

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/31

C12N 1/21 C12Q 1/68

C07K 14/22 C07K 16/12

G01N 33/68 A61K 39/095

A61K 39/40 A61K 48/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00805839.3

[43] 公开日 2003 年 4 月 30 日

[11] 公开号 CN 1415013A

[22] 申请日 2000.1.25 [21] 申请号 00805839.3

[30] 优先权

[32] 1999. 1. 29 [33] GB [31] 9902070.3

[86] 国际申请 PCT/EP00/00561 2000. 1. 25

[87] 国际公布 WO00/44904 英 2000. 8. 3

[85] 进入国家阶段日期 2001. 9. 29

[71] 申请人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

[72] 发明人 J·通纳德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

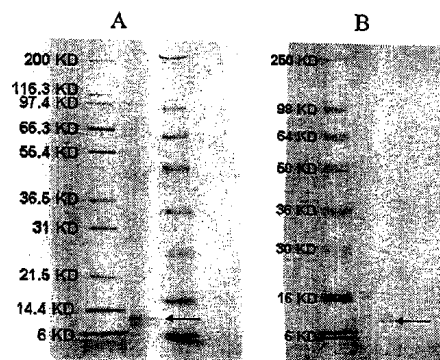
代理人 罗宏 刘玥

权利要求书 2 页 说明书 45 页 序列表 2 页  
附图 4 页

[54] 发明名称 源自脑膜炎奈瑟氏球菌的 BASB059 多肽

[57] 摘要

本发明提供了 BASB059 多肽和编码 BASB059 多肽的多聚核苷酸以及通过重组技术产生这样的多肽的方法。本发明也提供了诊断, 预防和治疗上的应用。



纯化的重组BASB059的分析。A着马斯染色的纯化BASB059的SDS-聚丙烯酰胺凝胶。B用抗氨酸免疫制剂进行的纯化的BASB059的Western印迹分析

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种分离的多肽，它包含的氨基酸序列和 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列至少有 85% 的同一性。
2. 权利要求 1 中所要求的分离的多肽，其中的氨基酸序列和 SEQ ID NO:2 的氨基酸至少有 95% 的同一性。
3. 权利要求 1 中所要求的多肽，其包含 SEQ ID NO:2 中的氨基酸。
4. 一种 SEQ ID NO:2 的分离多肽。
5. 权利要求 1 到 4 中任何一项所要求的多肽的免疫原性片段，其中上述免疫原性片段的免疫原活性基本上和 SEQ ID NO:2 的多肽的免疫原活性相同。
6. 一种分离的多聚核苷酸，它包含编码 SEQ ID NO:2 的多肽的核苷酸序列。
7. 一种分离的多聚核苷酸，它包含 SEQ ID NO:1 中的多聚核苷酸。
8. 一种含有编码 SEQ ID NO:2 的多肽的核苷酸序列的，分离的多聚核苷酸，它可以通过用标记的探针在严紧的杂交条件下筛选适当的文库得到，上述探针具有 SEQ ID NO:1 或其片段的序列。
9. 一种表达载体或活的重组微生物，它包含有根据权利要求 6 - 8 中任何一项的分离的多聚核苷酸。
10. 根据权利要求 6 - 8 中任何一项的多聚核苷酸的表达方法，它包括用含有至少一种上述多聚核苷酸的表达载体转化宿主细胞，并在足以使任何一种上述多聚核苷酸表达的条件下培养上述宿主细胞。
11. 一种疫苗组合物，它含有权利要求 1 到 5 任何一项中的有效量的多肽，以及药用上可接受的载体。
12. 一种疫苗组合物，它含有权利要求 6 到 8 任何一项中的有效量的多聚核苷酸，以及药用上可接受的载体。
13. 根据权利要求 11 或 12 中任何一项的疫苗组合物，其中所述的组合物含有至少一种其它脑膜炎奈瑟氏球菌抗原。
14. 一种抗体，它对权利要求 1 到 5 任何一项中所要求的多肽或其免疫片段具有免疫特异性。

15. 诊断脑膜炎奈瑟氏球菌感染的一种方法，该方法包括鉴定生物样品中存在的权利要求 1 到 5 任何一项中所要求的多肽，或者对上述多肽具有免疫特异性的抗体，上述生物样品源自怀疑患有这样感染的动物。
- 5      16. 一种组合物在一种药物的制备中的应用，所述组合物含有免疫学上有有效量的，权利要求 1 到 5 任何一项中所要求的多肽，所述药物用于在一种动物中产生免疫应答。
- 10      17. 一种组合物在一种药物的制备中的应用，所述组合物含有免疫学上有有效量的，权利要求 6 到 8 任何一项中所要求的多聚核苷酸，所述药物用于在一种动物中产生免疫应答。
18. 一种用于治疗患有脑膜炎奈瑟氏球菌疾病的人的药用组合物，该组合物至少含有一种针对权利要求 1 到 5 任何一项中所要求的多肽的抗体，以及适当的药用载体。

## 源自脑膜炎奈瑟氏球菌的 BASB059 多肽

## 发明领域

5 本发明涉及多聚核苷酸(这里指的是“BASB059 多聚核苷酸”), 由该多聚核苷酸编码的多肽(这里指的是“BASB059”或“BASB059 多肽”), 重组材料以及重组材料的生产方法。另一方面, 本发明涉及上述多肽和多聚核苷酸的使用方法, 包括防止细菌感染的疫苗。更进一步地, 本发明涉及检测某些病原体感染的诊断方法。

## 10 发明背景

脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)(meningococcus, 脑膜炎球菌)是一种经常分离自人上呼吸道的革兰氏阴性细菌。它有时引起入侵性细菌疾病如菌血症和脑膜炎。脑膜炎球菌疾病的发生率表现出地理性的、季节性的、和年度的差异(Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; 临床微生物学综述(Clin. Microbiol. Rev.) 2 (增刊), S18-S24, 1989)。温带国家的多数疾病是由于血清组 B 菌株引起的, 并且人口总数的发病率在 1-10/100,000/年之间变化, 有时达到更高的数值(Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7:R55-9, 1995; Scholten, R. J. P. M., 20 Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. 等, 临床感染疾病(Chin. Infect. Dis.) 16:237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., 等, 流行性感染(Epidemiol. Infect.) 105:119-126, 1990)。

由血清组 A 的脑膜炎球菌支配的流行病, 大部分在中非, 有时发病率高达 1000/100,000/年(Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. 临床微生物学综述(Clin. Microbiol. Rev.) 2 (增刊), S18-S24, 25 1989)。几乎脑膜炎疾病的所有病例都是由血清组 A, B, C, W-135 和 Y 脑膜炎球菌引起的, 并且已经有四价的 A, C, W-135, Y 多糖疫苗(Amand, J., Arminjon, F., Mayard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982)。最近, 通过和载体蛋白化学交联的方法, 上述多糖疫苗得以改善(Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, 30 V. K., 等 JAMA 275: 1499-1503, 1996)。

没有血清组 B 疫苗, 因为有人发现 B 荚膜多糖不具有免疫原性,

很可能是由于它和宿主的组分具有结构相似性 (Wyle, F.A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L. 等传染病杂志 (J. Infect. Dis.) 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Makela, P.M. Lancet ii: 355-357, 1983)。

5 多年以前就开始并进行了发展基于脑膜炎球菌外膜的疫苗的努力 (de Moraes, J. C.l, Perkins, B., Camargo, M. C.等 Lancet 340:1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J.K. 等 338: 1093-1096, 1991)。它证明这样的疫苗在较大的儿童 (>4岁) 和成人中表现出的效力为 57%-85%。

10 在这些疫苗中存在许多细菌的外膜成份, 如 PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB, 这些成份对于所观察到的保护效应的贡献还有待进一步阐明。通过使用动物的或人的抗体, 其它细菌外膜成份, 如 TbpB 和 NspA, 已经被认为可能与保护性免疫的诱导相关 (Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B.R, 实验药物杂志 (J. Exp. 15 Med.) 185: 1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, p. 等传染病免疫, (Inf. Immun.) 63: 884-890, 1995)。保护性免疫的机制可能涉及抗体介导的杀菌活性和调理性噬菌活性 (opsonophagocytosis)。

一种菌血症动物模型被用来结合所有的抗体介导的机制 20 (Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H. Poolman, J. T. Vaccine 7: 325-328, 1989)。一般认为, 后期补体成分介导的杀菌机制对于抗脑膜炎球菌疾病的免疫是至关重要的 (Ross, S.C., Rosenthal P.J., Berberic, H.M., Densen, P. 传染病杂志 (J. Infect. Dis.) 155:1266-1275, 1987)。

25 在过去的几十年中脑膜炎奈瑟氏球菌 (Neisseria meningitidis) 感染的频率显著增加。这是由于出现了多抗生素抗性的菌株以及由于免疫系统减弱的人群的增加。分离出具有几种或所有常规抗生素抗性的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株不再是罕见的现象。这一现象产生了未满足的医疗需要, 以及对新的抗微生物制剂、疫苗、药 30 物筛选方法、以及对这种生物的诊断检测的需求。

#### 发明概述

本发明涉及 BASB059, 特别是 BASB059 多肽和 BASB059 多聚核苷

酸，重组材料和它们的生产方法。在另一方面，本发明涉及这样的多肽和多聚核苷酸在包括防止和治疗微生物疾病等方面的使用方法。更进一步地，本发明涉及检测与微生物感染相关的疾病和与这样的感染相关的病情的诊断分析，例如用于检测 BASB059 多聚核苷酸或多肽的表达或活性的分析方法。

通过阅读随后的说明书和通过阅读本公开内容的其它部分，对于本领域的技术熟练人员而言，在本公开的发明的精神和范围内的多种变化和修饰将是显而易见的。

#### 本发明的描述

如下文所详细描述，本发明涉及 BASB059 多肽和多聚核苷酸。具体而言，本发明涉及脑膜炎奈瑟氏球菌的 BASB059 多肽和多聚核苷酸，它和任何已知的蛋白没有明显的相似性。本发明尤其涉及核苷酸序列和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO:2 中列出的 BASB059。应当理解，在以下的序列表中作为“DNA”列出序列代表了本发明的一个实施方案，因为普通技术人员将认识到这样的序列通常在多聚核苷酸，包括多聚核糖核苷酸，中非常有用。

#### 多肽

在本发明的一个方面中提供了此处称为“BASB059”和“BASB059 多肽”的脑膜炎奈瑟氏球菌多肽，以及它们的可用于生物学的，诊断的，预防的，临床的或治疗用途的变体，以及含有上述多肽或其变体的组合物。

本发明进一步提供了

(a) 一种分离的多肽，该多肽包括的氨基酸序列和 SEQ ID NO:2 的同一性至少为 85%，更优选地至少为 90%，更优选地至少为 95%，最优选地至少为 97-99% 或完全相同。

(b) 由一种分离的多聚核苷酸编码的多肽，上述分离的多聚核苷酸包括的多聚核苷酸序列和 SEQ ID NO:1 在 SEQ ID NO:1 的全长上的同一性至少为 85%，更优选地至少为 90%，更优选地至少为 95%，最优选地至少为 97-99% 或完全相同。

(c) 由一种分离的多聚核苷酸编码的多肽，上述分离的多聚核苷酸所编码的多肽和 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的同一性至少为 85%，更优选地至少为 90%，更优选地至少为 95%，最优选地至少为

97 - 99% 或完全相同。

在 SEQ ID NO:2 中提供的 BASB059 多肽是源自脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 ATCC13090 的 BASB059 多肽。

本发明还提供了 BASB059 多肽的免疫原性片段，即， BASB059  
5 多肽的一个连续部分 (contiguous portion)，该连续部分的免疫原性和含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多肽相同或基本上相同。这就是说，该片段(如果需要的话，与载体偶联时)能够引起识别 BASB059 多肽的免疫应答。这样的免疫原性片段包括，例如，缺少 N-末端引导序列，和 / 或跨膜区域，和 / 或 C-末端锚定区域的 BASB059 多肽。  
10 在一个优选的方面中，根据本发明的 BASB059 免疫原性片段含有基本上一个多肽的所有细胞外区域，上述多肽和 SEQ ID NO: 2 在 SEQ ID NO: 2 的全长上至少具有 85% 的同一性，更优选地至少 90% 的同一性，更优选地至少 95%，最优选地至少 97 - 99% 的同一性。

一个片段是一种多肽，该多肽的氨基酸序列与本发明的任何多肽  
15 的任何氨基酸序列的一部分，但不是全部，完全相同。对于 BASB059 多肽而言，片段可以是“独立存在的 (free-standing)”，或者是被包含在较大的多肽中，在较大的多肽中它们形成一个部分或区域，最优选地是在一个单一的较大多肽中作为单一连续区域。

优选的片段包括，例如，具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其  
20 变体的一部分的、截短的多肽，例如包括氨基和 / 或羧基端氨基酸序列的一系列连续残基。在宿主细胞中产生的，或由宿主细胞产生的降解形式的多肽也是优选的。进一步优选的是具有结构或功能特征的片段，如含有  $\alpha$ -螺旋和  $\alpha$ -螺旋形成区域， $\beta$ -平面和  $\beta$ -平面形成区域，转角和转角形成区域，卷曲或卷曲形成区域，亲水性区域，疏水性区域， $\alpha$ 两亲性区域， $\beta$ 两亲性区域，柔性区域，表面形成区域，底  
25 物结合区域和高抗原性指数区域的片段。

进一步优选的片段包括一种分离的多肽，该多肽含有的氨基酸序  
列至少有 15, 20, 30, 40, 50 或 100 个源自 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的连续氨基酸残基，或者一种分离的多肽，该多肽含有的氨基酸序  
30 列上至少有 15, 20, 30, 40, 50 或 100 个的从 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列上截短或缺失连续氨基酸残基。

通过肽段合成，本发明的多肽片段可以被用于生产相应的全长多

肽；因此，这些片段可以被用作生产本发明的全长多肽的中间产物。

特别优选的是一些变体，在这些变体中几个 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 或 1 个氨基酸以任何组合形式被替换，缺失或添加。

5 本发明的多肽或免疫原性片段可以是“成熟”蛋白的形式，或较大蛋白如前体蛋白或融合蛋白的一部分。包含一个附加的氨基酸序列经常是有利的，上述序列含有分泌或引导序列，前序列，辅助纯化的序列例如多个组氨酸残基，或一个附加的用于增加重组生产中的稳定性的序列。此外，还考虑到添加外源多肽或脂类末端或多聚核苷酸序列以增加最终分子的免疫原性潜力。

10 在一方面，本发明一般涉及经基因工程改造的可溶融合蛋白，上述可溶融合蛋白含有本发明的多肽或其片段，以及免疫球蛋白的各种亚类（IgG, IgM, IgA, IgE）的重链或轻链的恒定区域的各个部分。优选的免疫球蛋白是人 IgG，尤其是 IgG1，的重链的恒定区，融合在铰链区进行。在一个特定的实施方案中，通过引入能被凝血因子 Xa  
15 切割的切割序列，可以简单地将 Fc 部分除去。

此外，本发明涉及通过基因工程制备这些融合蛋白的方法，以及它们在药物筛选，诊断和治疗上的应用。本发明的一个更进一步的方面还涉及编码这样的融合蛋白的多聚核苷酸。融合蛋白技术的例子可以在国际专利申请号 W094/29458 和 W094/22914 中找到。

20 蛋白可以进行化学交联，或作为重组融合蛋白表达；重组融合蛋白使得其在表达系统中的生产水平比非-融合蛋白提高了。融合配偶体 (fusion partner) 可以帮助提供 T 辅助表位（免疫球蛋白融合配偶体），优选地为被人类识别的 T 辅助表位；或帮助蛋白的表达（表达增强子），使融合蛋白的表达产量比天然重组蛋白更高。优选的融合  
25 配偶体将既是免疫球蛋白融合配偶体也是表达增强配偶体。

融合配偶体包括源自 *Haemophilus influenzae*（流感嗜血杆菌）的蛋白 D 和源自流感病毒的非-结构蛋白，NS1（血凝素）。另一种融合配偶体是被称为 LytA 的蛋白。优选的是使用该分子的 C 末端部分。LytA 源自 *Streptococcus pneumoniae*（肺炎链球菌），它合成一种  
30 种 N-乙酰基-L-丙氨酸-酰胺酶，酰胺酶 LytA，（由 lytA 基因编码 {Gene, 43 (1986) 265-272 页}）一种特异性降解肽聚糖主链上某些化学键的自溶素。LytA 蛋白的 C-末端区域负责对胆碱或一些

胆碱类似物例如 DEAE 的亲水性。这个特性已被利用于发展大肠杆菌 C - LytA 表达质粒, 该质粒可用来表达融合蛋白。在蛋白质的氨基末端含有 C - LytA 片段的杂合蛋白的纯化已有描述 { 生物技术 (Biotechnology): (1992) 795 - 798 页 }。可以使用在 LytA 分子

5 5 的 C 末端从残基 178 开始的重复部分, 例如残基 188 - 305。

本发明也包括上述多肽的变体, 即与参照多肽相比进行了氨基酸保守替代的多肽, 在这样的多肽中一个残基被另一具有相似特征的残基所替代。通常这样的替代是在 Ala, Val, Leu 和 Ile 之间; Ser 和 Thr 之间; 酸性残基 Asp 和 Glu 之间; Asn 和 Gln 之间; 碱性残基 Lys

10 10 和 Arg 之间; 或芳香族残基 Phe 和 Tyr 之间进行。

本发明的多肽可以用任何适当的方法制备。这样的多肽包括分离的天然存在的多肽, 重组产生的多肽, 合成产生的多肽, 或通过这些方法的组合产生的多肽。制备这样的多肽的方法在本领域中已经众所周知。

15 15 本发明的多肽源自脑膜炎奈瑟氏球菌是最优选的, 但是, 它也可以优选地从相同分类学种属的其它生物得到。本发明的多肽也可能从, 例如, 从相同分类学科或目的生物得到。

#### 多聚核苷酸

20 20 本发明的一个目的是提供编码 BASB059 多肽的多聚核苷酸, 尤其是编码本文指定的 BASB059 多肽的多聚核苷酸。在本发明的一个特定的优选实施方案中, 多聚核苷酸包含一个编码 BASB059 多肽的区域, 该区域含有在 SEQ ID NO: 1 中列出的序列, 该序列包括一个全长基因, 或一个全长基因变体。

25 25 在 SEQ ID NO: 1 中提供的 BASB059 多聚核苷酸是源自脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 ATCC13090 的 BASB059 多聚核苷酸。

30 30 作为本发明的进一步的方面, 提供了编码和 / 或表达 BASB059 多肽和多聚核苷酸, 尤其是脑膜炎奈瑟氏球菌 BASB059 多肽和多聚核苷酸, 的分离的核酸分子, 包括, 例如, 为未加工的 RNA, 核酶 RNA, mRNA, cDNA, 基因组 DNA, B- 和 Z- DNA。本发明的进一步的实施方案包括生物学上, 诊断上, 预防上, 临床上或治疗上有用的多聚核苷酸和多肽, 和它们的变体, 以及包含上述多聚核苷酸, 多肽或变体的组合物。

本发明的另一个方面涉及分离的多聚核苷酸, 该多聚核苷酸包括

至少一个全长基因，它编码推导的具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 BASB059 多肽，它还编码与此紧密相关的多聚核苷酸及其变体。

在本发明的另一个特定的优选实施方案中，有源自脑膜炎奈瑟氏球菌的 BASB059 多肽，它包含或由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其  
5 变体组成。

利用本文提供的信息，例如在 SEQ ID NO: 1 中列出的多聚核苷酸序列，可以通过常规的克隆和筛选方法得到本发明的编码 BASB059 多肽的多聚核苷酸，例如那些用脑膜炎奈瑟氏球菌细胞作为起始材料从细菌中克隆和测序染色体 DNA 片段，然后获得全长的克隆的方法。  
10 例如，为了获得本发明的多聚核苷酸序列，如在 SEQ ID NO:1 中给出的多聚核苷酸序列，通常用源自部分序列的，放射性标记的寡核苷酸，优选为 17 聚体或更长，探测在大肠杆菌 (E. coli) 或其它一些合适的宿主中的脑膜炎奈瑟氏球菌染色体 DNA 克隆文库。然后利用严紧的杂交条件可以区别出含有与探针 DNA 相同的 DNA 的克隆。根据原始的多肽或多聚核苷酸设计测序引物，用测序引物通过杂交鉴定出单  
15 独的克隆，然后就可能在两个方向上延伸多聚核苷酸序列以确定全长基因序列。这样的测序可以方便地进行，例如，使用从质粒克隆制备得到的变性双链 DNA。适当的技术在 Maniatis, T., Fritsch, E.F. 和 Sambrook 等, (MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL), 2<sup>nd</sup>  
20 Ed. (分子克隆实验手册, 第二版); 冷泉港实验出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港 (Cold Spring Harbor), 纽约 (1989) 中有所描述(特别参见 1.90 的 Screening By Hybridization (杂交筛选) 和 13.70 的 Sequencing Denatured Doubled-Stranded DNA Template (变性双链 DNA 模板的测序))。也可以进行直接的基因组 DNA 测序以得到全长的基因序列。本发明的示例, SEQ ID NO:1 中  
25 列出的各个多聚核苷酸, 是在源自脑膜炎奈瑟氏球菌的 DNA 文库中发现的。

并且, SEQ ID NO:1 中列出的各个 DNA 序列含有一个编码蛋白的开放阅读框, 上述蛋白大致具有 SEQ ID NO: 2 中列出的氨基酸残基数, 可以通过本领域中的技术熟练人员众所周知的氨基酸残基分子量  
30 计算得到其推算出的分子量。

SEQ ID NO:1 中的多聚核苷酸在 SEQ ID NO:1 的核苷酸数 1 的起

始密码子和在核苷酸数 337 开始的终止密码子之间编码了 SEQ ID NO:2 的多肽。

在一个进一步的方面中，本发明提供了一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸含有以下部分或由以下部分组成：

5 (a) 一种多聚核苷酸序列，上述多聚核苷酸序列和 SEQ ID NO:1 在 SEQ ID NO:1 的全长上的同一性至少为 85%，更优选地至少为 90%，更优选地至少为 95%，最优选地至少为 97-99% 或完全相同。

10 (b) 一种多聚核苷酸序列，上述多聚核苷酸序列编码的多肽和 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列在 SEQ ID NO:2 的全长上的同一性至少为 85%，更优选地至少为 90%，更优选地至少为 95%，最优选地至少为 97-99% 或 100% 完全相同。

15 可以通过一种方法得到编码本发明的多肽的多聚核苷酸，包括来自脑膜炎奈瑟氏球菌以外的种属的同源物或直向同源基因，该方法包括以下步骤：用含有 SEQ ID NO:1 的序列或其片段的，或由它们组成的标记的或可检测的探针，在严紧杂交条件下（例如，温度在 45-65°C 之间，SDS 浓度在 0.1%-1% 之间）筛选适当的文库；并且分离出含有上述多聚核苷酸序列的全长的基因和 / 或基因组克隆。

20 本发明提供了一种多聚核苷酸序列，该序列在其全长上与 SEQ ID NO: 1 的编码序列（开放阅读框）完全相同。本发明还提供了一种成熟多肽或其片段的编码序列自身，或者在阅读框中与另一编码序列，如编码引导或分泌序列，前蛋白序列，或前体蛋白序列，或前前体蛋白序列的序列，在一起的一种成熟多肽或其片段的编码序列。本发明的多聚核苷酸还可能含有至少一个非编码序列，包括，例如但不限于，至少一个非编码的 5' 和 3' 序列，如转录但不翻译的序列，终止信号（如 rho 依赖性和非 rho 依赖性的终止信号），核糖体结合位点，Kozak 序列，稳定 mRNA 的序列，内含子和多聚腺苷酸化信号。多聚核苷酸序列还可以含有编码附加的氨基酸的附加编码序列。例如，可以编码便于融合多肽的纯化的标记序列。在本发明的某些实施方案中上述标记序列是 6 组氨基酸肽，上述 6 组氨基酸肽由 pQE (PQE) 载体提供，并且在 Gentz 等美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA) 86:821-824 (1989) 中有所描述，或者是 HA 肽标记 (Wilson 等，

25

30

Cell 37:767(1984) )，两种序列都可以用来纯化与其融合的多肽序列。本发明的多聚核苷酸还包括，但不限于，含有结构基因的多聚核苷酸，以及调控基因表达的与基因天然相联系的序列。

5 编码 SEQ ID NO: 2 的 BASB059 多肽的核苷酸序列可以与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 1 到 336 包含的多肽编码序列相同。替代地，它可以是一段由于遗传密码的冗余性（简并性）而同样编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的序列。

10 此处所用的术语“编码多肽的多聚核苷酸”包括一些多聚核苷酸，上述多聚核苷酸包括编码本发明的多肽的序列，上述多肽特别指细菌多肽，更特别地指具有 SEQ ID NO: 2 中列出的氨基酸序列的脑膜炎奈瑟氏球菌 BASB059 多肽。该术语还包括含有编码上述多肽的单一连续区域或不连续区域（例如，多聚核苷酸被整合噬菌体，整合插入序列，整合载体序列，整合转位子序列所中断，或者由于 RNA 编辑或基因组 DNA 重排所中断）以及附加区域的多聚核苷酸，上述附加区域也可能含有编码和 / 或非编码序列。

15 本发明进而涉及此处描述的多聚核苷酸的变体，它编码具有 SEQ ID NO: 2 的推导的氨基酸序列的多肽的变体。本发明的多聚核苷酸的片段可以被用来，例如，合成本发明的全长多聚核苷酸。

20 进一步特别优选的实施方案是编码 BASB059 变体的多聚核苷酸，上述变体具有 SEQ ID NO: 2 的 BASB059 多肽的氨基酸序列，并且其中几个，一些，5 到 10 个，1 到 5 个，1 到 3 个，2 个，1 个或无氨基酸残基以任何组合形式被替换、修饰、缺失、和 / 或添加。其中特别优选的是不改变 BASB059 多肽的特性和活性的沉默替换、添加和缺失。

25 本发明进一步优选的实施方案是在其全长上和编码 BASB059 多肽的多聚核苷酸具有至少 85% 的同一性的多聚核苷酸，以及与这样的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸，上述 BASB059 多肽具有 SEQ ID NO: 2 中列出的氨基酸序列。在这一点上，与同一多聚核苷酸在全长上具有至少 90% 同一性的多聚核苷酸是特别优选的，在这些特别优选的多聚核苷酸中，那些具有至少 95% 同一性的是尤其优选的。进而，在那些具有 95% 同一性的多聚核苷酸中，具有至少 97% 同一性的那些是高度优选的，其中那些至少 98% 和至少 99% 的是特别高度优选的，而具

有至少 99% 的是更为优选的。

所编码的多肽基本上保留了与 SEQ ID NO: 1 的 DNA 所编码的成熟多肽一样的生物学功能或活性的多聚核苷酸为优选的实施方案。

根据本发明的某些优选的实施方案，提供的多聚核苷酸和  
5 BASB059 多聚核苷酸序列，如 SEQ ID NO:1 中的那些多聚核苷酸序列，杂交，尤其是在严紧的条件下杂交。

本发明进一步涉及与本文提供的多聚核苷酸序列杂交的多聚核苷酸。在这一点上，本发明尤其涉及在严紧条件下与本文描述的多聚核苷酸杂交的多聚核苷酸。本文使用的术语“严紧条件”和“严紧杂交条件”的意思为只有在序列间的同一性至少为 95%，优选地至少为  
10 97% 时才会发生的杂交。严紧杂交条件的特定例子为在含有 50% 甲酰胺，5×SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)，50mM 磷酸钠 (pH7.6)，5×Denhardt's 溶液，10%葡聚糖硫酸酯和 20 微克/ml 变性的，剪切的鲑精 DNA 的溶液中 42°C 温育过夜，然后在大约 65°C 在 0.1×SSC  
15 中洗涤杂交支持物。杂交和洗涤的条件是众所周知的，并且在 Sambrook, 等, 分子克隆：实验手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, 冷泉港, N.Y., (1989) 中有示例，尤其是其第 11 章。也可以用本发明提供的多聚核苷酸序列进行溶液杂交。

20 本发明还提供了一种多聚核苷酸，该多聚核苷酸含有，或由一段多聚核苷酸序列组成，上述多聚核苷酸序列是通过筛选含有 SEQ ID NO:1 中列出的多聚核苷酸序列的完整基因的适当文库，并且分离上述多聚核苷酸序列而得到的，上述筛选是通过使用具有上述在 SEQ ID NO: 1 中列出的多聚核苷酸序列或其片段的序列的探针，在严紧的杂交  
25 条件下进行的。可用于获得这样的多聚核苷酸的片段包括，例如，在本文其它处充分描述的探针和引物。

作为本文别处所讨论的关于本发明的多聚核苷酸的分析，例如，本发明的多聚核苷酸，可以被用作 RNA, cDNA 和基因组 DNA 的杂交探针以分离编码 BASB059 的全长 cDNAs 和基因组克隆，以及分离和  
30 BASB059 基因有高同一性，特别是高序列同一性，的其它基因的 cDNA 和基因组克隆。这样的探针通常将含有至少 15 个核苷酸残基或碱基对。优选地，这样的探针将含有至少 30 个核苷酸残基或碱基对并且

可以有至少 50 个核苷酸残基或碱基对。特别优选的探针将含有至少 20 并且少于 30 个核苷酸残基或碱基对。

通过用 SEQ ID NO: 1 提供的 DNA 序列合成寡核苷酸探针进行筛选，可以分离 BASB059 基因的编码区域。然后用标记的具有与本发明的基因序列互补的序列的寡核苷酸筛选 cDNA，基因组 DNA 或 mRNA 文库，从而确定探针与文库的哪些成员杂交。

有几种获得全长 DNA，或延伸短 DNA 的，并且为本领域的技术熟练人员所共知的方法，例如那些基于快速扩增 cDNA 末端 (Rapid Amplification of cDNA ends, RACE) 的方法 (参见，例如，Rohman, 等, PNAS USA 85: 8998-9002, 1998)。最近的该技术的改造，例如，以 Marathon™ 技术 (Clontech Laboratories Inc.) 作为例子，已经显著简化了较长的 cDNA 的搜索。在 Marathon™ 技术中，从选定的组织中提取得到的 mRNA 被制备成 cDNA，并且在两端被链接上‘匹配’序列。然后用基因特异的和匹配特异的寡核苷酸引物共同进行核酸扩增 (PCR) 以扩增 DNA “缺失” 的 5’ 末端。利用“嵌套”引物反复进行 PCR 反应，上述“嵌套”引物即被设计用来在扩增产物中退火的引物 (通常匹配特异的引物进一步将匹配序列的 3’ 端退火，基因特异的引物将所选定的基因序列的 5’ 端退火)。然后可以通过 DNA 测序分析上述反应的产物，全长 DNA 的构建可以通过直接把产物与已存在的 DNA 连接以产生全长序列，或者利用新的序列信息设计 5’ 引物单独进行全长的 PCR。

如本文在涉及多聚核苷酸的分析中所进一步讨论的，本发明的多聚核苷酸和多肽可以被用作，例如，发现疾病，尤其是人类疾病，的治疗和诊断方法的研究试剂和材料。

作为源自序列 SEQ ID NO: 1-2 的寡聚核苷酸的本发明的多聚核苷酸可以用于本文所描述的方法中，但优选地用于 PCR，以确定本文所鉴定的多聚核苷酸是否在被感染组织的细菌中被部分或全部转录。已经认识到这样的序列也可用于诊断该病原体所达到的感染阶段和感染类型。

本发明也提供编码多肽的多聚核苷酸，该多肽是成熟蛋白加上附加的氨基或羧基-末端氨基酸，或成熟多肽内部的氨基酸 (例如，当成熟形式具有一条以上的肽链时)。这样的序列可以在蛋白从前体到

成熟形式的过程中起作用，可以允许蛋白运输，可以延长或缩短蛋白的半衰期，或可以便于蛋白在分析或生产中的操作，等等。通常在体内，附加的氨基酸可以被细胞的酶加工而离开成熟蛋白。

对于本发明的每个多聚核苷酸，本发明提供了与之互补的多聚核苷酸。优选地，这些互补的多聚核苷酸是完全与每个和它们互补的多聚核苷酸完全互补的。

由上述多肽的成熟形式与一个或多个前序列融合而成的前体蛋白可以是该多肽的无活性形式。当前序列被除去时，这种无活性的前体通常被激活。一些或全部的前序列可以在激活之前被除去。通常，这样的前体被称为前体蛋白。

在描述本发明的某些多聚核苷酸时除了常规的 A, G, C, T/U 核苷表示法外，也可以用术语“N”。“N”表示在 DNA 或 RNA 序列的该指定位置可以为四个 DNA 或 RNA 核苷中的任何一个，但是当以下情况是优选时除外：当某个核苷酸与相邻位置的核苷酸一起，在正确的阅读框中将导致在这样的阅读框中产生提前终止密码子效应时，N 不是那个核苷酸。

总而言之，本发明的多聚核苷酸可以编码成熟蛋白，成熟蛋白加上引导序列（将被称为前蛋白），成熟蛋白的前体，上述前体具有一个或多个并非前蛋白或前前体蛋白的引导序列的前体序列，前前体蛋白是前体蛋白的前体，它具有引导序列和一个或多个前体序列，上述前体序列和引导序列通常在加工步骤中被除去，产生上述多肽的活性成熟形式。

根据本发明的一个方面，提供了本发明的多聚核苷酸在治疗或预防上的应用，特别是在基因免疫上的应用。

本发明的多聚核苷酸在基因免疫上的应用将优选地使用适当的输送方法，例如直接将质粒 DNA 注射入肌肉（Wolff 等，人类分子遗传学（Hum Mol Genet）（1992）1:363，Manthorpe 等，人类基因治疗（Hum. Gene Ther）（1983）4: 419），输送 DNA 和特定蛋白载体的复合物（Wu 等，生物化学杂志（J Biol Chem.）（1989）264: 16985），将 DNA 与磷酸钙共沉淀（Benvenisty & Reshef, PNAS USA,（1986）83: 9551），将 DNA 包入各种形式的脂质体中（Kaneda 等，Science（1989）243:375），颗粒轰击（Tang 等，Nature（1992）356:

152, Eisenbrau 等, DNA 细胞生物学 (DNA Cell Biol) (1993) 12: 791) 和用克隆的反转录病毒载体进行体内感染 (Seeger 等, PNAS USA (1984) 81:5849)。

载体, 宿主细胞, 表达系统

- 5 本发明还涉及含有本发明的一种或几种多聚核苷酸的载体, 用本发明的载体经遗传工程得到的宿主细胞以及通过重组技术生产本发明的多肽。利用源自本发明的 DNA 构建体的 RNA 也可以通过无细胞翻译系统生产这样的蛋白质。

10 通过本领域中的技术熟练人员众所周知的方法可以从基因工程改造的含有表达系统的宿主细胞制备本发明的重组多肽。因此, 在更进一步的一个方面中, 本发明涉及含有本发明的一种或几种多聚核苷酸的表达系统, 涉及用这样的表达系统进行基因工程改造的宿主细胞, 并涉及通过重组技术生产本发明的多肽。

15 为了本发明的多肽的重组生产, 可以对宿主细胞进行基因工程改造以使其整合表达系统或表达系统的组成部分, 或本发明的多聚核苷酸。可以通过许多常规的实验室手册中描述的方法将多聚核苷酸导入到宿主细胞中, 例如 Davis 等, 分子生物学基本方法 (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY), (1986) 和 Sambrook, 等, 分子克隆: 实验手册 (MOLECULAR CLOINING: A LABORATORY MANUAL), 第二版, 冷泉港实验出版社, 冷泉港, N. Y. (1989), 例如磷酸钙转染, DEAE-葡聚糖介导的转染, 转位, 显微注射, 阳离子脂类介导的转染, 电穿孔, 转导, 刮棒负载 (scrape loading), 弹道法导入 (ballistic Introduction) 和感染。

25 适当宿主的代表例子包括细菌细胞, 如链球菌, 葡萄球菌, 肠球菌, 大肠杆菌, 链霉菌, 蓝细菌, *Bacillus subtilis* (枯草杆菌), *Moraxella catarrhalis* (狭鼻摩拉克氏菌), *Haemophilus influenzae* (嗜血流感杆菌) 和 *Neisseria meningitidis* (脑膜炎奈瑟氏球菌) 的细胞, 真菌细胞如酵母, *Kluveromyces* (克鲁维酵母), *Saccharomyces* (啤酒酵母), *basidiomycete* (担子菌类), *Candida albicans* (白色丝酵母) 和 *Aspergillus* (曲菌属) 的细胞; 昆虫细胞如果蝇 S2 和草地夜蛾 Sf9 细胞; 动物细胞如 CHO, COS, Hela, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 和 Bowes 黑色素瘤细胞; 植物细胞如裸子植

30

物和被子植物的细胞。

许多种表达系统可以用于生产本发明的多肽。这样的载体其中包括源自染色体的，附加体的和病毒的载体，等等，例如，源自细菌质粒，噬菌体，转位子，酵母附加体，插入元件，酵母染色体元件的载体和源自病毒，如杆状病毒，乳多空病毒如 SV40，牛痘病毒，腺病毒，禽痘病毒，假狂犬病病毒，细小核糖核酸病毒，反转录病毒和 $\alpha$ -病毒的载体以及来自它们的组合的载体，如源自质粒和噬菌体遗传元件的载体，如粘粒载体和噬菌体粒载体。表达系统构建体可以含有调节并导致表达的调控区域。通常，任何适于在宿主细胞中维持，扩增或表达多聚核苷酸和/或表达多肽的系统或载体都可以在这点上用于表达。可以通过多种众所周知的常规方法中的任何一种将适当的 DNA 序列插入到表达系统中，上述方法的例子如，例如，Sambrook 等，分子克隆，实验手册 (MOLECULAR CLONNING, A LABORATORY MANUAL) (上文) 中所列出的方法。

为了将翻译的蛋白分泌到内质网腔，到周质间隙或到细胞外环境，在真核生物重组表达系统中可以将适当的分泌信号整合到表达的多肽中。这些信号可以是上述多肽的内源信号或外源信号。

可以用众所周知的方法从重组细胞培养物回收和纯化本发明的多肽，上述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀，酸抽提，阴离子或阳离子交换层析，磷酸纤维素层析，疏水作用层析，亲和层析，羟磷灰石层析和植物凝集素层析。最优选地，用金属离子亲和层析 (Ion metal affinity chromatography, IMAC) 进行纯化。当多肽在细胞内合成，分离和/或纯化过程中变性时，可以利用众所周知的蛋白质重折叠技术重新生成活性构象。

表达系统也可以是重组的活微生物，例如病毒或细菌。感兴趣的基因可以被插入到活的重组病毒或细菌的基因组中。上述活载体的接种和体内感染将导致抗原在体内的表达并诱导免疫应答。用于上述目的的病毒和细菌如：痘病毒，(例如牛痘病毒，禽痘病毒，金丝雀痘病毒)  $\alpha$ -病毒 (新培斯病毒，Semliki 森林病毒，委内瑞拉马脑炎病毒)，腺病毒，腺相关病毒，小核糖核酸病毒 (脊髓灰质炎病毒，鼻病毒)，疱疹病毒 (带状疱疹病毒，等等)，利斯特菌，沙门氏菌，志贺氏菌，奈瑟氏菌，卡介苗。这些病毒和细菌可以是毒性的，或者

是经过多种方法弱化以得到活疫苗。这样的活疫苗也构成了本发明的一部分。

#### 诊断, 预测, 血清型和突变分析

本发明还涉及将本发明和 BASB059 的多肽多聚核苷酸用作诊断试剂的用途。对真核生物, 特别是哺乳动物, 尤其是人类, 体内的 BASB059 多聚核苷酸和 / 或多肽的检测将提供诊断疾病, 确定疾病的阶段或确定感染生物体对药物的反应的方法。可以通过多种众所周知的技术和本文提供的方法在核酸或氨基酸水平上检测真核生物, 特别是对哺乳动物, 尤其是人类, 特别是那些感染了或易于被含有 BASB059 基因或蛋白的生物感染的人。

可以从被怀疑感染了和 / 或被感染的个体的身体物质获得用于预测, 诊断或其它分析的多肽或多聚核苷酸。源自任何这些来源的多聚核苷酸, 特别是 DNA 或 RNA, 可以被直接用来检测, 或可以在分析之前通过 PCR 或任何其它扩增技术用酶进行扩增。RNA, 特别是 mRNA, cDNA 和基因组 DNA 也可以以相同的方式被应用。利用扩增, 可以通过分析个体体内存在的感染或驻留生物体的选定多聚核苷酸的基因型, 对上述生物体的物种和菌株的特征进行鉴定。通过将扩增产物和选自相关生物体的参照序列的基因型进行比较而改变扩增产物的大小, 可以检测缺失和插入, 上述相关生物体优选地为同一属的不同种或同一种的不同菌株。通过扩增 DNA 与标记的 BASB059 多聚核苷酸序列的杂交可以鉴定定点突变。可以通过 DNA 酶或 RNA 酶分别对 DNA 或 RNA 的水解, 或通过检测融解温度或复性动力学的差异可以将完好匹配或明显匹配的序列和不完好匹配或更明显不匹配的双链体分开。也可以通过比较多聚核苷酸片段与参照序列在凝胶上的电泳迁移性质的改变而检测多聚核苷酸序列的差异。这可以在存在或不存在变性剂的条件下进行。也可以通过直接的 DNA 或 RNA 测序检测多聚核苷酸的差异。参见, 例如, Myers 等, Science, 230:1242 (1985)。也可以通过核酸酶保护分析, 如 RNase, V1 和 S1 保护分析, 或通过化学裂解的方法揭示特定部位的序列变化。参见, 例如, Cotton 等, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 85: 4397-4401 (1985)。

在另一个实施方案中, 可以构建含有 BASB059 核苷酸序列或者其

片段的寡聚核苷酸探针阵列，以便有效地筛选，例如，基因突变，血清型，分类学的分类或鉴定。阵列技术方法是众所周知的并且具有广泛的可应用性，并可以被用于解决分子遗传学中的许多问题，包括基因表达，遗传连锁和遗传变异性（参见，例如，Chee 等，Science, 5 274:610(1996)）。

因此，在另一方面，本发明涉及一种诊断试剂盒，该诊断试剂盒含有：

(a) 本发明的多聚核苷酸，优选地为 SEQ ID NO:1 中的核苷酸序列，或其片段；

10 (b) 与 (a) 中的核苷酸序列互补的核苷酸序列；

(c) 本发明的多肽，优选地为 SEQ ID NO:2 中的多肽或其片段；或

(d) 针对本发明的多肽的抗体，优选地为针对 SEQ ID NO:2 中的多肽的抗体。

15 要明白在所有的这样的试剂盒中，(a)、(b)、(c)或(d)可以包括重要的成分。这样一种试剂盒在其中诊断一种疾病或情疑一种疾病中是有用途的。

本发明还涉及本发明的多聚核苷酸作为诊断试剂的应用。对与疾病或病原性相关的本发明的多聚核苷酸，优选地为 SEQ ID NO:1，的  
20 突变形式的检测将提供一种诊断工具，这种诊断工具将增加，或定义，一种疾病的诊断，疾病进程的预测，疾病阶段的确定，或对一种疾病的易感性，上述疾病是由于该多聚核苷酸的表达不足，表达过量或表达改变造成的。可以通过各种技术，例如本文其它处所描述的技术，在多聚核苷酸水平上对在这样的多聚核苷酸上带有突变的生物，  
25 尤其是传染性的生物进行检测。

也可以用各种技术，例如，通过血清型分型，在多聚核苷酸或多肽水平上对源自一种生物体的细胞进行检测，上述生物体在本发明的多聚核苷酸和/或多肽上含有突变或多态性（等位基因变种）。例如，可以用 RT-PCR 检测 RNA 中的突变。尤其优选的是联合使用 RT-PCR  
30 和自动化的检测系统，如，例如，GeneScan。RNA，cDNA 或基因组 DNA 也可以被用于相同的目的，PCR。作为例子，与编码 BASB059 多肽的多聚核苷酸互补的 PCR 引物可以被用于鉴定和分析突变。

本发明进而提供了在 5' 和 / 或 3' 端除去 1, 2, 3 或 4 个核苷酸的引物。这些可以被用于扩增从源自个体的样品, 如身体物质, 分离得到的 BASB059DNA 和 / 或 RNA。上述引物可以被用于扩增从被感染的个体分离得到的多聚核苷酸, 以便该多聚核苷酸可以进行多种技术的分析以便阐明该多聚核苷酸的序列。通过这种方法可以检测多聚核苷酸上的突变并用于诊断和 / 或预测感染, 或感染的阶段或进程, 或对感染物质进行血清学分型和 / 或分类。

本发明进而提供了诊断疾病的方法, 上述疾病优选地为细菌感染, 更优选地为由脑膜炎奈瑟氏球菌导致的感染, 上述方法包括确定源自个体的样品, 如身体物质, 中具有 SEQ ID NO:1 序列的多聚核苷酸的表达水平升高了。可以利用本领域中众所周知的多聚核苷酸定量方法的任何一种测量 BASB059 多聚核苷酸表达的升高或降低, 上述多聚核苷酸定量方法如, 例如, 扩增, PCR, RT-PCR, RNase 保护, Northern 印迹法, 分光光度法和其它杂交方法。

此外, 通过检测 BASB059 多肽相对于正常对照组织样品过量的表达, 根据本发明的诊断分析可以被用于, 例如, 检测感染的存在。可以用来确定源自宿主的样品, 如身体物质, 中 BASB059 多肽的水平。分析技术对于本领域中具有一定技术的人员是众所周知的。这样的分析方法包括放射性免疫分析, 竞争结合分析, Western 印迹分析, 抗体夹心法分析, 抗体检测和 ELISA 分析。

本发明的多聚核苷酸可以被用作多聚核苷酸阵列的组成成分, 上述阵列优选地为高密度的阵列或网格。这样的高密度阵列对于诊断和预测目的而言是特别有用的。例如, 一组点, 每个含有不同的基因, 并进而含有本发明的一种或几种多聚核苷酸; 利用源自或从身体样品得到的探针, 这样的一组点可以被用来探测个体中特定多聚核苷酸序列或相关序列的存在例如利用杂交或核酸扩增。这样的存在可能意味着存在病原体, 特别是脑膜炎奈瑟氏球菌, 并且可以用于诊断和 / 或预测疾病或疾病的进程。含有 SEQ ID NO:1 中的多聚核苷酸序列的许多变体的网格是优选的。含有编码 SEQ ID NO: 2 中的多肽序列的多聚核苷酸序列的变体的网格也是优选的。

#### 抗体

本发明的多肽和多聚核苷酸或它们的变体, 或表达它们的细胞,

可以被用作免疫原以生产分别对这样的多肽或多聚核苷酸具有免疫特异性的抗体。

在本发明的某些优选的实施方案中，还提供了针对 BASB059 多肽或多聚核苷酸的抗体。

5 可以利用常规方法，通过对动物，优选地为非人类动物，施用本发明的多肽和/或多聚核苷酸，或两者之一或两者的带表位的片段，或两者之一或两者的类似物，或表达或两者之一或两者的细胞，来得到针对本发明的多肽或多聚核苷酸的抗体。对于单克隆抗体的制备，可以使用本领域中已知的任何通过连续细胞系培养物产生抗体的技术。例子包括各种技术，如 Kohler, G. 和 Milstein, C., Nature  
10 256:495-497(1975); Kozbor 等，今日免疫学 (Immunology Today) 4: 72 (1983); Cole 等，Pg. 77-96 In 单克隆抗体和癌症治疗 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY), Alan R. Liss, Inc. (1985) 中的技术。

15 生产单链抗体的技术 (美国专利第 4, 946, 778 号) 可以被采用来生产针对本发明的多肽或多聚核苷酸的单链抗体。同时，转基因小鼠，或其它生物体或其它动物，如其它哺乳动物，可以被用来表达对本发明的多肽或多聚核苷酸具有免疫特异性的人源化抗体。

替代地，也可以用噬菌体展示技术选择对本发明的多肽具有结合  
20 活性的抗体基因，该抗体基因或者源自原始文库 (naive library) 或源自 PCR 扩增的淋巴细胞 V-基因库，上述淋巴细胞源自经筛选具有抗-BASB059 抗性的人类 (McCafferty, et al., (1990), Nature 348, 552-554; Marks, 等, (1992) 生物技术 (Biotechnology) 10, 779-783)。这些抗体的亲和性也可以通过，例如，链改组得以提高  
25 (Clackson 等, (1991) Nature 352: 628)。

以上描述的抗体也可以被用来分离或鉴定表达本发明的多肽或多聚核苷酸的克隆，用来通过，例如，亲和层析纯化上述多肽或多聚核苷酸。

因此，抗 BASB059 多肽或 BASB059 多聚核苷酸的抗体等等可以被  
30 用来治疗感染，特别是细菌感染。

多肽变体，包括抗原性的，表位的或免疫学上的等效变体构成了本发明的一个特定的方面。

优选地，抗体或其变体被修饰使其在个体中具有较少的免疫原性。例如，如果该个体是人，最优选地抗体可以被“人源化”，在人源化抗体中源自杂交瘤的抗体的一个或几个互补决定区被转移到人的单克隆抗体中，例如，如 Jones 等(1986)，Nature 321, 522-525  
5 中，或 Tempest 等，(1991)生物技术 (Biotechnology) 9, 266-273 中所描述。

#### 拮抗剂与激动剂 - 分析和分子

本发明的多肽和多聚核苷酸可以被用于评测小分子底物与配基和，例如，细胞，无细胞制备物，化学文库和天然产物混合物的结合。  
10 这些底物和配基可以是天然底物和配基或可以是结构或功能类似物。参见，例如，Coligan 等，免疫学中的通用方法 (Current Protocols In Immunology) 1(2): 第 5 章 (1991)。

筛选方法可以通过与待选化合物的相关的直接或间接标记简单地测量待选化合物与多肽或多聚核苷酸，或与带有该多肽或多聚核苷酸的膜或细胞，或与该多肽的融合蛋白的结合。替代地，该筛选方法可以与标记的竞争物竞争。进而，利用对于含有上述多肽或多聚核苷酸的细胞适当的检测系统，这些筛选方法可以测试待选化合物是否导致由于该多肽或多聚核苷酸的激活或抑制而产生的信号。通常在存在已知的激动剂的情况下检测激活的抑制剂，并观察在待选化合物存在的情况下激动剂的激活效应。具有组成型活性的多肽和/或组成型表达的  
15 的多肽和多聚核苷酸可以被用于在无激动剂或抑制剂的情况下筛选反激动剂或抑制剂的方法中；上述筛选是通过，根据具体情况，测定待选化合物是否导致对上述多肽或多聚核苷酸的激活的抑制。进而，筛选方法可以简单地含有以下步骤：将待选化合物与含有本发明的多肽或多聚核苷酸的溶液混合以形成混合物，测量混合物中的  
20 BASB059 多肽和/或多聚核苷酸的活性，并将混合物中的 BASB059 多肽和/或多聚核苷酸的活性与标准进行比较。融合蛋白，如本文先前所描述的 Fc 部分和 BASB059 多肽的融合蛋白，也可以被用于鉴定本发明的多肽的拮抗剂，以及鉴定系统发生和/或功能上相关的多肽的高通量筛选检测 (参见 D. Bennett 等，分子识别杂志 (J Mol. Recognition), 8:52--58(1995); 和 K. Johanson 等，生物化学杂志 (J Biol Chem), 270 (16):9459-9471(1995))。  
25  
30

与本发明的多肽结合和/或相互作用的多聚核苷酸，多肽和抗体也可以被用于设计筛选方法，上述筛选方法用于检测加入的化合物对 mRNA 和/或多肽在细胞中的生成的影响。例如，通过本领域中众所周知的方法用单克隆或多克隆抗体建立 ELISA 方法，以测量分泌的或与细胞相关的多肽的水平。这可以用来在适当的处理过的细胞或组织中寻找可能抑制或增强多肽生成的物质（也分别称为拮抗剂或激动剂）。

本发明也提供了一种筛选化合物的方法，以鉴定那些增强（激动剂）或阻断（拮抗剂）BASB059 多肽或多聚核苷酸的作用的化合物，特别是那些具有抑菌和/或杀菌作用的化合物。筛选的方法可能涉及高通量技术。例如，为了筛选激动剂或拮抗剂，将一种合成的反应混合物，一种含有 BASB059 多肽的细胞区室，例如膜，细胞外膜或细胞壁，或任何上述制备物与该多肽的标记底物或配基在有或无待选分子存在的情况下温育，上述待选分子可能是 BASB059 的激动剂或拮抗剂。待选分子激活或拮抗 BASB059 多肽的能力是通过标记配基的结合的下降，或通过从这样的底物生成的产物的量的降低来反映的。没有理由地（*gratuitously*）结合，即，不诱导 BASB059 多肽的效应，的分子很可能是很好的拮抗剂。结合得很好并且，根据具体情况，提高从底物生成产物的速率，增强信号转导或增强化学通道活性的分子是激动剂。可以通过使用报告系统增强对，根据具体情况，从底物生成产物的速率，或信号转导水平或化学通道活性水平的检测。在这方面有用的报告系统包括，但不限于，本领域中已知的比色系统，被转化为产物的标记底物，对 BASB059 多聚核苷酸或多肽活性的变化响应的报告基因以及结合分析。

另一个 BASB059 激动剂检测方法的例子是竞争检测法，该方法将 BASB059 和可能的激动剂与 BASB059-结合分子，重组的 BASB059 结合分子，天然底物或配基，或底物或配基的类似物混合在一起，在适当的条件下检测竞争性抑制。BASB059 可以被标记，例如通过放射性或比色化合物，以便精确地确定结合到结合分子的，或转化成产物的 BASB059 分子数，以便评价可能的拮抗剂的效价。

可能的拮抗剂其中包括有机小分子，肽，多肽和抗体，等等；上述抗体与本发明的多聚核苷酸和/或多肽结合，从而抑制或消除多聚

核苷酸或多肽的活性或表达。可能的拮抗剂也可以是有机小分子，肽，多肽，如紧密相关蛋白，或在结合分子上结合相同位点的抗体；例如一个结合分子，它不诱导 BASB059 所诱导的活性，从而通过排斥 BASB059 多肽和 / 或多聚核苷酸的结合，阻止了 BASB059 多肽和 / 或多聚核苷酸的作用或表达。

可能的拮抗剂包括与多肽的结合位点结合并占据了结合位点的小分子，它阻止了细胞结合分子的结合，从而阻止了正常的生物学活性。小分子的例子包括但不限于有机小分子，肽或类似肽的分子。其它可能的拮抗剂包括反义分子（这些分子的描述参见 Okano, 神经化学杂志 (J. Neurochem.) 56:560 (1991); 作为基因表达的反义抑制剂的寡脱氧核苷酸 (OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION), CRC Press, Boca Raton, FL (1988)）。优选的可能拮抗剂包括涉及 BASB059 变体的化合物。

在一个更进一步的方面，本发明涉及基因工程改造的可溶性融合蛋白，该融合蛋白包含本发明的多肽或其片段，以及各种亚类的免疫球蛋白 (IgG, IgM, IgA, IgE) 的重链和轻链的恒定区的各个部分。优选的免疫球蛋白是人类 IgG, 特别是 IgG1 的重链恒定区，其中融合在铰链区进行。在一个特定的实施方案中，通过引入可以被凝血因子 Xa 所切割的切割序列，可以简单地将 Fc 部分除去。进而，本发明涉及通过基因工程制备这些融合蛋白的方法，以及它们在药物筛选，诊断和治疗上的应用。本发明的一个更进一步的方面还涉及编码这样的融合蛋白的多聚核苷酸。融合蛋白技术的例子可以在国际专利申请号 W094 / 29458 和 W094 / 22914 中找到。

本文提供的各个多聚核苷酸序列可以被用于寻找和开发抗菌的化合物。它们所编码的蛋白表达后可以被用作筛选抗菌药物的靶。此外，编码所编码的蛋白的氨基末端区的多聚核苷酸序列，或相应 mRNA 的 Shine - Delgarno 序列或其它有利于翻译的序列都可以被用来构建反义序列以控制感兴趣的编码序列的表达。

本发明还提供了本发明的多肽，多聚核苷酸，激动剂或拮抗剂在干扰一种或几种病原体与真核宿主，优选地为哺乳动物宿主，间的初始物理相互作用上的应用，上述初始物理相互作用造成了感染的结果。具体而言，本发明的上述分子可以被用于：防止细菌，特别是革

兰氏阳性和 / 或革兰氏阴性细菌，对真核生物，优选地为哺乳动物，埋藏装置上的或伤口的细胞外基质蛋白的粘附；阻断真核生物，优选地为哺乳动物，的细胞外基质蛋白和介导组织损伤的细菌 BASB059 蛋白之间的细菌粘附，和 / 或；阻断感染的疾病发生的正常进行，上述感染是由植入埋藏装置或其它外科技术以外的原因导致的。

根据本发明的另一方面，提供了 BASB059 激动剂和拮抗剂，优选地为抑菌或杀菌的激动剂或拮抗剂。

本发明的激动剂或拮抗剂可以被用于，例如，防止、抑制和 / 或治疗疾病。

10 在一个进一步的方面，本发明涉及本发明的多肽的拟表位 (mimotopes)。拟表位是一段肽序列，它和天然肽足够类似 (序列上或结构上)，从而能被识别该天然肽的抗体所识别；或者当它与适当的载体偶联时能引起识别天然肽的抗体。

15 可以通过添加、缺失或替换选定的氨基酸来设计用于特定目的的肽拟表位。因此，可以对多肽进行修饰以便于与蛋白载体偶联。例如，对于一些化学偶联方法而言包括一个末端半胱氨酸是合乎需要的。此外，对于与蛋白载体偶联的肽而言，含有一个远离肽的偶联末端的疏水末端，以便上述肽的自由未偶联末端保持与载体蛋白的表面相连，这可能是合乎需要的。这样该肽段呈现的构象最接近于当它处于整体天然蛋白环境时的构象。例如，可以改变肽段使其含有 N-末端半胱氨酸和 C-末端疏水酰胺化的尾部。替代地，可以添加或替代一个或多个氨基酸的 D-立体化学异构体以得到有利的衍生物，例如，以增强上述肽的稳定性。

25 替代地，可以通过诸如噬菌体展示技术 (EP 0 552 267 B1) 这样的技术，利用自身能够结合本发明的多肽的抗体鉴定肽拟表位。该技术产生大量的模拟天然肽段结构的肽序列，并且因此能够结合抗天然肽的抗体，但它们自身不一定和该天然肽具有明显的序列同源性。

### 疫苗

30 本发明的另一方面涉及在个体中，特别是哺乳动物中，优选地为人类中，诱导免疫应答的方法，该方法包括用 BASB059 多聚核苷酸和 / 或多肽，或其片段或变体，对个体接种，上述接种足以产生抗体和

/或 T 细胞免疫应答以保护上述个体免受感染，特别是细菌感染，尤其特别是脑膜炎奈瑟氏球菌感染。还提供了一些方法，其中这样的免疫应答减慢了细菌的复制。本发明的另一方面涉及在个体中诱导免疫应答的方法，该方法包括为了诱导免疫应答而往上述个体输送直接表达 BASB059 多聚核苷酸和 / 或多肽，或其片段或变体的核酸载体、序列或核酶，以便在体内直接表达 BASB059 多聚核苷酸和 / 或多肽，或其片段或变体，从而例如产生抗体和 / 或 T 细胞免疫应答，包括，例如，产生细胞因子的 T 细胞或细胞毒性 T 细胞，从而保护上述个体免受疾病，不论上述疾病是否已经在上述个体中发生。施用上述基因的一个例子是将其包被在颗粒或其它东西上，从而加速其进入所期望的细胞。这样的核酸载体可以包括 DNA，RNA，核酶，修饰的核酸，DNA / RNA 杂合体，DNA - 蛋白复合物或 RNA - 蛋白复合物。本发明的一个进一步的方面涉及一种免疫组合物，当该组合物被引入到能够被诱导免疫应答的个体，优选地为人类，时在这样的个体中诱导针对 BASB059 多聚核苷酸和 / 或由其编码的多肽的免疫应答，其中上述组合物含有重组的 BASB059 多聚核苷酸和 / 或由其编码的多肽，和 / 或含有编码和表达上述 BASB059 多聚核苷酸，其编码的多肽，或其它本发明的多肽的抗原的 DNA 和 / 或 RNA。上述免疫应答可以被用于治疗或预防用途，并且可以是抗体免疫和 / 或细胞免疫的形式，如 CTL 或 CD4+ T 细胞引起的细胞免疫。

BASB059 多肽或其片段可以与辅助蛋白或化学部分融合，上述辅助蛋白或化学部分自身可以产生也可以不产生抗体，但它们能稳定上述第一蛋白并且产生具有抗原性和 / 或免疫原性的，优选地具有保护特性的，融合的或修饰的蛋白。这样融合的重组蛋白优选地进一步含有一个免疫原性的辅助蛋白，如源自嗜血流感杆菌 (*Haemophilus Influenzae*) 的脂蛋白 D，谷胱氨肽 - S - 转移酶 (GST) 或  $\beta$  - 糖苷酶，或任何其它相对较大的，能够稳定该蛋白并有利于其生产和纯化的辅助蛋白。此外，在接受该蛋白的生物体的免疫系统提供一种普遍的刺激的意义，该辅助蛋白可以作为一种佐剂。该辅助蛋白可以附接到第一蛋白的氨基或羧基一末端上。

在根据本发明的疫苗组合物中，BASB059 多肽和 / 或多聚核苷酸、或片段、或拟表位、或其变体可以存在于一个载体中，如以上描

述的活的重组载体，例如，活的细菌载体。BASB059 多肽的非活载体，例如，细菌外膜囊泡或“小泡 (blebs)”也是适合的。OM 小泡是源自革兰氏阴性菌两层膜的外膜，并且有报道表明存在于许多革兰氏阴性细菌中 (Zhou, L 等, 1998. 微生物学快报 (FEMS Microbiol. Lett.) 5 163:223-228)，包括 *C. trachomatis* 和 *C. psittaci*。报道表明能产生水泡的细菌病原体的不完全名单还包括: *Bordetella pertussis* (百日咳博德特氏菌)，*Borrelia burgdorferi*，*Brucella melitensis* (马尔他布鲁氏菌)，*Escherichia coli* (大肠埃希氏菌)，( *Brucella ovis*) 绵羊布鲁氏菌，*Haemophilus influenzae* (嗜流感杆菌)，*Legionella pneumophila* (嗜肺军团菌)，*Neisseria gonorrhoeae* (奈瑟氏淋病菌)，( *Neisseria meningitidis*) 脑膜炎奈瑟氏球菌，*Pseudomonas aeruginosa* (绿色假单胞菌) 和 *Yersinia enterocolitica* (小肠结肠炎叶尔森氏菌)。

小泡的优点是提供了天然构象的外膜蛋白，因此对于疫苗特别有用。可以对细菌进行改造，从而改变外膜上的一个或多个分子的表达，从而改善其疫苗用途。因此可以引入或上调 (例如，通过改变启动子) 外膜上合乎需要的免疫原性蛋白例如 BASB059 多肽的表达。替代地或另加地，可以下调不相关的 (例如非保护性的抗原或免疫显性的但却可变的蛋白) 或有害的 (例如毒性分子如 LPS，或自体免疫应答的可能的诱导剂) 外膜分子的表达。这些方法将在下文详细描述。

BASB059 基因的非编码侧翼区域含有对该基因的表达很重要的调控元件。这种调控同时在转录水平上和翻译水平进行。可以通过 DNA 测序获得处于该基因的开放阅读框的上游或下游的这些区域的序列。这些序列信息允许人们确定可能的调节基序，如不同的启动子元件，终止序列，可诱导序列元件，阻抑物，负责期变异 (phase variable) 的元件，Shine - Dalgarno 序列，可能具有参与调节的二级结构的序列，以及其它类型的调节基序或序列。这些序列是本发明的进一步的方面。

这些序列信息允许人们对 BASB059 基因天然表达调控。可以通过改变启动子，Shine - Dalgarno 序列，可能的阻抑物或操纵子元件，或任何其它相关的元件来完成对基因表达的上调。类似地，可以通过类似的改变达到对表达的下调。替代地，通过对相变异序列的改变可

以将该基因的表达处于位相变异的控制之下，或者可以将其表达与相变异的控制解偶联。在另一种方法中，可以将该基因置于一个或多个允许对表达进行调控的可诱导元件的控制之下。这样的调控的例子包括，但不限于，温度改变，添加诱导底物如选定的碳水化合物或它们的衍生物，痕量元素，维生素，辅因子，金属离子等的诱导。

可以通过几种不同的方法引入上文所描述的改造。可以通过随机诱变，然后筛选所需要的表型，从而在体内对涉及基因表达的序列进行改造。另一种方法包括分离感兴趣的区域，然后通过随机诱变或定点置换，插入或缺失突变进行改造。然后通过同源重组，改造后的区域被重新引入到细菌基因组中，接着测定对基因表达的影响。在另一种方法中，可以利用感兴趣的区域的序列知识来置换或缺失部分或所有的天然调节序列。在这种情况下，分离目的调节区域并进行改造，使其含有另一基因的调控元件，含有来自不同基因的调控元件的组合，含有合成的调控区域或含有任何其它调控区域，或者使野生型调控序列的选定部分被缺失。然后通过同源重组，这些改造后的序列可以被重新引入到细菌的基因组。可用于基因表达的上调的优选启动子的不完全清单包括源自脑膜炎奈瑟氏球菌或奈瑟氏淋病菌的启动子 *porA*, *proB*, *lbpB*, *tbpB p110*, *1st*, *hpuAB*; *ompCD*, *copB*, *lbpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; 源自 *M. catarrhalis* 的 *TbpB*; 源自嗜血流感杆菌的 *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw 2*。

在一个实施例中，可以通过将基因的启动子换为较强的启动子（通过分离该基因的上游序列，体外改造该序列，并通过同源重组重新引入到基因组中）而调控基因的表达。可以在细菌和细菌释放（或产生）的外膜小泡中实现上调表达。

在其它实施例中，所描述的方法可以用于产生重组细菌菌株，在上述重组菌株中用于疫苗用途的特性得到了改善。上述菌株可以是但不限于，弱化的菌株，所选择的抗原的表达增强的菌株，干扰免疫应答的基因被敲除（或表达降低）的菌株，免疫显性蛋白的表达受调节的菌株，外膜小泡的释放受调节的菌株。

因此，本发明也提供了 BASB059 基因的改造后的上游区域，该改造后的上游区域含有异源调控元件，该异源调控元件改变位于外膜的 BASB059 蛋白的表达水平。根据本发明的这个方面的上游区域包括

BASB059 基因的上游序列。上述上游区域紧接着 BASB059 基因的上游开始，并且从起始密码子 ATG 算起，其延伸的位置通常不超过该基因上游大约 1000bp。当基因位于多顺反子序列（操纵子）时，上游区域可以直接开始于感兴趣基因之前，或开始于操纵子中第一个基因之前。根据本发明的这个方面，优选地，改造的上游区域包含一个位于 ATG 上游 500bp 到 700bp 位之间的异源启动子。

因此，本发明在改造的细菌小泡中提供了 BASB059 多肽。本发明进一步提供了改造的宿主细胞，该宿主细胞产生无生命的基于膜的小泡载体。本发明进一步提供了含有 BASB059 基因的核酸载体，该 BASB059 基因具有改造的含有异源调控元件的上游区域。

本发明进一步提供了根据本发明的宿主细胞和细菌小泡的制备方法。

本发明也提供了组合物，尤其是疫苗组合物，和方法，上述组合物和方法含有本发明的多肽和/或多聚核苷酸，以及免疫刺激的 DNA 序列，例如在 Sato, Y. 等 Science 273:352 (1996) 中所描述的序列。

本发明也提供了将所描述的多聚核苷酸或其特定的片段应用于多聚核苷酸构建体的方法，上述多聚核苷酸构建体用于在感染脑膜炎奈瑟氏球菌的动物模型中进行基因免疫实验，上述多聚核苷酸或其特定的片段编码细菌细胞表面蛋白的非-可变区域。这样的实验在鉴定可能引起预防或治疗免疫应答的蛋白表位上特别有用。有人认为上述方法为随后的特定用途的单克隆抗体的制备作了准备，该单克隆抗体源自成功地抵抗或清除感染的动物的必要器官，该单克隆抗体用于开发哺乳动物细菌感染的预防制剂或治疗方法，上述细菌感染尤其指脑膜炎奈瑟氏球菌感染，上述哺乳动物尤其指人类。

本发明也包括一种疫苗制剂，它包含本发明的免疫原性的重组多肽和/或多聚核苷酸和合适的载体，例如药用上可接受的载体。因为多肽和多聚核苷酸在胃中可以被分解，因此优选地，它们通过非肠道途径施用，包括，例如，皮下的、肌肉内的、静脉内的或皮内的施用途径。适用于非肠道施用的制剂包括水溶性的和非水溶性的无菌注射溶液，它们可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌化合物和使该制剂与个体的体液，优选地为血液，等渗的溶剂；还包括水悬浮的和非水悬浮的悬浮液，它们可以含有悬浮制剂或稠化剂。该制剂可以在单一剂量

或多剂量的容器中提供，例如在密闭的安瓿和小瓶中，并且在冻干的条件下储存，只需要在使用之前加入无菌的液体载体。

本发明的疫苗制剂还可以包括佐剂系统以增强该制剂的免疫原性。优选地，该佐剂系统优先引起 TH1 型的免疫应答。

5 免疫应答可以被大致区分为两种极端的类型，体液或细胞介导的免疫应答（经典特征分别为受体和细胞效应器保护机制）。这些应答在分类学上分别被称为 TH1 型应答（细胞介导的应答）和 TH2 型免疫应答（体液应答）。

10 极端的 TH1 型免疫应答的特征为产生抗原特异的、单元型限制的细胞毒性 T 淋巴细胞和天然杀伤细胞应答。在小鼠中 TH1 型应答的特征经常为 IgG2a 亚型的抗体的产生，而在人类中这些相应于 IgG1 型抗体。TH2 型免疫应答的特征为产生许多同种型的免疫球蛋白，在小鼠中包括 IgG1, IgA 和 IgM。

15 有人认为产生这两种免疫应答背后的驱动力是细胞因子。高水平的 TH1 型细胞因子倾向于诱导针对既定抗原的细胞介导的免疫应答，而高水平的 TH2 型细胞因子倾向于诱导针对既定抗原的体液免疫应答。

20 TH1 和 TH2 型免疫应答的区分不是绝对的。事实上，在一个个体中维持的免疫应答被描述为主要 TH1 型或主要 TH2 型。但是，按照 Mosmann 和 Coffman 在鼠类 CD4<sup>+</sup>ve T 细胞克隆的描述来考虑细胞因子家族经常是便利的 (Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) TH1 和 TH2 细胞：导致不同功能特性的淋巴因子分泌的不同模式。免疫学年鉴 (TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology), 7, p145-173)。通常来说，TH1 型的应答是与 T 淋巴细胞产生的 INF- $\gamma$  和 IL-2 细胞因子的产生相关的。其它与 TH1 型免疫应答的诱导直接相关的细胞因子，如 IL-12，不是由 T 细胞产生的。相反，TH2 型的应答是与 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-13 的分泌相关的。

30 已知某些疫苗的佐剂特别适于刺激 TH1 或 TH2 型的细胞因子应答。疫苗接种后或感染后，通常免疫应答 TH1:TH2 平衡的最好指示包括：在用抗原重复刺激后，直接测量 T 淋巴细胞在体外产生的 TH1 或

TH2 细胞因子；和 / 或测量对抗原特异的抗体应答的 IgG1: IgG2a 比率。

因此 TH1 型的佐剂为用抗原体外重复刺激时，优先刺激分离的 T 细胞群产生高水平的 TH1 型细胞因子，并促进 CD8 + 细胞毒性 T 淋巴细胞和与 TH1 型同种型相关的抗原特异性免疫球蛋白的发生的佐剂。

能够优先刺激 TH1 型细胞应答的佐剂在国际专利申请 WO 94 / 00153 和 W095 / 17209 中有所描述。

3 脱 - O - 酰基单磷酰基脂 A (3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A, 3D -MPL) 是一种这样的佐剂。这是从 GB2220211 (Ribi) 中得知的。化学上它是具有 4, 5 或 6 酰基链的 3 脱 - O - 酰基单磷酰基脂 A 的混合物，由 Montana 的 Ribi Immunochem 公司制造。优选的 3 脱 - O - 酰基单磷酰基脂 A 形式在欧洲专利 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) 中公开。

优选地，3D - MPL 的颗粒小得足以通过 0.22 微米的膜 (欧洲专利 0 689 454)。每剂量提供的 3D - MPL 在 10 $\mu$ g-100 $\mu$ g 之间，优选地在 25 - 50 $\mu$ g 之间，其中提供的抗原的通常在 2 - 50 $\mu$ g 每剂量。

另一种优选的佐剂包括 QS21，它是一种源自 Quillaja Saponaria Molina 的树皮的，经 HPLC 纯化的无毒成分。这种佐剂可以任选地与一种载体一起，任选地与 3 脱 - O - 酰基单磷酰基脂 A (3D -MPL) 混合。

生产 QS21 的方法在美国专利第 5, 057, 540 中有所描述。

含有 QS21 的非反应原性制剂先前已有描述 (WO 96 / 33739)。当与抗原配制在一起时，这样的含有 QS21 和胆固醇的制剂已经被表明是成功的 TH1 刺激佐剂。

可能是 TH1 细胞应答的刺激因子的其它佐剂包括免疫调节的寡聚核苷酸，例如 W096 / 02555 中所公开的未甲基化的 CpG 序列。

不同的 TH1 刺激佐剂，如上文所描述的那些佐剂，的组合物也被认为是提供了一种作为 TH1 细胞应答优先刺激物的佐剂。例如，QS21 可以和 3D - MPL 配制在一起。QS21: 3D - MPL 的比率通常在 1: 10 到 10: 1 之间，优选地在 1: 5 到 5: 1 之间，并且经常基本上是 1: 1。3D - MPL: QS21 的最佳协同效应的优选范围是 2.5:1 到 1:1。

优选地，在根据本发明的疫苗组合物中还存在着一种载体。上述载

体可以是水包油乳剂或铝盐，如磷酸铝或氢氧化铝。

5 优选的水包油乳剂含有可代谢的油，如鲨烯， $\alpha$ 生育酚和吐温 80。在一个特别优选的方面，根据本发明的疫苗组合物中的抗原和 QS21 与 3D-MPL 在这样的乳剂中混合在一起。此外，上述水包油乳剂可以含有 span85 和 / 或卵磷脂和 / 或三辛酰甘油酯。

通常对于人类施用而言，疫苗中存在的 QS21 和 3D-MPL 在  $1\mu\text{g}$ - $200\mu\text{g}$  每剂量的范围内，例如在  $10$ - $100\mu\text{g}$ ，优选地在  $10\mu\text{g}$ - $50\mu\text{g}$ 。通常水包油乳剂含有 2 到 10% 的鲨烯，从 2 到 10% 的 $\alpha$ -生育酚和从 0.3 到 3% 的吐温 80。优选地，鲨烯： $\alpha$ 生育酚的比率等于或小于 1，因为这样的乳剂更为稳定。Span85 也可以在 1% 的水平存在。10 在一些情况下本发明的疫苗进一步含有稳定剂是有利的。

无毒的水包油乳剂优选地在水性载体中含有无毒的油，例如鲨烷或鲨烯，乳化剂，例如吐温 80。上述水性载体可以是，例如，磷酸盐缓冲液。

15 一种在水包油乳剂中含有 QS21、3D-MPL 和生育酚的特别强的佐剂制剂在 WO 95/17210 中有所描述。

本发明还提供了多价的疫苗组合物，它含有本发明的疫苗制剂以及其它抗原，特别是可用于治疗癌症、自身免疫疾病和相关病情的抗原。这样的多价疫苗组合物可以包括本文先前描述的 TH1 诱导佐剂。

20 虽然本发明的描述是关于某些 BASB059 多肽和多聚核苷酸，但是应当理解本发明覆盖了天然存在的多肽和多聚核苷酸的片段，以及进行了添加、缺失或替代而重组多肽或多聚核苷酸的免疫原性性质基本上不受影响的类似多肽和多聚核苷酸。

25 抗原可以以全细菌（活的或死的）的形式，或者以亚细胞组分的形式输送，这可能包括奈瑟氏脑膜炎球菌自身。

#### 组合物、试剂盒和施用

在本发明的一个进一步的方面提供了一种用于对细胞或多细胞生物施用的组合物，该组合物含有 BASB059 多聚核苷酸和 / 或 BASB059 多肽。

30 本发明还涉及含有本文讨论的多聚核苷酸和 / 或多肽或它们的激动剂或拮抗剂的组合物。本发明的多肽和多聚核苷酸可以和非无菌的或无菌的载体，或者用于细胞、组织或生物体的载体，如适用于对

个体施用的载体，一起组成组合物。这样的组合物含有，例如，介质添加剂（media additive）或治疗上有效量的本发明的多肽和/或多聚核苷酸，以及药用上可接受的载体或赋形剂。这样的载体可以包括，但不限于，盐溶液、缓冲盐溶液、右旋糖（dextrose）、水、甘油、乙醇和它们的组合。制剂应该与施用的形式相符。本发明进而涉及诊断用的或药用的包和试剂盒，它们含有一个或多个容器，装有一种或多种上文所述的本发明的组合物的成分。

本发明的多肽、多聚核苷酸和其它化合物可以单独使用或者与其它化合物，如治疗用的化合物，联合使用。

药用组合物可以以任何有效的、方便的方式施用，包括，例如，通过局部施用、口服施用、肛门施用、阴道施用、静脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、皮下施用、鼻腔内施用或皮内施用等等途径。

在治疗或预防中，上述活性制剂可以作为可注射的组合物对个体施用，例如，作为无菌的水分散物（aqueous dispersion），它优选地为等渗的。

在一个进一步的方面，本发明提供的药用组合物含有治疗上有效量的多肽和/或多聚核苷酸，如可溶形式的本发明的多肽和/或多聚核苷酸，激活或拮抗的肽或小分子化合物，以及药用上可接受的载体或赋形剂。这样的载体包括但不限于，盐溶液、缓冲盐溶液、右旋糖（dextrose）、水、甘油、乙醇和它们的组合。本发明进而涉及药用的包和试剂盒，它们含有一个或多个容器，装有一种或多种上文所述的本发明的组合物的成分。本发明的多肽、多聚核苷酸和其它化合物可以单独使用或者与其它化合物，如治疗用的化合物，联合使用。

组合物应该和施途径相适应，施途径如通过全身施途径或口服途径。优选形式的全身施途径包括注射，通常通过静脉内注射。可以使用其它注射途径，如皮下的、肌肉内的或腹膜内的途径。全身施用的替代方法包括渗透剂，如利用胆汁盐或梭链孢酸或其它去污剂进行跨粘膜施用或经皮施用。并且，如果本发明的多肽或其它化合物能被配制成肠溶性的或装入胶囊的制剂，则口服施用也是可能的。这些化合物的施用也可以是局部的（topical）和/或定位的（localized），其形式为药膏、糊膏剂、凝胶、溶液、粉末等等。

对于哺乳动物，尤其是人类，的施用而言，预计活性物质的每日

剂量在 0.01mg/kg 到 10mg/kg 之间，通常在大约 1mg/kg。在任何情况下医生将决定对于个体最适合的实际剂量，实际剂量将根据年龄、体重和特定个体的反应而有所不同。以上剂量是对通常情况的示例。当然，在个别情况下更高或更低的剂量范围是有利的，这也在本发明的范围之内。

所需要的剂量范围依赖于所选择的肽、施用途径、制剂的特性、对象病情的特性和参与的执业医生的判断。但是，适当的剂量在 0.1-100 $\mu$ g 每千克对象体重。

疫苗组合物可以方便地为可注射形式。可以利用常规的佐剂来增强免疫应答。疫苗的适当的单位剂量为 0.5-5 $\mu$ g 抗原 / kg，这样的剂量优选地施用 1-3 次，每次的间隔为 1-3 星期。在以上给出的剂量范围内不会观察到本发明的化合物的有害的毒性作用，上述有害的毒性作用如果存在的话可能会妨碍它们对适当个体的施用。

考虑到存在许多化合物，并且各种施用途径的效率不同，应当预期所需要的剂量有很大的变化。例如，预期口服施用所需要的剂量比静脉内施用所需要的剂量大。可以利用常规的经验程序对这些剂量水平的变化进行调整，这在本领域中是众所周知的。

#### 序列数据库、有形介质中的序列和算法

多聚核苷酸和多肽序列形成重要的信息资源，该信息资源可用来确定多聚核苷酸和多肽序列的 2 维或 3 维结构以及进一步鉴定其它的类似同源性的序列。通过以下手段很容易将以上方法简化：将上述序列储存在计算机可读的介质中，然后将存储的数据应用于已知的大分子结构程序，或通过众所周知的搜索工具，例如 GCG 程序包，利用上述存储的数据搜索序列数据库。

本发明还提供了特征序列或链，尤其是基因序列或编码的蛋白序列，的分析方法。优选的序列分析方法包括，例如，序列同源性分析方法，如同一性和相似性分析，DNA，RNA 和蛋白结构分析，序列组装，进化枝的分析，序列基序分析，开放阅读框的确定，核酸碱基呼叫 (nucleic acid base calling)，密码子使用频率分析，核酸碱基修剪 (nucleic acid base trimming) 和测序色谱峰分析。

提供了基于计算机的方法以进行同源性鉴定。该方法包括以下步骤：在计算机可读的介质中提供含有本发明的多聚核苷酸序列的第一

多聚核苷酸序列；将上述第一多聚核苷酸序列和至少一个第二多聚核苷酸序列或多肽序列比较以鉴定同源性。

提供了基于计算机的方法以进行同源性鉴定，所述方法包括以下步骤：在计算机可读介质中提供会有本发明的多肽序列的第一多肽序列；将上述第一多肽序列和至少一个第二多聚核苷酸或多肽序列比较以鉴定同源性。

在本说明书里应用的所有的出版物和参考文献，包括但不限于专利和专利申请，都在此全文引入作为参考，就象每一个单独的出版物或参考文献都被特地和单独地被注明在此引入作为参考那样。任何本申请要求优先权的专利申请也以上文描述的出版物和参考文献的方式在此全文引入作为参考。

#### 定义

“同一性”，如本领域中所知的那样是指，根据具体情况，两个或多个多肽序列或两个或多个多聚核苷酸序列之间的关系，这是通过序列的比较而确定的。在本领域中，“同一性”还表示多肽或多聚核苷酸序列之间的序列相关性的程度，这是通过这样的序列的链之间的匹配来确定的。很容易通过已知的方法来计算“同一性”，包括但不限于那些在以下文献中所描述的方法：计算机分子生物学 (Computational Molecular Biology)，Lesk, A. M., 编著，牛津大学出版社，1988；生物计算机学：信息学和基因组主题 (Biocomputing: Informatics and Genome Projects)，Smith, D. W., 编著，科学出版社，纽约，1993；序列数据的计算机分析，第 I 部分 (Computer Analysis of Sequence Data, Part, I)，Griffin, A.M., 和 Griffin, H. G., 编著，Humana Press, New Jersey, 1994；分子生物学中的序列分析 (Sequence Analysis In Molecular Biology)，von Heine, G., Academic Press, 1987；和序列分析引物 (Sequence Analysis Primer)，Gribskov, M. 和 Devereux, J., eds, M Stockton Press, New York, 1991；和 Carillo, H., 和 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)。确定同源性的方法的设计使得被测试的序列之间最好地匹配。进而，确定同一性的方法被编写成了向公众开放的计算机程序。确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包括，但不限于，GCG 程序包中的 GAP 程

序 (Devereux, J., 等, 核酸研究 (Nucleic Acid Research) 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 215: 403-410 (1990)), 和 FASTA (Pearson 和 Lipman 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85; 5 2444-2448 (1988))。BLAST 家族的程序在 NCBI 和其它来源上向公众开放 (BLAST Manual, Altschul, S., 等, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 215: 403-410 (1990))。众所周知的 Smith Waterman 算法也可以被用来确定同一性。

10 多肽序列比较的参数包括如下:

算法: Needleman 和 Wunsch, 分子生物学杂志 (J. Mol Biol.) 48:443-453 (1970)

比较矩阵 (comparison matrix): 来自 Henikoff 和 Henikoff, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) 89: 15 10915-10919 (1992) 的 BLOSSUM62

间隔补偿 (Gap penalty) :8

间隔长度补偿 (Gap length penalty) :2

可以使用这些参数的程序为 Genetics Computer Group, Madison WI 的向公众开放的 "Gap" 程序。以上描述的参数是肽段比较的默认参数 (同时对末端间隔没有补偿)。

20 多聚核苷酸序列比较的参数包括如下:

算法: Needleman 和 Wunsch, 分子生物学杂志 (J. Mol Biol.) 48:443-453 (1970)

比较矩阵 (comparison matrix): 匹配 = +10, 不匹配 = 0

25 间隔补偿 (Gap penalty) :50

间隔长度补偿 (Gap length penalty) :3

可以从 Genetics Computer Group, Madison WI 的 "Gap" 程序得到。这些为核酸比较的默认参数。

多聚核苷酸和多肽的 "同一性" 的优选的含义, 根据具体情况, 30 分别在下文的 (1) 和 (2) 中给出:

(1) 多聚核苷酸实施方案进一步提供了一种分离的多聚核苷酸, 该多聚核苷酸含有的多聚核苷酸序列和 SEQ ID NO: 1 中的参照

序列至少有 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 或 100% 的同一性, 其中所述的多聚核苷酸序列可以和 SEQ ID NO: 1 中的参照序列完全相同, 或者和参照序列相比具有某些整数的核苷酸变化, 其中所述的变化可以选自至少一个核苷酸被缺失, 替代, 包括转换和颠换, 或插入, 其中所述的变化可以在参照核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置或在这两个末端位置之间的任何位置发生, 或者独立地分布于参照序列的核苷酸之间, 或者在参照序列中以一个或多个邻近的组分布, 其中所述的变化核苷酸数是这样确定的: 将 SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数乘以定义了同一性百分比的整数, 除以 100, 然后将得数从以上所述的 SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数中减去, 或:

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

其中  $n_n$  是核苷酸变化数,  $x_n$  是 SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数,  $y$  对于 50% 是 0.50, 对于 60% 是 0.60, 对于 70% 是 0.70, 对于 80% 是 0.80, 对于 85% 是 0.85, 对于 90% 是 0.90, 对于 95% 是 0.95, 对于 97% 是 0.97, 对于 100% 是 1.00,  $\cdot$  是乘号的标志, 在从  $x_n$  中减去之前,  $x_n$  和  $y$  的任何非整数得数被下舍入 (rounded down to) 为最接近的整数。编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的多聚核苷酸序列的变化可能在编码序列中产生无义的, 错义的或读码框移动的突变, 从而在变化后改变由该多聚核苷酸编码的多肽。

作为例子, 本发明的多聚核苷酸序列可以与 SEQ ID NO: 1 中的参照序列相同, 也就是说可以是 100% 相同, 或者与上述参照序列相比可以含有某些整数的核苷酸变化, 以便其同一性百分比小于 100% 同一性。这样的变化选自至少一个核苷酸被缺失, 替代, 包括转换和颠换, 或插入, 其中所述的变化可以在参照核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置或在这两个末端位置之间的任何位置发生, 或者独立地分布于参照序列的核苷酸之间, 或者在参照序列中以一个或多个邻近的组分布。对于给定的同一性百分比, 其变化的核苷酸数是这样确定的: 将 SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数乘以定义了同一性百分比的整数, 除以 100, 然后将得数从以上所述的 SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数中减去, 或:

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

其中  $n_n$  是核苷酸变化数,  $x_n$  是 SEQ ID NO: 1 中的总核苷酸数,  $y$

是，例如对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85，等等，· 是乘号的标志，其中  $x_n$  和  $y$  的任何非整数得数在从  $x_n$  中减去之前被下舍入 (rounded down to) 为最接近的整数。

(2) 多肽实施方案进一步包括分离的多肽，该多肽含有的多肽和 SEQ ID NO:2 的多肽参照序列至少有 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 或 100% 的同一性，其中所述的多肽序列可以和 SEQ ID NO:2 中的参照序列相同，或者和参照序列相比具有某些整数的氨基酸变化，其中所述的变化可以选自至少一个氨基酸被缺失，替代，包括保守的替代和非保守的替代，或插入，其中所述的变化可以在参照多肽序列的氨基或羧基末端位置或在这两个末端位置之间的任何位置发生，或者独立地分布于参照序列的的氨基酸之间，或者在参照序列中以一个或多个邻近的组分布，其中所述的变化氨基酸数是这样确定的：将 SEQ ID NO: 2 中的总氨基酸数乘以定义了同一性百分比的整数，除以 100，然后将得数从以上所述的 SEQ ID NO: 2 中的总氨基酸数中减去，或：

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

其中  $n_a$  是氨基酸变化数， $x_a$  是 SEQ ID NO: 2 中的总氨基酸数， $y$  对于 50% 是 0.50，对于 60% 是 0.60，对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85，对于 90% 是 0.90，对于 95% 是 0.95，对于 97% 是 0.97，对于 100% 是 1.00，· 是乘号的标志，在从  $x_a$  中减去之前， $x_a$  和  $y$  的任何非整数得数被下舍入 (rounded down to) 为最接近的整数。

作为例子，本发明的多肽序列可以与 SEQ ID NO: 2 中的参照序列相同，也就是说可以是 100% 相同，或者与上述参照序列相比可以含有某些整数的氨基酸变化，以便其同一性百分比小于 100% 同一性，这样的变化可以选自至少一个氨基酸被缺失，替代，包括保守的替代和非保守的替代，或插入，其中所述的变化可以在参照多肽序列的氨基或羧基末端位置或在这两个末端位置之间的任何位置发生，或者独立地分布于参照序列的的氨基酸之间，或者在参照序列中以一个或多个邻近的组分布。对于给定同一性百分比，所述的变化氨基酸数是这样确定的：将 SEQ ID NO: 2 中的总氨基酸数乘以定义了同一性百分比的整数，除以 100，然后将得数从以上所述的 SEQ ID NO: 2

中的总氨基酸数中减去，或：

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

其中  $n_a$  是氨基酸变化数， $x_a$  是 SEQ ID NO: 2 中的总氨基酸数， $y$  是，例如对于 70% 是 0.70，对于 80% 是 0.80，对于 85% 是 0.85，  
5 等等， $\cdot$  是乘号的标志，其中  $x_n$  和  $y$  的任何非整数得数在从  $x_n$  中减去之前被下舍入 (rounded down to) 为最接近的整数。

在本文中，当“个体”是关于生物体时它的意思为多细胞真核生物，包括，但不限于，后生动物，哺乳动物，Ovid，牛科动物，猿猴，灵长类和人类。

10 “分离的”的意思为“通过人的手”从其天然状态被改变，也就是说，如果它天然存在，它被人从其初始环境移开或改变，或同时被移开并改变。例如，天然存在于活的生物体中的多聚核苷酸或多肽不是“分离的”，但是同一多肽或多聚核苷酸被从其天然状态共存的物质分开时，它们就是“分离的”，如该术语在本文中所使用的意思。  
15 并且，被通过转化、基因操作或通过任何其它重组方法被导入到生物体的多肽或多聚核苷酸是分离的，即使它仍然存在于上述生物体中，该生物体可以是活的或无生命的。

“多聚核苷酸”通常指任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸，它们可以是未修饰的 RNA 或 DNA，或修饰的 RNA 或 DNA，包括单  
20 链和双链区域。

“变体”指和参照多聚核苷酸或多肽不同，但保留了本质特征的多聚核苷酸或多肽。一个多聚核苷酸的典型的变体和参照多聚核苷酸在核苷酸序列上不同。该变体的核苷酸序列的改变可能改变也可能不改变参照多聚核苷酸所编码的多肽的氨基酸序列。如下文所讨论，核  
25 苷酸的改变可能导致参照多聚核苷酸所编码的多肽发生氨基酸的替代、添加、缺失、融合和截短。一个多肽的典型的变体和参照多肽在氨基酸序列上不同。通常，不同之处是有限的，以便参照多肽和变体的序列整体上非常相似，并且，在许多区域是相同的。变体和参照多肽在氨基酸序列上的差别可以是一个或多个氨基酸以任何组合形式的  
30 替代，添加，缺失。替代的或插入的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码子编码的。多聚核苷酸或多肽的变体可以是天然存在的，例如等位基因变体，或不是已知的天然存在的变体。多聚核苷酸和多

肽的非天然存在的变体可以通过诱变技术或通过直接合成产生。

“疾病”的意思为任何由细菌感染引起或与细菌感染相关的疾病，包括，例如，上呼吸道感染，侵入性细菌疾病，如菌血症和脑膜炎。

## 5 实施例

下面的实施例是通过常规技术进行的，上述常规技术对本领域的技术人员是众所周知的，并且是常规的，除了另外详细描述之处外。实施例是说明性的，但不限制本发明。

实施例 1: 在脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株 ATCC13090 中的 BASB059

## 10 序列

脑膜炎奈瑟氏球菌菌株 ATCC13090 的 BASB059 基因序列在 SEQ ID NO: 1 中列出。在 SEQ ID NO: 2 中列出的 BASB059 多聚核苷酸的翻译序列，没有表现出与任何已知蛋白的任何显著相似性。但是，BASB059 多肽含有一个脂蛋白特征的信号序列。

## 15 实施例 2: 表达重组 BASB059 的质粒的构建

### A: BASB059 的克隆

被分别设计入正向 Lip15 - Fm/p (5' - AGG CAG AGG CAT ATG AAC ACA CGC ATC ATC GTT TC-3') (SEQ ID NO: 3) 和反向 Lip15 - Rcf/p (5' -AGG CAG AGG CTC GAG GCA ACG GCC TGC CGC TTT AAG C-3') (SEQ ID NO: 4) 扩增引物的 NdeI 和 XhoI 限制位点，允许 BASB059 的 PCR 产物被定向地克隆到低拷贝数的大肠杆菌表达质粒 pET24b 中，以便 BASB059 蛋白可以作为融合蛋白被表达，该融合蛋白在 C-末端含有一个 (His) 6 亲和性标记。用基于硅胶的离心柱 (QiaGen)，按照厂商的建议，从扩增反应体系中纯化得到了 BASB059 PCR 产物。为了得到克隆所需要的 NdeI 和 XhoI 末端，按照厂商 (Life Technologies) 的建议，用 NdeI 和 XhoI 限制性内切酶依次将纯化得到的 PCR 产物完全消化。在第一次限制性消化后，如上文所述通过离心柱将盐除去来纯化 PCR 产物，并在第二次消化之前用无菌水洗脱。在与 pET24b 质粒连接之前再一次用基于硅胶的离心柱将消化过的 DNA 片段纯化。

### B: 表达载体的产生

为了制备用于连接的 pET24b 表达载体，类似地将质粒用 NdeI 和

XhoI 消化完全, 然后用小牛肠道磷酸酶 (CIP,  $\sim 0.02$  单位 / pmole 5' 端, Life Technologies) 按照厂商的指示消化以防止自身连接。用来进行连接反应的消化片段的摩尔量大约为制备的质体的 5 倍摩尔过量。通过本领域中众所周知的技术, 利用 T4DNA 连接酶 ( $\sim 2.0$  单位 / 反应, Life Technologies) 进行常规的连接反应 ( $\sim 16$  °C,  $\sim 16$  小时)。根据本领域中众所周知的方法, 将一小份连接反应的产物 ( $\sim 5\mu\text{l}$ ) 用来转化电感受态的 BL21 DE3 细胞。在  $\sim 1.0\text{ml}$  LB 肉汤中 37°C 生长  $\sim 2-3$  小时后, 将转化的细胞涂布到含有氨苄青霉素 ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 LB 琼脂平板上。在选择培养基中加入了抗生素以便保证所有的转化细胞都含有 pET24b 质粒 (KnR)。平板在 37°C 过夜培养  $\sim 16$  小时。用无菌的牙签挑取单个 KnR 菌落, 并用来对新鲜的 LB KnR 平板和  $\sim 1.0\text{ml}$  LB KnR 肉汤培养基进行“斑点 (patch)”接种。将上述斑点平板和肉汤培养基在常规的培养箱 (平板) 或水浴摇床里 37°C 温育过夜。

通过基于全细胞的 PCR 分析以确认转化物含有 BASB059DNA 插入序列。将  $\sim 1.0\text{ml}$  过夜培养的 LB Kn 肉汤培养基转移到  $1.5\text{ml}$  的聚丙烯管中, 用 Beckman 微量离心机 ( $\sim 3$  分钟, 室温,  $\sim 12,000\times g$ ) 收集细胞。用  $\sim 200\mu\text{l}$  无菌水悬浮细胞沉淀, 将  $\sim 10\mu\text{l}$  的一小份用于进行终体积  $\sim 50\mu\text{l}$  的, 同时含有 BASB059 正向和反向扩增引物的 PCR 反应。PCR 反应组分的最终浓度基本上和实施例 2 中标明的相同, 但是使用的 Taq 聚合酶为  $\sim 5.0$  个单位。第一步 95°C 变性步骤被延伸到 3 分钟以确保破坏细菌细胞并释放质粒 DNA。为了从溶解的转化物细胞样品中扩增 BASB059PCR 片段, 用 ABI Model 9700 热循环仪, 32 个循环, 三步热扩增模式, 即, 95°C, 45 秒; 55 - 58°C, 45 秒; 72°C, 1 分钟进行扩增。在热扩增之后, 通过琼脂糖凝胶电泳 (0.8% 的琼脂糖在 Tris - 醋酸盐 - EDTA (TAE) 缓冲溶液中) 对上述反应体系的约  $20\mu\text{l}$  的小份进行分析。在凝胶电泳和溴乙锭染色后用 UV 照射显示 DNA 片段。将 DNA 分子量标准 (1Kb 的阶梯 (Ladder), Life Technologies) 与待测样品同时电泳以估计 PCR 产物的分子量大小。产生预期的 PCR 产物的转化物被鉴定为含有 BASB059 表达构建体的菌株。然后分析含有表达质粒的菌株是否能进行 BASB059 的可诱导表达。

C: PCR - 阳性转化物的表达分析

对于以上鉴定的每个 PCR 阳性转化物，用斑点平板的细胞接种含有氨基青霉素（ $\sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$ ） $\sim 5.0\text{ml}$  的 LB 肉汤，并在  $37^\circ\text{C}$  摇床培养（ $\sim 250\text{rpm}$ ）过夜。用一小份（ $\sim 1.0\text{ml}$ ）过夜种菌培养物接种到含有  $\sim 25\text{ml}$  LB Kn 肉汤的  $125\text{ml}$  锥形瓶中并在  $37^\circ\text{C}$  摇床培养（ $\sim 250\text{rpm}$ ），直到培养物的浑浊度达到 O.D. 600 为  $\sim 0.5$ ，即对数生长中期（通常为大约 1.5-2.0 小时）。这时将大约一半培养物（ $\sim 12.5\text{ml}$ ）转移到第二个  $125\text{ml}$  的锥形瓶中并且加入终浓度  $1.0\text{mM}$ （用无菌水制备的  $1.0\text{M}$  的储存液，Sigma）的 IPTG 以诱导重组 BASB059 蛋白的表达。将 IPTG 诱导的和未诱导的培养物继续  $37^\circ\text{C}$  摇床培养  $\sim 4$  小时。诱导期后将诱导的和未诱导的培养物的样品（ $\sim 1.0\text{ml}$ ）取出，并通过微量离心管室温离心  $\sim 3$  分钟收集细胞。将每种细胞沉淀用  $\sim 50\mu\text{l}$  无菌水悬浮，然后与含有 2-巯基乙醇的  $2\times\text{Laemmli SDS-PAGE}$  上样缓冲液等体积混合，沸水浴  $\sim 3$  分钟以使蛋白变性。将体积相等的（ $\sim 15\mu\text{l}$ ）IPTG 诱导的和未诱导的细胞粗裂解液上样到相同的两块  $12\%$  Tris/甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶（ $1\text{mm}$  厚的小凝胶，Novex）。诱导的和未诱导的裂解样品和预染色的分子量标准（SeeBlue, Novex）在常规条件下用常规的 SDS/Tris/甘氨酸电泳缓冲液（BioRad）一起电泳。电泳后，一块胶用考马斯亮蓝 R250（BioRad）染色，然后脱色以显示新的 BASB059 可诱导蛋白。利用 BioRad 的 Mini-Protean II 印迹装置和 Towbin's 甲醇（ $20\%$ ）转移缓冲液  $4^\circ\text{C}$   $\sim 2$  小时，第二块胶被电印迹到 PVDF 膜上（ $0.45$  微米孔径，Novex）。根据本领域中已知的方法进行膜的封闭和抗体温育。先用单克隆的抗（His）5 抗体，然后用交联了 HRP 的兔抗鼠二抗（QiaGen）确认 BASB059 重组蛋白的表达和身分。用 ABT 不溶底物或使用 Hyperfilm 以及 Amersham ECL 化学发光系统显示抗-His 抗体的反应模式。

### 实施例 3: 重组 BASB059 的生产

#### 细菌菌株

含有 pET24b 质粒的大肠杆菌 BL21DE3 重组表达菌株被用来生产大量细胞，以用于重组蛋白的纯化，上述 pET24b 质粒编码源自脑膜炎奈瑟氏球菌的 BASB059。表达菌株在含有  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  卡那霉素（"Kn"）的 LB 琼脂平板上培养以保证质粒的保持。为了在  $-80^\circ\text{C}$  冷冻保存，将菌株在含有相同浓度的抗生素的 LB 肉汤中增殖，然后与

等体积的含有 30%  $\mu\text{g}$  甘油 LB 肉汤混合。

### 培养基

用于生产重组蛋白的发酵培养基由含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kn 的 2 $\times$ YT 肉汤培养基 (Difco) 组成。在发酵罐的培养基中加入 0.25ml/L 的抗泡沫剂 (Antifoam 204, Sigma)。为了诱导 BASB059 重组蛋白的表达，往发酵罐中加入 IPTG (异丙基  $\beta$ -D 硫代吡喃型半乳糖苷) (终浓度 1mM)

### 发酵

往含有 50ml 工作体积的一个 500ml 菌种锥形瓶中接种 0.3ml 融化后的冷冻培养物，或接种几个来自选择性琼脂平板培养物的菌落，然后在 37 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$  的 150rpm 的摇床平台 (Innova 2100, New Brunswick Scientific) 上温育 Kn 约 12 小时。然后该菌种培养物被用来接种 5L 工作体积的，内含有 Kn 抗生素的 2 $\times$ YT 肉汤培养基的发酵罐。该发酵罐 (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) 在 37 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ ，0.2-0.4VVM 空气喷射，Rushon 叶轮 250rpm 的条件下工作。在锥形瓶菌种培养物中或发酵罐中都不控制 pH 值。在发酵过程中，发酵罐内的 pH 值在 6.5 到 7.3 的范围内。当培养物达到对数生长中期时 (~0.7 O.D. 600 单位) 往发酵罐中加入 IPTG (1.0M 储存液，无菌水配制)。细胞被诱导 2-4 个小时，然后用 28RS Heraeus (Sepatech) 或 RC5C 超速离心机 (Sorvall Instruments) 离心收集细胞。细胞糊状物储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，直至进一步处理。

### 纯化

咪唑和生物技术级或更好的试剂都购自 Ameresco Chemical, Solon, Ohio. Triton X-100 (t-辛基苯氧基聚乙氧基-乙醇)，Triton X-114，磷酸钠，一元碱和尿素为试剂级或更好的，并购自 Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri. Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (1 $\times$ PBS) 购自 Quality Biological, Inc., Gaithersburg, Maryland. Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (10 $\times$ PBS) 购自 BioWhittaker, Walkersville, Maryland. 无 BSA 的五-His 抗体购自 QiaGen, Valencia, California. 过氧化物酶标记的 Affini Pure 羊抗鼠 IgG 购自 Jackson Immuno Research, West Grove, Penn. 所有的其它化学试剂都是试剂级的或更好的。

整合 Ni 的 Sepharose Fast Flow 树脂购自 Pharmacia, Sweden. 预灌制的 Tris-甘氨酸 4-20% 和 10-20% 聚丙烯酰胺凝胶, 所有的电泳缓冲液和溶液, SeeBlue 预染色分子量标准, MultMark 多色标准和 PVDF 转移膜都购自 Novex, San Diego, California. SDS-PAGE  
5 银染试剂盒购自 Daiichi Pure Chemicals Company Limited, Tokyo, Jknan. 考马斯染色溶液购自 BioRad Laboratories, Hercules, California. Arcrodic® PF 0.2m 注射滤器购自 Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan. GD/X25mm 一次性注射滤器购自 Whatman Inc., Clifton, New Jersey. 截留分子量 8, 000 的透析管  
10 购自 BioDesign Inc., Od New York, Carmal New York. BCA 蛋白检测试剂和蛇皮透析管, 截留分子量 3, 500, 购自 Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois.

#### 提取方法

细胞糊状物在室温融解 30 到 60 分钟。将细胞糊状物破碎后, 上  
15 清用 1.0% 的 Triton X114 分配, 将这个级分通过整合 Ni 的 Sepharose Fast Flow 树脂, 上述树脂预先用含 10% 甘油和 0.005% Triton X100 的 PBS (pH = 7.5) 平衡。用含有 200mM 咪唑的同一缓冲液洗脱蛋白。将含有洗脱物质的级分用 4 体积的含 2mM EDTA, 10mM 氯化钠和 0.005% Triton X 100 的 50mM Tris -HCl 缓冲液 (pH 7.5) 稀释后  
20 通过 DEAE - Sepharose FF 树脂。收集流出部分并用截留分子量 3KDa 的搅拌池浓缩, 然后对含 0.1% Trion X100 的 PBS (pH 7.4) 透析。

#### 最终制剂

通过对 0.1% Triton X -100 和 1×PBS, pH 7.4, 透析过夜, 中间换 3 次透析液, 配制 BASB059。对纯化的蛋白进行特征鉴定, 并用  
25 来产生抗体, 如下文所述。SDS - PAGE 的结果 (图 1A) 表明大约 10KDa 的一条蛋白带被纯化到纯度大于 90%, 并且能够通过 Western 印迹与抗 His 抗体反应 (图 1B)。

#### 生物化学特征: SDS - PAGE 和 Western 印迹分析

纯化的重组蛋白在 4-20% 聚丙烯酰胺凝胶上解析后 100V 1 小时  
30 电泳转移到 PVDF 膜上, 如先前所描述 (Thebaine 等, 1979, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 76:4350-4354)。然后将 PVDF 膜用含有 5% 脱脂奶粉的 25ml Dulbecco's 磷酸盐缓冲

液预处理。所有的以下温育都是在该预处理缓冲液里进行的。

PVDF 膜与抗 His 尾部抗体的稀释液在室温温育 1 小时。然后将 PVDF 膜用洗涤缓冲液(含有 150mM 氯化钠和 0.05% Tween-20 的 20mM Tris 缓冲液, pH 7.5) 洗涤两次。将 PVDF 膜与 25ml 1:5000 稀释的  
5 过氧化物酶标记的物种特异的交联物室温温育 30min。然后用洗涤缓冲液将 PVDF 膜洗涤 4 次, 并用 Zymed (San Francisco, CA) 提供的 3-氨基-9-乙基吖唑和尿素过氧化物分别显色 10 分钟。

#### 实施例 4: 用重组 BASB059 免疫小鼠

在 0, 14, 28 天向 Balb/C 小鼠三次注射在大肠杆菌中表达的,  
10 部分纯化的重组 BASB059 蛋白(10 只动物/组)。通过皮下途径向动物注射两种不同配方形式的约 5 $\mu$ g 抗原: 或者吸附在 100 $\mu$ g AlPO<sub>4</sub> 上或者和 SBAS2 乳剂一起配制(每剂量含有 5 $\mu$ g MPL 和 5 $\mu$ g QS21 的 SB62 乳剂)。在实验中还添加了阴性对照组, 阴性对照组由仅用 SBAS2 乳剂进行免疫的小鼠组成。小鼠在第 28 天(第二次注射后 14 天)和第  
15 35 天(第三次注射后 7 天)被放血以检测抗 BASB059 的特异性抗体。通过 ELISA 测量从 AlPO<sub>4</sub> 和 SBAS2 收集得到的血清(得自 10 只小鼠/组)中的特异性抗 BASB059 抗体(分别检测), 同时对从两种配方收集得到血清进行 Western 印迹分析(血清被混合在一起)。只利用第三次注射后的血清。图 2 中出示的结果清楚地表明, ELISA 实验说明  
20 在两种配方中都有特异性的 BASB059 抗体应答, 而没有检测到抗大肠杆菌抗体或抗大肠杆菌抗体很低。

#### 源自逐渐康复的病人的血清中存在抗 BASB059 抗体

在这个实验中通过 Western 印迹法检测了几个逐渐康复病人的血清对纯化的 BASB059 重组蛋白的识别。简言之, 将 6 $\mu$ g 部分纯化的  
25 BASB059 脑膜炎奈瑟氏球菌 B 蛋白在 SDS-PAGE 梯度凝胶(4-20%, Novex, 编号 n°EC6029) 上进行电泳迁移。利用 BioRad Trans-blot 系统(编号 n°170-3930) 100 伏 1: 30 小时将蛋白转移到硝酸纤维素片(0.45 $\mu$ m, BioRad 编号 n°162-0114) 上。然后, 在与入血清温育之前将滤膜用 PBS-0.05%吐温 20 室温封闭过夜。检测了如下逐  
30 渐康复病人的血清: 病人 # 262068, 261732, 262117, 261659, 261469, 261979 和 261324。用 PBS-0.05%吐温 20 将这些血清稀释 100 倍, 利用 mini-blotter 系统(Miniprotean, BioRad 编号

- n°170-4017) 与硝酸纤维素片室温温育 2 小时, 同时轻柔地摇晃。用 PBS - 0.05%吐温 20 重复洗涤 3 次, 每次 5 分钟后, 将硝酸纤维素片与用同一洗涤缓冲液 1 / 500 稀释的适当交联物 (生物素化的抗人 Ig 抗体, 源自绵羊, Amersham 编号 n°RPN1003) 在轻柔摇晃的条件下室温温育 1 小时。如前一步, 洗涤三次后, 将膜与用洗涤缓冲液 1 / 1000 稀释的链亲和素 - 过氧化物酶复合物 (Amersham 编号 n°1051) 在搅拌的条件下温育 30 分钟。在最后的三次重复洗涤后, 将膜与 50ml 含 30mg 4 - 氯 - 萘酚 (Sigma), 10ml 甲醇, 40ml 超纯水和 30 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的溶液温育 20 分钟进行显色。染色在用蒸馏水几次冲洗膜时被终止。
- 10 在图 3 和 4 中出示的结果表明, 在所有的 7 个逐渐康复的测试中都与 10KDa 的主带反应。这意味着 BASB059 蛋白可能在将来作为候选疫苗起作用。

## 序列信息

### BASB059 多聚核苷酸和多肽序列

SEQ ID NO:1

源自菌株 ATCC13090 的脑膜炎奈瑟氏球菌 BASB059 多聚核苷酸序列

5

```
ATGAACACACGCATCATCGTTTCGGCTGCGTTTCGTTGCGTTGGCATTAGCAGGTTGCGGC
TCAATCAATAATGTAACCGTTTCCGACCAGAACTTCAGGAACGTGCCGCGTTTGCCTTG
GGCGTCAGCCAAAATGCCGTAAAAATCAGCAACCGCAGCAATGAAAGCATAACGCATCAAC
TTTACCGCAACTGTGGGTAAGCGCGTGAGCCAATGCTATGTTACCAGTGTAATCAGCACA
ATCGGCGTTACCACTTCCGATGCAATTTGTTGGGAGGCGGAACGCACAAAGGCAAAAGT
CAATGCAATGCTTTGCTTAAAGCGGCAGGCCGTTGCTAA
```

SEQ ID NO:2

从 SEQ ID NO: 1 的多聚核苷酸序列推导得到的脑膜炎奈瑟氏球菌  
BASB059 多肽序列

10

```
MNTRIIVSAAFVALALAGCGSINNVTVSDQKLQERAALFVSGVSNVAVKISNRSNESIRIN
FTATVGRVSVQCYVTSVISTIGVTTSDAICLGGGTHKGKSNALLKAAGRC
```

SEQ ID NO: 3

AGG CAG AGG CAT ATG AAC ACA CGC ATC ATC GTT TC

15 SEQ ID NO:4

AGG CAG AGG CTC GAG GCA ACG GCC TGC CGC TTT AAG C

## 保藏的材料

含有脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 菌株的保藏物在美国典型培养物保存中心 (American Type Culture Collection) (本文中的“ATCC”) 于 1997 年 6 月 22 日保藏, 被指定的储藏号 (deposit number) 为 5 13090。该保藏物被称为脑膜炎奈瑟氏球菌 (Albrecht 和 Ghon), 它是冻干的, 由脑膜炎奈瑟氏球菌分离物构建得到的 1.5-2.9 kb 的插入物文库。该保藏物在 Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8:1-15(1958) 中有所描述。

该脑膜炎奈瑟氏球菌菌株保藏物在本文中称为“该保藏菌株”或 10 “该保藏菌株的 DNA”。

该保藏菌株含有全长的 BASB059 基因。该保藏菌株中所含有的上述多聚核苷酸的序列, 以及由其编码的任何多肽的氨基酸序列, 如果和本文序列的任何描述有所冲突的话都得到核实 (controlling)

该保藏菌株的保藏是根据关于为了专利目的的微生物保藏物的 15 国际共识 (International Recognition of the Deposit of Micro-organisms for Purposes of Patent Procedure) 的布达佩斯条约 (Budapest treaty) 的条款进行的。在专利公开后, 该菌株将无限制, 无条件地, 不可撤销地向公众开放。该保藏菌株仅仅是为了本领域的技术人员的便利而提供的, 并不等于承认保藏物对于启动 20 (enablement) 是必须的, 如 35 U. S. C. § 112 中所要求的那样。



```

Ile Ser Asn Arg Ser Asn Glu Ser Ile Arg Ile Asn Phe Thr Ala Thr
   50                      55                      60
Val Gly Lys Arg Val Ser Gln Cys Tyr Val Thr Ser Val Ile Ser Thr
  65                      70                      75                      80
Ile Gly Val Thr Thr Ser Asp Ala Ile Cys Leu Gly Gly Gly Thr His
                      85                      90                      95
Lys Gly Lys Ser Gln Cys Asn Ala Leu Leu Lys Ala Ala Gly Arg Cys
   100                      105                      110

```

```

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<214> 人工序列
<220>
<223> 引物

```

```
<400> 3
```

```
aggcagaggc atatgaacac acgcatcatc gtttc
```

```
35
```

```

<210> 4
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<214> 人工序列
<220>
<223> 引物

```

```
<400> 4
```

```
aggcagaggc tcgaggcaac ggctgccc ttttaagc
```

```
37
```

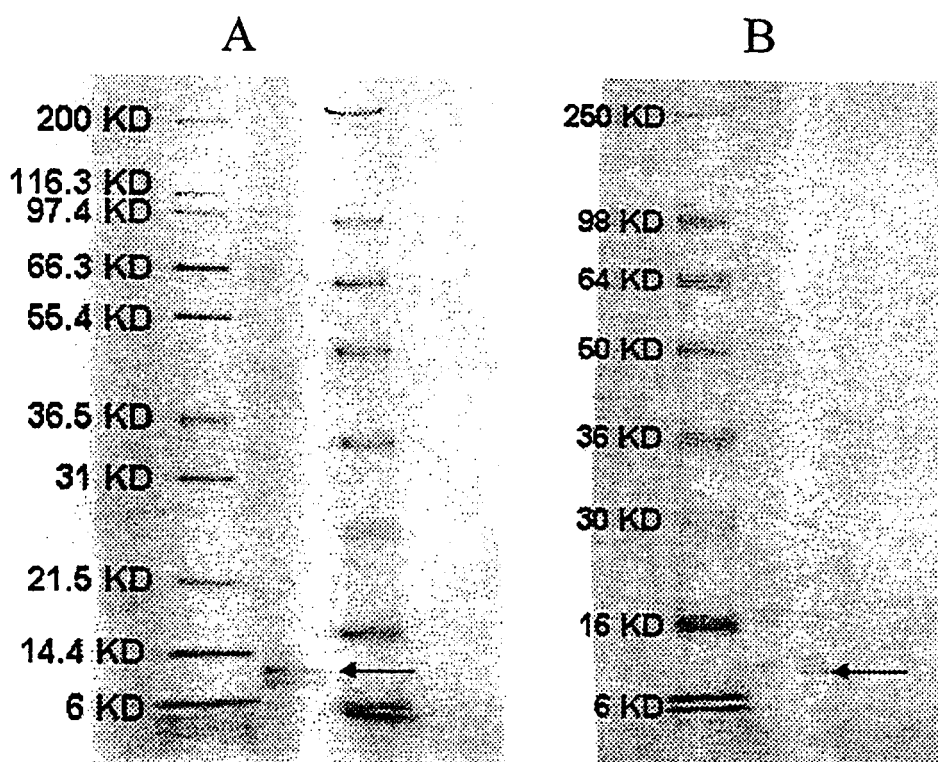


图 1: 纯化的重组BASB059的分析。A考马斯染色的纯化BASB059的SDS - 聚丙烯酰胺凝胶。B用抗氨酸免疫制剂进行的纯化的BASB059的Western印迹分析

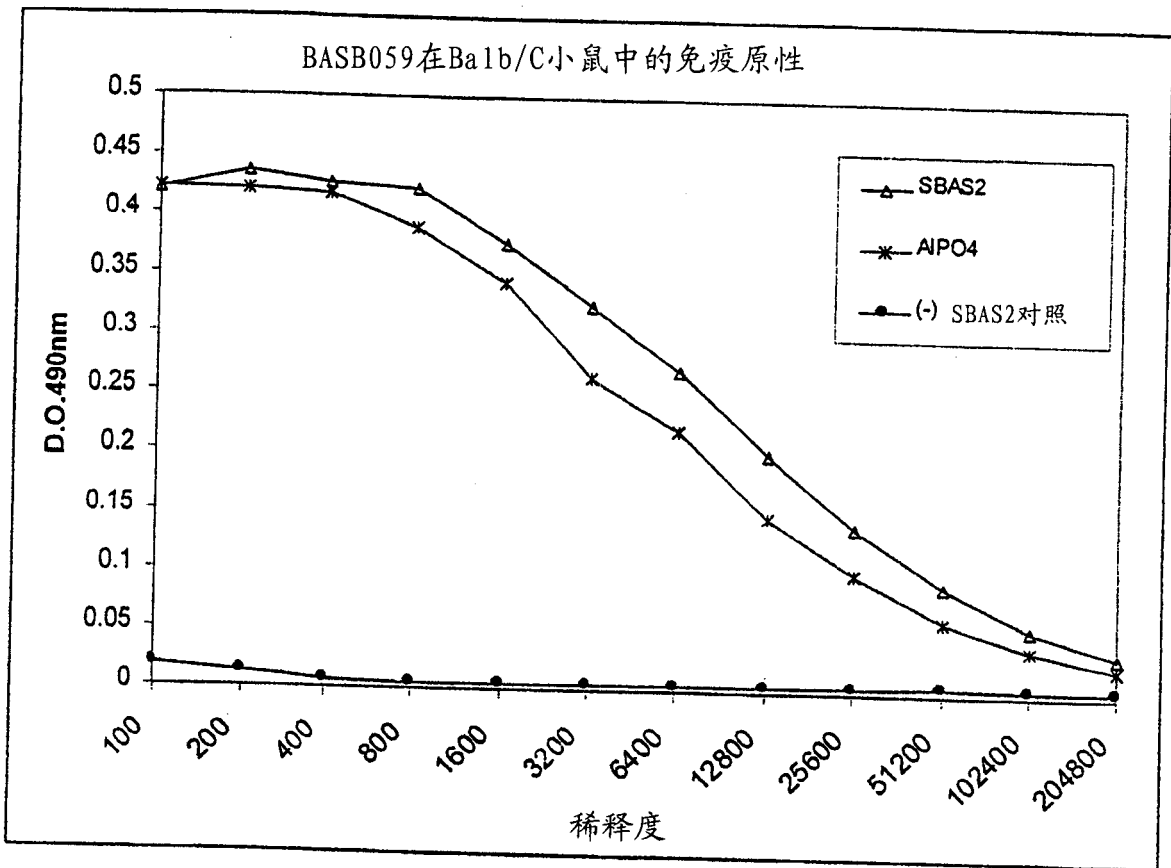


图 2: BASB059蛋白在Ba1b/C小鼠中的免疫原性

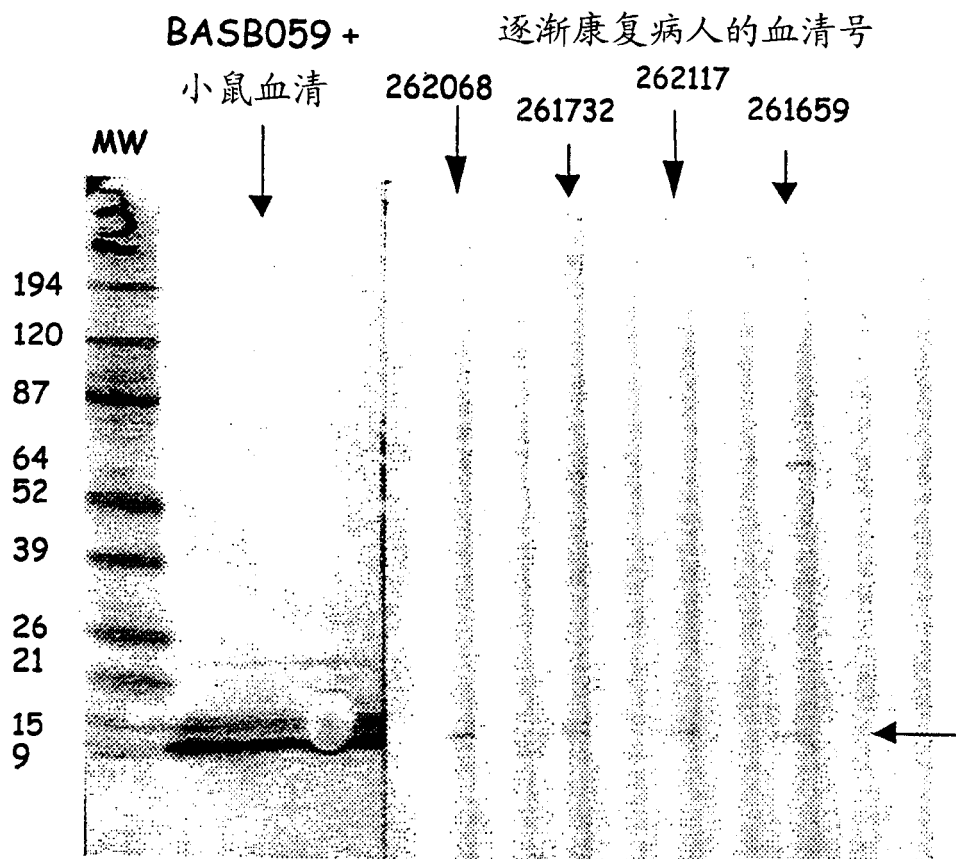


图 3: 在免疫小鼠和逐渐康复病人的血清中的抗BASB059抗体

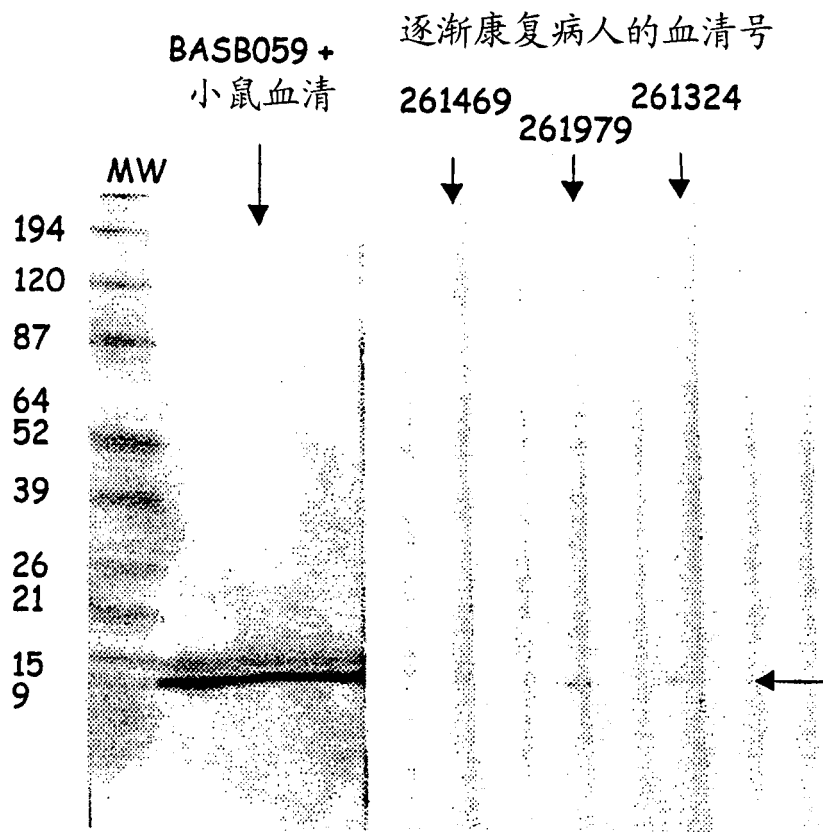
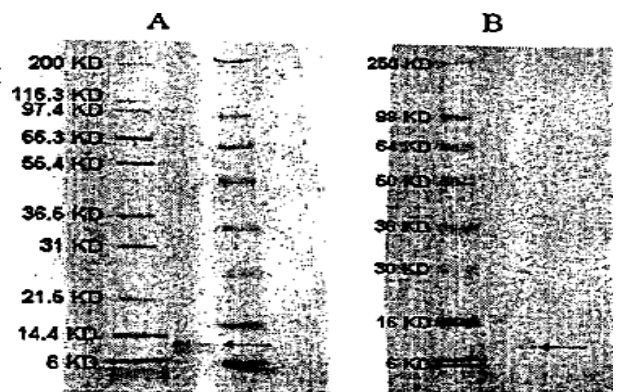


图 4: 在免疫小鼠和逐渐康复病人的血清中的抗BASB059抗体

专利名称(译)	源自脑膜炎奈瑟氏球菌的BASB059多肽		
公开(公告)号	<a href="#">CN1415013A</a>	公开(公告)日	2003-04-30
申请号	CN00805839.3	申请日	2000-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆生物有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆生物有限公司		
[标]发明人	J·通纳德		
发明人	J·通纳德		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/095 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569 C12Q1/68 G01N33/68 A61K39/40 A61K48/00		
CPC分类号	C07K14/22 A61P31/04 A61P37/04		
代理人(译)	罗宏 刘玥		
优先权	1999002070 1999-01-29 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了BASB059多肽和编码BASB059多肽的多聚核苷酸以及通过重组技术产生这样的多肽的方法。本发明也提供了诊断，预防和治疗上的应用。



纯化的重组BASB059的分析。A考马斯染色的纯化BASB059的SDS - 聚丙烯酰胺凝胶。B用抗氨基酸免疫制剂进行的纯化的BASB059的Western印迹分析