



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808166.8

[43] 公开日 2005年3月30日

[11] 公开号 CN 1602204A

[22] 申请日 2002.4.11 [21] 申请号 02808166.8

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 17 [33] US [31] 60/284,554

[32] 2001. 10. 3 [33] US [31] 60/326,838

[86] 国际申请 PCT/US2002/011501 2002. 4. 11

[87] 国际公布 WO2002/083711 英 2002. 10. 24

[85] 进入国家阶段日期 2003. 10. 13

[71] 申请人 希龙公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 儿童医院奥克兰研究所

[72] 发明人 D·格拉诺夫 G·莫

R·拉普奥里

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

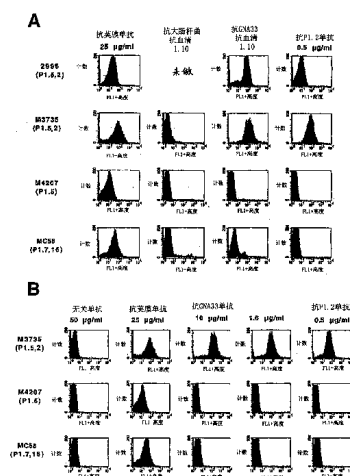
代理人 周承泽

权利要求书3页 说明书44页 附图5页

[54] 发明名称 诱导功能活性抗体的脑膜炎球菌 B 抗原表位的分子模拟物

[57] 摘要

本发明公开了奈瑟、脑膜炎血清 B 型 (MenB) P1.2 血清亚型 PorA 4 号环上的表面暴露的抗原表位的分子模拟物和其抗体。含有这类分子模拟物或其抗体的组合物可用于预防 MenB 疾病和诊断 MenB 感染。



1. 一种含氨基酸序列 QTP 的 GNA33 肽, 其特征在于, 所述肽能诱导产生抗体, 该抗体显示对奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌的补体介导杀菌活性和/或调
5 理活性。
2. 如权利要求 1 所述的 GNA33 肽, 其特征在于, 所述肽含有选自以下的氨基酸序列: FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10),
10 FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAQTPV (SEQ ID NO:13), 以及 SAQAQTPVH (SEQ ID NO:14)。
3. 如权利要求 2 所述的 GNA33 肽, 其特征在于, 所述肽含有氨基酸序列 FOTPV (SEQ ID NO:2)。
4. 一种含有如权利要求 1-3 中任一项所述的 GNA33 肽和药学上可接受的赋
15 形剂的组合物。
5. 如权利要求 4 所述组合物在用于在哺乳动物中诱导抗奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌的免疫应答的方法中的应用。
6. 一种在哺乳动物中诱导针对奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌免疫应答的方法, 其特征在于, 所述方法包括给予所述动物有效量的权利要求 4 所述的组
20 合物。
7. 一种针对权利要求 1-3 中任一项所述的 GNA33 肽的单克隆抗体, 其特征在于, 所述抗体显示对奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌的补体介导杀菌活性和/或调理活性。
8. 一种含有如权利要求 7 所述单克隆抗体和药学上可接受的赋形剂的组
25 合物。
9. 一种含有抗 GNA33 多肽抗体的组合物, 其特征在于, 所述抗体显示对奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌的补体介导杀菌活性和/或调理活性。
10. 如权利要求 9 所述的组合物, 其特征在于, 所述抗体为单克隆抗体。
11. 如权利要求 8-10 中任一项所述组合物在用于在哺乳动物中诱导抗奈
30 瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌的免疫应答的方法中的应用。
12. 一种在哺乳动物中诱导针对奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌免疫应答

的方法，其特征在于，所述方法包括给予所述动物有效量的权利要求 8-10 所述的组合物。

13. 一种编码权利要求 1-3 中任一项所述肽的多核苷酸。

14. 一种重组载体，其特征在于，所述载体包含有：

5 (a) 如权利要求 13 所述的多核苷酸；和

(b) 至少一个异源性控制元体与所述多核苷酸可操作性相连，因而所述多核苷酸能在宿主细胞中转录和翻译；并且对于所述多核苷酸而言，所述控制元件中至少有一个是异源性的。

15. 一种含有权利要求 14 所述重组载体的宿主细胞。

10 16. 一种产生 GNA33 肽的方法，其特征在于，所述方法包括在产生所述蛋白质的条件下培养权利要求 15 所述的宿主细胞。

17. 一种分离奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌抗原表位分子模拟物的方法，其特征在于，所述方法包括：

15 (a) 提供一群分子，该群分子包括假定的奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型细菌抗原表位的分子模拟物；

(b) 在允许抗 GNA33 抗体和可能存在的分子模拟物之间发生免疫结合的条件下，使该组分子与抗-GNA33 抗体接触，以形成复合物；和

(c) 从未结合分子中分离出该复合物。

20 18. 一种将 GNA33 多肽应用于检测生物样品中奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体的方法。

19. 一种将权利要求 1-3 中任一项所述的 GNA33 肽应用于检测生物样品中奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体的方法。

20. 一种检测生物样品中奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体的方法，其特征在于，所述方法包括：

25 (a) 提供生物样品；

(b) 在允许生物样品中存在的奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体与 GNA33 多肽结合的条件下，使所述生物样品与 GNA33 多肽发生反应，以形成抗体/GNA33 多肽复合物；和

30 (c) 通过检测有无该复合物存在从而检测样品中有无奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体的存在。

21. 一种检测生物样品中奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体的方法，其特征在

于，所述方法包括：

(a) 提供生物样品；

(b) 在允许生物样品中存在的奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体与 GNA33 多肽结合的条件下，使所述生物样品与权利要求 1-3 任一项所述的 GNA33 肽发生反
5 应，以形成抗体/GNA33 多肽复合物；和

(c) 通过检测有无该复合物存在从而检测样品中有无奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体的存在。

诱导功能活性抗体的脑膜炎球菌 B 抗原表位的分子模拟物

5 发明的技术领域

本发明总体上涉及细菌病原体，具体讲，本发明涉及奈瑟脑膜炎球菌 B 型血清型 (MenB) P1.2 血清亚型的 PorA 4 号环上表面暴露的抗原表位的分子模拟物及其相对应抗体。

10 发明的背景

奈瑟脑膜炎球菌是细菌性脑膜炎和败血症的致病体。脑膜炎球菌根据其荚膜和细胞壁抗原的免疫学特性分为若干血清型。现已知的血清型包括 A, B, C, W-135, X, Y, Z, 和 29E 型。已纯化获得几种血清型，包括 A, B, C, W-135 和 Y 型的负责血清型特异性的多糖。

15 奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型 (本文简称为 MenB 或 NmB) 在美国和欧洲婴儿和儿童细菌型脑膜炎中占据很高的百分比。该病原菌还可在年轻成人中导致致命性败血症。由外膜蛋白质 (OMP) 泡囊构成的实验性 MenB 疫苗在青少年中具有一定的保护作用。然而在受此病最大威胁的年龄婴儿中，接种该疫苗未见保护作用。此外，OMP 疫苗呈血清型和血清亚型特异性，而且主要的 MenB 菌株具有地区性和时间性变异，从而限制了此疫苗的应用。

20 已经开发了针对血清型 A, C, Y 和 W-135 引起的脑膜炎球菌疾病有效的、基于荚膜多糖的疫苗。然而试图开发 MenB 多糖的类似尝试却遭到失败，原因是荚膜 MenB 多糖 (本文简称为 MenB PS) 的免疫原性差。MenB PS 是一种 N-乙酰 (α 2- \rightarrow 8) 神经氨酸的均聚体。大肠埃希菌 K1 有着相同的荚膜多糖。MenB PS 所诱导的抗体可与宿主聚唾液酸 (PSA) 发生交叉反应。PSA 在胎儿和新生组织中有大量表达，尤其是在脑组织中的神经细胞附着分子 (NCAMs) 上。PSA 还可见于成人组织包括肾脏、心脏和嗅觉神经中，含量稍少一些。而大多数抗-MenB PS 抗体也是自身抗体。因而这类抗体可能会反过来影响胎儿发育，或者导致自身免疫疾病。

25 30 曾制备了一些 MenB PS 衍生物以图克服 MenB PS 的弱免疫原性。例如，有 C₃-C₈ N-酰基取代的 MenB PS 衍生物，见欧洲专利 504,202B, Jennings 等。类

似的还有 Jennings 等在美国专利 4, 727, 136 中描述了一种 N-丙酰基化的 MenB PS 分子, 本文简称作 NPr-MenB PS。经 NPr-MenB PS 葡糖偶联物免疫的小鼠体据称诱发了高滴度的 IgG 抗体。Jennings 等(1986) *J. Immunol.* 137:1708。在家兔中, 采用该衍生物产生了两种不同的抗体, 据称与两个不同的抗原表位相关, 5 其中一个为天然 MenB PS 所共有, 而另一个不共有。发现这些抗体有杀菌活性, 不与 MenB PS 发生交叉反应。Jennings 等(1987) *J. Exp. Med.* 165:1207。与该偶联物诱发的保护性抗体发生反应的细菌表面抗原表位, 尚不明了。另外, 由于此疫苗诱导的一亚组抗体与宿主聚唾液酸有自身反应活性(Granoff 等, (1998) *J Immunol.* 160:5028), 该疫苗在人体中的安全性尚不能肯定。

10 尽管做出了这些尝试, 常规方法没能鉴定到安全的、能对 MenB 感染提供广泛保护力的抗原。

人们对采用分子模拟抗原来诱导针对各种病原体的保护性免疫应答, 或者治疗癌症和自身免疫疾病抱有相当大的兴趣。当名义上的抗原有毒性或难以纯化时, 或者希望将免疫应答引向有限数量的抗原表位时, 用这种方法来开发预防传染性疾病的疫苗有着极高的应用价值。然而在模拟疫苗来诱导针对病原体的保护性抗体方面的研究报道相当少。

针对 MenB PS 衍生物的一些功能活性抗体在美国专利 6, 048, 527 中已有描述。这些抗体不与或很少与宿主组织发生交叉反应, 这提供了导致自身免疫疾病的最小风险。美国专利 6, 030, 619 描述了用这些抗体所鉴定到独特 MenB PS 20 抗原表位的分子模拟物。然而关于其他 MenB 抗原的肽模拟物仍相当令人感兴趣。

MenB MC58 菌株的完整基因组序列已有描述, Tettelin 等, *Science* (2000) 287:1809。诱导血清杀菌抗体反应的多个蛋白质已通过全基因组测序得以鉴定。这些蛋白质具有保守序列, 且似乎是暴露于带荚膜的 MenB 菌株表面。Pizza 25 等, *Science* (2000) 287:1816。这些蛋白之一是 GNA33(基因组衍生的抗原)。GNA33 是一种脂蛋白, 预测的氨基酸顺序显示其与大肠埃希菌和集胞藻 (*Synechocystis* sp.) 中一种膜结合的溶胞壁质葡萄糖基转移酶(MltA)具有同源性。Lommatzsch 等, *J. Bacteriol.* (1997) 179:5465-5470。在奈瑟脑膜炎球菌中 GNA33 呈高度保守。Pizza 等, *Science* (2000) 287:1816。以重组 GNA33 30 免疫的小鼠产生了检测到针对荚膜型 MenB 2996 菌株的高滴度血清杀菌抗体。抗体应答的强度与对照动物组(用 2996 菌株制备的 OMP 泡囊免疫)的相似。然

而，GNA33 诱导保护性抗体的机制以及针对不同 MenB 菌株的保护性应答的广度尚不明了。

不难明白，特别需要生产安全和有效的针对 MenB 的疫苗。

5 发明概述

本发明的基础是意外发现 GNA33 可通过模拟 P1.2 血清亚型菌株 PorA 4 号环上的表面暴露的抗原表位，诱导了对 MenB 的保护性抗体。这些抗体的功能活性已如本文描述的那样，通过体外和体内功能试验给以评估，预测了此分子制剂保护人体抵御脑膜炎球菌疾病的能力。

10 据此，在一实施方式中，本发明涉及 GNA33 诸肽，其包括用于产生显示有抗 MenB 细菌功能活性的抗体的抗原表位。这些肽含有不超过全长 GNA33 的序列。在具体的较佳实施方式中，这些肽包括氨基酸序列 QTP，和任选地 QTP 上游或下游的其他侧接序列，长度优选 1-50 或更多氨基酸，但不超过序列的全长，
15 比如 1-3，1-5 或 1-10 或 1-25，或这些范围的任一整数，可为 QTP 的 C-末端，也可为 N-末端。图 3 显示了 GNA33 序列的一个示范例 (SEQ ID NO:1)。QTP 位于图 3 中的 106-108 号位置。需明白这些序列并不仅限于图 3 中所示的侧接 QTP 的序列，因为各种 MenB 菌株 (比如本文所描述的那些) 具有不同的侧接序列。已获知各种菌株 PorA 区域的序列，其中的几个见表 2 所示。

在某些实施方式中，GNA33 肽包含选自以下的氨基酸序列：FQTPV (SEQ ID
20 NO:2)，FQTPVHS (SEQ ID NO:3)，AFQTPVHS (SEQ ID NO:4)，QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5)，AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6)，AQAFQTPVH (SEQ ID NO:7)，AQAFQTPV (SEQ ID NO:8)，QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9)，AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10)，FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11)，QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12)，DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12)，VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13)，以及 SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14)。

25 在其他一些实施方式中，本发明涉及采用 GNA33 多肽作为载体来插入其他不同血清型外膜蛋白质的抗原表位，以及通用载体。

另一实施方式中，本发明涉及编码这些肽的多核苷酸，以及含该多核苷酸的重组载体、含该载体的宿主细胞以及重组生产这些肽的方法。

30 在另一些实施方式中，本发明涉及针对 GNA33 抗原表位的抗体，其中这些抗体能被 GNA33 抗原表位结合，和/或显示抗 MenB 细菌的功能活性。如后面将进一步阐述的用本文描述的试验所测定的那样，此抗体分子显示了补体介导的

对 MenB 的杀菌活性和/或调理活性。代表性的 GNA33 抗原表位包括：QTP，
FQTPV(SEQ ID NO:2), FQTPVHS(SEQ ID NO:3), AFQTPVHS(SEQ ID NO:4),
QAFQTPVHS(SEQ ID NO:5), AQAFQTPVHS(SEQ ID NO:6), AQAFQTPVH(SEQ ID NO:7),
AQAFQTPV(SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF(SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ(SEQ ID NO:10),
5 FQTPVHSFQA(SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK(SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP(SEQ ID
NO:12), VSAQAFQTPV(SEQ ID NO:13), 以及 SAQAFQTPVH(SEQ ID NO:14)。

本发明的另一实施方式是抗 GNA33 抗原表位的单克隆抗体，以及产生这些
单克隆抗体的杂交瘤。优选该单克隆抗体展现抗 MenB 细菌的功能活性。

本发明的另一些实施方式是关于进一步分离 MenB 抗原表位的分子模拟物
10 的方法，以及用这些方法对分子模拟物进行鉴定。这些方法包括：

(a) 提供一群分子，其中包括一假定的 MenB 某抗原表位的分子模拟物；

(b) 在使本文所述抗体与分子模拟物之间发生免疫结合的条件下，将这群
分子与该抗体接触，如果存在分子模拟物，可形成一复合物；以及

(c) 将该复合物从未结合的分子中分离出来。

15 在另一实施方式中，本发明涉及一种组合物，其含有 GNA33，或含上述表
位的 GNA33 肽，它们与药学上可接受的赋形剂相组合。

在另一实施方式中，本发明涉及一种组合物，其含抗 GNA33 多肽的抗体，
与药学上可接受的赋形剂相组合。

20 在另一实施方式中，本发明涉及在哺乳类个体中诱导对奈瑟脑膜炎球菌血
清 B 型的免疫应答的方法，此方法包括给予该个体上述 GNA33 肽。

在另一实施方式中，本发明涉及治疗或预防哺乳类个体 MenB 疾病的方法，
此方法包括给予该个体有效量的上述组合物。

在另一实施方式中，本发明涉及检测生物样品中奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型
的抗体的方法，此方法包括：

25 (a) 提供生物样品；

(b) 在使生物样品中奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型抗体与 GNA33 多肽结合的条件
下，使上述生物样品与 GNA33 多肽反应，形成抗体/ GNA33 多肽复合物；以及

(c) 检测有无复合物的存在，从而可检测样品中是否存在奈瑟脑膜炎球菌
血清 B 型抗体。

30 代表性 GNA33 多肽包括的 GNA33 多肽含有选自以下的氨基酸序列：QTP，
FQTPV(SEQ ID NO:2), FQTPVHS(SEQ ID NO:3), AFQTPVHS(SEQ ID NO:4),

QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAFQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAFQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13), 以及 SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14)。

- 5 借助本文所公开的内容, 本领域普通技术人员将不难实施本发明的这些和其他实施方案。

附图的简要说明

- 图 1 显示抗-GNA33 抗血清 (1A) 和抗体结合于活的荚膜型 NmB 菌株表面。图 10 1A 显示如间接荧光流式细胞仪所测定, 多克隆抗-GNA33 抗血清和对照抗体 (mAbs) 与活的荚膜型 NmB 2996 菌株、M3735 菌株、M4207 菌株及 MC58 菌株的结合。对照 mAbs 和抗血清包括一抗-血清 B 型的荚膜特异性小鼠 mAb [SEAM 12, Granoff 等, *J. Immunol.* (1998) 160:5028-5036], 一种奈瑟脑膜炎球菌血清亚型 mAb 抗-ProA P1.2, 和用大肠埃希菌外膜泡囊免疫小鼠的多克隆抗血清。
- 15 图 1B 显示抗-GNA33 mAb25 和对照 mAbs 与 NmB M3735 菌株、M4207 菌株及 MC58 菌株的结合。小鼠源对照 mAbs 包括具有非相关特异性的 mAb (VIG10), 以及与上述图 1A 描述相同的抗荚膜和抗-ProA P1.2 mAbs。

- 图 2 显示从不同 MenB 菌株制备的、且经 SDS-PAGE 分辨的膜总组份的 Western 印迹图谱。图 2A 显示其与抗-GNA33 mAb25 的反应性。第 1 行为 rGNA33。第 2 行为从对照大肠埃希菌制备的总蛋白。第 3、4、5 行分别为 MenB 的 NG3/88 (P1.1) 菌株、MC58 (P1.7, 16) 菌株, 和一个 MC58 的突变株 (该突变株中编码 GNA33 的基因已被灭活) MC58 Δ GNA33 制备的总蛋白质。第 6、7、8、9 行分别为 MenB 的 BZ232 菌株、BZ232 Δ GNA33 菌株、NMB 菌株和 NMB Δ GNA33 菌株的总蛋白质。所有四个菌株均为 P1.5, 2 血清亚型。图 2B 显示与图 2A 相同的蛋白样
- 25 品的 Western 印迹图谱, 只是采用了抗-PorA P1.2 mAb 作为第一检测抗体

图 3 (SEQ ID NO:1) 显示一代表性 GNA33 多肽的全长氨基酸序列。带下划线的 1-21 号位置的氨基酸对应于一前导序列。

- 图 4 显示抗-GNA33 mAb25 与一些较小肽的结合, 这些较小肽对应于 (A) GNA33 和 (B) PorA P1.2 (2996 菌株) 的区段。通过采用各蛋白质制备的有 10
- 30 个氨基酸重叠的肽作图研究对显示的各代表性肽进行了鉴定, 并显示其包含有一个可被 mAb25 识别的抗原表位。

图 5 显示如间接荧光流式细胞仪所测定, 小鼠 mAbs 可与活的荚膜型 NmB 菌株结合。试验中使用的 mAbs 在图 1B 的文字说明中有描述。图 5A 显示抗-GNA33 mAb25 与 8047 菌株和 BZ232 菌株之间的依赖于浓度的结合(前者与人补体 $BC_{50} = 15\mu\text{g/ml}$, 后者与人补体 $BC_{50} > 150\mu\text{g/ml}$;)。当用家兔补体测试时, 5 该两菌株均易发生溶菌现象(见正文)。图 5B 显示抗-GNA33 与 M986 菌株(PorAVR₂ 的 P1.2 型)和 M5682 菌株(PorAVR₂ 的 P1.2 型)的结合, 并与 8047 菌株(PorAVR₂ 的 P1.2-2 型)作比较。M986 菌株对抗-GNA33 抗体的溶菌作用有抗性(人或家兔补体), M5682 菌株敏感(家兔补体), 8047 菌株亦敏感(人或家兔)。

10 发明详细描述

实施本发明, 除了特别说明之处, 将采用免疫学、微生物学、分子生物学的常规方法, 这些是该领域的技术文献中有全面解释。可参见例如: Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory manual* (第 2 版, 1989); Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory manual* (2001); Morrison 15 和 Boyd, *Organic Chemistry* (第 3 版, 1973); Carey 和 Sundberg, *Advanced Organic Chemistry* (第 2 版, 1985); Smith, M. B., *Organic Synthesis* (1994); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Handbook of Experimental Immunology*, I-IV 卷(D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编, 1986, Blackwell Scientific Publications)。

20 如本说明书和所附权利要求书中所用, 单数形式实际包含有复数的意义, 除非内容中有明确指出。

I. 定义

描述本发明过程中, 采用了以下术语, 其定义如下。

25 “GNA33 多肽”指从 GNA33 蛋白衍生而来的多肽, 它能够诱导针对 MenB 的免疫应答, 比如产生对 MenB 细菌显示功能活性的抗体。该术语可用来指一种大分子, 也可指一群均一或不均一的衍生自 GNA33 的抗原性大分子。对于本发明的目的, GNA33 多肽可衍生自任何已知的各种 MenB 菌株。2996 菌株的 GNA33 序列见图 3 所示(SEQ ID NO:1)。已知有许多其他 MenB 菌株的 GNA33 序列。例 30 如见以下的 GenBank 登号录: 奈瑟脑膜炎球菌 C81244, B82023, AF226395, AF226392, AF226390, AF226403, AF226413, AF226412, AF226387, AF226409, AF22

641, AF226397, AF226389, AF226393, AF226416, AF226414, AF226402, AF226404, AF235145, AF235144, AF235143; 铜绿假单胞菌 (PA01 菌株); 运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) AF300471; 根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AAK85834; 苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) CAC41396; 新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) AAK25702; 集胞藻 (*Synechocystis sp.*) PCC6803 菌株; 多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*) AAK03012; 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) Q9KPQ4; 大肠杆菌 AAB40463, AAC45723, P46885; 蚜虫巴克纳菌 (*Buchnera aphidicola*) (豌豆蚜); horikoshii 热球菌 (*Pyrococcus horikoshii*) NP143714。

10 如本文所用“GNA33 多肽”也包括从天然 GNA33 序列衍生的分子, 以及重组产生的或化学合成的 GNA33 多肽, 包括带或不带有信号序列(图 3 中 1-21 号氨基酸)的全长 GNA33 参照序列, 以及如以下所述保留了免疫原性的 GNA33 肽。

术语“类似物”指参照分子的衍生物。类似物可保留生物学活性, 如以下描述的那样保持了诱导针对 MenB 的功能活性抗体形成的能力。总体上, 术语
15 “类似物”指具有天然多肽序列的化合物, 它的结构相对于天然分子具有一个或多个氨基酸的增加、取代(通常为保守性), 和/或缺失, 只要这些修饰不损害其活性。优选的类似物至少具有与亲代分子相同的生物学活性, 甚至可能显示超过亲代分子的增强的活性。制备多肽类似物的方法是本领域所知道的, 在以下还将作进一步描述。

20 例如, 该类似物通常与参照分子有 50%的氨基酸相同, 更优选与所述天然肽的相关部分有 75-85%相同, 最优选 90-95%甚至更多相同。该氨基酸序列的氨基酸取代不超过约 10-75 个, 或不超过 5-50 个氨基酸取代, 或者甚至只有 1、2、3 或多至 5 个氨基酸取代, 或者上述范围之间的任何一个数。特别优选的取代一般是保守性取代, 即那些取代发生在一个家族的氨基酸中。从这个角度而言,
25 氨基酸总体上分为四个家族: (1)酸性—天冬氨酸和谷氨酸; (2)碱性—赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸; (3)非极性—丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 甲硫氨酸, 色氨酸; 以及(4)不带电极性—甘氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸有时被归类为芳香族氨基酸。可以合理地预测, 以异亮氨酸或缬氨酸替换亮氨酸, 或反之; 以谷氨酸替换天冬氨酸, 或反之; 以丝氨酸替换苏氨酸, 或反之; 或者以结构相关的氨基酸保守性替换一氨基酸, 对其活性将不会有大的

的影响。以下蛋白质也属于 GNA33 多肽的定义范畴，即这些蛋白质基本上具有与参照分子相同的氨基酸序列，但带有基本上不影响该蛋白质的免疫原性的少数氨基酸取代。本领域技术人员可以很容易地确定感兴趣分子、经过合理的修饰仍保持本文定义的生物学活性的分子区段。

5 “GNA33 肽”是本文所述的 GNA33 多肽，包括不超过所述 GNA33 参照分子的全长，并含有至少一个下述的抗原表位。因而，含有 GNA33 肽的组合物可包括所述 GNA33 分子全长的一部份，但非整个 GNA33 分子。GNA33 肽的非限制性例子包括：QTP, FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAFQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAFQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13), 以及 SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14)。

MenB 的“分子模拟物”是指能在功能上模拟 MenB 细菌上表达的至少一个抗原表位的分子。如以下将进一步阐述的那样，这类分子模拟物可用于疫苗组合物中和诱导用于诊断和治疗的抗体。分子模拟物包括、但不仅限于：小分子有机化合物；核酸及核酸衍生物；糖或寡糖；模拟肽包括肽、蛋白质及它们的衍生物，如含有非肽有机部份的肽、含或不含有氨基酸和/或肽键但保留肽配基结构和功能特征的合成肽；吡咯烷类；一类称作“拟肽”(peptoids)和“拟寡主”(oligopeptoids)的物质，即含 N-取代的甘氨酸的分子，见 Simon 等(1992) 15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367 中的描述；以及抗体，包括抗-独特型抗体。鉴定和制备分子模拟物的方法将在以下作更详细的阐述。

术语“抗体”包括多克隆和单克隆抗体制备物，以及杂交抗体、变异抗体、人源化抗体、F(ab')₂ 片段、F(ab) 分子、Fv 片段、噬菌体上展示的可变区单链片段、单结构域抗体、嵌合抗体及其显示亲代抗体分子免疫结合特性的功能片 25 段。

如本文所用术语“单克隆抗体”指含一群均一抗体的抗体组合物。该术语不受其制备方式的限制，包括整个免疫球蛋白分子以及 Fab 分子、F(ab')₂ 片段、噬菌体上展示的可变区单链片段(scFv)、人源化抗体以及显示亲代单克隆抗体分子免疫结合特性的其他分子。制备多克隆和单克隆抗体的方法是本领域所知的并将在以下作更详细的阐述。 30

“抗原表位”指抗原上的一种位点，B 细胞和 T 细胞对该位点可发生特异

性应答反应。该术语也可与“抗原决定簇”或“抗原决定族位点”互换使用。蛋白质、多糖或其他生物多聚物上的 B 细胞抗原表位可能由生物大分子的不同部份因折叠在一起而组成。这类抗原表位称为构象性或不连续性抗原表位，因为此位点由该多聚物的在线性序列上不连续、但在折叠构象上连续的区段构成。由生物多聚物或其他分子单个区段构成的抗原表位被为连续或线性抗原表位。T 细胞抗原表位一般限于线性肽。一个肽抗原表位可含有 5 个或更多个在空间构象上对该表位是独特的氨基酸。一般来说，一个抗原表位含有至少 5-8 个这样的氨基酸，更多的情况是含有 8-10 个这样的氨基酸，或者更多。确定氨基酸空间构象的方法是本领域所知的例如包括：X-射线晶体学和二维核磁共振谱。

抗原表位可采用本领域熟知的一些表位作图技术来鉴定。例如，可参见 *Methods in Molecular Biology* 第 66 卷 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey, 其中的 *Epitope Mapping Protocols*。例如，线性表位可通过以下方法来确定，即在固体支持物上同时合成大量的肽，它们相应于该蛋白质分子的诸部份，当这些肽仍附着于固体支持物上时使其与抗体反应。这类技术是本领域所知的并在例如美国专利 4,708,871、Geysen 等 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002、Geysen 等 (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715 (均纳入本文的参考文献) 中有所描述。类似地，构象性抗原表位不难通过测定氨基酸的空间构象而得以鉴定，如采用 X-射线晶体学和二维核磁共振。如，可参见 *Epitope Mapping Protocols*, 同上。也可用计算机程序来确定某给定蛋白质分子的抗原性部份，即利用 20 种氨基酸的亲水、疏水性质对该蛋白质的氨基酸序列亲水程度进行衡量，如在以下文献中所描述：Kyte 等, *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132; Hopp 和 Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78:3824-3828。例如 Hopp 和 Woods 的技术中对每个氨基酸设定了一个数字化的亲水值，然后沿着肽链对这些亲水值反复取平均值。局部平均亲水值最高的点代表了该分子的抗原性部位。

当用本文所述的分析方法确定抗体分子表现出的补体介导的针对 MenB 的杀菌活性和/或调理活性时，该抗体即对 MenB 细菌呈现“功能活性”。

当指多肽或多核苷酸时，“纯化的”和“分离的”表示所指分子的存在基本上不含有同类的其他生物大分子。本文所用术语“纯化的”宜指同类生物大分子重量至少占 75%，较佳的重量至少占 85%，更佳重量至少占 95%，最佳重量

至少占 98%。“分离的”编码特定多肽的多核苷酸指该核酸分子中基本上不含有其他不编码所述多肽的核酸。然而，此分子可含有一些对该组合物基本性质无有害影响的其它碱基或部份。

“重组 GNA33 多肽”指用上述技术检测并用本文所述重组 DNA 技术制备的具生物活性的 GNA33 多肽。总体而言，如以下将进一步描述的那样，克隆编码所需 GNA33 多肽的基因，然后在转化的生物体中表达。在表达条件下宿主生物表达该外来基因产生 GNA33 多肽。如果通过重组方式制备，本发明产生的多肽可不含通常存在于细胞中的其他分子。例如，可以很容易地得到不含任何微量 MenB 蛋白质污染物的 GNA33 多肽组合物，因为重组的非 MenB 宿主细胞所产生的唯一 MenB 蛋白就是重组 GNA33 多肽。

本文所用术语“多核苷酸”或“核酸分子”指任何长度的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的聚合体形式。该术语仅指分子的一级结构，因而包括双链和单链 DNA 和 RNA，还包含已知的修饰形式，例如本领域众所周知的标记物：甲基化；“加帽”；用类似物替换一个或多个天然核苷酸；核苷酸内部修饰如不带电荷链接（如磷酸甲酯类、磷酸三酯类、磷酸酰胺化物、氨基甲酸酯类等）以及带电荷链接（如硫代磷酸酯类、二硫代磷酸酯类等）、含有附属部份如蛋白质（包括例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等）、含有嵌入体（如吡啶、补骨脂素等）、含有螯合剂（如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等）、含有烷基化剂、含有经修饰的连接（如 α -端基异构核酸等）；以及多核苷酸的未修饰形式。

本文所用术语“重组 DNA 分子”或“重组多肽”指基因组、cDNA、半合成的或全合成来源的多核苷酸。就其来源或制备来说，(1)它不再与天然状况下与其相关联的多核苷酸的全部或一部份相关联；(2)它与天然状态时所连接的多核苷酸以外的多核苷酸相连接，或者(3)它不是天然产生的。因而，该术语包括合成方法衍生的核酸分子。

“编码序列”是一种核酸分子，它通常当置于适当的调节序列控制下时经 mRNA 被翻译成多肽。编码序列的边界部份可由 5'-末端的翻译起始密码子和 3'-末端的翻译终止密码子确定。编码序列可包括，但并不仅限于：cDNA 和重组核苷酸序列。

“控制序列”指与编码序列相连的影响其表达所必需的核酸序列。这类控制序列的性质取决于宿主生物；在原核生物中，这类控制序列一般包括启动子、

核糖体结合位点、转录终止序列；在真核生物中，一般这类控制序列包括启动子和转录终止序列。“控制序列”这一术语至少包括编码序列表达所必需的所有组分，还可包括其它组分，例如，‘前导序列和融合伙伴(fusion partner)序列。

5 诸如启动子这类控制元件，当 RNA 聚合酶与启动子结合时引导着细胞内编码序列的转录，并将该编码序列转录为 mRNA，再翻译成该编码序列所编码的多肽。

“可操作性相连”指位置上并列，其中所述诸组分相互之间所处的关系使它们可以按预期的方式发挥作用。一控制序列一编码序列“可操作性相连”，是它们以这样一种方式相连接：该编码序列的表达是在与控制序列相容的条件下实现的。控制元件不需要与编码序列相毗连，只要其功能可引导编码序列的表达。例如，在启动子和编码序列之间还可存在可转录但不翻译的序列，这种情况下仍可认为启动子与编码序列“可操作性相连”。

15 本文所用术语“表达盒”的，指一种分子，其含有与控制序列操作性相连的至少一个编码序列，控制序列包括在适当宿主细胞中转录该编码序列克隆拷贝及翻译 mRNA 所需的所有核苷酸序列。这类表达盒可用来在各种宿主如细菌、蓝绿藻、植物细胞、酵母细胞、昆虫细胞和动物细胞中表达真核基因。在本发明中，表达盒可包括，但不仅限于：克隆载体、特别设计的质粒、病毒或病毒颗粒。该表达盒还可包括宿主细胞自主复制的复制起点、可选择性标记物、各种限制性位点、高拷贝数因子及强启动子。

“载体”意指任何遗传性元件，如质粒、噬菌体、转座子、粘粒(cosmid)、染色体、病毒等，当它们与适当的控制元件相关联时能进行复制，并能在细胞之间传递基因序列。因此该术语包括克隆和表达运载体，以及病毒载体。

25 当外源多核苷酸被引入到细胞膜内时，细胞即被该外源多核苷酸所“转化”。外源多核苷酸可被、也可不被整合(经共价连接)入构成细胞基因组的染色体 DNA 中。例如，在原核生物和酵母中，外源 DNA 可被保持在诸如质粒这类游离元件上。至于真核细胞，稳定转化的细胞是其中外源 DNA 已被整合入染色体中，从而可通过染色体复制遗传给子代细胞的细胞。真核细胞具有建立细胞系或含有外源 DNA 的子代细胞群组成的克隆的能力，证明了这种稳定性。

30 “宿主细胞”是已被或者能被外源核酸分子转化的细胞。

“同源性”指两个多核苷酸之间或多肽的两个部份之间的百分比相同性。

当在指定长度的分子中两序列显示有至少约 50%相同时，两个 DNA 或两个多肽序列为彼此基本同源，较佳至少约 80%-85%，更佳至少约 90%，最佳约 95%-98% 的序列相同，或者在特定范围之间的任何百分比相同性。如本文所用，基本同源也指显示与特定的 DNA 或多肽序列完全相同的序列。

5 总体上，“相同性”指两个多核苷酸或多肽序列的核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸分别精确相对应。相同性百分率可通过排列两个序列直接比较两分子之间的序列信息，计数两个排列对比序列之间确切匹配部份的数目，再除以较短序列的长度，然后乘以 100。序列排列对比可以用含有与感兴趣的序列相同数目的氨基酸数的序列来进行。

10 天然或非天然产生的蛋白质变体优选与衍生自图 3 (SEQ ID NO:1) 的特定 GNA33 多肽具有至少 70%、80%、85%、90%、92%或 95%或更多相同性的氨基酸序列。更优选该分子相同性 98%或 99%。序列相同性百分率可通过 Smith-Waterman 同源性搜索算法来确定，采用仿射空格搜索 (affine gap search) 法，一个空格开放罚分 (gap open penalty) 为 12、一个空格延伸罚分 (gap extension penalty) 为 2、BLOSUM 矩阵值 (BLOSUM matrix) 为 62。Smith-Waterman 同源性搜索算法在 Smith 和 Waterman 所著的 *Adv. Appl. Math.* 2:482-489 (1981) 中有讲解。

或者，同源性的测定可通过多核苷酸在同源区之间形成稳定双螺旋体的条件下发生杂交，然后用单链特异性核酸酶消化，并测定消化片段的大小。基本上同源性的 DNA 序列可在严谨条件下 (如该特定系统所规定的那样) 进行 Southern 杂交实验鉴定。确定恰当的杂交条件是本领域的技术。可参见：Sambrook 等，同上；*DNA Cloning*, 同上；*Nucleic Acid Hybridization*, 同上。

25 “有效量”或“有效药量”是指该药物的无毒性但足以提供所需生物学结果的量。该结果可能是如用本文试验方法测定的那么样，产生了具有抗 MenB 功能活性的抗体。此外，该有效量可以是足以导致降低和/或缓解脑膜炎球菌性疾病的体征、症状或病因的量。任何个体病例的恰当的“有效”量，可通过本领域普通技术人员采用常规实验来定。

“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”指非生物学的或不希望的材料，该材料可以给予个体而不产生任何不希望的生物学效应或者不会与它所在的组合物中的任何组份发生有害的相互反应。

30 “生理性 pH”或“处于生理学范围内的 pH”指大约 7.2-8.0 范围的 pH 值 (包括 7.2 和 8.0)，更典型的大约 7.2-7.6 的范围内 (包括 7.2 和 7.6)。

本文所用的术语“哺乳动物”包括但不仅限于：任何哺乳动物纲的成员——人类、非人灵长类如黑猩猩和其他猿猴种系；农场动物如牛、马、绵羊、山羊、猪；家养动物如家兔、狗和猫；实验室动物包括啮齿动物，如大鼠、小鼠和豚鼠等。该术语并不指定年龄或性别。

5 本文使用的术语“免疫结合”和“免疫结合特性”指发生在一免疫球蛋白分子和该免疫球蛋白特异性抗原之间的非共价相互作用。

本文中所述的“生物样品”指从对象中分离得到的组织或液体样品，包括但不仅限于，例如：血、血浆、血清、粪便、尿液、骨髓、胆汁、脊髓液、淋巴液、皮肤样品；皮肤、呼吸道、肠道和生殖泌尿道的外分泌物；泪液、唾液、10 乳汁、血细胞、器官、活检组织；以及体外细胞培养样品，其包括但不仅限于：培养其中细胞和组织(如重组细胞)的生长而产生了条件培养液和细胞组分。

本文中所述的“标记物”和“可检测的标记物”指能被检测出来的分子，包括但不仅限于：放射性同位素、荧光发生剂、化学发光剂、酶、酶底物、酶15 辅助因子、酶抑制剂、生色团、染料、金属离子、金属溶胶、配体(如生物素或半抗原)等。“荧光素”指一种底物或其一部份，它能在可测范围内呈现荧光。在本发明中可能用到的标记物的特别例子包括：荧光黄、罗丹明、丹酰、7-羟基香豆素、得克萨斯红、鲁米诺、NADPH 和 β -半乳糖苷酶。

20 II. 本发明的实施模式

本发明系的基础是发现 GNA33——一种与大肠埃希菌小鼠转葡萄糖基酶同源的脂蛋白，由于模拟了 P1.2 血清亚型菌株中的 PorA 4 号环上的抗原表位能诱导保护性抗体。GNA33 在活菌体中不暴露于表面，而是位于胞质空隙中。用重叠肽方法对杀菌性抗-GNA33 mAb 的抗原表位制图显示，该 mAb 识别来自 GNA3325 和 PorA 的肽，而 GNA33 和 PorA 共同具有结合所必需的 QTP 序列。用流式细胞仪测得，抗-GNA33 mAb 也与对照的抗-PorA(P2.1)mAb(针对大多数 P1.2 血清亚型的 MenB 菌株细长表面)相结合。抗-GNA33 赋予受 P1.2 菌株攻击的幼龄大鼠以被动保护力。因而 GNA33 是一种新型的模拟物。它可诱导对 PorA 的保护性抗体。和 PorA 不同，当 GNA33 给药时它不需要蛋白质复性而可诱导保护性挤30 体。本发明者发现 GNA33 是迄今为止鉴定的最强模拟抗原之一。

关于 GNA33 显示为 PorAP1.2 抗原表位的免疫学模拟性质的发现，支持了

将 GNA33 运用在疫苗中以预防 P1.2 菌株(在美国约占血清 B 型分离株中的 8%)引起的疾病(Tondella 等, *J. Clin. Microbiol.* (2000) 38:3323-3328)。此外,通过在 GNA33 中或 GNA33 亚区中用其他 PorA 环替换,有可能产生其他血清亚型 PorA 的抗原表位的免疫学模拟物,它可用作脑膜炎球菌多价疫苗而体现其价值。这样的疫苗与基于重组 PorA 的疫苗相比有着许多优越性。例如,由于 rGNA33 可以方便地在无感染性的大肠埃希菌中大量表达,不需要洗涤剂抽提,不需重折叠或在脂质泡囊中重建,因而制备这种疫苗可大大简化。还有,如需要,可将新出现的致病性 NmB 菌株的含有抗原表位的 PorA 变体的区段置入 GNA33。

10 因此, GNA33 多肽、肽、抗体和其他 MenB 模拟物可用作诊断试剂和/或用在预防 MenB 疾病的组合物中。制备的抗 GNA33 抗体显示出抗 MenB 细菌的功能活性,此功能活性对赋予抗 MenB 疾病的保护力很重要。该抗体可在同型、抗原特异性和功能活性方面具有全面特征。

本发明中用到的 GNA33 多肽,可采用本领域中已知的技术直接从产生该产物的细菌中分离得到。或者,该多肽也可用肽领域技术人员所知道的几项技术,通过化学方法合成。例如,关于固相肽合成技术,可参见 J.M. Stewart 和 J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984), 以及 G. Barany 和 R.B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross 和 J. Meienhofer 编辑,第 2 卷, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254; 关于经典溶液合成,可参见 M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlin 1984), 以及由 E. Gross 和 J. Meienhofer 编辑的 *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, 第 1 卷。本发明的多肽还可用同步多个肽合成(simultaneous multiple peptide synthesis)方法进行化学制备。例如,可参见 Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1985) 82:5131-5135; 美国专利 4,631,211。

优选以重组方法产生多肽,采用分子生物学的标准技术,表达编码该多肽的多核苷酸。例如,编码上述分子的多核苷酸序列可以通过重组方法来获取,如从表达基因的细菌中筛选 cDNA 和基因库、或从已知包含有该基因的载体中衍生获得此基因。再则,采用标准技术,如苯酚抽提和 cDNA 或基因组 DNA 的 PCR,所需的基因可直接从含有它的细胞中分离得到。如,可参见 Sambrook 等, 30 同上,关于获取和分离 DNA 技术的描述。感兴趣的基因也可通过合成方法产生,

而不用克隆方法。对特定序列可设计带有适合密码子的分子。然后从标准方法制备的重叠寡核苷酸组装成完整的编码序列。例如,可参见 Edge(1981), *Nature* 292:756; Nambair 等(1984), *Science* 223:1299; 以及 Jay 等 *J. Bio. Chem.* 259:6311。

- 5 特定的核苷酸序列于是可从含有所需求序列的载体获得, 或者经全合成, 或者部份采用本领域已知的寡核苷酸合成技术来获得, 例如合适时采用多聚酶链反应(PCR)技术。可参见 Sambrook, 同上。具体讲, 获取编码所需序列的核苷酸序列的一个方法是: 将常规自动化多核苷酸合成仪产生的重叠性合成寡核苷酸的互补链进行退火处理, 然后用合适的 DNA 连接酶连接, 再通过 PCR 扩增已
- 10 连接的核苷酸序列。例如, 可参见 Jayaraman 等(1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088. 另外, 寡核苷酸指导的合成(Jones 等(1986), *Nature* 54:75-82)、原有核苷酸区域的寡核苷酸指导的诱变(Riechmann 等(1988), *Nature* 332:323-327, 以及 Verhoeyen 等(1988), *Science* 239:1534-1536), 利用 T₄ DNA 聚合酶进行的、对空格寡核苷酸的酶促填充等, 可用于本发明, 来提供具有变化的
- 15 的或增强的抗原结合能力的分子。

一旦制备或分离了编码序列, 可将该序列克隆入合适的载体或复制子中。许多种克隆载体已为本领域技术人员所知晓, 选择一个恰当克隆载体仅仅是一个选择问题。适合的载体包括但并不仅限于: 质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体或病毒, 它们在与适当的控制元件相联时具有复制能力。

- 20 然后按所采用的表达系统, 将该编码序列置于适妆的控制元件的控制之下。这样可将该编码序列置于启动子、核糖体结合位点(对于细菌表达而言)、或任选地操纵子的控制之下, 感兴趣的 DNA 序列通过适当的转化株转录为 RNA。此编码序列可含有、也可不含有一段信号肽的编码序列或先导序列, 这类序列可在以后的翻译后加工过程中会被宿主去除。可参见如: 美国专利 4, 431, 739;
- 25 4, 425, 437; 4, 338, 397。如有信号序列, 它可以是天然序列, 或可以是异源性信号序列。

- 除控制序列外, 加入调节序列或许是有利的, 它可调节有关宿主细胞生长的序列的表达。调节序列是本领域技术人员所知道的, 例子包括那些在对化学或物理刺激(包括调节性化合物存在时)的反应中导致开启或关闭基因表达的
- 30 序列。载体中还可存在其他类型的调节元件。例如, 增强子元件在此可用于提高构建物的表达水平。例子包括: SV40 早基因增强子(Dijkema 等(1985), *EMBO*

J. 4:761); 衍生自 Rous 肉瘤病毒长末端重复序列 (LTR) 的增强子/启动子 (Gorman 等 (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777); 和衍生自人 CMV 的元件 (Boshart 等 (1985), *Cell* 41:521), 此类元件包含在 CMV 内含子 A 序列中 (美国专利 5,688,688)。该表达盒还可进一步包括能在合适宿主细胞中自主复制的复制起点、一个或更多个可选择性标记物、一个或更多个限制性位点、高拷贝数潜能以及强启动子。

构建了表达载体后, 该特定编码序列便位于含有适当调节序列的载体中, 对于控制序列而言, 该编码序列的定位和取向应是其转录处于控制序列的“控制”之下 (即在控制序列处与 DNA 分子结合的 RNA 聚合酶能转录该编码序列)。可能需要对编码感兴趣的分子的序列进行修饰以达到这一目的。例如, 在某些情况时, 可能需要对该序列进行修饰以便使其以适当的取向与控制序列相连接, 即维持读码框。在插入到载体中之前, 可将控制序列和其他调节序列连接于该编码序列。或者也可以将该编码序列直接克隆到已包含有控制序列和适当限制性位点的表达载体中。

如以上所解释的那样, 制备参照 GNA33 多肽的突变体或类似物可能也是需要的。突变体或类似物可通过以下方法来制备: 去除 GNN33 多肽编码序列上的一部份、在该序列中插入一段序列、和/或替换掉一个或更多个核苷酸。修饰核苷酸序列的技术, 如定点诱等是该领域技术人员所熟知的。可参见, 如: Sambrook 等, 同上; Kunkel, T. A. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 448; Geisselsoder 等 (1987), *Bio Techniques* 5:786; Zoller 和 Smith (1983), *Methods Enzymol.* 100:468; Dalbadie-McFarland 等 (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6409。

该分子可在各种系统中表达, 包括昆虫、哺乳动物、细菌、病毒、酵母表达系统, 所有均为本领域所熟知。例如, 昆虫细胞表达系统, 如杆状病毒系统, 为本领域技术人员所知, *Agricultural Experiment Station Bulletin No 1555* (1987) 中有所描述。杆在 Summers 和 Smith, *Texas* 状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法已由 Invitrogen, San Diego CA (“MaxBac” kit) 以试剂盒形式商品化提供。类似地, 细菌和哺乳类细胞表达系统是本领域熟知的, 在 Sambrook 等, 同上中有描述。酵母表达系统也为本领域所知, 在 *Yeast Genetic Engineering* (Barr 等编辑, 1989), Butterworths, London 中有描述。

用于以上系统的许多适当的宿主细胞也已知道。例如, 本领域中知道的哺

乳动物细胞系，包括可从美国典型培养物收藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系(imortalized cell line)，比如(但并不限于)：中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Hela 细胞、乳仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人胚肾细胞、人肝细胞癌细胞(如 Hep G2)，Madin-Darby 牛肾(“MDBK”)细胞，以及其他一些细胞。类似地，
5 细菌宿主，如大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌以及链球菌属，在本发明的表达构建系统中也有运用。本发明所用的酵母宿主具体可包括：啤酒酵母、白色念珠菌、*Candida maltosa*、多形汉逊酵母(*Hansenul polymorpha*)、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、季也蒙毕赤酵母(*Pichia guillerimondii*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)，以及 *Yarrowia lipolytica*。杆状病毒表达载体所采用的昆虫细胞特别包括：埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、加州苜蓿夜蛾(*Autographa californica*)、家蚕(*Bombyx mori*)、黄猩猩果蝇(*Drosophila melanogaster*)、秋粘虫(*Spodoptera frugiperda*)、和银纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)。

运用本领域熟知的各种基因传递技术可以将含有感兴趣的核苷酸序列的核酸分子稳定地整合到宿主细胞基因组中，或者维持在适当宿主细胞中的稳定的附加型元件上。可参见，如：美国专利 5,399,346。

根据所选用的表达系统和宿主，在适宜蛋白质表达的条件下，通过培养上述表达载体转化的宿主细胞产生这些分子。然后将表达的蛋白质从宿主细胞中分离出来并纯化。如果表达系统将蛋白质分泌到培养基中，产物即可直接从培养基中纯化得到。如果不分泌，可从细胞裂解液中分离。适宜生长条件及回收产物方法的选择属于本领域常规技术范畴。

GNA33 多肽一旦产生，即可用于制备抗体。于是，该多肽以组合物形式提供给哺乳动物作免疫接种，这些动物包括标准实验室动物如啮齿类和家兔。此组合物可包含适当佐剂以诱导产生多克隆血清。一般将实验动物分组免疫接种该组合物并数次加强免疫接种。可从接种动物获得抗血清。能诱导产生杀菌性抗血清的 GNA33 多肽适合用于单克隆抗体的生产。这些抗体进而可用于寻找更多的将提供抗-MenB 疫苗抗原表位的 MenB 抗原模拟物。

因此在本发明的实施中，所选出的 GNA33 多肽可用于提供单克隆抗体或其功能相当物。本文所用的关于特定单克隆抗体的术语“功能相当物”指这样的分子：(a)能交叉阻断示范的单克隆抗体；(b)能与所述 GNA33 多肽选择性结合；
30 (c)能显示出抵抗 MenB 细菌细胞的功能活性(如，补体介导的杀菌和/或调理活

性)，如下述标准试验所测定的那样。此外，对于本发明产生特定单克隆抗体的杂交瘤而言，术语“子代”意在包括亲代杂交瘤的所有衍生物、组织、及后代，它们能产生与亲代所产生的单克隆抗体，而不论代次或核型是否相同。

单克隆抗体可用本领域熟知的标准技术制备，如 Kohler 和 Milstein 在
5 *Nature*(1975) 256:495 中描述的方法；或者也可对其进行修饰，如 Buck 等在
(1982) *In Vitro* 18:377 中描述的那样。典型的例子是，小鼠或大鼠用偶联于
蛋白质载体的 GNA33 多肽免疫接种并加强，取出脾脏(和任选的数个大淋巴结)
并分解成单个细胞。需要的话可在去除非特异性粘附细胞后，将细胞悬液加入
10 已用抗体包被的板或孔中筛选脾细胞。表达该抗原特异性和膜结合免疫球蛋白
的 B 细胞将与板结合，且不会被其余的悬液冲洗掉。将获得的 B 细胞或所有分
离的脾细胞经诱导与骨髓瘤细胞融合而形成杂交瘤。杂交中用的小鼠骨髓瘤系
包括那些可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的种类。

更具体说，体细胞杂交可通过 Buck 等(同上)的方法来制备，采用氮鸟嘌呤
15 抗性、非分泌性小鼠骨髓瘤细胞系 P3X-Ag8.653(可从 ATCC 获得)。通常通过
有限稀释来克隆杂交瘤细胞系，并检测产生的能特异性结合免疫抗原和与无
关抗原结合的抗体。然后对选出的分泌单克隆抗体的杂交瘤进行体外培养(例
如在组织培养瓶中或中空纤维反应器中)，或者体内培养(例如用小鼠腹水)。

可检测杂交瘤上清液的抗-MenB 反应性抗体，采用的方法是例如免疫 GNA33
多肽固相 ELISA，或者是以 MenB 细菌作为靶抗原的间接免疫荧光试验。杂交瘤
20 所分泌的单克隆抗体的选择性可用特异性竞争结合试验来检测，如抑制性
ELISA 等方法。例如，将以缓冲液或以含有可溶性 GNA33 多肽缓冲液稀释的抗
体分子，在包被 GNA33 多肽的 ELISA 容器中进行反应。洗涤后，被结合的抗体
用标记的抗-Ig (anti-IgM, IgG 和 IgA) 作为第二抗体进行检测。受可溶性 GNA33
多肽所抑制的抗体可认为是特异性的，选出来作进一步研究，包括同型分析和
25 对 MenB 结合能力和功能活性作进一步筛选。

特别是，可以对部份纯化的单克隆抗体分子与 MenB 表面结合的能力作单
独评价，采用标准分析方法，如本文实施例中所描述。可以通过评估补体介导
的杀菌活力和/或调理活性来确定其功能活性。具体说补体介导的抗体杀菌活
力可用标准试验方法(如在以下文献中描述的：Gold 等(1970), *Infect.*
30 *Immun.* 1:479; Westerink 等(1988), *Infect. Immun.* 56:1120; Mandrell 等(1995),
J. Infect. Dis. 172:1279; Granoff 等(1995), *Clin. Diagn. Laboratory Immunol.*

2:574)来评价。在这些试验中,便奈瑟脑膜炎球菌与补体以及被测抗体一同反应,进行不同取样时刻的细长计数。与零时间点的菌落计数值相比较,与抗体和补体一同孵育60分钟后测得的活菌细胞数降低了至少50%,显示补体介导的杀菌活性的那些抗体,认为符合本发明杀菌活性的目的,适合作进一步应用。

5 补体介导的溶菌作用被认为是负责宿主防御脑膜炎球菌性疾病侵害的主要机制。然而也有证据支持调理机制起着重要保护作用(如,可参见 Bjerknes 等(1985) *Infect. Immun.* 63:160)。因此,可评价本文产生的抗体的调理活性作为评估功能活性的第二手段或替代手段。调理试验得到的结果可用以补充杀菌性数据,并有助于选择能提供保护力的抗体。调理活性的评价对本发明小鼠
10 单克隆抗体(IgG1同型)的评价特别有用。小鼠IgG1(与人类IgG1相反)不能有效激活补体。因此小鼠IgG1抗体不能在上述试验中激活补体介导的MenB溶菌。然而IgG1抗-GNA33单克隆抗体的功能活性可在没有补体存在的情况下通过调理作用加以评估。

各种调理试验方法是本领域所知道的,可用于评价本发明的单克隆抗体功
15 能活性。这些标准试验包括以下文献中所描述的:Sjursen等(1987),*Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., Sec. C* 95:283; Halstensen等(1989),*Scand. J. Infect. Dis.* 21:267; Lehmann等(1991),*APMIS* 99:769; Halstensen等(1991),*NIPH Annals* 14:157; Fredlund等(1992) *APMIS* 100:449; Guttormsen等(1992),*Infect. Immun.* 60:2777; Guttormsen等(1993) *J. Infect. Dis.* 167:
20 1314; Bjerknes等(1995) *Infect. Immun.* 63:160; Hayrinen等(1995),*J. Infect. Dis.* 171:1481; de Velasco等(1995),*J. Infect. Dis.* 172:262; 和 Verheul, A. F. M. (1991), "Meningococcal LPS Derived Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccines, Immunochemical and Immunological Aspects", Thesis, Utrecht University, The Netherlands, pp. 112-135。

25 被选出的感兴趣的单克隆抗体可在体外经常规组织培养方法,或用哺乳动物在体内扩增。例如,如降植烷处理的小鼠可接种含对数生长期杂交瘤细胞的PBS,使之产生腹水。腹水液在进一步纯化之前可存放于-70°C。提供嵌合性抗体可能是需要的,尤其是如果抗体被用在预防或治疗用药物中时,比如用来提供对抗MenB的被动保护和MenB诊断制品中。可从小鼠单克隆抗体分子形成含
30 有人和非人氨基酸序列组成的嵌合抗体,以降低它们对人的免疫原性。(Winter等(1991),*Nature* 349:293; Lobuglio等(1989),*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:

4220; Shaw 等(1987), *J. Immunol.* 138:4534; Brown 等(1987), *Cancer Res.* 47:3577; Riechmann 等(1988), *Nature* 332:323; Verhoeyen 等(1988), *Science* 239:1534; Jones 等(1986), *Nature* 321:522; 欧洲公开专利 519,596, 发表于1992年12月23日; 英国公开专利 GB 2,276,169, 发表于1994年9月21日。)

5 可采用已知技术来产生显示与亲代单克隆抗体分子具相同免疫结合特性的抗体分子片段, 如 F(ab')₂、Fv 及 sFv 分子。参见: Inbar 等(1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2659; Hochman 等(1976), *Biochem* 15:2706; Ehrlich 等(1980), *Biochem* 19:4091; Huston 等(1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(16):5879; 美国专利 5,091,513 和 5,132,405, 被授予 Huston 等; 美国专利 4,946,778, 10 被授予 Ladner 等。

另一种可选择方法, 可采用噬菌体展示系统体外扩增单克隆分子群。(Saiki 等(1986), *Nature* 324:163; Scharf 等(1986), *Science* 233:1076; 美国专利 4,683,195 和 4,683,202; Yang 等(1995), *J. Mol. Biol.* 254:392; Barbas, III 等(1995), *Methods: Comp. Meth Enzymol* 8:94; Barbas, III 等(1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978。 15

噬菌体展示库一旦形成, 可用已知技术将其用于改善 Fab 分子的免疫结合亲和力。参见 Figini 等(1994), *J. Mol. Biol.* 239:68。

选自噬菌体展示库的 Fab 分子重链和轻链部分的编码序列可被分离或合成得到, 并克隆入适宜的载体或复制子上进行表达。可采用合适的表达系统, 例如包括: 细菌、酵母、昆虫、两栖和哺乳动物系统。细菌表达系统包括以下文献所描述的: Chang 等(1978), *Nature* 275:615; Goeddel 等(1979), *Nature* 281:544; Goeddel 等(1980), *Nucleic Acids Res.* 8:4057; 欧洲专利申请 EP 36,776; 美国专利 4,551,433; deBoer 等(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 和 Siebenlist 等(1980), *Cell* 20:269。 20

25 酵母表达系统包括以下文献所描述的: Hinnen 等(1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito 等(1983), *J. Bacteriol.* 153:163; Kurtz 等(1986), *Mol. Cell Biol.* 6:142; Kunze 等(1985), *J. Basic Microbiol.* 25:141; Gleeson 等(1986), *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp 等(1986), *Mol. Gen. Genet.* 202:302; Das 等(1984), *J. Bacteriol.* 158:1165; De Louvencourt 等(1983), *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Berg 等(1990), *Bio/Technology* 8:135; Kunze 等(1985), *J. Basic Microbiol.* 25:141; Cregg 等(1985), *Mol. Cell Biol.* 5: 30

3376; 美国专利 4,837,148 和 4,929,555; Beach 等(1981), *Nature* 300:706; Davidow 等(1985), *Curr. Genet.* 10:380; Gaillardin 等(1985), *Curr. Genet.* 10:49; Ballance 等(1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284-289; Tilburn 等(1983), *Gene* 26:205-221; Yelton 等(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474; Kelly 等(1985), *EMBO J.* 4:475-479; 欧洲专利申请 EP244,234, 国际公开专利 WO 91/00357。

异源性基因在昆虫中的表达可按以下文献描述方法实现: 美国专利 4,475,051; 欧洲专利申请 EP127,839 和 155,476; Vlak 等(1988), *J. Gen. Virol.* 69:765-776; Miller 等(1988), *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177; Carbonell 等(1988), *Gene* 73:409; Maeda 等(1985), *Nature* 315:592-594; Lebacqz-Verheyden 等(1988), *Mol. Cell Virol.* 8:3129; Smith 等(1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8404; Miyajima 等(1987), *Gene* 58:273; Martin (1988), *DNA* 7:99。许多杆状病毒株和变异株, 以及宿主的相应的允许昆虫宿主细胞在以下文献中有描述: Luckow 等(1988), *Bio/Technology* 6:47-55; Miller 等(1986), *GENERIC ENGINEERING*, Setlow, J. K. 等编辑, Vol. 8, Plenum Publishing, pp. 277-279 和 Meada 等(1985), *Nature* 315:592-594。

哺乳类中表达可按以下文献报道方法实现: Dijkema 等(1985), *EMBO J.* 4:761; Gorman 等(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777; Boshart 等(1985), *Cell* 41:521; 美国专利 4,399,216。按以下文献描述可促进哺乳类表达的其他特性: Ham 等(1979), *Meth. Enz.* 58:44; Barnes 等(1980), *Anal. Biochem.* 102:255; 美国专利 4,676,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655; 重新签发的美国专利 RE30,985; 国际公开专利 WO 90/103430, WO 87/00195。

任何上述抗体分子本申请中可用来提供治疗或预防性抗-MenB 药物。此外, 可利用上述技术生产“人源化”的抗体分子, 它含有衍生自小鼠单克隆抗体的抗原结合位点。

本发明上述的抗-MenB 抗体可方便地用作受体来筛选各种各样的分子库, 以鉴定 MenB 抗原表位的分子模拟物, 采用的方法如美国专利 6,030,619 和 6,048,527 所描述(纳入本文参考文献中)。鉴定该分子库中存在的分子模拟物通常涉及采用以下一个或多个程序: (1)用固定化的靶受体作亲和纯化; (2)使可溶性受体与固定的配体结合; 以及(3)在抗原竞争性试验中直接测试可溶性化合物或生物活性。被筛选出来作为分子模拟物的分子包括、但并不限于: 小

分子有机化合物、有机化合物的组合文库、核酸、核酸衍生物、糖或寡糖、拟肽、可溶性肽、被束缚在固相上的肽、展示在细菌噬菌体表面蛋白上的肽、细菌表面蛋白或抗体，和/或含有非肽有机部份的肽。

例如，多样性分子种类的文库可用组合性有机合成来制备。如，可参见
5 Gordon 等(1994), *J. Med. Chem.* 37:1335。实例包括(但不限于): 吡咯烷类、寡氨基甲酸酯类[Cho 等(1993), *Science* 261:1303]、拟肽如像 N-取代的甘氨酸多聚物[Simon 等(1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367], 以及联乙烯多肽(vinylogous polypeptides) [Hagihara 等(1992), *J. Am. Chem. Soc.* 114:6568]。

在合成过程中随着构建单元的加入，可用该领域已知的各种方法来跟踪这
10 些构建单元，从而可确定各文库成员的历史。这些方法包括：在光蚀刻芯片(寡氨基甲酸酯)上的可寻址定位；去卷积策略(deconvolution strategy)，此策略中通过递推加入单体到部份合成的文库(拟肽、吡咯烷、肽)而鉴定“命中”；以及分别合成的核苷酸[Nielsen 等(1993), *J. Am. Chem. Soc.* 115:9812]、或其他有机分子[Ohlmeyer 等(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922] (“标签”)
15 对组合库进行编码。与各文库成员相联的编码的标签在模拟物被选出之后可进行解码。例如，核酸标签可通过 DNA 测序来解码。

拟肽组合文库对鉴定 MenB 抗原表位分子模拟物特别有用。拟肽是 N-取代的甘氨酸的寡聚体[Simon 等(1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367], 它可用来以化学手段产生各种新生分子的文库。单体可加入 t-丁基侧链和 9-芴基-
20 甲氧基-羰基 α -胺(9-fluorenyl-methoxy-carbonyl α -amine)保护基团。将单体装配成拟肽寡聚体可采用例如“亚单体法” [Zuckermann 等(1992), *J. Am. Chem. Soc.* 114:10646]方法在固相进行。在该方法中，合成系借助于 Rink 酰胺聚苯乙烯树脂[Rink 等(1987), *Tetrahedron Lett.* 28:3787]进行。与树脂结合的胺通过以二异丙基碳二亚胺原位活化溴乙酸而被溴乙酰化。
25 随后，与树脂结合的溴乙酰胺被加入的胺转换。此胺可加入含其它反应性基团的 t-丁基保护基团。重复地两步循环直到加入了所需数量的单体。然后用 95% 三氟乙酸/5%水处理使寡肽从树脂上释放出来。合成最好用机器人合成仪来实施。可参见 Zuckermann 等(1992), *Pept. Protein Res.* 40:498; Zuckermann 等(1996), *Methods in Enzymology* 267:437。另一种方法是，拟肽单体的寡聚化
30 可通过苯丙三唑-1-yloxytris (吡咯烷)六氟磷酸磷或溴三-(吡咯烷)六氟磷酸磷的原位活化来进行。其中的其他步骤与采用 9-芴基-甲氧基-羰基氨基酸的常

规肽合成相同。参见 Simon 等(1992), 同上。

拟肽文库一旦生成, 可通过以下方法来筛选: 将本发明的单克隆抗体和组合性拟肽的各种混合物加入到包被有 MenB 多肽或 MenB 细菌的微孔板的孔中。孵育一段时间后洗去未结合的抗体, 而结合抗体用标准 ELISA 试验测定。如, 5 可参见 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 553。不含有结合抗体的孔表明存在有结合于抗体的拟肽模拟物。混合物中拟肽模拟物的具体身份通过将诸单体单元重复加到部份合成的文库的成员上而确定。参见 Zuckermann (1994), *J. Med. Chem.* 37:2678。鉴定小分子混合物中的活性化合物的其他方法 10 包括反相 HPLC 或亲和选择/质谱 [Nedved M. L. 等(1996), *Anal. Chem.* 68:4228] 分级组分该混合物。

假定分子模拟物一旦得到鉴定, 可如上所述测定它们诱导功能活性(如杀菌或调理活性)抗体的能力。具有这些性质的分子模拟物适合于进一步应用于例如疫苗组合物中。

15 GNA33 抗体及以用本发明功能活性抗-MenB 抗体鉴定得到的分子模拟物可用于产生诊断试验用抗体制剂。例如, 本文所述的 GNA33 抗体以及其它能与该分子模拟物反应的抗体可用于检测生物样品中的细菌抗原, 采用免疫诊断技术如竞争、直接反应或夹心类型试验。这类试验法包括: Western 印迹法、凝集试验、酶标记的和介导的免疫试验如 ELISA 法、生物素/亲和素类试验、放射免疫试验、免疫电泳、 20 免疫沉淀等。这些反应通常包括显示标记物如荧光、化学发光、放射活性、酶标记或染料分子, 或者其他可检测到模拟物和抗体之间或抗体反应所形成复合体的方法。

上述试验通常涉及到液相中未结合的抗体与结合有抗体-抗原复合物的固相支持物的分离。可用于实施本发明的的固体支持物包括的基质有硝酸纤维素(以膜 25 或微滴孔形式)、聚氯乙烯(以条或微滴孔形式)、聚苯乙烯乳胶(以珠子或微孔板形式)、聚偏二氟乙烯、重氮化纸、尼龙膜、活化珠(activated beads)、磁性反应珠(magnetically responsive beads)等。

通过, 固体支持物先与固相组分(如一种或多种 MenB 抗原或分子模拟物)在适当的结合条件下反应, 从而使该组分充分固定到支持物上。有时, 可以先与结合性能较好的蛋白质偶联, 以增强对支持物的固定。适宜的偶联蛋白包括(但并不限于): 30 血清白蛋白(包括牛血清白蛋白, BSA)类大分子、匙孔蛾血蓝蛋白、免疫球蛋白分

子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白,以及本领域技术人员熟知的其他蛋白质。可使抗原或模拟物结合于支持物的其他分子包括:多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物等。这类分子及将这些分子偶联于抗体的方法是该领域普通技术人员熟知的。如,可参见 Brinkley, M. A. *Bioconjugate Chem.* (1992) 3:2-13; Hashid 5 等, *J. Appl. Biochem.* (1984) 6:56-63; Anjaneyulu 和 Staros, *International J. of Peptide and Protein Res.* (1987) 30:117-124。

使固体支持物与固相组分反应后,通过洗涤把任何未被固定的固相组分从支持物上除去,接着在适合结合的条件下使结合在支持物上的组份与怀疑含有配体部份(如 MenB 抗体)的生物样品相接触。洗去未结合的配体后,在适宜结合条件下加入 10 第二结合剂分子,该第二结合剂能够与结合的配体选择性相联。第二结合剂的存在可用该领域熟知的技术来检测。

更具体说可采用 ELISA 方法,其中微滴板的孔用本发明的 MenB 抗原表位或模拟物包被。然后将含有或疑含有抗-MenB 免疫球蛋白分子的生物样品加到包被孔中。经过足以使抗体与固定化分子相结合的时间孵育,可洗板除去未结合部份,并 15 加入带可测出标记的第二结合分子。使该第二结合分子与被捕获的样品抗体反应,洗板并用该领域熟知的方法检测此第二结合分子的存在。

于是,在一个具体实施方案中,生物样品中结合的 MenB 配体的存在可以通过采用含有针对该抗体配体的抗体的第二结合剂不难检测到。本领域已知的许多抗-牛免疫球蛋白(Ig)分子,可以很容易地偶连于可检测的酶标记物上,如辣根过氧化酶、 20 碱性磷酸酶或脲酶,采用该领域技术人员已知的方法。然后用合适的酶底物以产生可检测信号。在其它相关实施方式中,采用该领域技术人员所知方法,可实施竞争型(competitive-type)ELISA 技术。

分析也可在溶液中进行,这样 MenB 或模拟物和这些分子的特异性抗体在沉淀条件下形成复合体。在一具体实施方式中,采用该领域已知的偶联技术, 25 如直接化学法或间接偶联,可将这些分子结合于固相颗粒(如琼脂糖珠等)。然后使包被的颗粒在适当的结合条件下与怀疑含有 MenB 抗体的生物样品接触。被结合抗体之间的交联作用导致形成颗粒-抗原表位或模拟物-抗体复合物凝聚体,它们可通过洗涤和/或离心被沉淀并从样品中分离。采用许多标准方法中的任何一种,如以上所述的免疫诊断方法,可对反应混合物进行分析以确定 30 有无复合物的存在。

在另一实施方式里,提供了一种免疫亲和基质,其中将怀疑含有 MenB 抗

体的生物样品中的多克隆群抗体固定在一基质上。可用固定化抗原对样品进行初步的亲纯化。得到样品制备物将只含有抗-MenB 分子，从而避免了亲和支持物上潜在的非特异性结合。许多高率且能很好保留抗原结合活性的固定免疫球蛋白(完整形式或特定片段形式)的方法是该领域知晓的。固定化的蛋白 A 或蛋白 G 都可用来固定免疫球蛋白，而不受任何具体方式的限制。

因此，一旦免疫球蛋白分子被固定以提供一免疫亲和基质，使带有标记的分子与结合抗体在适当结合条件下接触。从免疫亲和支持物上洗去非特异性结合的 MenB 抗原表位或模拟物后，可通过用该领域已知方法分析标记物以确定结合抗原的存在。

上述试验用的试剂，包括本发明的 GNA33 多肽和/或模拟物或其抗体，可以试剂盒形式提供，并配有适当的说明和其他必须试剂，以便实施上述的免疫试验。根据所用的具体免疫试验，此试剂盒还可含有适当的标记物及其他包装的试剂和材料(如洗涤用缓冲液等)。如上所述，标准免疫试验可用这些试剂盒来完成。

另外，GNA33 多肽、分子模拟物和抗体本发明可用于预防哺乳动物的 MenB 疾病。尤其是含有这些分子的疫苗组合物在已接种对象中可用于预防 MenB 疾病。该疫苗可与其他抗原或免疫调节剂一同联合给药，例如，免疫球蛋白、细胞因子和趋化因子，包括(但不限于)IL-2、修饰的 IL-2(cys125 变成 ser125)、GM-CSF、IL-12、 γ -干扰素、IP-10、MIP1b 及 RANTES。

该疫苗通常含有一种或多种“药学上可接受的赋形剂或运载体”，如水、盐水、甘油、乙醇等。另外，辅助性物质如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲物质等可以存在在于这类运载体中。

还可采用佐剂来增强此疫苗的效果。可将佐剂直接加到此疫苗组合物中，也可与疫苗分开同时给药，或者接种疫苗稍后再给予。这类佐剂包括，但并不限于：(1) 铝盐，如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等；(2) 水包油型乳化制剂(含有或不含有其他特异性免疫刺激剂如胞壁酰肽(见以下)或细菌细胞壁成份)，例如(a)MF59(国际公开专利 WO 90/14837; *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, 第 10 章, Powell 和 Newman 编辑, Plenum Press, 1995)，含有 5% 角鲨烷、0.5% 吐温 80™ (TWEEN 80™) 和 0.5% 司盘 85™ (SPAN 85™) (任选的含有不同量的 MTP-PE(见以下)，尽管这不是必需的)，它通过微流化器(如 110Y 型微流化器，Microfluidics, Newton, MA)配制成亚微米颗粒形；(b) SAF,

含有 10%角鲨烷、0.4%吐温 80™ 和 5% Pluronic 嵌段(blocked)聚合物 L121, 和 thr-MDP, 它或者被微流化成亚微米颗粒乳剂, 或者通过旋转振荡形成较大颗粒的乳剂; (c)RIBI™ 佐剂系统(RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), 含有 2%角鲨烷、0.2%吐温 80™ 以及由单磷酸脂质 A(monophosphory lipid A) (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(dimycolate) (TDM) 和细胞壁骨架(CWS)物质组成的一种或多种细菌细胞壁成份[最好是 MPL+CWS, (DETOX™)]; (3)皂苷类佐剂, 如可用于形成颗粒, 如 ISCOMs(免疫刺激复合物)的 QS21 或 STIMULON™(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)之类, 或者由此 ISCOMs 可不用其它洗涤剂。参见国际公开专利 WO 00/07621; (4)弗氏完全佐剂(CFA)及弗氏不完全佐剂(IFA); (5)细胞因子, 如白细胞介素[IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12(国际公开专利 WO 99、44636)等]、干扰素(如 γ -干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等等; (6)细菌 ADP-核糖基化毒素(ribosylating toxin)的脱毒突变株, 如霍乱毒素(CT); 百日咳毒素(PT)、或大肠杆菌不耐热毒素(LT), 具体是 LT-K63(野生型氨基酸第 63 位的赖氨酸被取代)、LT-R72(野生型氨基酸第 72 位的精氨酸被取代); CT-S109 (野生型氨基酸第 109 位的丝氨酸被取代)、PT-K9/G129(野生型氨基酸第 9 位的赖氨酸和第 129 位的甘氨酸被取代)(可参见国际公开专利 WO 93/13202, WO 92/19265); (7)MPL 或 3-O-去乙酰化 MPL(3dMPL)(可参见 GB 2220221), EP-A-0689454, 当与肺炎球菌糖类共用时可任选地基本上不加铝盐(如可参见国际公开专利 WO 00/56358); (8) 3dMPL 与例如 QS21 和/或水包油型乳剂的组合体(参见 EP-A-0835318、EP-A-0735898、EP-A-0761231); (9)含 CpG 基序的寡核苷酸[可参见 Roman 等(1997), *Nat. Med.* 3:849-854; Weiner 等(1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10833-10837; Davis 等(1998), *J. Immunol.* 160:870-876; Chu 等(1997), *J. Exp. Med.* 186:1623-1631; Lipford 等(1997), *Eur. J. Immunol.* 27:2340-2344; Moldoveanu 等(1988), *Vaccine* 16: 1216-1224; Krieg 等(1995), *Nature* 374:546-549; Klinman 等(1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879-2883; Ballas 等(1996), *J. Immunol.* 157:1840-1845; Cowdery 等(1996), *J. Immunol.* 156:4570-4575; Halpern 等(1996), *Cell Immunol.* 167:72-78; Yamamoto 等(1988), *Jpn. J. Cancer Res.* 79:866-873; Stacey 等(1996), *J. Immunol.* 157:2116-2122; Messina 等(1991), *J. Immunol.* 147:1759-1764; Yi 等(1996), *J. Immunol.* 157:4918-4925; Yi 等(1996), *J. Immunol.* 157:5394-5402; Yi 等(1998), *J.*

Immunol. 160:4755-4761; Yi 等(1998), *J. Immunol.* 160:5898-5906; 国际公开专利 WO 96/02555、WO 98/16247、WO 98/18810、WO 98/40100、WO 98/55495、WO 98/37919、WO 98/52581], 如那些含有至少一个 CG 二核苷酸的寡核苷酸, 其中的胞嘧啶可任选的被 5-甲基胞嘧啶所取代; (10) 聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯 (可参见国际公开专利 WO 99/52549); (11) 与 octoxynol 组合的聚氧乙烯山梨糖醇酐酯表面活性剂(参见国际公开专利 WO 01/21207), 或者与至少一种其它非离子型表面活性剂如 octoxynol 组合的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯表面活性剂(参见国际公开专利 WO 01/21152); (12) 皂苷和免疫刺激寡核苷酸, 如 CpG 寡核苷酸(参见国际公开专利 WO 00/62800); (13) 免疫刺激剂和金属盐颗粒(参见国际公开专利 WO 00/23105); 和(14) 其他可起到免疫刺激剂作用能增强该组合物效果的物质。

胞壁酰肽包括(但并不限于): N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP), N-乙酰-降胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP), N-乙酰-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺[MTP-PE]等。

为了增强此组合物的效果, 可能须要将此活性制剂与载体分子相连接。这些载体分子本身不诱导产生有害的抗体。合适载体通常是大的分解代谢缓慢的大分子物质, 如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集体(如油滴或脂质体)、无活性的病毒颗粒、CRM₁₉₇(一种白喉毒素的无毒性突变体)等。这类载体是该领域普通技术人员所熟知的。

典型的疫苗组合物以溶液形式或悬液形式制备成可注射型, 也可以制备成适合在注射前溶于或悬浮于液态载体的固体形式。该制剂也可乳化或包裹在脂质体中, 或者吸附于颗粒上, 以加强佐剂效应, 如上面所讨论的那样。

此疫苗含有有效量的活性制剂, 如 GNA33 多肽或其抗体, 和上述任何其他所需成份。“有效量”指可以在摄入的个体中诱导免疫学应答的量。这样的应答一般将导致个体产生分泌性的、细胞和/或抗体介导的针对该疫苗的免疫应答。通常, 这样的应答包括(但不限于)以下效应中的一种或多种: 产生诸种免疫球蛋白类型之一的抗体, 如免疫球蛋白 A、D、E、G 或 M; T 或 B 细胞的增殖; 向免疫细胞提供活化、生长和分化信号; 扩增辅助性 T 细胞、抑制性 T 细胞和/或细胞毒性 T 细胞和/或 gd T 细胞群体。

此疫苗一旦配制完成即可很方便地经胃肠道外途径给药, 如皮下或肌肉注射。

适合其他给药方式的其它药剂配方包括口服或经肺制剂、栓剂和透皮制剂。治疗剂量可以是单剂量方案或多剂量方案。

III. 实施例

5 以下是实施本发明的具体实施例的举例。提供这些实施例旨在说明本发明的目的，而不意味着以任何方式限制本发明的范围。

已作出努力来确保所用数字(如量、温度等)的精确性，但一些实验性误差或偏差应是被允许的。

10 材料与方法

细菌菌株：

本研究中包括的奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型菌株分离自不同国家脑膜炎球菌性疾病患者，并收集了 36 年时间以上。21 个菌株属血清 B 型菌株，一个属血清型 C 菌株。菌株情况小结于表 1 中。根据电泳分型 (electrophoretic
15 typing, ET) 收集的这些菌株代表了致病 MenB 菌株宽泛的遗传多样性。

通过用质粒 pBSUD33ERM 转化亲代菌株制备了菌株 MC58、BZ232、NMB(分别为 MC58ΔGNA33、BZ232ΔGNA33、NMBΔGNA33) 的突变株，它们的 *gna33* 基因被去除并被抗生素盒 (antibiotic cassette) 等位交换而置换。这个质粒包含了等位交换的上游和下游侧接基因区域和 *ermC* 基因 (红霉素抗性)。简单地讲，从
20 MC58 中扩增了上游侧接区 (包括起始密码子) 从 -867 到 +75 位，和下游侧接区 (包括终止密码子) 从 +1268 到 +1744 位，采用了以下引物：

U33FOR 5'-GCTCTAGAGATGAGTCGAACACAATGAACAATGTCCTGA-3' (SEQ ID NO:26)；

U33REV 5'-TCCCCCGGGCTCTTGCTTTGGCAGGCGGCGA-3' (SEQ ID NO:27)；

25 D33FOR 5'-TCCCCCGGGCACGGGATATGTGTGGC-3' (SEQ ID NO:28)；

D33REV 5'-CCCCTCGAGAGTAGGGACAACCGG-3' (SEQ ID NO:29)。

将扩增得到的片段克隆入 pBluescript 质粒 (Stratgene, Milan, Italy) 中，并用标准技术转化入大肠杆菌 DH5 中 [Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001)]。亚克隆一经完成，转化天然感受态奈瑟氏球菌
30

菌株 MC58、BZ232 和 NMB：选出几个菌落在巧克力琼脂平板上培养过夜 (Remel, Laztakas, KA) 并将它们与含有 1 μ g 质粒 DNA 的 20 μ l pH6.5 10mM Tris-HCl 相混合。将该混合物点种到巧克力琼脂平板上，在 5%CO₂、37°C 条件下培养 6 小时，然后以 PBS 稀释并涂布到含 7 μ g/ml 红霉素的巧克力琼脂平板上。PCR 证实三个红霉素抗性的菌株各自的基因组中都缺失了 *GNA33* 基因。PCR 所用的引物如下：

F33 5'-GCTCTAGAGGGCGACGACAGGCGG-3' (SEQ ID NO:30) 以及

F33 5'-CCCGCTCGAGTTACGGGCGGTATTCGG-3' (SEQ ID NO:31)

10

这些引物分别对应于 *gna33* 基因的 5' 正义链和 3' 反义链。*GNA33* 表达的缺失通过下述 Western 印迹分析加以确证。

单克隆抗体 (mAb) 试剂：

15 用于流式细胞仪、杀菌性和体内保护实验的抗体包括以下这些：从 Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Mileu, Bilthoven, The Netherland 或者 Wendell Zollinger, Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC 获得的脑膜炎球菌 PorA P1. 2-特异性亚型 mAb (MN16C13F4, IgG2a 亚类)；特异性针对荚膜类血清 B 型、SEAM 12 和 SEAM 3 [Granoff 等, *J. Immunol.* (1998) 160:5028-5036, IgG2a 亚类] 的抗-多糖 mAbs, 以及血清型 C mAb181.1 (Garcia-Ojeda 等, *Infect. Immun.* (2000) 68:239-246, IgG3 亚类)。MAB181.1 由 Kathryn Stein, 美国食品药品监督管理局 FDA 提供。阴性对照由以下组成：无相关特异性的小鼠 IgG mAb (VIG10)，或者针对用于表达 rGNA33 的大肠杆菌菌株蛋白质制备的小鼠多克隆抗血清。

25

GNA33 的表达和纯化

30 采用合成的寡核苷酸作为引物，通过 PCR 扩增菌株 2996 染色体 DNA 上的 *gna33* ORF [P. van der Ley 和 J. T. Poolman, *Infect. Immun.* (1992) 60:3156]。将扩增得到的 DNA 片段克隆入 pET-21b+ 载体中 (Novagen, Madison, WI) 表达成为 His 加尾的蛋白质 (HT-GNA33)，或没有信号和脂质修饰的可溶性蛋白质 (rGNA33)。重组蛋白的表达通过所述方法以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来评价。

在 Ni^{2+} 偶连的螯合型快流速琼脂糖凝胶 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 上进行亲和层析纯化得到 His 加尾蛋白质, 而无尾形用 mono S 型离子交换树脂 (Amersham-Pharmacia) 作 FPLC 予以纯化。

5 多克隆抗-GNA33 抗血清的制备

为了制备针对 GNA33 的抗血清, 用 $20\mu\text{g}$ 的纯化 HT-GNA33 或无尾 rGNA33 对 6 周龄 CD1 雌性小鼠进行免疫接种 (每组 4-10 只)。小鼠获自 Charles River (Italia S. P. A., Calco, Italy, 或 Hollister, California)。该重组蛋白质采用腹腔内注射方式给药, 第一剂同时给予弗氏完全佐剂 (CFA), 第二剂 (第 10 21 天) 和第三剂 (第 35 天) 加强同时给予弗氏不完全佐剂 (IFA)。在第 34 和第 49 天采取血样品。

单克隆抗体的制备

四至六周龄的雌性 CD1 小鼠除了第三剂不用佐剂外如上所述进行免疫接
15 种。三天后处死小鼠, 取其脾脏细胞与骨髓瘤细胞 P3X63-Ag8.653 融合, 比例为 5 个脾细胞对 1 个骨髓瘤细胞。在 HAT 选择培养基中培养两周后, 通过 ELISA 方法筛选杂交瘤上清液中的抗体结合活性, ELISA 采用了经 0.025% 低聚甲醛处理灭活的无荚膜奈瑟脑膜炎球菌 M7 菌株 [Stephens 等, *Infect. Immun.* (1991) 59:4097-4102] 包被的微孔板。将分泌 GNA33 特异性抗体的
20 的杂交瘤以有限稀释法克隆两次, 而后扩增并冷冻以备以后用于组织培养或在 BALB/c 小鼠中生产腹水。

单克隆抗体的亚类用小鼠单克隆抗体同型分类试剂盒 (Amersham-Pharmacia) 加以确定。在所选出的 mAbs 中, 采用了一种命名为 mAb25 的 IgG2a 抗-GNA33 mAb 来进行下述结合与功能研究。此单克隆抗体从小鼠腹水中经
25 Hi-Trap 亲和柱 (Amersham-Pharmacia) 纯化获得, 经 PBS 缓冲液完全透析后, 纯化 mAb 的浓度用改良的 Lowry 法以 BSA 作为标准品 (DC, Bio-Rad, Rome, Italy) 予以测定。mAb25 的结合特异性经 Western 印迹法确定, 采用了从菌株 MC58、BZ232 和 NMB 以及它们各自的 GNA33 敲降菌株 (MC58 Δ GNA33, BZ232 Δ GNA33 和 NMB Δ GNA33; 参见以下) 制备的膜蛋白质。

30

抗血清与荚膜型脑膜炎球菌活菌表面的结合

多克隆抗-GNA33 抗血清和 mAb25 与 NmB 活菌株表面的结合能力通过间接荧光试验的流式细胞仪测定得以确定，如以前所述进行 [Moe 等, *Infect. Immun.* (1999)67:5664-5675]。图 1A 显示多克隆抗-rGNA33 抗血清与四个代表性 NmB 菌株[亲代株 2996(P1.5, 2)和其他三个菌株 M3735(P1.5, 2)、M4207(P1.5)及 MC58(P1.7, 16)]的结合。抗-GNA33 多克隆抗血清仅与菌株 2996 和 M3735 有反应。抗荚膜阳性对照 mAb 可与所有四个菌株结合；而用大肠杆菌蛋白免疫接种的动物制备的阴性对照抗血清仅显示背景结合。图 1B 显示测定抗-GNA33 mAb25 与三个菌株[M3735(P1.5, 2)、M4207(P1.5)及 MC58(P1.7, 16)]细菌细胞表面结合的类似实验的结果。该 mAb 只与菌株 M3735(P1.5, 2)结合。

表 I 小结了流式细胞仪实验结果，测定了抗-GNA33 抗血清或 mAb25 与 22 个遗传多样性的荚膜型脑膜炎球菌菌株(21 个血清 B 型、1 个血清型 C)活菌表面结合的能力。抗-GNA33 抗体只与具 P1.5, 2 或 P1.2 血清亚型菌株结合(9 个菌株中全部，而其他 PorA 血清亚型 13 个菌株中的 0 个； $p < 0.001$)。9 个阳性菌株之一 M986，与其他 8 个菌株相比显示较弱的结合(参见下文)。与表达存在于 PorA 1 号环上 P1.5 抗原表位(而不是 4 号环上的 P1.2 抗原表位)的三个菌株(M4207, 1000 和 BZ83)不发生结合。另外，与不表达 PorA(如, P1-)的菌株 M136 也不结合。这些数据表明抗-GNA33 抗体与细菌表面的结合与 PorA 血清亚型 P1.2 的表达相关。

20 补体依赖性杀菌抗体的活性

杀菌活性按以前所述方法测定 [Moe 等, *Infect. Immun.* (2001)69:3762-3771]。除非特别说明之处，补体来源为健康成年人血清(MAS)，其中没有 ELISA 可检出的针对血清 B 型或 C 多糖的抗荚膜抗体，而且在 20%或 40%血清终浓度时测不到针对靶菌株的固有杀菌活性。在以下描述的几个实验中，采用以下材料作为补体来源来测定杀菌活性：未经治疗的丙球蛋白缺乏血症患者的血清 [Steele 等, *Infect. Immun.* (1984)44:452-458]、幼年家兔血清或成年大鼠血清。

动物的保护

30 在腹膜内注射进行攻击的幼龄大鼠中测试了抗-GNA33 抗体提供抗奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型菌血症被动保护的能力。按以往所述方法进行 [Moe 等,

Infect. Immun. (1999) 67:5664-5675]。简单地讲, 在攻击试验当天上午, 挑取菌落接种肉汤培养液和培养, 并按上述方法制备用于杀菌试验。对于 M986 菌株, 为了使灵敏度达到最大, 在 0 时间点给动物腹膜内注射 100 μ l 不同稀释度的被测或对照抗血清, 分别与大约 5×10^3 个攻击用 MenB 细菌混合。用其他测试菌株的实验中, 在 0 时间点腹膜内注射抗体, 2 小时后腹膜内注射攻击细菌。所用的抗荚膜阳性对照 mAb 为 SEAM3。细菌攻击后 18 小时, 通过心脏穿刺获取血样, 采用针头和装有约 10 μ l 不含防腐剂的肝素(1000 单位/ml, Fujisawa USA, Deerfield, IL)的针筒。分别取 1 μ l、10 μ l、100 μ l 等份血样铺在巧克力琼脂平板上。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养过夜后测定每 ml 血样的 CFU 数。计算几何平均 CFU/ml 值, 以无菌培养物接种的动物的 CFU/ml 值设定为 1。

SDS-PAGE 及 Western 印迹

按以下方法制备脑膜炎球菌诸菌株的全细胞抽提物。取单菌落于 7ml 补加 0.25%葡萄糖的 Mueller-Hinton 培养液中培养至 A_{620nm} 达到 0.5-0.7。以 5000 \times g 离心 15 分钟收集细菌并重新悬浮于 PBS 中。经冻融后, 将细菌悬浮液与样品缓冲液[0.06M Tris-HCl, pH6.8, 10%(v/v)甘油, 2%(w/v)SDS, 5%(v/v)2-巯基乙醇]混合, 并煮沸 10 分钟。将纯化的蛋白质(0.5 μ g/泳道)或者脑膜炎球菌菌株的全细胞抽提物(25 μ g)加样到 12.5%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上 [Laemmli, U. K, *Nature* (1970) 227:680-685], 并转移到硝酸纤维素膜上 [Towbin 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1979) 76:4350-4354]。转移过程在 150mA、4 $^{\circ}$ C 条件下进行 2 小时, 转移用缓冲液是 0.3% Tris 碱、1.44%甘氨酸、20%(v/v)甲醇。硝酸纤维素膜以饱和缓冲液(含 10%脱脂牛奶、0.1% Triton \times 100 的 PBS)4 $^{\circ}$ c 培育过夜进行饱和。用洗涤缓冲液(含 3%脱脂牛奶、0.1% Triton \times 100 的 PBS)洗膜两次, 并在 37 $^{\circ}$ C 与以下材料一同孵育 2 小时: 以洗涤缓冲液 1:200 稀释的小鼠抗血清, 终浓度为 6 μ g/ml 的 mAb25; 或者 1:100 稀释的抗-Por A P1.2 mAb。然后与 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗-小鼠 Ig (Dako, Glostrup, Denmark) 培育。用含 0.1% Triton \times 100 的 PBS 洗膜两次, 以 Opti-4NC 底物试剂盒 (Bio-Kad) 显色。加入水终止反应。

30 肽的斑点合成 (spot synthesis)

肽的斑点合成在氨基-PEG-纤维素膜 (ABIMED, Langerfeld, Germany) 上进

行,采用 ASP222 型自动化斑点合成仪 (ABIMED) 和二异丙基碳二亚胺 (DIC)/N-羟
基苯并三唑 (HOBt) 活化 [Frank 和 Overwin, *Methods Mol. Biol.* (1996) 66:149-
169]。采用原位制备的 0.2M 芴甲酯基 (Fmoc)-氨基酸衍生物的 HOBt 酯作偶联
5 反应。以二甲基甲酰胺配的溴酚蓝溶液处理斑点上的自由氨基,结果可形成蓝
色印迹从而可目测所有的合成步骤。最后一轮结束后,用 2%的醋酸酐对所有肽
进行 N-末端乙酰化。合成结束时,用三氟乙酸/三异丁基硅烷/水/二氯甲烷混
合物 (50/3/2/45) 除去侧链保护基团。

肽结合试验

10 将结合在纤维素上的肽浸泡在乙醇中以防止肽之间发生疏水相互作用。将
纤维素膜在 4°C 下与 10ml 含 2%酪蛋白、0.05%吐温 20 (T-TBS) 的 Tris 缓冲盐
水 (TBS:50mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 27mM KCl, pH7.0) 一同培育过夜,以阻断
非特异性结合。将纤维素膜与 1:100 T-TBS 阻断缓冲液稀释的抗-GNA33
mAb25 (6 μ g) 或抗-PorA 1.2 mAb 在 37°C 孵育 2 小时。然后加入 1:3000 T-TBS
15 阻断缓冲液稀释的与碱性磷酸酶偶连的山羊抗-小鼠 IgG (BioRad), 37°C 孵育 1
小时。用 T-TBS 洗膜三次,通过将膜与溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐
(BCIP) (Sigma, Steinheim, Germany) 及 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基 2,5-二苯基四
唑溴化物 [MTT; Sigma] 一同在底物缓冲液 (100mM Tris, pH8.9, 100mM NaCl, 2mM
MgCl₂) 中培育来实现对结合的检测。用光学扫描仪 Umax Speedy II 2200 可对
20 信号做定量评价。

实施例 1

以间接荧光流式细胞计数测定抗-GNA33 抗体与细菌细胞表面的结合

用 rGNA33 (由菌株 2996 基因所编码) 接种 CD1 小鼠。得到的含多克隆抗体
25 的抗血清通过间接免疫荧光结合试验的流式细胞计数检测测定了其于各种
MenB 菌株活细胞结合的能力。图 1A 显示多克隆抗-rGNA33 抗血清与四个代表
性 MenB 菌株 [亲代株 2996 (P1.5, 2) 和其他三个菌株 M3735 (P1.5, 2)、
M4207 (P1.5) 及 MC58 (P1.7, 16)] 的结合。抗-GNA33 多克隆抗血清仅与菌株 2996
和 M3735 反应。抗荧膜阳性对照 mAb 能结合所有的 4 种菌株,而用大肠杆菌蛋
30 白免疫接种动物制备的阴性对照抗血清仅显示背景结合。图 1B 显示测定抗-
GNA33 mAb25 与三个菌株 [M3735 (P1.5, 2)、M4207 (P1.5) 及 MC58 (P1.7, 16)] 细

菌细胞表面结合的类似实验的结果。此 mAb 仅与菌株 M3735 (P1. 5, 2) 结合。

表 I 总结了流式细胞计数实验的结果，此实验测定了抗-GNA33 抗血清或 mAb25 与 22 个遗传学多样性的荚膜型脑膜炎球菌菌株 (21 个血清 B 型、1 个血清型 C) 活菌表面结合的能力。抗-GNA33 抗体只与 P1. 5, 2 或 P1. 2 血清亚型菌株结合 (9 个菌株全部，而其他 PorA 血清亚型 13 个菌株中 0 个； $p < 0.001$)。9 个阳性菌株之一 M986，与其他 8 个菌株相比显示较弱的结合 (参见下文)。与表达 P1. 5 抗原表位 [存在于 PorA 1 号环上，Sacchi 等, *Infect. Dis.* (2000) 182:1169-1176] 而不表达 4 号环 P1. 2 抗原表位的三个菌株 (M4207, 1000 和 BZ83) 不结合。还有，与不表达 PorA (如, P1-) 的菌株 M136 不结合。这些数据表明抗-GNA33 抗体与细菌表面的结合与 PorA 血清亚型 P1. 2 的表达相关。

实施例 2

从不同奈瑟脑膜炎球菌 B 族菌株制备的全膜组份的 Western 印迹

意外地发现抗-GNA33 与细菌表面的结合，和 P1. 2 血清亚型之间明显相关，故通过对代表性菌株总蛋白的 Western 印迹作进一步研究和用 SDS-PAGE 分析。图 2 显示了四种血清 B 型菌株的结果，其中两株，即 NG3/88 (P1. 7, 1) 和 MC58 (P1. 17, 16) 的流式细胞分析呈抗-GNA33 表面结合阴性，而另两株，即 BZ232 和 NMB (均为 P1. 5, 2) 则呈阳性结合。数据资料还显示于三个菌株 (MC58、BZ232 和 NMB) 的全膜制备物，这些菌株中编码 GNA33 的基因已失活。

图 2A 中，两株非 P1. 2 菌株，即 NG3/88 (第 3 泳道) 和 MC58 (第 4 泳道) 的全膜制备物中，通过抗-GNA33 mAb25 检测到表观分子量约 48kDa 的一条条带。该条带的表观分子量与预期的 rGNA33 (第 1 栏) 一致，而它不存在于对照大肠杆菌菌株的总蛋白制备物中 (第 2 泳道)，和 GNA33 敲除的菌株 MC58 的总蛋白制备物中 (第 5 泳道)。第 6、第 8 泳道分别含有菌株 BZ232 和 NMB 制备的总蛋白质。该两菌株均具有 PorA 血清亚型 P1. 5, 2。每一泳道中有两条抗-GNA33 反应条带。在 BZ232 和 NMB 的 GNA33 敲除菌株总蛋白中 (第 7、第 9 泳道) 未出现较高的 48kDa 条带，这一结果证实该蛋白是 GNA33。分子量较低的抗-GNA33 反应性条带，根据其具有与 mAb (和 P1. 2 有反应活性) 反应的能力，看来是 PorA (见图 2B)。

图 2B 显示与图 2a 所述相同的蛋白质样品的 Western 印迹分析，但使用了抗-PorA P1. 2 作为第一检测抗体。正如所预期的，抗-PorA mAb 不与 rGNA33 (第

1 泳道)、阴性对照大肠杆菌蛋白(第 2 泳道)、或者不表达 PorA P1.2 的菌株的全膜制备物(第 3、4、5 泳道)反应。然而,在表达 PorA P1.2 的菌株 BZ232(第 6 泳道)、BZ232ΔGNA33(第 7 泳道)、NMB(第 8 泳道)和 NMBΔGNA33(第 9 泳道)的全膜制备物中检测到一种与 PorA 预期表观分子量相符的蛋白质。该蛋白质也存在于这些菌株各自 GNA33 敲除制备物中(分别为第 7、第 9 泳道)。这些结果证实了图 2A 中,与抗-GNA33 mAb 起反应的表观分子量为 41kDA 的蛋白质是 PorA。与之形成对比的是,抗-PorA P1.2 mAb 在 Western 印迹分析中不与 GNA33 反应。

10 实施例 3

抗-GNA33 mAb25 识别的表面 PorA 抗原表位的肽图

已知抗-P1.2 mAb 能识别 4 号环上 PorA 的抗原表位。表 2 显示了本研究中选出的 MenB 菌株 4 号环可变区(VR₂)氨基酸序列的比较[见 Sacchi 等, *Infect. Dis.* (2001) 182:1169-1176, 或者 <http://mlst.zoo.ox.ac.uk/Meningococcus> 以了解最近修订的 PorA VR 的命名习惯]。表 2 中包括了两个密切相关的 VR₂ 型 P1.10 和 P1.10-1 的序列,分别来自 BZ83(P1.10)和 M4207(P1.10-1),两个菌株均为抗-GNA33 mAb 表面结合阴性。此两个阴性菌株 4 号环序列与抗-GNA33 阳性菌株相差一由 6 个氨基酸组成的肽。阳性 P1.2 菌株含六元肽 QTPKSQ(SEQ ID NO:16)或 QTPQSQ(SEQ ID NO:17),而阴性 P1.10 或 P1.10-1 菌株含六元肽分别为 NKQNQR(SEQ ID NO:18)和 NKQNQP(SEQ ID NO:19)(表 2)。

特别是,为了鉴定抗-GNA33 mAb25 识别的特异性氨基酸序列,合成了横跨整个 GNA33 氨基酸序列(表 3)和 PorA 4 号环(2996 菌株的 P1.2-2)的重叠性线状去帽肽,其 GneBank 登录号为 X57180。[注: X57180 中的序列编码具 QTPE 序列(SEQ ID NO:20)的 VR₂。但后来发现这个序列是错的(C. T. Sacchi, CDC, Atlanta, GA, personal communication)。正确的序列是 QTPQ(SEQ ID NO:21)]。与 mAb25 呈阳性反应(≥8 染料单位)的肽在表 3 中有详述。所有 8 个阳性 GNA33 肽有一共同的三元肽: QTP。QTP 序列也存在于所有 5 个能与 mAb25 反应的阳性 PorA P1.2 肽中。然而, QTP 序列对于抗-GNA33 结合是不够的,因为没有 mAb 能结合含 QTP 但缺乏 FVQ 先导序列的三个 4 号环肽。

30 为了明确各蛋白质上足以与抗-GNA33 mAb25 结合的最小肽序列,合成了进一步缩短的肽,其起始序列为 AQAFQTPVHS(图 4A, SEQ ID NO:6); 以及以

TPAHFVQQTP(图 4B, SEQ ID NO:22)为起始序列的 PorA P1.2 肽。此 mAb 能与含有 FQTPV(SEQ ID NO:2)的 GNA33 肽以及含有 FVQQTP(SEQ ID NO:23)的 PorA P1.2 肽强烈结合,但不与任何较小的肽结合。通过对 PorA 4 号环和 GNA33 相关肽中所含氨基酸作系统性丙氨酸或甘氨酸取代,鉴定了各蛋白质的相同最小抗原表位。见表 4 对 PorA 4 号环 VR P1.2-2 型的丙氨酸取代数据小结。

这些数据提示,由于与含有序列 QTP 的 PorA 的 P1.2 抗原表位发生交叉反应,rGNA33 所诱导的抗体对表达 P1.2 抗原表位的 Nm 菌株具有杀菌活性。

实施例 4

10 抗-GNA33 抗体和抗-PorA P1.2 抗体与 P1.2 NmB 菌株结合的比较

抗-rGNA33 抗体能与 PorA P1.2 抗原表位发生交叉反应这一意外发现,为比较由 ProA 血清亚型 P1.2 诱导的抗 rGNA33 抗体的活性提供了机会。在测试的 9 个 P1.2 菌株中有一个例外,其浓度依赖的抗-GNA33 mAb 结合与对照抗-PorA P1.2 mAb 结合相似(见图 5A 菌株 8047 和 BZ232 的代表性数据)。该例外菌株 M986 与其他 P1.2 菌株相比时显示与抗-GNA33 抗体较弱的结合(图 5B)。相反,所有 P1.2 菌株包括 M986 在内,与抗-PorA P1.2 mAb 的结合相似。

菌株 M986 的 VR₂ 序列类型据报道为 P1.2 型(GenBank 登录号 U92912),P1.2 限于 4 号环序列,包括 FVQQTPK(SEQ ID NO:24)区段,与菌株 8047 和 BZ232 的 FVQQTPQ(SEQ ID NO:25)(VR₂ 为 P1.2-2 型)相对。VR₂ 型别以特定 P1.2 抗原表位的氨基酸序列为基础。另两个据称具有 P1.2 型 VR₂ 序列的菌株(菌株 M3735 和 M5682)各自显示强烈的抗-GNA33 抗体结合,这种结合与对照抗-PorA P1.2 mAb 的结合相当(见例如菌株 M3735 的结合数据,图 1A;菌株 M5682 的结合数据,图 5B)。对菌株 M986、M3735 和 M5682 中 PorA 4 号环的 VR₂ 序列类型通过两次核苷酸测序证实为 P1.2。因此,K 变为 Q 的序列差异看来不足以解释抗-GNA33 与 M986 菌株结合活性的降低。

实施例 5

杀菌活性

比较了小鼠 mAbs 对 PorA P1.2、rGNA33(mAb25)和血清 B 型(SEAM 12)及 C(mAb 181.1)多糖荚膜的补体依赖性杀菌活性。用于测试 NmC 菌株 5954,血清 C 型抗荚膜 mAb(IgG3 亚类)为例外,其余所有 mAb 亚类均为 IgG2a。所有 9 个

菌株在人补体存在下抗-PorA P1.2 的 BC_{50} 为 $<0.5\mu\text{g/ml}$ 。血清 B 型抗荚膜 mAb 的相对应 BC_{50} 值较高, 在 $5\sim 12\mu\text{g/ml}$ 之间; 而血清型 C mAb (M5954 菌株) 的 BC_{50} 为 $<1\mu\text{g/ml}$ 。如表 5 所小结的, 抗-GNA33 mAb 的杀菌活性有可变性, 依赖于所用补体的来源。对于三个菌株 (8047、NMB 和 M3735) 而言, 在人补体存在下其

5 抗-GNA33 mAb 的 BC_{50} 值在 $7\sim 15\mu\text{g/ml}$ 范围。这些菌株的此值与抗荚膜抗体所显示的值相似。对于其余 6 个菌株 (2996、BZ232、M5545、M5682、M5954、M986), 在人补体存在下用抗-GNA33 mAb 未观察到杀伤 [当用无内源性杀菌活性的正常成人血清测试时, $BC_{50}>60\mu\text{g/ml}$ (表 5); 当用丙球蛋白缺乏血症患者血清测试时 $BC_{50}>30\mu\text{g/ml}$]。当采用幼年家兔血清作为补体来源时, 6 个菌株中除 1 个之外

10 均对抗-GNA33 诱导的溶菌作用敏感。敏感菌株的 BC_{50} 值在 $\leq 1\mu\text{g/ml}$ 到 $8\mu\text{g/ml}$ 范围 (表 5)。例外的又是 M986 菌株, 当用人或家兔补体测试时用抗-GNA33 mAb 未观察到杀菌作用 (BC_{50} 分别为 $>150\mu\text{g/ml}$ 和 $>30\mu\text{g/ml}$)。通过流式细胞计数测定, 对此菌株缺乏溶菌作用可能与该 mAb 的较低表面结合有关 (图 5B)。多克隆小鼠抗-rGNA33 抗血清与人补体对 5 个测试菌株的各自杀菌效价, 与用抗-GNA33

15 mAb25 测得的结果一致 (表 5)。

实施例 6

抗-GNA33 抗血清的被动保护作用

在幼年大鼠模型中评价了多克隆小鼠抗-GNA33 抗体提供抗 MenB 菌血症被

20 动保护力的能力。采用了三个菌株: 8047, 一个在人或家兔补体存在时对抗-GNA33 溶菌作用敏感的菌株; BZ232, 这个菌株在人补体存在时对抗-GNA33 的溶菌作用有抗性, 但在家兔或大鼠补体存在时则敏感; M986, 这个菌株在人、家兔或大鼠补体存在时能抵抗抗-GNA33 的溶菌作用。在该模型中测得的被动保护结果汇总于表 6。

25 实验 1 中, 取 $100\mu\text{l}$ 以 1:5 或 1:25 比例稀释的多克隆小鼠抗-GNA33 抗血清与 $5.8\times 10^3\text{CFU}$ 的菌株 8047 相混合, 腹膜内注射。攻击 18 小时后测定受到完全保护抵御了菌血症的大鼠。同一实验中, 给予 $100\mu\text{l}$ 以 1:5 或 1:25 比例稀释的抗-GNA33 抗血清与 $6.5\times 10^3\text{CFU}$ 的菌株 M986 (一个对抗-GNA33 溶菌作用有抗性的菌株) 相混合的所有动物, 均发生了菌血症。尽管缺乏杀菌活性, 接受

30 抗-GNA33 抗血清治疗并用菌株 M986 攻击的动物血液 CFU/ml 几何平均值, 比用阴性对照抗血清 (用大肠杆菌蛋白制备) 治疗的对照动物低 $10\sim 20$ 倍 ($p=0.02$)。

在第二个实验(实验 2)中用抗-GNA33 mAb25 得到了类似结果。所有 6 只大鼠在 0 时间点预先腹膜内注射 20 μ g 的 mAb, 2 小时后用 3.5×10^3 CFU 的菌株 M986 攻击, 攻击 18 小时后血样中发现有细菌存在。但 CFU/ml 的几何平均值低于用无关 mAb 预处理的对照动物组的 0.3%以下 ($p < 0.02$)。同一实验中, 每只大鼠给予 5 20 μ g 抗-P1.2 mAb 即可呈完全保护对抗了 M986 菌株攻击, 每只大鼠 2 μ g 能提供部份保护(6 只测试动物中有 1 只发生菌血症)。

在第三、第四次(实验 3 和实验 4)实验中, 用菌株 BZ232(在人补体存在下对抗-GNA33 溶菌作用有抗性; 但对家兔或大鼠补体敏感)攻击大鼠。在此实验中, 抗-GNA33 mAb 对于该菌株的保护活性相似于或高于对照抗荚膜抗体, 仅略 10 低于抗-PorA P1.2 mAb。

如上所示, 由于免疫接种 rGNA33 而产生的小鼠抗体, 在补体存在下能介导奈瑟脑膜炎球菌的溶菌过程, 这是因为抗-GNA33 抗体能与膜孔蛋白 PorA 的 P1.2 抗原表位发生交叉反应。这是一个意外的结果, 因为 GNA33 和 PorA 不具有显著的序列同源性, 在结构、功能上也不相关, 物理上位于不同的细菌亚结构 15 构中。因此, GNA33 可作为 PorA 的免疫模拟物。

GNA33 所显示的分子模拟程度是罕见的。首先, 如以所述, GNA33 是一种与 PorA 无关的非免疫球蛋白。其次, rGNA33 诱导了抗体应答, 从多方讲, 这与由外膜泡囊制备物中天然 PorA 诱导的应答在功能活性上相类似。第三, 此处描述的多克隆小鼠抗-rGNA33 抗血清是在两个独立的实验室中制备的其杀菌 20 数据被独立地重复。

在以往的研究中, 用相应于 PorA P1.2 4 号环的肽免疫接种, 没能诱导出能与该天然蛋白质结合的抗体, 或在补体存在下能介导溶菌作用的抗体 [McGuinness 等, *J. Exp. Med.* (1990) 171:1871-1872]。假设较小的肽片段在天然膜孔蛋白中不能取得稳定的构像。类似的, 用大肠杆菌或枯草芽孢杆菌表达的 25 的 rPorA 免疫接种不能诱生杀菌抗体, 除非采用脂质体或洗涤剂在重组蛋白中重建表面可触及的 PorA 抗原表位的构像 [Christodoulides 等, *Microbiology* (1998) 144:3027-3037; Idänpään-Heikkilä 等, *Vaccine* (1995) 13:1501-1508]。这些结果提示 PorA 上负责诱导杀菌抗体的抗原表位是构象性表位。与之形成对比的是, 用 rGNA33 模拟物免疫接种诱导的杀菌抗体, 可与 PorA4 号环的 P1.2 30 抗原表位发生交叉反应。与 rPorA 不同, 这反应发生于用作免疫原的重组 GNA33 蛋白简单地与弗氏佐剂混合时, 不需要复性该重组分子。

因此，叙述了 GNA33 多肽、抗原表位、针对它们的抗体、以及这些分子的用途。从前述内容，应该明白虽然本文描述了本发明的一些特定实施方式目的是为了说明本发明，但在不脱离所附权利要求书提出的思路 and 范围仍有可能对其进行各种修改。

表 1

对于血清类型和 PorA VR 称谓, 通过流式细胞计数测定的抗-GNA33 抗体与活的荚膜型奈瑟脑膜炎球菌菌株表面的结合

菌株号	国家	年份	血清型分类 ^A	PorA VR 称谓 (序列) ^B	抗- GNA33 ^C
M5954	U. S.	1997	C:2a:P1.2	ND	+
M5682	U. S.	1999	B:2a:P1. 5, 2	P1. 5, 2	+
M986	U. S.	1963	B:2a:P1. 5, 2	P1. 5, 2	+
M3735	U. S.	1992	B:NT:P1. 5, 2	P1. 5-1, 2	+
M5545	U. S.	1998	B:NT:P1. 5, 2	P1.5-4,2-2	+
8047	U. S.	1978	B:2b:P1. 5, 2	P1. 5-2, 2-2	+
NMB	U. S.	1982	B:2b:P1. 5, 2	P1. 5-2, 2-2	+
BZ232	Netherlands	1964	B:NT:P1. 2	P1. 5-2, 2-2	+
2996	Netherlands	1975	B:2b:P1. 5, 2	P1. 5-1, 2-2	+
M136	U. S.	1968	B:16, 11:P1-	P1. 5-1, 2-2	-
M4207	U. S.	1997	B:10:P1. 5	P1. 5-1, 10-1 ^C	-
1000	USSR	1989	B:NT:P1. 5	P1. 5-1, 10-4	-
BZ83	Netherlands	1984	B:P1. 5, 10	P1. 5-1, 10	-
NG6/88	Norway	1988	B:NT:P1. 1	P1. 7-4, 1	-
BZ198	Netherlands	1986	B:NT:P. NST	P1. 7-4, 4	-
S3446	U. S.	1972	B:19, 14:P1. 22, 14	P1. 22-1, 14	-
IH5341	Finland	1985	B:15:P1. 7, 16	ND	-
CU385	Cuba	1980	B:4, 7:P1. 19, 15	P1. 19, 15	-
SWZ107	Switzerland	1980	B:4:P. NST	P1. 22-1, 14	-
H44/76	Norway	1976	B:15:P1. 7, 16	P1. 7, 16	-
NG3/88	Norway	1988	B:8:P1. 7, 1	P1. 7, 1	-
MC58	U. K.	1985	B:15:P1. 7, 16	15:P1. 7, 16-2	-

^ANST = 对已有 mAbs 不能作血清亚型分型; -=PorA 表达不能以 SDS-PAGE 检测。

^B根据 Sacchi 等在 *Infect. Dis.* (2000) 182:1169-1176 以及 <http://neisseria.mist.net> 中提出的修订的 PorA VR 类型称号命名法。

^C用小鼠多克隆抗-GNA33 抗血清和/或 mAB25 测定。

菌株	VR2 序列类型	PorA 4 号环氨基酸序列	表面结合
M3735	P1.2	HFVQ QTPKSQ PTLVP (序列编号: 32)	阳性
BZ232	P1.2-2	HFVQ QTPQSQ PTLVP (序列编号: 33)	阳性
2996	P1.2-2	HFVQ QTPQSQ PTLVP (序列编号: 33)	阳性
BZ83	P1.10	HFVQ NKQNQR PTLVP (序列编号: 34)	阴性
M4207	P1.10-1	HFVQ NKQNQP PTLVP (序列编号: 34)	阴性

表 3 针对制备于 GNA33 和 PorA P1.2 的 4 号环(2996 菌株)重叠肽的抗-GNA33 mAb25 的抗原表位图谱

GNA33 ^A	染料单位	PorA P1.2 的 4 号环 ^a	染料单位
QDVSAQAFQT (序列编号: 35)	0	YTPAHFVQQT (序列编号: 37)	0
DVSAQAFQTP (序列编号: 12)	23	TPAHFVQQTP (序列编号: 22)	8
VSAQAFQTPV (序列编号: 13)	27	PAHFVQQTPQ (序列编号: 38)	10
SAQAFQTPVH (序列编号: 14)	29	AHFVQQTPQS (序列编号: 15)	14
AQAFQTPVHS (序列编号: 6)	30	HFVQQTPQSQ (序列编号: 39)	15
QAFQTPVHSF (序列编号: 9)	30	FVQQTPQSQP (序列编号: 40)	9
AFQTPVHSFQ (序列编号: 10)	24	VQQTPQSQPT (序列编号: 41)	4
FQTPVHSFQA (序列编号: 11)	22	QQTPQSQPTL (序列编号: 42)	0
QTPVHSFQAK (序列编号: 12)	19	QTPQSQPTLV (序列编号: 43)	2
TPVHSFQAKQ (序列编号: 36)	2	TPQSQPTLVP (序列编号: 44)	2

^a 如产生的斑点 = 10 个染料单位即认为该肽序列与抗-GNA33 mAb25 的结合为阳性。

10 元肽	相对结合	共有肽 FVQQTPA (序列编号: 54)
PGH FVQ QTP Q (序列编号: 45)	8	
PAA FVQ QTP Q (序列编号: 46)	8	
PAH AVQ QTP Q (序列编号: 47)	1	
PAH FAQ QTP Q (序列编号: 48)	4	
PAH FVA QTP Q (序列编号: 49)	2	
PAH FVQ ATP Q (序列编号: 50)	0	
PAH FVQ QAP Q (序列编号: 51)	0	
PAH FVQ QTA Q (序列编号: 52)	0	
PAH FVQ QTA A (序列编号: 53)	2	

		多克隆抗血清	mAb 25	
		BC ₅₀ (1/titer) ^A	BC ₅₀ (μg/ml) ^A	
菌株	VR2 序列类型	人补体 ^{B, C}	人补体 ^B	家兔补体
8047	P1.2-2	⇒ 16	15	< 0.5
NMB	P1.2-2	⇒ 16	9	ND ^C
M3735	P1.2	ND	7	ND
2996	P1.2-2	< 4	> 60	< 0.5
BZ232	P1.2-2	< 4	> 150	< 0.5
M5682	P1.2	ND	> 60	< 0.5
M5954	P1.2	ND	> 60	1
M5545	P1.2	ND	> 60	8
M986	P1.2	< 4	> 150	> 30

^A BC₅₀, mAb 的浓度; 或者抗血清稀释度倒数, 当与细菌细胞和 20%补体一同培育 60 分钟时产生的 CFU/ml 数与 0 时间点相比下降了 50%。

^B 在人补体存在时抗-PorA P1.2 mAb 的 BC₅₀ 范围为 0.25 μg/ml 到 0.5 μg/ml。在人补体存在时血清 B 型抗荚膜 mAb (SEAM 12) 对 8 种血清 B 型菌株的 BC₅₀ 范围为 5 μg/ml 到 15 μg/ml。在人补体存在时血清 C 型抗荚膜 mAb (181.1) 对 M5954 菌株的 BC₅₀ 为 < 1 μg/ml。

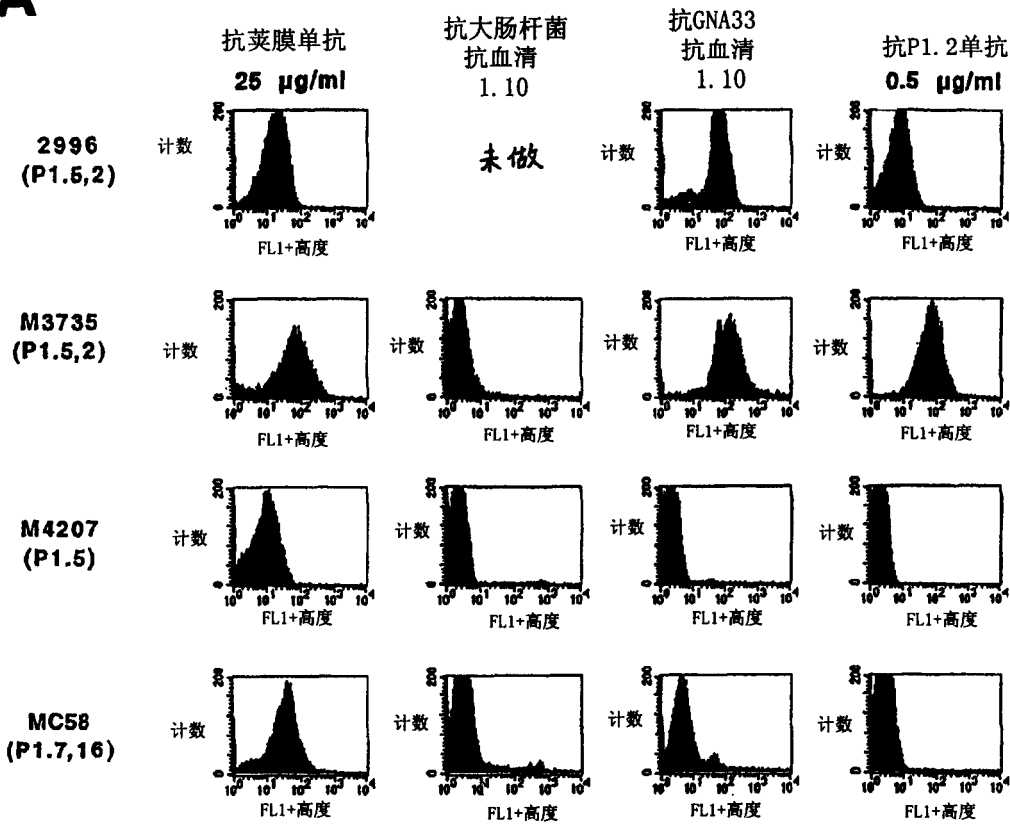
^C ND, 未测。

表 6: 抗-GNA33 抗体对受奈瑟脑膜炎球菌血清 B 型菌株 8047、M986 或 BZ232 攻击的幼年大鼠提供的被动保护作用					
实验	菌株 (每只大鼠攻击的 CFU 数)	治疗 ^A	血清稀释 倍数 或剂量	18 小时血培养	
				阳性数/ 总数	CFU/ml (几何平均值, 10 ³) ^B
1	8047 (5.8x10 ³)	抗荚膜 mAb	2	0/5	<0.001
		抗-GNA33 抗血清	1:5	0/5	<0.001
		抗-GNA33 抗血清	1:25	0/5	<0.001
		抗-大肠杆菌抗血清	1:5	5/5	53
		清无关 mAb	2	5/5	63
1	M986 (6.5x10 ³)	抗荚膜 mAb	2	0/5	<0.001
		抗-GNA33 抗血清	1:5	5/5	19
		抗-GNA33 抗血清	1:25	5/5	41
		抗-大肠杆菌抗血清	1:5	5/5	408
		无关 mAb	2	5/5	203
2	M986 (3.5x10 ³)	抗荚膜 mAb	20	1/6	0.002
		抗-GNA33 mAb	20	6/6	1.873
		抗-PorA1.2 mAb	20	0/6	<0.001
		抗-PorA1.2 mAb	2	1/6	0.003
		无关 mAb	20	6/6	630
3	BZ232 (7.1x10 ³)	抗荚膜 mAb	10	3/6	<0.056
		抗-GNA33 mAb	15	0/6	<0.001
		抗-GNA33 mAb	3	1/6	<0.006
		抗-GNA33 mAb	0.6	5/6	0.282
		抗-PorA1.2 mAb	15	0/6	<0.001
		抗-PorA1.2 mAb	3	0/6	0.001
		无关 mAb	15	6/6	>500
4	BZ232 (4.7x10 ³)	抗-GNA33 mAb	0.6	5/6	4.562
		抗-PorA1.2	3.0	0/6	<0.001
		抗-PorA1.2	0.6	0/6	<0.001
		抗-PorA1.2	0.12	3/7	0.022
		无关 mAb	3	8/8	273

A: 实验 1 中, 将细菌与抗血清或对照 mAb 相混合后马上进行腹膜内注射攻击。实验 2、3、4 中, 动物在 0 时间点用 mAb 腹膜内注射治疗。两小时后腹膜内注射细菌进行攻击。两实验中攻击 18 小时后收取血液培养物。

5 B: 计算 CFU/ml 几何平均值时, 指定接种无菌培养物的动物的 CFU/ml 值为 1。实验 1 中, 接种 1:5 或 1:25 稀释度抗-GNA33 抗血清、并用 M986 菌株 (28.8×10^3) 攻击的动物组, 其 CFU/ml 几何平均值低于给予无关 mAb 或大肠杆菌抗血清 (350×10^3 , $P=0.02$) 的对照组动物。实验 2、3、4 中, 用抗-GNA33 mAb 治疗的动物, 其 CFU/ml 几何平均值低于给予无关 mAb 的对照组 ($P<0.02$)。

A



B

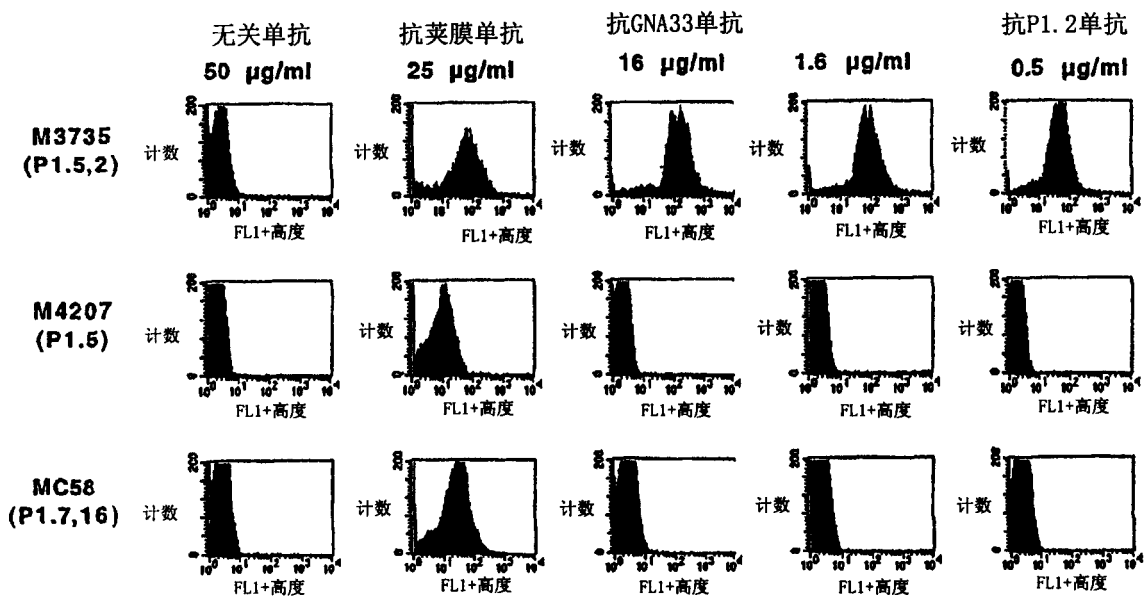


图 1

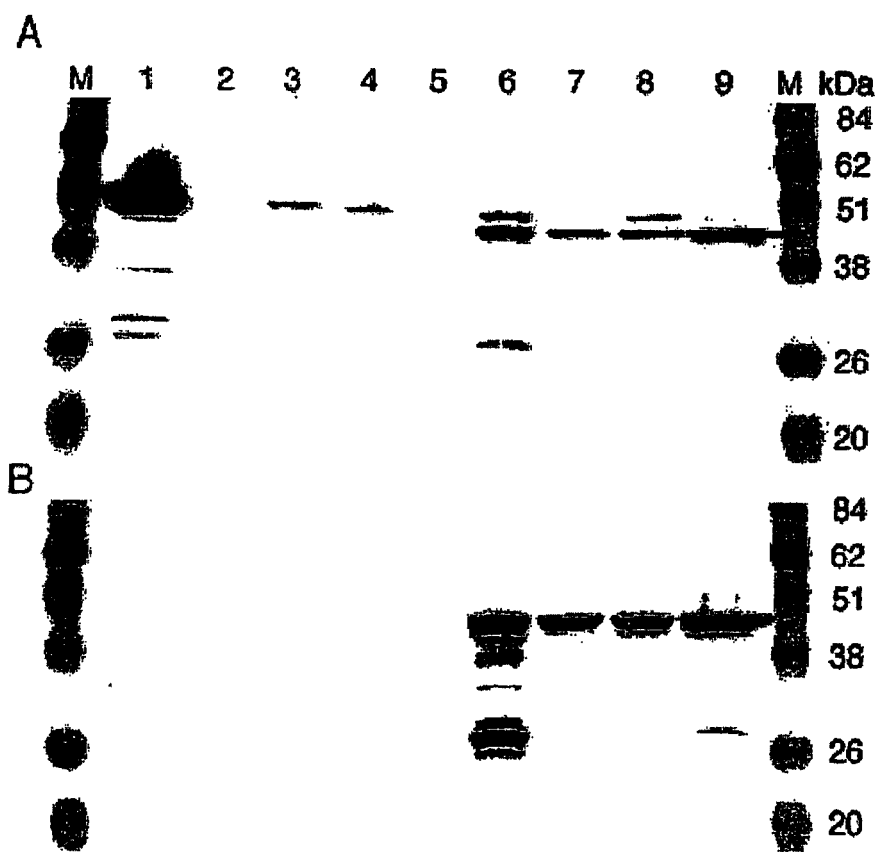


图 2

1 MKKYLFRAAL CGIAAAILAA COSKSIQTFP QPDTSVINGP DRPVGIPDPA
51 GTTVGGGGAV YTVVPHLSLP HWAAQDFAKS LQSFRLGCAN LKNRQGWQDV
101 CAQAFQTPVH SVQAKOFFER YFTPWQVAGN GSLAGTVTGY YEPVLKGDDR
151 RTAQARFPIY GIPDDFISVP LPAGLRSGKA LVRIRQTGKN SGTIDNTGGT
201 HTADLSQFPI TARTTAIKGR FEGRFLPYH TRNQINGGAL DGKAPILGYA
251 EDPVELFFMH IQSGRLKTP SGKYIRIGYA DKNEHPYVSI GRYMADKGYL
301 KLGQTSMQGI KAYMQQPQR LAEVLGQNPS YIFFRELTGS SNDGPVGGALG
351 TPLMGEYAGA VDRHYITLGA PLFVATAHPV TRKALNRLIM AQDTGSAIKG
401 AVRVDYFWGY GDEAGELAGK QKTTGYVWQL LPNGMKPEYR P

图 3

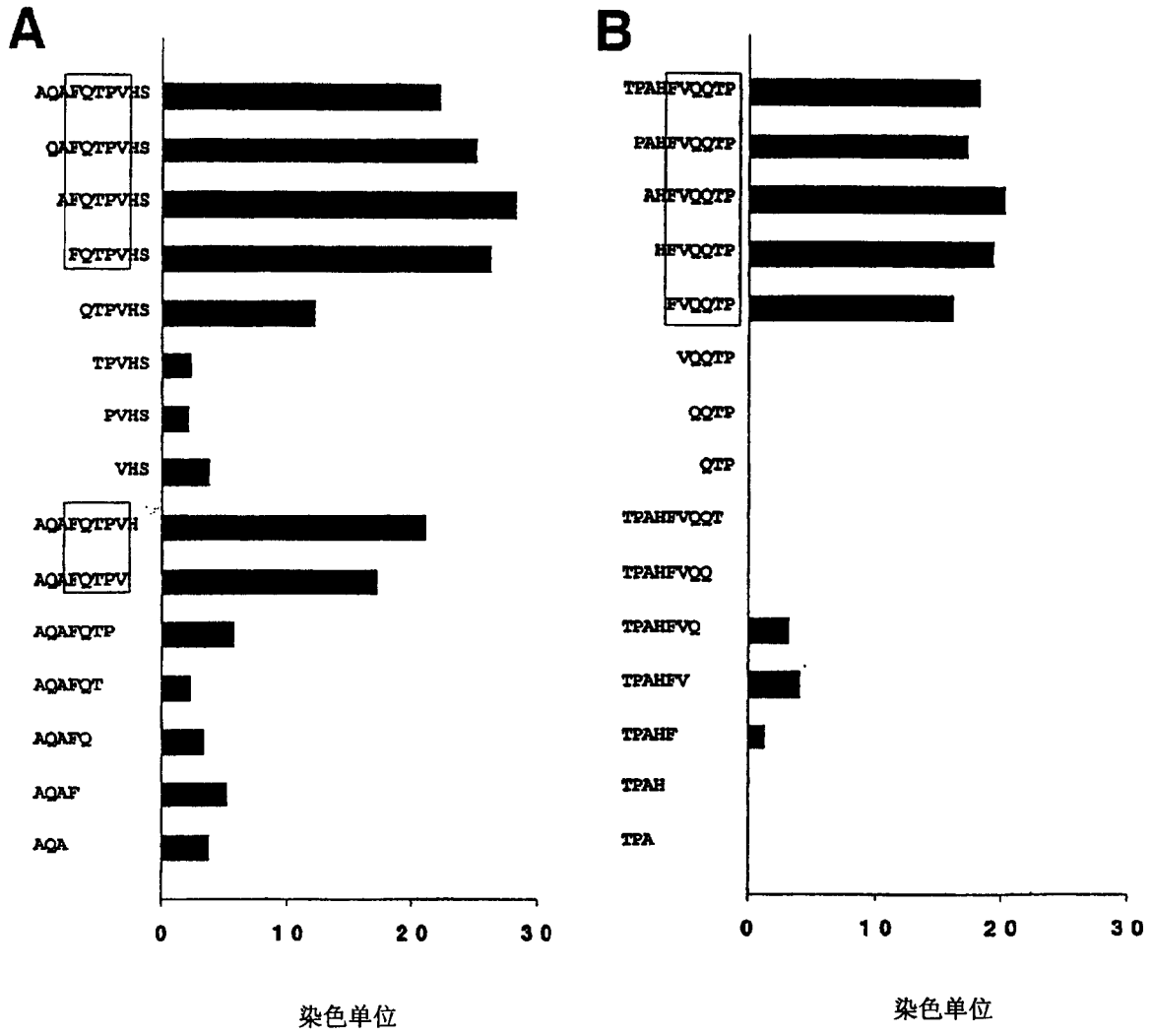
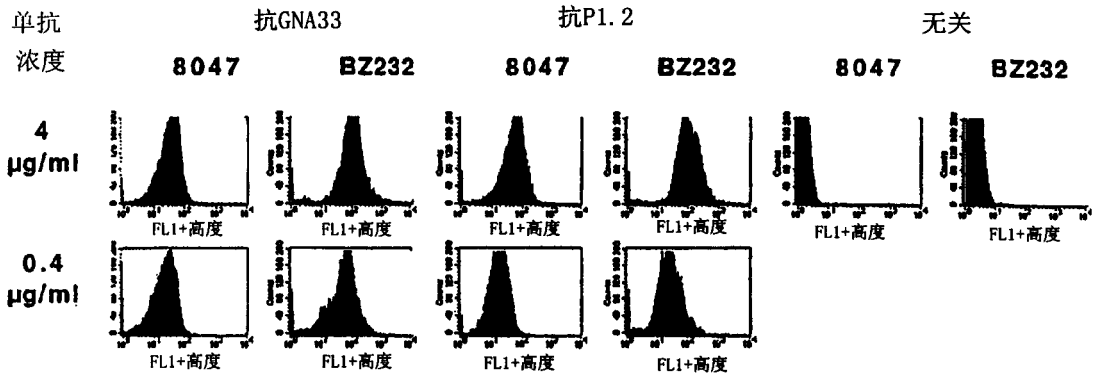


图 4

A



B

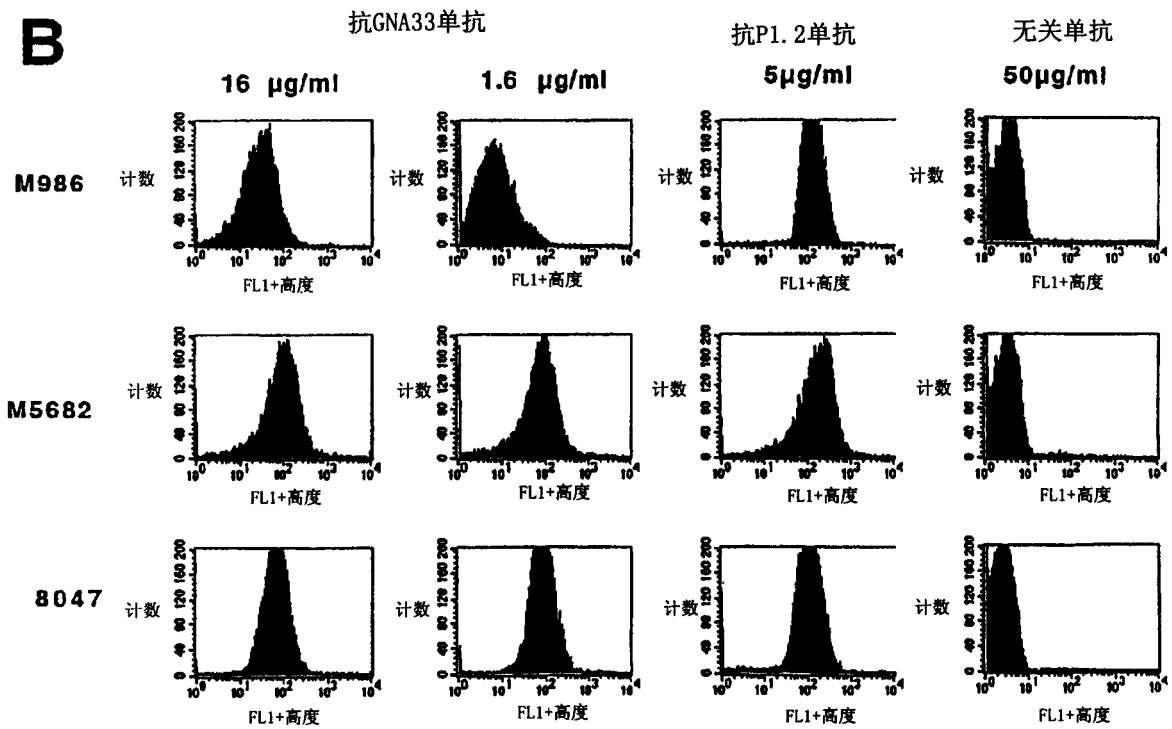


图 5

专利名称(译)	诱导功能活性抗体的脑膜炎球菌B抗原表位的分子模拟物		
公开(公告)号	CN1602204A	公开(公告)日	2005-03-30
申请号	CN02808166.8	申请日	2002-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司 儿童医院奥克兰研究所		
申请(专利权)人(译)	希龙公司 儿童医院奥克兰研究所		
当前申请(专利权)人(译)	希龙公司 儿童医院奥克兰研究所		
[标]发明人	D格拉诺夫 G莫 R拉普奥里		
发明人	D·格拉诺夫 G·莫 R·拉普奥里		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/095 A61K39/395 A61K39/40 A61P31/04 A61P43/00 C07K1/22 C07K2/00 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/13 C12N15/63 C12P21/00 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/36 G01N33/569 C12Q1/68 C12P19/34 C07H21/02 C07H21/04		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K14/22 A61K39/00 A61P31/04 A61P43/00 Y10S530/825		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/284554 2001-04-17 US 60/326838 2001-10-03 US		
其他公开文献	CN1306956C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了奈瑟、脑膜炎血清B型(MenB)P1.2血清亚型PorA 4号环上的表面暴露的抗原表位的分子模拟物和其抗体。含有这类分子模拟物或其抗体的组合物可用于预防MenB疾病和诊断MenB感染。

