

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99805601.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 3 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1245512C

[22] 申请日 1999.4.29 [21] 申请号 99805601.4

[30] 优先权

[32] 1998.4.29 [33] US [31] 60/083,405

[86] 国际申请 PCT/US1999/009486 1999.4.29

[87] 国际公布 WO1999/055875 英 1999.11.4

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.27

[71] 专利权人 惠氏控股有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 T·N·梅特卡夫三世

R·J·扎古尔斯基 P·奥依

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

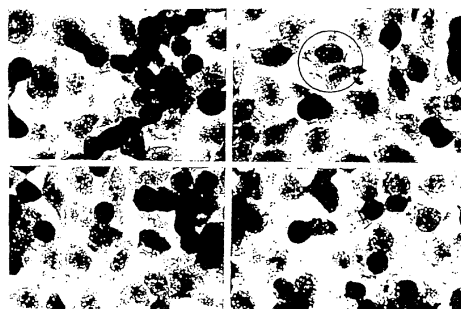
权利要求书 4 页 说明书 54 页 附图 8 页

[54] 发明名称

含重组菌毛蛋白的抗淋病奈瑟氏球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌的疫苗

[57] 摘要

分别克隆了淋病奈瑟氏球菌和脑膜炎奈瑟氏球菌的 pilE 基因，并表达它们相应的重组菌毛蛋白。另外，构建了一个嵌合的 pilE 基因，其中编码菌毛蛋白氨基端区域的 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌 pilE 基因区域用淋病奈瑟氏球菌 pilE 基因的相应区域置换。该重组脑膜炎球菌 I 类菌毛蛋白的表达水平高于由脑膜炎奈瑟氏球菌全长 pilE 基因表达的菌毛蛋白。另外，构建了一个嵌合的 pilE 基因，其中编码菌毛蛋白羧基端区域的 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌 pilE 区域用淋病奈瑟氏球菌 pilE 基因的相应区域置换。该重组的菌毛蛋白可用于疫苗以保护机体抵抗由淋病奈瑟氏球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌所致的疾病。



1. 一种疫苗组合物，其特征在于，它包含分离纯化的重组表达的奈瑟氏属菌毛蛋白，所述菌毛蛋白由以下三个区域组成：(a) 高度保守的氨基端区域；(b) 中间区域，该区显示有限量的序列变异和 (c) 蛋白的第三部分羧基端，其中所述的疫苗组合物在人宿主内能引发保护性免疫应答。
2. 如权利要求 1 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的菌毛蛋白来自淋病奈瑟氏球菌。
3. 如权利要求 1 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的菌毛蛋白来自脑膜炎奈瑟氏球菌。
4. 如权利要求 3 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的菌毛蛋白是脑膜炎奈瑟氏球菌 I 类菌毛蛋白。
5. 如权利要求 3 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的菌毛蛋白是脑膜炎奈瑟氏球菌 II 类菌毛蛋白。
6. 如权利要求 1 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的菌毛蛋白是淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白，所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1-167 的氨基酸序列，或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8-167 的氨基酸序列。
7. 如权利要求 1 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的疫苗组合物还包含佐剂、稀释剂或载体。
8. 如权利要求 7 所述的疫苗组合物，其特征在于，所述的佐剂选自：氢氧化铝、磷酸铝、StimulonTM QS-21、3-O-脱酰单磷酸脂 A、IL-12 和野生型或突变型霍乱毒素。
9. 权利要求 2 所述的疫苗组合物的用途，其特征在于，该疫苗组合物用于制备抗淋病奈瑟氏球菌的药物。
10. 权利要求 3 所述的疫苗组合物的用途，其特征在于，该疫苗组合物用于制备抗淋病奈瑟氏球菌的药物。
11. 权利要求 6 所述的疫苗组合物的用途，其特征在于，该疫苗组合物用于制备抗淋病奈瑟氏球菌的药物。
12. 权利要求 3 所述的疫苗组合物的用途，其特征在于，该疫苗组合物用于制备抗脑膜炎奈瑟氏球菌的药物。
13. 权利要求 2 所述的疫苗组合物的用途，其特征在于，该疫苗组合物用于

制备抗脑膜炎奈瑟氏球菌的药物。

14. 权利要求 6 所述的疫苗组合物的用途, 其特征在于, 该疫苗组合物用于制备抗脑膜炎奈瑟氏球菌的药物。

15. 一种制备权利要求 1 的疫苗组合物的方法, 其特征在于, 该方法包括步骤: 加入剂量足以使所述疫苗组合物在人宿主内引发保护性免疫应答的, 分离纯化的重组表达的奈瑟氏属菌毛蛋白, 所述菌毛蛋白由以下三个区域组成: (a) 高度保护的氨基端区域; (b) 中间区域, 该区显示有限量的序列变异和 (c) 蛋白的第三部分羧基端。

16. 一种分离和纯化的 DNA 序列, 其特征在于, 所述的 DNA 序列包含编码淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列, 所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1-167 的氨基酸序列, 或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8-167 的氨基酸序列。

17. 如权利要求 16 所述的分离纯化的 DNA 序列, 其特征在于, 所述的 DNA 序列具有 SEQ ID NO: 1 核苷酸 1-501 或 22-501 的核苷酸序列。

18. 一种质粒, 其特征在于, 所述的质粒包含有一种分离和纯化的 DNA 序列, 该序列包含编码淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列, 所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1-167 的氨基酸序列, 或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8-167 的氨基酸序列。

19. 如权利要求 18 所述的质粒, 其特征在于, 所述的质粒包含具有 SEQ ID NO: 1 核苷酸 1-501 或 22-501 核苷酸序列的 DNA 序列。

20. 如权利要求 19 所述的质粒, 其特征在于, 所述的质粒被命名为 ATCC 98637。

21. 一种用权利要求 18 所述质粒转化的宿主细胞。

22. 如权利要求 21 所述的宿主细胞, 其特征在于, 所述的宿主细胞是大肠埃希氏菌菌株。

23. 如权利要求 22 所述的宿主细胞, 其特征在于, 所述的质粒被命名为 ATCC 98637。

24. 一种产生淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白的方法, 其特征在于, 该方法包括: 用权利要求 19 所述的质粒转化或转染宿主细胞, 以及在允许宿主细胞表达所述嵌合重组菌毛蛋白的条件下培养该宿主细胞。

25. 一种分离和纯化的淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白, 其特征在于, 所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1-167

的氨基酸序列,或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8-167 的氨基酸序列。

26. 如权利要求 1 所述的疫苗组合物,其特征在于,所述的菌毛蛋白是淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白,所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 1-170 的氨基酸序列,或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 8-170 的氨基酸序列。

27. 权利要求 26 所述的疫苗组合物的用途,其特征在于,用于制备抗淋病奈瑟氏球菌的药物。

28. 权利要求 26 所述的疫苗组合物的用途,其特征在于,用于制备抗脑膜炎奈瑟氏球菌的药物。

29. 一种分离和纯化的 DNA 序列,其特征在于,所述的 DNA 序列包含编码淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列,所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 1-170 的氨基酸序列,或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 8-170 的氨基酸序列。

30. 如权利要求 29 所述的分离和纯化的 DNA 序列,其特征在于,所述的 DNA 序列具有 SEQ ID NO: 3 核苷酸 1-510 或 22-510 核苷酸序列的 DNA 序列。

31. 一种质粒,其特征在于,所述的质粒包含一种分离和纯化的 DNA 序列,该序列包含编码淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列,所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 1-170 的氨基酸序列,或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 8-170 的氨基酸序列。

32. 如权利要求 31 所述的质粒,其特征在于,所述的质粒包含具有 SEQ ID NO: 3 核苷酸 1-510 或 22-510 核苷酸序列的 DNA 序列。

33. 如权利要求 31 所述的质粒,其特征在于,所述的质粒被命名为 ATCC 207199。

34. 一种用权利要求 31 所述质粒转化的宿主细胞。

35. 如权利要求 34 所述的宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞是大肠埃希氏菌菌株。

36. 如权利要求 35 所述的宿主细胞,其特征在于,所述的质粒被命名为 ATCC 207199。

37. 一种产生淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的方法,其特征在于,该方法包括:用权利要求 31 所述的质粒转化或转染宿主细胞,以及在允许宿主细胞表达所述嵌合重组菌毛蛋白的条件下培养该宿主细胞。

38. 一种分离和纯化的淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白, 所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 1-170 的氨基酸序列, 或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 8-170 的氨基酸序列。

5

含重组菌毛蛋白的抗淋病奈瑟氏球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌的疫苗

5 发明领域

本发明涉及在疫苗中采用重组菌毛蛋白来保护机体预防淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)或脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)引起的疾病。

发明背景

10 淋病奈瑟氏球菌(*N. gonorrhoeae*)和脑膜炎奈瑟氏球菌(*N. meningitidis*)是革兰氏阴性球菌。淋病奈瑟氏球菌和脑膜炎奈瑟氏球菌基因上非常相近,但在它们所致疾病的临床表现上差别很大。淋病奈瑟氏球菌造成淋病,而脑膜炎奈瑟氏球菌导致脑膜炎球菌性脑膜炎。这些奈瑟菌属的细菌存在于机体的粘膜表面。

IV 型菌毛是许多革兰氏阴性细菌表面的非鞭毛性毛状结构,这些革兰氏阴性细菌包括:偶蹄形菌属(原来的类杆菌属)的节瘤偶蹄形菌,啮蚀艾肯菌,反硝化(脱氮)金氏菌,牛莫拉氏菌,腔隙莫拉氏菌,不液化莫拉氏菌,淋病奈瑟氏球菌,脑膜炎奈瑟氏球菌和铜绿假单胞菌(Bibliography Entries 1,2)。霍乱弧菌的毒素共调节菌毛和肠致病性大肠杆菌的束形成菌毛表现出与 IV 型菌毛有限数量的相似性,据认为是远亲关系(1,2)。对于淋球菌和脑膜炎球菌来说,有菌毛的细菌比无菌毛的细菌黏附于各种人上皮细胞的亲和力高得多,所以认为菌毛是使微生物锚着于粘
20 膜感染部位的毒力因子。

IV 型菌毛宽为 5—7nm,长度为 5 μ m。菌毛蛋白的亚基串联连接形成长而细的聚合体。对于致病奈瑟氏菌属,菌毛外观是天然的均聚物,由单一结构的亚基组成菌毛蛋白。菌毛蛋白的分子量为 13,000—22,000 道尔顿(1,2,3)。

菌毛蛋白天然装配到细菌外膜称为菌毛的螺旋结构中,该外膜的分子量约为
25 10⁷ 道尔顿。当纯化的菌毛用 pH12 的磷酸缓冲液透析时,完整的菌毛不可逆的分解成菌毛蛋白凝聚物称为菌毛蛋白寡聚体(4)。这些菌毛寡聚体的凝聚物的大小(分子量约为 600,000 道尔顿)比完整的菌毛要小得多。

淋病奈瑟氏球菌表达的单一菌毛蛋白被最先由 Schoolnik 和其合作者分离出,并测序(5)。淋球菌菌毛蛋白由以下三个区域组成:(a)高度保守的氨基端区域
30 (残基 1—53);(b)中间区域(残基 54—124)该区显示有限量的序列变异和(c)蛋白的第三部分为羧基端(残基 125—160),含有高度可变的二硫环。

在天然感染过程中,菌毛经历高频率的时象和抗原性变异(3,6)。这种变

异的遗传学特别复杂，已经进行了广泛的研究。每株淋球菌都有能力改变菌毛分子的一级氨基酸序列，从而改变其菌毛的抗原性质。负责这种变异的分子机理涉及：表达基因座（*pilE*）和众多（17 到 19）非启动子沉默（*pilS*）基因之间的非互换性重组（6）。菌毛序列（或其部分）从 *pilS* 基因座移动到一个表达基因座，产生新的菌毛变异，从而使淋球菌能够表达极其大量的菌毛蛋白。

与淋球菌相反，脑膜炎球菌只表达两种不同种类的菌毛，称为 I 类和 II 类菌毛。和淋球菌一样，脑膜炎球菌 I 类菌毛经历抗原性和时象的变异（3）。I 类菌毛显示与淋球菌菌毛分子量（17—20kd）相似，和单克隆抗体（SM1）的反应性相似（该单抗与淋球菌菌毛上高度保守的表位结合）（3）。已克隆了许多 I 类菌毛，显示氨基酸序列与淋球菌菌毛的序列有高度相似性（7）。相反，II 类菌毛不与 SM1 抗体反应，而且分子量也较低（13—16kd）。表达 II 类菌毛的几个菌株显示能与抗淋球菌菌毛的多克隆抗血清起反应。Aho 等人（7）最近确定了 II 类菌毛的序列。奈瑟氏菌菌毛三个区域的第一个区域基本上是相同的。II 类菌毛蛋白与 I 类菌毛和淋球菌菌毛的不同在于高变区有大缺失发生。Achtman 等人（8）采用 I 类或 II 类菌毛的特异性单克隆抗体，证明了非洲的一些血清群 A 分离物与两种抗体都结合。已经证明了表达 I 类菌毛的菌株也截除了沉默的 I 类菌毛基因（7）。结合起来看，这些资料提示一个脑膜炎球菌单细胞同时表达两种菌毛蛋白的可能性。

由于认为是菌毛介导了与粘膜细胞的最初接触，所以值得感兴趣的是将这些结构作为疫苗抗原来预防菌毛细菌造成的疾病。在人群中进行了菌毛疫苗预防旅行者腹泻和淋病的试验（9）。然而，至今它们只对同源菌株有效。据报道一些以菌毛为基础的疫苗已用于家畜患的疾病，如牛传染性角结膜炎（红眼）（1），羊脚腐烂症（1，10）和幼猪（9）或小牛（9）腹泻。在每种这类兽医研究的例子中，菌毛疫苗提供了免受表达同源而不是异源菌毛菌株攻击的保护。

最早的淋球菌疫苗包含整个微生物体，但提供很少或不提供保护作用。最近抗淋病疫苗的开发着重于纯化的表面组分，特别是菌毛（9，11）和孔蛋白（P.I 或 Por）（11）。然而至今，只有菌毛显示出能保护人体免受攻击，而且这限于保护人体抵御同源菌株（12）。已显示淋球菌菌毛的变性形式（4）能在小鼠和豚鼠中产生可在体外结合异源菌毛的抗体。然而，并不认为这是商业上可行的方法，因为在液体培养基（商业生产必需的）中带菌毛的淋球菌很难生长（1）。以初步人攻击研究的成功为基础，在一项大规模安慰剂对照双盲效力实验中进行了淋球菌菌毛疫苗的测试（12）。在该实验中，此疫苗不能保护男性志愿者避免淋球菌

感染。推测该情况最可能的解释为菌毛的不均一性（12）。

确实淋球菌和脑膜炎球菌的菌毛蛋白的抗原性变异，是以菌毛为基础的疫苗开发中反复被列举的一个主要障碍（3，13，14，15，16，17）。已有人提出：装配的完整菌毛上的优势免疫表位是二硫环，该环呈现出最大的序列变异（17，18）。

5 这就解释了用福尔马林处理的淋球菌菌株 Pgh3-2 的完整菌毛，在韩国现场实验失败的原因（12）。另外，本文包括的一些参考文献，其中谈及抗纯化的菌毛，或菌毛蛋白片段的抗血清，能结合于变性（Western 印迹）或分离的奈瑟氏菌毛，但不与细菌表面的异源菌毛结合（16，17，19，20）。还没有完全弄清楚这是由于装配的菌毛中表位的抗原性变异或隐蔽所致。一些报道强调了这一点，这些报道证明只有在体外呈现出功能活性的单克隆抗体，才是那些不与异源菌毛结合的抗体（3）。牛莫拉氏菌和节瘤偶蹄形菌的完整菌毛显示菌毛引发保护性免疫应答是可能的（10）。然而这些疫苗只能保护机体抵抗表达同源菌毛而不是异源菌毛的细菌的攻击（10，21）。科学界一致认为看来以菌毛为基础的疫苗，如果可能，将只保护机体预防表达同源菌毛的细菌。

15 重组表达装配的菌毛在许多微生物体中都已描述，其依赖于适当的转运和装配基因（22）。对于奈瑟氏菌，在一个连续操纵子中没有发现编码参与菌毛装配和转运蛋白的基因，所以这种方法是不可行的。在欧洲专利 202,260 B1 中选择的另一种替代方法是在某种细菌宿主（该宿主已经具有装配不同 IV 菌毛所需的蛋白；如铜绿假单胞菌）中表达 IV 菌毛基因（23）。但如 Hoynes 等人所报道，在假单胞菌属外膜上表达和装配淋球菌菌毛是不稳定的（24）。当此种重组菌株在存在选择性抗菌素的液体培养基中生长时，野生型带菌毛的假单胞菌属会过度生长。作者陈述如下：

25 “宿主菌株中外源 mePhe（N-甲基苯丙氨酸）菌毛蛋白产物的相容性将依赖宿主和供体菌毛蛋白装配系统的趋异程度。观察到的表达淋球菌菌毛蛋白的 PAK/2PfS（铜绿假单胞菌 K/2PfS 株）的不稳定性…可能表明 mePhe 菌毛种间表达受限在于该例子中所用的方法。”（24）

由于该结果，在假单胞菌属中表达淋球菌菌毛不能认为是商业上可行的方法。

Elleman、Egerton 和合作者描述了用节瘤偶蹄形菌的完整菌毛开发抵抗羊脚腐烂病的疫苗。现场实验显示完整的菌毛保护了动物预防了表达同源菌毛的节瘤偶蹄形菌感染。这意味着商品疫苗必需含有 8 或 9 种不同的菌毛，以实现全面保护。为了使该方法可行，克隆了节瘤偶蹄形菌的菌毛基因，并在大肠杆菌中表达（25）。发现重组菌毛蛋白与内膜结合。当在一次攻击试验中测试含有表达重组

菌毛蛋白的大肠杆菌（超声处理过的）细胞疫苗时，重组大肠杆菌细胞产生的抗体滴度与纯化的天然菌毛的相似（25）。然而，重组大肠杆菌细胞疫苗产生的凝集滴度比完整菌毛的（690 对 47,800）明显要低，并低于保护性相关的滴度（5,000—10,000）（25, 26）。

- 5 在用节瘤偶蹄形菌作活性攻击后，与完整菌毛所显示的相反，重组菌毛蛋白疫苗不能显示出任何显著的保护活性。Emery 和其合作者显示完整菌毛的变性废除了菌毛在动物中诱导保护的能力（27）。另外，用去污剂（辛烷基- β -D-葡萄糖苷）或低 pH（2.2）解离的菌毛恢复了该蛋白的效力（引发保护避免攻击后严重病变的形成）（28）。而不管各组之间抗体滴度事实上没有显著区别。作者
- 10 陈述说“可能有 1 个或多个与四级结构相关的表位（以被处理所破坏）”。他们进一步陈述说：

- “大肠杆菌表达产物作疫苗失败，可能是由于其在宿主细胞膜上的物理性吸留造成的，虽然初步实验表明这不是造成它无效的主要原因（没有显示数据）。对于大肠杆菌表达产物作疫苗失败的另一种解释为：
- 15 表达的单元前菌毛蛋白单元可能由于前导序列的存在，不能结合到天然构象中（以适当呈递重要的表位）。”（28）。

- Elleman 和其合作者证实在重组菌毛蛋白上存在构象表位的重要性，并证实它们需要通过抗原的更好呈递来增加免疫应答。他们建议两种方法：从大肠杆菌膜纯化该蛋白；或在铜绿假单胞菌中表达该蛋白，使其可装配到细胞表面的纤丝
- 20 菌毛中。后一种方法是较佳的，因为“这将大大改善免疫原性并且简化蛋白的纯化”（25）。

另外，Elleman 和其合作者也回顾了采用菌毛蛋白（菌毛的亚基蛋白）作为节瘤偶蹄形菌成熟纤丝菌毛完整的下等候选疫苗：

- “成熟菌毛看来比同剂量的纤丝菌毛亚基蛋白可引起更强烈和适当
- 25 （即，K-凝集）的免疫反应。在血清学上约 5,000 的 K-凝集滴度一般认为是最小应答，该最小应答与抵抗某给定节瘤偶蹄形菌菌株感染的足够保护性免疫力相当。这样应答的水平（达到更高的数量级）容易通过接种成熟菌毛疫苗而实现，但接种分离的亚基蛋白（只能引发低水平的血清 K-凝集抗体）不能实现”（23）。

- 30 最近 Alves 等人报道了附加的数据，提示纤丝菌毛亚基蛋白不适宜合作候选疫苗（29）。当小鼠免疫接种了编码大肠杆菌 CFA/I 菌毛黏附素蛋白（如菌毛蛋白）的多核苷酸疫苗时，诱导产生的抗体与天然完整 CFA/I 菌毛诱导产生的不同。此

外，这些抗重组蛋白的抗体与抗天然蛋白的抗血清相反，没有表现出任何凝集活性。

除了上述工作外，也开发了一种有效的以菌毛为基础的淋球菌或脑膜炎球菌疫苗。脑膜炎球菌疫苗限于那些具有血清型 A、C、Y 和 W135 荚膜的疫苗。

- 5 因此，需要鉴定用于保护机体抵抗由淋球菌或脑膜炎球菌所有血清型造成的疾病的疫苗中的组份。

发明概要

- 由此，本发明的一个目的是分别鉴定由淋球菌和脑膜炎球菌衍生的合适的抗原性结构，其可能组成抵抗这些细菌的可行性候选疫苗。这些候选疫苗必需能诱导、体识别并结合各致病性奈瑟氏菌的多种分离物的抗体。
- 10

下述本发明的这些和其它目的是通过克隆和表达淋球菌和脑膜炎球菌的重组菌毛蛋白（rpilin）而实现。

- 本发明还涉及一种质粒的构建，该质粒表达脑膜炎球菌嵌合的 I 类菌毛蛋白，其中 I 类脑膜炎球菌菌毛蛋白的氨基端区域被淋球菌菌毛蛋白相应的氨基端区域
- 15
- 置换。该质粒表达的脑膜炎球菌嵌合性 I 类重组菌毛蛋白的量显著高于全长脑膜炎球菌 pilE 基因表达的 I 类脑膜炎球菌重组菌毛蛋白的量。

- 为了得到脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白的表达，将嵌合 DNA 序列首先插入到一个适当的质粒载体中。然后用该质粒转化或转染一个适当的宿主细胞。在本发明的一实施例中，宿主细胞是大肠杆菌菌株。然后在使宿主细胞表达所述
- 20
- 嵌合的 I 类重组菌毛蛋白的条件下，培育该宿主细胞。

本发明还涉及构建一种质粒，该质粒表达脑膜炎球菌嵌合的 II 类菌毛蛋白，其中 II 类脑膜炎球菌菌毛蛋白的羧基端区域被淋球菌菌毛蛋白相应的羧基端区域置换。

- 为了得到脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白的表达，将嵌合 DNA 序列首先插入到一个适当的质粒载体中。然后用该质粒转化或转染一个适当的宿主细胞。在本发明的一实施例中，宿主细胞是大肠杆菌菌株。然后在使宿主细胞表达所述
- 25
- 嵌合的 II 类重组菌毛蛋白的条件下，培育该宿主细胞。

- 在本发明的另一实施例中，将分离和纯化的重组菌毛蛋白（淋球菌、脑膜炎球菌或嵌合的）用于制备疫苗组合物，它包含分离纯化的重组表达的奈瑟氏属菌
- 30
- 毛蛋白，所述菌毛蛋白由以下三个区域组成：（a）高度保护的氨基端区域；（b）

中间区域，该区显示有限量的序列变异和 (c) 蛋白的第三部分羧基端，该组合物在哺乳动物宿主中能引发保护性免疫应答。此疫苗组合物可进一步包括佐剂、稀释剂或载体。佐剂的例子包括氢氧化铝、磷酸铝、MPL™、Srimulon™、QS-21、IL-12 和霍乱毒素。将此疫苗组合物以足够的免疫原性量给予哺乳动物宿主，以

5 保护宿主抵抗淋球菌或脑膜炎球菌造成的疾病。

本发明的第二个方面包括制备上述疫苗组合物的方法，包括步骤：加入剂量足以使所述疫苗组合物在人宿主内引发保护性免疫应答的，分离纯化的重组表达的奈瑟氏属菌毛蛋白，所述菌毛蛋白由以下三个区域组成：(a) 高度保护的氨基端区域；(b) 中间区域，该区显示有限量的序列变异和 (c) 蛋白的第三部分羧基

10 端。

本发明的第三个方面包括一种分离和纯化的 DNA 序列，包含有编码淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列，所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1-167 的氨基酸序列，或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8-167 的氨基酸序列。

15 在本发明的第四个方面，包括在标准的高度严谨 Southern 杂交条件下，能与上述 DNA 序列杂交的分离和纯化的 DNA 序列。

本发明的第五个方面包括一种质粒，包含有一种分离和纯化的 DNA 序列，该序列包含在标准的高度严谨 Southern 杂交条件下，能与上述编码淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列杂交的 DNA 序列，

20 所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1-167 的氨基酸序列，或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8-167 的氨基酸序列。

本发明的第六个方面包括一种质粒，该质粒含有上述分离和纯化的编码淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列。

本发明的第七个方面公开了用上述第五个方面所述的质粒转化的宿主细胞。

25 本发明的第八个方面公开了一种产生淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白的方法，包括：用上述第五个方面所述的质粒转化或转染宿主细胞，以及在允许宿主细胞表达所述嵌合重组菌毛蛋白的条件下培养该宿主细胞。

本发明的第九个方面包括一种分离和纯化的淋病奈瑟氏球菌和 I 类脑膜炎奈

瑟氏球菌的嵌合重组菌毛蛋白，在加工前具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 1—167 的氨基酸序列，或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸 8—167 的氨基酸序列。

本发明的第十个方面公开了用上述疫苗组合物制备免疫淋病奈瑟氏球菌的药物的用途。

本发明的第十一个方面公开了用上述疫苗组合物制备抗脑膜炎奈瑟氏球菌的药物的用途。

本发明的第十二个方面公开了一种分离和纯化的 DNA 序列，包含有编码淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的 DNA 序列，所述的菌毛蛋白在加工前具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 1—170 的氨基酸序列，或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 8—170 的氨基酸序列。

本发明的第十三个方面公开了一种分离和纯化的 DNA 序列，在标准的高度严谨 Southern 杂交条件下，能与上述第十二个方面所述的 DNA 序列杂交。

本发明的第十四个方面包括一种质粒，它包含本发明第十三个方面的分离和纯化的 DNA 序列。

本发明的第十五个方面包括一种质粒，包含第十二个方面的 DNA 序列。

本发明的第十六个方面包括用第十四个方面的质粒转化的宿主细胞。

本发明的第十七个方面包括一种产生淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白的方法，包括：用第十四个方面的质粒转化或转染宿主细胞，以及在允许宿主细胞表达所述嵌合重组菌毛蛋白的条件下培养该宿主细胞。

本发明的第十八个方面包括一种分离和纯化的淋病奈瑟氏球菌和 II 类脑膜炎奈瑟氏球菌嵌合重组菌毛蛋白，在加工前具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 1—170 的氨基酸序列，或在加工成成熟蛋白后具有 SEQ ID NO: 4 氨基酸 8—170 的氨基酸序列。

附图简要说明

图 1 描绘了透射电子显微镜下淋球菌（菌株 I756 recA-）的带菌毛细胞，与豚鼠抗淋球菌重组菌毛蛋白（从菌株 Pgh3-1 得到的）抗血清（1: 50 稀释 15 分钟）培育后，与驴抗豚鼠 IgG 偶联的 12nm 胶体金（1: 5 稀释，30 分钟）反应，

再用 NanoVan 染色。图 1A 为抗重组菌毛蛋白豚鼠免疫血清（第 6 周）；图 1B 为正常豚鼠血清（第 0 周）；图 1C 无第一抗体（primary antibody）。

图 2 描绘了豚鼠抗淋球菌重组菌毛蛋白（从菌株 Pgh3-1 得到的）抗血清，对带菌毛的淋球菌细胞（菌株 I756 recA-）附着人子宫颈细胞（ME180 细胞系）的作用。图 2A 描绘了豚鼠抗淋球菌重组菌毛蛋白抗血清对该附着的抑制（第 6 周）；图 2B 描绘了正常豚鼠抗血清不能防止带菌毛的淋球菌细胞附着子宫颈细胞（第 0 周）。圈出了每组实验中结合于子宫颈细胞的细菌的代表性丛集的大小。每组实验显示了同一实验条件下四个不同的视野。每组实验豚鼠抗血清作 1: 10, 000 稀释。

图 3 描绘了透射电子显微镜下脑膜炎球菌（菌株 H355）的带菌毛细胞，与豚鼠抗脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白（从菌株 H44/76 得到的）抗血清（1: 60 稀释 30 分钟）培育后，与驴抗豚鼠 IgG 偶联于 12nm 胶体金（1: 5 稀释，30 分钟）反应，再用 NanoVan 染色。图 3A 为抗重组菌毛蛋白豚鼠免疫血清（第 6 周）；图 3B 为正常豚鼠血清（第 0 周）；图 3C 无第一抗体。细胞与抗血清培育前已固定。

发明详述

本发明涉及含有淋球菌或脑膜炎球菌重组菌毛蛋白的疫苗组合物。尽管上面讨论了许多，仍决定研究大肠杆菌中表达的这种重组菌毛蛋白的用途。令人惊讶的是，这些重组菌毛蛋白显示出候选疫苗的特征。

描述在大肠杆菌中克隆淋球菌 pilE 基因的第一个报道是 1982 年（30）。从此，对 pilE 的分子特征进行了大量的下述遗传因子的实验室研究，这些遗传因子控制着菌毛蛋白的表达、菌毛蛋白的转运、菌毛蛋白序列的变异和菌毛的宿主黏着特性。然而，没有一个报道描述了重组菌毛蛋白的纯化或重组表达菌毛蛋白的免疫应答。

下述的实施例 2 描述了编码淋球菌重组菌毛蛋白的 pilE 基因的克隆和表达。表达通过用含有 pilE 基因的质粒转化命名为 TOP10F' 的大肠杆菌菌株而实现。成功的克隆和表达后，通过 pilE 基因的测序证实与天然序列的相同性。为了有助于

克隆, 引入了 NcoI2 位点 (要求修饰一个碱基)。结果, 在七个氨基酸长信号肽中的第二氨基酸从天冬酰胺变为天冬氨酸。

实施例 2 中含 pilE 基因的质粒 (命名为 pPX2000) 包含有一个氨苄青霉素抗性 (Amp^R) 标记。如实施例 3 中所述, 构建了另一个含有卡那霉素抗性 (Kan^R) 标记, 而不是 Amp^R 的质粒。该质粒命名为 pPX2002, 在其转化大肠杆菌 TOP10F' 菌株后, 表达了淋球菌重组菌毛蛋白, 水平类似于 pPX2000 (含有 Amp^R 标记) 所得到的水平。

如实施例 4 所述, 用相似的方案构建了命名为 pPX2003 含有脑膜炎球菌 I 类菌毛基因的一个质粒。引入 NcoI 位点 (CC ATG G), 跨越编码信号肽基因的起始端。这将信号肽第二氨基酸残基从天冬酰胺变为天冬氨酸 (第一残基仍为甲硫氨酸)。还包括一个 Amp^R 标记。将该构建物转化大肠杆菌 TOP10F' 菌株后, 表达了脑膜炎球菌 I 类重组菌毛蛋白。然而, 其表达的水平显著低于 pPX2000 或 pPX2002 得到的淋球菌重组菌毛蛋白。不受理论的束缚, 这种较低的表达水平可能是由于大量的反向重复序列 (出现于重组 I 类 pilE 中) 所致。

为了增加脑膜炎球菌菌毛蛋白的表达, 如实施例 5 所述, 构建了一个嵌合质粒。pPX2003 中编码脑膜炎球菌 I 类重组菌毛蛋白的前 60 个氨基酸用 pPX2002 中淋球菌 DNA 的相应区域置换。结果产生的 Amp^R 质粒命名为 pPX2004, 其具有的核苷酸序列见 SEQ ID NO:1。用 pPX2004 质粒转化命名为 TOP10F' 的大肠杆菌 K12 菌株。诱导后, 与 pPX2003 表达的脑膜炎球菌重组菌毛蛋白的量相比, 表达的嵌合重组菌毛蛋白有了显著增加。该嵌合构建物的表达水平与 pPX2002 表达的淋球菌重组菌毛蛋白的量相当。嵌合的 I 类重组菌毛蛋白长度 167 个氨基酸 (包括信号序列) (SEQ ID NO: 2), 与预计的大小相符。

命名为 TOP10F' 的大肠杆菌 K12 菌株 (含有重组质粒 pPX2004), 于 1998 年 1 月 27 日由申请人保藏在由美国典型培养物保藏中心, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., 并已指定 ATCC 登录号为 ATCC98637。

如实施例 6 所述, 构建的嵌合质粒, 其脑膜炎球菌 II 类 pilE 基因的 3' 端被淋球菌的相应区域置换。具体说, pPX8001 中编码二硫环 (脑膜炎球菌菌株 FAM18 的脑膜炎球菌 II 类菌毛蛋白的最后 22 个氨基酸) 的 DNA 被 pPX2000 中淋球菌菌株 Pgh3-1 的淋球菌 (pilE) DNA 的相似 (但更大) 区域加上羧基端区域的附加部分 (共计 44 个氨基酸) 所置换。结果得到的 Amp^R 质粒命名为 pPX8017, 它具有的核苷酸序列见 SEQ ID NO:3, 其中核苷酸 1-378 来自脑膜炎球菌 II 类, 而

核苷酸 379—510 来自淋球菌。用质粒 pPX8017 转化命名 TOP10F' 的大肠杆菌 K12 菌株。诱导后，表达了嵌合的 II 类重组菌毛蛋白，其长度为 170 个氨基酸（包括 7 个氨基酸长的信号序列）（SEQ ID NO: 4），其中氨基酸 1—126 来自脑膜炎球菌 II 类，而氨基酸 127—170 来自淋球菌。该嵌合的 II 类重组菌毛蛋白与预计的大小相符。出于克隆考虑，将一个 NcoI 位点引入，故将信号序列中的第二个氨基酸从赖氨酸变为谷氨酸。预计这种变化不会对抗原性或免疫原性有任何影响。

携带重组质粒 pPX8017 的大肠杆菌 K12 菌株（称为 TOP10F'）的样品，由本申请人在 1999 年 4 月 15 日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)（10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A.），其 ATCC 登录号为 ATCC 207199。

除了实施例 2—6 中详细描述的主细胞—载体系统之外，各种不同的主细胞—载体系统都适合用于表达本发明疫苗中所用的淋球菌、脑膜炎球菌和嵌合重组菌毛蛋白。载体系统应与所用的主细胞相容。适合的宿主细胞包括：用质粒 DNA、粘粒 DNA 或嗜菌体 DNA 转化的细菌；病毒如牛痘病毒和腺病毒；酵母如 Pichia 细胞；昆虫细胞如 Sf9 或 Sf21 细胞；或哺乳动物细胞系如中国仓鼠卵巢细胞；以及其它常规生物体。

各种不同的常规转录和翻译元件可用于主细胞载体系统。将 pilE DNA 插入一个表达系统，并将启动子和其它控制元件连接到该载体的特定位置点，这样当将该质粒载体插入到主细胞时，主细胞可以表达 pilE DNA。

根据所用的主细胞载体系统，可通过转化、转导、转染或感染将质粒引入主细胞。然后，在主细胞可表达重组菌毛蛋白的条件下培育主细胞。

本发明还涉及一种分离和纯化的 DNA 序列，它包含的 DNA 序列编码脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白，该蛋白的氨基端区域来自淋球菌 pilE 基因而其中中央和羧基端区域来自脑膜炎球菌 pilE 基因（SEQ ID NO: 1）。SEQ ID NO: 1 中的核苷酸 1—501 编码加工前的脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白；核苷酸 22—501 编码加工后成为成熟蛋白的脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白。本发明还涉及脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白，该蛋白具有 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 1—167 的氨基酸序列（加工前）或 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 8—167 的氨基酸序列（加工后成为成熟蛋白）。由淋球菌重组菌毛蛋白或脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白构建物产生的总蛋白中约 10% 是缺少信号序列的，其已通过加工除去。

本发明还涉及一种分离和纯化的 DNA 序列，它包含的 DNA 序列编码脑膜炎

球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白，该蛋白的羧基端区域来自淋球菌 pilE 基因而其中
中央和氨基端区域来自脑膜炎球菌 pilE 基因 (SEQ ID NO: 3)。SEQ ID NO: 3 中
的核苷酸 1—510 编码脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白 (加工前)；核苷酸 22
—510 编码脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白 (加工后成为成熟蛋白)。本发
5 明另外还涉及脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白，该蛋白具有 SEQ ID NO: 4
中氨基酸 1—170 的氨基酸序列 (加工前) 或 SEQ ID NO: 4 中氨基酸 8—170 的
氨基酸序列 (加工后成为成熟蛋白)。

除了包含在 pPX2004 和 pPX8017 中的嵌合 DNA 序列 (分别编码脑膜炎球菌
嵌合的 I 类重组菌毛蛋白和脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白) 之外，本发明
10 还包括 (因为遗传密码的冗余性) 在生物学上等价于编码嵌合重组菌毛蛋白的 DNA
序列，也就是说，这些其它的 DNA 序列的特征，其是核苷酸序列与本文所示的
核苷酸序列虽然不同，但它们所编码的蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 或 SEQ
ID NO: 2 中的 DNA 序列所编码的相同。

具体地说，本发明包括那些与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的序列有足够相
15 同性，从而可以在高度严谨 Southern 杂交条件 (例如 Sambrook 等人 (31) 中所
述的条件) 下能杂交的 DNA 序列。

本发明也包括这样的 DNA 序列：它编码的氨基酸序列不同于脑膜炎球菌嵌
合的 I 类或 II 类的重组菌毛蛋白，但在生物学上等价于这些蛋白之一的氨基酸序
列 (SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4)。这些氨基酸序列可以说是与嵌合重组菌
20 毛蛋白的那些序列在生物学上等价，如果它们序列的区别只是重组菌毛蛋白序列
的微小缺失、插入或替代，从而使该序列的三级构象与重组菌毛蛋白的三级构象
相比基本上没有变化。

例如，氨基酸丙氨酸 (一种疏水性氨基酸) 的密码子可用编码另一疏水性较
差的残基 (如甘氨酸)，或一个疏水性较强的残基 (如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨
25 酸) 的密码子替代。相似地，改变可以是导致一种带负电荷的残基替代另一个 (如
天冬氨酸替代谷氨酸) 或一种带正电荷的残基替代另一个 (如赖氨酸替代精氨酸)
以及以亲水性近似的残基之间的替代，也可以期待产生生物学上相当的产物。期
望导致蛋白分子 N—端或 C—端改变的核苷酸改变，但不会改变蛋白质的活性。

另外，在已知的可变区域中的变化是生物学上等价的，其中保守区的三级构
30 象基本上没有改变 (与那些重组菌毛蛋白的相比)。生物学上等价序列的另一种
定义为：仍旧有能力产生交叉反应的免疫应答的序列。具体地说，脑膜炎球菌嵌
合的 I 类和 II 重组菌毛蛋白可通过将淋球菌菌毛蛋白的相应插入物加长或缩短来

修饰，只要修饰的嵌合重组菌毛蛋白仍具有产生交叉反应免疫应答的能力。

每个建议的修饰都是采用本领域的常规技术，如测定编码产物是否保留了结构和生物活性。所以，说明书或权利要求书中所用的术语“脑膜炎球菌嵌合的 I 类重组菌毛蛋白”或“脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白”，可以理解此术语

5 包含了导致产生生物学上等价蛋白的所有这些修饰和变异。

如实施例 7 所述，淋球菌重组菌毛蛋白与表达该蛋白的大肠杆菌的细胞膜结合。多种去污剂能够选择性溶解大肠杆菌的重组菌毛蛋白，包括 Empigen™ BB、Triton™ X-100、还原的 Triton™ X-100、辛烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷（OG）、Zwittergent™ 3-10 或 3-14。离心后，透析和用柱分级分离，得到纯化的重组菌毛

10 蛋白。

如实施例 8 所述，嵌合的 I 类重组菌毛蛋白通过破裂大肠杆菌细胞分离和纯化，通过离心澄清，过滤，并在两根柱上分级分离。

如实施例 9 所述，脑膜炎球菌嵌合的 II 类重组菌毛蛋白可通过破裂大肠杆菌细胞来分离和纯化，通过离心澄清，透析，并在两根柱上分级分离。

如实施例 10 所述，对纯化的淋球菌重组菌毛蛋白进行重复的 N-端测序。20—40 个氨基端残基的测序给出的结果与 DNA 序列推导出的氨基酸序列一致。质谱法测得重组菌毛蛋白（有信号序列）的分子量为 18,006 道尔顿，很符合预计的质量 17,981 道尔顿（根据氨基酸成分预计）。相反，当重组菌毛蛋白用去污剂进行大小排阻柱层析时，得到的表观分子量为 68,899 道尔顿。这提示重组菌

15 毛蛋白已凝集。用 PBS 透析重组菌毛蛋白，来去除去污剂，结果所得物质的表观分子量为 452,349 道尔顿（用凝胶过滤测定）。这提示其经历了进一步的凝集。

20

如实施例 11 所述，用纯化的淋球菌重组菌毛蛋白免疫豚鼠或小鼠获得免疫血清。如实施例 12 中列出的，Western 印迹分析显示抗重组菌毛蛋白的抗血清结合于带菌毛的淋球菌细胞制的全细胞裂解物，而不与无菌毛的细胞裂解物结合。

25 相反，抗菌毛蛋白寡聚体的抗血清结合于带菌毛的和无菌毛的细胞裂解物。

如实施例 13 详细描述，用 ELISA 分析时，该混合的抗淋球菌重组菌毛蛋白的抗血清对结合于纯化的淋球菌重组菌毛蛋白具有很高的终点滴度。实施例 13 也详细描述了各种佐剂的作用。当重组菌毛蛋白单用 MPL™、MPL™ 与磷酸铝、或 Stimulon™ QS-21 作佐剂时，在小鼠内得到很好的体液免疫应答。

如实施例 14 中列出的，全细胞 ELISA 显示，抗重组菌毛蛋白的抗血清结合于特定淋球菌菌株有菌毛的细胞，但不结合于同基因特定淋球菌菌株无菌毛的细胞。

30

如实施例 15 所述, 用淋球菌重组菌毛蛋白(有或无天然霍乱毒素)对小鼠进行鼻内免疫接种。小鼠用无佐剂的重组菌毛蛋白免疫接种后, 产生的混合血清的抗原 ELISA 测得有显著的免疫应答; 这种应答由于加入天然霍乱毒素而增加。混合血清对结合完整有菌毛的淋球菌细胞 ELISA 滴度很低; 当小鼠用天然霍乱毒素免疫接种时, 这种结合大大提高。

如实施例 16 所述, 免疫电镜显示抗重组菌毛蛋白的抗体沿着淋球菌表面的菌毛纤丝长度(方向)结合。这提示体内抗体结合于细菌表面存在的表位。

实施例 17 显示, 与重组菌毛寡聚物抗血清所得的结果相比, 与异源带菌毛细菌分离物结合的重组菌毛蛋白抗血清滴度较高。用 pH12 磷酸缓冲液透析重组菌毛蛋白, 使重组菌毛蛋白转变成重组菌毛蛋白寡聚物。

菌毛介导了淋球菌与人粘膜细胞的初步结合。所以, 如果一种抗原有能力引发阻止淋球菌吸附于人粘膜细胞的抗体, 就证明了该抗原是候选疫苗。

如实施例 18 中所述, 豚鼠抗重组菌毛蛋白抗血清显著地抑制了表达异源菌毛的淋球菌与人子宫颈上皮细胞的结合。故淋球菌菌毛的生成与该细菌的感染性相关(2, 3, 32)。

这些数据表明, 重组菌毛蛋白能够产生结合于完整淋球菌细胞上各种菌毛的抗体, 而且这种抗血清表现出功能活性(抑制细菌黏附), 这将保护免疫接种的人抵抗淋球菌定居和感染(32, 33)。前面已经报道过, 用表达节瘤偶蹄形菌的重组菌毛蛋白的大肠杆菌细胞免疫接种是有免疫原性的(23, 25, 28), 但不能保护机体抵抗攻击。因为这些结果, 这些研究者不再采用重组菌毛蛋白亚基, 而赞成采用装配的菌毛。然而, 本文描述的数据提示, 重组表达的菌毛蛋白纯化后诱导了一种保护人体防止淋球菌定居的免疫应答。所以, 这些数据支持了重组菌毛蛋白是用于抵抗淋球菌的候选疫苗的观点。

如实施例 19 所述, 对脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的 N 端测序。该 35 个氨基端残基的测序给出的结果与 DNA 序列推导的氨基酸序列相一致。嵌合重组菌毛蛋白(有信号肽)的分子量通过质谱测定为 17, 659 道尔顿, 与根据氨基酸成分预测的 17, 676 道尔顿相当。相反, 当脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白用去污剂进行大小排阻层析分析时, 得到表观分子量为 69, 480 道尔顿。与淋球菌重组菌毛蛋白相比, 这提示脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白凝集了。

如实施例 20 详细描述, 当用 ELISA 分析时, 抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的混合的抗血清, 对脑膜炎球菌 I 类重组菌毛蛋白和带菌毛的脑膜炎球菌细胞都有很高的终点滴度。如实施例 20 中详尽所述的, 佐剂, 特别是 Stimulon™

QS-21, 对抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的抗血清结合于脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白和带菌毛的脑膜炎球菌细胞, 产生了显著的应答。

如实施例 21 所述, 免疫电镜显示抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的抗体沿着脑膜炎球菌菌毛的长度(方向)结合。这提示体内抗体结合于细菌表面存在的表位。

在实施例 4 中, 显示抗淋球菌重组菌毛蛋白的抗血清识别并结合于带菌毛的脑膜炎球菌细胞。在实施例 22 中已表明, 产生的抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的抗血清可结合于带菌毛的淋球菌细胞。

如实施例 23 所述, 用豚鼠抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清被动免疫接种幼鼠, 能够帮助体内预防脑膜炎球菌血症。在接受这种免疫血清的动物中细菌的定居水平显著降低。另外, 用重组表达的菌毛蛋白产生的免疫应答能够在体内保护抵抗表达异源菌毛蛋白的脑膜炎球菌。

如实施例 24 所述, 用带有或不带霍乱毒素的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白鼻内免疫接种小鼠, 其中的霍乱毒素是突变体(其氨基酸位点 29 的谷氨酸用组氨酸置换)(CT-CRM, E29H)。小鼠用无佐剂的重组菌毛蛋白接种后, 产生的混合血清在抗原 ELISA 中测得有明显的免疫应答; 该应答通过加入突变体 CT-CRM, E29H 霍乱毒素而提高。

如实施例 25 所述, 小鼠皮下免疫接种含 MPL™ 佐剂的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白后显示: 抑制了脑膜炎奈瑟氏球菌 I 类菌株在小鼠鼻咽的定居。

如实施例 26 所述, Western 印迹分析显示从用脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白免疫接种的豚鼠得到的抗血清, 结合于带菌毛的脑膜炎球菌细胞(表达 I 类或 II 类菌毛蛋白)的全细胞裂解物。

如实施例 27 所述, 诱导的针对部分纯化的脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白的抗血清结合于同源细菌菌株的脑膜炎球菌细胞。

综上所述, 这些资料支持了重组菌毛蛋白, 特别是脑膜炎球菌嵌合 I 类和 II 类重组菌毛蛋白, 是抗脑膜炎奈瑟氏球菌的候选疫苗的观点。

淋球菌重组菌毛蛋白可用于制备保护哺乳动物抵抗淋球菌造成的疾病的疫苗。脑膜炎球菌嵌合重组菌毛蛋白, 脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白和脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白可用于制备保护哺乳动物抵抗脑膜炎奈瑟氏球菌造成的疾病的疫苗。

另外, 交互保护抵抗不同奈瑟氏球菌菌种, 可通过用含有淋球菌重组菌毛蛋白(保护哺乳动物抵抗由脑膜炎奈瑟氏球菌造成的疾病)的疫苗进行免疫接种;

或用含有脑膜炎球菌重组菌毛蛋白，脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白或脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白的疫苗进行免疫接种保护哺乳动物抵抗由淋球菌造成的疾病。

5 这些疫苗组合物包括一种分离和纯化的重组菌毛蛋白，该疫苗组合物在哺乳动物宿主内能引发保护性免疫应答。

含有重组菌毛蛋白的疫苗可以混有免疫学上可接受的稀释剂或常规形式的载体，来制备可注射的溶液或悬浮液。该疫苗引发的抗体水平可以通过采用某些佐剂来改善，如 StimulonTM QS-21(Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA)、MPLTM(3-O-脱酰单磷酸脂 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, 10 MT)、磷酸铝、氢氧化铝、IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA) 和霍乱毒素(野生型或突变形式，如氨基酸 29 位点的谷氨酸被另一个氨基酸，较佳的是组氨酸置换，美国临时专利申请 60/102, 430)。

本发明的疫苗可通过传统形式的注射，如皮下、腹腔内或肌肉注射入人体，以及口腔、粘膜、鼻内或阴道给予，以诱导保护机体抵抗淋球菌或脑膜炎球菌造成的疾病的主动性免疫应答。给予的剂量由本领域技术人员已知的方法确定。通过 15 单次剂量的疫苗，或需要给予几次加强剂量来赋予保护力。

为了使本发明更加易于理解，列出以下实施例。这些实施例仅是出于说明的目的，不构成对本发明范围的任何限制。

20 实施例

按 Sambrook 等人所述的方案，使用了标准分子生物学技术(31)。

实施例 1

细菌和细胞培养

25 细菌和培养条件

淋球菌分离物得自 Tampa, FL; Ottawa, Canada; Washington, D.C.; Seattle, WA; Rochester, NY; Chapel Hill, NC; 和 Evanston, IL。脑膜炎球菌分离物得自 Chapel Hill, NC; 和 Bilthoven, Netherlands。

细菌以冻干形式保存或-70℃冷冻直到使用。当在固体培养基上生长时，琼脂 30 平板在潮湿环境和 5% (v/v) CO₂ 的 37℃培养箱中培育。淋球菌和脑膜炎奈瑟氏球菌在 GC 培养基(Difco Laboratories, Detroit, MI)上生长，该培养基无血红蛋白，但添加有葡萄糖(400mg/L)、谷氨酰胺(10mg/L)、羧化辅酶(20μg/L)和硝

酸铁 (500 μ g/L)。脑膜炎球菌的液体悬浮培养物在缺少琼脂的同样培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱 (70RPM) 中生长。在培养分离自小鼠鼻组织匀浆的脑膜炎球菌实验中, 细菌在上述 GC 培养基上生长, 且含有下列混合的抗菌素 (Difco): 硫酸粘菌素 (75 μ g/ml)、利霉菌素 (125 μ g/ml)、万古霉素 (30 μ g/ml) 和乳酸三甲氧苄二氨嘧啶 (125 μ g/ml)。通过菌落形态鉴定带菌毛的淋球菌, 单菌落每天传代以保持表型。脑膜炎球菌细胞菌毛生成状态通过对 NanoVan 染色 (Nanoprobe, Stony Brook, NY) (pH 8 30 分钟) 的样品进行透射电子显微镜评估。使大肠杆菌在 SOB 琼脂上生长, SOB 琼脂由以下组成: 20g/L Bacto 胰蛋白胨 (Difco)、5g/L 酵母提取物 (Difco)、0.6g/L NaCl、0.2g/L KCl 和 1% (w/v) 琼脂 (pH 7.5), 或在 SOB 肉汤 (不加琼脂) 中生长。在一些实验中, Bacto 胰蛋白胨用相同量的 HysoyTM (Sheffield Products, Norwich, NY) 替换。

上皮细胞培养

ME-180 细胞系 (ATCC, Beltsville, MD) 是一种表皮样癌, 起初衍生于子宫颈癌。使该细胞在补加 10% (v/v) 胎牛血清 (Sigma, St. Louis, MO)、青霉素 G (1000 单位/mL) (Gibco BRL)、L-链霉素 (1mg/mL) (Gibco BRL) 和 2mM L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 中, 37 $^{\circ}$ C 5% (v/v) CO₂ 的潮湿环境下生长。细胞每 3-4 天分裂一次。

20 实施例 2

淋球菌在大肠杆菌内的克隆和表达

用带菌毛的淋球菌菌株 Pgh-1 冷冻样品作为 PCR 反应中 pilE DNA 的来源。pilE 基因的扩增使用了以下识别完整菌毛蛋白 (包括前导序列) 3' 和 5' 端的引物: 5' CCC CGC GCC ATG GAT ACC CTT CAA AAA GGC 3' (PILEFWD) (SEQ ID NO: 5) 和 5' GGG CCT GGA TCC GTG GGA AAT CAC TTA CCG 3' (PILEREV) (SEQ ID NO: 6)。得到的 PCR 产物在 pilE 编码区域的起始处含有一个 NcoI 位点, 在末端含有一个 BamHI 位点。考虑到克隆, 将 NcoI 位点引入该基因。这将导致信号序列的第二个氨基酸的改变, 从天冬酰胺 (AAT) 变成天冬氨酸 (GAT)。由于氨基酸 2 是信号肽的一部分, 该信号肽在成熟蛋白的正常加工中被劈开, 所以这种改变预期对抗原性或免疫原性不会有任何影响。将 PCR 产物克隆到 pCRTM II TA 克隆载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 连接, 转化入大肠杆菌 TOP10F' 中 (Invitrogen)。在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的平板或含有 50 μ g/mL 卡那霉素的

平板上筛选菌落。从这些转化体的过夜培养物中分离出质粒 DNA，并用酶 EcoRI 和 NotI 限制性消化进行分析。

对四个含有正确大小插入片段的克隆作 DNA 序列分析，来确证 *pilE* PCR DNA 片段的存在。克隆 #17，命名为 pPX1999，用作 *pilE* 基因的来源。pPX1999 和 pTrcHisA(Invitrogen)的质粒 DNA 用 NcoI 和 BamHI 限制性内切酶消化，将该 DNA 片段凝胶分离，连接并转化入大肠杆菌 TOP 10F' 中。筛选氨苄青霉素抗性菌落，分离新转化体的质粒 DNA，用 BamHI 和 NcoI 限制性内切酶进行 DNA 限制酶切分析。对两个具有正确限制模式的克隆作 DNA 序列分析。这两个克隆都具有正确的 DNA 序列，命名为 pPX2000。

为了测试重组菌毛蛋白的表达，使含有这些克隆的培养物在加有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 12 μ g/mL 四环素的 SOB 摇瓶或发酵罐中生长。当用摇瓶时，大肠杆菌在 1L 培养基中生长至 $A_{600}=0.9-1.0$ 。加入终浓度为 1mM 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导重组菌毛蛋白的表达，使生长持续 1-4 小时，此时离心 (13, 689 $\times$ g, 20 分钟, 4 $^{\circ}$ C) 收集细胞，-20 $^{\circ}$ C 保存。对于发酵罐来说，将一个平板的过夜培养物接种到含有 500mL 培养基的摇瓶中，继续培养过夜。然后将该液体培养物接种到含有 8.9L 培养基的 Biostat B 发酵罐 (Braun Biotech, Allentown, PA) 中。当含有 HySoyTM 的培养基添加了终浓度 1%(w/v) 的葡萄糖时，发酵罐中细菌的生长得到提高。当培养物达到 $A_{600}=1.0$ 时，加入终浓度为 1mM 的 IPTG，使继续生长 1-4 小时，然后离心 (13, 689 $\times$ g, 20 分钟, 4 $^{\circ}$ C) 收获细胞。丢弃培养液，-20 $^{\circ}$ C 细胞沉淀保存。用 IPTG 诱导后，显著增加了重组菌毛蛋白的表达，在诱导后 3-4 小时达到最高水平。

诱导培养物的样品用十二烷基磺酸钠 (SDS-PAGE) 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。重组菌毛蛋白用考马斯蓝染色观察，用淋球菌菌毛特异性单克隆抗体 (克隆 #A33020023, Biospecific, Emeryville, CA) 进行 Western 印迹验证鉴定它。

25

实施例 3

构建含有卡那霉素抗性标记的淋球菌重组 *pilE* 质粒

构建一个质粒，其 Amp^R 标记用 Kan^R 标记置换。除下面特别指出的外，用实施例 2 中的流程。对 pTrcHisA 质粒 DNA 进行 PCR 反应，采用 TrcFXba 引物，5' GGC TCTAGA CTG TCA GAC CAA GTT TAC TC 3' (SEQ ID NO: 7)，和 TrcRXba 引物，5' GGC TCTAGA TTG AAG CAT TTA TCA GGG 3' (SEQ ID NO: 8)。带下划线的序列编码 XbaI 限制位点。约 3.5kb PCR 产物含有 pTrcHisA DNA 减去

氨苄青霉素编码区域。对 pACYC177 质粒 DNA (New England Biolabs, Beverly, MA) 进行了另一个 PCR 反应, 采用 KanFXba 引物, 5' GGC TCT AGA TAA ACA GTA AT A CAA GGG G 3' (SEQ ID NO: 9), 和 KanRXba 引物, 5' GGC TCT AGA TTA GAA AAA CTC ATC GAG C 3' (SEQ ID NO: 10)。同样, 带下划线的序列编码 XbaI 限制位点。约 860bp 的 PCR 产物含有卡那霉素抗性基因。两种 PCR 产物从琼脂糖凝胶上纯化得到, 用 XbaI 限制性内切酶消化二种 DNA, 提取并连接起来。将一份连接反应物转化到大肠杆菌 TOP10F' 中, 一份转化混合物接种含有 30μg/mL 卡那霉素的 SOB 平板。

将总计 48 个 Kan^R 菌落在含有氨苄青霉素或卡那霉素的 SOB 平板上划线培养(一式两份)。如预计的那样, 所有 Kan^R 菌落都是氨苄青霉素敏感的。由于克隆设计是对称的, 分离获得了两种取向的卡那霉素插入物。筛选出与原先氨苄青霉素基因相同顺时针方向的卡那霉素插入物, 用于进一步研究, 称其为 pZ564。将 pZ564 中含有 lacIq 基因、trc 启动子和多克隆位点的 DNA 区域, 用 pPX2000 质粒的相似区域(也含有 pilE)置换, 方法如下: 用 SphI 和 XmnI 限制性内切酶消化 pZ564 和 pPX2000。凝胶纯化 pPX2000 的约 2.2kb DNA 片段和 pZ564 的约 2.6kb DNA 片段, 连接起来, 并转化到大肠杆菌 TOP10F' 中。得到的正确质粒称为 pPX2002。

当选择抗生素从氨苄青霉素换成卡那霉素时, 可以看到诱导的相似时间过程和重组菌毛蛋白表达水平。

20 实施例 4

在大肠杆菌内克隆和表达脑膜炎球菌 I 类 pilE

由于淋球菌和脑膜炎球菌 I 类菌毛蛋白 DNA 和氨基酸序列的高度同源性(7), 用全细胞 ELISA 评估了淋球菌重组菌毛蛋白抗血清结合于脑膜炎球菌细胞表达的菌毛的能力。该抗血清表现出结合于菌株 H355 的脑膜炎奈瑟氏球菌带菌毛细胞的滴度为 151, 100。

该结合似乎是针对菌毛蛋白的, 因为对该菌株全细胞裂解物的 Western 印迹显示, 只有与菌毛蛋白共迁移的单一一条带可结合此抗血清(没有显示数据)。大量其它的脑膜炎球菌菌株在全细胞 ELISA 中显示低滴度, 但透射电子显微镜没有证明菌毛的存在。根据这些数据, 决定克隆并重组表达脑膜炎奈瑟氏球菌的 I 类菌毛蛋白。起初, 采用了淋球菌的 pilE 相同的策略。除下面特别指出的外, 使用实施例 2 中的流程。

从脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 H44/76 基因组 DNA 扩增 I 类 pilE, 采用以下引物:

5' CCC CGC GCC ATG GAC ACC CTT CAA AAA GGT TTT ACC 3' (NMFPILE) (SEQ ID NO: 11), 和 5' GGG CCT GGA TCC GAG TGG CCG TGG AAA ATC ACT TAC CGC 3' (NMRPILE) (SEQ ID NO: 12)。如预计的, 得到约 600bp DNA 的 PCR 产物。一份 PCR 反应产物用 BamHI 和 NcoI 限制性内切酶消化, 插入到 pTrcHisA。消化的 DNA 在琼脂糖凝胶上电泳, 凝胶纯化 DNA 片段。然后将 DNA 片段连接起来, 转化到大肠杆菌 TOP10F' 中。用 BamHI 和 NcoI 限制性内切酶对氨苄青霉素抗性克隆进行小质粒制备分析。表达正确限制性消化模式的克隆称为 RZ1142, 质粒称为 pPX2003。

诱导后, 当用 SDS-PAGE 分析全细胞裂解物时, 观察到分子量约为 15, 000 道尔顿的考马斯蓝染色多肽。用 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析这些克隆的四种克隆的全细胞裂解物显示, 存在一种蛋白, 它具有适当的迁移率和与抗淋球菌菌株 LB2 完整菌毛的多克隆抗血清有反应性。纯化的 I 类重组菌毛蛋白长度为 167 个氨基酸。然而, 这种重组菌毛蛋白的表达水平明显低于相同条件下生长的 pPX2000 或 pPX2003 获得的水平。分析重组 I 类 pilE 中的 DNA 序列显示, 有大量反向重复序列, 这可能解释大肠杆菌中这种蛋白低水平表达的原因。

实施例 5

在大肠杆菌内构建和表达淋球菌和脑膜炎球菌 I 类嵌合 pilE

为了增加脑膜炎球菌菌毛蛋白的表达, 将 pPX2003 (实施例 4 中所述脑膜炎球菌 I 类 pilE 构建物) 中编码前 60 个氨基酸的 DNA 以 pPX2002 (实施例 3 中所述淋球菌 pilE 构建物, 包括 7 个氨基酸的信号肽) 相当区域置换 (SEQ ID NO: 4)。除下面特别指出的外, 采用实施例 2 中的流程。

按以下方式将脑膜炎球菌 pilE 基因的保守 5' 端区域用淋病奈瑟氏球菌菌株 Pgh-1 的相同区域置换, 如下将 BsmBI 位点引入脑膜炎球菌 pilE 基因中: 从 pPX2003PCR 扩增 DNA, 采用如下引物: 5' CCG GCG CGT CTC TCA CGG CGA ATG GCC CGG C 3' (CL-1ESPF) (SEQ ID NO: 13) 和 5' GGG CCT GGA TCC GAG TGG CCG TGG AAA ATC ACT TAC CGC 3' (NMRPILE) (SEQ ID NO: 14) 和 Taq DNA 聚合酶。将预期的 PCR DNA 产物直接克隆到 pCR2.1(Invitrogen)中并转化入 TOP10F' 细胞, 得到的质粒命名为 pZ578。然后, 将 BsmBI 位点引入淋球菌 pilE, 方法如下。所用引物为 5' GCA TAA TTC GTG TCG CTC AAG GCG C 3' (TRCUPFW) (SEQ ID NO: 15) 和 5' GCC GCG CGT CTC CCG TGA TTC AGG TAA TAC TCG G 3' (PILEESPR) (SEQ ID NO: 16) 和 Pfu DNA 聚合酶。PCR

扩增 pPX2000 pilE 基因的 5' 端。然后将所得的淋球菌 PCR 产物和 pZ578 用 BsmBI 消化，并连接起来。再 PCR 扩增连接的 DNA，采用 5' GCA TAA TTC GTG TCG CTC AAG GCG C 3' (TRCUPFW) (SEQ ID NO: 17) 和 5' GGG CCT GGA TCC GAG TGG CCG TGG AAA ATC ACT TAC CGC 3' (NMRPILE) (SEQ ID NO: 18) 引物。

DNA PCR 产物具有预计的大小（约 850bp），用 NcoI 和 BamHI 消化，得到约 600bp 的片段。凝胶分离该片段，直接克隆入 NcoI 和 BamHI 切开的 pPX2000 载体中，置换淋球菌 pilE 基因。得到的质粒是氨苄青霉素抗性的，标记 pPX2004，用于转化 TOP10F'。该转化体分析显示存在期望的嵌合 pilE DNA。用 IPTG 诱导后，与 pPX2003 表达的脑膜炎球菌重组菌毛蛋白量相比，构建物表达的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的量显著增加。用 1% 辛烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (OG) 提取及如实施例 7 所述纯化方案 (TMAE Fractogel™ 柱, 10mM Tris™, pH 8.5, 含 0.1%(w/v) Zwittergent™ 3-14) 纯化重组淋球菌菌毛蛋白，得到高纯度的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白（收率为约 5mg/g 湿细胞重量）。用 SDS-PAGE 和激光密度仪分析时，该物质的纯度大于 90%。SDS-PAGE 显示约 15,000 道尔顿大小的一个主条带。脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的长度也为 167 个氨基酸，包括 7 个氨基酸的信号序列，如该纯化蛋白氨基端的 36 个残基测序所得显示。

20 实施例 6

在大肠杆菌内构建和表达淋球菌和脑膜炎球菌 II 类嵌合 pilE

脑膜炎球菌 II 类 pilE 的初期克隆包括从带菌毛的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 FAM18 细胞分离染色体 DNA 和在 PCR 反应中扩增 II 类 pilE DNA。II 类 pilE 基因的扩增采用如下识别完整菌毛蛋白（包括前导序列）3' 和 5' 端的引物：5' GCG GCC GCC ATG GAA GCA ATC CAA AAA GGT TTC ACC C 3' (PILE2FWD) (SEQ ID NO: 19) 和 5' GCG GCC GGA TCC GGT CAT TGT CCT TAT TTG GTG CGG C 3' (PILE2REV) (SEQ ID NO: 23)。用与实施例 2 相似的策略，得到的 PCR 产物在 pilE 编码区域的起始处含有一个 NcoI 位点，在末端含有一个 BamHI 位点。出于克隆考虑，将 NcoI 位点引入该基因。这导致信号序列第二个氨基酸的改变，从赖氨酸 (AAA) 变为谷氨酸 (GAA)。如前所述，预计这种变化对抗原性或免疫原性没有任何作用。将 PCR 产物克隆到 pCR2.1 克隆载体 (Invitrogen) 中，连接并转化到大肠杆菌 TOP10F' 中。在含有 100μg/mL 氨苄青霉素的平板或

含有 50 μ g/mL 卡那霉素的平板上筛选菌落。从这些转化体的过夜培养物中分离出
质粒 DNA，并用酶 EcoRI 限制性内切进行分析。

克隆 # 8，命名为 pPX8001，用作 pilE 基因的来源。pPX8001 和
pTrcHisC(Invitrogen)的质粒 DNA 各用 NcoI 和 BamHI 限制性内切酶消化，凝胶分
5 离所得的 DNA 片段，连接并转化入大肠杆菌 TOP 10F' 中。筛选氨苄青霉素抗
性菌落后，分离新转化体的质粒 DNA，用 BamHI 和 NcoI 限制性内切酶进行 DNA
限制酶切分析。对两个具有正确限制模式的克隆作 DNA 序列分析。这两个克隆
都具有正确的 DNA 序列，命名为 pPX8002。

为了测定重组 II 类菌毛蛋白的表达，将 10mL 含有这些克隆的培养物，
10 pPX8002，在 50mL 管中生长，其中的 SOB 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 12 μ g/mL
四环素，直到 $A_{600}=1.0$ 。加入终浓度 1mM 的 IPTG 诱导了重组蛋白的表达，培养
继续 3 小时。当被诱导细胞的全细胞裂解物用 SDS-PAGE 分离并用考马斯蓝染
色时，没有测到新（诱导）的条带。这提示 FAM18 pilE 基因产物表达的水平低
于那些考马斯蓝（染色）识别的水平。当 FAM18 pilE 克隆入 pET17b 质粒并转化
15 入大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS（有或无 pilE 信号序列）时，没有测到重组蛋白
的明显表达。当脑膜炎奈瑟氏球菌两个其它菌株（NmB, 2996）的 II 类 pilE 基因
克隆入相同的 pTrcHis 质粒和 TOP10F' 表达系统中时，得到类似的结果。

确定的，根据 PCR 和测序数据，也测到菌株 NMB 和 2996 表达 II 类菌毛蛋白。
在以染色体 DNA 或细胞作为模板的分离反应中，从一些脑膜炎奈瑟氏球菌菌株
20 扩增 pilE 基因，采用 I 类的引物(NMFPILE 和 NMRPILE)和 II 类的引物(PILE2FWD
和 PILE2REV)。将 PCR 产物克隆入 pTrcHisC 并测序，或直接测序。进行了序
列对比，类似 H44/76 菌株的序列被定为 I 类，类似于 FAM18 菌株的序列被定为
II 类。并非从所有扩增菌株都能获得序列。根据 PCR 数据进行了初步分类。I 类
菌株是那些用 I 类引物而不是用 II 类引物获得正确大小 PCR 产物的菌株，而 II
25 类菌株是那些用 II 类引物而不是用 I 类引物获得正确大小 PCR 产物的菌株。

根据脑膜炎球菌 I 类菌毛蛋白的试验，将编码 II 类 pilE 前 60 个氨基酸（保守
氨基端区域）的区域用淋球菌菌株 Pgh3-1 的相应区域置换。所得嵌合 pilE 的表
达用各种不同的启动子在大量的大肠杆菌表达菌株中进行研究。实验菌株包括：
PR13（RNA 缺陷型）、BL21（蛋白酶缺陷型）、KS474（周质蛋白酶缺陷型）、
30 AD494（Novagen，其允许在胞质中形成二硫键）和 TOPP 的三个菌株（Stratagene，
可用于难表达蛋白的非 K-21 菌株）。在所有的实验中，在考马斯蓝染色的 SDS
-PAGE 中没有测到重组蛋白。研究了另一个表达质粒 pET17b（包括一个 T7 启

动子)得到类似的结果。

应注意的是, pPX8002 中的天然 II 类 *ilE* 基因序列终止于碱基 447。距天然脑膜炎球菌 II 类 *pilE* 终止位点下游 (3') 的 DNA 序列, 核苷酸 447 到 519, 含有反向的重复序列 (其可能形成茎和环结构)。因为茎和环结构可能是转录的有效终止子, 所以假设 pPX8002 中该附加 3' 序列 (74 碱基) 的缺少可能影响嵌合 II 类 *pilE* 信息在大肠杆菌中的转录。所以, 所有后来的克隆都恢复该下游 3' 末端序列。

将脑膜炎球菌菌株 II 类 *pilE* 基因的各个部分用淋球菌菌株 Pgh3-1 *pilE* 基因的相应区域系统置换, 目的是鉴定抑制表达的区域。置换区域从 5' 或 3' 端开始, 并逐渐扩大。还构建了 5' 和 3' 端的双置换, 直到天然 *pilE* II 类只残留下 84 个核苷酸的内部区域。该区域也被置换, 结果重新构建了 rGC, 并且如预期的那样该克隆以相似于 pPX2000 的考马斯蓝染色水平表达了重组菌毛蛋白。FAM18 *pilE* 基因的以下区域 (以核苷酸号列出) 用 Pgh3-1 的相应区域 (在括号内列出) 置换: 单区域置换的是 1-108 (1-108)、1-181 (1-181)、1-294 (1-282)、439-499 (478-553)、379-519 (367-553)、295-519 (283-553)、295-378 (283-366); 双区域置换是 1-294 (1-282) & 379-519 (367-553)、1-181 (1-181) & 439-499 (478-553)、1-181 (1-181) & 379-519 (367-553)、1-294 (1-282) & 439-499 (478-553)。

当在大肠杆菌 TOP10F' 中用 pTrcHis 表达系统表达这些构建物时, 两个构建物产生的蛋白水平可用考马斯蓝检测: 第一个含有核苷酸 379-519 (包括二硫环和 3' 突出端) 的置换; 第二个含有核苷酸 1-181 (包括保守 5' 区域) 和 379-519 (包括二硫环和 3' 突出端) 的置换。因为仅置换 5' 区域不能导致重组蛋白的表达, 还因为第一构建物保留了天然脑膜炎球菌菌毛蛋白序列的大部分, 选出该构建物 (核苷酸 379-519) 用于进一步的研究。由于脑膜炎球菌和淋球菌蛋白的氨基酸序列在该区域明显不同, 有文件 (17, 18) 指出该二硫环经历了显著的抗原变异。所以, 任何针对该区域 (即二硫环) 的免疫应答将表现出脑膜炎球菌菌株间极小的交叉反应性。因为淋球菌插入物是脑膜炎球菌二硫环大小的两倍 (39 残基对 18 残基), 产生的嵌合蛋白在 SDS-PAGE 凝胶上迁移的表现分子量约为 19, 000 道尔顿。

该嵌合基因的构建方法如下。扩增 pPX8002 (FAM18 II 类 *pilE*) 得到 5' 片段, 采用如下引物: 5' GCG GCC GCC ATG GAA GCA ATC CAA AAA GGT TTC ACC C 3' (PILE2FWD) (SEQ ID NO: 19) 和 5' GCC GCG CGT CTC CGA ACC

GGA GTT TTG TTT GCC 3' (REV-CYS) (SEQ ID NO: 20)。从 pPX2000 扩增得到淋球菌二硫环(即淋球菌基因的 3' 端),采用引物 5' CCG GGC CGT CTC GGT TCG GTA AAA TGG TTC TGC 3' (FWD-CYS) (SEQ ID NO: 21) 和 5' GGG CCT GGA TCC GTG GGA AAT CAC TTA CCG 3' (PILEREV) (SEQ ID NO: 22)。分别纯化得到的 PCR 产物,用限制性内切酶 BsmBI 消化,而后连接形成全长嵌合 pilE,再用引物 PILE2FWD 和 PILEREV 扩增。该 PCR 产物用限制性内切酶 NcoI 和 BamHI 消化,连接入一个相似限制的 pTrcHisC 载体,转化入 TOP10F' 感受态细胞中。

培养转化体,并用限制性内切酶 NcoI 和 BamHI 分析。用限制性内切酶 StuI 分析了具有正确大小插入物的四个克隆。其中,三个具有正确的限制图。测定了具有正确限制模式三个克隆中两个的序列。克隆 #5 具有正确的 DNA 序列,命名为 pPX8017。该克隆含有的核苷酸序列列于 SEQ ID NO: 3 中,其中核苷酸 1-378 来自脑膜炎奈瑟氏球菌和核苷酸 379-510 来自淋球菌。

在 50mL 管内用 10mL 培养基检查了表达。细胞在 SOB 中生长(该 SOB 添加有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 12 μ g/ml 四环素)直到 A_{600} 约为 1.0。加入终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导培养物。让生长继续 3-4 小时,然后通过离心(13,689 $\times$ g, 20 分钟, 4 $^{\circ}$ C)收集该时间点的细胞, -20 $^{\circ}$ C 保存。对于发酵罐,用平板的过夜培养物或冰冻存储液接种含有 500mL 培养基的摇瓶,再生长过夜。将该液体培养物接种入含有 8.9L 培养基的 Biostat B 发酵罐(Braun Biotech, Allentown, PA)中。当用终浓度为 1%(w/v)葡萄糖补充含有 HySoyTM 的培养基时,发酵罐中的细菌生长提高。当培养物达到 A_{600} =4.0-6.0 时,加入终浓度为 1mM 的 IPTG,让细胞再生长 2-4 小时然后离心(13,689 $\times$ g, 20 分钟, 4 $^{\circ}$ C)收集细胞。丢弃培养液,细胞沉淀 -20 $^{\circ}$ C 保存。通过 IPTG 的诱导,嵌合 II 类重组菌毛蛋白的增加是很显著的。

在十二烷基磺酸钠(SDS-PAGE)存在下用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了被诱导的培养物样品。用考马斯蓝染色可观察到重组脑膜炎球菌嵌合 II 类菌毛蛋白(表观分子量约 19,000 道尔顿),其鉴定通过用针对一种淋球菌肽(Glu Ala Ile Leu Leu Ala Glu Gly Gln Lys Ser Ala Val Thr Glu Tyr Tyr Leu Asn His Gly Lys) (SEQ ID NO: 24)的多克隆抗血清作 Western 印迹得到证明,该肽位于 II 类菌毛蛋白氨基端的保守区域。脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白长度为 170 个氨基酸(包括信号肽, 其中氨基酸 1-126 来自脑膜炎奈瑟氏球菌,氨基酸 127-170 来自淋球菌。

实施例 7

从大肠杆菌分离和纯化重组淋球菌菌毛蛋白

用以下步骤纯化上述实施例 2 和 3 中得到的重组淋球菌菌毛蛋白。本步骤同样可用于纯化实施例 4 中得到的脑膜炎球菌重组菌毛蛋白，并可用于初步纯化实施例 5 中得到的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白。随后，如下述实施例 8 中所述改进了脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的分离步骤。表达重组菌毛蛋白的大肠杆菌的亚细胞分级分离显示，该蛋白结合于细胞膜上，更可能是内膜，因为 1% (v/v) Triton™ X-100 能够溶解该蛋白。当尝试了在存在 0.05-0.1% (v/v) Triton™ X-100 时除去污染的大肠杆菌蛋白时，发现低于 pH9.5 时重组菌毛蛋白不能牢固地结合到离子交换柱上。所以，检验了大量去污剂从大肠杆菌膜制备物中选择性溶解重组菌毛蛋白的能力。

将从 1L 培养物中获得的细胞沉淀（约 5g 湿重）通过加入 30mL 10mM Hepes (pH7.2) (Research Organics, Cleveland, OH) 和 1mM EDTA 使其融解，用 Microfluidizer 细胞匀浆器 (Microfluidics International Corp., Newton, MA) 裂解细胞。离心 (12,000×g, 10 分钟) 澄清裂解物和沉淀膜 (288,652×g 1 小时)。将膜垂悬于 33mL 10mM Hepes (pH7.4), 1mM MgCl₂ 中并用以下去污剂的一种在室温下抽提 1 小时：(a) Triton™ X-100 (Calbiochem-Novabiochem International, San Diego, CA), (b) 还原的 Triton™ X-100 (Calbiochem), (c) 辛烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (OG) (Calbiochem), (d) Zwittergent™ 3-8 (Z3-8) (Calbiochem), (e) Zwittergent™ 3-10 (Z3-10) (Calbiochem), (f) Zwittergent™ 3-12 (Z3-12) (Calbiochem), (g) Zwittergent™ 3-14 (Z3-14) (Calbiochem), (h) Empigen BB™ (Calbiochem) 或 (i) Tween™ 80 (ICN, Cleveland, OH)。

Empigen BB™ (1% v/v)、Zwittergent™ 3-10 (1% w/v)、还原的 Triton™ X-100 (1% v/v)、带有 Zwittergent™ 3-10 (1% w/v) 或 3-14 (0.1% w/v) 的辛烷基葡萄糖苷 (1% v/v) 分别选择性提取获得了重组菌毛蛋白（含有最微量的大肠杆菌蛋白污染）。Zwittergent™ 3-12，即使是 0.1% (w/v)，溶解了重组菌毛蛋白和大量的大肠杆菌蛋白。Triton™ 80 在测试的任何一个浓度都不能提取到重组蛋白 (0.1-1% v/v)。

通过离心 (288,652×g 1 小时)，从不溶解的膜物质中分离出溶解的蛋白。上清液（含有重组菌毛蛋白）在 4℃ 透析过夜，透析液用 10mM Tris™ (pH 8.5) 含有以下非离子去污剂的一种：(a) 0.1% (w/v) Zwittergent™ 3-14, (b) 1% (w/v) Zwittergent™ 3-10 或 (c) 1% (w/v) OG。将透析的物质在 Fractogel™ EMD TMAE-650(S) (EM Separations Technology, Wakefield, RI) 柱上分级分离，该柱已用 10mM

Tris™(pH8.5)和各去污剂平衡。用含有适当去污剂的以 10mM Tris™ (pH 8.5), 配的 NaCl 线性梯度 0—0.2M, 来洗脱结合的蛋白。混合含有重组菌毛蛋白的组份, 分析纯度和蛋白含量。偶尔为了增加重组菌毛蛋白的纯度, 将混合的物质用起始缓冲液透析, 并在 TAME 柱上第二次分级分离。

- 5 从柱上选择性洗脱的重组菌毛蛋白, 通过考马斯蓝染色的 SDS—PAGE 作激光密度分析评价, 是高度纯化的 (>90% 匀质)。当用 1% (w/v) Zwittergent™ 3-10, 1% (w/v) OG 或 0.1% (w/v) Zwittergent™ 3-14 进行提取和柱层析分离时, 得到相似的结果。重组菌毛蛋白的收率 (是大肠杆菌蛋白总量的主要部分) 在用 SOB 培养基 1.5L 摇瓶生长的培养物中约为 10mg/L。当重组大肠杆菌 (含 pPX2002) 用
- 10 HySoy™ 为基础的培养基在发酵罐中生长时, 纯化的重组菌毛蛋白的收率增加到约 30mg/L 培养物, 相应于每克细胞质量 7mg 重组菌毛蛋白。当发酵罐中含有 1% 葡萄糖时, 重组菌毛蛋白的总收率增加到约 100mg/L。

将纯化的重组菌毛蛋白用含 0.05%(w/v) Z3-14 的 10mM 磷酸钠、140mM NaCl(pH 7)(PBS)透析, 无菌过滤, 4℃保存或-20℃冻存。

15

实施例 8

从大肠杆菌分离和纯化脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白

- 如实施例 2 所述, 大规模培养含 pPX2004 的大肠杆菌细胞在 Biostat B 发酵罐中生长。将细菌细胞 (约 88 克湿重大肠杆菌 pPX2004) 重悬浮于 440mL 10mM
- 20 Hepes、1mM EDTA(pH 7.5)中, 用 Microfluidizer Model 110Y(Microfluidics Corp., Newton, MA)破裂。破裂的细胞通过离心 (6, 084×g, 20 分钟, 10℃) 澄清。收集上清液, 通过离心 (205, 471×g, 1 小时, 10℃) 分离膜组份。沉淀用匀浆器重悬浮于 220mL 10mM Hepes, 1mM MgCl₂, 1%(w/v) 辛烷基—β—D—吡喃葡萄糖苷(pH 7.5)中, 并室温搅拌 90 分钟。离心悬浮液 (205, 471×g, 1 小时, 10
- 25 ℃)。离心后, 将含有溶解的嵌合 I 类重组菌毛蛋白的上清液通过 0.22μ Nalgene 真空抽滤膜, 4℃保存。用浓 NaOH 调节辛烷基葡萄糖苷提取物的 pH 到 pH 8.5, 然后装入 200mL TMAE Fractogel™ 柱上 (EM Separations Technology, Gibbstown, NJ), 该柱已用 25mM Tris™、0.1% (w/v) Zwittergent™ 3-14(pH 8.5)平衡。用补加的 400mL 平衡缓冲液从柱上洗去不结合的蛋白。重组菌毛蛋白的洗脱用 25mM
- 30 Tris™、0.1% (w/v) Zwittergent™ 3-14(pH 8.5), 配的 10 倍柱容积的线性梯度 NaCl (0—0.2M NaCl), 流速 10.0mL/分钟。混合含有嵌合 I 类重组菌毛蛋白的组份, 用 dH₂O 以 1: 1 稀释, 装入 100mL 40μm 瓷羟基磷灰石柱(Bio-Rad, Hercules, CA)

(已用 10mM NaPO₄、0.1% (w/v) Zwittergent™ 3-14(pH 6)平衡)。用补加的 200mL 平衡缓冲液从柱上洗去不结合的蛋白。嵌合 I 类重组菌毛蛋白的洗脱用含有 0.1% (w/v) Zwittergent™ 3-14 的 10 倍柱容积线性梯度 NaPO₄ (10–150mM NaPO₄) 液, 流速 5.0mL/分钟。用 SDS–PAGE 分析筛选各组份, 混合那些含有嵌合 I 类重组菌毛蛋白的组分。用激光密度仪检测考马斯蓝染色的凝胶, 测定纯化物质的纯度至少为 95%。纯化的嵌合 I 类重组菌毛蛋白的收率约为 35mg/g 湿重细胞。

实施例 9

从大肠杆菌分离和纯化脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白

除非特别指出, 所有的步骤都在室温中进行。将冷冻的大肠杆菌细胞重悬浮于 10ml 10mM Hepes (pH 7.2), 1mM EDTA/g 细胞, 用 Microfluidizer 细胞匀浆器匀浆破裂细胞。细胞裂解物通过离心 (13, 689×g, 30 分钟) 澄清。得到的上清液继续离心 (388, 024×g, 30 分钟, 4℃)。丢弃上清液, 将含有膜的沉淀–20℃ 冷冻过夜。膜沉淀 9mL/管重悬浮于 10mM Hepes(pH 7.2)、1mM MgCl₂ 中, 用 1% (w/v) Zwittergent™ 3-16(Calbiochem)提取 1 小时。离心悬浮液 (388, 024×g, 30 分钟), 再用上述 Zwittergent™ 3-16 提取得到的沉淀。离心 (388, 024×g, 30 分钟) 后, 将沉淀重悬浮于 9mL 50mM Tris™ (pH 8.0)、5mM EDTA 中, 用 1%(w/v) N-月桂基十二烷基肌氨酸钠 (Sigma) 室温提取过夜 (轻微振荡)。这导致脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白溶解。通过离心 (388, 024×g, 30 分钟) 除去不溶物质, 弃之。在含有脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白的上清液中加入终浓度为 1%(w/v)的 Zwittergent™ 3-14, 并用 50mM Tris™(pH 8.0)、10mM EDTA、1% Zwittergent™ 3-14 透析该物质过夜。取一等份 (1mL, 0.3mg 蛋白) 透析物通过 MonoQ™(Pharmacia, Piscataway, NJ)柱 (5×10mm), 该柱已用 50mM Tris™(pH 8.0)、10mM EDTA、1% Zwittergent™ 3-14 平衡, 流速为 0.5mL/分钟。合并含有嵌合 II 类重组菌毛蛋白不结合物质, 用 10mM NaPO₄(pH 6.8)、1%(w/v) Zwittergent™ 3-14 透析过夜。该物质的纯度约为 80%, 用于下面实施例 26 和 27 所述的研究中。使该物质通过 1mL 羟基磷灰石柱 (Bio-Rad) 进一步纯化, 该柱已用 10mM NaPO₄(pH 6.8)、1%(w/v) Zwittergent™ 3-14 平衡。用含有 1%(w/v) Zwittergent™ 3-14 的线性梯度 0-0.5M NaPO₄ 液洗脱纯化的脑膜炎球菌嵌合 II 类蛋白。用 SDS–PAGE 筛选各组份嵌合 II 类重组菌毛蛋白 (凝胶用考马斯蓝或银染色)。两种分析都显示, 存在单一的多肽条带, 其分子量约为 19, 000 道尔顿。通过激光密度分析聚丙烯酰胺凝胶显示该物质的纯度大于 95%。

实施例 10

淋球菌重组菌毛蛋白的分析方法

用二金鸡纳酸蛋白试验 (Pierce, Rockford, IL) 测定蛋白含量, 以 BSA 为标准。

- 5 蛋白制备物的纯度用考马斯亮蓝染色聚丙烯酰胺凝胶 (存在 SDS 时电泳) (SDS-PAGE), 并用 Personal Densitometer SI (Molecular Devices) 进行激光密度分析而确定。制品中菌毛蛋白的鉴定用实施例 2 所述的单克隆抗体通过 Western 印迹证实, 此单抗是针对淋球菌菌株 P9 的纯化菌毛的 (Biospecific)。菌毛蛋白的 N 端序列用 Applied Biosystems 477A 蛋白测序测定。当对纯化的重组菌毛蛋白进行 N
- 10 端测序时, 经常测到两个序列。主要的序列代表完整的菌毛蛋白, 包括 7 个氨基酸前导序列。组成 10-20% 样品的次要序列为重组菌毛蛋白, 其缺少了前导序列, 序列从苯丙氨酸 (成熟淋球菌菌毛蛋白的 N 端残基) 开始。对于这两种重组菌毛蛋白形式, 氨基端残基的测序给出的结果与从 DNA 序列推定的序列相一致。

- 用 Finnigan MAT Lasermat™ 2000 (San Jose, CA), 以基质辅助的激光解吸离子
- 15 化飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱分析法, 测定了重组菌毛蛋白的质量。用马肌红蛋白校准该仪器到其期望质量 (16, 951.5 道尔顿) 的 0.01% 内。重组菌毛蛋白与等体积的氰基-4-羟基肉桂酸基质 (10mg/mL, 70: 30 乙腈: 0.1% (v/v) 三氟乙酸/水中) 混合。将一份该混合液 (1μL) 存储于样品期, 风干, 然后作 MALDI-TOF 质谱分析。平均 15 次分析 (每次分析为 10 次注射的总和) 的数据, 来确
- 20 定重组菌毛蛋白的质量。测定的重组菌毛蛋白 (带信号肽) 分子量为 18, 000 道尔顿, 与根据氨基酸成分预计的分子量 (17, 981) 相当。每批都测到质量为 17, 232 道尔顿 (平均) 的一个小峰。重组菌毛蛋白两种形式分子量的差别 (769 道尔顿) 在于前导序列前六个氨基酸 (Met Asp Thr Leu Gln Lys) (SEQ ID NO: 2, 氨基酸 1-6) 的丢失, 其分子量为 774 道尔顿。

- 25 用分析级 Superose™ 12 柱 (Pharmacia, Piscataway, UJ) (以含有 0.05% (w/v) Zwittergent™ 3-14 的 PBS 平衡), 作大小排阻层析, 得到极不同的重组菌毛蛋白表观分子量。在这些条件下, 该蛋白的洗脱位置相应于分子量为 68, 899。这提示该重组蛋白凝聚。然而, 从大小排阻柱洗脱蛋白在很大程度上受到蛋白形状的影响。速度沉降离心实验的结果显示, 重组菌毛蛋白在溶液中的分子量约为 45,
- 30 000 道尔顿。为了除去去污剂 (Zwittergent™ 3-14), 重组蛋白用 PBS 充分透析。透析的重组蛋白表现为可溶, 且在高速离心 (122, 000 × g, 1 小时) 也不沉淀。没有试图证明是否可从重组蛋白中完全除去去污剂。以 PBS 作凝胶过滤分析该物

质, 表明该蛋白的表观分子量为 452, 349 道尔顿。这提示它经历了进一步凝聚。没有确定二种聚合体中亚基的数量。

452, 349 只能视为一个估计的值, 因为蛋白可能依旧是处于微团中, 如同不知去污剂是否从样品中被完全去除。鉴于重组菌毛蛋白在配制成疫苗时稀释了约 5 15—30 倍的事实, 看来很可能疫苗中的重组菌毛蛋白的表观分子量约为 450kD。

实施例 11

从重组菌毛蛋白制备免疫血清

通过给豚鼠(雌性, 200g)皮下免疫注射 20 μ g 混合有佐剂的纯化的淋球菌重组菌毛蛋白进行了免疫原性的研究。研究的佐剂为: (a)以 PBS (pH6)配的 Stimulon™ QS-21(25 μ g/剂量); (b) 以 PBS (pH7) 配的磷酸铝 (Lederle Laboratories, Pearl River, NY, 100 μ g/剂量); 或 (c) 单用 PBS(pH 7)。最初, 动物在第 0、4 和 8 周免疫接种, 在第 0、4、6 和 10 周采血清。免疫应答时间过程的分析显示, 第 8 周作的第三次疫苗接种不增强免疫应答, 因此后来用重组菌毛蛋白作的研究结束于第六周的采血。

为了研究佐剂调节淋球菌重组菌毛蛋白免疫应答的能力, 小鼠(雌性, 8 周岁, 每组 5 或 10 只)在第 0、4 和 6 周皮下免疫接种 1—10 μ g 纯化的蛋白, 在第 0、4、6 和 8 周收集血清。在第 8 周进行阴道灌洗, 将 RPMI 1640 (75 μ L) 滴注入阴道并抽吸 3—4 次。合并每组灌洗液, 将 50 μ L 胎牛血清加入到每个合并液中。

对于脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白, 小鼠只在第 0 和 4 周接受免疫接种, 在第 0、4 和 6 周收集血清。在小鼠中研究了所有重组菌毛蛋白胃肠道外的免疫原性, 研究了以下佐剂: (a)以 PBS (pH6)配的 Stimulon™ QS-21(25 μ g/剂量); (b)以 PBS (pH7) 配的磷酸铝 (Lederle Laboratories, Pearl River, NY, 100 μ g/剂量); (c) 以 PBS (pH7) 配的 MPL™ (50 μ g/剂量) (d)以 PBS (pH7) 配的磷酸铝 (100 μ g/剂量) 和 MPL™ (50 μ g/剂量) 或单用 PBS(pH 7)。

对于脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白, 第 0 和 4 周豚鼠接受 20 μ g 蛋白和以 PBS(pH6)配的 Stimulon™ QS-21(25 μ g/剂量)佐剂, 在第 0、4 和 6 周收集血清。

评估了重组表达的菌毛(淋球菌或脑膜炎球菌嵌合 I 类)诱导粘膜免疫应答的能力方法是对小鼠鼻内免疫接种 (a) 2.5 μ L 含 1 或 10 μ g 淋球菌重组菌毛蛋白的盐水(有或无 1 μ g 天然霍乱毒素), 或(b)5 μ g 嵌合 I 类重组菌毛蛋白稀释于 10 μ L PBS (pH 7), 有或无 1 μ g 突变体 CT—CRM, E29H 霍乱毒素。在第 0、2 和 3 周给予免疫注射。

实施例 12

抗淋球菌重组菌毛蛋白免疫应答的 Western 印迹分析

按照实施例 11 所述的方案，用纯化的淋球菌重组菌毛蛋白免疫接种豚鼠。首先用 Western 印迹分析了免疫接种过淋球菌重组菌毛蛋白的豚鼠的抗血清，（没有显示数据）。这些印迹显示抗淋球菌重组菌毛蛋白的抗血清识别了对应于带菌毛淋球菌细胞全细胞裂解物中菌毛蛋白的一个条带；同一淋球菌菌株无菌毛细胞裂解物中没有染色条带。

从淋球菌菌毛蛋白寡聚物免疫接种的豚鼠的抗血清中得到了可比较数据。如上述（4）通过解离完整的菌毛获得了菌毛蛋白寡聚物。简单而言，这包括将完整的菌毛在 37mM 磷酸钠（pH 12）中 4℃ 透析 48 小时，然后用 50mM TrisTM、145mM NaCl(pH 8.0)透析，然后离心（100,000×g，1 小时）澄清菌毛蛋白寡聚物。离心后，菌毛蛋白寡聚物保留在上清液中。与抗淋球菌重组菌毛蛋白的抗血清相比，菌毛蛋白寡聚物抗血清能与带菌毛的细胞裂解物结合，同时也结合带和不带菌毛细胞裂解物的许多其它条带（没有显示数据）。这些条带代表了菌毛蛋白寡聚物制品中的污染物，推测它们不与菌毛结合。

实施例 13

重组淋球菌菌毛蛋白 ELISA

通过 ELISA 测定了纯化的蛋白或细菌细胞的终点滴度。在所有 ELISA 操作中，除非特别指出，均在室温中培育 1 小时。终点滴度被定义为吸光值比空白孔（不含第一抗体）大 0.10 的外推稀释度。对于豚鼠抗血清分析，将纯化的重组菌毛蛋白稀释于 0.1M TrisTM (pH 8)，终浓度为 1μg/mL。每份（100μL）加入到微量滴定板（Immulon II, Nunc, Naperville IL）的孔中，在 4℃ 培养过夜。用 Skanwash 300 滴定板洗涤器（Skatron Instruments, Alexandria, VA），以含有 0.05%(v/v)TweenTM - 20(PBS-T)的 PBS 洗涤 5 次。各用 200μL 含 1% (w/v) BSA 的 PBS-T 封闭诸孔，洗涤，各孔加入一份抗血清（稀释于含 0.1%(w/v)BSA 的 PBS-T）。洗涤滴定板，用 100μL 偶联了兔抗豚鼠 IgG(重链或轻链)的碱性磷酸酶检测结合的第一抗体（Zymed Laboratories, South San Francisco, CA），此偶联物 1: 2000 稀释于含 0.1%(w/v)BSA 的 50mM TrisTM(pH 8)中。洗涤滴定板，用 100μL/孔磷酸对硝基苯（Sigma）(2mg/mL 在 0.5M 二乙醇胺中，0.25mM MgCl₂, pH9.8)进行显色。30 分钟后，加入 50μL 3N NaOH 终止反应。用 Thermomax ELISA 平板读数仪（Molecular

Devices, Sunnyvale, CA) 读取 405nm 吸光度。

所有用重组菌毛蛋白免疫接种的动物都有很好的应答反应，用抗原 ELISA 显示如表 1。

表 1

- 5 混合的抗淋球菌重组菌毛蛋白豚鼠抗血清与纯化的重组淋球菌菌毛蛋白结合的
终点滴度*

制备物	免疫原	终点滴度		
		第 0 周	第 4 周	第 6 周
1	重组 Pgh3-1 菌毛蛋白 (制品 1)	≤100	51, 345	494, 805
2	重组 Pgh3-1 菌毛蛋白 (制品 2)	54	30, 237	594, 298
3	重组 Pgh3-1 菌毛蛋白 (制品 3)	≤100	24, 830	546, 682

*三批不同的重组菌毛蛋白作为免疫原。豚鼠在第 0 和 4 周免疫接种 (皮下注射)，并在第 0、4 和 6 周采血。对混合的血清进行分析。

佐剂对免疫应答的影响

- 10 在小鼠中研究了以下佐剂对淋球菌重组菌毛蛋白免疫应答的影响：(a)以 PBS (pH6)配的 Stimulon™ QS-21；(b)以 PBS (pH7) 配的磷酸铝；(c)以 PBS (pH7) 配的 MPL™ (d)以 PBS (pH7) 配的磷酸铝和 MPL™；或单用 PBS(pH 7)。为了分析小鼠抗血清，如下改进了抗原 ELISA 流程。微量滴定板 (Costar EIA/RIA, Corning Costar, Cambridge, MA) 用 100μL 含有 1μg/mL 重组菌毛蛋白的 PBS37℃
15 包被过夜。用 Skantron 300 滴定板洗涤器以含有 0.1%(v/v) Tween™-20 的 PBS 洗涤板 5 次。用含有 0.1%(w/v)明胶和 0.02%NaN₃ 的 PBS 封闭各孔。第一抗体用 PBS 稀释，该 PBS 含有 0.1%(w/v)明胶、0.05%(v/v)Tween™-20(PBS-TG)和 0.02%(w/v)NaN₃，每份 100μL 在微量滴定板中培育 2 小时。洗涤后，用生物素酰化的兔抗小鼠 IgG(Fc 区域) (Brookwood Biomedical, Birmingham, AL) 以 PBS—
20 TG 和 0.02%(w/v)NaN₃1: 8000 稀释检测第一抗体。洗涤平板，依次用以链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶 (Zymed Laboratories) 1: 5000 稀释于 PBS—TG 和 0.02%(w/v)NaN₃(培养 30 分钟)检测第二抗体。洗涤平板，用含有 0.03%(v/v)过氧化氢的 0.1M 柠檬酸盐 (pH 4.2) 配的 0.5mg/mL 2, 2' - 连氮 - 双 - (3 - 乙基苯并噻唑啉 - 6 - 磺酸) (ABTS) 显色 30 分钟，用 SLT 340 ATTC 微板读数仪 (SLT
25 Labinstruments, Research Triangle Park, NC) 在 405nm 监测。用双对数坐标图描绘出数据，如上述确定终点滴度。

当重组菌毛蛋白用 MPL™ 为佐剂时，在小鼠中得到体液免疫应答，在数量级

上类似于用 Stimulon™ QS-21(表 2A)观察到的。分析同一动物的阴道冲洗物也显示，这些动物的阴道冲洗物有明显的 IgG 滴度（表 2B）。

表 2A

佐剂对淋球菌重组菌毛蛋白免疫应答的影响*

体液：

5

	抗原 ELISA	全细胞 ELISA				
		同源菌株	异源菌株			
佐剂	重组菌毛蛋白	Pgh3-1	LB2	#11	T-1	I756
AlPO ₄	361,260	249,410	93,444	141,622	42,535	89,615
MPL™	1,262,735	902,891	499,223	586,642	165,301	321,340
AlPO ₄ +MPL™	1,159,670	265,269	112,856	160,814	41,368	110,162
Stimulon™ QS-21	4,915,200	1,053,446	478,338	440,014	111,753	333,341

表 2B

佐剂对淋球菌重组菌毛蛋白免疫应答的影响*

阴道灌洗液**

佐剂	重组菌毛蛋白滴度		全细胞滴度***	
	IgG	IgA	LB2 P+	LB2 P-
AlPO ₄	1,452	262	68	≤50
MPL™	6,409	26	1,128	0
AlPO ₄ +MPL™	938	12	120	≤50
Stimulon™ QS-21	2,716	175	311	37

10 *Balb/c 小鼠（每组 5 只）在第 0、4 和 6 周免疫接种 10μg 重组菌毛蛋白，其中佐剂如上述。动物在第 0、4、6 和 8 周采血。对第 8 周的混合血清作分析。第 0 周的终点滴度≤5,000。

**在第 8 周获得的混合阴道灌洗液。

***用风干细胞的全细胞 ELISA。

15 P+：带菌毛的细胞。P-：带菌毛亲代细胞衍生的无菌毛突变体。

实施例 14

淋球菌全细胞 ELISA

在全细胞 ELISA 中证实了，在完整的装配的菌毛中发现重组菌毛蛋白表达的明显数目的交叉反应表位，其中抗纯化的重组菌毛蛋白的抗血清显示出对众多表达异源菌毛的淋球菌菌株的高滴度。豚鼠抗血清结合活淋球菌细胞的能力用如下方案测定。微量滴定板（Immunolon II）用 100 μ L 含有 0.01%(w/v) 聚-L-赖氨酸（Sigma）的 PBS4 $^{\circ}$ C 培育过夜。用 Dacron 拭子将前夜的细菌琼脂培养物收获入 PBS 中，将悬液的浊度调节到 $A_{600}=1.0$ 。除去微量滴定板中的聚赖氨酸液，将每份 100 μ L 细菌悬液加入到孔中。用手动式 Nunc 洗涤器以 PBS 洗涤板 5 次，用 200 μ L 含有 1%（w/v）BSA 的 PBS（PBS-B）封闭。然后，用 PBS 洗涤板 5 次，将每份 100 μ L 以含有 0.1% (w/v)BSA 的 PBS 稀释的抗血清加入到孔中。用 PBS 洗涤 5 次后，用 100 μ L 上述适当的碱性磷酸酶偶联物（以 1：2000 稀释于含有 0.1%BSA 的 PBS 中）检测结合的抗血清。洗涤板，如上述显色并进行吸光度读数（30 分钟显色）。

在用全细胞 ELISA 分析时，抗重组菌毛蛋白的豚鼠抗血清结合于各地理区域的带菌毛的细菌分离物，但不结合于同一淋球菌菌株的相应无菌毛的细胞（表 3）。

表 3

抗重组菌毛蛋白的豚鼠抗血清结合各菌株活淋球菌细胞的终点滴度*

菌株	来源	Pgh3-1 重组菌毛蛋白（制品 1）	Pgh3-1 重组菌毛蛋白（制品 2）	Pgh3-1 重组菌毛蛋白（制品 3）
Pgh3-1 P+	匹兹堡	2, 940, 971	2, 461, 272	2, 373, 641
Pgh3-1 P-	匹兹堡	<250	<250	<250
LB2 P+	未知	505, 439	481, 815	825, 517
LB2 P-	未知	187	34	114
I-756 P+	加拿大安大略湖	689, 309	713, 904	1, 026, 231
1948 P+	罗马尼亚	290, 367	259, 487	325, 640
1635 P+	巴拿马	2, 714, 006	$\geq 546, 750$	$\geq 546, 750$
22714FB P+	Fort Bragg, NC	397,763	346,895	498,882
T-1 P+	未知	189, 490	317, 370	272, 828
M-2 P+	未知	124, 906	117, 734	151, 966
3138K P+	韩国	220, 730	179, 127	584, 044
N-2 P+	诺福克,VA	350,210	337,232	435,164

J474B P+	牙买加	238, 640	205, 247	380, 970
新鲜临床分离物 52407 P+	坦帕, FL	598, 124	890, 678	778, 607
# 11 P+	Rochester,NY	214,673	292,358	385,985
2-57-U17 P+	Chapel Hill,NC	1,364,126	2,379,267	3,791,263
2-42-U14 P+	Chapel Hill,NC	1,449,757	1,964,641	11,619,267

*三批不同的重组菌毛蛋白作为免疫原。如上述免疫接种豚鼠（皮下照射）并且采血。分析第 6 周的混合血清。第 0 周血清的终点滴度≤250。

P+：带菌毛的细胞。P-：带菌毛亲代细胞衍生的无菌毛突变体。

用微量滴定板进行抗重组菌毛蛋白（表 2）小鼠抗血清的全细胞 ELISA 分析，其中用如下方案将孔中的细菌完全干燥。用 Dacron 拭子将前夜的细菌琼脂培养物收获于 PBS 中，并将细菌悬液的浊度调节到 $A_{600}=0.1$ 。每份（100μL）细菌悬液加入到孔中，37℃风干板。在蒸发掉所有液体后，密封板，4℃中保存到使用。剩下的试验采用上述小鼠抗血清的抗原 ELISA 流程。全细胞 ELISA 数据（表 2 和 3）提示，重组菌毛蛋白诱导的抗体结合于带菌毛淋球菌表面的保守表位。

10

实施例 15

诱导抗淋球菌重组菌毛蛋白的粘膜免疫应答

因为淋病是生殖道粘膜的一种疾病，有兴趣检验诱导粘膜免疫应答的粘膜免疫能力。按如下方法实施。在第 0、1 和 2 周，用淋球菌重组菌毛蛋白盐水（1 或 10μg/10μL）（有或无 1μg 天然霍乱毒素）鼻内免疫接种小鼠。在第 0、1 和 2 周，每组 5 只 Swiss-Webster 小鼠鼻内免疫接种重组菌毛蛋白（有或无霍乱毒素）。对混合的血清进行分析。第 0 周的终点滴度<50。

如表 4 所示，当动物用无佐剂的重组菌毛蛋白免疫接种时，在抗原 ELISA 中测到显著的免疫应答（第 0 周滴度<300）。该应答通过添加天然霍乱毒素得到提高。

20

表 4

抗淋球菌重组菌毛蛋白的混合小鼠抗血清与纯化的重组淋球菌菌毛蛋白结合的
终点滴度

抗原（剂量 μg）	佐剂（剂量 μg）	第 22 天	第 36 天	第 50 天
重组菌毛蛋白（1）	无	1, 648	1, 287	2, 291

重组菌毛蛋白 (10)	无	29, 046	20, 658	71, 067
重组菌毛蛋白 (1)	霍乱毒素 (1)	4, 673	7, 526	3, 273
重组菌毛蛋白 (10)	霍乱毒素 (1)	107, 011	321, 714	280, 079
无	霍乱毒素 (1)	<300	<300	<300

然后, 用抗淋球菌菌株 FA1090 的 ELISA 检验这些血清结合于完整、带菌毛淋球菌细胞的能力。如上述将这些细胞在微量滴定板上完全干燥。如表 5 所示, 在只用菌毛蛋白中测到低的滴度 (第 0 周滴度<300)。加入霍乱毒素能够大大提高与带菌毛细胞的结合。

5

表 5

抗淋球菌重组菌毛蛋白的混合小鼠抗血清与完整的、带菌毛淋球菌细胞结合的
终点滴度

抗原 (剂量 μg)	佐剂 (剂量 μg)	第 22 天	第 36 天	第 50 天
重组菌毛蛋白(1)	无	1, 009	852	729
重组菌毛蛋白(10)	无	6, 009	6, 252	5, 564
重组菌毛蛋白(1)	霍乱毒素 (1)	1, 133	1, 456	1, 048
重组菌毛蛋白(10)	霍乱毒素 (1)	209, 522	57, 767	38, 127
无	霍乱毒素 (1)	239	<500	<500

实施例 16

10 淋球菌免疫电镜术

采用如下流程观察了抗血清与带菌毛细菌的结合。用对数生长后期的 recA^- 带菌毛淋球菌液体培养物一份点滴到镀金的载网中 5 分钟, 用一张滤纸除去过量的液体。用 PSB-S 封闭载网 5 分钟, 然后用含 1% 新鲜明胶(Fluka, Ronkonkoma, NY) 的 PBS 封闭 10 分钟。然后在室温中, 用稀释于 PSB-B 的多克隆抗血清培育载网 1—60 分钟。将载网浸泡在 PBS-B 液滴中除去没有结合的抗体 (4×30 秒)。将载网浸泡在一滴结合于驴抗豚鼠 IgG(Jackson Research Labs, West Grove, PA) 12nm 的胶体金 (以 1: 5 稀释于 PBS-B) 中 30 分钟, 检测结合的第一抗体。然后如上述, 在 PBS-B 液滴上冲洗载网 5 次。然后用含 1%(v/v) 戊二醛 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) 的 PBS 固定样品 3 分钟, 再以蒸馏水漂洗 5×1 分钟, 用 NanoVan 染液 (NanoProbes, Stony Brook, NY) (pH 8) 轻微染色 30 秒。使载网接触滤纸除去所有的液体, 用 Zeiss 10C 透射电子显微镜, 在 15—75, 000X 以 80kv 加速电压检验。

如免疫电镜（图 1A）所示，抗重组菌毛蛋白抗体沿着淋球菌表面的异源菌毛纤丝的长度（方向）结合。这提示体内抗体将结合于那些细菌表面存在的表位。

实施例 17

5 淋球菌重组菌毛蛋白寡聚物的全细胞 ELISA

为了鉴定那些完整菌毛（或菌毛蛋白寡聚物）重组菌毛蛋白的生化和免疫特性，将纯化的重组菌毛蛋白通过 pH12 的磷酸缓冲液透析转变为重组菌毛蛋白寡聚物。用全细胞 ELISA，检验由该物质（重组菌毛蛋白寡聚物）诱导的抗血清结合于活的、带菌毛淋球菌的能力。如表 6 所示，与未处理的重组菌毛蛋白诱导产生的抗血清相比，抗重组菌毛蛋白寡聚物的抗血清对于结合各种带菌毛淋球菌细胞有非常低的滴度。这提示重组菌毛蛋白寡聚物丢失了大量通常存在于重组菌毛蛋白上的交叉反应表位。

表 6

15 pH12（“寡聚化”）对重组菌毛蛋白豚鼠抗血清结合于带菌毛淋球菌细胞终点滴度的影响*

菌株	重组菌毛蛋白	重组菌毛蛋白寡聚物**
I-756	927, 564	16, 903
FA-19	107, 100	1, 982
FA1090 (2-57-U17)	721, 786	6, 737
LB2	905, 711	4, 205
#11	225, 602	6, 999
#4	288, 120	8, 104
3138K	106, 315	5, 429
T-1	497, 987	42, 162
1948	166, 864	8, 616
J474B	576, 640	25, 002

*豚鼠（每组 4 只）在第 0 和 4 周，免疫接种（皮下注射）20μg 重组菌毛蛋白抗原，以 25μg Stimulon™ QS-21 为佐剂。分析第 6 周的混合的血清。

**在 4℃用磷酸钠（pH 12）透析纯化的重组菌毛蛋白 48 小时，然后用 PBS 透析 24 小时。

20 实施例 18

对黏附人子宫颈细胞的抑制

因为菌毛介导了淋球菌与人粘膜细胞的初级结合，所以研究了重组菌毛蛋白抗体抑制这些细菌附着上皮细胞的能力。选择了宫颈癌衍生的 ME-180 细胞。另外，为了使这些实验中带菌毛细菌的丛集最小化，使它们以液体悬浮培养物生长。这
5 需要用淋球菌菌株 Pgh3-1 或 I756 的 recA^- 衍生物，以维持菌毛的表达。在液体培养液中生长 4-5 小时期间，这些 recA^- 菌株没有显示出显著的丛集，这使结果翻译更为容易。

在这些实验中，用 ME-180 细胞接种 8 孔槽载玻片(Nunc)，实验当天这些细胞已 80-90% 铺满。用拭子将 recA^- 淋球菌细胞的过夜培养物移入 PBS（加热到
10 37°C）中，用于接种含液体 GC 培养基的摇瓶，该培养基补充有 0.4%(w/v) NaHCO_3 ，最终达到 $A_{600}=0.2$ 。细胞培养物 37°C 以 120RPM 振荡培养约 4 小时，此时培养物达到 $A_{600}\leq 0.8$ 。细菌细胞悬浮液以 RPMI 1640 作 1: 8 稀释，将第二排 8 孔槽的诸孔与 300 μL RPMI 1640 和胎牛血清至少培育 1 小时。除去 RPMI 1640 封闭液，加入 40 μL 抗血清或 RPMI 1640（无牛血清），然后加入 260 μL 稀释的细菌悬浮
15 液（ $\approx 8 \times 10^7$ CFU），37°C/5%（v/v） CO_2 培育 1 小时。含有 ME180 细胞的孔槽载玻片用无抗菌素的 RPMI 1640 冲洗。然后，将预温育的细菌和抗血清混合液加到 ME180 细胞上，37°C 温育载玻片 30 分钟。从子宫颈细胞单层除去含有未结合细菌细胞的培养基，用 RPMI 1640 轻轻冲洗诸孔 3 次。最后一次冲洗后，从载玻片上移去孔槽，细胞以甲醇固定 30-60 秒，用 Wright-Giemsa 染液(VWR Scientific,
20 West Chester, PA)染色。在水中脱色后，将盖玻片覆在每个孔上。

用油浸镜头光学显微镜检验载玻片，由不知道测试血清的人拍摄典型视野的照片。由同样不知道样品种类的人来分析所得到的图片。另外，因为带菌毛淋球菌以丛集形式结合于上皮单细胞层，所以抗血清对淋球菌细胞结合的影响通过计数细菌丛而不是细菌个体来定量测量。以十次随机扫描每个孔全孔所见测定带菌毛
25 细菌丛的数量。确定了含有免疫血清和正常血清孔之间的百分数差异。同样，该分析由不知道分析样品种类的研究者独立完成。

最初的结果显示，带菌毛和无菌毛细胞以不同的结合型式与 ME180 片状单层细胞结合。淋球菌带菌毛的两株菌株，典型地以细菌丛集结合于片状单层细胞中所选择的上皮细胞。相反，相应的同基因无菌毛细胞或者不结合（Pgh3-1）于或者呈现低水平、分散地结合（I756）于上皮单细胞层。所以，细菌在上皮单细胞
30 层上的聚集与菌毛的存在相关。

另外，测试了抗 Pgh3-1 重组菌毛蛋白豚鼠抗血清抑制菌株 I-756 带菌毛细胞

结合于 ME-180 细胞的能力。典型图片（比较图 2A（第 6 周）和图 2B（第 0 周））的分析显示，抗重组菌毛蛋白的抗体显著地抑制了带菌毛淋球菌与子宫颈上皮细胞的结合。相反，与正常豚鼠血清相比，重组菌毛蛋白抗血清对同一菌株的无菌毛细胞的结合没有影响（没有显示数据）。虽然不能测定在这些条件下细菌结合的数量，但通过计数在正常或免疫血清存在时结合的细菌丛可定量分析附着情况。用此法确定了（与正常豚鼠血清相比）抗重组菌毛蛋白抗血清减少了结合于上皮细胞的细菌丛约 60%。

虽然该试验没有得到易得的可量化数据，通过计数细菌丛得到的估算可能低估了抗血清的效力。这是因为其它细胞表面成份（如 Opa 蛋白）介导了这种结合，这不可能期望单用抗重组菌毛蛋白抗血清就能克服。

实施例 19

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的分析方法

用实施例 10 所述的分析方法分析嵌合脑膜炎球菌 I 类重组菌毛蛋白。如 MALDI-TOF 质谱仪测定的那样，脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的亚基分子量为 17,659 道尔顿，与根据氨基酸成分预期的分子量 17,676 道尔顿非常相似。当该蛋白用 Superose™ 12 柱（以含有 0.05%(w/v) Zwittergent™ 3-14 的 PBS 平衡）作大小排阻层析分析时，嵌合 I 类重组菌毛蛋白的表观分子量为 69,480 道尔顿。这与相同条件下分析的淋球菌重组菌毛蛋白的表观分子量（68,899 道尔顿）基本相同。

用 Edman 降解法测定了纯化的脑膜炎球菌 I 类重组菌毛蛋白的 N 端序列，结果（得自三个不同的样品）与预计的蛋白序列相一致。对所有序列至少测定了 35 个残基。

25 实施例 20

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白 ELISA

用实施例 13 和 14 所述的方法，用 ELISA 测定了抗纯化蛋白或细菌细胞抗血清的终点滴度。用分别采血的混合血清作 ELISA。在脑膜炎球菌细胞上作全细胞 ELISA，该细胞加热杀死（56℃，60 分钟）或直接在微量滴定板上完全干燥。在 620nm，将细胞悬浮液稀释到 620nm 吸光度为 0.1，取每份 100μL 置于微量滴定板的孔中。使每个板在 37℃或室温干燥，密封，保存于 4℃直到使用。改变全细胞 ELISA 的流程如下：（1）将第一和第二抗血清稀释于含有 0.1%(v/v)Tween™-

20 和 0.1% (w/v)BSA 的 PBS 中；和 (2) 用 Skanwash 300 滴定板洗涤器以含有 0.05%(v/v) Tween™-20 的 PBS 洗涤平板 5 次。

所有用嵌合 I 类重组菌毛蛋白免疫接种的豚鼠应答良好，如抗原 ELISA 显示见表 7。

5

表 7

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清与纯化的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白结合的终点滴度*

佐剂：

采血	Stimulon™ QS-21	AlPO ₄	无
第 0 周	23	12	32
第 4 周	26, 607	12, 067	4, 829
第 6 周	1, 519, 956	327, 539	302, 911

10 *豚鼠（每组 4 只）在第 0 和 4 周免疫接种（皮下注射）20μg 嵌合 I 类重组菌毛蛋白，其中添加的佐剂为 (a) 25μg Stimulon™ QS-21 的 PBS (pH 6)；(b)100μg AlPO₄ 盐水；或 (c) 单用 PBS (pH 7)。动物在第 0、4 和 6 周采血。所有分析采用了混合的血清。

如表 8 所示，对带菌毛细胞的 ELISA 观察到显著的应答。

表 8

15 脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清与脑膜炎球菌（菌株 H355）的带菌毛细胞结合的终点滴度*

佐剂：

采血	Stimulon™ QS-21	AlPO ₄	无
第 0 周	28	19	53
第 4 周	1, 293	1, 052	381
第 6 周	61, 497	25, 477	16, 467

*细胞加热杀死。

佐剂对免疫应答的影响

20 用实施例 13 所述的方法，在小鼠中研究了佐剂对脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的免疫应答的影响。如表 9 所示，加入 Stimulon™ QS-21 实现了抗血清与脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白结合的最显著的应答。

表 9

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清与纯化的脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌

毛蛋白结合的终点滴度*

佐剂:

采血	Stimulon™ QS-21	AlPO ₄	MPL™	AlPO ₄ / MPL™	无
第 0 周	<50	44	<50	31	<50
第 4 周	44,011	29,925	40,146	110,093	<250
第 6 周	707,084	103,437	284,455	137,686	115, 022

*小鼠（每组 10 只）在第 0 和 4 周免疫接种（皮下注射）10μg 脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白，其中添加的佐剂为（a）25μg Stimulon™ QS-21 的 PBS（pH 6）；（b）100μg AlPO₄ 盐水；（c）50μg MPL™ 的 PBS（pH 7）；（d）100μg AlPO₄ 和 50μg MPL™ 盐水；或（e）单用 PBS（pH 7）。动物在第 0、4 和 6 周采血。所有分析采用了混合的血清。

如表 10 所示，加入 Stimulon™ QS-21 也实现了抗血清与脑膜炎球菌带菌毛细胞结合的最显著的应答。

10表 10

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清与脑膜炎球菌（菌株 H355）带菌毛细胞结合的终点滴度*

佐剂:

采血	Stimulon™ QS-21	AlPO ₄	MPL™	AlPO ₄ / MPL™	无
第 0 周	172	146	153	160	<50
第 4 周	6,088	2,310	4,205	5,647	311
第 6 周	171,718	25,135	52,053	17,039	16,617

细胞加热杀死。

15进一步分析显示了，抗嵌合 I 类重组菌毛蛋白的抗血清能与表达 I 类菌毛蛋白（在一些实验中为 II 类菌毛蛋白）的脑膜炎球菌细胞结合。显示于表 11 中的结果是部分交叉反应的证据。

表 11

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白与脑膜炎球菌带菌毛细胞结合的终点滴度*

佐剂

20

菌株	表达的菌毛蛋白的类型	第 0 天	Stimulon™ QS-21	AlPO ₄	MPL™
H355	I	409	127,383	41,190	102,987
M982	I	217	>36,540	>36,540	>36,540
CDC1521	II	988	2,602	1,345	1,768
FAM18	II	3,518	>36,540	26,513	>36,540

*细胞不经过加热杀死，而直接在微量滴定板上干燥（室温）。

实施例 21

脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白免疫电镜术观察

5 如下采用透射电子显微术观察了嵌合脑膜炎球菌 I 类重组菌毛蛋白抗血清与脑膜炎球菌菌株 H355 带菌毛细胞的结合。用无菌环仔细地
膜炎球菌前夜培养物中挑出一个菌落，置于含有 0.5-1.0mL 改进的 Franz 培养基[1.3 g/L 谷氨酸、20mg/L 半胱氨酸、10g/L Na₂HPO₄ · 7H₂O、90mg/L KCl、6 g/L NaCl、2g/L 酵母
10 透析物并且补充以葡萄糖（4g/L）、谷氨酸（100mg/L）、脱羧辅酶（200μg/L）和硝酸铁（5mg/L）]的 microfuge 管内。每份细胞悬浮液点样 5 次于镀金载网上，其中每份细胞悬浮液花了 5 分钟，用滤纸除去过量的液体。然后用含有 4%(v/v) 多聚甲醛、0.1%（v/v）戊二醛的 PBS 室温固定细菌细胞 30 分钟。载网逐一与以下物质培育：(a) PBS-B，5 分钟；(b)1%（w/v）新鲜明胶 PBS，10 分钟；和(c)含有 0.2M 甘氨酸的 PBS，5 分钟。然后如实施例 16 所述，用抗脑膜炎球菌嵌合 I
15 类重组菌毛蛋白抗血清检测封闭的载网。如图 3A 所示，抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗体沿着菌毛的长度（方向）结合。相反，正常血清（第 0 周）没有显示与菌毛有任何结合（图 3B）。

实施例 22

20 脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清与淋球菌带菌毛细胞的交叉反应性
根据脑膜炎球菌 I 类菌毛蛋白和淋球菌菌毛蛋白的序列类似性，在上述实施例 4 中已显示抗淋球菌重组菌毛蛋白的抗血清识别并结合于带菌毛的脑膜炎球菌细胞。在本实施例中，证明了抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的抗血清结合于带菌毛的淋球菌细胞。表 12 和 13 分别总结了小鼠和豚鼠实验的数据。

表 12

抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的小鼠抗血清与带菌毛淋球菌细胞结合的
终点滴度

淋球菌 菌株	抗原/佐剂					淋球菌重组菌 毛蛋白+ MPL™
	脑膜炎球菌重组 I 类菌毛蛋白					
	Stimulon ^T M QS-21	AlPO ₄	MPL™	AlPO ₄ /M PL™	无	
I756	4, 527, 943	79, 927	114, 958	56, 627	57, 426	356, 936
FA1090	531, 627	40, 406	97, 224	31, 267	38, 122	219, 600

5

表 13

抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的豚鼠抗血清与带菌毛淋球菌细胞结合的
终点滴度

抗原/佐剂				
淋球菌 菌株	脑膜炎球菌重组 I 类菌毛蛋白			淋球菌重组菌毛蛋白 + Stimulon™ QS-21
	Stimulon™ QS-21	AlPO ₄	无	
I756	301, 969	122, 714	78, 111	46, 424
FA1090	322, 311	262, 422	170, 842	108, 094

10

实施例 23

用脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清被动保护机体抵抗脑膜炎球菌菌血症

15 Saukkonen 和 Leinonen (34) 最初描述的幼大鼠模型是一种评价疫苗保护机体能抗脑膜炎球菌菌血症能力的可行性动物模型。测试了抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白豚鼠抗血清（以 Stimulon™ QS-21 为佐剂）保护幼大鼠抵抗菌血症（由表达菌毛蛋白的脑膜炎球菌菌株造成）的能力。在第 0 天，Sprague-Dawley 幼大鼠（4-5 日龄）被动免疫接种（腹膜内注射）0.1mL 抗嵌合 I 类重组菌毛蛋白豚鼠抗血清（第 6 周）（以 1：5、1：10 或 1：20 稀释于 PBS）。对照组接受 0.1mL

正常豚鼠血清（第 0 周）（以 1：5 稀释于 PBS）注射。24 小时后，用约 5×10^5 菌落形成单位（cfu）的 0.1mL 带菌毛脑膜炎球菌（菌株 H355）攻击（腹膜内注射）动物。攻击 3 小时后，处死动物，取等份心血稀释，置于 GC 琼脂平板上。然后在 37℃5%CO₂ 中培育平板 18—24 小时。计数细菌菌落，然后确定菌血症的水平。用一种方差 t 检验分析方法比较了接受免疫血清（第 6 周）组和接受正常血清（第 0 周）对照组。如下表 14 所显示，与用正常豚鼠血清免疫接种的动物相比，用特异性抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的豚鼠抗血清被动免疫接种的动物，表现出菌血症水平呈对数级减少。该差异有统计学意义， $p<0.05$ 。

表 14

10 抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的豚鼠抗血清在用带菌毛脑膜炎球菌（菌株 H355）攻击的幼大鼠中防止菌血症的能力*

采血	稀释度	cfu 平均值±std
第 0 周	1： 5	4.87±0.18
第 6 周	1:5	3.55±0.48**
第 6 周	1:10	3.63±0.36**
第 6 周	1:20	3.98±0.75**

*如表 7 所述，从豚鼠获得的抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白抗血清。

** $p<0.05$ 。

cfu±std=菌落形成单位±标准差

15

实施例 24

诱导抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白的粘膜免疫应答

在第 0、1 和 2 周，给小鼠鼻内免疫接种脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白盐水（5μg/10μL），其中含有或不含有交叉反应突变形式的霍乱毒素（CT—CRM，E29H）。如下表 15 所示，当动物用无佐剂的重组菌毛蛋白免疫接种时，在抗原 ELISA 中测到显著的免疫应答。加入霍乱毒素提高了该应答。

20

表 15

抗脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白混合小鼠抗血清与纯化的重组脑膜炎球菌嵌合 I 类重组菌毛蛋白结合的终点滴度*

25

	重组菌毛蛋白（无佐剂）	重组菌毛蛋白加 CT-CRM
血清	6,168	1,181,871
IgG	490	3,940
IgA		
支气管洗液**	<10	580
IgG	<10	19
IgA		
鼻腔洗液**	<10	98
IgG	12	236
IgA		
阴道灌洗液**	174	70
IgG	15	687
IgA		

*分析了第4周的混合血清。第0周混合血清的IgG和IgA终点滴度<50。

**如下进行灌洗：

支气管：用1mL RPMI 1640灌洗肺5次，然后在样品中加入50μL胎牛血清（FBS），离心（2,000×g×5分钟）澄清，-20℃保存。

5 鼻腔：用0.5mL RPMI 1640灌洗鼻孔一次，在样品中加入20μL FBS，然后-20℃保存。

阴道：用0.075mL RPMI 1640灌洗阴道5次，然后在样品中加入10μL FBS，-20℃保存。

10 实施例25

用脑膜炎球菌嵌合I类重组菌毛蛋白抗血清主动保护抵御脑膜炎球菌的定居

人体内脑膜炎球菌疾病的第一步是细菌在鼻咽中定居。在这一过程中，据信菌毛在介导细菌与上皮细胞初步接触中起主要作用。许多研究者描述了新生动物鼻咽中细菌定居的过程，但没有人将其作为测试脑膜炎球菌疫苗效力的模型进行研究（35）。为了评价本发明，开发了用成熟远交小鼠作为脑膜炎球菌鼻内定居的模型。在第0、4和8周，对Swiss-Webster小鼠皮下免疫接种脑膜炎球菌嵌合I类重组菌毛蛋白（以MPL™为佐剂）。在第10周，动物腹腔内注射2mg右旋糖苷铁（Sigma），并且用10μL约1×10⁷cfu的对数生长中期的带菌毛脑膜炎球菌（同样含有40μg右旋糖苷铁）鼻内攻击。攻击后第1天，一半动物再接受腹腔

内注射 2mg 右旋糖苷铁。攻击后第 1 和 2 天，通过将鼻组织匀浆接种于含选择性抗菌素的 GC 琼脂平板上，测定了鼻中活菌的数量。结果显示于表 16。

表 16

用带菌毛的脑膜炎球菌菌株 H355 攻击的小鼠鼻匀浆中回收的活菌数 (cfu) *

抗原 (剂量 μg)	cfu/鼻	
	第 1 天**	第 2 天**
H355 全细胞 (25)	1, 165	67
I 类重组菌毛蛋白 (10)	6, 866	63
盐水	17, 943	3, 406

5 *所有疫苗以 100μg MPL™/剂配制。每组由 5 只小鼠组成。

 **鼻内攻击后的天数。

实施例 26

Western 印迹分析抗脑膜炎球菌 II 类嵌合重组菌毛蛋白的免疫应答

10 采用如实施例 11 所述的流程，用纯化的脑膜炎球菌 II 类嵌合重组菌毛蛋白免疫接种豚鼠。首先用 Western 印迹法分析了用脑膜炎球菌 II 类嵌合重组菌毛蛋白免疫接种的豚鼠产生的抗血清（没有显示数据）。这些印迹显示，抗脑膜炎球菌 II 类嵌合重组菌毛蛋白抗血清识别了相应于带菌毛脑膜炎球菌细胞（表达 II 类菌毛蛋白（FAM18）或 I 类菌毛蛋白（H355））的全细胞裂解物中菌毛蛋白的一个

15 条带。相反，抗含有 pTrcHis 载体的大肠杆菌提取物的抗血清在 Western 印迹中不与任何菌毛蛋白条带反应。

实施例 27

抗脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白与带菌毛脑膜炎球菌细胞的结合

20 抗部分纯化的脑膜炎球菌嵌合 II 类重组菌毛蛋白的抗血清显示能结合于同源菌株 FAM18 的脑膜炎球菌细胞，滴度>36, 450（第 0 周的滴度为 473）。

参考文献

1.Tennent, J.M.,和 Mattick, J.S., Fimbriae. Adhesion, Genetics, biogenesis and vaccines,
25 第 127-146 页, P. Klemm, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL 1994).
2.Strom, M. S., 和 Lory, S., Ann. Rev. Microbiol., 47, 565-596(1993).
3.Heckels, J.E., Clin. Microbiol. Rev., 2(Suppl.), S66-73(1989).

- 4.美国专利 4,702,911,
- 5.Schoolnik, G.K., J. Exp. Med., 159, 1351-1370(1984).
- 6.Davies, J.K., 等人, Fimbriae. Adhesion, genetics, biogenesis and vaccines, 第 147-155 页, P. Klemm, Ed. (CRC Press, Boca Raton , FL 1994).
- 5 7.Aho, E.L., 等人, Infect. Immun., 65,2613-2620(1997).
- 8.Achtman, M., 等人, J. Inf. Dis., 165,53-68(1992).
- 9.Levine, M. M., 等人, Fimbriae. Adhesion, genetics, biogenesis and vaccines, 第 255-270 页 P. Klemm, Ed.(CRC Press, Boca Raton ,FL 1994).
10. Stewart, D.J., 等人, Aust. Vet. J., 62,153-159(1985).
- 10 11. Tramont, E.C., Clin. Microbiol. Rev., 2(Suppl.),S74-7(1989).
- 12.Boslego, J.W., 等人 Vaccine, 9, 154-162(1991).
- 13.Rothbard, J.B., 和 Schoolnik, G.K., Adv. Exp. Med. Biol., 185,247-73(1985).
14. Olafson, R.W., 等人, Infect. Immun., 48,336-342(1985).
- 15.Seifert, H.S., 等人, Vaccine, 6.107-109(1988).
- 15 16.Sparling, P.F., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91,2456-2463(1994).
- 17.Tothbard ,J.B., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82,915-919(1985).
18. Forest, K.T., 和 Tainer, kJ.A., Vaccines 97. Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases, 第 167-173 页 F. Brown, 等人, Eds.(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1997).
- 20 19. Robinson , E.N.J., 等人, Mol. Microbiol., 3, 57-64(1989).
20. Eisentein, B.I., 等人, Recombinant DNA vaccines: rationale and stratagies, 第 89-113 页 R.E. Isaacson, Ed., (Marcel Dekker, Inc., New York, NY 1992).
- 21.Lepper, A.W., Aust. Vet. J., 65,310-316(1988).
- 22.Hull, R.A., 等人, Infec. Immun., 33,933-938(1981).
- 25 23.欧洲专利 202,260 B1
24. Hoyne, P.A., 等人, J.Bact., 174, 7321-7327(1992).
25. Elleman, T.C., 等人, Infect. Immun., 51, 187-192(1986).
26. O'Meara, T.J., 等人, Immun. Cell. biol., 71,473-488(1993).
- 27.Emery, D.L., 等人, Aust. Vet. J., 61,237-8(1984).
- 30 28.Stewart, D.J., 等人, Vet. Microbiol., 27,283-93(1991).
29. Alves, A.M.B., 等人, American Society for Microbiology, Abstract E-97, 第 253 页(1997).

-
30. Meyer, T.F., 等人, Cell, 30, 45-52(1982).
31. Sambrook, J., 等人, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , N. Y.(1989).
32. Stephens, D.S., Clin. Microbiol. Rev., 2(Suppl.), S104-111(1989).
- 5 33. Tramont, E.C., 等人, J. Clin. Invest., 68,881-888(1981).
34. Saukkonen, K.和 Leinonen, M., Gonococci and Meningococci, 第 815-820 页 J.T. Poolman, Ed. (Kluwer Academic Publications, Dordrecht, Netherland, 1986).
35. Salit, I.E., 等人, Can.J.Microbiol., 30, 1022-1029(1984).

序 列 表

5

<110> American Cyanamid Company

10 <120>含有重组菌毛蛋白的抗淋病奈瑟氏球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌的疫苗

<130> 33377-00/PCT

15 <140>

<141>

<160> 24

20 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 504

<212> DNA

25 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：嵌合的脑膜炎奈瑟氏球菌 I 类和淋病奈瑟氏球菌序列

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(501)

<400> 1

35

```
atg gat acc ctt caa aaa ggc ttt acc ctt atc gag ctg atg att gtg      48
Met Asp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val
  1             5             10             15
```

40

```
atc gcc atc gtc ggc att ttg gcg gca gtc gcc ctt ccc gcc tac caa      96
Ile Ala Ile Val Gly Ile Leu Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Tyr Gln
      20             25             30
```

45

```
gac tac acc gcc cgc gcg caa gtt tcc gaa gcc atc ctt ttg gcc gaa 144
Asp Tyr Thr Ala Arg Ala Gln Val Ser Glu Ala Ile Leu Leu Ala Glu
      35             40             45
```

50

```
ggt caa aaa tca gcc gtt acc gag tat tac ctg aat cac ggc gaa tgg 192
Gly Gln Lys Ser Ala Val Thr Glu Tyr Tyr Leu Asn His Gly Glu Trp
      50             55             60
```

ccc ggc aac aac act tct gcc ggc gtg gca tct tct tca aca atc aaa 240
 Pro Gly Asn Asn Thr Ser Ala Gly Val Ala Ser Ser Ser Thr Ile Lys
 65 70 75 80
 5

ggc aaa tat gtt aag gaa gtt aca gtc gca aac ggc gtc att acc gcc 288
 Gly Lys Tyr Val Lys Glu Val Thr Val Ala Asn Gly Val Ile Thr Ala
 85 90 95
 10

aca atg ctt tca agc ggc gta aac aaa gaa atc caa ggc aaa aaa ctc 336
 Thr Met Leu Ser Ser Gly Val Asn Lys Glu Ile Gln Gly Lys Lys Leu
 100 105 110
 15

tcc ctg tgg gcc aag cgt caa gac ggt tcg gta aaa tgg ttc tgc gga 384
 Ser Leu Trp Ala Lys Arg Gln Asp Gly Ser Val Lys Trp Phe Cys Gly
 115 120 125
 20

cag ccg gtt acg cgc acc gac gcc aaa gcc gac acc gtc gcc gcc gcc 432
 Gln Pro Val Thr Arg Thr Asp Ala Lys Ala Asp Thr Val Ala Ala Ala
 130 135 140
 25

gcc aag acc gcc gac aac atc aac acc aag cac ctg ccg tca acc tgc 480
 Ala Lys Thr Ala Asp Asn Ile Asn Thr Lys His Leu Pro Ser Thr Cys
 145 150 155 160
 30

cgc gac gca agt gat gcc agc taa 504
 Arg Asp Ala Ser Asp Ala Ser
 165
 <210> 2
 <211> 167
 <212> PRT
 35
 <213> 人工序列

<400> 2
 Met Asp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val
 1 5 10 15
 40

Ile Ala Ile Val Gly Ile Leu Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Tyr Gln
 20 25 30
 45

Asp Tyr Thr Ala Arg Ala Gln Val Ser Glu Ala Ile Leu Leu Ala Glu
 35 40 45
 50

Gly Gln Lys Ser Ala Val Thr Glu Tyr Tyr Leu Asn His Gly Glu Trp

	50	55	60	
5	Pro Gly Asn Asn Thr Ser Ala Gly Val Ala Ser Ser Ser Thr Ile Lys			
	65	70	75	80
10	Gly Lys Tyr Val Lys Glu Val Thr Val Ala Asn Gly Val Ile Thr Ala			
	85	90	95	
15	Thr Met Leu Ser Ser Gly Val Asn Lys Glu Ile Gln Gly Lys Lys Leu			
	100	105	110	
20	Ser Leu Trp Ala Lys Arg Gln Asp Gly Ser Val Lys Trp Phe Cys Gly			
	115	120	125	
25	Gln Pro Val Thr Arg Thr Asp Ala Lys Ala Asp Thr Val Ala Ala Ala			
	130	135	140	
30	Ala Lys Thr Ala Asp Asn Ile Asn Thr Lys His Leu Pro Ser Thr Cys			
	145	150	155	160
35	Arg Asp Ala Ser Asp Ala Ser			
	165			
40	<210> 3			
	<211> 510			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
45	<220>			
	<223> 人工序列描述: 嵌合脑膜炎奈瑟氏球菌 II 类和淋病奈瑟氏球菌			
50	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1).. (510)			
55	<400> 3			
	atg gaa gca atc caa aaa ggt ttc acc ctg atc gag ctg atg atc gtc			48
	Met Glu Ala Ile Gln Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val			
	1	5	10	15
60	atc gcc atc gtc ggt atc ttg gca gcc gtc gcc ctg ccc gca tac caa			96
	Ile Ala Ile Val Gly Ile Leu Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Tyr Gln			
	20	25	30	
65	gac tac acc gcg cgc gcc caa atg tcc gaa gcc ctg act ttg gca gaa			144
	Asp Tyr Thr Ala Arg Ala Gln Met Ser Glu Ala Leu Thr Leu Ala Glu			
	35	40	45	

```

      ggt caa aaa tcc gca gtg atc gag tat tat tcc gac aac ggc aca ttc 192
      Gly Gln Lys Ser Ala Val Ile Glu Tyr Tyr Ser Asp Asn Gly Thr Phe
           50                55                60
5
      ccg aac agc aat act tcc gca ggt att gct gcc tct aac gag att aaa 240
      Pro Asn Ser Asn Thr Ser Ala Gly Ile Ala Ala Ser Asn Glu Ile Lys
           65                70                75                80

10      ggt aag tat gtg gca tcg gtt aag gtt gaa ggt aat gcc tct gtt gct 288
      Gly Lys Tyr Val Ala Ser Val Lys Val Glu Gly Asn Ala Ser Val Ala
                85                90                95

      tct att acc gct acc atg aac tct agt aat gtg aat aag gac atc aaa 336
15      Ser Ile Thr Ala Thr Met Asn Ser Ser Asn Val Asn Lys Asp Ile Lys
                100                105                110

      ggt aaa acc ttg gta ctc gtc ggc aaa caa aac tcc ggt tcg gta aaa 384
20      Gly Lys Thr Leu Val Leu Val Gly Lys Gln Asn Ser Gly Ser Val Lys
                115                120                125

      tgg ttc tgc gga cag ccg gtt acg cgc gac aac gcc gac aac gac gac 432
25      Trp Phe Cys Gly Gln Pro Val Thr Arg Asp Asn Ala Asp Asn Asp Asp
           130                135                140

      gtc aaa gac gcc ggc aac aac ggc atc gaa acc aag cac ctg ccg tca 480
      Val Lys Asp Ala Gly Asn Asn Gly Ile Glu Thr Lys His Leu Pro Ser
           145                150                155                160

30      acc tgc cgc gat acg tca tct gat gcc aaa 510
      Thr Cys Arg Asp Thr Ser Ser Asp Ala Lys
                165                170

35
      <210> 4
      <211> 170
      <212> PRT
      <213> 人工序列

40
      <400> 4
      Met Glu Ala Ile Gln Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val
           1                5                10                15

45      Ile Ala Ile Val Gly Ile Leu Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Tyr Gln
                20                25                30

      Asp Tyr Thr Ala Arg Ala Gln Met Ser Glu Ala Leu Thr Leu Ala Glu
                35                40                45

50      Gly Gln Lys Ser Ala Val Ile Glu Tyr Tyr Ser Asp Asn Gly Thr Phe
           50                55                60

```

	Pro Asn Ser Asn Thr Ser Ala Gly Ile Ala Ala Ser Asn Glu Ile Lys	
	65 70 75 80	
5	Gly Lys Tyr Val Ala Ser Val Lys Val Glu Gly Asn Ala Ser Val Ala	
	85 90 95	
	Ser Ile Thr Ala Thr Met Asn Ser Ser Asn Val Asn Lys Asp Ile Lys	
	100 105 110	
10	Gly Lys Thr Leu Val Leu Val Gly Lys Gln Asn Ser Gly Ser Val Lys	
	115 120 125	
	Trp Phe Cys Gly Gln Pro Val Thr Arg Asp Asn Ala Asp Asn Asp Asp	
15	130 135 140	
	Val Lys Asp Ala Gly Asn Asn Gly Ile Glu Thr Lys His Leu Pro Ser	
	145 150 155 160	
20	Thr Cys Arg Asp Thr Ser Ser Asp Ala Lys	
	165 170	
25	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
30	<400> 5	
	ccccgcgcca tggataccct tcaaaaaggc	30
35	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
40	<400> 6	
	gggcctggat ccgtgggaaa tcacttaccg	30
45	<210> 7	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
50	<400> 7	
	ggctctagac tgtcagacca agtttactc	29
	<210> 8	

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
5	<400> 8	
	ggctctagat tgaagcattt atcaggg	27
	<210> 9	
	<211> 28	
10	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
	<400> 9	
15	ggctctagat aaacagtaat acaagggg	28
	<210> 10	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
20	<400> 10	
	ggctctagat tagaaaaact catcgagc	28
25	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> I 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
30	<400> 11	
	ccccgcgcca tggacaccct tcaaaaaggt tttacc	36
	<210> 12	
35	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> I 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
	<400> 12	
40	gggcctggat ccgagtggcc gtggaaaatc acttaccgc	39
	<210> 13	
	<211> 31	
	<212> DNA	
45	<213> I 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
	<400> 13	
	ccggcgcgtc tctcacggcg aatggccccg c	31
50	<210> 14	
	<211> 39	
	<212> DNA	

	<213> I 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
5	<400> 14 gggcctggat ccgagtggcc gtggaaaatc acttaccgc	39
10	<210> 15 <211> 25 <212> DNA <213> 淋病奈瑟氏球菌	
15	<400> 15 gcataattcg tgctgctcaa ggcgc	25
20	<210> 16 <211> 34 <212> DNA <213> 淋病奈瑟氏球菌	
25	<400> 16 gccgcgcgc tcccgtgatt caggtaatac tcgg	34
30	<210> 17 <211> 25 <212> DNA <213> I 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
35	<400> 17 gcataattcg tgctgctcaa ggcgc	25
40	<210> 18 <211> 39 <212> DNA <213> I 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
45	<400> 18 gggcctggat ccgagtggcc gtggaaaatc acttaccgc	39
50	<210> 19 <211> 37 <212> DNA <213> II 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
	<400> 19 gcggccgcca tggaagcaat ccaaaaaggt ttcaccc	37
	<210> 20	

	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> II 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
5	<400> 20	
	gccgcgcgctc tccgaaccgg agttttgttt gcc	33
10	<210> 21	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
15	<400> 21	
	ccgggccgctc tcggttcggt aaaatggttc tgc	33
20	<210> 22	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
	<400> 22	
	gggcctggat ccgtgggaaa tcacttacgg	30
25	<210> 23	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> II 类脑膜炎奈瑟氏球菌	
30	<400> 23	
	gcggccggat ccggtcattg tccttatttg gtgcggc	37
35	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> PRT	
	<213> 淋病奈瑟氏球菌	
40	<400> 24	
	Glu Ala Ile Leu Leu Ala Glu Gly Gln Lys Ser Ala Val Thr Glu Tyr	
	1 5 10 15	
45	Tyr Leu Asn His Gly Lys	

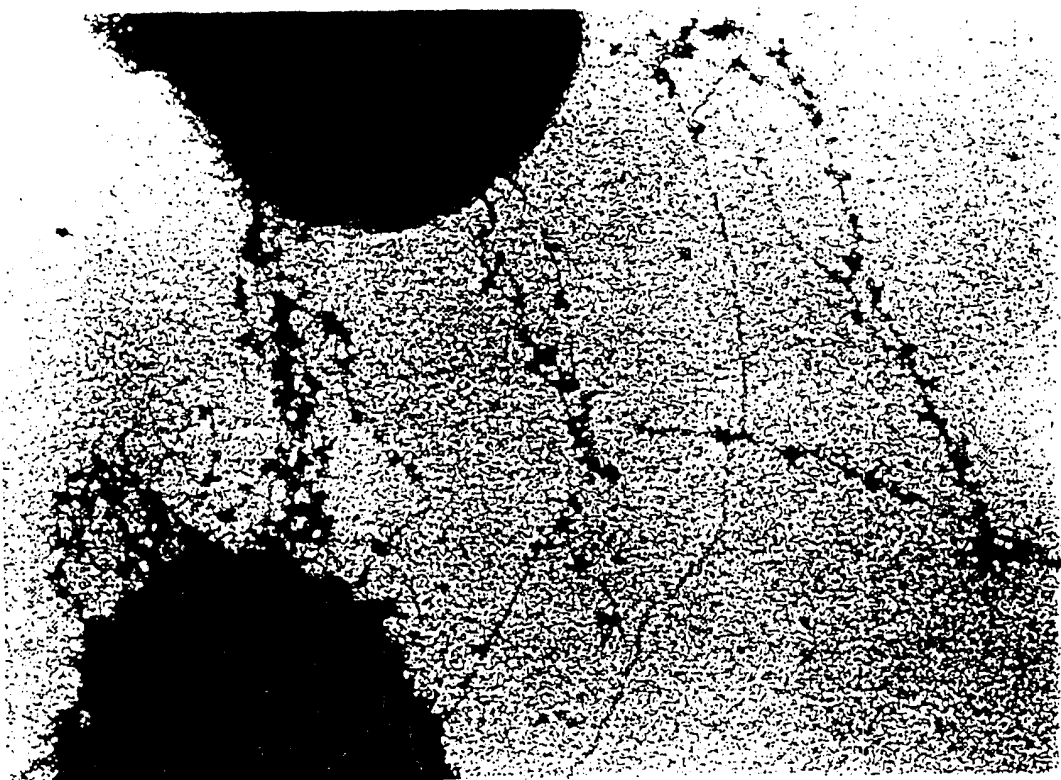


图 1A

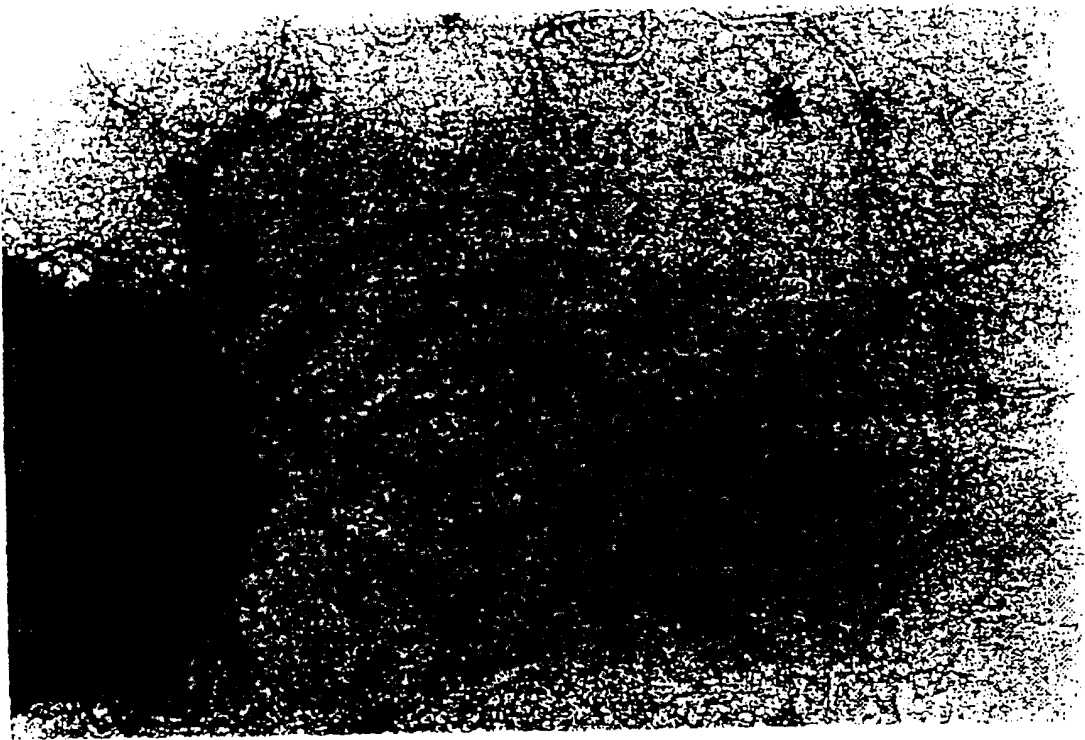


图 1B

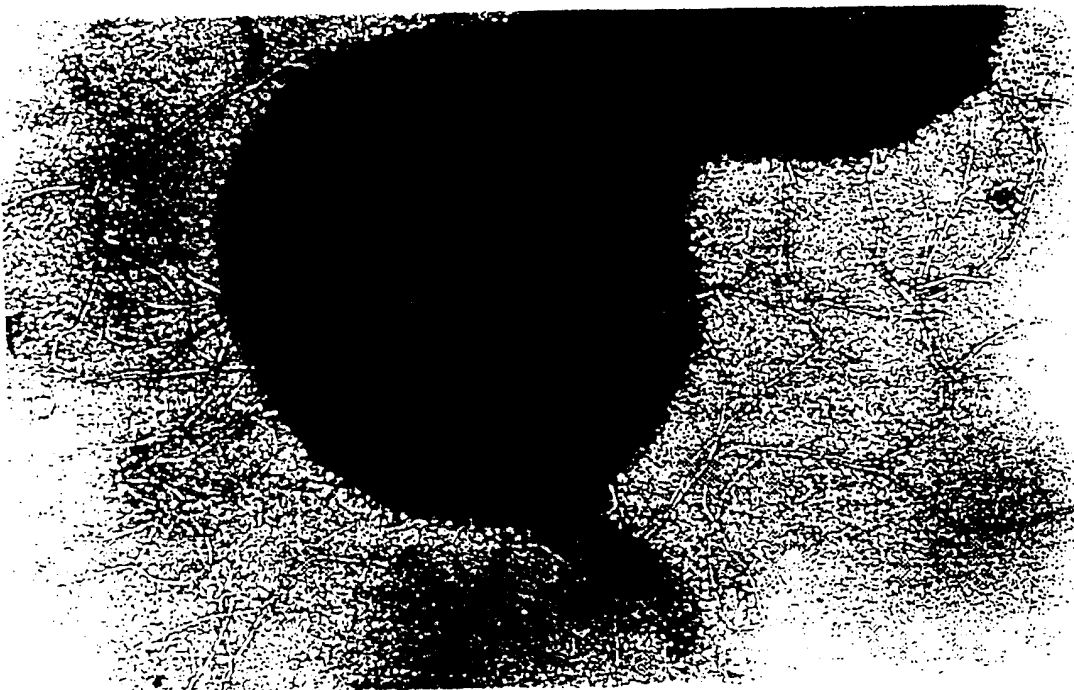
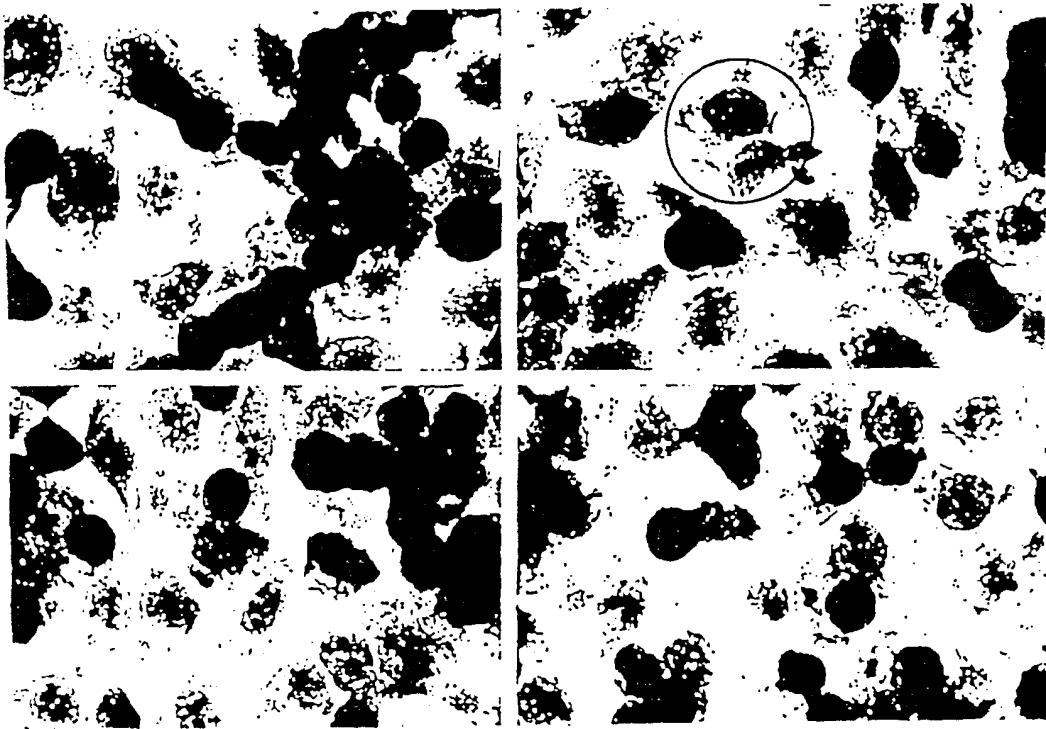
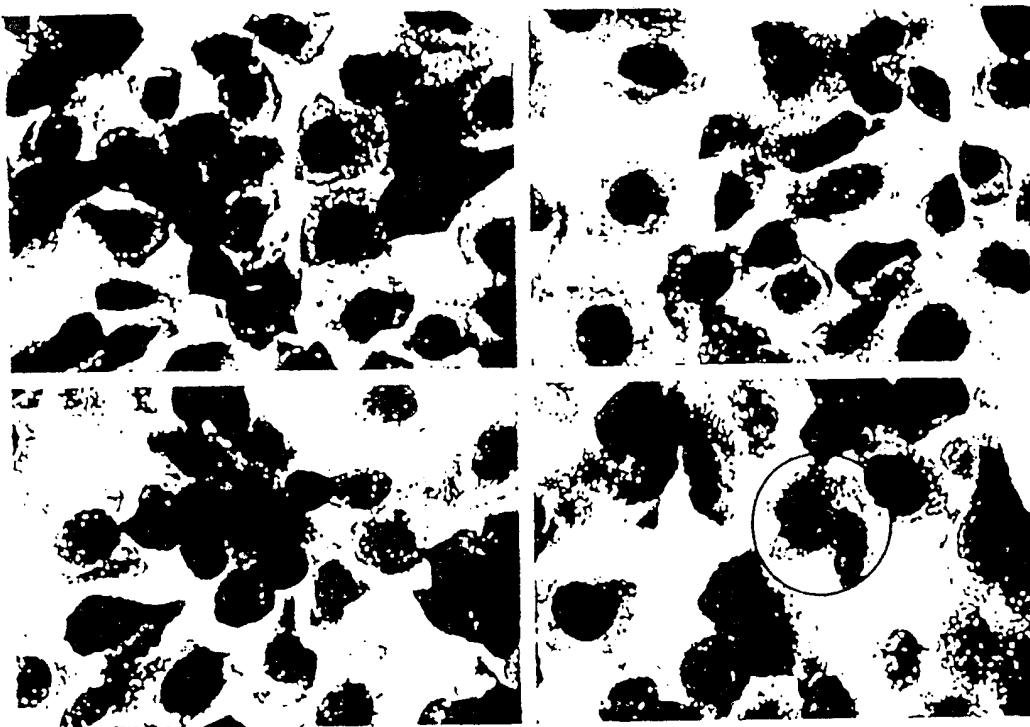


图 10



图

2A



图

2B



图 3A

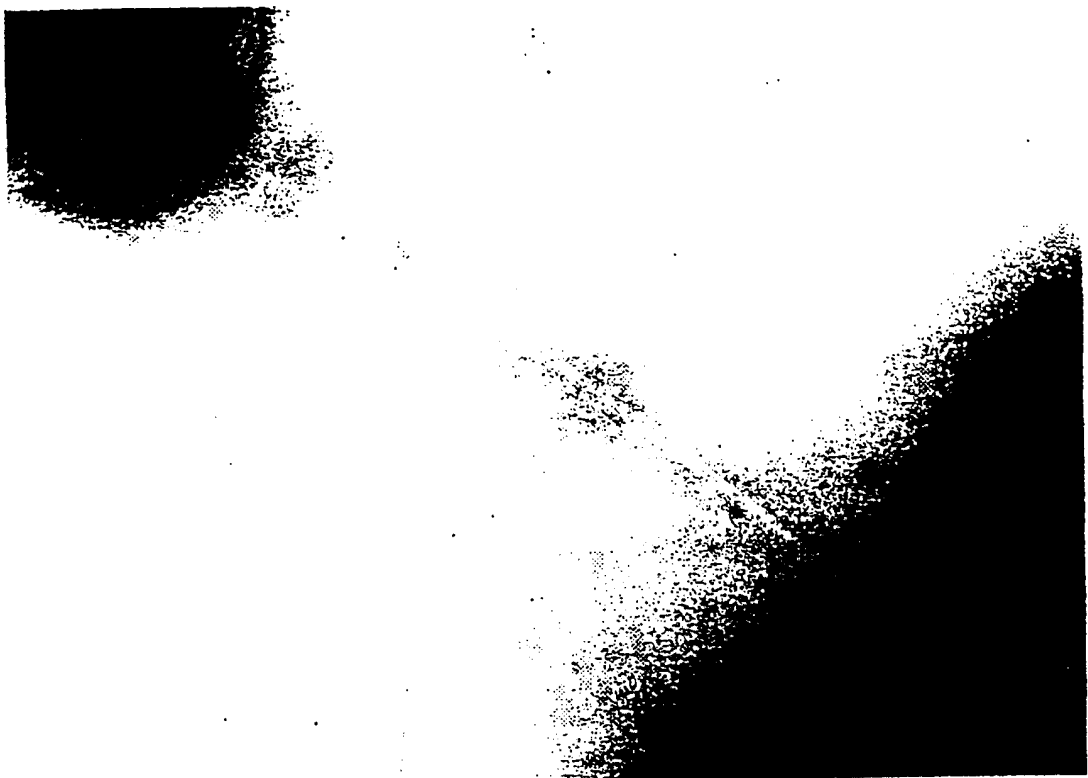


图 3B



图 3C