LC-MS/MS (液体色谱联合质谱法), (参见图 3) 以获得关于相关制剂的组份的质谱信息。(参见本节中随后描述的肽定位和测序方法)。

使用捷库尔斯基 (Zagursky) 和拉塞尔 (Russell), 2001, 生物技术 (BioTechniques), 31:636-659 中所描述的方法和算法分析脑膜炎奈瑟菌 A 桑格 (Sanger) 基因组序列。此挖掘分析产生超过 12,000 个可能开放阅读框架 (ORF)。上文所述的直接序列数据和质谱数据两者表明未吸附部分的主要组份为存在于桑格数据库的分析中的若干 ORF 的产物。由此方法鉴别的三种主要蛋白质对应于 ORF 4431、5163 和 2086 (参见图 1B 和 3)。

尽管 ORF 4431 为部分中所鉴别出的最主要蛋白质, 但针对重组脂质化 4431 的小鼠抗体不具有杀菌性且在动物模型中不提供保护反应。正进行 ORF 5163 的另一分析。

本文中所述的制剂的第二最主要组份对应于 ORF 2086 的产物。

免疫原性方法:

抗血清的制备:

除有注释外, 将蛋白质组合物/疫苗以 25 µg 总蛋白质调配且用 20 µg QS-21 作佐剂。在第 0 周和 4 周通过皮下 (臀部) 注射将 0.2 mL 剂量投与 6-8 周龄雌性瑞士-维博斯特 (Swiss-Webster) 小鼠。在第 0 周和 4 周收集血液, 且在第 6 周执行最后放血。

杀菌性检定:

基本上如所描述执行杀菌性检定 (参见蒙特乌罗斯 (Mountzouros) 和豪维尔 (Howell), 2000, 临床微生物学杂志 (*J. Clin. Microbiol.*) 38 (8):2878-2884)。将 SBA 的补体介导的抗体依赖性杀菌效价表示为杀死≥50%引入检定中的目标细胞的测试血清的最高稀释度的倒数 (BC₅₀ 效价)。

用于鉴别 2086 蛋白的方法:

片段的溴化氰裂解和直接测序:

阴离子交换未吸附部分 (AEUF) 的溴化氰裂解。用 90%冷乙醇使 AEUF 沉淀且用于 70%甲酸中的 10 mg/mL 溴化氰将其溶解至 1 mg/mL 的蛋白质浓度。于室温下在黑暗中执行反应过夜。通过快速真空干燥裂解产物, 且用 HE/0.1%还原 TX-100 溶解小球。使用

SDS-PAGE, 接着 N 末端氨基酸测序鉴别此部分的组份。

用于鉴别组份的蛋白酶消化/逆相/N 末端测序:

用 GluC (V8)、LysC 或 ArgC 消化 AEUF。蛋白质与酶的比率为 30 μ g 蛋白质比 1 μ g 酶。于 37°C 下进行消化过夜。使消化的蛋白质混合物 (30 μ g) 通过七微米橡胶多孔管 (Aquapore) RF-300 管柱且用 10-95% 乙腈于 0.1% 三氟乙酸中的梯度洗脱, 且手动收集峰。也使无蛋白质空白通过管柱, 且自样品色谱图减去来自此空白的峰。通过质谱仪分析仪发生在样品过柱时的峰, 且分析那些产生纯质量的样品以用于 N 末端氨基酸测序。

N 末端氨基酸测序:

对于自印迹切取的谱带来说, 将蛋白质样品自 SDS 凝胶转移至 PVDF 膜, 用酰胺黑 (Amido Black) (于去离子水中的 10% 乙酸、0.1% 酰胺黑) 染色且于 10% 乙酸中脱色。接着使用甲醇清洗的小刀或迷你爱山吐 (Exacto) 刀自所有十条泳道切取所需蛋白质谱带且将其置于应用生物系统 (Applied Biosystems) 477A 蛋白质测序仪的反应滤筒中。对于溶液中样品的直接测序来说, 组装预吸附硅胶干燥剂 (Prosorb) 滤筒且用 60 μ L 甲醇湿润 PVDF。用 50 μ L 去离子水冲洗 PVDF 且将样品 (50 μ L) 装载于 PVDF 上。使用 50 μ L 去离子水冲洗样品后, 将预吸附硅胶干燥剂 (Prosorb) PVDF 打孔, 干燥, 且置于应用生物系统 (Applied Biosystems) 477A 蛋白质测序仪的反应滤筒中。对于两种方法来说, 随后在最优印迹条件下使应用生物系统 (Applied Biosystems) N 末端测序仪运作 12 个或更多个循环 (1 个循环空白、1 个循环标准, 且所需残基鉴别为 10 个或更多个循环) 且于应用生物系统 (Applied Biosystems) 120A PTH 分析器上进行 PTH-氨基酸检测。于模拟图表记录器上和用数字方法经由仪器软件收集所述循环。使用模拟和数字数据, 通过比较 PTH-氨基酸的标准组和其于分析器上的各别滞留时间来进行氨基酸指定 (半胱氨酸残基在转化期间被破坏且未检测到)。可自单一残基获得多个序列信息且基于信号强度得到一级指定对比二级指定。

LC-MS/MS

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步分析以 IEF 纯化的蛋白质样品。通过库马斯蓝 (Coomassie blue) 染色观察蛋白质, 且手动切取相关谱带, 接着将其还原、烷基化和使用自动凝胶内胰蛋白酶消化自动仪器 (1) 用胰蛋白酶 (普洛麦加, 麦迪逊, 威斯康新 (Promega, Madison, WI)) 原位消化。消化后, 使用专家快速真空 (Savant Speed Vac) 浓缩器 (特默研究公司, 霍德布鲁克, 纽约 (ThermoQuest, Holdbrook, NY)) 将肽提取物浓缩至 10-20 μ L 的最终体积。

于自动微电喷逆相 HPLC 上分析肽提取物。简单地说, 微电喷界面由 Picofrit 熔融二

氧化硅喷雾针组成，其长度为 50 cm、ID 为 75 μm 、孔口直径为 8 μm （新目标公司，剑桥，马萨诸塞（New Objective, Cambridge MA）），装有 10 μm 长度为 10 cm 的 C18 逆相珠粒（YMC 公司，威尔明顿，北卡罗莱纳（YMC, Wilmington, NC））。将 Picofrit 针安装于固持于自制基座上的光纤固持器（美莱斯格略特公司，欧文，加利福尼亚（Melles Griot, Irvine, CA））中，所述自制基座定位于质谱仪检测器前方。经由钛接头将管柱的后部垂直以向电喷雾界面供应电连接。所述接头与管接于连接于 HPLC 溶剂泵（ABI 140C，帕金埃尔默，诺沃克，康涅狄格（Perkin-Elmer, Norwalk, CT））的 FAMOS 自动取样器（LC 包装公司，旧金山，加利福尼亚（LC-Packings, San Francisco, CA））的一段熔融二氧化硅毛细管（FSC）连接。HPLC 溶剂泵传递 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量，使用 PEEK 微量紧致套管（PEEK microtight）对开三通（splitting tee）（楚柏科学公司，橡树港，华盛顿州（Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA））将其降低至 250 nL/min，且接着使用 FSC 输送管传递至自动取样器。LC 泵和自动取样器各自使用其内部使用者程序来控制。将样品插入塑料自动取样器小瓶中，密封，且使用 5 μL 样品环管注射。

微毛细管 HPLC-质谱法：

通过微电喷 HPLC 系统，使用 0-50% 溶剂 B（A：0.1 M HoAc，B：90% MeCN/0.1 M HoAc）的 50 分钟梯度分离自凝胶内消化液提取的肽。在于 1.5 kV 的喷雾电压下操作且使用 150 $^{\circ}\text{C}$ 的加热毛细管温度的芬宁安 LCQ（Finnigan LCQ）离子阱质谱仪（特默研究公司，圣何塞，加利福尼亚（ThermoQuest, San Jose, CA））上进行肽分析。使用与仪器一起提供的数据采集软件以自动 MS/MS 方式获得数据。获取方法包括 1 MS 扫描（375-1200 m/z），接着 MS 扫描中最丰富 3 种离子的 MS/MS 扫描。利用动态排除和同位素排除功能增加所分析的肽离子的数目（设置：3 amu=排除宽度，3 min=排除持续时间，30 秒=预排除持续时间，3 amu=同位素排除宽度）。使用 SEQUEST 计算机算法合并使用来源于脑膜炎奈瑟菌（来自桑格）的完整基因组的蛋白质数据库的芬宁安生物研究（Finnigan Bioworks）数据分析包（特默研究公司，圣何塞，加利福尼亚（ThermoQuest, San Jose, CA））执行 MS/MS 数据的自动分析。研究的结果在图 3 中说明。

实例 2

重组脂质化 P2086（RLP2086）的克隆：

A.) 原生前导序列：

源材料：

通过 PCR，自称为 8529 的血清群 B 脑膜炎奈瑟菌株的临床分离株扩增 ORF 2086

基因。此菌株的血清群、血清型和血清亚型以括号展示；8529 (B:15, P1:7b,3)。此脑膜炎球菌菌株来源于 The RIVM (比尔特芬, 荷兰 (Bilthoven, The Netherlands))。

PCR 扩增和克隆策略:

ORF 2086 的目测检查表明此基因具有潜在脂蛋白信号序列。使用专属隐马尔可夫模型 (Hidden Markov Model) 脂蛋白算法的其它分析证实 ORF 2086 含有脂蛋白信号序列。为以更类似原生构形重组表达 P2086, 寡核苷酸引物经设计以扩增脂蛋白信号序列完好的全长基因且基于对脑膜炎奈瑟菌 A ORF 2086 的桑格序列分析。通过聚合酶链反应 (PCR) [ABI 2400 热循环仪, 应用生物系统 (Applied Biosystems), 福斯特市, 加利福尼亚 (Foster City, CA)] 自脑膜炎奈瑟菌菌株 8529 扩增 2086 基因。将正确尺寸扩增产物接合且克隆至 pCR2.1-TOPO (体外基因公司 (Invitrogen)) 中。将质粒 DNA 用 NdeI 和 BamHI 限制性消化, 凝胶纯化且接合至 pET-27b(+) 载体 (新基因公司 (Novagen)) 中。

本文中所述的寡核苷酸引物于 PerSeptive 生物系统寡核苷酸合成器 (应用生物系统 (Applied Biosystems), 福斯特市, 加利福尼亚 (Foster City, CA)) 上使用 β -氰基乙基胺基磷酸酯化学 (应用生物系统 (Applied Biosystems), 福斯特市, 加利福尼亚 (Foster City, CA)) 合成。

利用原生前导序列的 rLP2086 脂蛋白表达:

参看图 5, 将质粒 pPX7340 转化/转染或感染至 BLR (DE3) pLysS 宿主细胞 (生命科学公司 (Life Sciences)) 中。选择一种转化子且将其接种于 50 mL 含有 2% 葡萄糖、卡那霉素 (kanamycin) (30 μ g/mL)、氯霉素 (30 μ g/mL) 和四环素 (12 μ g/mL) 的极品 (Terrific) 肉汤中。过夜培养物的 OD₆₀₀ 为 6.0。将过夜培养物于 1 公升具有 1% 甘油和相同抗生素的极品肉汤中稀释。起始 OD₆₀₀ 为 0.4。2 小时后, OD₆₀₀ 为 1.6 且收集预诱导样品。将等于 OD₆₀₀=1 的细胞离心且移除上清液。将全细胞小球再悬浮于 150 μ L Tris-EDTA 缓冲液和 150 μ L 2 $\times$ SDS-PAGE 样品缓冲液中。添加 IPTG 至 1 mM 的最终浓度。3.5 小时后, 如所描述收集诱导后样品且于 SDS-PAGE 上进行分析 (参见图 4)。

rLP2086 的纯化:

在差示清洁剂提取后溶解来自大肠杆菌的 rLP2086。不同于在其原生环境中的 P2086, rLP2086 并不由曲通 X-100 或两性洗涤剂 3-12 显著溶解。用十二烷基肌氨酸钠溶解大部分 rLP2086, 表明其与大肠杆菌的外膜组份相互作用, 此与其在脑膜炎奈瑟菌中不同。溶解后, 类似于原生蛋白质来纯化 rLP2086, 因为许多污染大肠杆菌蛋白质可通过于 pH 8 下吸附于阴离子交换树脂而移除。尽管高于其理论 pI 大于半个 pH 值单位, 但

在 pH 8 时 rLP2086 仍未吸附。通过于 pH 4.5 下使 rLP2086 吸附于阳离子交换树脂来达成进一步纯化。

SDS-PAGE 后, rLP2086 的均质性在图 2 中展示。rLP2086 的质量通过 MALDI-TOF 质谱分析测定为 27,836。此质量与理论质量 27,100 相差 736, 此接近细菌脂蛋白共有的 N 末端脂质修饰的质量。原生和 rLP2086 两者似乎均为外膜脂蛋白。用 N 末端测序的尝试受阻且此与末端修饰一致。

纯化方法:

将表达 P2086 的 BLR DE3 pLysS 细胞的冷冻小球以 20 mL/g 湿细胞重量再悬浮于 10 mM HEPES-NaOH/1 mM EDTA/1 μ g/mL Pefabloc SC 蛋白酶抑制剂 (罗氏公司 (Roche)) pH 7.4 (HEP) 中且通过流化床装置 (微流体公司 (Microfluidics Corporation) 110Y 型) 溶胞。将细胞溶菌液以 150,000 $\times$ g 离心 1 小时。将离心块用 HEP 洗涤两次且离心两次, 且将所得膜离心块冷冻过夜。将离心块用 10 mM HEPES-NaOH/1 mM $MgCl_2$ /1% TX-100 pH 7.4 溶解 30 分钟, 接着以 150,000 $\times$ g 离心 30 分钟。将此举重复三次。膜离心块如上用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1%两性洗涤剂 3-12 pH 8 洗涤两次, 接着分别用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1%两性洗涤剂 3-14 pH 8 和 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1%两性洗涤剂 3-14/0.5M NaCl pH 8 洗涤两次。

接着用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1%十二烷基肌氨酸钠溶解 rLP2086。将此十二烷基肌氨酸钠提取物调整至 1%两性洗涤剂 3-14 (Z3-14) 且以 30 倍过量的 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Z3-14 透析两次。用 90%乙醇使透析的 rLP2086 提取物沉淀以移除残余十二烷基肌氨酸钠, 且用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Z3-14 pH 8 (TEZ) 溶解。通过离心移除不可溶物质, 使上清液通过阴离子交换色谱管柱, 且于未结合的洗脱份中收集 rLP2086。接着将未结合的物质相对于 30 倍过量的 25 mM NaAc/1% Z3-14 pH 4.5 透析两次, 且通过阳离子交换色谱管柱。将 rLP2086 用 0-0.3 M NaCl 梯度洗脱且通过 SDS-PAGE (库马斯染色) 分析。通过激光密度测定法测定 rLP2086 混合物纯度为 84%。

rLP2086 亚族 B 的抗血清的表面反应性和杀菌活性。

参看表 VII, 来自亚族 B 菌株 8529 的经纯化 rLP2086 的抗血清通过全细胞 ELISA 测试证明对所有十种 2086 亚族 B 菌株的表面反应性。检测到抵抗表达异源性血清亚型抗原 PorA 的十种 2086 亚族 B 菌株中的九种的杀菌活性。这些菌株代表引起整个西欧、美洲、澳大利亚和新西兰的血清群 B 脑膜炎球菌疾病的菌株。在杀菌性检定中唯一未杀死的菌株 870227 通过全细胞 ELISA 与抗 rLP2086 (亚族 B) 血清强烈地反应, 表明此菌株表达

具有与 P2086 共有的抗原决定基的蛋白质。

也通过全细胞 ELISA 测试表 VII 中所列的 2086 亚族 A 菌株的表面反应性。三种这些菌株中的两种似乎具有极低程度的反应性，此表明一些 2086 亚族 A 菌株可能不与抗 rLP2086 亚族 B 的抗体交叉反应。也对菌株 870446、NMB 和 6557 执行用于鉴别来自菌株 8529 的 2086 亚族 B 基因的 PCR 扩增程序。未检测到 2086 亚族 B PCR 扩增产物。

免疫原性方法：

抗血清的制备：

如先前实例 1 中所述调配疫苗。然而，使用 10 μ g 剂量。

全细胞酶联免疫吸附检定 (ELISA)：

将脑膜炎奈瑟菌全细胞悬浮液于无菌 0.01 M 磷酸盐、0.137 M NaCl、0.002 M KCl (PBS) 中稀释至于 620 nm 下 0.1 的光学密度。自此悬浮液，将 0.1 mL 添加至 Nunc Bac T 96 孔盘 (目录# 2-69620) 的各孔中。于室温下将细胞于盘上干燥三天，接着盖上盖子，倒置且储存于 4°C 下。用洗涤缓冲液 (0.01 M Tris-HCl、0.139 M NaCl/KCl、0.1% 十二烷基聚(氧乙烯二醇醚)_n n=23 (Brij-35®, 可得自 ICI 美洲有限公司, 威尔明顿, 特拉华 (ICI Americas, Inc., Wilmington, Delaware)), pH 7.0-7.4) 将盘洗涤三次。于 PBS、0.05% 吐温-20/叠氮化合物中制备抗血清的稀释液且将 0.1 mL 转移至经涂覆盘中。将盘于 37°C 下培养两小时。将盘于洗涤缓冲液中洗涤三次。将山羊-抗小鼠 IgG AP (南方生物技术公司 (Southern Biotech)) 以 1:1500 稀释于 PBS/0.05% 吐温-20 中，将 0.1 mL 添加至各孔中，且将盘于 37°C 下培养两小时。(如上) 洗涤盘。通过将磷酸对硝基苯酯 (西格马公司 (Sigma)) 于 1 M 二乙醇胺/0.5 mM MgCl₂ 中稀释至 1 mg/mL 来制备底物溶液。将底物以每孔 0.1 mL 添加至盘中且于室温下培养一小时。用每孔 50 μ L 的 3 N NaOH 停止反应且以 690 nm 作为参考于 405 nm 下读盘。

B) P4 前导序列：

PCR 扩增和克隆策略：

为最优化 rLP2086 表达，将 2086 基因克隆在未分型流感嗜血杆菌的 P4 信号序列后 (格林 (Green) 等人, 1991)。用于脂蛋白克隆的引物列于表 IV 中且通过以下化合物编号来鉴别：5658、5660、6473、6543 和 6385。使用具有以下化合物编号 5658 和 5660 的引物自脑膜炎奈瑟菌 B 菌株 8529 扩增 ORF 2086。使用具有以下化合物编号 6385 和 5660 的引物自脑膜炎奈瑟菌血清群 B 菌株 CDC1573 扩增 ORF 2086。使用具有以下化合物编号 6473 和 6543 的引物自脑膜炎奈瑟菌血清群 B 菌株 2996 扩增 ORF 2086。N 末端 (5')

引物经设计以与 2086 基因的成熟区（起始于氨基酸位置 3 处的丝氨酸残基，刚好位于半胱氨酸下游）同源。将限制性位点 **Bam**HI（GGATTC）并入各 N 末端引物的 5'末端且使甘氨酸残基插入成熟蛋白质的氨基酸位置 2 中。C 末端（3'）引物经设计以与 2086 基因的 C 末端同源且包括终止密码子以及用于克隆目的的 **Sph**I 位点。将自各脑膜炎奈瑟菌 B 菌株扩增的片段克隆至中间载体中且通过序列分析筛选。

将来自合适克隆的质粒 DNA 用 **Bam**HI 和 **Sph**I 限制酶（新英格兰生物实验室（New England Biolabs）（NEB））消化。选择称为 pLP339 的载体（由申请案的受让人供应）作为表达载体。此载体利用 pBAD18-Cm 主链（贝克维奇（Beckwith）等人，1995）且含有未分型流感嗜血杆菌（格林（Green）等人，1991）的 P4 脂蛋白信号序列和 P4 基因。将 pLP339 载体用限制酶 **Bam**HI 部分消化且接着经受 **Sph**I 消化。将扩增的 2086 片段（**Bam**HI/**Sph**I）各自分别接合至 pLP339 载体（部分 **Bam**HI/**Sph**I）。这一克隆策略将成熟 2086 基因置于 P4 脂蛋白信号序列后。**Bam**HI 位点保留在 P4 信号序列与 2086 基因之间的克隆接合点处（参见图 7 中所示的质粒构筑体）。以下为 **Bam**HI 克隆接合点处序列的一实例：

[P4 信号序列]- TGT GGA TCC -[保留 2086 成熟核酸序列]

[P4 信号序列]- Cys Gly Ser -[保留 2086 成熟核酸序列]

参看图 7，将各扩增片段克隆至含有 P4 前导序列的经修饰 pBAD18-Cm 载体中。对表达 rP4LP2086（重组 P4 脂质化 2086）的重组大肠杆菌 BLR pPX7343 执行发酵以试图通过添加额外葡萄糖来增加细胞密度。根据萨姆布鲁克（Sambrook），将发酵槽填充 10 L 补充有 1%葡萄糖的完全 M9 基本培养基。

发酵槽中葡萄糖的初始浓度为 45 g/L。将发酵槽接种至约 0.25 的初始 OD。约 OD 25 时，再添加 20 g/L 葡萄糖。在 OD 63.4 时葡萄糖耗尽时用 1%阿拉伯糖诱导培养物。继续发酵直至诱导后 3 小时。在诱导后 t=0、1、2、3 时保存样品且使用 BSA 量化蛋白质。t=3 时，蛋白质产量为约 0.35 g/L，和 7%总细胞蛋白质。自约 10 L 培养物收获总共 895 克湿细胞糊状物。

使用与上文实例 2、A 小节中所述相同的方法执行 rP4LP2086 的纯化。

本文中所述的寡核苷酸引物于 PerSeptive 生物系统寡核苷酸合成器（应用生物系统（Applied Biosystems），福斯特市，加利福尼亚（Foster City, CA））上使用 β -氰基乙基胺基磷酸酯化学（应用生物系统（Applied Biosystems），福斯特市，加利福尼亚（Foster City, CA））合成。用于 PCR 扩增 ORF 2086 基因家族的引物列于表 IV 中，所述表展示本发明

的引物的非限制性实例。

表 IV

引物

化合物编号	引物	限制性位点
4623	反向	BamHI
4624	正向	NdeI
4625	正向	
5005	正向	
5007	反向	
5135	反向	BglII
5658	正向	BamHI
5660	反向	SphI
6385	正向	BamHI
6406	正向	BglII 和 NdeI
6470	正向	
6472	反向	
6473	正向	BamHI
6474	正向	BglII 和 NdeI
6495	正向	
6496	反向	
6543	反向	SphI
6605	反向	BglII
6721	正向	BglII 和 NdeI

实例 3

非脂质化成熟 2086 蛋白的发育遗传学：

为进一步评估 2086 蛋白的免疫原性，执行非脂质化形式的 P2086 的克隆和表达。

ORF 2086 的 PCR 基因扩增：

来自各种染色的 2086 基因可用如 PCT/US02/32369（于 2003 年 8 月 7 日以 WO 03/063766 公开）和 PCT/US04/11901（于 2004 年 11 月 4 日以 WO 04/094596 公开）中所述的引物来扩增。

这些引物的特征包括各引物中的合成 BglII 限制性位点、化合物编号 6406 和 6474 中的合成 NdeI 限制性位点和存在于化合物编号 5135 和 6605 中的所有三种阅读框架中的终止密码子。引物编号 6406 和 6474 扩增具有与第二胺基末端密码子(ACG)融合的 ATG (Met) 的 2086 基因，此表示成熟 2086 多肽的单一氨基酸取代（置换 TGC Cys）。

PCR 克隆载体为 TOPO-PCR2.1, 体外基因公司 (Invitrogen), 巴伦西亚, 加利福利亚 (Valencia, CA)。

用于表达非脂质化 2086 蛋白的载体为来自新基因公司 (Novagen), 麦迪逊, 威斯康新 (Madison, WI) 的 pET9a。

大肠杆菌克隆菌株为 Top10, 体外基因公司 (Invitrogen), 卡尔斯巴德, 加利福利亚 (Carlsbad, CA)。

大肠杆菌表达菌株为 BLR (DE3) pLysS, 新基因公司 (Novagen), 麦迪逊, 威斯康新 (Madison, WI)。

用于克隆目的的培养基为根据萨姆布鲁克 (Sambrook) 等人的具有 1% 取代甘油的无菌葡萄糖和适当抗生素 (胺苄西林或卡那霉素) 的极品肉汤液体或琼脂。

质粒纯化用 Qiagen Spin 小规模纯化试剂盒 (巴伦西亚, 加利福利亚 (Valencia, CA)) 进行。

用于非脂质化 2086 表达的产物菌株或细胞系的制备:

通过聚合酶链反应 (PCR) [AmpliTaq 和 ABI 2400 热循环仪, 应用生物系统 (Applied Biosystems), 福斯特市, 加利福利亚 (Foster City, CA)] 自来源于脑膜炎球菌菌株 8529 的染色体 DNA 扩增 2086 基因。2086 基因的 PCR 扩增在由化合物编号 6474 和 5135 鉴别的各反应中利用两种寡核苷酸引物。将扩增的 2086 PCR 产物直接克隆至 TOPO-PCR2.1 克隆载体中且于补充有 100 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄西林和 20 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal 的极品肉汤琼脂上选择。选择白色菌落且使其生长。使用 Qiagen 小规模纯化试剂盒制备质粒 DNA 且针对 PCR 片段插入筛选质粒。使 PCR 插入质粒经受 DNA 测序 (大染料化学 (Big Dye chemistry) 于 ABI377 测序仪上, 应用生物系统 (Applied Biosystems), 福斯特市, 加利福利亚 (Foster City, CA))。

将展现正确 DNA 序列的质粒用 BglII 限制酶消化且使用基因清除 (GeneClean) II 纯化试剂盒 (Bio101, 卡尔斯巴德, 加利福利亚 (Carlsbad, CA)) 将 BglII 片段凝胶纯化。将经纯化的 BglII 片段克隆至表达载体 pET9a 的 BamHI 位点。于补充有 30 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的极品肉汤盘上选择 pET9a/2086 克隆。使卡那霉素抗性克隆生长且制备小规模纯化质粒 DNA。针对 2086 基因在 BamHI 位点处的适当取向筛选质粒。取向正确的质粒表示 T7-抗原与 2086 基因的胺基末端融合 (rP2086T7)。将这些 rP2086T7 基因融合体转化至 BLR (DE3) pLysS 中, 于极品肉汤/Kan 盘上选择, 于极品肉汤中生长且用 1 mM IPTG (异丙基 β -D-硫代吡喃半乳糖苷) 诱导表达 rP2086T7 融合蛋白。rP2086T7 融合蛋白以高含量

表达。

接着使这些融合质粒经受 NdeI 限制消化, 此删去 T7-抗原且将成熟 2086 基因直接连接于由载体提供的 ATG 起点。将这些 NdeI 缺失质粒转化至 Top10 细胞中且于极品肉汤/Kan 盘上选择。使候选物克隆生长且制备小规模纯化质粒 DNA。使质粒 DNA 经受 DNA 测序以证实 2086 基因序列的缺失和完整性。这些质粒由称为 pPX7328 的质粒图表示(图 6)。将表示正确 DNA 序列的质粒转化至 BLR (DE3) pLysS 中, 于极品肉汤/Kan 盘上选择, 于极品肉汤中生长且用 IPTG 诱导表达 2086 蛋白。当移除 T7 标签后, pET9a 载体未能表达菌株 BLR (DE3) pLysS 中的成熟 2086 蛋白。

非脂质化 2086 蛋白的产生:

经纯化的质粒 DNA 用于使表达菌株 BLR(DE3)pLysS 转化。带有质粒的 BLR(DE3)pLysS 细胞对卡那霉素有抗性且可通过添加 1 mM IPTG 而诱导表达高含量 PorA 蛋白。rP2086T7 融合蛋白可在大肠杆菌细胞系 BLR (DE3) pLysS 中以约 40%的总蛋白质表达为不可溶包涵体。此经纯化融合蛋白用于免疫小鼠且产生显著含量的抵抗异源性脑膜炎球菌菌株的杀菌性抗体。(参见表 V)

2086 非脂质化基因突变诱发:

对 2086 基因的 5'末端执行 PCR 引物突变诱发。表达研究正在进行以判定是否可移除 T7 标签, 同时展现成熟 rP2086T7 的高表达量。

非脂质化 rP2086T7 的纯化:

通过流化床装置以 10 mM Hepes-NaOH/5 mM EDTA/1 mM Pefabloc SC pH 7.4 使表达非脂质化 rP2086T7 的大肠杆菌 BLR (DE3) pLysS 细胞溶胞。接着将细胞溶菌液以 18,000×g 离心 30 分钟。将包涵体离心块用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1%曲通 X-100 pH 8 洗涤三次, 接着每次以 24,000×g 离心 30 min。接着将包涵体离心块用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1%两性洗涤剂 3-14 pH 8 洗涤两次, 接着每次以 24,000×g 离心 15 min。接着用 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/4 M 尿素 pH 8 溶解包涵体离心块历时两小时, 接着离心以移除不可溶物质。将上清液(溶解的 rP2086T7)分成四个相等样品。使用储备溶液将一个样品调整至 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2 M 尿素 pH 8 (无清洁剂), 一个调整至 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2 M 尿素/1%氢化曲通 X-100 pH 8 (TX-100), 一个调整至 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2 M 尿素/1%两性洗涤剂 3-12 pH 8 (Z3-12), 且一个调整至 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2 M 尿素/1%两性洗涤剂 3-14 pH 8 (Z3-14)。为移除尿素, 将样品以不含尿素的各别缓冲液彻

底透析。接着将样品以不含尿素和 60 mM NaCl 的各别缓冲液彻底透析以降低 NaCl 浓度。以 2,000×g 离心 15 分钟来移除不可溶物质，且使用所得上清液（再折叠的 rP2086T7）作其它实验。发现如使用库马斯染色 SDS-PAGE 和激光密度测定法所测定，rP2086T7 的均质性为 91-95%。

免疫原性程序-如实例 2 中所述

此经纯化融合蛋白用于免疫小鼠且产生显著含量的抵抗异源性脑膜炎球菌菌株的杀菌性抗体。（参见下表 V）：

表 V
抗 rP2086T7 的小鼠抗体的杀菌性效价

小鼠血清	描述	异源菌株/H44/76
第 6 周 AF780	r2086T7, 10 µg	3200
第 0 周混合物	预免疫血清	10
第 6 周 AE203	rLP2086, 10 µg (阳性对照) *	6400

(*阳性对照血清由用 rLP2086 免疫小鼠而产生)

实例 4

ORF 2086 的嵌合克隆的发展

来自菌株 CDC-1573 的 2086 基因的 N 末端区域含有不存在于来自菌株 8529 和 2996 的 2086 基因中的重复区段（参见图 8）。似乎此重复区段使重组 2086 蛋白在两种基于大肠杆菌的表达系统（pET 和 pBAD）中的表达量增加。自 CDC-1573 2086 基因表达的重组蛋白质的量在 pET 和 pBAD 表达系统中显著好于自使用相同系统的菌株 8529 和 2996 的 2086 基因重组表达的量。来自所有三种菌株的 2086 基因的 N 末端区域相对同源，此重复区段除外。因此，合理的假定通过将 CDC-1573 N 末端与来自菌株 8529 和 2996 的 2086 基因融合，当使用 pET 和 pBAD 系统时自这些基因表达的重组 2086 蛋白含量将增加。

材料和方法：

将来自菌株 8529 和 2996 的染色体 DNA 纯化且用作 PCR 扩增嵌合 2086 基因的模板。具有化合物编号 6721 和 5135 的 PCR 引物用于扩增来自菌株 8529 的嵌合 2086 基因且具有化合物编号 6721 和 6605 的 PCR 引物用于扩增来自菌株 2996 的嵌合 2086 基因。将 PCR 产物直接克隆至来自体外基因公司 (Invitrogen) 的 PCR2.1 TOPO 载体中且接着通过 DNA 序列分析筛选以鉴别完整嵌合 2086 基因。接着用 BglII 将那个基因自 PCR2.1 载体裂解

且将 BglII 片段插入 pET9a 质粒的 BamHI 位点中。针对适当取向筛选质粒插入物且接着使其经受 NdeI 消化。线性 NdeI 片段自体接合以达成含有由 pET9a 载体提供的 T7 标签序列的小 NdeI 片段的删去。此删去直接将 T7 启动子连接至嵌合 2086 基因的 5'末端。将 NdeI 缺失质粒转化至大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中且针对用 IPTG 诱导的嵌合 2086 蛋白表达筛选卡那霉素抗性菌落。

初始研究表明当在 pET9a 系统中表达时, 来自菌株 2996 的嵌合 2086 基因表达重组蛋白质为天然 2996/2086 基因的约两倍。pBAD 系统尚未测试。

尽管仅执行一个实验, 但数据表明存在来自嵌合 2086 基因的增强效用。与来自菌株 8529 和 2996 的 2086 基因的 CDC-1573 N 末端融合体的产生提供增强的重组 2086 蛋白表达。

实例 5

脑膜炎奈瑟菌菌株的 2086 PCR 筛选:

为测定临床分离株中 2086 基因的保守性, 对 88 种脑膜炎奈瑟菌菌株执行 PCR 扩增。

ORF 2086 的初始 PCR 鉴别利用表 IV 中所列的引物 (参见上述实例 2), 其由以下化合物编号鉴别: 4623、4624 和 4625。这些引物基于桑格的脑膜炎奈瑟菌血清群 A 序列而设计。为促进筛选大量菌株, 将内部引物设计成 2086。通过 PCR, 用由化合物编号 5005 和 5007 识别的新设计的内部 2086 引物筛选总共 88 种脑膜炎奈瑟菌菌株。用这些引物, 申请者能够鉴别来自 88 种脑膜炎奈瑟菌菌株中的 63 种 (约 70%) 的 2086 基因 (参见表 VIA)。

检查且比对桑格的脑膜炎奈瑟菌血清群 A 序列与 TIGR 的脑膜炎奈瑟菌血清群 B 序列中的 2086 基因周围的扩展区。设计引物以对应于 2086 基因上游和下游的区域。所述目的在于利用这些引物以自多种脑膜炎奈瑟菌菌株扩增大于全长 2086 基因以作序列比较。使用化合物编号 6470 和 6472 进行一种菌株 (6557) 的 PCR 扩增, 产生低产率的产物。克隆菌株 6557 扩增产物, 且将质粒 DNA 提交序列分析。结果显示一种具有比先前所见更大序列变异性的新型 2086 基因。菌株 6557 的 2086 基因在氨基酸层面上与其它菌株序列约 75%一致。有趣的是, 菌株 6557 为先前通过上文所述的 2086 PCR 筛选测试为阴性的 30%菌株之一。

设计对于菌株 6557 中的 C 端可变区具有特异性的内部引物。这些引物用于筛选先前通过 2086 PCR 筛选测试为阴性的约 30%菌株中更大变异的 2086 基因。通过 PCR 使用这些新识别的内部 2086 引物 (由化合物编号 6495 和 6496 识别) 筛选所有可得的脑膜炎奈

瑟菌株 (n=88)。在此筛选中, 仅先前通过对于 2086 的 PCR 测试为阴性的约 30%脑膜炎奈瑟菌株为 PCR 阳性。自先前 PCR 阴性 (约 30%) 菌株扩增的基因组应代表新型 2086 基因或第二 2086 基因家族, 在本文中称为 2086 亚族 A。用来源于 8529 的引物自约 70%菌株扩增的 2086 基因组在本文中称为亚族 B。

用于 PCR 扩增研究的脑膜炎奈瑟菌株选自下表, 表 VIA 和表 VIB。表中所列的菌株提供作为本文先前所揭示者以外的脑膜炎奈瑟菌株的实例, 但不限于此。表 VIA 中所列的菌株分类为 2086 蛋白亚族 A, 表 VIB 中所列的菌株分类为 2086 蛋白亚族 B。各表中所列的菌株由血清亚型分组。所述菌株可得自表中所示的以下四个来源: MPHL-曼彻斯特公共健康实验室, 曼彻斯特, 英国 (MPHL-Manchester Public Health Laboratory, Manchester, UK); RIVM, 比尔特芬, 荷兰 (RIVM, Bilthoven, The Netherlands); 爱俄华大学医学院微生物学系, 爱俄华市, 爱俄华州 (University of Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology, Iowa City, IA); 和华特里德军队研究学院, 华盛顿特区 (Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.)。

表 VIA

菌株	血清亚型	来源
M97 251854	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250622	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250572	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250771	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250732	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250809	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 252697	B:1, PI:6	MPHL
M97 252988	B:4, PI:6	MPHL
M97 252976	B:4, PI:6	MPHL
M97 252153	B:4, PI:6	MPHL
M97 253248	B:15, PI:7, NT	MPHL
CDC1610	P1:NT 4(15)	CDC
CDC1521	P1.6, 3 2b(4)	CDC
CDC1034	P1.7 4(15)	CDC
L8	P1.7,1 15(4)	华特里德 (Walter Reed)
CDC1492	P1.7,1 4(15)	CDC
870446	P1.12a,13	RIVM
CDC2369	P1.(9),14	CDC
6557	P1.(9),14	RIVM
2996	P1.5, 2	RIVM
NmB	P1.5, 2	UIOWA
L3	P1.5, 2	华特里德
B16B6	P1.5, 2	RIVM
CDC1135		CDC

菌株	血清亚型	来源
L5	PI.NT	华特里德
L4	PI.21, 16	华特里德

表 VIB

菌株	血清亚型	来源
M98 250670	B:1, PI:4	MPHL
M98 250024	B:1, PI:4	MPHL
M97 253524	B:1, PI:4	MPHL
M97 252060	B:1, PI:4	MPHL
M97 251870	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251836	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251830	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251905	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251898	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251885	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251876	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251994	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251985	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251957	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251926	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252045	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252038	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252026	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252010	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252098	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252083	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252078	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250735	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250797	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250768	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250716	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250699	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250393	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250173	B:4z, PI:10	MPHL
M97 253462	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250762	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250610	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250626	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 250571	B:15, PI:16	MPHL
M97 252097	B:15, PI:16	MPHL
M97 253092	B:1, PI:6	MPHL
M97 252029	B:15, PI:7, NT	MPHL
M97 251875	B:15, PI:7, NT	MPHL
CDC1127	PI.7, 16 4(15)	CDC
CDC982	PI.7, 16 4(15)	CDC

菌株	血清亚型	来源
CDC1359	PI.7, 16 4(15)	CDC
CDC798	PI.7, 16 15(4)	CDC
CDC1078	PI.7, 16 15(4)	CDC
CDC1614	PI.7, 16 15(4)	CDC
CDC1658	PI.7, 16 15(4)	CDC
H44/76	PI.7, 16 15(4)	RIVM
CDC1985	PI.7, 13 4(15)	CDC
L6	PI.7, 1 ?(4)	华特里德
CDC1573	PI.7, 1 4(15)	CDC
L7	PI.7, (9), 1	华特里德
CDC937	PI.7, 3	CDC
8529	PI.7, 3	RIVM
880049	PI.7b, 4	RIVM
CDC2367	PI.15 4(15)	CDC
H355	PI.19, 15	RIVM
CDC1343	PI.14 4(15)	CDC
M982	PI.22, 9	RIVM
870227	PI.5c, 10	RIVM
B40	PI.5c, 10	RIVM
5315	PI.5c, 10	RIVM
CDC983	PI.5, 2	CDC
CDC852	PI.5, 2	CDC
6940	PI.18, 25 (6)	RIVM

其它菌株易于以来自受感染个体的分离株形式得到。

实例 6

rLP2086 抗血清相对于脑膜炎球菌菌株的反应性：

下表，表 VII 展示如上文所述的 rLP2086 的交叉反应和交叉保护能力。如表中所指，加工 rLP2086 且使用包括全细胞 ELISA (WCE)、杀菌性检定 (BCA) 和大鼠幼仔 (IR) 检定的多种技术进行分析以测定多克隆抗体相对于 2086 蛋白的表面反应性。

表 VII

RLP2086-8529 抗血清相对于多种脑膜炎球菌菌株的反应性

菌株	血清亚型	WCE	BC	IR
2086 亚族 A				
870446	PI.12a,13	808,615	(i) >800	
NmB	PI.5a,2c	47,954	<100	
6557	PI.22a,14a	169,479	<25	-
2086 亚族 B				
880049	PI.7b,4	1,402,767	A) 100	+
H44/76	PI.7,16	8,009,507	>6400	
H355	PI.19,15	10,258,475	3,200	+

6940	P1.18,25(6)	5,625,410	800	
870227	P1.5c,10	4,213,324	<25	+
252097	P1.7b,16	10,354,512	(ii) >800	
539/8529	P1.7b,3	11,635,737	3,200	
M982	P1.22,9	1,896,800	800	
CDC-1573	P1.7a,1	208,259	25	
CDC-937	P1.7b,(3)	9,151,863	>800	

+败血症减少大于 10 倍

-败血症减少小于 10 倍

实例 7

制备表达 ORF2086 蛋白的各种构筑体。下表，表 VIII 为出于展示实例且说明本发明的实施例（但不限于其）的目的的 r2086 构筑体表。

表 VIII

R2086 构筑体概述

构筑体	启动子	前导序列	表达	提取	载体	总蛋白质%
pPX7340	T7	天然	库 马 斯	十二烷基肌 氨酸钠可溶	pET27b	2.5% 经 加工脂 蛋白
pPX7341	T7	P4	库 马 斯	十二烷基肌 氨酸钠可溶	pET27b	5% 经 加工脂 蛋白
pPX7343	阿 拉 伯 糖	P4	库 马 斯	十二烷基肌 氨酸钠可溶	pBAD18 cm	7-10% 经加工 脂蛋白
pPX7325	T7	T7 标签融 合/成熟	库 马 斯	包涵体	pET9a	40-50% 成熟蛋 白质
pPX7328	T7	成熟	库 马 斯	可溶	pET9a	10% 成 熟蛋白 质

实例 8

用 LOS 空乏外膜蛋白进行的其它研究鉴别产生非 PorA 的能够激发表达异源血清亚型的菌株的杀菌性抗体的外膜蛋白的其它菌株。以下描述根据本发明的一实施例鉴别其它蛋白质且具体地说外膜脂蛋白的其它研究，其可减少脑膜炎球菌免疫原性组合物中所需的蛋白质数目。这些其它研究补充先前实例中所述的研究。

亚细胞分级分离、差示清洁剂提取、等电聚焦和离子交换色谱法与抵抗多种菌株的免疫和杀菌性检定结合使用以鉴别所关注的蛋白质的小组。主要组份的直接测序指示 N 末端被阻断。通过来源于化学和蛋白水解消化物的多肽的直接测序来获得内部蛋白质序列。A 群脑膜炎球菌菌株的基因组序列自桑格中心下载且由吾人的生物信息组使用现有和专用算法进行分析以建立可查找数据库。肽序列数据指示 ORF2086 为受关注的。基于此 orf 的引物用于自菌株 8529 PCR 扩增 P2086 基因。基因序列的分析、N 末端被阻断的事实和其亚细胞定位指示 P2086 为脂质化外膜蛋白 (LP2086)。rLP2086-8529 和来自其它脑膜炎球菌菌株的变异体使用流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*) P4 信号序列在大肠杆菌中重组表达为脂蛋白。通过差示清洁剂提取将这些重组蛋白质自大肠杆菌膜分离, 使用离子交换色谱法纯化, 且用于使小鼠免疫。小鼠抗 LP2086 血清能够促进抵抗脑膜炎奈瑟菌的若干不同血清亚型菌株的杀菌活性。自许多脑膜炎奈瑟菌菌株进一步分析 P2086 基因展示这些序列分成两组, 称为亚族 A 与亚族 B。(参见图 12) 抵抗亚族 B 蛋白质的抗血清具有抵抗表达亚族 B 蛋白质的九种菌株和表达亚族 A 蛋白质的一种菌株的杀菌性。亚家族 A 抗血清具抵抗亚族 A 菌株的杀菌性。一种 rPorA 与一种 rLP2086 的混合物激发扩展除由单独任一蛋白质诱导外的疫苗覆盖的互补抗体。

这些观察结果产生以下结论。rLP2086 抗原能够激发抵抗表达异源性 PorA 和异源性 P2086 蛋白的脑膜炎球菌菌株的杀菌性抗体。P2086 家族的抗原单独或与其它奈瑟菌抗原组合时可作为适用疫苗或具有免疫原性。

下文详细描述上述研究。发现可溶外膜蛋白 (sOMP) 的复合混合物激发抵抗表达异源性 PorA 蛋白的菌株的 PorA 非依赖性杀菌性抗体。差示清洁剂提取、等电聚焦和离子交换色谱法接着小鼠免疫的过程用于跟踪免疫活性组份。

在每一步骤中, 针对表面反应性和抵抗含有代表脑膜炎球菌疾病的世界范围流行病学的血清亚型抗原的若干菌株的杀菌活性检定血清。

此分离和免疫过程用于鉴别 B 组脑膜炎奈瑟菌的新颖交叉反应性免疫原性候选物。

PorA 缺乏菌株的产生-将 porA 染色体基因座克隆至来自菌株 2996 的质粒 pPX7016 中。在质粒中, porA 启动子、S/D 盒和最初 38 个 N 末端密码子已经删去且经自含 KanR 表达卡匣置换。用限制酶使质粒线性化且自然地转化至血清亚型菌株 PI:5,2; PI:9; PI:7,16; PI:15; PI:4; PI:3 和 PI:10 中。选择卡那霉素抗性转化子且在 ELISA 中针对血清亚型特异性单克隆的 PorA 的损失来筛选。

杀菌性检定: 参见蒙特乌罗斯 K. T. (Mountzouros, K. T.), 和 A. P. 豪维尔 (A. P.

Howell).2000.在 B 群脑膜炎奈瑟菌的基于荧光的血清杀菌检定中检测补体介导的抗体依赖性杀菌活性 (Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*) .*临床微生物学杂志 (J. Clin. Microbiol.)* 38(8):2878-2884。

全细胞酶联免疫吸附检定 (ELISA): 将脑膜炎奈瑟菌全细胞悬浮液于无菌 0.01 M 磷酸酯、0.137 M NaCl、0.002 M KCl (PBS) 中稀释至于 620 nm 下 0.1 的光学密度。自此悬浮液, 将 0.1 mL 添加至 Nunc Bac T 96 孔盘 (目录号 2-69620) 的各孔中。于 37℃ 下将细胞于盘上干燥过夜, 接着盖上盖子, 倒置且储存于 4℃ 下。用洗涤缓冲液 (0.01 M Tris-HCl、0.139 M NaCl/KCl、0.1% Brij-35, pH 7.0-7.4) 将盘洗涤三次。于 PBS、0.05% 吐温-20/叠氮化合物中制备抗血清的稀释液且将 0.1 mL 转移至经涂覆盘中且于 37℃ 下培养两小时。将盘于洗涤缓冲液中洗涤三次。将山羊-抗小鼠 IgG AP (南方生物技术公司 (Southern Biotech)) 以 1:1500 稀释于 PBS/0.05%吐温-20 中, 将 0.1 mL 添加至各孔中, 且将盘于 37℃ 下培养两小时。(如上) 洗涤盘。通过以 1 mg/ml 将对硝基苯基磷酸酯 (西格马公司 (Sigma)) 稀释于二乙醇胺中来制备底物溶液。将底物以每孔 0.1 mL 添加至盘中且于室温下培养一小时。用每孔 50 μ l 的 3 N NaOH 停止反应且以 690 nm 作为参考于 405 nm 下读盘。

重组 PorA 诱导: 使 BLR (DE3) /pET9a 菌株于 37℃ 下于补充有 Kan-30 和 2%葡萄糖的 HySoy 肉汤 (Sheffield Products) 中生长过夜。早晨, 将 O/N 培养物以 1/20 稀释于 HySoy 肉汤 Kan-30 和 1%甘油中且于 37℃ 下生长 1 小时。通过添加 IPTG 至 1 mM 的最终浓度来诱导这些培养物。使培养物再生长 2-3 小时且接着收获。

重组 PorA 纯化: 用 8 M 尿素将 rPorA 自大肠杆菌包涵体溶解, 且通过相对于不含有尿素的缓冲液透析来再折叠。接着通过透滤浓缩再折叠 rPorA 且通过 G25 管柱将缓冲液交换为 NaPO₄ pH 6。接着使经透析的 rPorA 于阳离子交换管柱 (S Fractogel) 上过柱且用 1 M NaCl 洗脱。

来自菌株 8529 (P1.7-2,3) 的 sOMP 激发小鼠体内抵抗表达异源性血清亚型的菌株的 PorA 非依赖性杀菌活性。下表, 表 IX 展示在研究菌株中的杀菌活性。

表 IX

测试菌株	血清亚型	BC ₅₀ 效价 ¹
539	P1.7-2,3	1280
539 PorA-	NST ²	1080

H44/76 H44/76 PorA-	P1.7,16 NST	3285 2620
H355 H355 PorA-	P1.19,15 NST	>1350 >1350
880049 880049 PorA-	P1.7-2,4 NST	290 85
M982 M982 PorA-	P1.22,9 NST	85 <50

sOMP 的制备：用 TX-100、两性洗涤剂 3-14 和两性洗涤剂 3-14+0.5 M NaCl 提取肺炎奈瑟菌膜。将上文所提及的 sOMP 溶解于两性洗涤剂 3-14/0.5 M NaCl 提取物中。使用所属领域的技术人员众所周知的技术执行所述提取，例如参见美国专利第 6,355,253 号，其以引用的方式并入本文中。

免疫原性：在第 0 周和 4 周用 25 µg 总蛋白质和 20 µg QS-21 佐剂免疫雌性瑞士-维博斯特小鼠。在第 6 周进行放血和数据分析。

1 杀菌性 (BC₅₀) 效价表示为减少 50%活细胞计数的抗血清的稀释度的倒数。第 0 周正常小鼠血清具有小于 25 的 BC₅₀ 效价。

2 NST=不可血清亚型分类

下表，表 X 和表 XI 展示亚族 A 和亚族 B 两者的重组脂质化 P2086 (rLP2086) 的纯化和表征概述。

亚族 A rLP2086 纯化

表 X

rLP2086 变异体	A.A.同源性(%) ¹	理论 pI	纯度(%) ²
870446	75	6.1	80
2996	71	5.9	95
M97 252988	71	6.3	96
C11	68	6.4	82
M98 250771	62	6.1	83

亚族 B rLP2086 纯化

表 XI

rLP2086 变异体	A.A.同源性(%) ¹	理论 pI	纯度(%) ²
8529	100	7.5	96
M982	94	6.3	96
88049	92	6.2	90

CDC1573	87	5.6	93
---------	----	-----	----

纯化方法：用 TX-100 将所有变异体自大肠杆菌膜溶解（rLP2086-8529 除外，其用十二烷基肌氨酸钠或尿素溶解）。用于 Tris-HCl 或 NaPO₄ 缓冲液中的阴离子交换（TMAE）、尺寸排阻和/或阳离子交换（S Fractogel）色谱法的组合来达成进一步纯化。

1 与来自菌株 8529 的 P2086 相比的氨基酸同源性

2 如通过 SDS-PAGE 和胶状库马斯染色谱带（简称为蓝染）的激光密度测定法所测定的纯度

经测试抵抗同源和异源菌株的亚族 B 成员，rLP2086-8529 的免疫原性

下表 XII 展示经测试抵抗同源和异源菌株的亚族 B 成员，rLP2086-8529 的免疫原性
表 XII

目标菌株	P2086 亚族	目标菌株血清亚型	A.A. 同源性 ^a	全细胞 ELISA ^b 效价	BC ₅₀ 效价 ^c
539	B	P1.7-2,3	100	>1,458,000	3,200
H44/76	B	P1.7,16	100	>1,458,000	3,200
H355	B	P1.19,15	100	>1,458,000	3,200
CDC937	B	P1.7-2,3-4	100	>1,458,000	>800
M97 252097	B	P1.7-2,16	100	>1,458,000	>800
870227	B	P1.5-2,10	100	>1,458,000	<25
6940	B	P1.18,25, 6	97	900,162	>800
M982	B	P1.22,9	94	435,909	200
880049	B	P1.7-2,4	92	349,912	400
CDC1573	B	P1.7-1,1	87	102,508	25
870446	A	P1.12-1,1 3	71	389,829	800
M98 250771	A	P1.22,14	62	139,397	<25
NmB	A	P1.5-1,2-2	71	<2,000	<25

疫苗接种程序：在第 0 周和第 4 周用 10 µg rLP2086-8529+20 µg QS-21 免疫 6-8 周龄雌性瑞士-维博斯特小鼠。在第 6 周放血时执行数据分析。

a 与 rLP2086-8529 相比 P2086 的氨基酸同源性

b 表示为吸收率=0.1 时稀释度的倒数的终点效价

c 表示为减少 50%活细胞计数的抗血清的稀释度的倒数的 BC₅₀ 效价。第 0 周正常小鼠血清具有小于 10 的 BC₅₀ 效价。

表 XII 展示经测试抵抗同源和异源菌株的亚族 B 成员，rLP2086-2996 的免疫原性。

表 XIII

目标菌株	P2086 亚族	目标菌株血清亚型	A.A. 同源性 ^a	全细胞 ELISA ^b 效价	BC ₅₀ 效价 ^c
NmB	A	P1.5-1,2-2	99.6	8,979	<25
870446	A	P1.12-1,13	99	<1,458,000	>800
M97 252697	A	P1.18,25,6	A) 98	320,732	>800
6557	A	P1.22-1,14-1	98	17,319	<25
M98 250732	A	P1.22,14-1	89	241,510	>800
M98 250771	A	P1.22,14	89	447,867	800
H44/76	B	P1.7,16	72	56,386	<25

疫苗接种程序：在第 0 周和第 4 周用 10 µg rLP2086-2996+20 µg QS-21 免疫 6-8 周龄雌性瑞士-维博斯特小鼠。在第 6 周放血时执行数据分析。

a 与 rLP2086-2996 相比 P2086 的氨基酸同源性

b 表示为吸收率=0.1 时稀释度的倒数的终点效价

c 表示为减少 50%活细胞计数的抗血清的稀释度的倒数的杀菌性 (BC₅₀) 效价。第 0 周正常小鼠血清具有小于 10 的 BC₅₀ 效价。

下表 XIV 展示 rLP2086 和 rPorA 的抗血清当混合时互补且检定其杀菌活性。

表 XIV

抗血清	H44/76 (P1.7,16)	NMB (P1.5-1,2-2)	880049 (P1.7-2,4)	H355 (P1.19,15)	870227 (P1.5-2,10)	6557 (P1.22-1,14-1)
抗 rLP2086+ 三种 rPorA 抗血清	>3,200	>800	200	>800	200	200
对照						
抗 rLP2086	6,400	<25	100	3,200	<25	<25
相应单价 rPorA 抗血清	-	1,600	-	-	200	400

疫苗接种程序：在第 0 周和第 4 周用 10 µg rLP2086-8529/20 µg QS-21 或 15 µg rPorA/100 µg MPL 免疫 6-8 周龄雌性瑞士-维博斯特小鼠。在第 6 周放血时执行数据分析。

a 表示为减少 50%活细胞计数的抗血清的稀释度的倒数的杀菌性 (BC₅₀) 效价。第 0 周正常小鼠血清具有小于 10 的 BC₅₀ 效价。

下表, 表 XV 展示 rLP2086 亚族与两种 rPorA 的混合物激发小鼠体内的杀菌性抗体。

表 XV

	H44/76	6940	880049	M982	M98 250771	M98 250732	M97 252697	870446	NmB	6557
	SfB ^b	SfB	SfB	SfB	SfA ^b	SfA	SfA	SfA	SfA	SfA
	P1.7, 16	P1.1825 ,6	P1.7-2,4	P1.22,9	P1.22 ,14	P1.22 ,14-1	P1.18 ,25,6	P1.12-1 ,13	P1.5-1, 2-2	P1.22-1, 14-1
抗原										
rLP2086-8529+rLP2086-2996	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	-	<25
rLP2086-8529+rLP2086-2996+rP1.5-1,2-2+rP1.22-1,14-1	>800	800	100	200	400	400	>800	>800	>800	200
单价对照 ^c	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	>800	800

疫苗接种程序: 在第 0 周和第 4 周用 10 µg 每一蛋白质+20 µg QS-21 免疫 6-8 周龄雌性瑞士-维博斯特小鼠。在第 6 周放血时执行数据分析。

a 表示为减少 50%活细胞计数的抗血清的稀释度的倒数的杀菌性 (BC₅₀) 效价。第 0 周正常小鼠血清具有小于 10 的 BC₅₀ 效价。

b SfA-亚族 A, SfB-亚族 B

c 相应单价对照: rLP2086-8529、rLP2086-2996、rP1.5-1,2-2 或 rP1.22-1,14-1 抗血清

下文总结上述研究的结果。抗 rLP2086 抗血清具有抵抗 13/16 种测试菌株的杀菌性。表达不同血清亚型的十一种菌株由抗 P2086 血清杀死。抗 rLP2086 血清的杀菌活性与抗 rPorA 血清互补。P2086 与 PorA 的混合物激发小鼠体内的互补杀菌性抗体。差示清洁剂提取、纯化和免疫连同抵抗许多菌株的功能性抗体检定可用于鉴别新疫苗候选物。P2086

已鉴别作为疫苗候选物，其激发抵抗在 P2086 和 rPorA 两者方面异源的菌株的杀菌性抗体。因此，蛋白质的 2086 家族单独或与其它奈瑟菌抗原组合时可为适用疫苗。

实例 9

通过 PCR 针对 ORF 2086 基因的存在筛选不同血清群的脑膜炎球菌菌株。最终，筛选超过一百种脑膜炎球菌菌株。

两组对 C 末端可变区具有特异性的内部 PCR 引物用于区别亚族 A 和 B 基因序列。约 350 bp 的 PCR 扩增产物的存在表明 2086 基因序列存在于染色体上。所有菌株产生预期尺寸的单一 PCR 产物。测定全长 ORF 2086 基因的核苷酸序列，将其比对 (DNASTar MegAlign) 且用于产生系统树。

2086 基因在 pBAD 阿拉伯糖可诱导启动子系统中重组表达为 rLP2086 脂蛋白或在 IPTG 可诱导 pET 系统中表达为 rP2086 非脂质化蛋白质。这些重组蛋白质在 *大肠杆菌* B 中表达。经纯化的重组蛋白质用于使小鼠免疫且检定小鼠抗血清其血清 IgG 效价和其抵抗多种异源脑膜炎球菌菌株的杀菌活性。

通过 PCR 自以下全脑膜炎球菌细胞、经纯化染色体 DNA 或质粒 DNA 模板的一者扩增 ORF 2086。

将 ORF 2086 基因克隆至载体 pLP339 中，其将嗜血杆菌属 P4 前导序列与 ORF 2086 基因的 5'端融合。*大肠杆菌*菌株 BLR 用作宿主菌株以自 pBAD/ORF 2086 克隆重组表达脂质化形式的 rP2086。(参见图 10A)pBAD 阿拉伯糖可诱导启动子驱使表达 P4 信号/ORF 2086 融合蛋白以表达脂质化形式的 rP2086。将缺乏信号序列的 P2086 基因克隆至 pET9a 载体中的高度活性 T7 噬菌体启动子后。*大肠杆菌*菌株 BL21 (DE3) 用作宿主菌株以自 pET9a/ORF 2086 克隆重组表达非脂质化形式的 ORF 2086。可通过添加 IPTG 诱导 *大肠杆菌*菌株 BL21 中的 DE3 溶素原以在 lacUV5 启动子控制下表达 T7 RNA 聚合酶。参见 WCE; *FEMS 微生物通信 (FEMS Micro. Lett.)*, 48 (1987) 367-371 和 BCA; *临床微生物学杂志 (J. Clin. Microbiol.)*, 38 (2000) 2878-2884。

将基因 ORF 2086 自不同脑膜炎奈瑟菌菌株克隆且测序。将核苷酸序列比对 (DNASTar MegAlign) 且用于产生系统树。此树揭露两种不同亚族的 ORF 2086 基因核苷酸序列。两种亚族的基因在其 5'端类似，但在其 3'端附近含有相当多变异。尽管似乎存在显著可变性，但基因的特定关键区域在不同菌株中高度同源。在不欲受理论约束的情况下，这些保守性区域可提供蛋白质功能连续性且可表示用作疫苗目标的交叉保护性抗原决定基。

自若干血清群 B 脑膜炎球菌菌株克隆 2086 基因且在有或无脂质化信号序列情况下表达。与 T7 标签融合的非脂质化形式以高量表达。T7 标签测序可提供 mRNA 稳定性且显著增强多肽翻译程度。此融合蛋白似乎沉积于包涵体中且可容易用已知方案纯化且再折叠。脂质化和非脂质化形式的 P2086 以约 5 至 8% 的总细胞蛋白质表达，例外的为 T7 标签融合物，其以约 50% 总蛋白质表达 rP2086。非脂质化形式的蛋白质似乎可溶且集中于细胞质中。脂质化形式的蛋白质似乎与膜部分相关且用清洁剂溶解。其天然脂质化形式的蛋白质可具有用于抗原呈现的优良三级结构和/或所连接的脂质可充当刺激较高免疫原性反应的佐剂。

所有经测试的脑膜炎奈瑟菌 B 菌株似乎具有一个类 2086 基因。阐述 2086 基因的至少两个家族。2086 同系物已通过以下各物中 PCR 筛选而鉴别：

脑膜炎奈瑟菌 A、B、C、W135、Y

乳糖奈瑟菌

淋病奈瑟菌 FA1090

若干 ORF 2086 基因已经克隆且重组表达。

自各种脑膜炎球菌菌株表达 P2086 的脂质化形式。

这些重组蛋白质已经纯化且用于给小鼠接种疫苗。

所得抗血清具有杀菌性。

自各种菌株表达 P2086 的非脂质化形式。

rLP2086 始终激发比 rP2086 高的免疫反应。

rLP2086 也展现增强的抵抗同源和异源脑膜炎球菌菌株两者的杀菌活性。

实例 11

以下进一步证明 P2086 在奈瑟菌菌株中表达且提供 P2086 在若干菌株中表达的其它特定实例。

用再悬浮于 SDS 样品缓冲液中且于 98°C 下加热四分钟的来自盘培养物的细胞制备细胞溶菌液。以每孔约 30-50 µg 总蛋白质将样品装载于 10-20% 预铸凝胶 (ICN) 上且在 175 V 下过柱。将所述凝胶转移至硝化纤维膜上，接着用于 Tris 缓冲生理食盐水 (Blotto) 中的 5% 奶粉阻断 30 min。所用一次抗体为抵抗小鼠体内个别 rLP2086 变异体的多克隆抗血清的混合物。

参看图 17 和 18，西方印迹法展示 rLP2086 小鼠抗血清对 P2086 亚族 A 和 B 全细胞溶菌液的反应性。对于亚族 A 细胞溶菌液印迹法来说，所用抗血清抵抗 rLP2086-2996、

rLP2086-870446 和 rLP2086-250771, 其中 rLP2086-250771 以 1/500 稀释于 Blotto 中且其它以 1/1000 稀释于 Blotto 中。对于亚族 B 细胞溶菌液印迹法来说, 所用的抗血清抵抗 rLP2086-8529 (以 1/1000 稀释于 Blotto 中)、rLP2086-CDC1573、rLP2086-M982 和 rLP2086-880049 (此三种以 1/500 稀释于 Blotto 中)。将一次抗血清和印迹于 4℃ 下培养过夜。洗涤印迹, 将山羊-抗小鼠 AP 二次抗体以 1/500 添加于 Blotto 中, 且将印迹于室温下培养 30 min。洗涤后, 使用 BCIP/NBT 膜磷酸酶底物系统 (KPL) 使印迹显影。

参考文献

上文所提及的参考文献在下文指出且以引用的方式全部并入本文中:

1. 1997. 公共健康监督下对传染性病状的病例定义 (Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance). CDC。

2. 1995 萨姆布鲁克 J. (Sambrook J.) 和 D. W. Russell 拉塞尔 (D. W. Russell). 1995. 当代分子生物学方案 (Current Protocols in Molecular Biology). 约翰威立父子公司 (John Wiley & Sons, Inc.), 纽约 (New York)。

3. 1994. 格里芬 A. M. (Griffin A. M.) 和格里芬 H. G. (Griffin H. G.), 编, 序列数据的计算机分析 (Computer Analysis of Sequence Data, Part I). 胡玛娜出版社 (Humana Press), 新泽西 (New Jersey)。

4. 1993. 史密斯 (Smith, D. W.), 编, 生物计算: 信息学和基因组计划 (Biocomputing: Informatics and Genome Projects). 学术出版社 (Academic Press), 纽约 (New York)。

5. 1991. 格里布斯科夫 M. (Gribskov, M.) 和德维吕 J. (Devereux, J.), 编序列分析入门 (Sequence Analysis Primer). 斯托克顿出版社 (Stockton Press), 纽约 (New York)。

6. 1988. 莱斯克 A. M. (Lesk, A. M.), 编计算分子生物学 (Computational Molecular Biology). 牛津大学出版社 (Oxford University Press), 纽约 (New York)。

7. 阿卜杜拉希 H. (Abdillahi H.), 和 J. T.波尔曼 (J. T. Poolman). 1988. 在全细胞 ELISA 中使用单克隆抗体进行脑膜炎奈瑟菌 B 群血清亚型分类 (*Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA). 微生物发病机理 (*Microbial Pathogenesis*) 4(1):27-32。

8. 阿克特曼 M. (Achtman M.) 1995. 脑膜炎奈瑟菌的流行性传播和抗原变异性 (Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*). 微生物学前沿 (*Trends in Microbiology*) 3(5):186-92。

9. 阿尔姆 R. A. (Alm, R. A.), L. S. 林 (L. S. Ling), D. T. 摩尔 (D. T. Moir), B. L.

金 (B. L. King), E. D. 布朗 (E. D. Brown), P. C. 道奇 (P. C. Doig), D. R. 史密斯 (D. R. Smith), B. 诺南 (B. Noonan), B. C. 吉尔德 (B. C. Guild), B. L. 德让 (B. L. deJonge), G. 卡麦尔 (G. Carmel), P. J. 图米罗 (P. J. Tummino), A. 卡卢梭 (A. Caruso), M. 乌莉亚-尼克尔森 (M. Uria-Nickelsen), D. M. 米尔斯 (D. M. Mills), C. 伊维斯 (C. Ives), R. 吉布森 (R. Gibson), D. 麦尔博格 (D. Merberg), S. D. 米尔斯 (S. D. Mills), 江奇 (Q. Jiang), D. E. 泰勒 (D. E. Taylor), G. F. 乌维斯 (G. F. Vovis), 和 T. J. 特卢斯特 (T. J. Trust). 1999. 人类胃病原体幽门螺旋杆菌的两个不相关分离株的基因组序列比较 (Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*) [出版勘误出现在自然 (Nature) 1999 年 2 月 25 日; 397(6721):719]. 自然 (Nature). 397:176-80。

10. 阿尔舒尔 S. F. (Altschul, S. F.), T. L. 麦登 (T. L. Madden), A. A. 斯嘉费尔 (A. A. Schaffer), 张江 (J. Zhang), 张震 (Z. Zhang), W. 米勒 (W. Miller), 和 D. J. 里普曼 (D. J. Lipman). 1997. 加帽 BLAST 和 PSI-BLAST: 新一代蛋白质数据库搜索程序 (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs). 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 25:3389-402。

11. 安德尔森 T. F. (Anderson, T. F.) 1951. 在制备用于电子显微镜的试样中保存三维结构的技术 (Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope). 纽约科学院学报 (Trans N Y Acad Sci.) 13:130-134。

12. 恩布罗奇 F. (Ambrosch, F.), G. 维德曼 (G. Wiedermann), P. 克鲁伊 (P. Crooy), 和 A. M. 乔治 (A. M. George). 1983. 新四价脑膜炎球菌疫苗的免疫原性和副作用 (Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine). 世界卫生组织公报 (Bulletin of the World Health Organization) 61(2):317-23。

13. 本森 G. (Benson, G.) 1999. 发现串连重复: 分析 DNA 序列的程序 (Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences). 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 27:573-80。

14. 卡芮罗 H. (Carillo, H.), D. 里普曼 (D. Lipman), 和 J. 希尔安 (J. Siam). 1988. 应用数学 (Applied Math) 48:1073。

15. 陈 C. C. (Chen, C. C.), 和 P. P. 克莱芮 (P. P. Cleary). 1989. 链球菌 C5a 肽酶在大肠杆菌中的克隆和表达: 与 12 型 M 蛋白基因连接 (Cloning and expression of the

streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene) . 传染免疫学 (*Infect. Immun*) . 57:1740-1745。

16. 克摩里吉娜 I. (Chmouryguina, I.) , A. 苏霍洛夫 (A. Suvorov) , P. 法拉利 (P. Ferrieri) , 和 P. P. 克莱芮 (P. P. Cleary) . 1996. A 群和 B 群链球菌中 C5a 肽酶基因的保存 (Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci) . 传染免疫学 (*Infect. Immun*) . 64:2387-2390。

17. 库克里尔 F. R.三世 (Cockerill, F. R., 3rd) , R. L. 汤姆逊 (R. L. Thompson) , J. M. 穆塞尔 (J. M. Musser) , P. M. 施里耶夫特 (P. M. Schlievert) , J. 塔尔波特 (J. Talbot) , K. E. 霍利 (K. E. Holley) , W. S. 哈姆森 (W. S. Harmsen) , D. M. 伊尔斯特路普 (D. M. Ilstrup) , P. C. 霍奈尔 (P. C. Kohner) , M. H. 金 (M. H. Kim) , B. 弗兰克福特 (B. Frankfort) , J. M. 马那哈 (J. M. Manahan) , J. M. 斯特克博格 (J. M. Steckelberg) , F. 罗伯森 (F. Roberson) , 和 W. R. 维尔森 (W. R. Wilson) . 1998. 16 位连续侵袭性链球菌病病例的分子、血清学和临床特征 (Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease) . 明尼苏达东南研究组 (Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group) . 临床感染疾病 (*Clin Infect Dis*) . 26:1448-58。

18. 科特里 H. S. (Courtney, H. S.) , 李叶 (Y. Li) , J. B. 戴尔 (J. B. Dale) , 和 D. L. 哈丝蒂 (D. L. Hasty) . 1994. A 群链球菌的纤维结合蛋白/纤维蛋白原结合蛋白的克隆、测序和表达 (Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci) . 感染免疫学 (*Infect Immun.*) 62:3937-46。

19. 塞罗佐 M. (Cserzo, M.) , E. 华林 (E. Wallin) , I. 西蒙 (I. Simon) , G. 范海因 (G. von Heijne) , 和 A. 埃罗夫森 (A. Elofsson) . 1997. 预测原核生物膜蛋白中的跨膜 α 螺旋: 致密对准表面方法 (Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method) . 蛋白质工程 (*Protein Engineering.*) 10:673-6。

20. 坎宁安 M. W. (Cunningham, M. W.) , 和 A. 昆因 (A. Quinn) . 1997. 链球菌 M 蛋白的 I 类抗原决定基与肌球蛋白之间的免疫原性交叉反应性 (Immunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin) . 先进实验医学生物学 (*Adv Exp Med Biol.*) 418:887-92。

21. 戴尔 J. B. (Dale, J. B.) , R. W. 拜尔德 (R. W. Baird) , H. S. 科特里 (H. S. Courtney) , D. L. 哈丝蒂 (D. L. Hasty) , 和 M. S. 布朗茨 (M. S. Bronze) . 1994. 脂磷

壁酸对小鼠抵抗 A 群链球菌咽喉感染的被动保护 (Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid) . *传染病期刊 (J Infect Dis.)* 169:319-23。

22. 戴尔 J. B. (Dale, J. B.) , M. 西蒙斯 (M. Simmons) , E. C. 蒋 (E. C. Chiang) , 和 E. Y. 蒋 (E. Y. Chiang) . 1996. 重组八价 A 链球菌 M 蛋白疫苗 (Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine) . *疫苗 (Vaccine)* . 14:944-8。

23. 戴尔 J. B. (Dale, J. B.) , R. G. 华本 (R. G. Washburn) , M. B. 马奎斯 (M. B. Marques) , 和 M. R. 威塞尔 (M. R. Wessels) . 1996. 透明质酸胶囊和表面 M 蛋白对调理 A 群链球菌的抗性 (Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci) . *感染免疫学 (Infect Immun.)* 64:1495-501。

24. 埃迪 S. R. (Eddy, S. R.) 1996. 隐马尔可夫模型 (Hidden Markov models) . *当代理论结构生物学 (Cur Opin Struct Bio)* . 6:361-5。

25. 艾伦 R. P. (Ellen, R. P.) , 和 R. J. 吉布森 (R. J. Gibbons) . 1972. 化脓链球菌对上皮表面的 M 蛋白相关性粘附: 毒性的先决条件 (M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence) . *感染免疫学 (Infect Immun.)* 5:826-830。

26. 恩格 J. K. (Eng, J. K.) , A. L. 麦克科马克 (A. L. McCormack) , 和 J. R. 耶茨三世 (J. R. Yates, 3rd) . 1994. 使肽的串联质谱光谱数据与蛋白质数据库中的氨基酸序列相关的方法 (An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database) . *质谱学会 (Am Soc Mass Spectrometry)* . 5:976-89。

27. 费谢蒂 V. A. (Fischetti, V. A.) , V. 庞切利 (V. Pancholi) , 和 O. 施涅温 (O. Schneewind) . 1990. 革兰氏阳性球菌表面蛋白的锚区域中六肽序列的保存 (Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci) . *分子微生物学 (Mol Microbiol)* . 4:1603-5。

28. 福格 G. C. (Fogg, G. C.) , 和 M. G. 卡帕龙 (M. G. Caparon) . 1997. 化脓链球菌中纤维结合蛋白结合由于 *rofA* 的无氧活化而组成型表达 (Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*) . *细菌学杂志 (J Bacteriol.)* 179:6172-80。

29. 福斯特 T. J. (Foster, T. J.) , 和 M. 浩克 (M. Hook) . 1998. 金黄色葡萄球菌的表

面蛋白粘附 (Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*) . *微生物学前沿 (Trends Microbiol)* . 6:484-8。

30. 福莱瑟 C. M. (Fraser, C. M.) , S. 凯瑟琳 (S. Casjens) , 黄文明 (W. M. Huang) , G. G. 萨顿 (G. G. Sutton) , R. 克莱顿 (R. Clayton) , R. 莱西拉 (R. Lathigra) , O. 怀特 (O. White) , K. A. 凯奇恩 (K. A. Ketchum) , R. 达德森 (R. Dodson) , E. K. 西奇 (E. K. Hickey) , M. 吉温 (M. Gwinn) , B. 达夫蒂 (B. Dougherty) , J. F. 汤姆博 (J. F. Tomb) , R. D. 福莱舍曼 (R. D. Fleischmann) , D. 理查德森 (D. Richardson) , J. 彼得森 (J. Peterson) , A. R. 克拉夫奇 (A. R. Kerlavage) , J. 凯奇布什 (J. Quackenbush) , S. 萨尔茨堡 (S. Salzberg) , M. 汉森 (M. Hanson) , R. 范胡格特 (R. van Vugt) , N. 帕尔默 (N. Palmer) , M. D. 亚当斯 J. (M. D. Adams, J.)。

31. 金凯恩 (Gocayne) , J. C. 芬特 (J. C. Venter) , 等人 1997. 莱姆病螺旋菌 *Borrelia burgdorferi* 的基因组序列 (Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*) [参见注释]. *自然 (Nature)* . 390:580-6。

32. 古得施奈德 I. (Goldschneider, I.) , E. C. 古茨克里奇 (E. C. Gotschlich) , 和 M. S. 阿特斯坦 (M. S. Artenstein) . 1969. 人类对脑膜炎球菌的免疫性 I. 体液抗体的作用 (Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies) . *实验医学杂志 (Journal of Experimental Medicine)* 129(6):1307-26。

33. 古得施奈德 I. (Goldschneider, I.) , E. C. 古茨克里奇 (E. C. Gotschlich) , 和 M. S. 阿特斯坦 (M. S. Artenstein) . 1969. 人类对脑膜炎球菌的免疫性 II. 天然免疫性的产生 (Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity) . *实验医学杂志 (Journal of Experimental Medicine)* 129(6):1327-48。

34. 古茨克里奇 (Gotschlich) , E. C., I. 古得施奈德 (Goldschneider) , 和 M. S. 阿特斯坦 (M. S. Artenstein) . 1969. 人类对脑膜炎球菌的免疫性 IV. 人类志愿者中 A 群和 C 群脑膜炎球菌多糖的免疫原性 (Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers) . *实验医学杂志 (Journal of Experimental Medicine)* 129(6):1367-84。

35. 古茨克里奇 (Gotschlich) , E. C., I. 古得施奈德 (Goldschneider) , 和 M. S. 阿特斯坦 (M. S. Artenstein) . 1969. 人类对脑膜炎球菌的免疫性 V. 带菌状态下以脑膜炎球菌 C 群多糖免疫的作用 (Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state) . *实验医学杂志 (Journal of*

Experimental Medicine) 129(6):1385-95。

36. 格林 B.A. (Green, B.A.), 法利 J.E. (Farley, J.E.), 奎恩-总督 T. (Quinn-Dey, T.), 德伊奇 R.A. (Deich, R.A.), 和洛特里克 G.W. (Zlotnick, G.W.) . 1991. 流感嗜血杆菌的 e (P4) 外膜蛋白: 抗 e 血清的生物活性和结构基因的克隆和测序 (The e (P4) Outer Membrane Protein of *Haemophilus influenzae*: Biologic Activity of Anti-e Serum and Cloning and Sequencing of the Structural Gene) . *传染免疫学 (Infect. Immun)* . 59: 3191-3198。

37. 古茨曼 L-M (Guzman, L-M), 柏林 D. (Belin, D.), 卡尔森 M.J. (Carson, M.J.), 贝克维奇 J. (Beckwith, J.) . 1995. 含有阿拉伯糖 PBAD 启动子的载体的紧密调控、调节和高水平表达 (Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter) . *细菌学杂志 (J. Bacteriology)* 177:4121-4130。

38. 海克 J. (Hacker, J.), G.布龙-奥勒尔 (G. Blum-Oehler), I.穆德尔发 (I. Muhldorfer), 和 H.切帕 (H. Tschape) . 1997. 致病细菌的病原性岛: 结构、功能和对微生物演化的影响 (Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution) . *分子微生物学 (Mol Microbiol)* . 23:1089-97。

39. 哈士奇 E. (Hanski, E.), 和 M.卡帕龙 (M. Caparon) . 1992. 纤维结合蛋白结合蛋白蛋白质 F 是 A 群链球菌化脓链球菌的粘附因子 (Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*) . *美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci., USA)* . 89:6172-76。

40. 哈士奇 E. (Hanski, E.), P. A.霍维茨 (P. A. Horwitz), 和 M. G. 卡帕龙 (M. G. Caparon) . 1992. 化脓链球菌 JRS4 的纤维结合蛋白结合蛋白蛋白质 F 在异源链球菌和肠球菌中的表达促进其与呼吸道上皮细胞的粘附 (Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells) . *感染免疫学 (Infect Immun.)* 60:5119-5125。

41. 海南德斯-桑萨 J. (Hernandez-Sanchez, J.), J. G.维拉德斯 (J. G. Valadez), J. V. 海莱拉 (J. V. Herrera), C.昂蒂维斯 (C. Ontiveros), 和 G.瓜奈罗斯 (G. Guarneros) . 1998. λ 杆状小基因介导的蛋白质合成抑制涉及肽基 tRNA 的累积和 tRNA 饥饿 (lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA) . *欧洲分子生物学组织期刊 (EMBO Journal)* . 17:3758-65。

42. 黄涛涛 (Huang, T. T.), H.马尔克 (H. Malke), 和 J. J.法利 (J. J. Ferretti) . 1989. A 群链球菌德链激酶基因: 大肠杆菌中的克隆、表达和序列分析 (The streptokinase gene

of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis). *分子微生物学 (Mol Microbiol)* . 3:197-205.

43. 海耶丝 W. L. (Hynes, W. L.), A. R.迪克松 (A. R. Dixon), S. L.沃尔顿 (S. L. Walton), 和 L. J.阿里吉丝 (L. J. Aridgides). 2000. 化脓链球菌的胞外透明质酸酶基因 (*hyla*) (The extracellular hyaluronidase gene (*hyla*) of *Streptococcus pyogenes*). *FEMS 微生物通讯 (FEMS Microbiol Lett.)* 184:109-12.

44. 海耶丝 W. L. (Hynes, W. L.), L.汉考克 (L. Hancock), 和 J. J. 法利 (J. J. Ferretti). 1995. 化脓链球菌的第二噬菌体透明质酸酶基因的分析: 第三透明质酸酶参与胞外酶活性的证据 (Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 63:3015-20.

45. 伊萨博格 R. R. (Isberg, R. R.), 和 G.特兰范尼伊 (G. Tran Van Nhieu). 1994. 通过整合素受体使微生物结合和内化 (Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors). *微生物学前沿 (Trends Microbio.)* 2:10-4.

46. 琼斯 K. F. (Jones, K. F.), 和 V. A.费谢蒂 (V. A. Fischetti). 1988. 抗体结合于 M6 蛋白上的位置对 A 群 M6 链球菌的调理和噬菌作用的重要性 (The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci). *实验医学杂志 (J Exp Med.)* 167:1114-23.

47. 吉尔博格 B. M. (Kihlberg, B. M.), M.科林 (M. Collin), A.奥尔森 (A. Olsen), 和 L.博克 (L. Bjorck). 1999. 蛋白质 H, 化脓链球菌的抗噬菌表面蛋白 (Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 67:1708-14.

48. 考布林克 R. (Koebnik, R). 1995. 一些细菌细胞表面蛋白中肽聚糖结合 α 螺旋主结构的提出 (Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins) [通信; 注释]. *分子微生物学 (Molecular Microbiology)* . 16:1269-70.

49. 奎布斯 O. P. (Kuipers, O. P.), H. J.布特 (H. J. Boot), 和 W. M.德福斯 (W. M. de Vos). 1991. 改良的使用 PCR 的位点特异性突变诱发方法 (Improved site-directed mutagenesis method using PCR). *核酸研究 (Nucleic Acids Res.)* 19:4558.

50. 凯特 J. (Kyte, J.), 和 R. F.杜立特 (R. F. Doolittle). 1982. 显示蛋白质的水疗特征的简单方法 (A simple method for displaying the hydropathic character of a protein). *分*

子生物学杂志 (*Journal of Molecular Biology*) 157:105-132。

51. 兰德 O. (Landt, O.), H. P. 格鲁奈特 (H. P. Grunert), 和 U. 哈恩 (U. Hahn). 1990. 使用聚合酶链反应进行快速位点特异性突变诱发的一般方法 (A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction). 基因 (*Gene*) 96:125-128。

52. 罗斯奈尔 M. J. (Loessner, M. J.), S. 格恩 (S. Gaeng), 和 S. 施乐 (S. Scherer). 1999. 在金黄色葡萄球菌噬菌体 187 的内溶菌素基因中类假日素蛋白基因完全植入框架以外的证据 (Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187). 细菌学杂志 (*J Bacteriol.*) 181:4452-60。

53. 卢卡辛 A. V. (Lukashin, A. V.), 和 M. 波罗朵夫斯基 (M. Borodovsky). 1998. 基因标记 hmm: 发现基因的新的解决方法 (GeneMark.hmm: new solutions for gene finding). 核酸研究 (*Nucleic Acids Res.*) 26:1107-15。

54. 卢克莫夫斯基 S. (Lukomski, S.), C. A. 蒙特格麦瑞 (C. A. Montgomery), J. 卢让基娃 (J. Rurangirwa), R. S. 盖斯克 (R. S. Geske), J. P. 巴里什 (J. P. Barrish), G. J. 亚当斯 (G. J. Adams), 和 J. M. 穆塞尔 (J. M. Musser). 1999. 化脓链球菌产生的胞外半胱氨酸蛋白酶参与小鼠中侵袭性皮肤感染和扩散的发病机理 (Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice). 感染免疫学 (*Infect Immun.*) 67:1779-88。

55. 玛多尔 D. V. (Madore, D. V.) 1998. 免疫反应作为流感嗜血杆菌 b 型疫苗功效的指示剂的表征 (Characterization of immune response as an indicator of *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy). 儿科传染性疾病杂志 (*Pediatr Infect Dis J.*) 17:S207-10。

56. 马特苏卡 Y. V. (Matsuka, Y. V.), S. 比莱伊 (S. Pillai), S. 古巴 (S. Gubba), J. M. 穆塞尔 (J. M. Musser), 和 S. B. 奥尔姆斯坦德 (S. B. Olmsted). 1999. 化脓链球菌胞外半胱氨酸蛋白酶对纤维蛋白原的裂解和抑制酶蛋白水解活性的抗体的产生 (Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity). 感染免疫学 (*Infect Immun.*) 67:4326-33。

57. 马兹曼宁 S. K. (Mazmanian, S. K.), 刘广 (G. Liu), H. 托-特哈特 (H. Ton-That), 和 O. 施涅温 (O. Schneewind). 1999. 金黄色葡萄球菌, 将表面蛋白锚定于细胞壁德酶 (*Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall). 科

学 (*Science*) . 285:760-3。

58. 麦克阿蒂 C. P.(McAtee, C. P.), K. E. 福莱(K. E. Fry), 和 D. E. 博格(D. E. Berg). 1998. 用“蛋白质组”技术鉴别幽门螺旋杆菌的可能诊断和疫苗候选物 (Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by "proteome" technologies) . *螺旋杆菌 (Helicobacter)* . 3:163-9。

59. 麦克阿蒂 C. P. (McAtee, C. P.), M. Y. 林 (M. Y. Lim), K. 丰 (K. Fung), M. 维利冈 (M. Velligan), K. 福莱 (K. Fry), 周涛 (T. Chow), 和 D. E. 博格 (D. E. Berg) . 1998. 用二维凝胶电泳、序列分析和血清谱分析鉴别幽门螺旋杆菌的可能诊断和疫苗候选物 (Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling) . *临床诊断实验免疫学 (Clin Diagn Lab Immunol.)* 5:537-42。

60. 麦克阿蒂 C. P. (McAtee, C. P.), M. Y. 林 (M. Y. Lim), K. 丰 (K. Fung), M. 维利冈 (M. Velligan), K. 福莱 (K. Fry), 周大鹏 (T. P. Chow), 和 D. E. 博格 (D. E. Berg) . 1998. 用蛋白质组技术表征幽门螺旋杆菌疫苗候选物 (Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques) . *色谱 B 生物医学科学应用杂志 (J Chromatogr B Biomed Sci Appl.)* 714:325-33。

61. 马吉哈德 N. (Mejlhede, N.), J. F. 阿特金斯 (J. F. Atkins), 和 J. 奈伊哈德 (J. Neuhard) . 1999. 解码枯草芽孢杆菌 *cdd* 时在序列 CGA AAG 发生核糖体-1 移框 (Ribosomal -1 frameshifting during decoding of *Bacillus subtilis cdd* occurs at the sequence CGA AAG) . *细菌学杂志 (J. Bacteriol.)* 181:2930-7。

62. 摩里奈利 G. (Molinari, G.), S. R. 泰雷 (S. R. Talay), P. 瓦伦丁-维冈 (P. Valentin-Weigand), M. 罗德 (M. Rohde), 和 G. S. 哈特沃 (G. S. Chhatwal) . 1997. 化脓链球菌的纤维结合蛋白结合蛋白 SfbI 参与 A 群链球菌在上皮细胞中的内化 (The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells) . *感染免疫学 (Infect Immun.)* 65:1357-63。

63. 蒙特乌罗斯 K. T. (Mountzouros, K. T.), 和 A. P. 豪维尔 (A. P. Howell) . 2000. 在 B 群脑膜炎奈瑟菌的基于荧光的血清杀菌检定中检测补体介导的抗体依赖性杀菌活性 (Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*) . *临床微生物学杂志 (J. Clin. Microbiol.)* 38(8):2878-2884。

64. 纳凯 K. (Nakai, K.), 和 M. 坎内沙 (M. Kanehisa) . 1991. 预测革兰氏阴性菌

中蛋白质定位位点的高级系统 (Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria). *蛋白质 (Proteins)*. 11:95-110。

65. 纳华内 W. W. (Navarre, W. W.), 和 O. 施涅温 (O. Schneewind). 1999. 革兰氏阳性菌的表面蛋白和其靶向细胞壁包膜的机制 (Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope). *微生物分子生物学综述 (Microbiol Mol Biol Rev)*. 63:174-229。

66. 涅尔森 H. (Nielsen, H.), J. 英格布莱科特 (J. Engelbrecht), S. 布伦克 (S. Brunak), 和 G. 范海因 (G. von Heijne). 1997. 原核和真核生物信号肽的鉴别和其裂解位点的预测 (Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites). *蛋白质工程 (Protein Engineering.)* 10:1-6。

67. 尼兹特 V. (Nizet, V.), B. 比霍 (B. Beall), D. J. 巴斯特 (D. J. Bast), V. 达特 (V. Datta), L. 吉尔本 (L. Kilburn), D. E. 莱欧 (D. E. Low), 和 J. C. 德阿萨维多 (J. C. De Azavedo). 2000. A 群链球菌产生链球菌溶血素 S 的遗传基因座 (Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 68:4245-54。

68. 诺德斯特兰德 A. (Nordstrand, A.), W. M. 麦克肖 (W. M. McShan), J. J. 法利 (J. J. Ferretti), S. E. 霍尔姆 (S. E. Holm), 和 M. 诺格林 (M. Norgren). 2000. 链激酶基因的等位基因取代降低 A 群链球菌株 NZ131 的致肾炎能力 (Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 68:1019-25。

69. 奥尔姆斯坦德 S. B. (Olmsted, S. B.), S. L. 爱尔兰德森 (S. L. Erlandsen), G. M. 杜宁 (G. M. Dunny), 和 C. L. 威尔士 (C. L. Wells). 1993. 用视野发射扫描电子显微镜高分辨率观察由信息素诱导结合质粒 pCF10 编码的粪肠球菌表面蛋白 (High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of *Enterococcus faecalis* surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10). *细菌学杂志 (J Bacteriol.)* 175:6229-37。

70. 帕克 J. (Park, J.), 和 S. A. 泰克曼 (S. A. Teichmann). 1998. DIVCLUS: 发现单结构域蛋白和多结构域蛋白中的同源结构域的 GEANFAMMER 包中的自动方法 (DIVCLUS: an automatic method in the GEANFAMMER package that finds homologous domains in single- and multi-domain proteins). *生物信息学 (Bioinformatics)*. 14:144-50。

71. 帕克希尔 J. (Parkhill, J.), M. 阿克特曼 (M. Achtman), K. D. 詹姆斯 (K. D. James),

S. D. 本特利 (S. D. Bentley), C. 舒尔奇 (C. Churcher), S. R. 克里 (S. R. Klee), G. 莫莱里 (G. Morelli), D. 巴沙姆 (D. Basham), D. 布朗 (D. Brown), T. 奇林沃斯 (T. Chillingworth), R. M. 戴维伊斯 (R. M. Davies), P. 戴维斯 (P. Davis), K. 戴夫林 (K. Devlin), T. 费尔特维尔 (T. Feltwell), N. 汉姆林 (N. Hamlin), S. 霍尔罗德 (S. Holroyd), K. 杰格尔斯 (K. Jagels), S. 里特 (S. Leather), S. 莫乌尔 (S. Moule), K. 蒙格尔 (K. Mungall), M. A. 奎尔 (M. A. Quail), M. A. 莱昂德莱姆 (M. A. Rajandream), K. M. 路特福德 (K. M. Rutherford), M. 西蒙德斯 (M. Simmonds), J. 斯科尔顿 (J. Skelton), S. 怀特海德 (S. Whitehead), B. G. 斯布赖特 (B. G. Spratt), 和 B. G. 巴莱尔 (B. G. Barrell). 2000. 脑膜炎奈瑟菌 Z2491 的血清群 A 菌株的完全 DNA 序列 (Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491) [参见注释]. *自然 (Nature)*. 404:502-6.

72. 皮埃尔舒巴赫 M. D. (Pierschbacher, M. D.), 和 E. 罗斯拉蒂 (E. Ruoslahti). 1987. 序列 Arg-Gly-Asp-Xaa 的立体化学对细胞粘附中的结合特异性的影响 (Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion). *生物化学杂志 (J Biol Chem)*. 262:17294-8.

73. 比萨 M. (Pizza, M.), V. 斯嘉拉多 (V. Scarlato), V. 玛斯格纳尼 (V. Massignani), M. M. 朱利安尼 (M. M. Giuliani), B. 阿利格 (B. Arico), M. 科曼杜西 (M. Comanducci), G. T. 杰宁斯 (G. T. Jennings), L. 巴尔蒂 (L. Baldi), E. 巴托利尼 (E. Bartolini), B. 卡派切 (B. Capecchi), C. L. 加利奥蒂 (C. L. Galeotti), E. 鲁兹 (E. Luzzi), R. 马奈蒂 (R. Manetti), E. 马切蒂 (E. Marchetti), M. 摩拉 (M. Mora), S. 诺蒂 (S. Nuti), G. 拉蒂 (G. Ratti), L. 桑蒂尼 (L. Santini), S. 萨维诺 (S. Savino), M. 斯卡塞利 (M. Scarselli), E. 斯托尼 (E. Storni), P. 佐 (P. Zuo), M. 布鲁伊克 (M. Broecker), E. 亨德特 (E. Hundt), B. 纳普 (B. Knapp), E. 布莱尔 (E. Blair), T. 马森 (T. Mason), H. 泰特林 (H. Tettelin), D. W. 胡德 (D. W. Hood), A. C. 杰夫利斯 (A. C. Jeffries), N. J. 桑德斯 (N. J. Saunders), D. M. 格兰诺夫 (D. M. Granoff), J. C. 芬特 (J. C. Venter), E. R. 莫克森 (E. R. Moxon), G. 格兰蒂 (G. Grandi), 和 R. 拉泊利 (R. Rappuoli). 2000. 用全基因组测序鉴别对抗血清群 B 脑膜炎球菌疫苗候选物 (Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing). *科学 (Science)* 287(5459):1816-20.

74. 波蒂尔斯基 A. (Podbielski, A.), A. 甫洛朵夫 (A. Flosdorff), 和 J. 韦伯-海宁曼 (J. Weber-Heynemann). 1995. A 群链球菌 virR49 基因控制四个结构病毒调节子基因

的表达 (The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 63:9-20。

75. 波尔曼 J. T. (Poolman, J. T.) 1996. 细菌外膜蛋白疫苗, 脑膜炎球菌实例 (Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example). *实验医学和生物学进展 (Advances in Experimental Medicine & Biology)* 397:73-7。

76. 布罗福特 T. (Proft, T.), S. 路易斯莫法特 (S. Louise Moffatt), C. J. 贝卡恩 (C. J. Berkahn), 和 J. D. 福莱斯特 (J. D. Fraser). 1999. 来自化脓链球菌的新颖超抗原的鉴别和表征 (Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*). *实验医学杂志 (J Exp Med.)* 189:89-102。

77. 普格斯利 A. P. (Pugsley, A. P.) 1993. 革兰氏阴性菌中的完全一般分泌途径 (The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria). *微生物学综述 (Microbiol Rev)* 57:50-108。

78. 奎恩 A. (Quinn, A.), K. 沃德 (K. Ward), V. A. 费谢蒂 (V. A. Fischetti), M. 亨瑞克 (M. Hemric), 和 M. W. 坎宁安 (M. W. Cunningham). 1998. 链球菌 M 蛋白的 I 类抗原决定基和肌球蛋白之间的免疫学关系 (Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 66:4418-24。

79. 瑞达 K. B. (Reda, K. B.), V. 卡普尔 (V. Kapur), D. 朱伊莱 (D. Goela), J. G. 兰费尔 (J. G. Lamphear), J. M. 穆塞尔 (J. M. Musser), 和 R. R. 里奇 (R. R. Rich). 1996. 链球菌超抗原 SSA 等位基因变异体的系统发生分布提供化脓链球菌内 ssa 水平转移的证据 (Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within *Streptococcus pyogenes*). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 64:1161-5。

80. 萨姆布鲁克 J. (Sambrook J.), 和 D. W. Russell 拉塞尔 (D. W. Russell). 2001. 分子克隆实验手册 (*Molecular cloning a laboratory manual*), 第 3 版, 第 3 卷. 冷泉港实验出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港 (Cold Spring Harbor), 纽约 (New York)。

81. 萨尔茨堡 S. L. (Salzberg, S. L.), A. L. 戴尔切 (A. L. Delcher), S. 卡西夫 (S. Kasif), 和 O. 怀特 (O. White). 1998. 使用内插马尔可夫模型进行微生物基因鉴别 (Microbial gene identification using interpolated Markov models). *核酸研究 (Nucleic Acids Res.)* 26:544-8。

82. 索克昂恩 K. (Saukkonen, K.), H. 阿卜杜拉希 (H. Abdillahi), J. T.波尔曼 (J. T. Poolman), 和 M. 列农 (M. Leinonen). 1987. 针对脑膜炎奈瑟菌 B:15:P1.16 的 1 类和 3 类外膜蛋白的单克隆抗体在大鼠幼仔感染模型中的保护功效: 疫苗研发的新前景 (Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development). *微生物发病机理 (Microbial Pathogenesis)* 3(4):261-7。

83. 塞达哈 (Sedegah) 等人 1994. *免疫学 (Immunology)* 91, 9866-9870。

84. 松博格 M. G. (Sonnenberg, M. G.), 和 J. T. 贝里斯勒 (J. T. Belisle). 1997. 用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳、N 末端氨基酸测序和电喷雾质谱定义结核分枝杆菌培养物滤出液蛋白质 (Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 65:4515-24。

85. 松海默 E. L. (Sonnhhammer, E. L.), S. R. 埃迪 (S. R. Eddy), 和 R. 杜宾 (R. Durbin). 1997. Pfam: 基于种子比对的蛋白质结构域家族的综合数据库 (Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments). *蛋白质 (Proteins)* 28:405-20。

86. 斯蒂芬 D. L. (Stevens, D. L.) 1995. 链球菌中毒休克综合症: 疾病范围、发病机理和治疗新构想 (Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment). *紧急传染性疾病 (Emerg Infect Dis)* 1:69-78。

87. 斯托克鲍尔 K. E. (Stockbauer, K. E.), L. 马格恩 (L. Magoun), 刘明 (M. Liu), E. H. 伯恩斯 (E. H. Burns), Jr., S. 古巴 (S. Gubba), S. 雷尼西 (S. Renish), 潘晓 (X. Pan), S. C. 博得芮 (S. C. Bodary), E. 贝克 (E. Baker), J. 库伯恩 (J. Coburn), J. M. 莱昂 (J. M. Leong), 和 J. M. 穆塞尔 (J. M. Musser). 1999. 具有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 主结构的 A 群链球菌的半胱氨酸蛋白酶致病因子的天然变异体优先结合整合素 $\alpha v \beta 3$ 和 $\alpha I I b \beta 3$ (A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha I I b \beta 3$) *美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci, USA)* 96:242-7。

88. 泰特林 H. (Tettelin, H.), N. J. 桑德斯 (N. J. Saunders), J. Heidelberg, A. C. 杰夫利斯 (A. C. Jeffries), K. E. 奈尔森 (K. E. Nelson), J. A. 埃森 (J. A. Eisen), K. A. 凯奇恩 (K. A. Ketchum), D. W. 胡德 (D. W. Hood), J. F. 佩登 (J. F. Peden), R. J. 杜德

森 (R. J. Dodson), W. C. 奈尔森 (W. C. Nelson), M. L. 格温 (M. L. Gwinn), R. 德拜 (R. DeBoy), J. D. 彼得森 (J. D. Peterson), E. K. 西奇 (E. K. Hickey), D. H. 哈福特 (D. H. Haft), S. L. 萨尔茨堡 (S. L. Salzberg), O. 怀特 (O. White), R. D. 福莱舍曼 (R. D. Fleischmann), B. A. 杜尔蒂 (B. A. Dougherty), T. 马森 (T. Mason), A. 切克 (A. Ciecko), D. S. 帕基希 (D. S. Parksey), E. 布莱尔 (E. Blair), H. 希同 (H. Cittone), E. B. 克拉克 (E. B. Clark), M. D. 科顿 (M. D. Cotton), T. R. 乌特贝克 (T. R. Utterback), H. 霍瑞 (H. Khouri), 秦宏 (H. Qin), J. 范马特凡 (J. Vamathevan), J. 吉尔 (J. Gill), V. 斯嘉拉多 (V. Scarlato), V. 玛斯格纳尼 (V. Masignani), M. 比萨 (M. Pizza), G. 格兰蒂 (G. Grandi), 孙雷 (L. Sun), H. O. 史密斯 (H. O. Smith), C. M. 福莱舍 (C. M. Fraser), E. R. 莫克森 (E. R. Moxon), R. 拉泊利 (R. Rappuoli), 和 J. C. 芬特 (J. C. Venter). 2000. 脑膜炎奈瑟菌血清群 B 菌株 MC58 的全基因组序列 (Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58). *科学 (Science)* 287(5459):1809-15.

89. 托-特哈特 H. (Ton-That, H.), 刘广 (G. Liu), S. K. 马兹马尼安 (S. K. Mazmanian), K. F. 法乌尔 (K. F. Faull), 和 O. 施涅温 (O. Schneewind). 1999. 在 LPXTG 主结构裂解金黄色葡萄球菌表面蛋白的转肽酶分类酶的纯化和表征 (Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif). *美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A)*. 96:12424-12429.

90. 冯海因里奇 G. (von Heinje, G.) 1987. 分子生物学中的序列分析 (Sequence Analysis in Molecular Biology). 学术出版社 (Academic Press), 纽约 (New York).

91. 文丁 K. (Weldingh, K.), I. 罗森兰德斯 (I. Rosenkrands), S. 杰科布森 (S. Jacobsen), P. B. 拉斯姆森 (P. B. Rasmussen), M. J. 埃尔希 (M. J. Elhay), 和 P. 安德森 (P. Andersen). 1998. 用于分析结核分枝杆菌培养物滤出液的二维电泳和六种新颖蛋白质的纯化和表征 (Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins). *感染免疫学 (Infect Immun.)* 66:3492-500.

92. 沃尔夫 (Wolff) 等人 1990. *科学 (Science)*. 247, 1465-1468.

93. 植竹 T. (Yutsudo, T.), K. 奥村 (K. Okumura), M. 岩崎 (M. Iwasaki), A. 原 (A. Hara), S. 神谷 (S. Kamitani), W. 南出 (W. Minamide), H. 五十岚 (H. Igarashi), 和 Y. 木通 (Y. Hinuma). 1994. 化脓链球菌菌株中编码新颖促有丝分裂因子的基因仅分布在 A 群链球菌中 (The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is

distributed only in group A streptococci). *传染和免疫学 (Infection and Immunity)*. 62:4000-4004。

94. 捷库尔斯基 R.J. (Zagursky, R.J.) 和 D.拉塞尔 (Russell). 2001. 生物信息学：在细菌疫苗发现中的用途 (Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery). *生物技术 (BioTechniques)*. 31:636-659。

现充分描述本发明，对于所属领域的一般技术人员将显而易见，在不悖离本文中所描述的本发明的精神或范围的情况下可对其作出许多改变和修改。上文描述本发明的优选实施例以及许多可能替代形式。然而，这些实施例仅出于举例的目的且本发明不受其限制。

<110> 惠氏公司

<120> 用于预防和治疗脑膜炎球菌疾病的新颖免疫原性组合物

<130> AM102485

<150> 60/876,486

<151> 2006-12-22

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 786

<212> DNA

<213> 奈瑟菌

<400> 1

```

tgcagcagcg gaggcggcgg aagcggaggc ggcggtgtcg ccgccgacat cggcacgggg      60
cttgccgatg cactaactgc gccgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca      120
ttggaagact ctattcccca aaacggaaca ctaaccctgt cggcacaagg tgcggaaaaa      180
actttcaaag ccggcgacaa agacaacagc ctcaacacgg gcaaactgaa gaacgacaaa      240
atcagccgct tcgactttgt gcaaaaaatc gaagtggacg gacaaaccat cacgctggca      300
agcggcgaat ttcaaata caaacaggac cactccgccg tcgttgccct acagattgaa      360
aaaatcaaca accccgacaa aatcgacagc ctgataaacc aacgctcctt ccttgtcagc      420
ggtttgggcg gagaacatac cgccttcaac caactgcccg gcggcaaagc cgagtatcac      480
ggcaaagcat tcagctccga cgacccgaac ggagggctgc actactccat tgattttacc      540
aaaaaacagg gttacggcag aatcgaacac ctgaaaacac ccgagcaaaa tgtcgagctt      600
gcctccgccg aactcaaagc agatgaaaaa tcacacgccg tcattttggg cgacacgcgc      660
tacggcagcg aagaaaaagg cacttaccac ctgcaccttt tcggcgaccg cgcccaagaa      720
atcgccggct cggcaaccgt gaagataggg gaaaagggtc acgaaatcgg catcgccggc      780
aaacag                                           786

```

<210> 2

<211> 262

<212> PRT

<213> 奈瑟菌

<400> 2

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala 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 Pro Gln Asn
 35 40 45
 Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
 50 55 60
 Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr
 85 90 95
 Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser
 100 105 110
 Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile
 115 120 125
 Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
 130 135 140
 Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr His
 145 150 155 160
 Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser
 165 170 175
 Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
 180 185 190
 Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp
 195 200 205
 Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
 210 215 220

Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
245 250 255

Gly Ile Ala Gly Lys Gln
260

<210> 3
<211> 792
<212> DNA
<213> 奈瑟菌

<400> 3
tgcggatcca gcagcggagg cggcggaagc ggaggcggcg gtgtcgccgc cgacatcggc 60
acggggccttg ccgatgcact aactgcgccg ctcgaccata aagacaaagg tttgaaatcc 120
ctgacattgg aagactctat tccccaaaac ggaacactaa ccctgtcggc acaaggtgcg 180
gaaaaaactt tcaaagccgg cgacaaagac aacagcctca acacgggcaa actgaagaac 240
gacaaaatca gccgcttcga ctttgtgcaa aaaatcgaag tggacggaca aaccatcacg 300
ctggcaagcg gcgaatttca aatatacaaa caggaccact ccgccgtcgt tgccctacag 360
attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc gacagcctga taaaccaacg ctccttcctt 420
gtcagcgggtt tgggcggaaga acataaccgcc ttcaaccaac tgcccggcgg caaagccgag 480
tatcacggca aagcattcag ctccgacgac ccgaacggca ggctgcacta ctccattgat 540
tttaccaaaa aacaggggta cggcagaatc gaacacctga aaacacccga gcaaaatgtc 600
gagcttgctt ccgccgaact caaagcagat gaaaaatcac acgccgtcat tttgggcgac 660
acgcgctacg gcagcgaaga aaaaggcact taccacctcg cccttttcgg cgaccgcgcc 720
caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag ataggggaaa aggttcacga aatcggcatc 780
gccggcaaac ag 792

<210> 4
<211> 263
<212> PRT
<213> 奈瑟菌

<400> 4

Cys Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala
1 5 10 15

Asp Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His
 20 25 30

Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln
 35 40 45

Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys
 50 55 60

Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln
 85 90 95

Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His
 100 105 110

Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys
 115 120 125

Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly
 130 135 140

Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr
 145 150 155 160

His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr
 165 170 175

Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu
 180 185 190

Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala
 195 200 205

Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser
 210 215 220

Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln
 225 230 235 240

Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu
245 250 255

Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
260

<210> 5
<211> 786
<212> DNA
<213> 奈瑟菌

<400> 5
atgagcagcg gaggcggcgg aagcggaggg ggcggtgtcg ccgccgacat cggcacgggg 60
cttgccgatg cactaactgc gccgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca 120
ttggaagact ctattcccca aaacggaaca ctaaccctgt cggcacaagg tgcggaaaaa 180
actttcaaag ccggcgacaa agacaacagc ctcaacacgg gcaaactgaa gaacgacaaa 240
atcagccgct tcgactttgt gcaaaaaatc gaagtggacg gacaaaccat cacgctggca 300
agcggcgaat ttcaaataa caaacaggac cactccgccc tcgttgccct acagattgaa 360
aaaatcaaca accccgacaa aatcgacagc ctgataaacc aacgctcctt ccttgtcagc 420
ggtttgggcg gagaacatac cgccttcaac caactgcccg gcggcaaagc cgagtatcac 480
ggcaaagcat tcagctccga cgacccgaac ggcaggctgc actactccat tgattttacc 540
aaaaaacagg gttacggcag aatcgaacac ctgaaaacac ccgagcaaaa tgcgagctt 600
gcctccgccc aactcaaagc agatgaaaaa tcacacgccg tcattttggg cgacacgcgc 660
tacggcagcg aagaaaaagg cacttaccac ctgcgccctt tcggcgaccg cgcccaagaa 720
atcgccggct cggcaaccgt gaagataggg gaaaagggtt acgaaatcgg catcgccggc 780
aaacag 786

<210> 6
<211> 262
<212> PRT
<213> 奈瑟菌

<400> 6

Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala 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 Pro Gln Asn
 35 40 45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
 50 55 60

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr
 85 90 95

Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser
 100 105 110

Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile
 115 120 125

Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
 130 135 140

Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr His
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser
 165 170 175

Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
 180 185 190

Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp
 195 200 205

Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
 210 215 220

Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
 225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
 245 250 255

Gly Ile Ala Gly Lys Gln
260

<210> 7
<211> 792
<212> DNA
<213> 奈瑟菌

<400> 7
tgcagcagcg gaggcggcgg aagcggaggc ggcggtgtcg ccgccgacat cggcgcgggg 60
cttgccgatg cactaacgc accgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca 120
ttggaagact ccatttccca aaacggaaca ctgaccctgt cggcacaagg tgcggaaaga 180
actttcaaag ccggcgacaa agacaacagt ctcaacacag gcaaactgaa gaacgacaaa 240
atcagccgct tcgactttat ccgtcaaatc gaagtggacg ggcagctcat taccttgag 300
agcggagagt tccaagtgtg caaacaagc cattccgcct taaccgcct tcagaccgag 360
caagtacaag actcggagca ttccgggaag atggttgca aacgccagtt cagaatcggc 420
gacatagtgg gcgaacatac atcttttgac aagcttccca aagacgtcat ggcgacatat 480
cgcgggacgg cgttcggttc agacgatgcc ggcgaaaac tgacctacac catagatttc 540
gccgccaagc agggacacgg caaaatcgaa ctttgaaat cgctgaact caatgttgac 600
ctggccgccc ccgatatcaa gccgatgaa aaacaccatg ccgtcatcag cggttccgtc 660
ctttacaacc aagccgagaa aggcagttac tctctaggca tctttggcgg gcaagcccag 720
gaagttgccg gcagcgcgga agtggaacc gcaaacggca tacgccatat cgggtcttgcc 780
gccaagcaat aa 792

<210> 8
<211> 263
<212> PRT
<213> 奈瑟菌

<400> 8
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1 5 10 15
Ile Gly Ala 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 Arg Thr Phe Lys Ala
50 55 60

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu
85 90 95

Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser
100 105 110

Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser
115 120 125

Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly
130 135 140

Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
165 170 175

Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
180 185 190

Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro
195 200 205

Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln
210 215 220

Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln
225 230 235 240

Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His
245 250 255

Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
260

<210> 9
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> 奈瑟菌

<400> 9
 tgcggatcca gcagcggagg cggcggaagc ggaggcggcg gtgtcgccgc cgacatcggc 60
 gcggggcttg ccgatgcaact aaccgcaccg ctcgaccata aagacaaagg tttgaaatcc 120
 ctgacatttg aagactccat ttcccaaaac ggaacactga ccctgtcggc acaaggtgcg 180
 gaaagaactt tcaaagccgg cgacaaagac aacagtctca acacaggcaa actgaagaac 240
 gacaaaatca gccgcttcga ctttatccgt caaatcgaag tggacgggca gctcattacc 300
 ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag 360
 accgagcaag tacaagactc ggagcattcc gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga 420
 atcggcgaca tagtgggcca acatacatct tttgacaagc ttcccaaaga cgtcatggcg 480
 acatatcgcg ggacggcggt cggttcagac gatgccggcg gaaaactgac ctacaccata 540
 gatttcgccg ccaagcaggg acacggcaaa atcgaacatt tgaaatcgcc tgaactcaat 600
 gttgacctgg ccgccgccga tatcaagccg gatgaaaaac accatgccgt catcagcggc 660
 tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc agttactctc taggcatctt tggcgggcaa 720
 gccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg gaaaccgcaa acggcatacg ccatatcggt 780
 cttgccgcca agcaataa 798

<210> 10
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 奈瑟菌

<400> 10

Cys Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala
 1 5 10 15

Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His
 20 25 30

Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln
 35 40 45

Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Arg Thr Phe Lys
 50 55 60

Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
85 90 95

Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
100 105 110

Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His
115 120 125

Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val
130 135 140

Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
165 170 175

Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His
180 185 190

Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
195 200 205

Pro Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
210 215 220

Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala
225 230 235 240

Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg
245 250 255

His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
260

<210> 11

<211> 792

<212> DNA

<213> 奈瑟菌

```

<400> 11
atgagcagcg gaggcggcgg aagcggaggg ggcggtgtcg ccgccgacat cggcgcgggg 60

cttgccgatg cactaaccgc accgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca 120

ttggaagact ccatttccca aaacggaaca ctgaccctgt cggcacaagg tgcggaaaga 180

actttcaaag cgggcgacaa agacaacagt ctcaacacag gcaaactgaa gaacgacaaa 240

atcagccgct tcgactttat ccgtcaaadc gaagtggacg ggcagctcat taccttggag 300

agcggagagt tccaagtgtg caaacaagc cattccgcct taaccgccct tcagaccgag 360

caagtacaag actcggagca ttccgggaag atggttgcca aacgccagtt cagaatcggc 420

gacatagtgg gcgaacatac atcttttgac aagcttccca aagacgtcat ggcgacatat 480

cgcgggacgg cgttcggttc agacgatgcc ggcggaaaac tgacctacac catagatttc 540

gccgccaagc agggacacgg caaaatcgaa catttgaaat cgcctgaact caatgttgac 600

ctggccgcgg ccgatatcaa gccggatgaa aaacaccatg ccgtcatcag cggttccgtc 660

ctttacaacc aagccgagaa aggcagttac tctctaggca tctttggcgg gcaagcccag 720

gaagttgccg gcagcgcgga agtggaacc gcaaacggca tacgccatat cggctcttggc 780

gccaagcaat aa 792

```

```

<210> 12
<211> 263
<212> PRT
<213> 奈瑟菌

```

```

<400> 12

```

```

Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1          5          10          15

```

```

Ile Gly Ala 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 Arg Thr Phe Lys Ala
          50          55          60

```

```

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
65          70          75          80

```

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu
 85 90 95

Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser
 100 105 110

Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser
 115 120 125

Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly
 130 135 140

Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr
 145 150 155 160

Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
 165 170 175

Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
 180 185 190

Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro
 195 200 205

Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln
 210 215 220

Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln
 225 230 235 240

Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His
 245 250 255

Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 260

未吸附TMAE部分中组份的鉴别：肽的SDS-PAGE分离

(对未吸附TMAE部分进行CNBr裂解，
接着进行SDS-PAGE且对来自PVDF印迹的片段进行N末端测序)

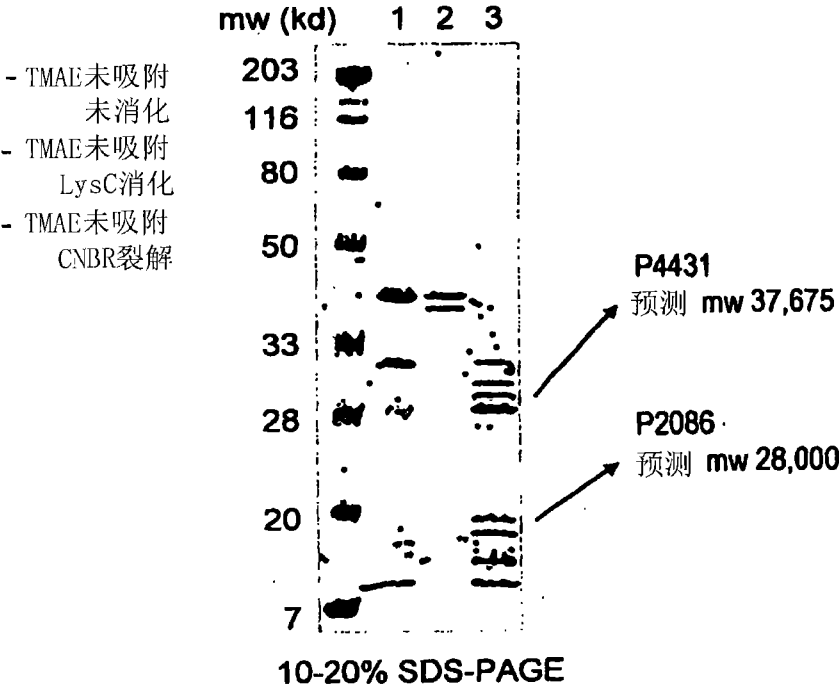


图1A

未吸附TMAE部分中组份的鉴别：肽的逆相分离

对未吸附TMAE部分进行酶促消化，
接着进行肽的逆相色谱分离和直接N末端测序

酶促消化	肽的滞留时间 (min)	肽的分子量(d)	N末端 ID
GluC (V8)	6.716	2069.7	P5163
LysC	13.800	3351.2	P4431
LysC	13.800	3351.2	P2086
ArgC	6.860	2278.9	P5163

P4431
预测mw 36,775

P2086
预测mw 27,100

P5163
预测mw 7,081

图1B

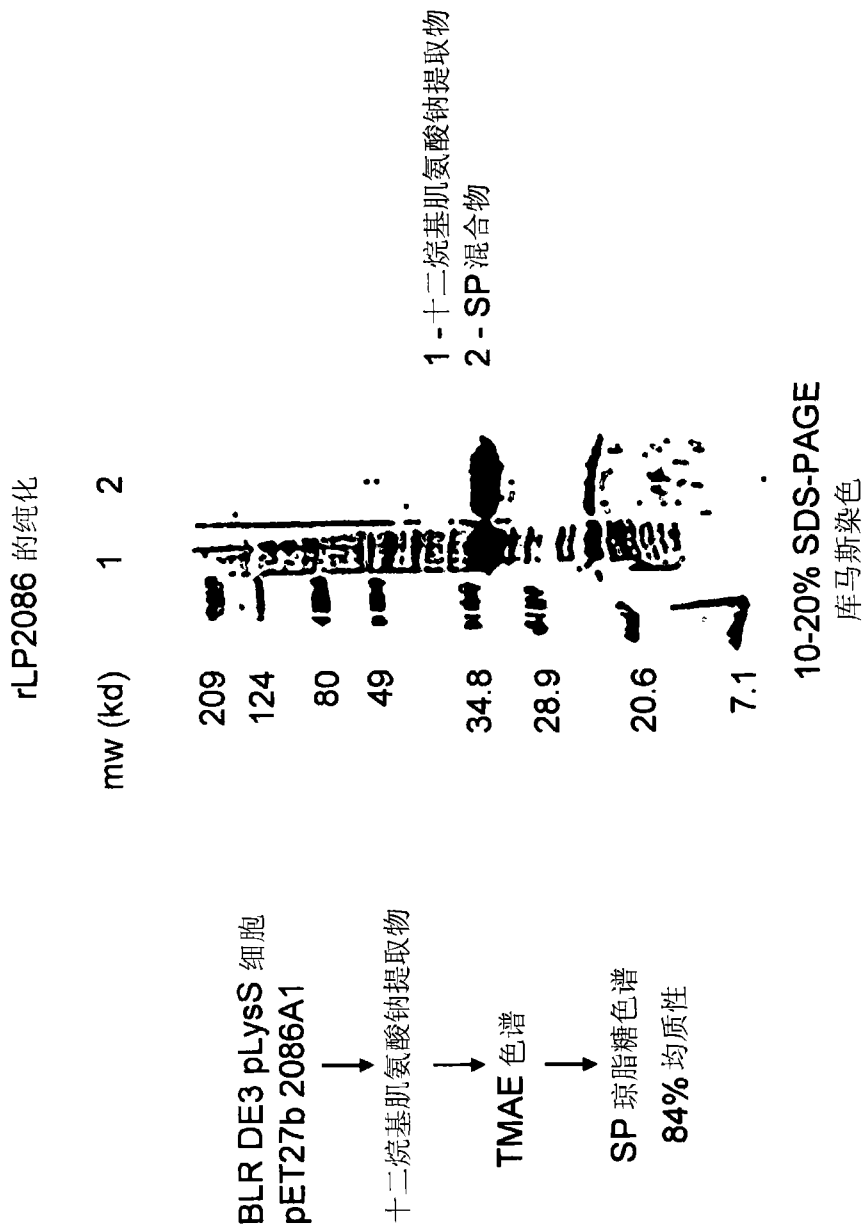


图2

未吸附TMAE部分中组份的鉴别：LC-MS/MS

接着进行凝胶切取，
蛋白水解消化和LC-MS/MS分析(液体色谱联合质谱法)

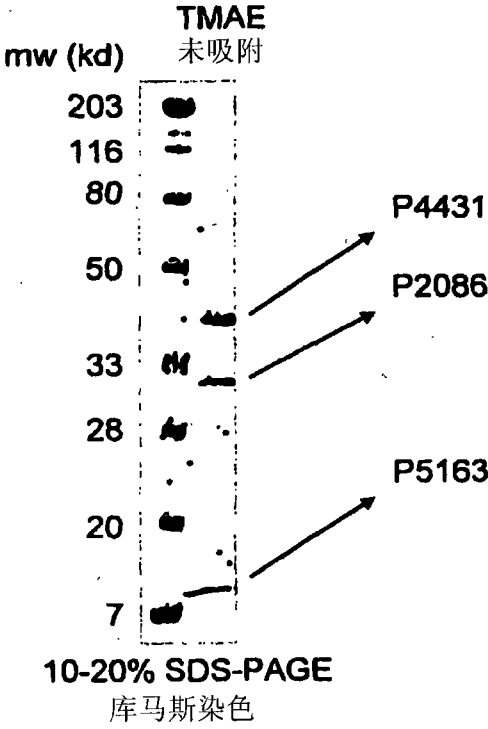


图3

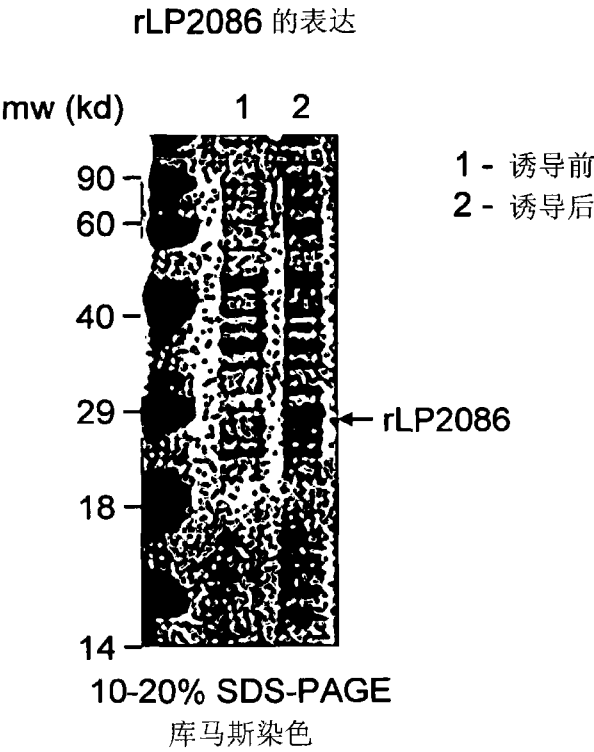


图4

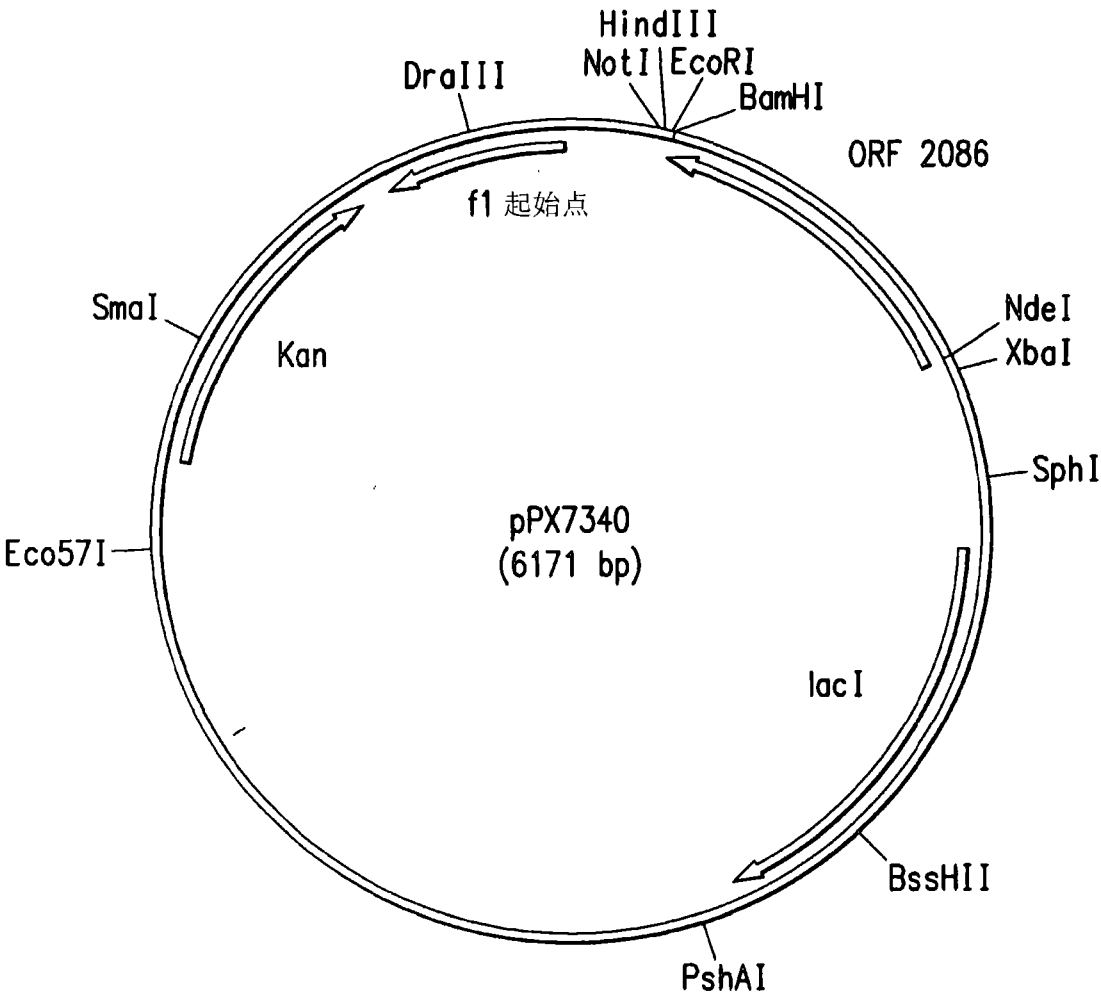


图5

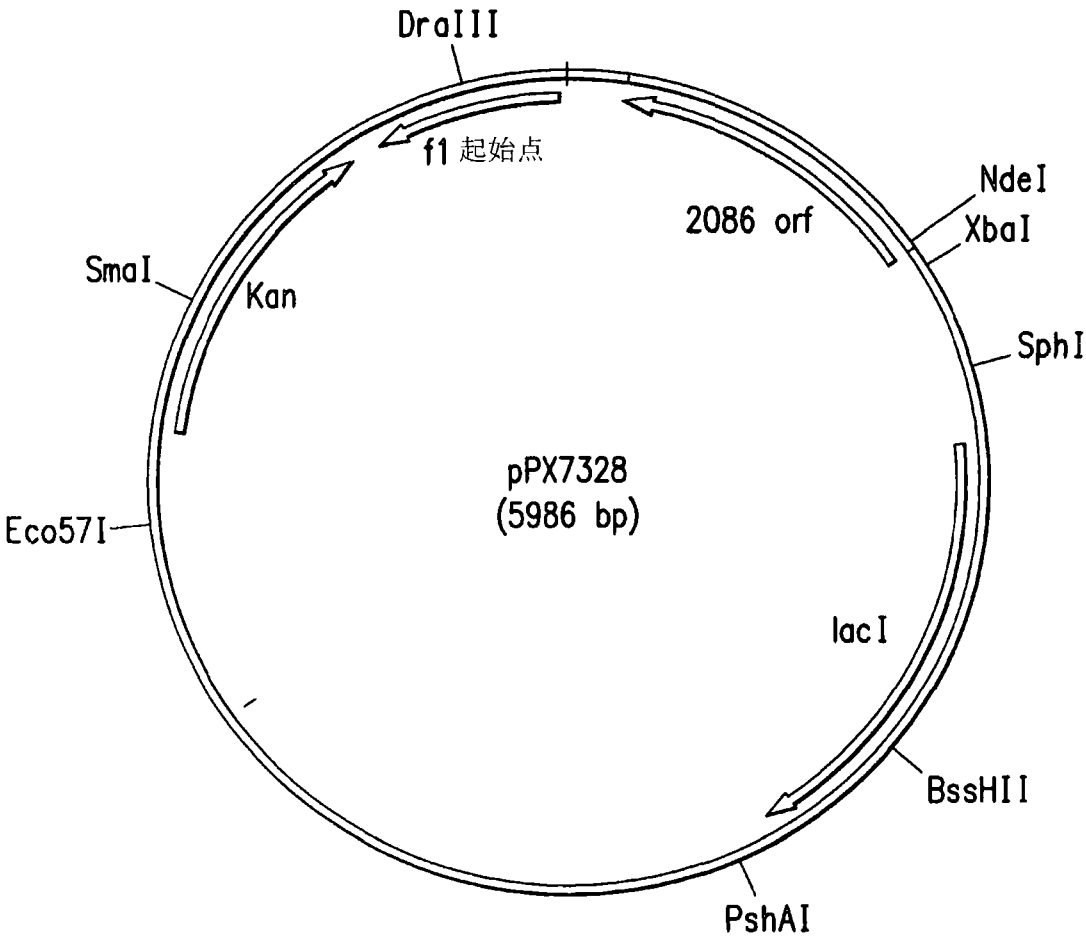


图6

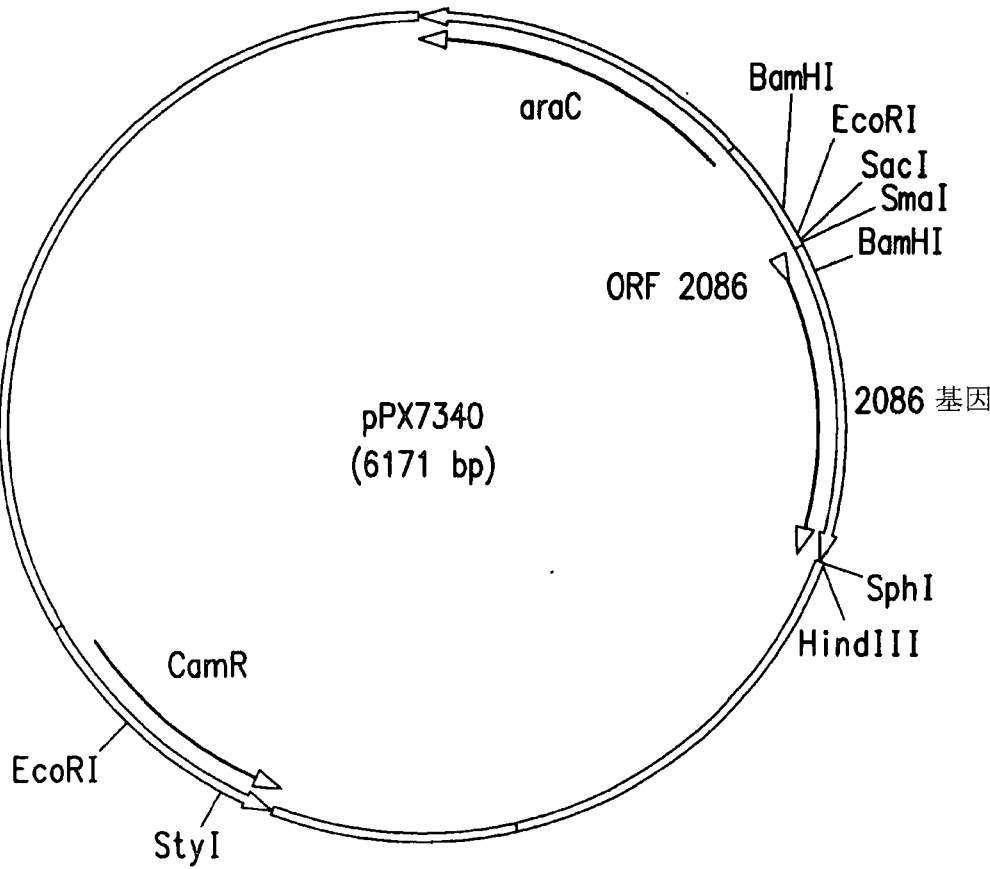


图7

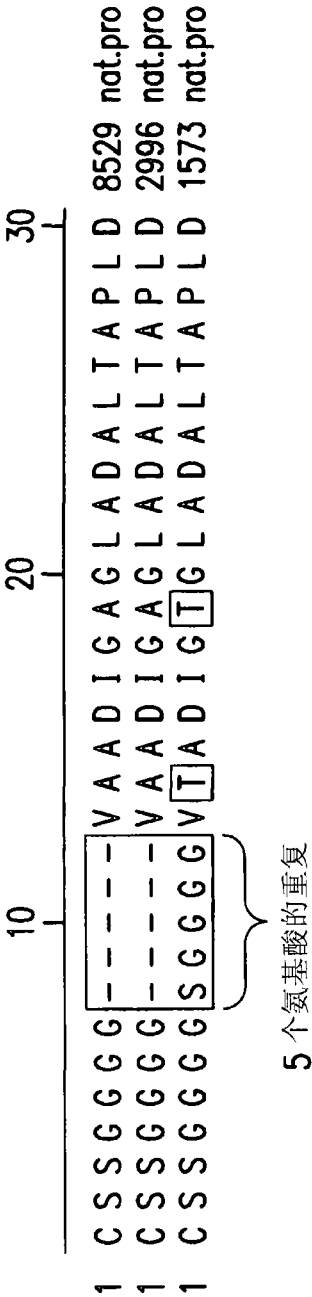


图8

Nm菌株8529中的免疫原性组份的鉴别

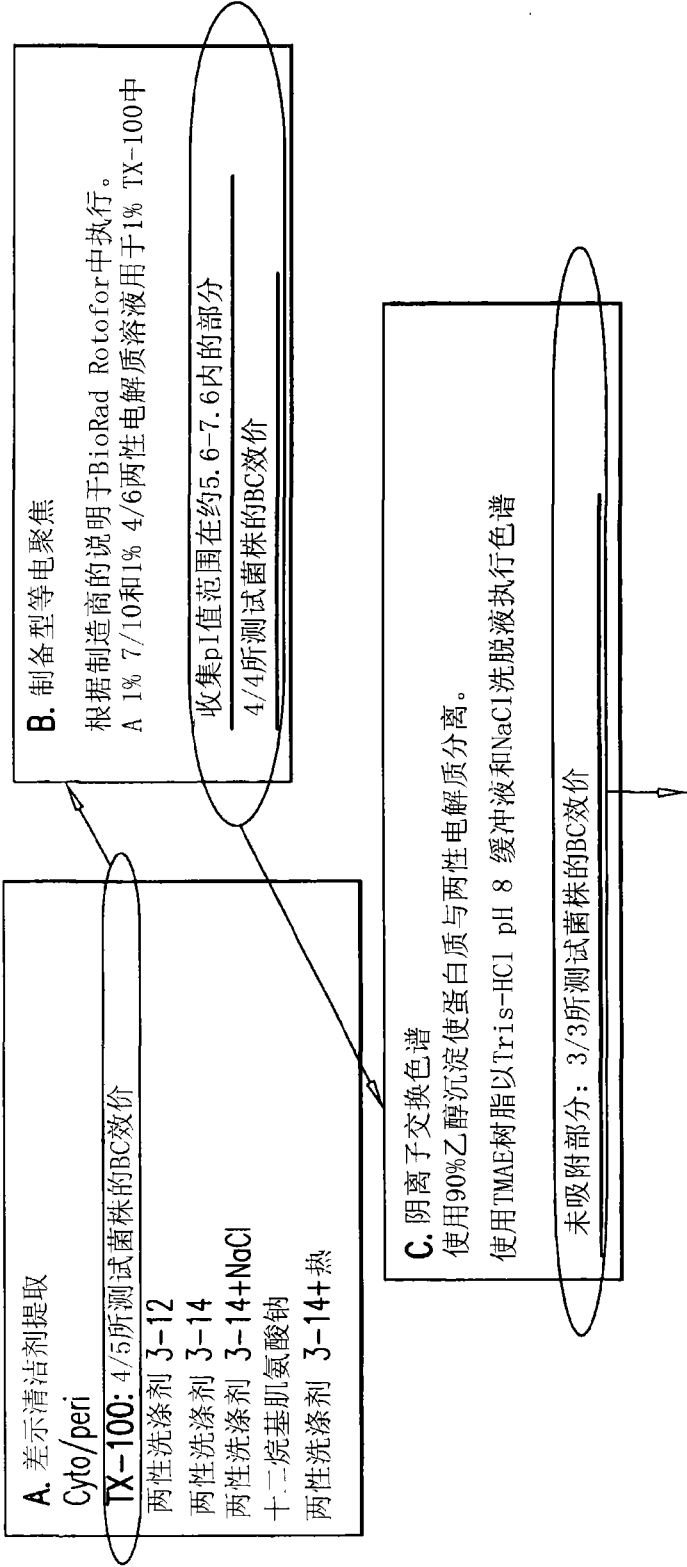


图9A

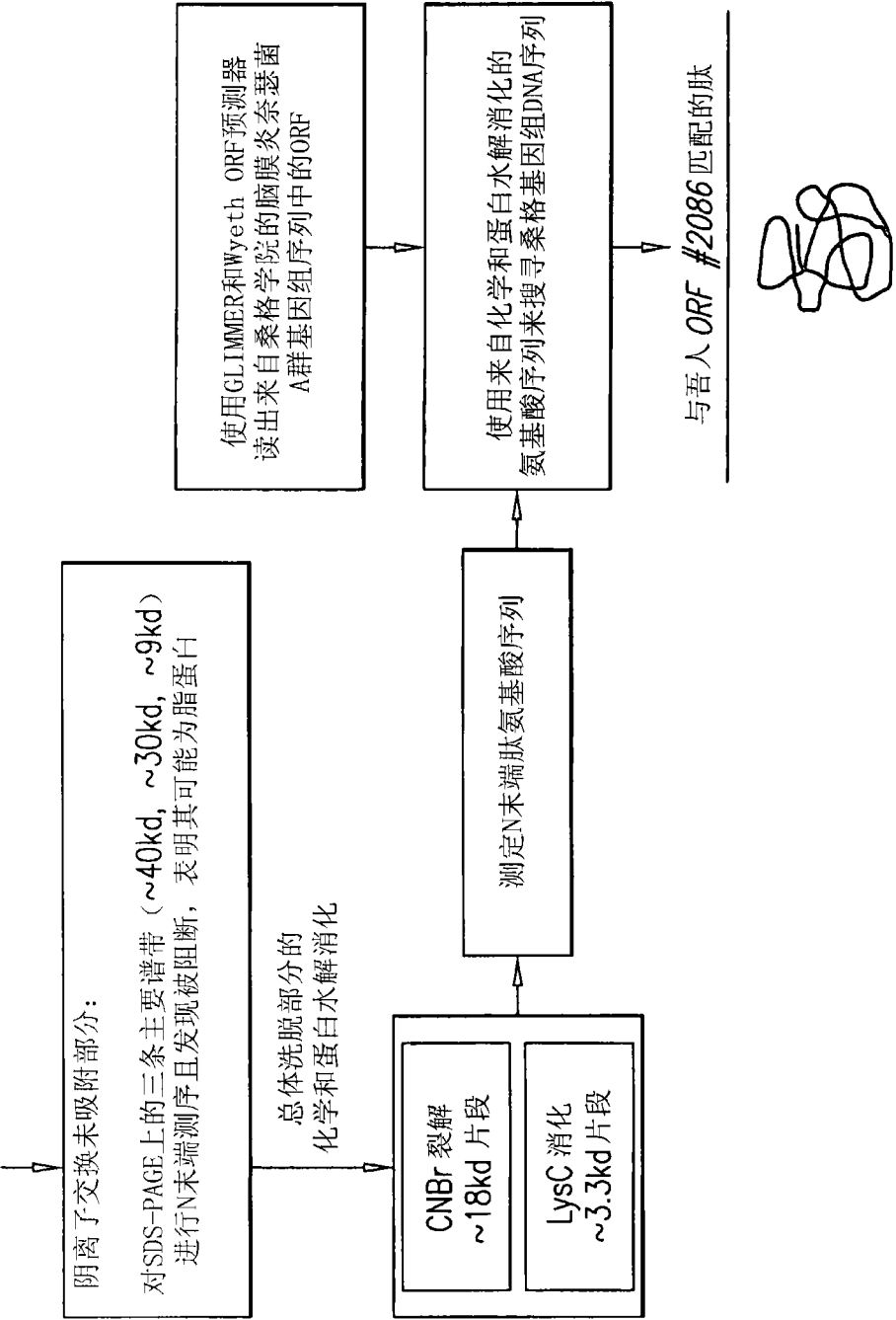
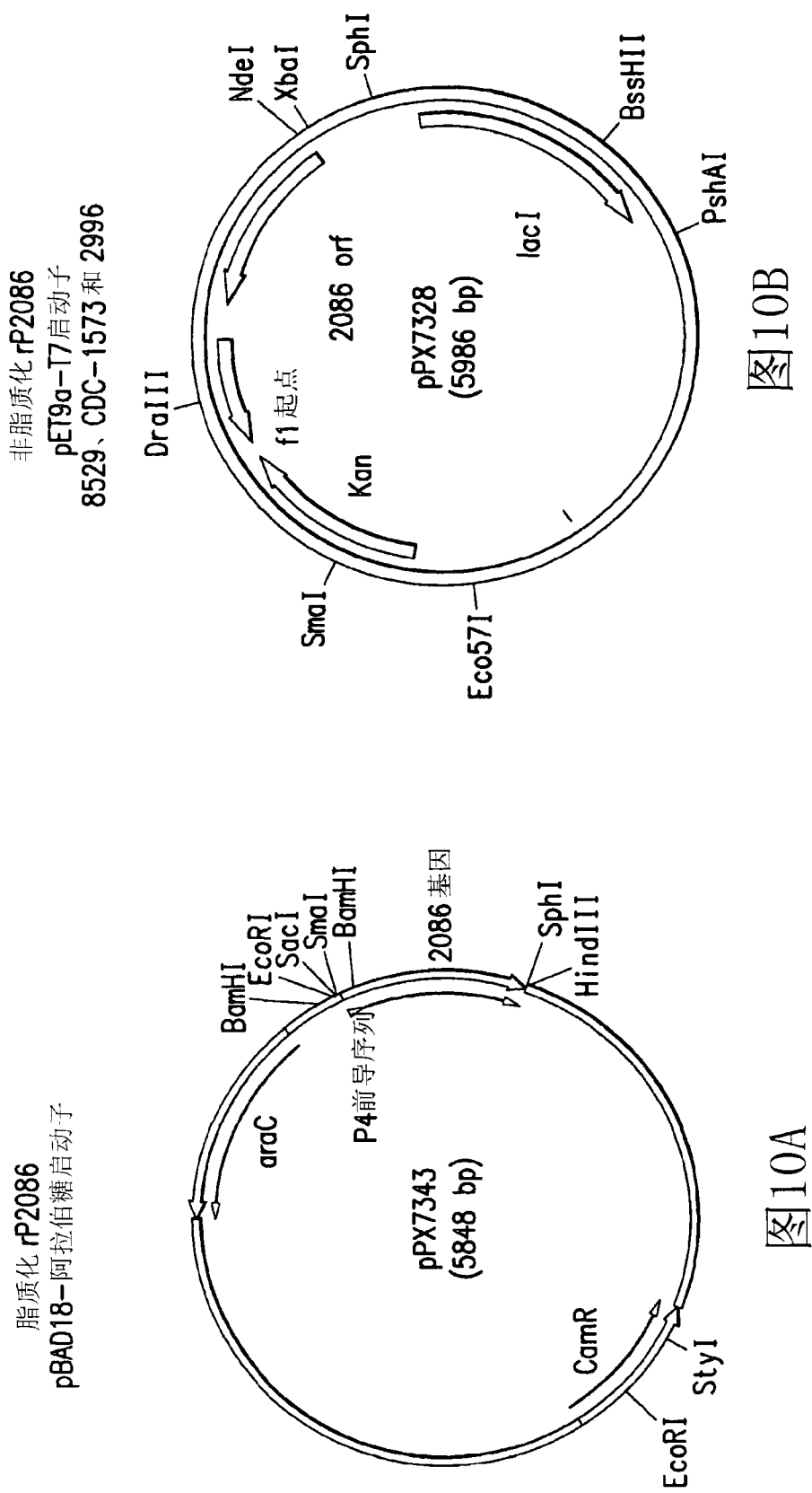


图9B



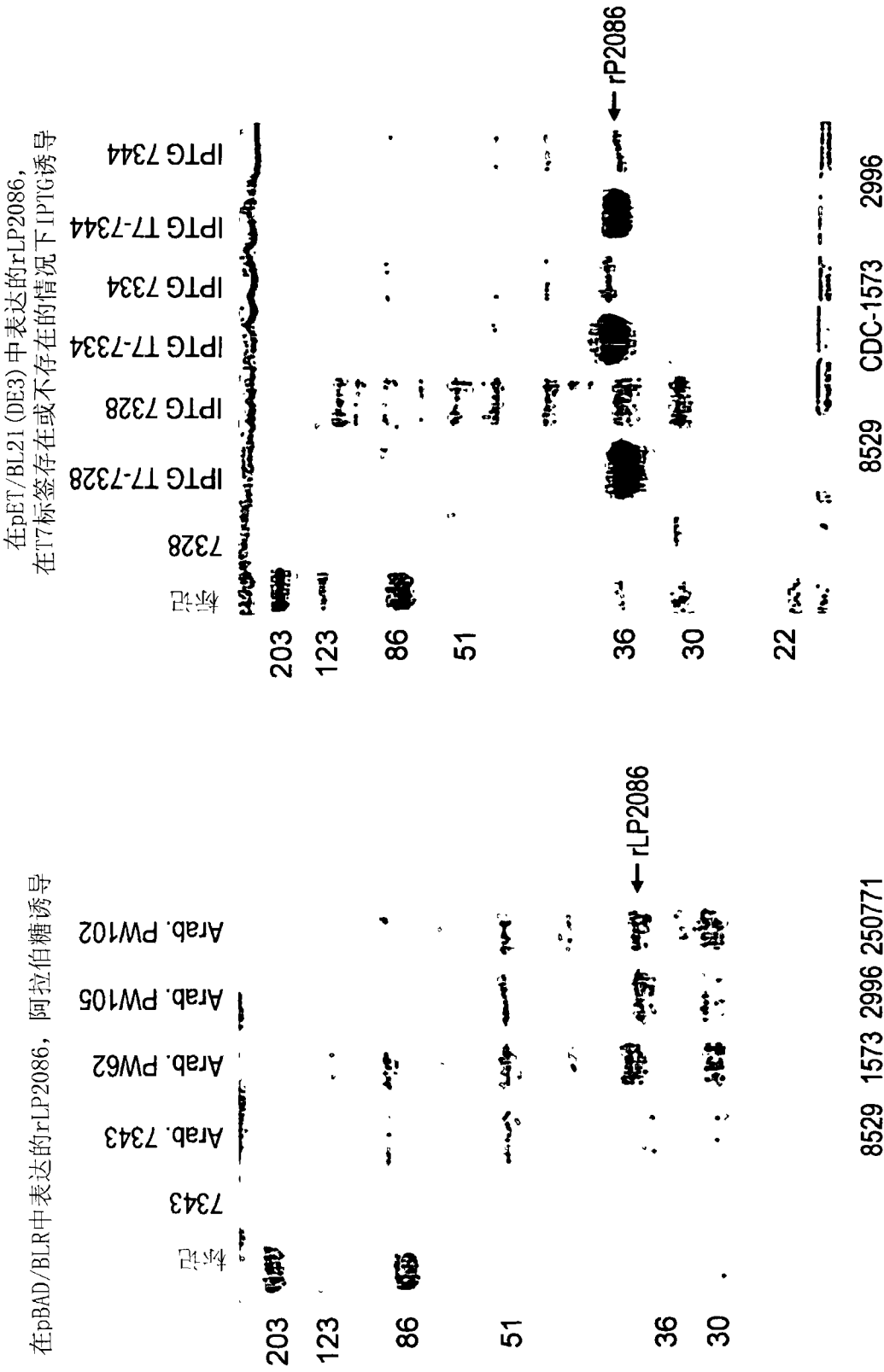


图11A

图11B

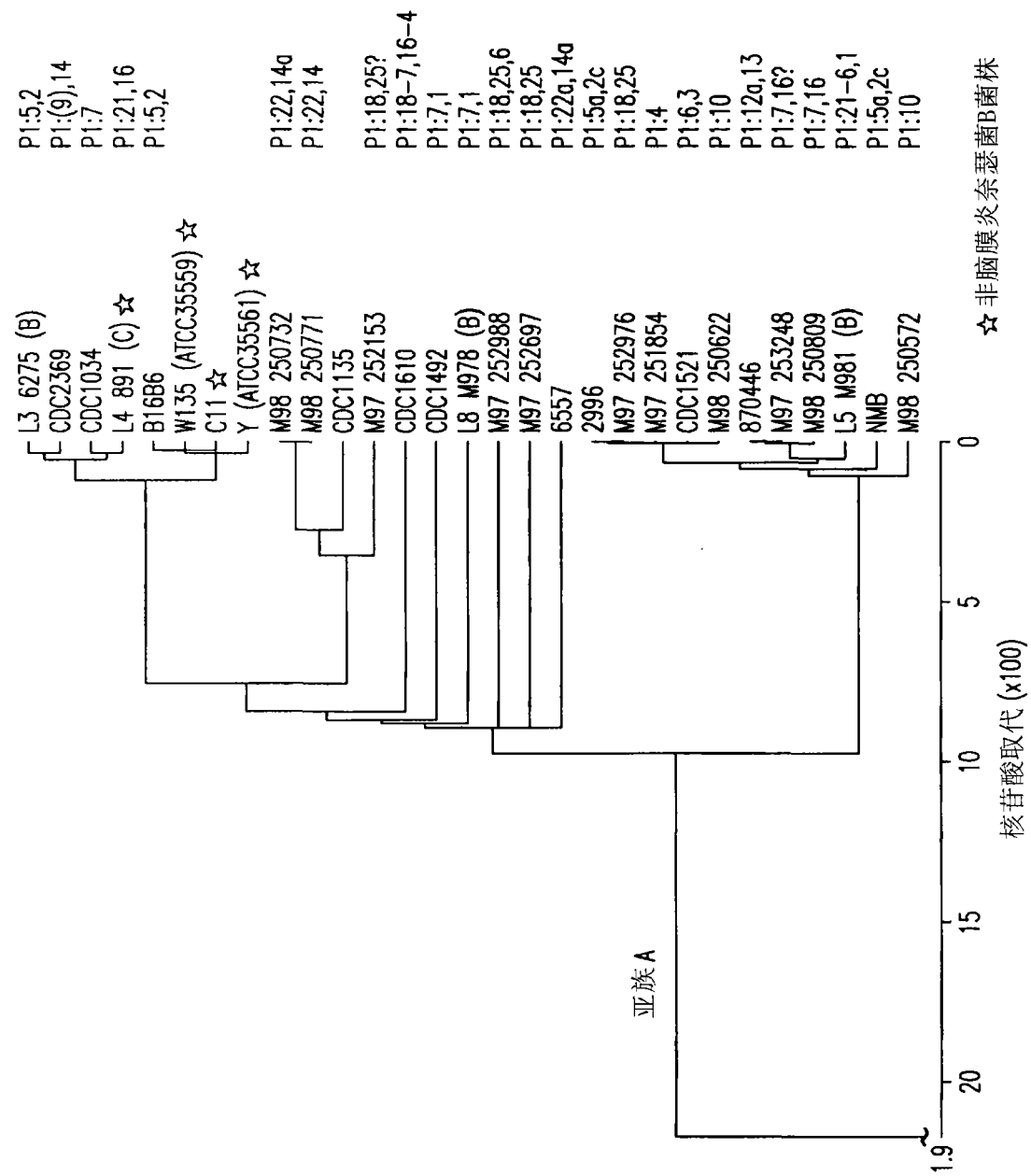


图12A

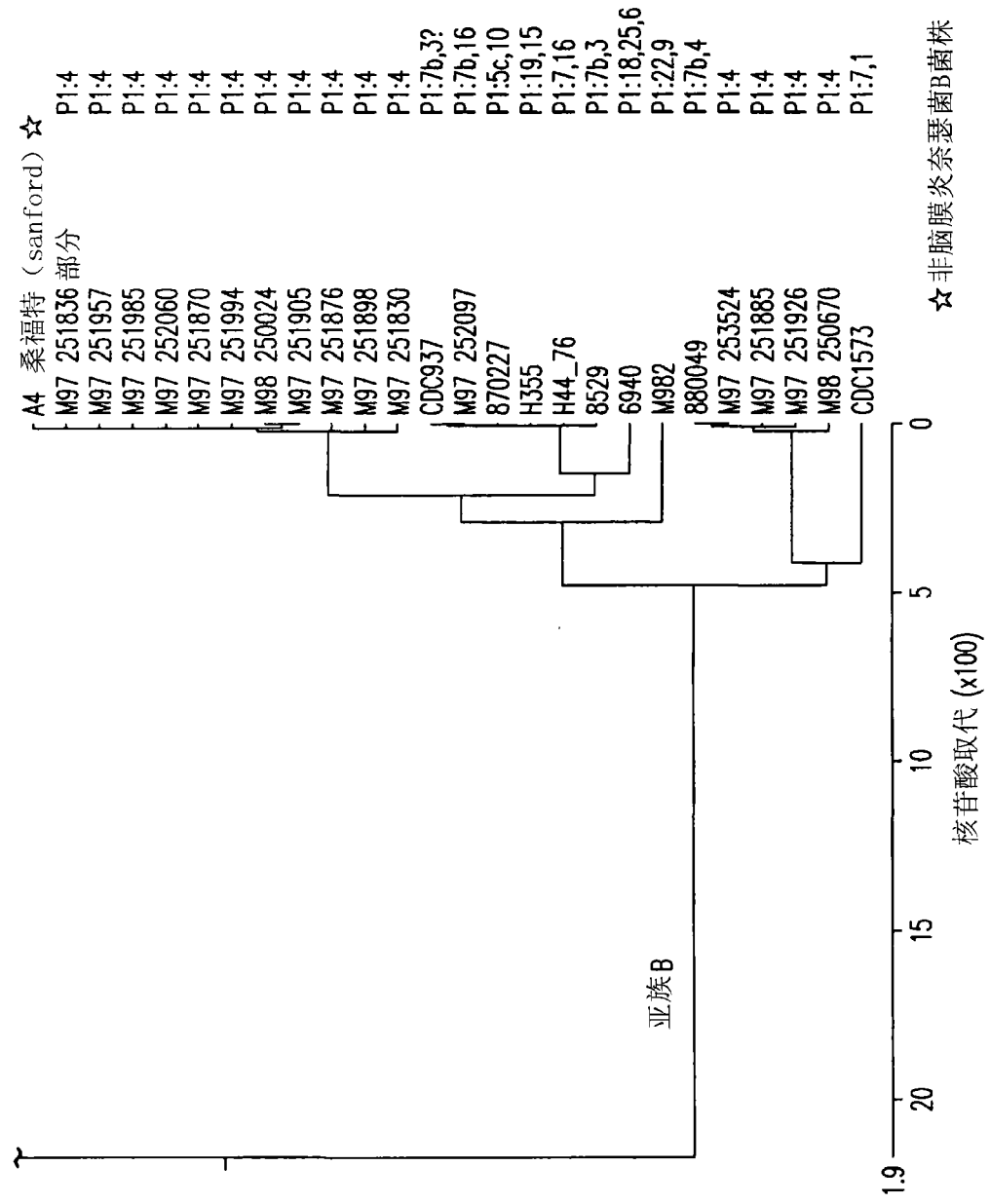


图12B

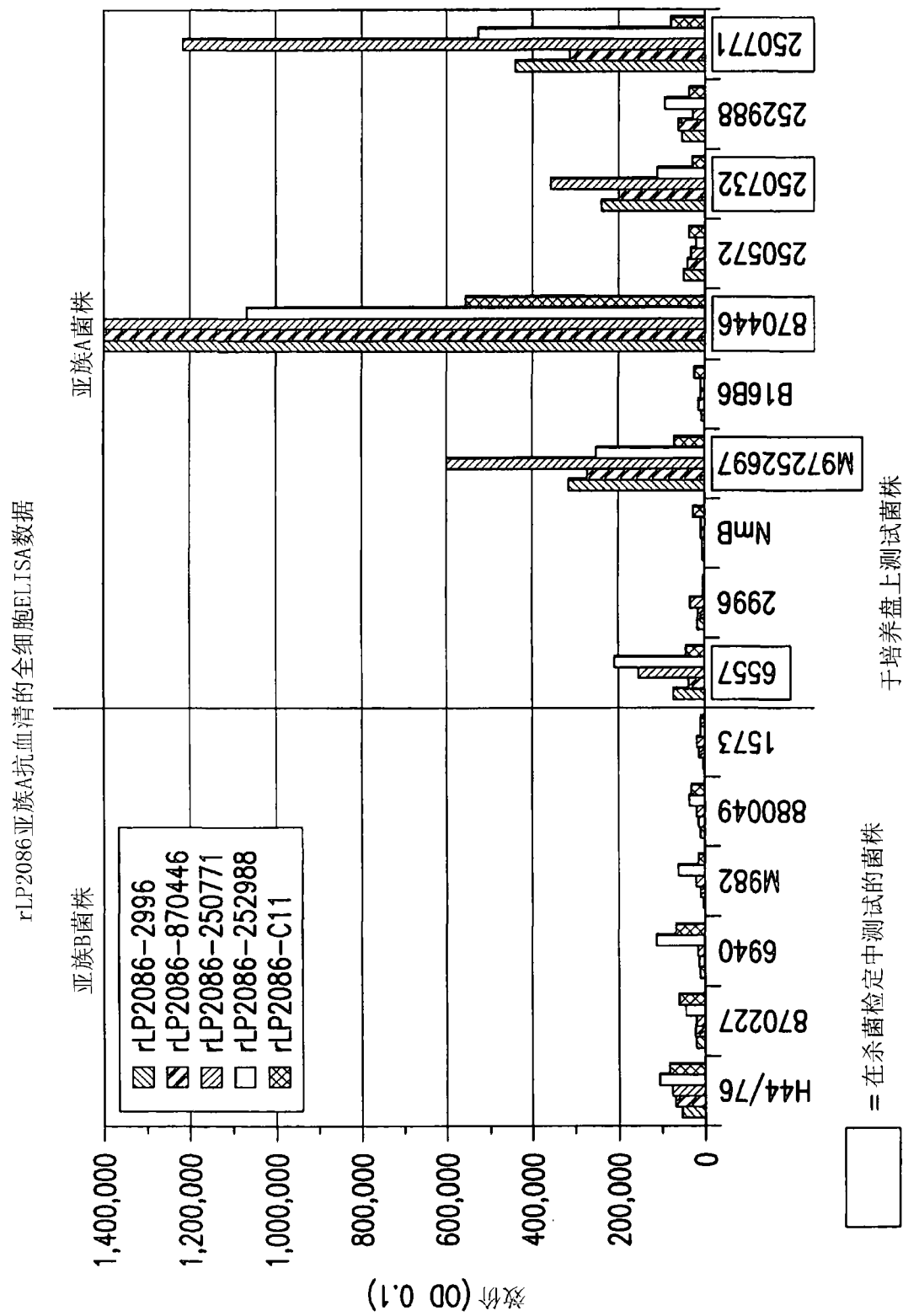


图13

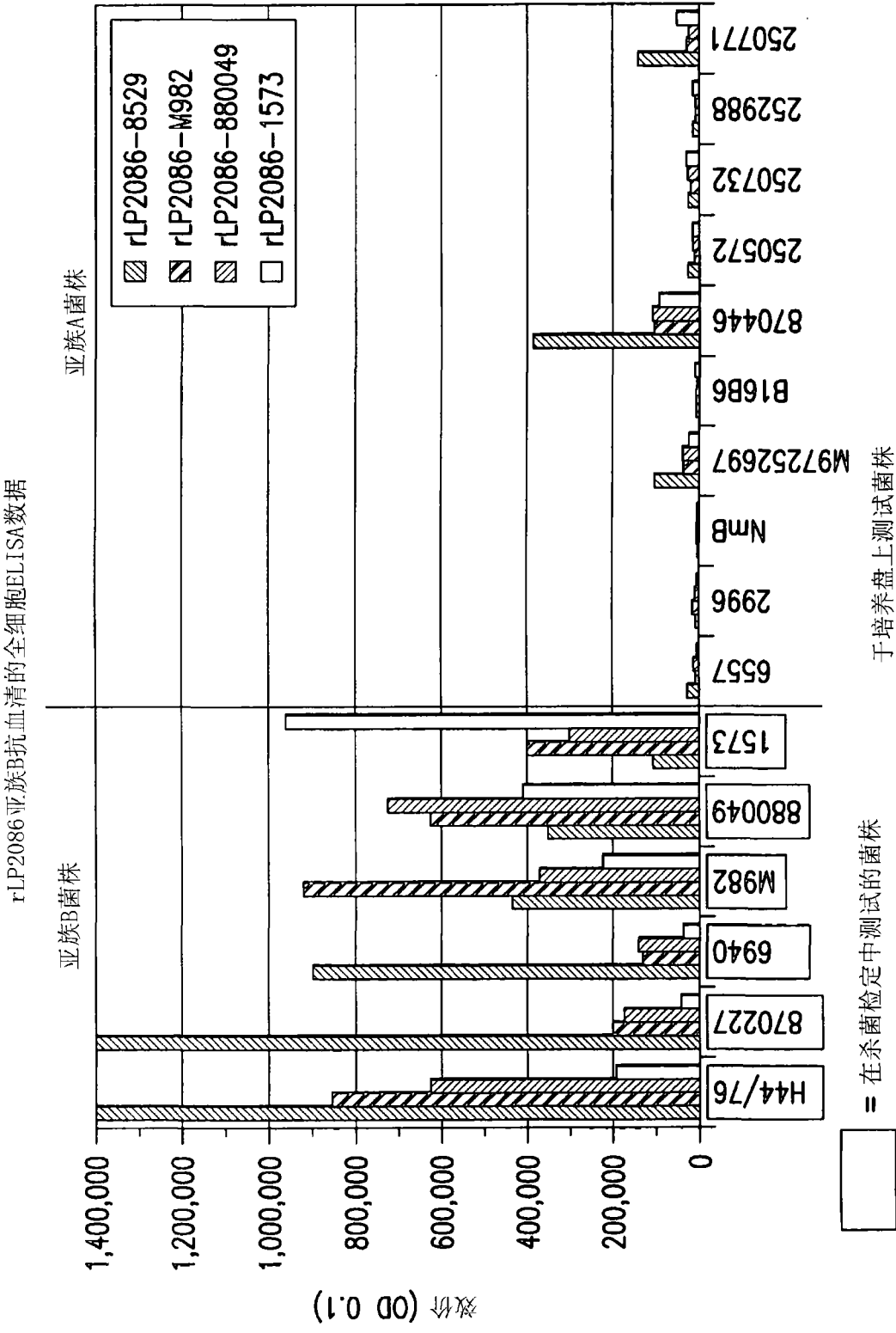
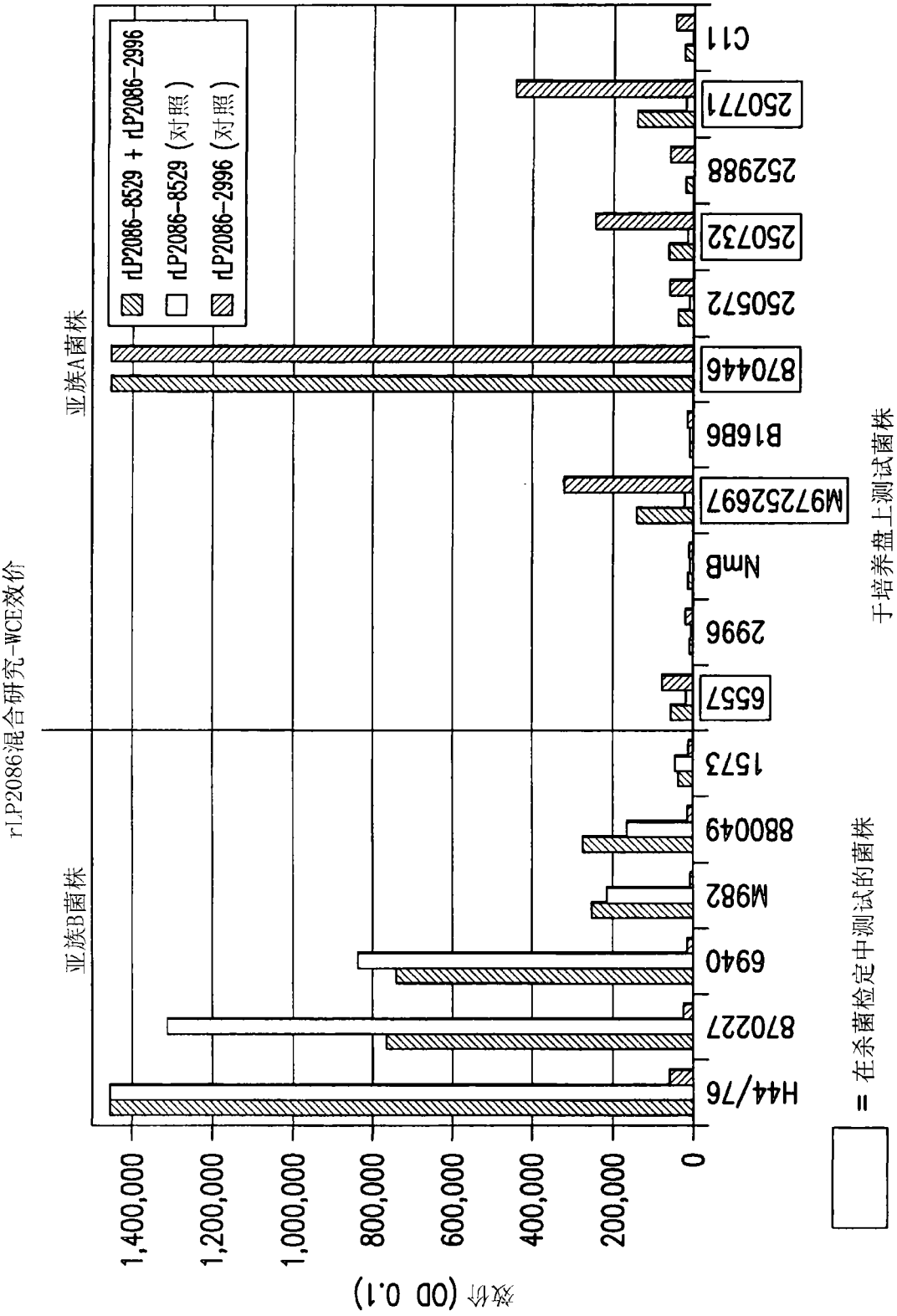
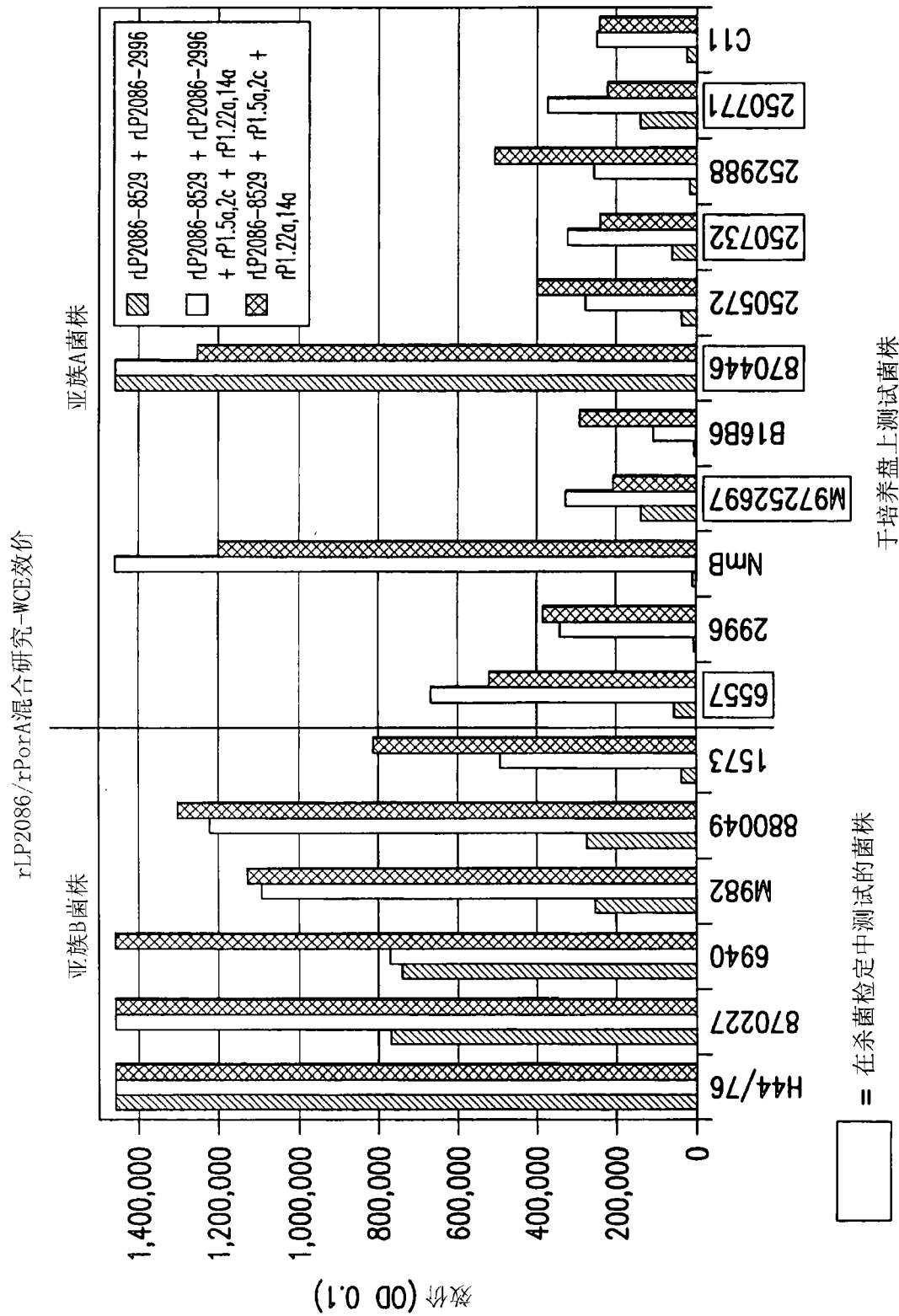


图14





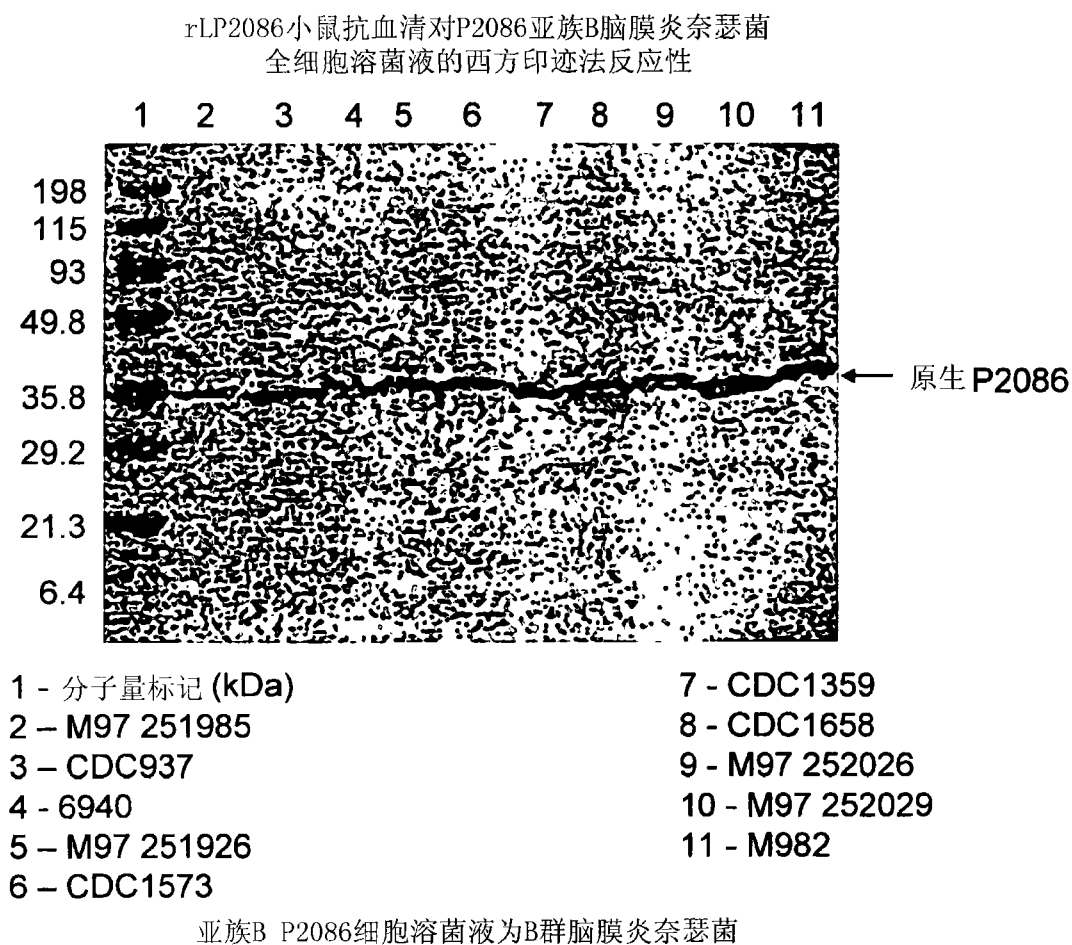


图17

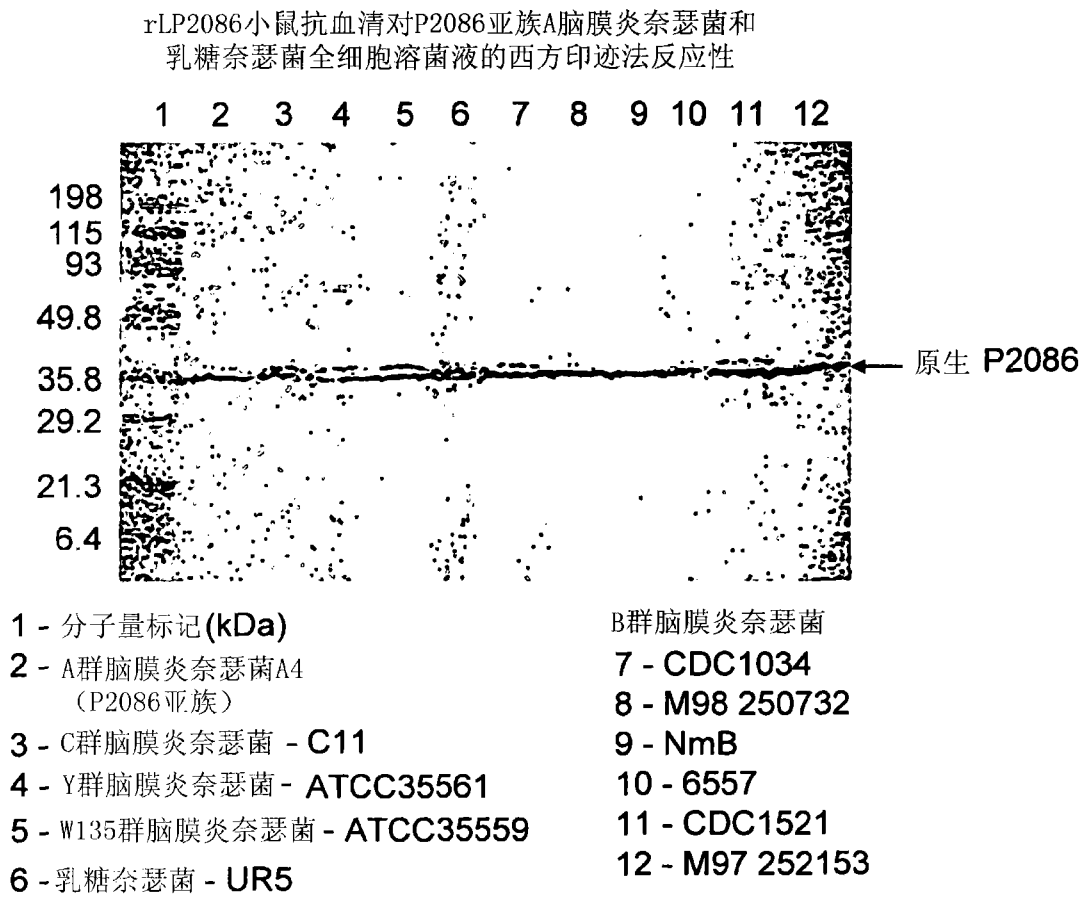


图18