



(43) 申请公布日 2016.03.23

序列表3页 附图10页

1. 一种用于治疗或预防由脑膜炎奈瑟球菌和/或淋病奈瑟球菌导致的感染或疾病的免疫原性组合物,其包含至少一种修饰的H因子结合蛋白,其中所述组合物给予人或非人动物时能引发免疫应答,其中所述修饰的H因子结合蛋白具有SEQ ID No:1序列,但在至少一个位置上有改变的氨基酸,所述改变的氨基酸导致所述修饰的H因子结合蛋白与SEQ ID No:1序列相比没有H因子结合或减少至少5倍,其中所述改变的氨基酸残基至少为SEQ ID No:1所示序列的位置106,且其中所述H因子结合蛋白与SEQ ID No:1序列具有至少90%序列相同性。

2. 如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述H因子结合蛋白来自脑膜炎奈瑟球菌或淋病奈瑟球菌。

3. 如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述修改的H因子结合蛋白相比SEQ ID No:1序列包含两种或更多改变的氨基酸。

4. 如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述改变的至少一个氨基酸是使所述H因子结合蛋白与H因子形成复合物时,与分离的野生型H因子结合蛋白相比表面暴露减少的氨基酸残基。

5. 如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述序列如SEQ ID ON:1所示并在位置106具有一个改变的氨基酸。

6. 如权利要求1所述的组合物,其特征在于,除了所述修饰的H因子结合蛋白,所述组合物还包含一种或多种抗原。

7. 如如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述组合物能引发针对脑膜炎奈瑟球菌和/或淋病奈瑟球菌的保护性免疫应答。

8. 如如权利要求1所述的组合物,其用于针对脑膜炎奈瑟球菌和/或淋病奈瑟球菌的预防或治疗疫苗。

9. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的组合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

10. 权利要求1所述的组合物在制备用于人或非人哺乳动物针对脑膜炎奈瑟球菌或淋病奈瑟球菌进行免疫的药物中的用途。

11. 用于在生物体中引起免疫应答的药盒,包含权利要求1所述的组合物和有关给药的说明书。

含有突变型H因子结合蛋白的疫苗组合物

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为PCT/GB2009/051439,国际申请日为2009年10月26日,进入中国国家阶段的申请号为200980148000.3,名称为“含有突变型H因子结合蛋白的疫苗组合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于引发对病原生物的免疫应答的免疫原性组合物,具体的,涉及能引发保护性免疫应答的免疫原性组合物。

背景技术

[0003] 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)(脑膜炎球菌)是寄居于人鼻咽中的一种荚膜革兰氏阴性双球菌。普通人群中的携带率通常为约10%。复杂的宿主-病原体关系通常是共生性的。但是,携带脑膜炎球菌有时能引起侵入性疾病。这一现象通常与属于少数的超毒力克隆谱系的菌株有关(Caugant, D.A.等(1987) *J Bacteriol* 169:2781-2792)。脑膜炎球菌(*N.meningitidis*)是全球化脓性脑膜炎的主要原因,并且是唯一一种能造成脑膜炎和败血症爆发的细菌。根据疾病在任何一个地理位置的地方性或流行性的普遍性,发病率在每 10^5 人群中为1-3之间。因此,需要开发预防性和治疗性方案来降低侵入性脑膜炎球菌疾病的发生率、致死率和发病率。

[0004] 脑膜炎奈瑟球菌对多种一线抗生素敏感,但是尽管如此,大量被诊断为脑膜炎球菌感染的患者死于重症或承受严重的并发症。致死率从没有并发症的脑膜炎病例中的2-3%到发生感染性休克的病例中的50%或更高(Cartwright, K.A.和D.A. Ala'Aldeen(1997) *J Infect* 34:15-19)。

[0005] 当前批准的疫苗是基于包裹住细菌外膜的多糖荚膜,因此仅提供了针对表达相应荚膜的一部分菌株的保护。此外,还没有针对血清组B脑膜炎奈瑟球菌广谱有效的疫苗,而这种菌株是发达国家中脑膜炎球菌疾病的最常见病因。这是因为血清组B荚膜由唾液酸的聚合物组成,该聚合物在结构上与婴儿期和胚胎发育期表达的人神经细胞粘着分子的一种修饰相关。人们担心用这一抗原进行免疫会造成自身免疫应答。

发明内容

[0006] 本发明涉及新型的组合物,具体地,涉及新型的包含修饰的H因子结合蛋白的免疫原性组合物,以及这些组合物在引发针对脑膜炎奈瑟球菌的免疫应答中的应用。

[0007] 本发明的目的之一是提供一种或多种能用来引发针对脑膜炎奈瑟球菌的保护性免疫应答的组合物。

[0008] 本发明的第一方面提供了包含至少一种修饰的H因子结合蛋白的免疫原性组合物,其中该组合物给予人或非人动物时能引发免疫应答。

[0009] 优选地,本文所述H因子结合蛋白是指来自脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)或淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)的H因子结合蛋白。

[0010] 脑膜炎奈瑟球菌通过模拟宿主而破坏宿主生物的免疫应答。脑膜炎奈瑟球菌使用H因子结合蛋白形式的蛋白质替代带电碳水化合物化学特性来征集宿主的补体调节子,H因子。

[0011] 在健康个体中,补体的激活通过包括H因子(fH)在内的膜结合和水溶性血浆调节蛋白被精确调控。H因子是155kDa的蛋白质,由二十个域(称为补体控制蛋白重复,或CCP)组成。多种病原体已经适应为通过在它们的表面整合H因子来避免补体介导的杀伤。

[0012] 如上所述,脑膜炎奈瑟球菌作为造成细菌性脑膜炎和感染性休克的主要原因,是一种具有全球重要性的适应人体的病原体(Stephens等(2007)Lancet 369,2196-210)。由于奈瑟球菌菌株的差异,现有的脑膜炎球菌疾病疫苗不提供广谱基础的保护,因此其应用很有限。一种方法是使用H因子结合蛋白(称为fHbp,GNA 1870、或R2086)作为疫苗组合物中的抗原。H因子结合蛋白是27kDa的表面脂蛋白,普遍存在于脑膜炎奈瑟球菌的表面,能引发保护性的杀菌抗体(Fletcher等(2004)Infect Immun 72,2088-100;Masignani等(2003)J Exp Med 197,789-99)。H因子结合蛋白起到把补体的负调节物,H因子征集到细菌表面的作用,并通过抑制人血浆中补体介导的裂解而对脑膜炎球菌避免先天免疫应答的能力有贡献(Madico等(2006)J Immunol 177,501-10;Schneider等(2006)J Immunol 176,7566-75)。

[0013] 在本发明中,使用了至少一种修饰的H因子结合蛋白作为抗原。该蛋白质被修饰以避免、或减少H因子与蛋白质的结合。在疫苗制剂中的H因子结合蛋白被给予到对象后,H因子与H因子结合蛋白的结合被认为会降低疫苗的成功。首先,H因子结合蛋白上H因子的存在可能限制宿主免疫系统对H因子结合蛋白上关键表位的识别。所产生的针对这些表位的抗体可以是杀菌的,并且抑制H因子与细菌结合使得细菌对补体介导的裂解敏感。其次,针对H因子结合蛋白的免疫应答还能以和半抗原类似的方式引发针对已结合的H因子的应答。这可能引起潜在的不希望发生的自身免疫应答。最后,由于补体蛋白质具有佐剂活性,免疫应答中涉及补体激活。通过征集H因子来降低免疫位点的补体激活会降低疫苗接种后得到的免疫水平。

[0014] 优选地,本发明中使用的修饰的H因子结合蛋白在蛋白质的一个或多个位点上被改变。

[0015] 优选地,与野生型蛋白质的氨基酸相比,修饰的H因子结合蛋白至少有一个氨基酸被改动。

[0016] 优选地,所述一个或多个被改变的氨基酸残基使H因子结合蛋白在和H因子形成复合物时与分离的H因子结合蛋白相比表面暴露减少。H因子结合蛋白中所述一个或多个被改变的氨基酸可以是图6(SEQ ID NO:1)所示序列中选自下列位置编号的氨基酸:103、106、107、108、109、145、147、149、150、154、156、157、180、181、182、183、184、185、191、193、194、195、196、199、262、264、266、267、268、272、274、283、285、286、288、289、302、304、306、311和313。

[0017] 在H因子结合蛋白中被改变的一个或多个氨基酸可以是在野生型蛋白质中与H因子形成氢键结合的一个或多个氨基酸。

[0018] 在H因子结合蛋白中被改变的一个或多个氨基酸可以是图6(SEQ ID NO:1)所示序列中选自下列位置编号的氨基酸:103、106、107、108、180、181、183、184、185、191、193、195、

262、264、266、272、274、283、286、304和306。

[0019] 本发明中使用的修饰的H因子结合蛋白中,上述氨基酸中的两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、或者五个或更多个可以被改变。优选通过改变H因子结合蛋白中的一个或多个氨基酸,防止或显著降低与H因子的结合。

[0020] 在一种实施方式中,氨基酸编号283和204中的至少一个被突变/改变成丙氨酸,而不是谷氨酸。优选地,这一突变导致H因子的结合几乎完全消除。

[0021] 和H因子与野生型H因子结合蛋白间的结合相比,H因子与修饰的H因子结合蛋白间的结合优选至少降低5倍,优选至少降低10倍,优选至少降低2个数量级。结合力的降低优选在分析物浓度为约50nM下测得。这样的结合力降低幅度被认为是显著的降低。

[0022] 除了对H因子结合蛋白进行修改来避免或抑制与H因子的结合之外,该蛋白质还可以包括对蛋白质作为针对脑膜炎奈瑟球菌感染的免疫原的能力没有影响的其它突变。例如,可以对蛋白质做出其它保守性氨基酸改变。类似地,可以对蛋白质进行不改变蛋白质免疫原性的插入或缺失操作。

[0023] 优选地,修饰的H因子结合蛋白与图6所示序列具有至少60%、70%、80%、85%、90%、95%或更高的序列相同性,但是经过修饰,优选至少在一个位置上有一个不同的氨基酸,这一修饰导致H因子的结合力丧失或者显著降低。

[0024] 序列相同性的百分值被定义为:经过序列比对和在必要时引入缺口以最大程度提高序列相同性百分数后,序列中与所提供的氨基酸序列中的氨基酸相同的氨基酸的百分数。为确定序列相同性百分数进行的比对可以通过本领域技术人员公知的多种方式实现,例如包括:利用BLAST(国家生物技术信息中心基础本地比对搜索工具,National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)。

[0025] 例如,相同性百分数的变化可能是由于氨基酸的取代、插入或缺失。氨基酸取代可以是保守性的,其中所取代的氨基酸具有相似的结构和/或化学特性,例如用异亮氨酸取代亮氨酸就是保守性取代。

[0026] 免疫原性组合物是一种当被给予对象后能引发针对至少一种修饰的H因子结合蛋白的免疫应答的组合物。优选地,对象是人或者非人动物,更优选是人或者非人哺乳动物。

[0027] 优选地,本发明的组合物引发的免疫应答影响到脑膜炎奈瑟球菌感染已免疫的人的能力。优选地,脑膜炎奈瑟球菌对经本发明组合物免疫的人的感染能力被阻止或预防。这可以通过多种方式实现。被引发的免疫应答可以识别并破坏脑膜炎奈瑟球菌。或者或此外,被引发的免疫应答可以阻止或预防脑膜炎奈瑟球菌的复制。或者或此外,被引发的免疫应答可以阻止或预防脑膜炎奈瑟球菌在人或非人动物内引起疾病。

[0028] 修饰的H因子结合蛋白可以是重组生产的(例如从基因工程表达系统中),或者是合成产物,例如通过体外肽合成或体外翻译制得。

[0029] 除了一个或多个修饰的H因子结合蛋白以外,本发明的组合物还可以进一步的包含一个或多个抗原。进一步包含的抗原也可以来自脑膜炎奈瑟球菌,并且可能引发针对脑膜炎奈瑟球菌的免疫应答。

[0030] 在被给予对象时,组合物可以用来引发/引起保护性的免疫应答。保护性的免疫应答可以造成脑膜炎奈瑟球菌在感染对象时被杀伤,或者可以预防或抑制脑膜炎奈瑟球菌复制和/或引起疾病。

[0031] 组合物可被用作针对脑膜炎奈瑟球菌的预防性或治疗性疫苗。

[0032] 本发明的另一方面提供了一种包含至少一种修饰的H因子结合蛋白和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0033] 优选地,该药物组合物包含按本发明的第一方面所述的组合物。

[0034] 优选地,该药物组合物能引起针对脑膜炎奈瑟球菌的保护性免疫应答。

[0035] 本文所用的短语“引起保护性的免疫应答”是指,组合物能在被给予组合物的宿主生物如人或者非人哺乳动物中引起一种保护性的反应。优选地,保护性的免疫应答能保护免受脑膜炎奈瑟球菌的后续感染。保护性的免疫应答可以通过减少脑膜炎奈瑟球菌的复制或通过影响脑膜炎奈瑟球菌的作用模式来消除或降低感染程度从而减轻疾病。

[0036] 合适的可接受的赋形剂和载体是本领域技术人员公知的。它们可以包括固体或液体载体。合适的液体载体包括水和盐水。组合物中的蛋白质被配制成乳液或者它们可被配制成生物可降解的微球体或者脂质体。

[0037] 组合物还可以包含佐剂。合适的佐剂是本领域技术人员公知的,可以包括不完全弗氏佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant,用于动物中的应用)、以及金属盐如铝或钙盐。

[0038] 组合物还可以包含用来控制组合物稠度和/或控制抗原/分泌型蛋白质从组合物中释放的聚合物或其它试剂。

[0039] 组合物还可以包含其它试剂,例如稀释剂,可包括水、盐水、甘油或其它合适的醇等;润湿剂或乳化剂;缓冲剂;增稠剂例如纤维素或纤维素衍生物;防腐剂;去污剂、抗微生物剂;等等。

[0040] 优选地,组合物中的活性成分纯度超过50%,通常纯度超过80%,经常纯度超过90%,更优选纯度超过95%、98%或99%。最经常使用的是活性成分纯度接近100%,例如纯度约99.5%或99.9%。

[0041] 本发明的组合物可以用作针对由脑膜炎奈瑟球菌引起的感染的疫苗。该组合物可以用作针对脑膜炎或其它侵入性脑膜炎球菌疾病包括败血症或感染性休克的疫苗。该疫苗可以预防性地给予具有脑膜炎奈瑟球菌接触风险的人群和/或治疗性地给予已经接触脑膜炎奈瑟球菌的人。

[0042] 优选地,若组合物用作疫苗,那么组合物包含免疫有效量的抗原,其中组合物包含至少一种修饰的H因子结合蛋白。抗原的“免疫有效量”指在一次剂量或一系列剂量中给予个体时能有效治疗或预防脑膜炎奈瑟球菌感染的量。这个量会因待治疗个体的健康和身体状况以及抗原而变。确定给予生物体的免疫原性或疫苗组合物的有效量是本领域技术人员能力范围内的。

[0043] 本发明的组合物可以经口服、全身、胃肠外、外用、粘膜、肌肉内、静脉内、腹膜内、皮内、皮下、鼻内、阴道内、直肠内、透皮、舌下、吸入或气雾剂给药。

[0044] 该组合物可以被安排为作为一次剂量或者多次剂量方案中的一部分进行给药。多次剂量可以以初次免疫之后进行一次或多次加强免疫进行给药。初次免疫和加强免疫之间合适的时间可以常规确定。

[0045] 本发明的组合物可以单独使用,或可以与一种或多种其它免疫原性或疫苗组合物,和/或一种或多种其它治疗方案联合使用。

[0046] 在被给予对象后,本发明的组合物可以诱发血清杀菌抗体应答并引发介导调理素

调节的吞噬作用的抗体。这些应答可以在小鼠中方便的测得,并且结果是疫苗效力的标准指标。

[0047] 或者替代地,本发明的组合物还可以引发免疫应答来中和细菌蛋白或其它分子,从而预防它们具有它们的正常功能并且预防或减轻疾病进展,而无需破坏病原性生物/细菌,在本申请中为脑膜炎奈瑟球菌。

[0048] 本发明的另一方面提供了一种或多种修饰的H因子结合蛋白在制备用于引发免疫应答的药物中的应用。该药物可用于对对象进行针对脑膜炎奈瑟球菌的预防性或治疗性疫苗接种。该药物可以是预防性或治疗性疫苗。该疫苗可以针对脑膜炎奈瑟球菌引起的脑膜炎、败血症和/或感染性休克。

[0049] 本发明的另一方面提供了一种包含用于产生针对脑膜炎奈瑟球菌的免疫应答的一种或多种修饰的H因子结合蛋白的组合物。该免疫应答可以是预防性或治疗性的。该组合物可以用作疫苗。

[0050] 本发明的另一方面提供了一种保护人或非人动物免受脑膜炎奈瑟球菌感染影响的方法,包括把本发明的任一其它方面所述的组合物给予人或者非人动物。该组合物可以是疫苗。

[0051] 本发明的另一方面提供了一种提高人或非人动物的免疫应答的方法,包括把本发明所述的药物组合物给予人或非人动物。该免疫应答优选为保护性的。在已接受初免的患者中该方法可产生加强应答。所述免疫应答可以是预防性或治疗性的。

[0052] 一种检测包括给予本发明组合物的治疗性治疗的功效的方式包括在给予该组合物后监测脑膜炎奈瑟球菌感染。一种检测包括给予本发明组合物的预防性治疗的功效的方式包括在给予该组合物后监测针对脑膜炎奈瑟球菌的免疫应答。

[0053] 本发明的另一方面提供了一种或多种修饰的H因子结合蛋白在制备用于免疫人或非人哺乳动物使其免受脑膜炎奈瑟球菌感染的药物中的应用。

[0054] 本发明的另一方面提供了用于诱导生物体中免疫应答的药盒,包含本发明所述的免疫原性或疫苗组合物以及与给药相关的说明书。

[0055] 除了它们的疫苗潜在应用外,本发明的组合物还可用作诊断试剂和对接种者免疫能力的测量方式。

[0056] 尽管本发明的所有内容和上面讨论的优选特征都针对脑膜炎奈瑟球菌,但技术人员能够理解它们同样可用于淋病奈瑟球菌(*N. gonorrhoeae*)。

[0057] 技术人员能够理解上述讨论的任何优选特征可以用于本发明的任何方面。

[0058] 下面参照以下附图和实施例,仅以举例的方式描述本发明的优选实施方式。

附图说明

[0059] 图1a到1f-图1a到1f显示H因子结合蛋白结合位点位于H因子的CCP6处并需要H因子结合蛋白的全部胞外部分。图1a为H因子与完整的H因子结合蛋白及其截短形式(如图示)结合的Far Western分析。膜用纯化的H因子培育并用 α -fH pAb检测。只有在完整的27kDa的H因子结合蛋白(箭头所示)处观察到结合。图1b显示了用 α -fH pAb获得的FACS分析结果,该抗体检测脑膜炎奈瑟球菌和H因子之间的结合。图1c利用SPR结果显示H因子结合蛋白只能与含有CCP6的H因子构建体结合。小插图显示了注射到H因子结合蛋白表面的不同稀释度的

fH67的1:1朗格缪尔(Langmuir)拟合曲线,以确定动力学参数。图1d显示了FACS竞争研究(使用针对CCP5的 α -fH mAb,因此不能识别fH67构建体)的结果,说明短的fH67构建体(在约0.3到30 μ M之间)能够竞争掉全长H因子的结合,证明该构建体包含了完整的H因子结合蛋白结合位点。所示数值为三次实验荧光强度的平均值 $\pm$ 标准差(s.d.)。图1e所示SPR定量证实了CCP6的存在对于与H因子结合蛋白的高亲和力结合是必要和充分的,并且常见的H因子CCP7多态性(402His/Tyr)不显著改变fHbp结合的亲和性。

[0060] 图1f列表说明了通过表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance)实验用芯片表面的H因子结合蛋白和液相中的H因子构建体获得的结合常数。使用BiaEvaluation 2.0软件和1:1朗格缪尔模型进行拟合。所示数值是均值 $\pm$ 标准差,Chi2是BiaEvaluation 2.0给出的拟合质量的指标。

[0061] 图2a到2c-显示了H因子结合蛋白及其与fH67的复合物的结构。图2a显示了H因子结合蛋白(残基80至320)的动画图示的两个视图。标明了A、B和C区域。图2b显示了在H因子结合蛋白和H因子的CCP 6与7之间形成的fHbp:fH67复合物的动画图。两种蛋白中参与了相互作用表面之间的盐桥形成的侧链以球-棍模式标示(小图中被放大并重新定向)。图2c显示了H因子结合蛋白和fH67的拓扑结构,指示出了参与蛋白质之间氢键或盐桥相互作用的残基。实心圆点表示与其伙伴形成氢键的残基。实心星形表示与其伙伴形成盐桥的残基。星号表示该相互作用仅在一些独立的复合物结构拷贝中被发现。

[0062] 图3-涉及H因子结合蛋白与H因子之间的界面,表明在H因子和H因子结合蛋白中将带电侧链取代为丙氨酸的定位诱变导致它们在浓度约为野生型的KD时与各自的野生型伙伴间的结合力消灭。黑色柱表示H因子分析物注射到(50nM, 40 μ l.min⁻¹)H因子结合蛋白表面上的时间段。

[0063] 图4-使用了两种晶形的七个晶体学独立的fH67/fHbp复合物拷贝(4个复合物拷贝为P1形式,3个拷贝为C2形式)的重叠图考虑到fH67/fHbp复合物的挠性。尽管包装环境非常不同,晶体间的高度相似性表明复合物是生物学相关的。

[0064] 复合物内蛋白质的重排仅限于fH67的CCP7相对于CCP6和H因子结合蛋白的位置发生少量移动。包装在最接近CCP7的H因子结合蛋白的环也相对可移动,这由它们较高的温度因子所显示(在此图中用“更稠厚”的色调标示)。

[0065] 图5-显示H因子结合蛋白表面上的抗体表位的位置。在12,20,21处保护性表位deCCPibed中的残基用CPK图示法(CPK representations)按元件着色(C为绿色,N为蓝色,O为红色)(Glu 211、Arg 214和Arg 269)。

[0066] 阻断H因子结合的抗体的表位用CPK图示法,按H因子结合蛋白的着色 标示(区域“A”为黄色,区域“B”为绿色,区域“C”为青色)。尽管这些表位中没有有一个被直接定位在H因子识别位点,但它们都离识别位点很近,使得与大抗体的结合可能阻碍H因子的识别。H因子的多态性残基402的组氨酸侧链也在CPK图示中显示。尽管这一残基靠近H因子结合蛋白的次要触点(参见图2,残基103到108附近),但SPR得到的两种多态性形式的证据表明,该残基并非关键触点。晶体学独立的复合物拷贝之间(图4),两个蛋白在这一点上的相互接触方式有显著变化,由此可见复合物的这一区域(GNA环和H因子域)是最具可移动性的区域,这个事实也支持了上文的结论。

[0067] 图6-H因子结合蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。该蛋白质的GenBank登录号为

AAF42204。

[0068] 图7-fHbp:fH67复合物的结构。图7A-动画图显示的fHbp(绿色表示家族间保守的残基,红色为非保守的残基)和表面模型显示的fH67。图7B-小鼠和人fH之间不同的残基显示为红色,我们的研究显示黄色残基影响fH的结合。

[0069] 图8-SPR确定的fHbp变体1、2和3与fH678的结合。还检查了与淋球菌同源物NG00033的相互作用。

[0070] 图9A,等温滴定量热法证实fHbp/fH相互作用在溶液中表现为nM水平的KD。图9B,包含两个Glu至Ala突变的fHbp结构证实只在突变的侧链有结构改变(由 α C, F0-FC图中红色电子密度差异所示)。图9C, 5nM H因子的结构域5、6和7流过野生型和突变型fHbp的响应(上方数据曲线为fHbp变体1,下方数据曲线为fHbp变体1DM)。图9D, 20nM完整的H因子流过野生型和突变型fHbp的响应(上方数据曲线为fHbp变体1,下方数据曲线为fHbp变体1DM)。

具体实施方式

[0071] H因子结合蛋白(其序列由图1给出)的功能以前已通过将蛋白质分割成覆盖全部胞外区域的一系列区域,称为“A”、“B”和“C”进行过研究(Giuliani等(2005) *Infect Immun* 73, 1151-60)。Western印迹分析显示,所有三个区域对于H因子和H因子结合蛋白之间高亲和力的相互作用都是必需的(图1a),表明H因子结合蛋白在其整个表面上具有较长的H因子识别位点。

[0072] 为了鉴定H因子20个CCP结构域中的哪一个介导与H因子结合蛋白的相互作用,使用了以下技术:far Western分析;FACS分析(图1b);表面等离子共振(图1c)。所得结果显示,H因子被H因子结合蛋白识别的关键区域是第六结构域CCP6和含有CCP6的构建体能抑制依赖H因子结合蛋白的H因子和脑膜炎奈瑟球菌间的相互作用(图1d)。相互作用的定量分析显示,任何含有CCP6的构建体的解离常数为约5nM(图1c、1e和1f)。这一相互作用在高盐(1M NaCl,未显示)或pH为4到8(未显示)的条件下不解离,这补充支持了结合事件的高亲和性性质。

[0073] 参见图9A-D,表面等离子共振显示fHbp的双突变体以高出两个数量级的KD结合H因子的结构域6和7。该突变体也结合更长的构建体(由结构域5、6和7组成)和全长H因子(提纯自血清),其结合力比野生型fHbp弱得多。

[0074] 获得了H因子的CCP 67(下文中称为fH67)和包含H因子结合蛋白区域A、B和C的胞外部分形成的复合物的晶体结构,建立了H因子结合蛋白和fH67的模型并总共用七个独立的复合物拷贝(图2a、b和c)把两种晶形的模型改进到2.35 Å。如图2a所示,H因子结合蛋白的胞外区域折叠形成两个 β 桶(β -barrels),N-端的桶由“A”和一部分“B”区域组成,而C-端的桶由其余的“B”区和“C”区域组成。用N-端的桶在结构数据库中搜索未发现接近的结构同源物, β 桶的独特拓扑结构(图2c)表明它们不是从基因重复事件中产生的。

[0075] fH67:fHBP复合物(H因子:H因子结合蛋白)通过H因子结合蛋白的两个 β 桶和H因子CCP6之间广泛的相互作用而连接在一起(图2b),这与结合研究相一致。具体的,插入在CCP6的第二个 β 链(该CCP域的一个不寻常的特征)内的螺旋位于复合物中心。PISA服务器进行的分析对所有七个独立复合物给出了1.0的显著性值(即,极有可能是生物学显著的),H因子结合蛋白埋入复合物的平均表面积($2860 \pm 177 \text{Å}^2$)比多数抗体:抗原复合物中的埋

入面积都大。

[0076] 此外,基于结构所预测的复合物形成的 ΔG (-6kcal/mol)与结合研究得出的亲和性(-11kcal/mol ,从图1e所示的KD计算得到)相一致,进一步支持了结晶复合物的生理相关性。相互作用表面显示了良好的形状互补性(图2c),具有大量静电相互作用,包括多个氢键和盐桥。与fHbp:fH相互作用研究相一致,该研究未检测到与衰老相关黄斑变性有关的H因子402His/Tyr同种型之间结合的差异(图1e、4和5)。His402仅外围参与了与H因子结合蛋白相互作用,它与H因子结合蛋白N-端 β 桶的链1和2之间的挠性环接触(图4)。

[0077] 为进一步查明相互作用表面,形成了两种蛋白质的双突变/取代型,其中的带电侧链被取代为小的疏水残基丙氨酸(A)。在fH67中进行了R341A和H337A突变,而H因子结合蛋白中的突变为E283A和E304A。利用SPR对突变蛋白和它们的野生型伙伴之间相互作用的研究显示,两种突变型的亲和性都降低了两个数量级以上,以致在分析物浓度为野生型KD的10倍左右(约50nM)时几乎观察不到相互作用(图3a)。在高数千倍的分析物浓度(μM 范围)下,两种蛋白质的突变型与野生型伙伴发生相互作用:与野生型相比,fHbpE283A,E304A保持了定性意义上相似的结合速率但解离速率有提高,而fH67R341A,H337A在解离速率上与野生型相互作用更相似但结合速率大大降低(图1e)。

[0078] 来自不同家族的fHbp具有相同的结合特性

[0079] 脑膜炎奈瑟球菌菌株表达单一的fHbp,各属于三种变体家族中的一种:变体1、变体2和变体3。我们的研究集中在变体1的fHbp,因为这是疾病分离物中最常见的家族。图7显示了绘制在复合物结构上的三个家族间序列的差异,并表明,尽管序列保守度较高($>60\%$ 相同),但在fH结合位点周围存在 显著的差异。因此,我们测定在不同的fHbp家族之间fH识别模式是否保守,以及相同的fHbp和fH残基是否是结合的关键。这对于形成结合力减弱的fHbp变体来作为疫苗进行评价是关键的信息。

[0080] 为此,我们克隆、表达并纯化了来自变体2和变体3的fHbp,并开始鉴定它们与fH的相互作用(图8)。迄今为止,我们的SPR研究显示识别模式是类似的,亲和性在同一数量级,并且fH中相同残基的突变对所有家族fHbp的结合都有显著影响(未显示)。值得注意的是,尽管淋病奈瑟球菌fHbp同源物(NG00033)与变体3密切相关(91%氨基酸相同),但没有检测到纯化蛋白与fH发生相互作用(图8)。

[0081] fHbpE283A,E304A突变型保持了原子结构

[0082] 对fHbpE283A,E304A突变型(双突变,DM)不能与fH67以纳摩尔(nM)范围的解离常数(KD)结合的一个可能解释是,氨基酸变化破坏了蛋白质的整体结构。为解决这一问题,确定了与fH67复合的fHbpE283A,E304A突变型的晶体结构。

[0083] 结果证实fHbp唯一的结构变化是突变的侧链(图9B)。此外,我们确定了这些突变在与fH5、6、7和全长fH结合中的相关性(图9C和D)。可以观察到fH在浓度为10nM范围时与野生型蛋白质相互作用,表明全长fH的亲和性与较小的片段(如fH5、6、7)在相同范围内。然而,fHbpE283A,E304A蛋白的结合亲和性与野生型蛋白相比显著降低。

[0084] 将已发表的能引发杀菌抗体的H因子结合蛋白的表位(Giuliani等(2005)Infect Immun 73,1151-60;Cantini等(2006)J Biol Chem 281,7220-7)绘制到结构图上,显示目前已鉴定的位点都不直接位于H因子识别位点内。然而,抗体识别的影响因子结合的表位位于识别位点周围,因此可能通过位阻来抑制H因子结合(图5)。

[0085] fHbp单突变体和双突变体保持了免疫原性为检查氨基酸变化E283A和E304A的影响,表达并纯化了具有这些取代的单个(即fHbpE283A、和fHbpE304A)或组合(fHbpE283A, E304A)的fHbp变体1。用野生型fHbp和 这些蛋白质来免疫各组小鼠(每组5个),并测定免疫血清中的杀菌抗体。结果(表1)用能造成50%或更高的野生型血清组B脑膜炎奈瑟球菌(菌株H44/76)杀伤率的血清的最高稀释度的倒数表示。免疫前的血清没有杀伤作用。

[0086] 表1 用野生型或突变型fHbp免疫动物得到的血清杀菌抗体(SBA)效价

[0087]

用来产生血清的多肽	针对H44/76的SBA效价
fHbp	64
fHbpE283A, E304A	64
fHbpE283A	256
fHbpE304A	64

[0088] 结果显示突变型蛋白质至少具有与野生型蛋白质相同的引发针对血清组B脑膜炎奈瑟球菌的SBA效价的能力。

[0089] 方法

[0090] Western印迹分析:用SDS-PAGE分离蛋白样品,然后15V下60分钟转移至PVDF膜。膜在含有5%奶粉的PBS中4℃封闭过夜,用PBSTM(含有0.05%吐温20和0.5%脱脂奶粉的PBS)淋洗一遍后用第一抗体或fH来源在室温下培育1到2小时。用PBSTM清洗三次后,膜用含有山羊抗人fH多克隆抗体(最终稀释度为1:1000)或鼠抗fHbp多克隆抗体(最终稀释度为1:10,000)的PBS培育。使用1:500稀释的 α -家兔过氧化物酶偶联的IgG(DC公司(Dakocytomation))进行结合的检测。

[0091] 流式细胞术分析:总量为 10^8 的脑膜炎奈瑟球菌与10 μ l纯化的fH(2 μ M)或CCP(终浓度为3mM)在37℃下培育30分钟。用PBS-0.1%吐温20(PBST)清洗三遍后,细菌用含有单克隆抗体(mAb)MRC 0X241或抗人H因子多克隆抗体的PBS培育30分钟。用PBST清洗三遍后,细胞用FITC偶联的第二抗体在4℃下避光培育30分钟。用FACS Calibur分析仪(BD公司(Becton Dickinson))通过流式细胞术检测与脑膜炎球菌结合的H因子。对于抑制实验,全长H因子和所示浓度逐渐升高的CCP 67以及细菌一起培育。

[0092] 蛋白质的表达和复合物的纯化:在大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)宿主细胞中,H因子结合蛋白和截短形式的蛋白质表达成在其C端用聚组氨酸标记的融合蛋白(Masignani等(2003)J Exp Med Vol 197, No 6, 789-97)。菌株培养物生长至对数中期,用异丙基-硫代半乳糖苷(IPTG,终浓度为1mM)诱导表达。在His-Trap柱上,按照生产商说明书(GE健康护理公司(GE Healthcare))用亲和层析纯化蛋白质,用250mM咪唑从柱上洗脱。如前所述,在大肠杆菌中表达H因子构建体(用再折叠使两个CCP片段内能正确的形成四个二硫键)并通过肝素柱亲和纯化或者大小排阻色谱法纯化。在fHbp与fH67(高摩尔过量)混合后,复合物用大小排阻色谱法(GE健康护理公司的Superdex S-200,缓冲液为Tris pH 7.5, 150mM NaCl)纯化,未复合的fH67与柱基质之间强的相互作用确保复合物峰与过量fH67峰的良好分离。SDS-PAGE和质谱确认了推定的复合物峰中存在两种蛋白质(数据未显示)。

[0093] 定位诱变:双突变型以顺序的方式使用QuikChange定位诱变试剂盒(司查塔基公司(Stratagene))产生。

- [0094] fH67的R341A,H337A双突变型使用下列引物产生:
- [0095] H337A正向,
- [0096] 5'AAACATGGAGGTCTATATGCTGAGAATATGCGTAGACCATACTTTCC3'(SEQ ID NO:2);
- [0097] H337A反向,
- [0098] 5'TTTGTACCTCCAGATACGACTCTTATACGCATCTGGTATGAAAGG3'(SEQ ID NO:3)。
- [0099] R341A正向,
- [0100] 5'GGTCTATATCATGAGAATATGGCTAGACCATACTTTCCAGTAGC 3'(SEQ ID NO:4);
- [0101] R341A反向,
- [0102] 5'CCAGATATAGTACTCTTATACCGATCTGGTATGAAAGGTCATCG3'(SEQ ID NO:5)。
- [0103] 通过测序证实了突变的引入。如前所述表达重组突变型fH67片段,并从包含体再折叠(Prosser等(2007)Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Common Jun 1:63 (PT6):480-3)。
- [0104] 为生成H因子结合蛋白的E283A,E304A突变型,所使用的引物为:
- [0105] E283A正向5'ACAACCAAGCCGCGAAAGGCAGTTAC 3';
- [0106] E283A反向5'ACAACCAAGCCGCGAAAGGCAGTTAC 3';
- [0107] E304A正向TGCCGGCAGCGCGGCAGTGAACCG 5';
- [0108] E304A反向5'CGGTTTTCTACTGCCGCGCTGCCGGCA 3'
- [0109] 并如上所述进行蛋白表达和纯化。
- [0110] 表面等离子共振:用标准的胺偶联方案把H因子结合蛋白或H因子构建体偶联到传感器表面(CM5芯片)。随后,合适的配体在液相中以40 μ l/min的流速流过。高/低盐浓度(0到3M NaCl)或极端pH(试验过4-8的范围)都不能破坏强相互作用,因此在连续注射之间应用了延长的解离时间(60分钟)。在液相中用较大的H因子结合蛋白得到的数据不能用简单的1:1模型得到令人满意的拟合(原因可能是较大蛋白质移动进/出芯片基质的问题或因较小的蛋白质偶联到芯片表面引起的H因子结合位点的位阻),近平衡值的粗略分析提示KD在数十至数百nM范围内(取决于所用的H因子构建体)。一旦相互作用互换(fH在芯片上),数据就能用1:1朗格缪尔模型令人满意的拟合(图1f), χ^2 约为3,显示含有CCP6的构建体的真实KD在5nM数量级(见图1f)。还将fHbp伙伴偶联在芯片表面上(fHbp_{WT}~800RU,偶联在通道1上,fHbp_{E283A,E304A}~1500RU,偶联在通道2上),分析fH67和H因子结合蛋白的双突变型。然后,fH67(WT和突变型)以50 μ M(约10倍于天然K_d)的浓度流过,显示出与WT配对之间的相互作用程度相比,突变型与其WT伙伴之间的相互作用很低或没有。为计算fH67_{R341A H337A}对fHbp_{WT}的亲合性,使用跨越250nM到20 μ M浓度范围内的一系列注射(一式两份)并用BiaEvaluation软件拟合来给出图1f所示数值。
- [0111] 结晶和X-射线数据采集:使用沉滴蒸气扩散法,用0.2 μ l复合物+0.2 μ l母液滴(假定消光系数为2.2计算得复合物为4.5mg/ml,母液优化到接近JCSG-plus条件15,20%聚乙二醇6000MW,0.1M Bicine pH 9.0)进行晶体生长。收获的晶体和SDS-PAGE证实fH67和H因子结合蛋白都存在(数据未显示)。晶体(通常为50x 10x 5 μ m)用15%乙二醇做超低温保护后在液氮中快速冷冻。通过轮换使用其一的方法同时在ESRF和Diamond上采集数据,振荡范围在0.5或1度,晶体保持在120K。天然P1的数据采集自 λ 为0.9523 $\text{\AA}$ 的光束线ID14eh4(ESRF),天然C2和Pt组的数据采集自 λ 为0.9814 $\text{\AA}$ 的光束线103(Diamond),Hg组的数据采

集自 λ 为1.003Å的光束线BM14(ESRF),S-SAD的数据采集自 λ 为1.8 Å的光束线ID29(ESRF)。数据被积分并用带有-3d选项的xia2放大以套用XDS4积分程序和Scala5框间放大程序。

[0112] 结构解析与细化:通过用fh67结构(取自早先由fh678与蔗糖八硫酸盐的复合物所得结构,SOS,PDBID:2UWN)分子替换、和利用铂、汞衍生物的MIRAS方法、和C2不对称单元中33个硫中31个的不规则散射解析出C2晶体形式的fh67/fHbp复合物的结构。利用MolRep7(CCP4程序包)发现三个fh67拷贝,利用不对缺失原子建模的Buster-TNT细化了两个CCP结构域刚体。随后,这些相被整合成SHARP定相作业并用来定位其它晶体中的重原子(6Pt、1Hg和31S)。使用3.2Å的数据和产生的相,结合SHARP中分子替换得到的数据和相,在SHARP中(每个晶体的B因子固定为Wilson值)细化重原子模型,产生品质因数为0.54(最高分辨率壳层3.3-3.2Å时为0.35)的相。各衍生物的相位力(不规则/同形)铂为0.7/2.4,汞为0.2/0.3,不规则硫信号为0.3/0.0。用这些相所得的图在SHARP中进行溶剂平坦化,并用H因子结合蛋白、H因子CCP6和H因子CCP7区域的三个不同操作子在DM中平均。H因子结合蛋白C-端桶的NMR模型(Cantini等(2006)J Biol Chem Mar 17:281(11):7220-7)不能用于这一密度(所见链被扭曲),因此用Coot程序手工构建了模型。利用40到2.35Å范围内的数据用Coot和Buster-TNT处理进行重建并细化,未采用晶体对称来抑制各结构域的核心,同时允许环形区域之间的更多变动直至R/Rfree为25.5/27.1且Ramachandran曲线中没有残基在禁止区域(MolProbity确定94.6%在最有利位置)。该模型含有fh67的所有残基,以及除H因子结合蛋白N-端的五个残基和亲和标记的六个组氨酸(在分子的所有拷贝中都是混乱的)以外的所有残基。用MolRep程序进行单个结构域(H因子CCP6和H因子CCP7和H因子结合蛋白)的分子替换使能分辨P1晶形(不同包装排列的复合物的四个独立拷贝)。用Coot/Buster-TNT对环形区域的较小改造和细化(90到2.35Å)使R/Rfree为23.2/26.3,而且Ramachandran曲线中没有残基在禁止区域(95.3%在最有利位置)。用PyMol程序绘制结构图。

[0113] 免疫方案

[0114] 七周龄的BALB/C小鼠在第0和第10天用带有弗氏佐剂的纯化fHbp或突变型fHbp进行皮下免疫。每个动物接受总体积为200微升的等体积PBS和佐剂配制的25微克蛋白。在第14天处死动物,并从小鼠中采集血清,汇集后分装并在-80℃下保存。

[0115] 血清杀菌活性(SBA)

[0116] 血清组B脑膜炎奈瑟球菌菌株H44/76在固体培养基上生长过夜,收集入PBS,并对菌落形成单位定量计数。将血清的连续稀释物加入到细菌(10^4 CFU,SBA缓冲液)和幼兔补体(Pelfreeze,最终1:8稀释)中,1小时后通过接种到固体培养基上来测定存活的细菌数。

序列表

<110> 帝国创新技术有限公司

<120> 含有突变型H因子结合蛋白的疫苗组合物

<130> 112467

<150> GB0819633.9

<151> 2008-10-25

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 320

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟球菌 (Neisseria meningitidis)

<400> 1

[0001] Met Pro Ser Glu Pro Pro Phe Gly Arg His Leu Ile Phe Ala Ser Leu
1 5 10 15

Thr Cys Leu Ile Asp Ala Val Cys Lys Lys Arg Tyr His Asn Gln Asn
20 25 30

Val Tyr Ile Leu Ser Ile Leu Arg Met Thr Arg Ser Lys Pro Val Asn
35 40 45

Arg Thr Ala Phe Cys Cys Leu Ser Leu Thr Thr Ala Leu Ile Leu Thr
50 55 60

Ala Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly
65 70 75 80

Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu
85 90 95

Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys
100 105 110

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

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

Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu
145 150 155 160

Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr
165 170 175

Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg
180 185 190

Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys
195 200 205

[0002]

Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser
210 215 220

Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys
225 230 235 240

Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val
245 250 255

Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val
260 265 270

Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser
275 280 285

Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu
290 295 300

	Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln	
	305 310 315 320	
	<210> 2	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 2	
	aaacatggag gtctatatgc tgagaatatg cgtagaccat actttcc	47
	<210> 3	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0003]	<400> 3	
	tttgtacctc cagatacgac tcttatacgc atctggtatg aaagg	45
	<210> 4	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 4	
	ggtctatatc atgagaatat ggctagacca tactttccag tagc	44
	<210> 5	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 5	
[0004]	ccagatatag tactcttata ccgatctggt atgaaaggtc atcg	44

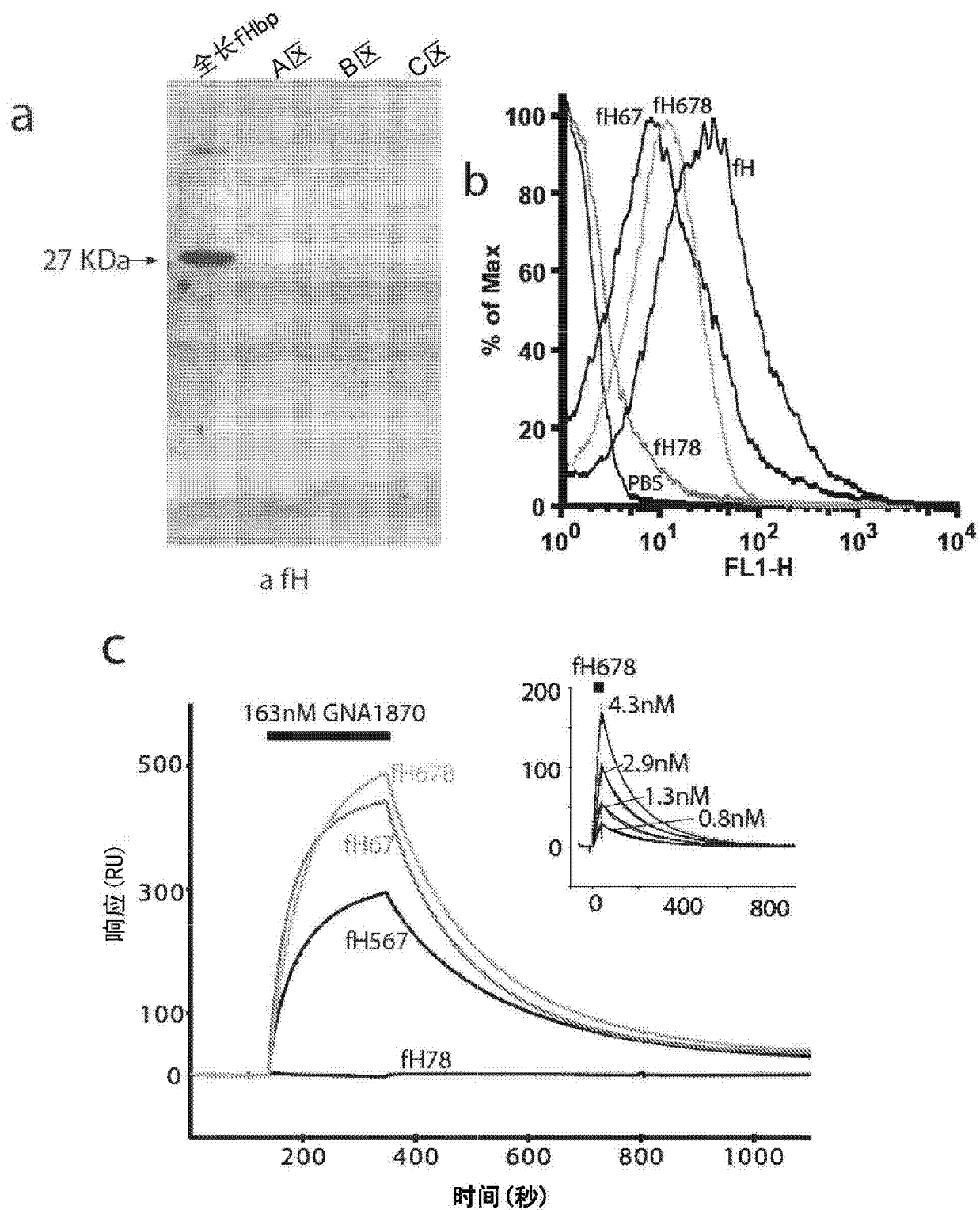


图1

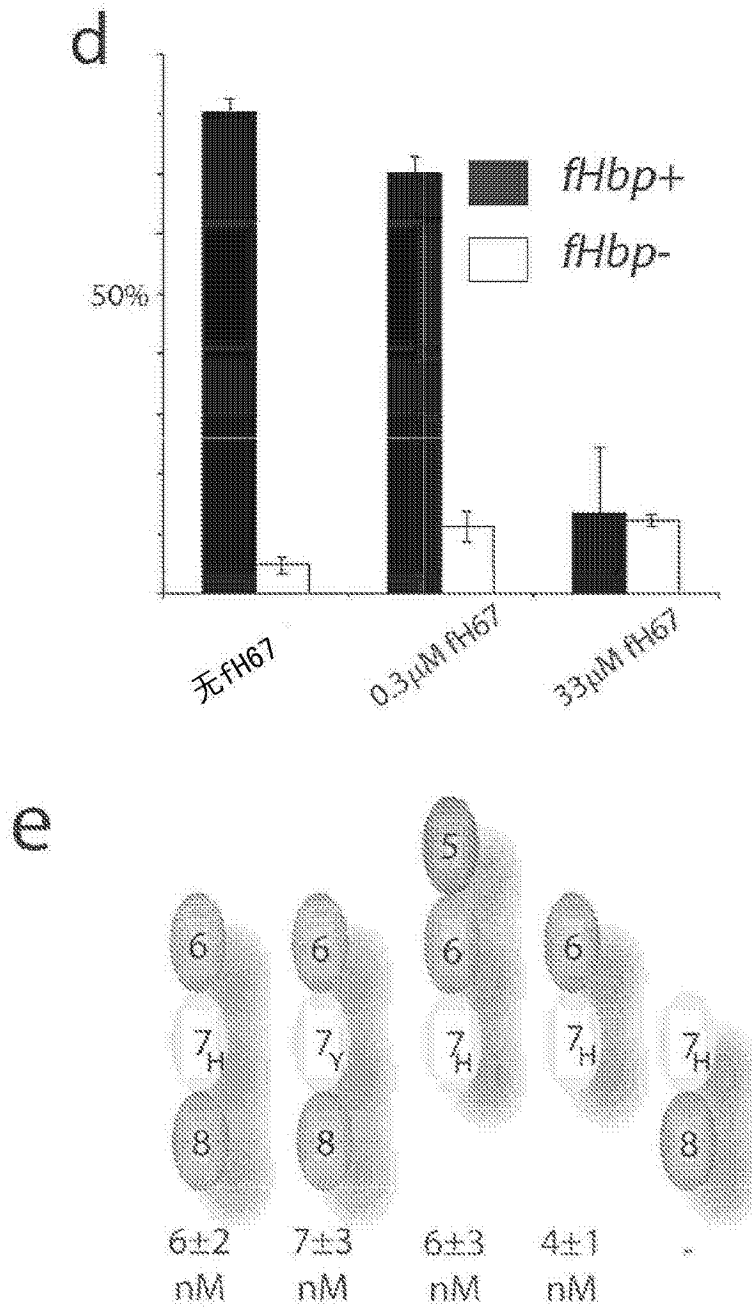


图1(续)

f

构建体	k_a ($M s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	χ^2
fH567	$3.5e^5 \pm 2.2e^5$	$1.8e^{-3} \pm 3.6e^{-4}$	$6.1e^{-3} \pm 2.5e^{-3}$	2.1 ± 1.1
fH678 His 402	$3.6e^5 \pm 4.4e^4$	$1.9e^{-3} \pm 3.4e^{-4}$	$5.7e^{-9} \pm 2.3e^{-9}$	3.5 ± 2.2
fH676 Tyr402	$3.0e^5 \pm 1.9e^5$	$1.7e^{-3} \pm 2.8e^{-4}$	$7.2e^{-3} \pm 2.7e^{-9}$	4.3 ± 1.0
fH67	$7.2e^5 \pm 1.5e^5$	$2.9e^{-3} \pm 6.4e^{-4}$	$4.0e^{-9} \pm 0.5e^{-10}$	2.1 ± 1.3
fH67 _{R341A,H337A} [*]	$1.4e^3, 1.7e^3$	$4.6e^{-3}, 6e^{-3}$	$2.7e^{-6}, 2.8e^{-6}$	2.3, 4.7
fH78	未测得结合			

* 所列数值来自两次独立实验

图1(续)

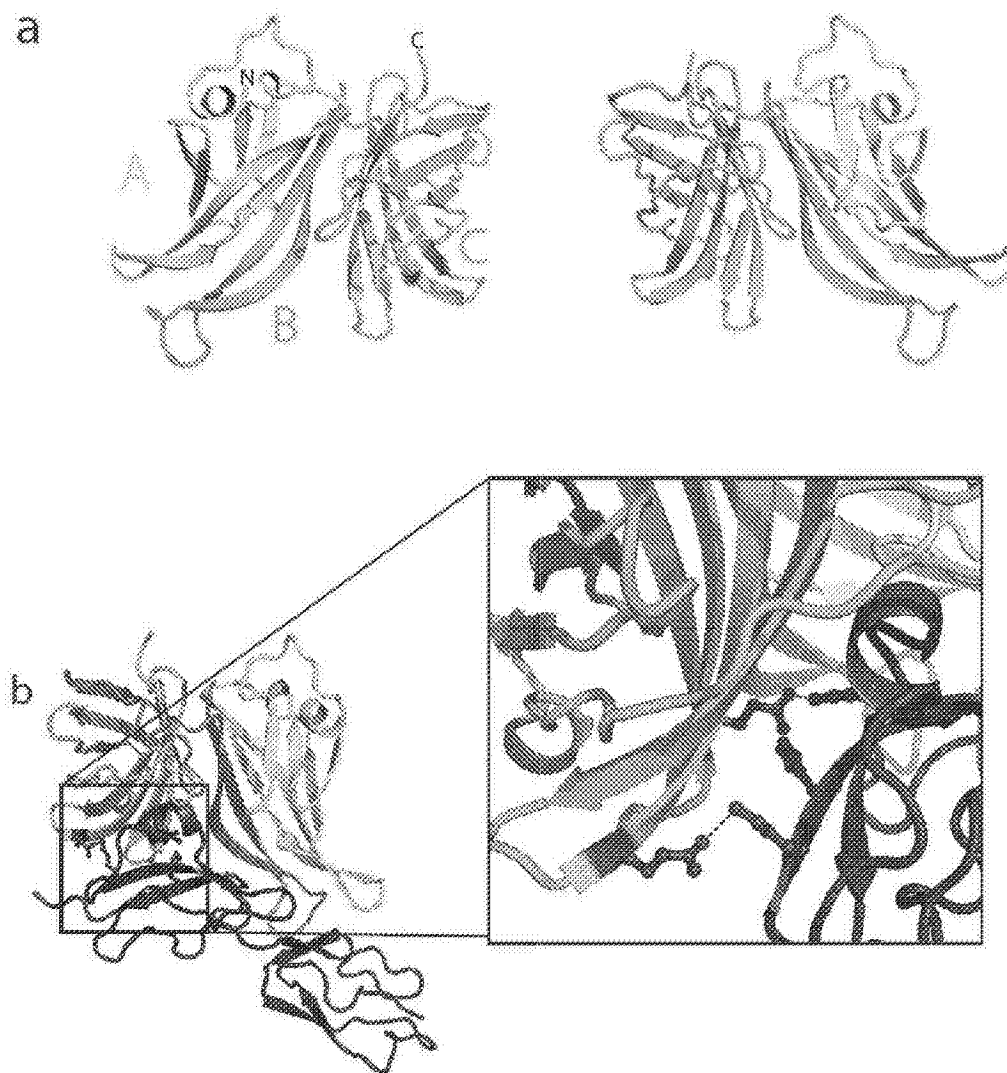
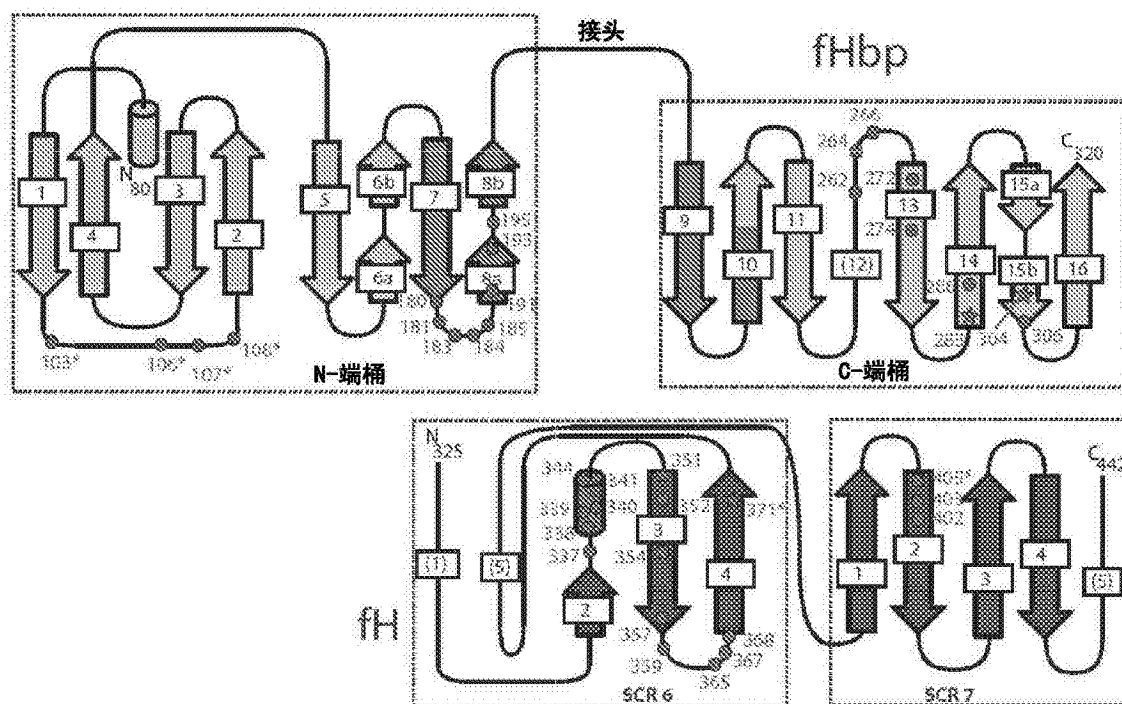


图2

C



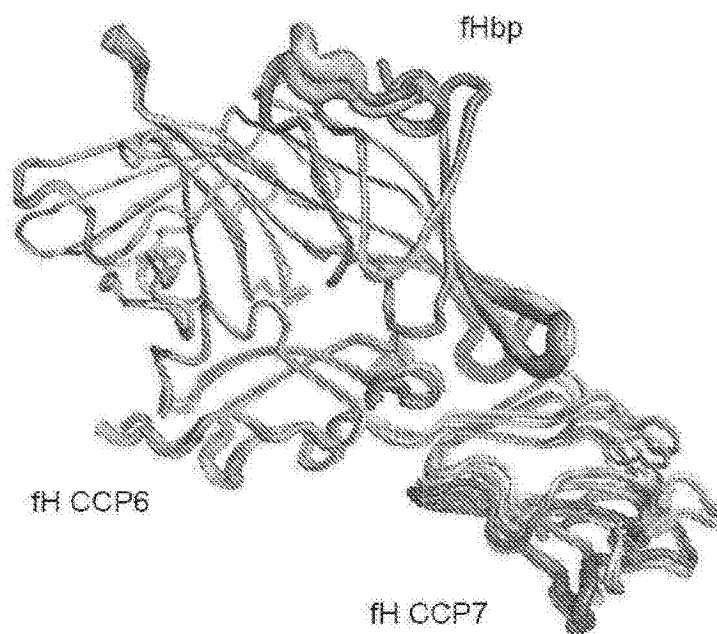


图4

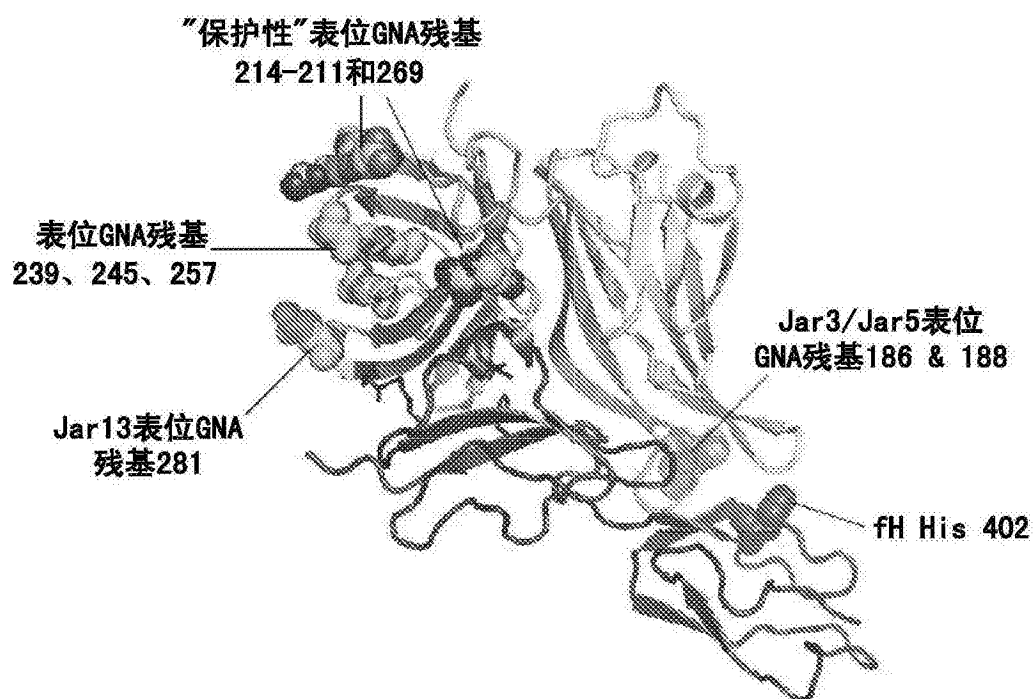


图5

1	MPSEPPFGRH LIFASLTCLI DAVCKKRYHN QNVYILSILR MTRSKPVNRT AFCCLSLTTA
61	LILTACSSGG GGVAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLOS LTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAEK
121	TYGNGDSLNT GKLNNDKVSFDFIRQIEVD GQLITLESGE FQVYKQSHSA LTAFAQTEQIQ
181	DSEHSGKMVA KRQFRIGDIA GEHTSFDKLP EGGRATYRGT AFGSDDAGGK LTYTIDFAAK
241	QGNKGIEHLK SPELNVDLAA ADIKPDGKRH AVISGSVLYN QAEKGSYS LGIFGKAQEV
301	GSAEVKTVNG IRHIGLA AKQ

图6

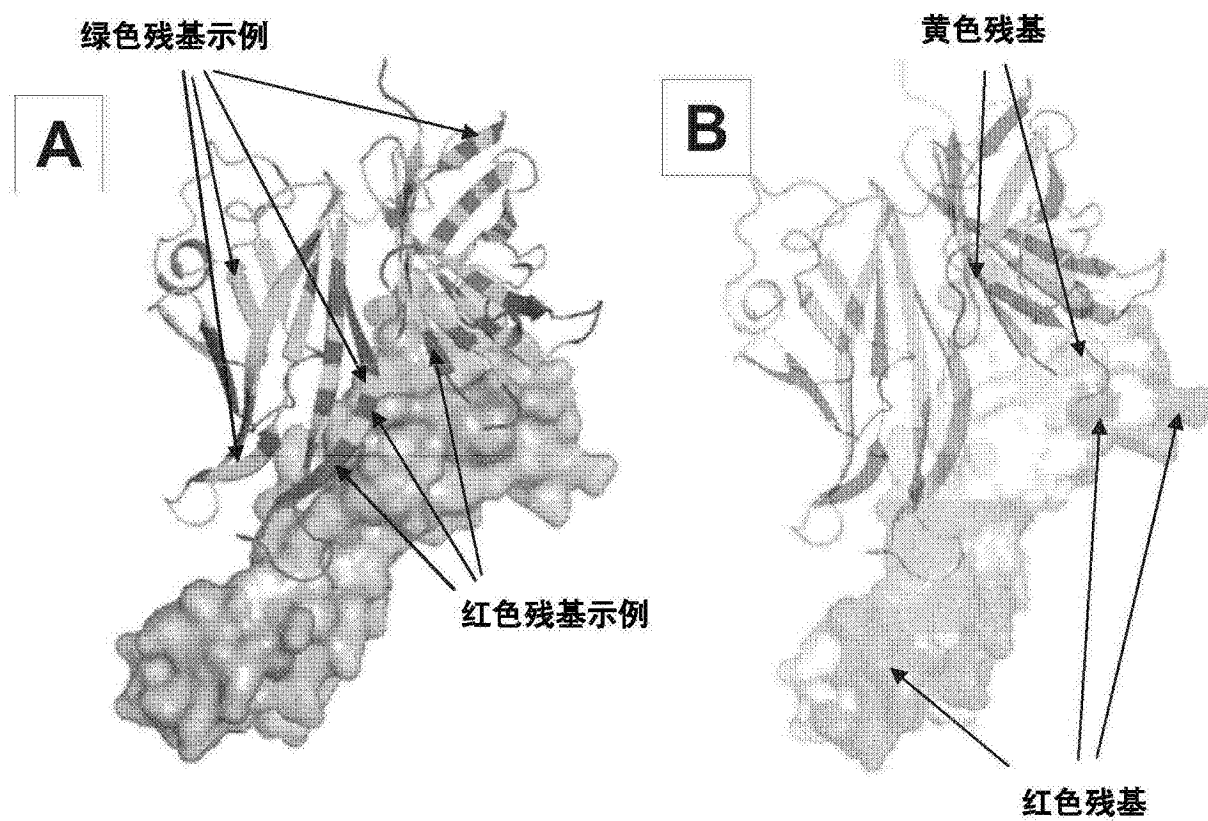
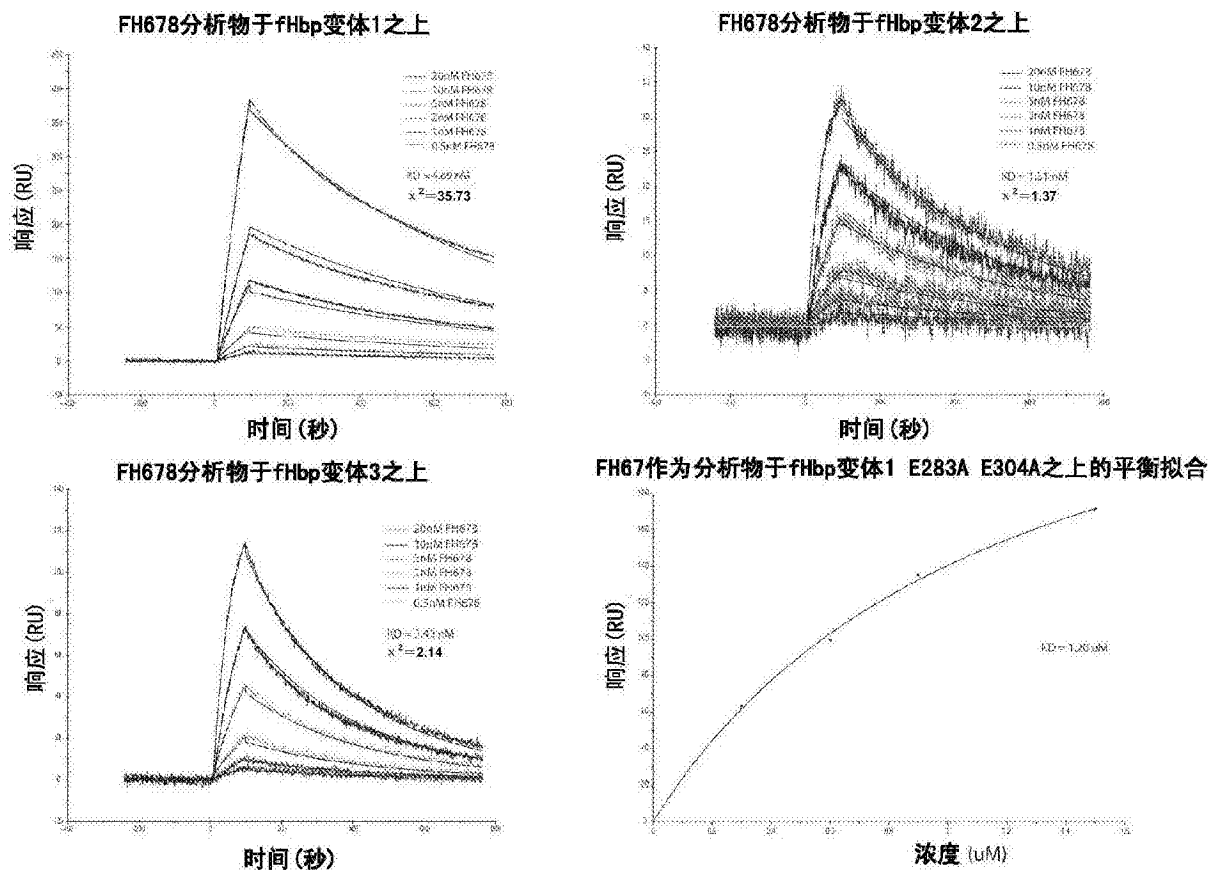


图7



	fHbp变体1	fHbp变体2	fHbp变体3	fHbp E283A E304A	NGO0033
FH67	5nM	2nM	3nM	1.2uM	6uM
FH678	5nM	2nM	3nM		
FH67 K351N Y452K	未测得结合				
FH67 N339E M340S	67nM	44nM	165nM	未测得结合	
FH67 H337Y R341L	未测得结合				

图8

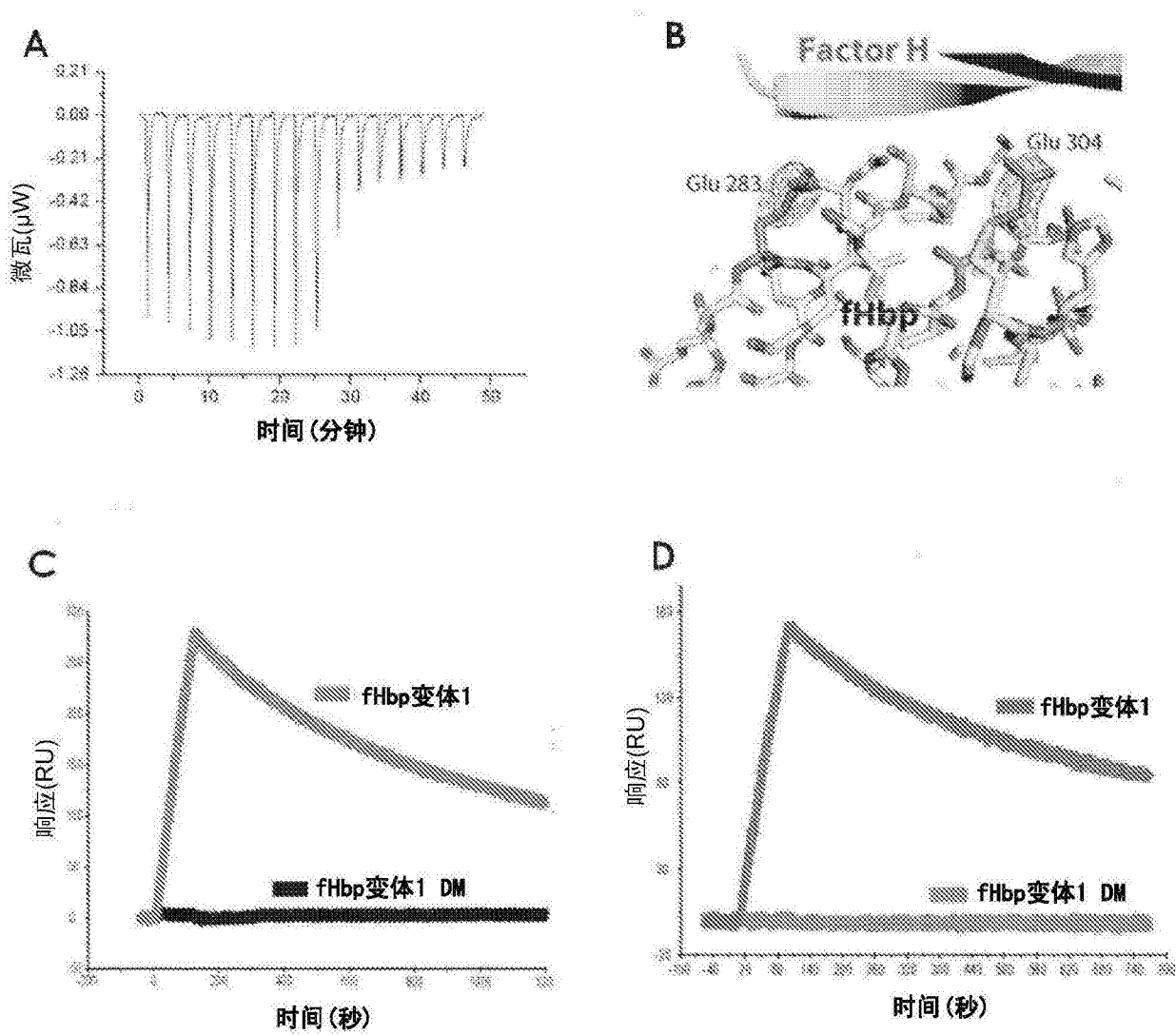


图9