



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123724 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200980132130. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 19

A61K 38/03(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/39(2006. 01)

PCT/US2008/067471 2008. 06. 19 US

A61P 31/16(2006. 01)

61/182, 614 2009. 05. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/047911 2009. 06. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02009/155489 EN 2009. 12. 23

(71) 申请人 变异生技公司

地址 加拿大加蒂诺

(72) 发明人 弗朗西斯科·迪亚兹-米托马

安德烈·奥格雷尔

乔斯·V·托里斯 戴维·E·安德森

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 张世俊

权利要求书 10 页 说明书 35 页

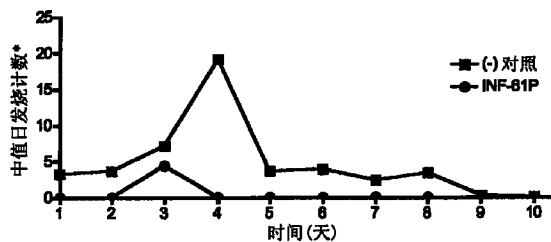
序列表 11 页 附图 14 页

(54) 发明名称

治疗流行性感冒的组合物和方法

(57) 摘要

本申请案提供可用于治疗流行性感冒的组合物和方法。如本文所述,所述组合物和方法是基于对流行性感冒显示免疫原性的肽和肽组合的研制。在一些实施例中,所述肽组合诱发针对多个流行性感冒病毒株(例如季节性流行性感冒病毒株或甚至新的猪源性 A(H1N1) 型大流行性感冒病毒)的保护性反应。



1. 一种免疫原性组合物,其包含:

第一肽,其包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中所述第一肽包括来自 A 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;

第二肽,其包含 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列;和

第三肽,其包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中所述第三肽包括来自 B 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 90%同源性的区域。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 95%同源性的区域。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-50 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 16 的 50-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 2 的至少 20 个相邻氨基酸。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 3 的至少 20 个相邻氨基酸。

8. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 4 的至少 20 个相邻氨基酸。

9. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 5 的至少 20 个相邻氨基酸。

10. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 2 的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-3$ 。

11. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 3 的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-3$ 。

12. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 4 的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-2$ 。

13. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 5 的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-3$ 。

14. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 40 个相邻氨基酸。

15. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 60 个相邻氨基酸。

16. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 80 个相邻氨基酸。

17. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-81。

18. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 82-88。

19. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO.6 的氨基酸 1-88。
20. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含少于 100 个的氨基酸。
21. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第二肽包含 SEQ ID NO.9 的氨基酸序列。
22. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第二肽包含 SEQ ID NO.10 的氨基酸序列。
23. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第二肽包含 SEQ ID NO.11 的氨基酸序列。
24. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO.9 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。
25. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO.10 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。
26. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO.11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。
27. 根据权利要求 24 至 26 中任一权利要求所述的组合物,其中 $n = 4$ 。
28. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第二肽包含少于 30 个的氨基酸。
29. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含与 SEQ ID NO.18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 90%同源性的区域。
30. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含与 SEQ ID NO.18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 40 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。
31. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含与 SEQ ID NO.18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的第一区域和与 SEQ ID NO.18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的第二区域。
32. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含与 SEQ ID NO.8 具有至少 80%同源性的区域。
33. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含与 SEQ ID NO.8 具有至少 90%同源性的区域。
34. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含与 SEQ ID NO.8 具有至少 95%同源性的区域。
35. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含与 SEQ ID NO.18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,而另一者包含与 SEQ ID NO.18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。
36. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第三肽包含少于 100 个的氨基酸。
37. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物另外包含:
第四肽,其包含 SEQ ID NO.14 的氨基酸序列,其中所述第四肽包括来自 A 型流行性感冒核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。
38. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO.14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $n = 1-4$ 。
39. 根据权利要求 38 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。
40. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中所述第四肽包含少于 30 个的氨基酸。
41. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物另外包含:

第四肽,其包含 SEQ ID NO. 15 的氨基酸序列,其中所述第四肽包括来自 A 型流行性感
冒核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。

42. 根据权利要求 41 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 15
的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $n = 1-4$ 。

43. 根据权利要求 42 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。

44. 根据权利要求 41 所述的组合物,其中所述第四肽包含少于 30 个的氨基酸。

45. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 80%
同源性的区域,所述第三肽包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 80% 同源性的区域,且所述组合物
包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。

46. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 90%
同源性的区域,所述第三肽包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 90% 同源性的区域,且所述组合物
包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。

47. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 95%
同源性的区域,所述第三肽包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 95% 同源性的区域,且所述组合物
包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。

48. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6,所述第三肽包
含 SEQ ID NO. 8,且所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同
第二肽,其中 $n = 1-4$ 。

49. 根据权利要求 45 至 48 中任一权利要求所述的组合物,其中 $n = 4$ 。

50. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽基本上由 SEQ ID NO. 6 组成,所述
第三肽基本上由 SEQ ID NO. 8 组成,且所述组合物包含 2^n 种各自基本上由 SEQ ID NO. 11 的
不同氨基酸序列组成的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。

51. 根据权利要求 50 所述的组合物,其中所述组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ
ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。

52. 根据权利要求 51 所述的组合物,其中 n 和 / 或 $m = 2$ 。

53. 根据权利要求 51 所述的组合物,其中 n 和 / 或 $m = 3$ 。

54. 根据权利要求 51 所述的组合物,其中 n 和 / 或 $m = 4$ 。

55. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中每个肽都具有免疫原性。

56. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中至少一种肽另外包含具有
20 个或 20 个以上来自非流行性感蛋白质的相邻氨基酸的区域。

57. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中每个肽都另外包含具有 20
个或 20 个以上来自非流行性感蛋白质的相邻氨基酸的区域。

58. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中至少两种肽存在于单个蛋
白质内。

59. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述第一肽和所述第三肽
包含少于 100 个的氨基酸,且所述第二肽包含少于 30 个的氨基酸。

60. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物另外包含佐剂。

61. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述佐剂为明矾 (alum)。

62. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述佐剂为具有佐剂活性

的免疫活性皂苷部分,其来源于南美树木智利皂荚树 (Quillaja Saponaria Molina) 的树皮。

63. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述佐剂为 TLR-3 激动剂。
64. 根据权利要求 63 所述的组合物,其中所述佐剂为聚核糖肌苷酸:聚核糖胞苷酸。
65. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述佐剂为 TLR-4 激动剂。
66. 根据权利要求 65 所述的组合物,其中所述佐剂含有单磷酸基脂质 A 或 3-脱酰基单磷酸基脂质 A。
67. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中所述佐剂为 TLR-7/8 激动剂。
68. 根据权利要求 67 所述的组合物,其中所述佐剂为 1-异丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺。
69. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物,其中至少一种肽与微脂粒缔合。
70. 根据权利要求 69 所述的组合物,其中所述微脂粒包含非离子型表面活性剂。
71. 根据权利要求 70 所述的组合物,其中所述微脂粒包含甘油酯。
72. 根据权利要求 70 所述的组合物,其中所述微脂粒包含二醇或甘油醚。
73. 根据权利要求 70 所述的组合物,其中所述微脂粒包含促进类脂质分子传输穿过粘膜的传输增强剂。
74. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含侧链的 C₂₃ 碳原子携带羧酸的胆固醇衍生物。
75. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含胆酸、鹅脱氧胆酸或其盐。
76. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、熊脱氧胆酸或其盐。
77. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含酰氧化氨基酸或其盐。
78. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含含有 C₆₋₂₀ 烷酰基或烯酰基部分的酰基肉碱或其盐。
79. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含离子型表面活性剂。
80. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含链烷酸或链烯酸。
81. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含磷酸酯。
82. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含二鲸蜡基磷酸酯、磷脂酸或磷脂酰丝氨酸。
83. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含硫酸单酯。
84. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含鲸蜡基硫酸酯。
85. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含类固醇。
86. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒包含胆固醇。
87. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒的直径在约 10nm 至约 10 μm 范围内。
88. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中所述微脂粒的直径在约 800nm 至约 1.5 μm 范围内。
89. 根据权利要求 73 所述的组合物,其中至少一种肽囊封在所述微脂粒的水性核心

内。

90. 一种免疫原性组合物,其包含包括与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域的肽,其中所述肽包括来自 A 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。

91. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 2 的至少 20 个相邻氨基酸。

92. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 3 的至少 20 个相邻氨基酸。

93. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 4 的至少 20 个相邻氨基酸。

94. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 5 的至少 20 个相邻氨基酸。

95. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 2 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-3$ 。

96. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 3 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-3$ 。

97. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 4 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-2$ 。

98. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 5 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-3$ 。

99. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 40 个相邻氨基酸。

100. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 60 个相邻氨基酸。

101. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 80 个相邻氨基酸。

102. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 90%同源性的区域。

103. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 95%同源性的区域。

104. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-81。

105. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 82-88。

106. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 6。

107. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽基本上由 SEQ ID NO. 6 组成。

108. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽由 SEQ ID NO. 6 组成。

109. 根据权利要求 90 所述的组合物,其中所述肽包含少于 30 个的氨基酸。

110. 一种免疫原性组合物,其包含包括 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列的肽。

111. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 9 的氨基酸序列。

112. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 10 的氨基酸序列。

113. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列。
114. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。
115. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 10 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。
116. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。
117. 根据权利要求 116 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自基本上由 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列组成的不同肽。
118. 根据权利要求 114 至 117 中任一权利要求所述的组合物,其中 $n = 4$ 。
119. 根据权利要求 110 所述的组合物,其中所述肽包含少于 30 个的氨基酸。
120. 一种免疫原性组合物,其包含包括与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域的肽,其中所述肽包括来自 B 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。
121. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 90%同源性的区域。
122. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 40 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。
123. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的第一区域和与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的第二区域。
124. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 80%同源性的区域。
125. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 90%同源性的区域。
126. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 95%同源性的区域。
127. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 8。
128. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽基本上由 SEQ ID NO. 8 组成。
129. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽由 SEQ ID NO. 8 组成。
130. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,且所述组合物另外包含包括与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域的不同肽。
131. 根据权利要求 120 所述的组合物,其中所述肽包含少于 100 个的氨基酸。
132. 一种免疫原性组合物,其包含包括 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列的肽,其中所述肽包括来自 A 型流行性感胃核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。
133. 根据权利要求 132 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。
134. 根据权利要求 133 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。

135. 根据权利要求 132 所述的组合物,其中所述肽包含少于 30 个的氨基酸。
136. 一种免疫原性组合物,其包含包括 SEQ ID NO. 15 的氨基酸序列的肽,其中所述肽包括来自 A 型流行性感胃核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。
137. 根据权利要求 136 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。
138. 根据权利要求 137 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。
139. 根据权利要求 136 所述的组合物,其中所述肽包含少于 30 个的氨基酸。
140. 一种免疫原性组合物,其包含包括 SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列的肽。
141. 根据权利要求 140 所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 1 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。
142. 根据权利要求 141 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。
143. 根据权利要求 140 所述的组合物,其中所述肽包含少于 30 个的氨基酸。
144. 一种免疫原性组合物,其包含包括与 SEQ ID NO. 7 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域的肽,其中所述肽包括来自 A 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。
145. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述区域与 SEQ ID NO. 7 的区域具有至少 90%同源性。
146. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述区域与 SEQ ID NO. 7 的区域具有至少 95%同源性。
147. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 7 的至少 40 个相邻氨基酸。
148. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 7 的至少 60 个相邻氨基酸。
149. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 7 的至少 80 个相邻氨基酸。
150. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽包含 SEQ ID NO. 7。
151. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽基本上由 SEQ ID NO. 7 组成。
152. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽由 SEQ ID NO. 7 组成。
153. 根据权利要求 144 所述的组合物,其中所述肽包含少于 100 个的氨基酸。
154. 一种治疗患流行性感胃或处于流行性感胃风险中的个体的方法,所述方法包含向所述个体投予治疗有效量的根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物。
155. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述组合物经口投予。
156. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述组合物不经肠投予。
157. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述组合物通过肌肉内注射投予。
158. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述组合物经鼻内或通过吸入投予。
159. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述组合物经直肠投予。
160. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述个体患季节性流行性感胃或处于季节性流行性感胃风险中。
161. 根据权利要求 154 所述的组合物,其中所述个体患有猪源性 A(H1N1) 型流行性感

冒病毒所引起的流行性感冒或处于所述流行性感冒风险中。

162. 一种免疫原性组合物,其包含:

TLR-3 激动剂佐剂;

微脂粒,其包含非离子型表面活性剂和促进类脂质分子传输穿过粘膜的传输增强剂;

第一肽,其包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中所述第一肽包括来自 A 型流行性感冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;

第二肽,其包含 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列;

第三肽,其包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中所述第三肽包括来自 B 型流行性感冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;和

第四肽,其包含 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列,其中所述第四肽包括来自 A 型流行性感冒核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。

163. 根据权利要求 162 所述的组合物,其中所述 TLR-3 激动剂佐剂包含 poly(I:C)。

164. 根据权利要求 162 至 163 中任一权利要求所述的组合物,其中所述传输增强剂为胆汁酸、其衍生物或任何前述物质的盐。

165. 根据权利要求 164 所述的组合物,其中所述传输增强剂为脱氧胆酸钠。

166. 根据权利要求 162 至 165 中任一权利要求所述的组合物,其中所述非离子型表面活性剂为甘油酯。

167. 根据权利要求 166 所述的组合物,其中所述非离子型表面活性剂为 1-单棕榈酰基甘油。

168. 根据权利要求 162 至 167 中任一权利要求所述的组合物,其中所述微脂粒另外包含离子型两性分子。

169. 根据权利要求 168 所述的组合物,其中所述离子型两性分子为二鲸蜡基磷酸酯。

170. 根据权利要求 162 至 169 中任一权利要求所述的组合物,其中所述微脂粒另外包含类固醇。

171. 根据权利要求 170 所述的组合物,其中所述类固醇为胆固醇。

172. 根据权利要求 162 所述的组合物,其中所述微脂粒包含 1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡基磷酸酯、胆固醇和脱氧胆酸钠。

173. 根据权利要求 162 至 172 中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物另外包含明矾。

174. 一种治疗患流行性感冒或处于流行性感冒风险中的个体的方法,所述方法包含向所述个体经口投予治疗有效量的根据权利要求 162 至 173 中任一权利要求所述的组合物。

175. 一种免疫原性组合物,其包含:

TLR-4 激动剂佐剂;

微脂粒,其包含非离子型表面活性剂;

第一肽,其包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中所述第一肽包括来自 A 型流行性感冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;

第二肽,其包含 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列;

第三肽,其包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至

少 80%同源性的区域,其中所述第三肽包括来自 B 型流行性感 冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸 ;和

第四肽,其包含 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列,其中所述第四肽包括来自 A 型流行性感 冒核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。

176. 根据权利要求 175 所述的组合物,其中所述 TLR-4 激动剂佐剂包含单磷酸基脂质 A 或 3- 脱酰基单磷酸基脂质 A。

177. 根据权利要求 175 至 176 中任一权利要求所述的组合物,其中所述非离子型表面 活性剂为甘油酯。

178. 根据权利要求 177 所述的组合物,其中所述非离子型表面活性剂为 1- 单棕榈酰基 甘油。

179. 根据权利要求 175 至 178 中任一权利要求所述的组合物,其中所述微脂粒另外包 含离子型两性分子。

180. 根据权利要求 179 所述的组合物,其中所述离子型两性分子为二鲸蜡基磷酸酯。

181. 根据权利要求 175 至 180 中任一权利要求所述的组合物,其中所述微脂粒另外包 含类固醇。

182. 根据权利要求 181 所述的组合物,其中所述类固醇为胆固醇。

183. 根据权利要求 175 所述的组合物,其中所述微脂粒包含 1- 单棕榈酰基甘油、二鲸 蜡基磷酸酯、胆固醇和脱氧胆酸钠。

184. 根据权利要求 175 至 183 中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物另外包 含明矾。

185. 一种治疗患有流行性感 冒或处于流行性感 冒风险中的个体的方法,所述方法包含 向所述个体不经肠授予治疗有效量的根据权利要求 175 至 184 中任一权利要求所述的组 合物。

186. 根据权利要求 185 所述的组合物,其中所述组合物通过肌肉内注射授予。

187. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述 第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 40 个相邻氨基酸。

188. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述 第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-88。

189. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述 第二肽包含 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列。

190. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述 组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。

191. 根据权利要求 190 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。

192. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述 第三肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 90% 同源性的区域。

193. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述 第三肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的 第一区域和与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性

的第二区域。

194. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,而另一者包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。

195. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含 SEQ ID NO. 12 的氨基酸序列,而另一者包含 SEQ ID NO. 13 的氨基酸序列。

196. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $n = 1-4$ 。

197. 根据权利要求 196 所述的组合物,其中 $n = 4$ 。

198. 根据权利要求 162 至 173 或 175 至 184 中任一权利要求所述的组合物,其中:

所述第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-88;

所述组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 4$;

所述组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含 SEQ ID NO. 12 的氨基酸序列,而另一者包含 SEQ ID NO. 13 的氨基酸序列;且

所述组合物包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 4$ 。

治疗流行性感动的组合物和方法

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案主张于 2008 年 6 月 19 日申请的 PCT 专利申请案第 PCT/US08/67471 号和于 2009 年 5 月 29 日申请的美国临时申请案第 61/182614 号的优先权和权利。所述优先权申请案的内容以全文引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 流行性感冒是一种常见的呼吸系统传染性疾物，其与正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) 家族病毒相关联。由于此病毒具有高度变异性，所以通常每年都需要考虑到病毒株变异并经重新调配的疫苗接种。美国 (the United States) 每年所研制的疫苗组合物都由食品与药物管理局疫苗和相关生物制剂咨询委员会部门 (the Department of Food and Drug Administration Vaccines and the Related Biologicals Advisory Committee) 确定。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 也类似地运用一个全球实验室监测网络来检测新的流行性感冒变异体，例如参见拉旺希 (Lavanchy)，疫苗 (Vaccine) 17 :S24 (1999)。进行选择的基础是近来分离的流行性感冒病毒的抗原分析、抗原变异体的传播模式、和近来接种的个体的抗体反应。

[0004] A 和 B 型流行性感冒是引起流行性人类疾病的两种类型流行性感冒病毒。A 型流行性感冒病毒基于以下两种表面抗原进一步分成亚型：血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (N)。B 型流行性感冒病毒未分成亚型。从 1977 年以来，A 型 (H1N1) 流行性感冒病毒、A 型 (H3N2) 流行性感冒病毒和 B 型流行性感冒病毒已在全球范围内进行传播。对于处于由流行性感冒感染所引起的严重疾物和相关并发症的高风险中的个体来说，接种公认是预防或削弱流行性感冒的单一最有效方式。接种由灭活流行性感冒病毒制备的抗原可刺激特异性抗体的产生。但仅仅预防的是那些制成疫苗的病毒株或密切相关的病毒株。

[0005] 每年的疫苗都含有三种病毒株 (通常为两种 A 型和一种 B 型)，这三种病毒株代表着认为在即将到来的冬天可能传播的流行性感冒病毒。当前和出现的流行性感冒病毒株的抗原特征为选择每年的疫苗内所包括的病毒株提供基础。WHO 每年都检查世界流行病学情况，且必要时会基于当前的流行病学证据，提出新的病毒株。

[0006] 尽管重新构成，但疫苗不可能包括世界上在特定季节期间主动感染个体的所有不同病毒株。另外，调配和制备足量的疫苗剂量以应对流感感染的季节性增加也需要花费相对较长的时间。通常制备一种疫苗要花费 6 个月以上。因此，新的或忽略的流行性感冒病毒株可在这 6 个月时间内突显，引发一场流行病。2009 年 4 月，首次检测到新的猪源性 A (H1N1) 型流行性感冒病毒。相较于先前所述的 H1N1 亚型，其为四重基因重配病毒 (quadruple reassortant)。病毒开始是爆发于墨西哥 (Mexico)，但此流行病穿过边界迅速席卷美国和加拿大 (Canada)，目前几乎所有国际上的国家都报道有新的病例。所属领域中对治疗流行性感动的改良组合物和方法仍然存在需要。明确地说，需要针对 WHO 所提出的季节性流行性感冒病毒株和新出现的大流行性感冒病毒株 (例如新的猪源性 A (H1N1) 型流行性感冒病毒) 具有广泛免疫原性的组合物。

发明内容

[0007] 本申请案提供可用于治疗流行性感动的组合物和方法。如本文所述,所述组合物和方法是基于对流行性感动显示免疫原性的肽和肽组合的研制。

[0008] 在一些实施例中,肽组合诱发针对多个流行性感动病毒株,例如季节性流行性感动病毒株或甚至新的猪源性 A(H1N1) 型大流行性感动病毒的保护性反应。

[0009] 在一些实施例中,组合物不经肠授予(例如通过肌肉内注射)。在一些实施例中,不经肠组合物包括包含非离子型表面活性剂的微脂粒(vesicle)。在一些实施例中,不经肠组合物包括 TLR-4 激动剂佐剂。在一些实施例中,不经肠组合物中所存在的至少一部分 TLR-4 激动剂佐剂与微脂粒物理缔合。

[0010] 虽然目前流行性感动疫苗局限于上述不经肠投药途径(例如肌肉内注射),但我们已经鉴别出经口授予时诱发保护性反应的组合物。因此,在一些实施例中,组合物经口授予。在一些实施例中,口服组合物包括胆汁盐体(bilosome)。在一些实施例中,口服组合物包括 TLR-3 激动剂佐剂。在一些实施例中,口服组合物中所存在的至少一部分 TLR-3 激动剂佐剂与胆汁盐体物理缔合。

附图说明

[0011] 图 1A-B 展示如竞争微量中和分析所检测,示范性肽组合物的特异性。稀释人类血清,并与所选肽组合物一起培育,随后与流行性感动病毒一起培育。培育后,加入 MDCK(马丁-达比狗肾(Madin-Darby Canine Kidney))细胞,且培养板在 18-22 个小时后显影。(A) 使用人类血清,检测针对新喀里多尼亚流行性感动(influenza New Caledonia)(A/NC/20/99)的竞争微量中和。(B) 使用人类血清,检测针对威斯康星流行性感动(influenza Wisconsin)(A/Wis/67/05)的竞争微量中和。

[0012] 图 2 展示如 IFN γ -ELISPOT 分析所检测,由示范性肽组合物所引发的细胞介导的免疫反应,表示为每百万个细胞的斑点形成细胞(SFC)。在所选肽存在下培养流行性感动接种个体的周围血液单核细胞(PBMC)。2 天后,培养板显影,且放大并计数每孔中的斑点数目。

[0013] 图 3 展示相较于未接种的对照动物,接种肽组合物 INF-61P 的动物中用 1×10^6 个空斑形成单位(pfu)的 H3N2(A/威斯康星/2005)病毒激发后 10 天时间内的中值日发热计数。发热计数定义为动物每分钟的体温为 40°C 或 40°C 以上;每 3 小时计算每组 4 只动物的中值发热计数。对照和接种动物具有类似的起始体温(参见第 0 天)。

[0014] 图 4 展示相较于未接种的对照动物,接种肽组合物 INF-61P 的动物中用 1×10^6 个 pfu 的 H3N2(A/威斯康星/2005)病毒激发后 10 天时间内的重量损失。

[0015] 图 5 展示在经肽组合物 INF-61P 免疫的雪貂的直肠洗液(上图)和鼻洗液样品(下图)中可见的针对流行性感动病毒的粘膜 IgA 反应(流感灵(FLUVIRAL))。资料表示为每只动物中相对于接种前反应的增加倍数,且相对于不同样品中所存在的 IgA 总量标准化。还提供用市售流行性感动疫苗(流感灵)获得的比较资料。

[0016] 图 6 展示在经肽组合物 SFV2 免疫的雪貂血清中可见的针对 B 型流行性感动(俄亥俄州(Ohio))的重组 HA 蛋白质的血清 IgA 反应。成对的左列和右列分别展示每只动物

接种前和接种后血清样品中通过 ELISA 所测得的反应（报道为光学密度）。在动物 4850 号和 4860 号中可以看到强阳性反应。

[0017] 图 7 展示以脂质化肽组合物 INF-09L-A 诱发的广泛反应性细胞 (CTL) 免疫。用组合物接种成年 (> 12 个月) HLA (A*0201) 转基因小鼠三次, 此组合物靶向 A 型流行性感冒的核蛋白中的可变区。组合物还包括明矾 (alum) 佐剂。对照组仅仅接收佐剂。用多个亚型的不同流行性感冒病毒株来感染脾细胞: H3N2 (A/HK/1/18、A/ 维多利亚 (Victoria)/3/75) 和 H1N1 (A/NC/20/99、A/PR/8/34)。斑点表示对各病毒株具有特异性的 IFN γ 分泌 T 细胞的频率, 且误差线表示每组小鼠中的标准偏差 (n = 3)。结果从左至右如下呈现: H3N2 (A/HK/1/18)、H3N2 (A/ 维多利亚 /3/75) 和 H1N1 (A/NC/20/99) 和 H1N1 (A/PR/8/34)。

[0018] 图 8 展示在有或者没有 TLR-3 激动剂佐剂 (poly I:C) 下对经口授予的肽组合物的免疫反应。小鼠 (每组 n = 4) 经口免疫 4 次 (第 0、3、14 和 17 天)。接种后收获脾细胞, 并在活体外用相同肽组合物刺激。使用 IFN γ ELISPOT 分析测量反应。如图 8 中所示, 接收佐剂的动物反应比接收单独疫苗的动物反应大得多。

[0019] 图 9 展示 SEQ ID NO 16、17 和 18 的序列。

[0020] 图 10A-B 展示针对 A 型流行性感冒以下亚型的重组血凝素 (rHA) 蛋白质的血清 IgG 反应 (通过 ELISA 来测量): (A/ 所罗门岛 (Solomon Island)/03/06) H1N1 或 (A/ 威斯康星 /67/05) H3N2, 在经肌肉内授予的肽组合物 SFV2 免疫的雪貂中测量。免疫后血清显示, 对于经肌肉内授予的肽组合物 SFV2 免疫的雪貂, ELISA 中对 rHA 所罗门 (A) 与威斯康星 (B) 的免疫反应均为显著的。未检测到针对 B 型流行性感冒 (B/ 马来西亚 (Malaysia)/2506/04) 的 rHA 的 IgG 反应 (资料未示)。还提供用市售流行性感冒疫苗 (凡尔灵 (VAXIGRIP)) 获得的比较资料。

[0021] 图 11 展示经肌肉内授予的肽组合物 SFV2 免疫, 接着经受病毒激发的雪貂鼻洗液的病毒载量。用免疫原性肽组合物 SFV2 接种动物, 且用 2×10^5 个 pfu H1N1 (A/ 所罗门岛 /03/06) 激发, 并在病毒血症最高峰 (第 2 天) 时通过空斑分析来测量鼻洗液样品的病毒载量。各符号表示个别动物中所测得的病毒载量。还提供用市售流行性感冒疫苗 (凡尔灵) 获得的比较资料。

[0022] 图 12 展示经肌肉内授予的肽组合物 SFV2 免疫的雪貂中针对潜在大流行性感冒病毒株的体液免疫。在接种两周后 (在病毒激发前) 从动物中收集血清, 并通过 ELISA 来测试样品与假定大流行性猪 (H1N1/ 加利福尼亚 (California)/2009) 分离株的重组血凝素 (rHA) 蛋白质的反应性。还提供用市售流行性感冒疫苗 (凡尔灵) 获得的比较资料。

[0023] 图 13 展示示范性 TLR-4 激动剂佐剂 PHAD (来自亚拉巴马州 (AL) 阿拉巴斯特市 (Alabaster) 的雅凡蒂极性脂质公司 (Avanti Polar Lipids, Inc.) 的磷酸化己酰二糖) 的化学结构。

[0024] 图 14 展示另一示范性 TLR-4 激动剂佐剂 (来自亚拉巴马州阿拉巴斯特市的雅凡蒂极性脂质公司) 二 [3- 脱氧 -D- 甘露 - 辛酮糖酰基] - 脂质 A (铵盐) 的化学结构。

具体实施方式

[0025] 定义

[0026] 整个本申请案中, 采用若干个如以下段落中所定义的术语。

[0027] 如本文所用的术语“免疫反应”是指在动物中引起的反应。免疫反应可指细胞免疫、体液免疫或可包含两者。免疫反应也可限于免疫系统的一部分。举例来说,在一些实施例中,免疫原性组合物可诱发 IFN γ 反应增加。在一些实施例中,免疫原性组合物可诱发粘膜 IgA 反应(例如在鼻和 / 或直肠洗液中测量)。在一些实施例中,免疫原性组合物可诱发全身性 IgG 反应(例如在血清中测量)。

[0028] 如本文所用的术语“免疫原性”意指能够使在宿主动物中对非宿主实体(例如流行性感病毒)产生免疫反应。在一些实施例中,此免疫反应构成由针对特定传染性有机体(例如流行性感病毒)的疫苗引起的保护性免疫的基础。

[0029] 如本文所用的术语“肽”是指一串至少三个通过肽键连接在一起的氨基酸。一般说来,肽中氨基酸的数目没有上限。肽一般仅含有天然氨基酸;然而,可包括非天然氨基酸(即天然不存在,但可并入多肽链中的氨基酸)。本发明肽中的一个或一个以上氨基酸也可以例如通过添加例如碳水化合物基团、磷酸酯基、法呢基、异法呢基、脂肪酸基、用于结合、官能化或其它修饰的连接子等化学实体来修饰。在各个实施例中,修饰可产生更稳定的肽(例如活体内半衰期更长)。合适的修饰可包括环化肽、并入 D-氨基酸等。在各个实施例中,修饰可产生免疫原性更强的肽。合适的修饰可包括共价连接一个或一个以上脂质(例如但不限于软脂酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基、月桂酰基、辛酰基、癸酰基等)、融合于载体蛋白(例如但不限于结核菌素纯蛋白衍生物 (purified protein derivative of tuberculin, PPD)、破伤风类毒素 (tetanus toxoid)、霍乱毒素 (cholera toxin) 和其 B 亚单位、卵白蛋白、牛血清白蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂、胞壁酰二肽和其类似物、细胞因子或其片段等)等。

[0030] 如本文所用的术语“同源性百分比”是指如本申请案中所定义的最佳比对后两种序列之间的序列一致性百分比。如果在经比对以达成如下所述的最大对应时两种序列中的氨基酸序列相同,那么可以说两种氨基酸序列“一致”。通常通过在一个区域或“比较窗”上比较两种最佳比对序列的序列以鉴别和比较序列相似性区域,进行两种氨基酸序列之间的序列比较。用于比较的序列可以通过史密斯 (Smith) 和沃特曼 (Waterman), 应用数学进展 (Ad. App. Math.) 2 :482 (1981) 的局部同源性算法,通过尼德曼 (Neddleman) 和伍兹 (Wunsch), 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 48 :443 (1970) 的同源性比对算法,通过皮尔森 (Pearson) 和李普曼 (Lipman), 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85 : 2444 (1988) 的相似法探究,通过这些算法的计算机化执行或通过目测来进行最佳比对。

[0031] 通过在比较窗上比较两个最佳比对的序列来测定“序列一致性百分比”,其中比较窗中的部分氨基酸序列可包含相较于参考序列(不包含添加或缺失)的添加或缺失(即间隙),以最佳比对两个序列。此百分比如下计算:通过测定两个序列中相同氨基酸残基所在位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中总位置数并将此结果乘以 100,得到序列一致性百分比。以上所给出的序列一致性定义是所属领域的技术人员所使用的定义。定义自身不需要任何算法的帮助。所述算法仅仅是有助于促进序列的最佳比对,而不是计算序列一致性。由所述定义可见两个比较序列之间只存在明确的一个序列一致性值,此值对应于针对最佳比对所获得的值。

[0032] 如本文所用的术语“治疗有效量”是指足以在所治疗个体中展示有意义益处的量。免疫原性组合物的治疗有效量可视例如所需生物学终点、组合物的性质、投药途径、所治疗

个体的健康、体型和 / 或年龄等因素而变化。

[0033] 如本文所用的术语“治疗”是指免疫原性组合物授予患有流行性感、具有流行性感症状或具有发展成流行性感冒的诱因的个体,以达到缓和、减轻、改变、改善、好转或影响流行性感、流行性感症状或发展成流行性感冒的诱因的目的。在一些实施例中,术语“治疗”是指接种个体。

[0034] 一些实施例的详细描述

[0035] 本申请案提供可用于治疗流行性感冒的组合物和方法。如本文所述,所述组合物和方法是基于对流行性感显示免疫原性的肽和肽组合的研制。

[0036] 在一些实施例中,肽组合诱发针对多个流行性感病毒株,例如季节性流行性感病毒株或甚至新的猪源性 A(H1N1) 型大流行性感病毒的保护性反应。

[0037] 在一些实施例中,组合物不经肠授予(例如通过肌肉内注射)。在一些实施例中,组合物包括 TLR-4 激动剂佐剂。在一些实施例中,组合物包括包含非离子型表面活性剂的微脂粒。在一些实施例中,组合物中所存在的至少一部分 TLR-4 激动剂佐剂与微脂粒物理缔合。

[0038] 虽然目前流行性感疫苗局限于上述不经肠投药途径(例如肌肉内注射),但我们已经鉴别出经口授予时诱发保护性反应的组合物。因此,在一些实施例中,组合物经口授予。在一些实施例中,组合物包括 TLR-3 激动剂佐剂。在一些实施例中,组合物包括胆汁盐体。在一些实施例中,组合物中所存在的至少一部分 TLR-3 激动剂佐剂与胆汁盐体物理缔合。

[0039] I. 肽

[0040] 一方面,本申请案提供可单独或组合使用,产生用于治疗流行性感冒的免疫原性组合物的肽。应了解,任何所述肽都包括在免疫原性组合物中,且本申请案涵盖包括所述肽的任何排列或组合的组合物。下文第 II 部分将描述一些示范性肽组合。

[0041] A 型流行性感血凝素 (HA) 亚型 1(H1) 肽

[0042] 实例中的表 2-6 描述来源于 A 型流行性感血凝素 (HA) 亚型 1(H1) 蛋白质的若干种肽的氨基酸序列。如表 2-5 和序列表中所示,一些肽是常见一致序列的变异体。

[0043] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 2(参见表 2) 的至少 20 个相邻氨基酸的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 2 的一致序列所描述的任一变异序列的任何 20 个相邻氨基酸。在一些实施例中,肽可包含 SEQ ID NO. 2 的至少 21、22、23、24、25 或 26 个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7 或 8 种包含 SEQ ID NO. 2 的至少 20 个相邻氨基酸的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 2 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-3$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。

[0044] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 3(参见表 3) 的至少 20 个相邻氨基酸的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 3 的一致序列所描述的任一变异序列的任何 20 个相邻氨基酸。在一些实施例中,肽可包含 SEQ ID NO. 3 的至少 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 或 33 个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7 或 8 种包含 SEQ ID

NO. 3 的至少 20 个相邻氨基酸的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 3 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-3$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。

[0045] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 4(参见表 4) 的至少 20 个相邻氨基酸的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 4 的一致序列所描述的任何 20 个相邻氨基酸。在一些实施例中,肽可包含 SEQ ID NO. 4 的至少 21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3 或 4 种包含 SEQ ID NO. 4 的至少 20 个相邻氨基酸的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 4 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-2$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。

[0046] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 5(参见表 5) 的至少 20 个相邻氨基酸的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 5 的一致序列所描述的任何 20 个相邻氨基酸。在一些实施例中,肽可包含 SEQ ID NO. 5 的至少 21、22、23、24、25、26、27、28 或 29 个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7 或 8 种包含 SEQ ID NO. 5 的至少 20 个相邻氨基酸的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 5 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-3$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。

[0047] 在一些实施例中,本申请案提供包含与 SEQ ID NO. 6(参见表 6) 的至少 40 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域的肽。在一些实施例中,同源性可为至少 85%、90%、95%或 99%。

[0048] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 6 的至少 40 个相邻氨基酸的肽。在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 6 的至少 50、60、70 或 80 个相邻氨基酸的肽。因此,肽可包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-81。肽也可包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 82-88。在一些实施例中,肽可包含 SEQ ID NO. 6 的整个序列。在其它实施例中,肽可基本上由 SEQ ID NO. 6 组成。在其它实施例中,肽可由 SEQ ID NO. 6 组成。

[0049] 除上述外,本申请案还提供包含与 SEQ ID NO. 16(参见图 9) 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域的肽种类,其中所述肽包括来自 A 型流行性感凝血凝素 (HA) 蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。此种类涵盖上述其它 H1 肽。在一些实施例中,肽可包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 85%、90%、95%或 99%同源性的区域。在一些实施例中,肽可包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-50 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。在一些实施例中,肽可包含与 SEQ ID NO. 16 的 50-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。

[0050] 在一些实施例中,任何上述 H1 肽都可包含少于 30 个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的肽也可以包含在较大肽中。

[0051] A 型流行性感凝血凝素 (HA) 亚型 3(H3) 肽

[0052] 实例中的表 9-11 描述来源于 A 型流行性感凝血凝素 (HA) 亚型 3(H3) 蛋白质的若干种肽的氨基酸序列。如表 9-11 和序列表中所示,这些肽都是 SEQ ID NO. 17(参见图 9)

的一致序列的变异体。

[0053] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 17 的序列的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 17 的一致序列所描述的任一变异序列。

[0054] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 9 (参见表 9) 的序列的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 9 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 9 的序列的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 9 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 9 的氨基酸序列组成的肽。

[0055] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 10 (参见表 10) 的序列的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 10 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 10 的序列的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 10 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 10 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 10 的氨基酸序列组成的肽。

[0056] 在一些实施例中,本申请案提供包含 SEQ ID NO. 11 (参见表 11) 的序列的肽。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 11 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 11 的序列的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列组成的肽。

[0057] 在一些实施例中,任何上述 H3 肽都可包含少于 30 个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的肽也可以包含在较大肽中。

[0058] 实例中的表 7 描述来源于 A 型流行性感胃血凝素 (HA) 亚型 3 (H3) 蛋白质的另一种肽的氨基酸序列。本申请案提供包含与 SEQ ID NO. 7 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域的肽,其中所述肽包括来自 A 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。在一些实施例中,肽可包含与 SEQ ID NO. 7 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同源性的区域。在一些实施例中,肽可包含与 SEQ ID NO. 7 的至少 50、60、70 或 80 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域。在一些实施例中,肽可包含 SEQ ID NO. 7 的整个序列。在其它实施例中,肽可基本上由 SEQ ID NO. 7 组成。在其它实施例中,肽可由 SEQ ID NO. 7 组成。在一些实施例中,肽可包含少于 100 个的氨基酸,例如少于 90、80、70、60、50 或 40 个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的肽也可以包含在较大肽中。

[0059] B型流行性感胃血凝素(HA)肽

[0060] 实例中的表8和12描述来源于B型流行性感胃血凝素(HA)蛋白质的若干种肽的氨基酸序列。

[0061] 在一些实施例中,本申请案提供包含与SEQ ID NO.18(参见图9)的位置2-49或68-121的至少20个相邻氨基酸具有至少80%同源性的区域的肽,其中所述肽包括来自B型流行性感胃血凝素蛋白质的少于100个的相邻氨基酸。在一些实施例中,肽可包含与SEQ ID NO.18的位置2-49或68-121的至少20个相邻氨基酸具有至少85%、90%、95%或99%同源性的区域。在一些实施例中,肽可包含与SEQ ID NO.18的位置2-49或68-121的至少25、30、35、40或45个相邻氨基酸具有至少80%同源性的区域。

[0062] 在一些实施例中,肽可包含与SEQ ID NO.12(参见表12)的整个序列具有至少80%同源性的区域。在一些实施例中,同源性程度可为至少85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,肽可包含SEQ ID NO.12的整个序列。在一些实施例中,肽可基本上由SEQ ID NO.12组成。在一些实施例中,肽可由SEQ ID NO.12组成。

[0063] 在一些实施例中,肽可包含与SEQ ID NO.13(参见表12)的整个序列具有至少80%同源性的区域。在一些实施例中,同源性程度可为至少85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,肽可包含SEQ ID NO.13的整个序列。在一些实施例中,肽可基本上由SEQ ID NO.13组成。在一些实施例中,肽可由SEQ ID NO.13组成。

[0064] 在一些实施例中,肽可包含与SEQ ID NO.18的位置2-49的至少20个相邻氨基酸具有至少80%同源性的第一区域和与SEQ ID NO.18的位置68-121的至少20个相邻氨基酸具有至少80%同源性的第二区域。在一些实施例中,同源性可更高,例如至少85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,第一和/或第二区域中的同源性可覆盖SEQ ID NO.18的位置2-49或68-121的至少25、20、35、40或45个相邻氨基酸。

[0065] 在一些实施例中,肽可包含与SEQ ID NO.8(参见表8)的整个序列具有至少80%同源性的区域。在一些实施例中,同源性程度可为至少85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,肽可包含SEQ ID NO.8的整个序列。在其它实施例中,肽可基本上由SEQ ID NO.8的序列组成,或由SEQ ID NO.8的序列组成。

[0066] 在一些实施例中,任何上述的B型HA肽都可包含少于100个的氨基酸,例如少于90、80、70、60、50或40个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的肽也可以包含在较大肽中。

[0067] A型流行性感胃核蛋白(NP)肽

[0068] 实例中的表13和14描述来源于A型流行性感胃核蛋白(NP)的若干种肽的氨基酸序列。表13中的肽是SEQ ID NO.14的一致序列的变异体。表14中的肽是SEQ ID NO.15的一致序列的变异体。

[0069] 在一些实施例中,本申请案提供包含SEQ ID NO.14(参见表13)的序列的肽,其中所述肽包括来自A型流行性感胃核蛋白的少于20个的相邻氨基酸。应了解,涵盖由SEQ ID NO.14的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16种包含SEQ ID NO.14的序列的不同肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含SEQ ID NO.14的不同氨基酸序列的不同肽,其中 $n = 1-4$ 。在

一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列组成的肽。

[0070] 在一些实施例中, 本申请案提供包含 SEQ ID NO. 15 (参见表 14) 的序列的肽, 其中所述肽包括来自 A 型流行性感胃核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。应了解, 涵盖由 SEQ ID NO. 15 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此, 在一些实施例中, 免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 15 的序列的不同肽。在一些实施例中, 免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同肽, 其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 15 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 15 的氨基酸序列组成的肽。

[0071] 在一些实施例中, 任何上述 NP 肽都可包含少于 30 个的氨基酸。然而, 如本文所讨论, 在一些实施例中, 包含任一确定区域的肽也可以包含在较大肽中。

[0072] 其它流行性感胃肽

[0073] 本申请案提供包括来自一种以上流行性感胃蛋白质的序列的其它肽。因此, 在一些实施例中, 本申请案提供包含 SEQ ID NO. 1 (参见表 1) 的氨基酸序列的肽。如表 1 和序列表中所示, SEQ ID NO. 1 为一致序列。一致序列来源于 B 型流行性感胃 HA 蛋白质和 A 型流行性感胃 HA H3 蛋白质中的序列。应了解, 涵盖由 SEQ ID NO. 1 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述肽的免疫原性组合物。因此, 在一些实施例中, 免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 1 的序列的不同肽。在一些实施例中, 免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 1 的不同氨基酸序列的不同肽, 其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列组成的肽。还应了解, 在一些实施例中, 肽可包含少于 30 个的氨基酸。然而, 如本文所讨论, 在一些实施例中, 包含任一确定区域的肽也可以包含在较大肽中。

[0074] II. 肽组合

[0075] 一方面, 本申请案提供包括第 I 部分中所描述肽的组的免疫原性组合物。应了解, 以下示范性组合没有限制性, 且本申请案涵盖第 I 部分中所描述肽的所有变更和组合。还应了解, 其它肽 (包括现有流行性感胃疫苗中发现的传统流行性感胃蛋白质抗原) 可加入本文所述的任何免疫原性组合物中。在一些实施例中, 免疫原性组合物中的每种肽都独立地具有免疫原性。

[0076] 在一些实施例中, 至少一种肽包含具有 20 个或 20 个以上来自非流行性感胃蛋白质的相邻氨基酸的区域。在一些实施例中, 每种肽都包含具有 20 个或 20 个以上来自非流行性感胃蛋白质的相邻氨基酸的区域。在一些实施例中, 组合物的至少两种肽存在于单个蛋白质内。

[0077] 在一些实施例中, 本申请案提供包括来自第 I 部分的一种或一种以上 A 型流行性感胃 HA H1 肽和一种或一种以上 A 型流行性感胃 HA H3 肽的免疫原性组合物。

[0078] 在一些实施例中,本申请案提供包括来自第 I 部分的一种或一种以上 A 型流行性感 冒 HA H1 肽和一种或一种以上 B 型流行性感 冒 HA 肽的免疫原性组合物。

[0079] 在一些实施例中,本申请案提供包括来自第 I 部分的一种或一种以上 A 型流行性感 冒 HA H3 肽和一种或一种以上 B 型流行性感 冒 HA 肽的免疫原性组合物。

[0080] 在一些实施例中,本申请案提供包括来自第 I 部分的一种或一种以上 A 型流行性感 冒 HA H1 肽、一种或一种以上 A 型流行性感 冒 HA H3 肽和一种或一种以上 B 型流行性感 冒 HA 肽的免疫原性组合物。

[0081] 在一些实施例中,来自第 I 部分的一种或一种以上 A 型流行性感 冒 NP 肽可包括在 任一上述组合中。

[0082] 在一些实施例中,本申请案提供包含以下的免疫原性组合物:第一肽,其包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中第一肽包括来自 A 型流行性感 冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;第二肽,其包含 SEQ ID NO. 17 的 氨基酸序列;和第三肽,其包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中第三肽包括来自 B 型流行性感 冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸。在一些实施例中,第一肽和第三肽包含少于 100 个的氨基酸,且第 二肽包含少于 30 个的氨基酸。

[0083] 在一些实施例中,还包括包含 SEQ ID NO. 14 或 15 的氨基酸序列的第四肽,其中第 四肽包括来自 A 型流行性感 冒核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。

[0084] 示范性第一肽 (A 型流行性感 冒 HA H1)

[0085] 在一些实施例中,第一肽可包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至 少 85%、90%、95%或 99%同源性的区域。在一些实施例中,第一肽可包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-50 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。在一些实施例中,第一肽可包含与 SEQ ID NO. 16 的 50-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。

[0086] 在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 2 (参见表 2) 的至少 20 个相邻氨基酸。 应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 2 的一致序列所描述的任一变异序列的任何 20 个相邻氨基酸。 在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 2 的至少 21、22、23、24、25 或 26 个相邻氨基酸。 本申请案还提供包含两种或两种以上所述第一肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中, 免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7 或 8 种包含 SEQ ID NO. 2 的至少 20 个相邻氨基酸 的不同第一肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 2 的不 同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-3$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。

[0087] 在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 3 (参见表 3) 的至少 20 个相邻氨基酸。 应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 3 的一致序列所描述的任一变异序列的任何 20 个相邻氨基酸。 在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 3 的至少 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、 32 或 33 个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第一肽的免疫原性组 合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7 或 8 种包含 SEQ ID NO. 3 的至少 20 个相邻氨基酸的不同第一肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自 包含 SEQ ID NO. 3 的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-3$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。

[0088] 在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 4(参见表4)的至少20个相邻氨基酸。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 4的一致序列所描述的任一变异序列的任何20个相邻氨基酸。在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 4的至少21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第一肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含2、3或4种包含 SEQ ID NO. 4的至少20个相邻氨基酸的不同第一肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 4的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-2$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。

[0089] 在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 5(参见表5)的至少20个相邻氨基酸。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 5的一致序列所描述的任一变异序列的任何20个相邻氨基酸。在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 5的至少21、22、23、24、25、26、27、28或29个相邻氨基酸。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第一肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含2、3、4、5、6、7或8种包含 SEQ ID NO. 5的至少20个相邻氨基酸的不同第一肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 5的不同氨基酸序列的不同第一肽,其中 $n = 1-3$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。

[0090] 在一些实施例中,第一肽可包含与 SEQ ID NO. 6(参见表6)的至少40个相邻氨基酸具有至少80%同源性的区域。在一些实施例中,同源性可为至少85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 6的至少40个相邻氨基酸。在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 6的至少50、60、70或80个相邻氨基酸。因此,第一肽可包含 SEQ ID NO. 6的氨基酸1-81。第一肽也可包含 SEQ ID NO. 6的氨基酸82-88。在一些实施例中,第一肽可包含 SEQ ID NO. 6的整个序列。在其它实施例中,第一肽可基本上由 SEQ ID NO. 6组成。在其它实施例中,第一肽可由 SEQ ID NO. 6组成。

[0091] 在一些实施例中,任何上述第一肽都可包含少于30个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的第一肽也可以包含在较大肽中。

[0092] 示范性第二肽(A型流行性感冒 HA H3)

[0093] 在一些实施例中,第二肽可包含 SEQ ID NO. 17的序列。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 17的一致序列所描述的任一变异序列。

[0094] 在一些实施例中,第二肽可包含 SEQ ID NO. 9(参见表9)的序列。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 9的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第二肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16种包含 SEQ ID NO. 9的序列的不同第二肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 9的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 9的氨基酸序列组成的第二肽。

[0095] 在一些实施例中,第二肽可包含 SEQ ID NO. 10(参见表10)的序列。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 10的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第二肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含2、3、4、

5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 10 的序列的不同第二肽。在一些实施例中，免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 10 的不同氨基酸序列的不同第二肽，其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中， $n = 1$ 。在一些实施例中， $n = 2$ 。在一些实施例中， $n = 3$ 。在一些实施例中， $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 10 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 10 的氨基酸序列组成的第二肽。

[0096] 在一些实施例中，第二肽可包含 SEQ ID NO. 11 (参见表 11) 的序列。应了解，涵盖由 SEQ ID NO. 11 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第二肽的免疫原性组合物。因此，在一些实施例中，免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 11 的序列的不同第二肽。在一些实施例中，免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽，其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中， $n = 1$ 。在一些实施例中， $n = 2$ 。在一些实施例中， $n = 3$ 。在一些实施例中， $n = 4$ 。应了解本申请案还提供基本上由 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列组成的第二肽。

[0097] 在一些实施例中，任何上述第二肽都可包含少于 30 个的氨基酸。然而，如本文所讨论，在一些实施例中，包含任一确定区域的第二肽也可以包含在较大肽中。

[0098] 示范性第三肽 (B 型流行性感冒 HA)

[0099] 在一些实施例中，第三肽可包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同源性的区域。在一些实施例中，第三肽可包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 25、30、35、40 或 45 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域。

[0100] 在一些实施例中，第三肽可包含与 SEQ ID NO. 12 (参见表 12) 的整个序列具有至少 80% 同源性的区域。在一些实施例中，同源性程度可为至少 85%、90%、95% 或 99%。在一些实施例中，第三肽可包含 SEQ ID NO. 12 的整个序列。在一些实施例中，第三肽可基本上由 SEQ ID NO. 12 组成。在一些实施例中，第三肽可由 SEQ ID NO. 12 组成。

[0101] 在一些实施例中，第三肽可包含与 SEQ ID NO. 13 (参见表 12) 的整个序列具有至少 80% 同源性的区域。在一些实施例中，同源性程度可为至少 85%、90%、95% 或 99%。在一些实施例中，第三肽可包含 SEQ ID NO. 13 的整个序列。在一些实施例中，第三肽可基本上由 SEQ ID NO. 13 组成。在一些实施例中，第三肽可由 SEQ ID NO. 13 组成。

[0102] 在一些实施例中，第三肽可包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的第一区域和与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的第二区域。在一些实施例中，同源性可更高，例如至少 85%、90%、95% 或 99%。在一些实施例中，第一区域和 / 或第二区域中的同源性可覆盖 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 25、20、35、40 或 45 个相邻氨基酸。

[0103] 在一些实施例中，第三肽可包含与 SEQ ID NO. 8 的整个序列具有至少 80% 同源性的区域。在一些实施例中，同源性程度可为至少 85%、90%、95% 或 99%。在一些实施例中，第三肽可包含 SEQ ID NO. 8 的整个序列。在其它实施例中，第三肽可基本上由 SEQ ID NO. 8 的序列组成，或由 SEQ ID NO. 8 的序列组成。

[0104] 在一些实施例中，免疫原性组合物可包括两种不同的第三肽，其中一者包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域，而另一者包含

与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域。在一些实施例中,所述肽的一或两者中同源性程度可为至少 85%、90%、95%或 99%。

[0105] 在一些实施例中,任何上述第三肽都可包含少于 100 个的氨基酸,例如少于 90、80、70、60、50 或 40 个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的第三肽也可以包含在较大肽中。

[0106] 示范性第四肽 (A 型流行性感冒 NP)

[0107] 在一些实施例中,任选的第四肽可包含 SEQ ID NO. 14 (参见表 13) 的序列。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 14 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第四肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 14 的序列的不同第四肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解免疫原性组合物也可包括基本上由 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列组成的第四肽。

[0108] 在一些实施例中,任选的第四肽可包含 SEQ ID NO. 15 (参见表 14) 的序列。应了解,涵盖由 SEQ ID NO. 15 的一致序列所描述的任一变异序列。本申请案还提供包含两种或两种以上所述第四肽的免疫原性组合物。因此,在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种包含 SEQ ID NO. 15 的序列的不同第四肽。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 1$ 。在一些实施例中, $n = 2$ 。在一些实施例中, $n = 3$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。应了解免疫原性组合物也可包括基本上由 SEQ ID NO. 15 的氨基酸序列组成、或由 SEQ ID NO. 15 的氨基酸序列组成的第四肽。

[0109] 在一些实施例中,任何上述第四肽都可包含少于 30 个的氨基酸。然而,如本文所讨论,在一些实施例中,包含任一确定区域的第四肽也可以包含在较大肽中。

[0110] 示范性肽组合

[0111] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 80%同源性的区域的第一肽、包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 80%同源性的区域的第三肽、和 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9、10 或 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一个实施例中,第二肽各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列。在一个实施例中, $n = 4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中, $m = 4$ 。

[0112] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 90%同源性的区域的第一肽、包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 90%同源性的区域的第三肽、和 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9、10 或 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一个实施例中,第二肽各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列。在一个实施例中, $n = 4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中, $m = 4$ 。

[0113] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括包含与 SEQ ID NO. 6 具有至少 95%同源性的区域的第一肽、包含与 SEQ ID NO. 8 具有至少 95%同源性的区域的第三肽、和 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9、10 或 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一个实施例中,第二肽各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列。在一个实施例中, $n = 4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中, $m = 4$ 。

[0114] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括包含 SEQ ID NO. 6 的第一肽、包含 SEQ ID NO. 8 的第三肽、和 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 9、10 或 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一个实施例中,第二肽各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列。在一个实施例中, $n = 4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中, $m = 4$ 。

[0115] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括基本上由 SEQ ID NO. 6 组成的第一肽、基本上由 SEQ ID NO. 8 组成的第三肽、和 2^n 种各自基本上由 SEQ ID NO. 9、10 或 11 的不同氨基酸序列组成的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一个实施例中,第二肽各自基本上由 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列组成。在一个实施例中, $n = 4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自基本上由 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列组成的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自基本上由 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列组成的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中, $m = 4$ 。

[0116] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括由 SEQ ID NO. 6 组成的第一肽、由 SEQ ID NO. 8 组成的第三肽、和 2^n 种各自由 SEQ ID NO. 9、10 或 11 的不同氨基酸序列组成的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一个实施例中,第二肽各自由 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列组成。在一个实施例中, $n = 4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自由 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列组成的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中,组合物另外包含 2^m 种各自由 SEQ ID NO. 15 的不同氨基酸序列组成的不同第四肽,其中 $m = 1-4$ 。在一个实施例中, $m = 4$ 。

[0117] III. 肽合成

[0118] 本文所述的肽可使用所属领域中的任何已知方法(包括重组方法)合成。在各个实施例中,肽可通过固相肽合成法(SPPS)来合成。在 SPPS 中,C 端氨基酸通过与连接分子所形成的酸不稳定键连接于固相(通常为交联树脂,例如含聚苯乙烯或聚乙二醇的树脂)。所用固相一般不溶于合成所用的溶剂中,从而可相对简单且快速地冲洗掉过量的试剂和副产物。N 端用在酸中稳定,但可通过碱来除去的保护基(例如 Fmoc 基团)保护。侧链官能团用碱稳定而酸不稳定的基团保护。SPSS 技术接着包含将 N- α 上经保护的氨基酸并入生长肽链中,而 C 端仍然连接于固相。实例 1 描述示范性 SPSS 工艺。

[0119] 一般说来,此工艺可自动操作,且市售装置可用于常规合成长度为 20 个或 20 个以上氨基酸的肽。当制备长肽(例如长度超过 40 个氨基酸)时,可证明适宜在一系列通过使用适当保护基接合的片段中产生肽。

[0120] 如本文所述,某些肽组合物可包括单个肽序列的多个变体(例如在相同序列中

的 2 个或 2 个以上位置具有 2 个或 2 个以上不同氨基酸)。虽然指定组中的各变异体可个别合成,但通常适宜在单一合成中合成变异体子集或整组变异体。在各个实施例中,此可使用分开-组合法(split-combine method)实现。因此,如果此组变异体经设计以在指定位置包括两种不同氨基酸的一种,那么树脂可分成两个同等部分,且各部分可与两种氨基酸的一种偶合,形成两种不同的肽链。一旦偶合结束,即可将两个部分重新组合,以便后来的氨基酸可加入两链中。或者,可使用一锅法,其中两个替代性氨基酸加入同一反应中。通常两种氨基酸以等摩尔量加入;然而,在某些情况下(例如在其各别反应动力学差异显著的情况下),优选非等摩尔量。接着可使用凯撒茛三酮试验(Kaiser ninhydrin test)监测肽反应是否结束。

[0121] 以下参考文献描述制备肽混合物的一些示范性方法:霍顿(Houghten),美国国家科学院院刊 82:5131(1985);盖森(Geysen)等人,美国国家科学院院刊 81:3998(1984)和美国专利第 5,010,175 号。

[0122] IV. 佐剂

[0123] 在一些实施例中,免疫原性组合物可包括一种或一种以上佐剂。如所属领域中所熟知,佐剂是增强免疫反应的试剂。佐剂为所属领域中所熟知(例如参见“疫苗设计:亚单位和佐剂方法(Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach)”,制药学生物技术(Pharmaceutical Biotechnology),第 6 卷,鲍威尔(Powell)和纽曼(Newman)编,普莱南出版社(Plenum Press),纽约(New York)和伦敦(London),1995)。

[0124] 示范性佐剂包括完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)、角鲨烯、角鲨烷和明矾(氢氧化铝),所述佐剂都是所属领域中熟知的物质且可从若干来源购得。在一些实施例中,铝或钙盐(例如氢氧化物或磷酸盐)可用作佐剂。明矾(氢氧化铝)已用于许多现有的疫苗中。通常每一剂量可包括约 40 至约 700 μg 的铝。

[0125] 在各个实施例中,水包油乳液或油包水乳液也可用作佐剂。举例来说,油相可包括角鲨烯或角鲨烷和表面活性剂。在各个实施例中,可使用非离子型表面活性剂,例如脱水山梨糖醇和二缩甘露醇(mannide)的单-和二- C_{12} - C_{24} 脂肪酸酯。油相优选占免疫原性肽的约 0.2 重量%至约 15 重量%(例如约 0.2%至 1%)。PCT 公开案第 W0 95/17210 号描述示范性乳液。

[0126] 命名为 QS21 的佐剂是一种具有佐剂活性的免疫活性皂苷部分,其来源于南美树木智利皂荚树(Quillaja Saponaria Molina)的树皮,且其生产方法揭示于美国专利第 5,057,540 号中。智利皂荚树皂苷的半合成和合成衍生物也是适用的,例如美国专利第 5,977,081 号和第 6,080,725 号中所述的皂苷衍生物。

[0127] TLR 是与果蝇 Toll 受体同源的蛋白质家族,其识别病原体相关分子模式,因此帮助身体区分自身分子与非自身分子。病毒病原体中常见的物质通过 TLR 识别为病原体相关分子模式。举例来说,TLR-3 识别双股 RNA 中的模式,TLR-4 识别脂多糖中的模式,而 TLR-7/8 识别病毒和细菌 RNA 和 DNA 中含有腺苷的模式。当通过此模式识别引发 TLR 时,发生一系列信号传导事件,引起发炎和先天性和适应性免疫反应的活化。大量含有各种 TLR 所识别的分子模式的合成配体正研制成为佐剂,且可包括在如本文所述的免疫原性组合物中。

[0128] 举例来说,聚核糖肌苷酸:聚核糖胞苷酸或 poly(I:C)(得自加利福尼亚州(CA)圣地亚哥市(San Diego)的英孚杰公司(InvivoGen))是双股 RNA(病毒感染相关分子

模式)的合成类似物,并且为示范性 TLR-3 激动剂佐剂(例如参见菲尔德(Field)等人,美国国家科学院院刊 58:1004(1967)和拉维(Levy)等人,美国国家科学院院刊 62:357(1969))。下文实例 11 将证明此佐剂用于示范性口服肽组合物的益处。在一些实施例中,poly(I:C)可与其它试剂组合,以提高稳定性(例如通过核糖核酸酶的活性来减少降解)。举例来说,美国专利第 3,952,097 号、第 4,024,241 号和第 4,349,538 号描述 poly(I:C)与聚 L-赖氨酸的复合物。聚精氨酸加入到 poly(I:C)中也已展示通过核糖核酸酶的活性来减少降解。美国专利公开案第 20090041809 号描述具有一种或一种以上锁核酸(LNA)核苷的双股核酸,其可充当 TLR-3 激动剂。所属领域的技术人员将能够鉴别其它适合的 TLR-3 激动剂佐剂。

[0129] 诸如单磷酰基脂质 A(MPL)和 3-脱酰基单磷酰基脂质 A(3D-MPL)等减毒脂质 A 衍生物(ALD)是示范性 TLR-4 激动剂佐剂。ALD 是类脂质 A 分子,其经改变或构筑,以使分子显示更少或不同的脂质 A 的不良影响。这些不良影响包括致热性、局部什瓦茨曼反应性(Shwarzman reactivity)和毒性,如鸡胚 50%致死剂量分析(CELD₅₀)中所评估。MPL 和 3D-MPL 分别描述于美国专利第 4,436,727 和 4,912,094 号中。MPL 最初来源于作为肠细菌脂多糖(LPS)的组分的脂质 A,脂多糖是一种有效但毒性高的免疫系统调节剂。3D-MPL 与 MPL 的不同之处在于酯连接于位置 3 的还原末端葡萄糖胺的酰基残基已选择性地除去。应了解,MPL 和 3D-MPL 可包括脂肪酸链长变化的大量脂肪酸取代型式(即庚酰基、己酰基、戊酰基等)的混合物。因此,本发明涵盖 MPL 和 3D-MPL 的各种形式,包括其混合物在内。

[0130] 在一些实施例中,这些 ALD 可与海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)组合于例如 2%角鲨烯/Tween™ 80 乳液中(例如参见英国专利第 2122204 号)。以 PHAD(磷酸化己酰基二糖),可从亚拉巴马州阿拉巴斯特市的雅凡蒂极性脂质公司获得 MPL。图 13 展示 PHAD 的化学结构。下文实例 13 证明此佐剂用于示范性不经肠肽组合物的益处。图 14 中展示另一示范性 TLR-4 激动剂佐剂二[3-脱氧-D-甘露-辛酮糖酰基]-脂质 A(铵盐)的化学结构(也来自亚拉巴马州阿拉巴斯特市的雅凡蒂极性脂质公司)。所属领域的技术人员将能够鉴别其它适合的 TLR-4 激动剂佐剂。举例来说,其它脂多糖已经描述于 WO 98/01139、美国专利第 6,005,099 号和欧洲专利第 729473 号中。

[0131] 咪喹莫特(Imiquimod)(1-异丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺)是小分子 TLR-7/8 激动剂,其也适宜包括在如本文所述的免疫原性组合物中。

[0132] V. 微脂粒

[0133] 在一些实施例中,组合物中的一种或一种以上肽可与微脂粒组合。如所属领域中所熟知,微脂粒一般具有经一个或一个以上包括亲水脂分子(例如脂肪酸、脂质、类固醇等)的双层围住的水性隔室。一种或一种以上肽可存在于微脂粒的水性核心中。视肽的疏水性而定,肽也可以与双层缔合(例如通过疏水性相互作用和/或氢键或离子键)。应了解,任何微脂粒都可用于如本文所述的免疫原性组合物,且双层的亲水脂分子可为离子型和/或非离子型。

[0134] 在一些实施例中,微脂粒可包含非离子型两性分子(例如非离子型表面活性剂)。具有适当两性分子特性的任何非离子型表面活性剂都可用以形成此类微脂粒。适合的表面活性剂的实例包括但不限于基于甘油的酯连接表面活性剂。所述甘油酯可包含例如各酰基部分中含有至少 10 个碳原子的两种高级脂族酰基的一种。基于所述甘油酯的表面活性剂

可包含一个以上甘油单元,例如多达 5 个甘油单元。可使用甘油单酯,例如含有 C₁₂-C₂₀ 烷基或烯酰基部分,例如己酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、软脂酰基、油酰基或硬脂酰基的甘油单酯。一个示范性表面活性剂为 1-单棕榈酰基甘油。

[0135] 醚连接的表面活性剂也可用作非离子型表面活性剂。举例来说,适合的是基于甘油或具有含至多 4 个碳原子的低级脂族二醇的二醇的醚连接表面活性剂。基于所述二醇的表面活性剂可包含一个以上二醇单元,例如多达 5 个二醇单元(例如二乙二醇鲸蜡基醚和/或聚氧乙烯-3-月桂基醚)。可使用二醇或甘油单醚,包括含有 C₁₂-C₂₀ 烷基或烯基部分,例如辛基(capryl)、月桂基、肉豆蔻基、鲸蜡基、油基(oleyl)或硬脂基的二醇或甘油单醚。可使用的环氧乙烷缩合产物包括 PCT 公开案第 W088/06882 号中所揭示的环氧乙烷缩合产物(例如聚氧乙烯高级脂族醚和胺表面活性剂)。示范性的醚连接表面活性剂包括 1-单鲸蜡基甘油醚和二乙二醇鲸蜡基醚。

[0136] 在一些实施例中,包含非离子型表面活性剂的微脂粒可另外包含离子型两性分子,例如使微脂粒带负电荷。举例来说,此可有助于稳定微脂粒并提供有效分散。不受限制地,例如高级链烷酸和链烯酸(例如棕榈酸、油酸)的酸性物质或包括磷酸酯(例如二烷基磷酸酯(例如二鲸蜡基磷酸酯或磷脂酸或磷脂酰丝氨酸))和硫酸单酯(例如高级烷基硫酸酯(例如鲸蜡基硫酸酯))在内的含有酸基的其它化合物都可用于达成此目的。离子型两性分子如果存在,那么其通常占非离子型表面活性剂的 1 重量%与 30 重量%之间。例如 2 重量%与 20 重量%之间或 5 重量%与 15 重量%之间。

[0137] 在一些实施例中,微脂粒组分可与具有高分子量且能够形成双层的适当疏水性物质(例如类固醇,例如固醇,例如胆固醇)混合。在一些实施例中,类固醇的存在可有助于形成决定微脂粒物理性质的双层。类固醇如果存在,那么其通常占非离子型表面活性剂的 20 重量%与 120 重量%之间。例如 25 重量%与 90 重量%之间或 35 重量%与 75 重量%之间。

[0138] 在一些实施例中,微脂粒可为胆汁盐体(参见例如美国专利第 5,876,721 号)。如本文所用的“胆汁盐体”是包含非离子型表面活性剂和促进类脂质分子传输穿过粘膜的传输增强分子的微脂粒。如美国专利第 5,876,721 号中所述,多种分子可用作传输增强剂。举例来说,侧链的 C₂₃ 碳原子携带羧酸和/或其衍生物的胆固醇衍生物可以用作传输增强剂。所述衍生物包括(但不限于)“胆汁酸”胆酸和鹅脱氧胆酸、其与甘氨酸或牛磺酸的结合产物(例如甘氨酸胆酸和牛磺胆酸)、包括脱氧胆酸和熊脱氧胆酸在内的衍生物、和这些酸各自的盐。

[0139] 其它传输增强剂包括酰氧化氨基酸,例如酰基肉碱和其盐。举例来说,诸如棕榈酰基肉碱等含有 C₆₋₂₀ 烷基或烯酰基部分的酰基肉碱可以用作传输增强剂。如本文所用的术语酰氧化氨基酸意欲涵盖一级、二级和三级氨基酸以及 α 、 β 和 γ 氨基酸。酰基肉碱为酰氧化 γ 氨基酸的实例。

[0140] 应了解,免疫原性组合物所包括的胆汁盐体可包含一种以上类型的传输增强剂,例如一种或一种以上不同胆汁盐和一种或一种以上酰基肉碱。

[0141] 还应了解,胆汁盐体也可以合并离子型两性分子,例如使胆汁盐体带负电荷。举例来说,此可有助于稳定胆汁盐体并提供有效分散。不受限制地,例如高级链烷酸和链烯酸(例如棕榈酸、油酸)的酸性物质或包括磷酸酯(例如二烷基磷酸酯(例如二鲸蜡基磷酸酯

或磷脂酸或磷脂酰丝氨酸))和硫酸单酯(例如高级烷基硫酸酯(例如鲸蜡基硫酸酯))在内的含有酸基的其它化合物都可用于达成此目的。

[0142] 在一些实施例中,胆汁盐体组分可与具有高分子质量且能够形成双层的适当疏水性物质(例如类固醇,例如固醇,例如胆固醇)混合。在一些实施例中,类固醇的存在可有助于形成决定胆汁盐体物理性质的双层。

[0143] 胆汁盐体内所存在的传输增强剂的存在量一般以非离子型表面活性剂计介于 40 重量%与 400 重量%之间(例如 60 重量%与 100 重量%之间或 70 重量%与 90 重量%之间)。类固醇如果存在,那么其通常占非离子型表面活性剂的 20 重量%与 120 重量%之间(例如 25 重量%与 90 重量%之间或 35 重量%与 75 重量%之间)。离子型两性分子如果存在,那么其通常占非离子型表面活性剂的 1 重量%与 30 重量%之间(例如 2 重量%与 20 重量%之间或 5 重量%与 15 重量%之间)。

[0144] 存在多种已知用于制备包含非离子型表面活性剂的微脂粒的技术,例如 PCT 公开案第 W0 1993/019781 号中所提及的技术。应了解,任何这些已知的方法可用以制备适合的微脂粒且可以通过修改任何这些技术来制备胆汁盐体。一种示范性技术为旋转膜蒸发法,其中通过从有机溶剂(例如烃或氯化烃溶剂,诸如氯仿)中旋转蒸发来制备非离子型表面活性剂膜,例如参见拉塞尔(Russell)和亚历山大(Alexander),免疫学杂志(J. Immunol.) 140 :1274(1988)。所得薄膜接着在传输增强剂存在下在碳酸氢盐缓冲液中再水合。

[0145] 另一种用于产生用以制备胆汁盐体的微脂粒的方法为柯林斯(Collins)等人,药学与药理学杂志(J. Pharm. Pharmacol.) 42 :53(1990)所揭示的方法。此方法包含使非离子型表面活性剂、类固醇(在使用的情况下)和离子型两性分子(在使用的情况下)的混合物熔融,及在用力混合下在水性缓冲液存在下水合。传输增强剂可通过与其它组分一起包括在熔融混合物中(即通过共熔融)或伴随用以截留肽的过程中并入微脂粒中。

[0146] 另一种方法包含在剪切力存在下水合。可用于施加所述剪切力的设备为熟知的适合装置(参见例如 PCT 公开案第 W088/06882 号)。声波处理和超声波处理也是形成微脂粒或改变其粒径的有效手段。

[0147] 一种或一种以上肽可与微脂粒以任何方式组合。举例来说,在旋转膜蒸发技术中,此可通过在肽连同传输增强剂存在下膜的水合来实现。在其它方法中,一种或一种以上肽可与预先形成的微脂粒通过脱水-再水合法组合,在所述方法中存在水相中的肽通过闪冻、接着冻干来截留,例如参见卡比(Kirby)和格雷格狄斯(Gregoriadis),生物技术(Biotechnology) 2 :979(1984)。或者,可使用冻融技术,其中微脂粒与肽混合,并在液氮中重复闪冻,且升温至约例如 60°C 的温度(即超过有关表面活性剂的转变温度),例如参见皮克(Pick),生物化学与生物物理学集刊(Arch. Biochem. Biophys.) 212 :195(1981)。除截留肽外,脱水-再水合法和冻融技术也能够将其它传输增强剂伴随并入微脂粒中。

[0148] 在每一所述方法中,微脂粒组分的悬浮液可在足以维持微脂粒形成混合物处于熔融状态的高温下若干次挤压通过微孔聚碳酸酯膜。此过程的优点在于可产生尺寸均一的微脂粒。根据本发明可使用的微脂粒(包括胆汁盐体)可具有任何直径。在一些实施例中,混合物可包括直径在约 10nm 至约 10 μ m 范围内的微脂粒。在一些实施例中,微脂粒的直径在约 100nm 至约 5 μ m 之间。在一些实施例中,微脂粒的直径在约 500nm 至约 2 μ m 之间。在

一些实施例中,微脂粒的直径在约 800nm 至约 1.5 μm 之间。

[0149] VI. 剂量和投药

[0150] 本发明的方法适用于治疗包括成人和儿童在内的人类的流行性感冒。然而,一般说来,其可适用于任何动物。在一些实施例中,本文中的方法可用于兽医学应用,例如犬科和猫科应用。必要时,本文中的方法也可以用于农畜,例如羊、禽、牛、猪和马等种类。

[0151] 本文所述的组合物一般以诱发免疫反应所需或足以诱发免疫反应的量和次数授予。给药方案可由一段时间内单个剂量或多个剂量组成。待要授予的肽组合物的精确量可随各个体而变化,且可视若干因素而定。因此,应了解,一般说来,所用的准确剂量将由执业医师确定,且不仅取决于个体的体重和投药途径,而且也取决于个体的年龄和症状的严重程度和/或感染的风险。在一些实施例中,免疫原性组合物中肽的剂量可在约 0.01 至 50mg 范围内。举例来说,在一些实施例中,范围可在 0.1 与 5mg 之间,例如 0.1 与 2mg 之间。实例 14 描述示范性投药方案,其包含两次连续肌肉内注射 0.2 或 1mg 肽剂量(第 0 天和第 28 天)。

[0152] 一般说来,组合物可通过任何途径授予个体。实例中的结果证明本文所述的免疫原性肽组合物不仅在通过传统的不经肠途径授予时可诱发保护性反应,而且在经口授予时也诱发保护性反应。因此,在一些实施例中,组合物可经口(包括经颊、舌下和通过洗胃或其它人工供应手段)授予。所述经口传递可使用例如呈片剂、胶囊、多颗粒、凝胶、膜、胚珠(ovule)、酞剂、溶液、悬浮液等形式的固体或液体组合物实现。在一些实施例中,当使用液体组合物时,组合物可结合碱性组合物(例如碳酸氢盐溶液)授予以中和胃的 pH 值。在一些实施例中,碱性组合物可在肽组合物之前和/或之后授予。在一些实施例中,碱性组合物可在投药之前与肽组合物组合,或与肽组合物同时服用。

[0153] 应了解,考虑到经口传递优于任何形式的注射,所以尤其期望口服途径。还应了解,根据所有已知的流行性感冒疫苗迄今都是不经肠授予的事实,结果是令人意外的。根据本文所述的免疫原性组合物中所包括的肽比当前流行性感冒疫苗中所用的标准蛋白质抗原短得多的事实,能够通过经口传递诱发保护性反应尤其是出乎意外。实际上,长期以来所属领域中对短肽用作免疫原与经口传递蛋白质疫苗两者存在着偏见。

[0154] 在一些实施例中,口服组合物包含一种或一种以上肽、胆汁盐体和佐剂。在一些实施例中,佐剂为 TLR-3 激动剂。在一些实施例中,佐剂可与胆汁盐体混合。在一些实施例中,佐剂可与胆汁盐体缔合(例如通过将佐剂与一种或一种以上肽和/或胆汁盐体组分在用以产生胆汁盐体的过程中合并)。

[0155] 在一些实施例中,组合物经调配,用于例如通过注射等方式不经肠传递。在所述实施例中,可例如通过静脉内、肌肉内、皮内或皮下或通过输注或无针注射技术投药。对于所述不经肠投药,组合物以常规冻干组合物形式制备和维持,并在投药前用医药学上可接受的盐水溶液(例如 0.9% 盐水溶液)复原。如所属领域中已知,可用例如甲烷磺酸等医药学上可接受的酸调整可注射组合物的 pH 值。可采用的其它可接受的媒剂和溶剂包括林格氏溶液(Ringer's solution)和 U.S.P. 此外,无菌的不挥发性油常规用作溶剂或悬浮介质。出于此目的,可采用包括合成单酸甘油酯或二酸甘油酯在内的任何无刺激性的不挥发性油。此外,例如油酸等脂肪酸用于制备注射剂。可例如通过经过细菌截留过滤器过滤或者通过并入杀菌剂,将可注射调配物杀菌,呈无菌固体组合物形式,这些无菌固体组合物可

在临使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0156] 在一些实施例中,不经肠组合物包含一种或一种以上肽、包含非离子型表面活性剂的微脂粒和佐剂。在一些实施例中,佐剂为 TLR-4 激动剂。在一些实施例中,佐剂可与微脂粒混合。在一些实施例中,佐剂可与微脂粒缔合(例如通过将佐剂与一种或一种以上肽和/或微脂粒组分在用以产生微脂粒的过程中合并)。

[0157] 组合物也可以通过鼻内或通过吸入投予,且宜以干粉吸入物(dry powder inhaler)形式或在使用或不使用适合推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷、二氧化碳或其它适合的气体)下从加压容器、泵、喷雾器、雾化器或喷洒器产生的气雾剂喷雾呈现形式传递。在加压气雾剂的情况下,单位剂量可通过提供阀传递计量的量来确定。加压容器、泵、喷雾器、雾化器或喷洒器可含有抗体的溶液或悬浮液,所述溶液或悬浮液例如使用乙醇与推进剂的混合物作为溶剂,且可另外含有润滑剂,例如脱水山梨糖醇三油酸酯。用于吸入器或吹入器的胶囊及药筒(例如由明胶制成)可经调配,以含有肽组合物与适合粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0158] 供直肠投药的组合物优选是栓剂,其可通过将肽与适合的无刺激性赋形剂或载剂(例如可可油、聚乙二醇或栓剂蜡)混合来制备,这些赋形剂或载剂在周围温度下是固体但在体温下是液体,因此在直肠穹(rectal vault)中融化并释放抗体。如所属领域中已知,也可使用保留灌肠和直肠导管。诸如羟丙基纤维素等粘度增强载剂也是供直肠投药的某些本发明载剂,因为其有助于组合物保留在直肠内。一般说来,所选择的加入到组合物中的载剂体积应使组合物最大程度地保留。明确地说,体积不应大到危及所投组合物保留在直肠穹中。

[0159] VII. 示范性组合物

[0160] 在一些实施例中,本发明提供的免疫原性组合物包括 TLR-3 激动剂佐剂以及包含非离子型表面活性剂和促进类脂质分子传输穿过粘膜的传输增强剂的微脂粒。在一些实施例中,所述组合物可经口投予。在一些实施例中,TLR-3 激动剂佐剂包含 poly(I:C)。在一些实施例中,传输增强剂为胆汁酸、其衍生物或任何前述物质的盐(例如脱氧胆酸钠)。在一些实施例中,非离子型表面活性剂为甘油酯(例如 1-单棕榈酰基甘油)。在一些实施例中,微脂粒另外包含离子型两性分子(例如二鲸蜡基磷酸酯)。在一些实施例中,微脂粒另外包含类固醇(例如胆固醇)。在一些实施例中,微脂粒包含 1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡基磷酸酯、胆固醇和脱氧胆酸钠。在一些实施例中,组合物另外包含明矾。

[0161] 在一些实施例中,本发明提供的免疫原性组合物包括 TLR-4 激动剂佐剂以及包含非离子型表面活性剂的微脂粒。在一些实施例中,所述组合物可不经肠投予(例如通过肌肉内注射)。在一些实施例中,TLR-4 激动剂佐剂包含单磷酰基脂质 A 或 3-脱酰基单磷酰基脂质 A。在一些实施例中,非离子型表面活性剂为甘油酯(例如 1-单棕榈酰基甘油)。在一些实施例中,微脂粒另外包含离子型两性分子(例如二鲸蜡基磷酸酯)。在一些实施例中,微脂粒另外包含类固醇(例如胆固醇)。在一些实施例中,微脂粒包含 1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡基磷酸酯和胆固醇。在一些实施例中,组合物另外包含明矾。

[0162] 在一些实施例中,上述免疫原性组合物包括:第一肽,其包含与 SEQ ID NO. 16 的 20-100 个相邻氨基酸具有至少 80%同源性的区域,其中第一肽包括来自 A 型流行性感冒血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;第二肽,其包含 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列;第三

肽,其包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域,其中第三肽包括来自 B 型流行性感胃血凝素蛋白质的少于 100 个的相邻氨基酸;和第四肽,其包含 SEQ ID NO. 14 的氨基酸序列,其中第四肽包括来自 A 型流行性感胃核蛋白的少于 20 个的相邻氨基酸。

[0163] 在一些实施例中,第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的至少 40 个相邻氨基酸。在一些实施例中,第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-88。

[0164] 在一些实施例中,第二肽包含 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列。在一实施例中,组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。

[0165] 在一些实施例中,第三肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 或 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 90% 同源性的区域。在一些实施例中,第三肽包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的第一区域和与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的第二区域。在一些实施例中,组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 2-49 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域,而另一者包含与 SEQ ID NO. 18 的位置 68-121 的至少 20 个相邻氨基酸具有至少 80% 同源性的区域。在一些实施例中,组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含 SEQ ID NO. 12 的氨基酸序列,而另一者包含 SEQ ID NO. 13 的氨基酸序列。

[0166] 在一些实施例中,组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $n = 1-4$ 。在一些实施例中, $n = 4$ 。

[0167] 在一些实施例中,第一肽包含 SEQ ID NO. 6 的氨基酸 1-88;组合物包含 2^n 种各自包含 SEQ ID NO. 11 的不同氨基酸序列的不同第二肽,其中 $n = 4$;组合物包含两种不同的第三肽,其中一者包含 SEQ ID NO. 12 的氨基酸序列,而另一者包含 SEQ ID NO. 13 的氨基酸序列;且组合物包含 2^m 种各自包含 SEQ ID NO. 14 的不同氨基酸序列的不同第四肽,其中 $m = 4$ 。

[0168] 在一些实施例中,上述组合物用以治疗患季节性流行性感胃或处于季节性流行性感胃风险中的个体。

[0169] 在一些实施例中,上述组合物用以治疗患有猪源性 A(H1N1) 型流行性感胃病毒所引起的流行性感胃或处于此流行性感胃风险中的个体。

[0170] 实例

[0171] 以下实例描述制造和实践本文所述的某些组合物和方法的一些示范性方式。应了解,所述实例仅仅是出于示范性的目的,且不欲限制本文所述的组合物和方法的范围。

[0172] 实例 1:肽合成

[0173] 本文所述的所有肽都通过固相肽合成 (SPPS) 来合成。一般说来,C 端氨基酸通过与连接分子所形成的酸不稳定键连接于交联聚苯乙烯 (或基于 PEG) 树脂。此树脂不溶于合成所用的溶剂中,从而可相对简单且快速地冲洗掉过量的试剂和副产物。N 端用在酸中稳定,但可通过碱来除去的 Fmoc 基团保护。任何侧链官能团都用碱稳定而酸不稳定的基团保护。合成接着是基于将 N- α 上经 Fmoc 保护的氨基酸并入生长肽链中,其中链的一端仍然连接于固相。

[0174] 以下为一种用以制造本文所述肽的示范性 SPPS 法。为开始各偶合,用含 20% 哌啶的 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 除去 NovaPEG 树脂结合的氨基酸 / 肽上的 Fmoc 基团。接着清洗,并加入经保护的氨基酸,此氨基酸已在其 α - 羧基上经四氟硼酸 2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3- 四甲基脲活化。使经活化的氨基酸和树脂结合的氨基酸在碱存在下反应,形成新的肽键。虽然肽通过分步法合成,但诸如偶合试剂四氟硼酸 2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3- 四甲基脲 (TBTU)、碱、二异丙基乙胺 (DIPEA) 和去阻断剂哌啶等所有可溶性试剂都可通过在各偶合步骤结束时过滤和清洗,从肽 - 固体支撑基质中除去。重复此过程,直到将所需的肽组装在树脂上为止。用含有至少 85% 三氟乙酸 (TFA) 的裂解溶液,使肽从树脂上裂解并脱除肽的保护基后,通过从乙醚中沉淀,接着离心来收集粗肽。接着通过 HPLC 和质谱分析纯化和表征肽。

[0175] 如本文所述,某些肽组合物可包括单个肽序列的多个变异体 (例如在相同序列中的 2 个或 2 个以上位置具有 2 个或 2 个以上不同氨基酸)。虽然指定组中的各变异体可个别合成,但通常适宜在单一合成中合成变异体子集或整组变异体。举例来说,此可使用分开 - 组合法实现。因此,如果此组变异体经设计以在指定位置包括两种不同氨基酸中的一种,那么树脂可分成两个同等部分,且各部分可与两种氨基酸中的一种偶合,形成两种不同的肽链。一旦偶合结束,即可将两个部分重新组合,以便后来的氨基酸可加入两链中。或者,可使用一锅法,其中两个替代性氨基酸加入同一反应中。通常两种氨基酸以等摩尔量加入;然而,在某些情况下 (例如在其各别反应动力学差异显著的情况下),优选非等摩尔量。接着可使用凯撒茛三酮试验监测肽反应是否结束。

[0176] 实例 2 :竞争微量中和分析

[0177] 在本实例中,评估各种肽组合物结合流行性感胃中和抗体的能力。用伊斯科夫改良杜尔贝科培养基 (Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium, IMDM) 稀释不同的肽组合物 (参见图 1 和下表 1-9) 为 $80 \mu\text{g/ml}$,且 $50 \mu\text{l}$ 加入 96 孔平底微量滴定板 (纳克 (Nunc)) 中的不同孔中。适当时,各肽组合物可包括所有变异体 (例如表 1 中所示的 8 个 INF-HA-3-V3 肽变异体、表 4 中的 4 个 INF-H1-4-V4 肽变异体等)。用 IMDM 以 1/40 稀释市售抗流行性感胃血清和人类血清,且 $50 \mu\text{l}$ 加入各孔中,接着培养板在 37°C 下培育 1 小时。将 $50 \mu\text{l}$ 含 1×10^5 个 pfu 流行性感胃病毒株威斯康星 (A/Wis/67/05) 或新喀里多尼亚 (A/NC/20/99) 的 IMDM 加入各孔中,且培养板在 37°C 下再培育 1 小时。随后,将 5×10^4 个补充有 2% 胎牛血清 (FCS) 的马丁达比狗肾 (MDCK) 细胞加入各孔中。每个培养板都含有 4 个细胞和 4 个病毒对照孔。培养板在 37°C 下培育 18-22 小时。每孔用 $50 \mu\text{l}$ 70% 乙醇固定细胞 10 分钟,且在室温下空气干燥。用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤培养板 5 次,且用 10% FCS 阻断各孔。在 4°C 下 90 分钟后, $50 \mu\text{l}$ 经阻断缓冲液以 1/500 稀释的针对 A 型流行性感胃核衣壳抗原的单克隆抗体 (凯美空 (Chemicon)) 加入各孔中。在 4°C 下再培育 1 小时后,洗涤培养板 5 次,且在 4°C 下将 $100 \mu\text{l}$ 山羊抗小鼠 IgG 过氧化酶结合的亲和力纯化的抗体 (1/10,000) 加入各孔中,历时 30 分钟。洗涤培养板 5 次,且通过 $100 \mu\text{l}$ 邻苯二胺 (OPD ;密苏里州 (MO) 圣路易斯市 (St. Louise) 的西格玛 (Sigma)) 显影,并在 20 分钟后用 1N HCl 停止酶反应。通过 ELISA 板式读数器 (伯乐公司 (Bio-Rad)) 在 490nm 波长下测量 OD,来定量反应。图 1 中展示关于包含表 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 中肽的组合物的结果。

[0178] 如图 1 中所示,市售或免疫血清的加入可抑制活体外细胞的流行性感胃病毒感

染,可通过 ELISA 进行光学密度 (OD) 测量来定量。因此,在免疫血清存在下约 0.6 的 OD 值 (参见病毒对照) 减少至约 0.2 (参见病毒 + 血清对照)。用血清培育各种肽组合物可使肽结合于血清中所存在的一些中和抗体,从而逆转其中和活性 (例如约 0.3 或 0.3 以上的 OD 值)。

[0179] 表 1-SEQ ID NO. 1

[0180]

肽名称	序列
一致	GSRPXVREDGGLPQSXRISIXWTIVKPG
取代 1 号	----D-----G----D-----
取代 2 号	----W-----S----Y-----
INF-HA-3-V3/1	GSRPDVREDGGLPQSGRISIDWTIVKPG
INF-HA-3-V3/2	GSRPDVREDGGLPQSGRISIYWTIVKPG
INF-HA-3-V3/3	GSRPDVREDGGLPQSSRISIDWTIVKPG
INF-HA-3-V3/4	GSRPDVREDGGLPQSSRISIYWTIVKPG
INF-HA-3-V3/5	GSRPWVREDGGLPQSGRISIDWTIVKPG
INF-HA-3-V3/6	GSRPWVREDGGLPQSGRISIYWTIVKPG
INF-HA-3-V3/7	GSRPWVREDGGLPQSSRISIDWTIVKPG
INF-HA-3-V3/8	GSRPWVREDGGLPQSSRISIYWTIVKPG

[0181] 表 2-SEQ ID NO. 2

[0182]

肽名称	序列
一致	XTGVSASCSHNGXSSFYXNLLWLTGK
取代 1 号	V-----K----R-----
取代 2 号	T-----E----K-----
INF-H1-4-V1/1	VTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGK
INF-H1-4-V1/2	VTGVSASCSHNGKSSFYKNLLWLTGK
INF-H1-4-V1/3	VTGVSASCSHNGESSFYRNLLWLTGK

INF-H1-4-V1/4	VTGVSASC SHNGESSFYKNLLWLTGK
INF-H1-4-V1/5	TTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGK
INF-H1-4-V1/6	TTGVSASC SHNGKSSFYKNLLWLTGK
INF-H1-4-V1/7	TTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTGK
INF-H1-4-V1/8	TTGVSASC SHNGESSFYKNLLWLTGK

[0183] 表 3-SEQ ID NO. 3

[0184]

肽名称	序列
一致	HYSRXFTPEIXKRPKVRXQEGRINYYWTLLEPG
取代 1 号	----R----A-----D-----
取代 2 号	----K----T-----N-----
INF-H1-4-V3/1	HYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/2	HYSRRFTPEIAKRPKVRNQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/3	HYSRRFTPEITKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/4	HYSRRFTPEITKRPKVRNQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/5	HYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/6	HYSRKFTPEIAKRPKVRNQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/7	HYSRKFTPEITKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPG
INF-H1-4-V3/8	HYSRKFTPEITKRPKVRNQEGRINYYWTLLEPG

[0185]

[0186] 表 4-SEQ ID NO. 4

[0187]

肽名称	序列
一致	PVTIGECPKYVRSXKLRMXTGLRNIPSIQS
取代 1 号	-----A---V-----

取代 2 号	-----A--A-----
INF-H1-4-V4/1	PVTIGECPKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQS
INF-H1-4-V4/2	PVTIGECPKYVRS AKLRMATGLRNIPSIQS
INF-H1-4-V4/3	PVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQS
INF-H1-4-V4/4	PVTIGECPKYVRSTKLRMATGLRNIPSIQS

[0188] 表 5-SEQ ID NO. 5

[0189]

肽名称	序列
一致	CELLISXESWSYIVEXPNPENGTCPYGF
取代 1 号	-----K-----T-----Y-
取代 2 号	-----R-----K-----H-
INF-H1-4-V5/1	CELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYF
INF-H1-4-V5/2	CELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGHF
INF-H1-4-V5/3	CELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYF
INF-H1-4-V5/4	CELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHF
INF-H1-4-V5/5	CELLISRESWSYIVETPNPENGTCYPGYF
INF-H1-4-V5/6	CELLISRESWSYIVETPNPENGTCYPGHF
INF-H1-4-V5/7	CELLISRESWSYIVEKPNPENGTCYPGYF
INF-H1-4-V5/8	CELLISRESWSYIVEKPNPENGTCYPGHF

[0190] 表 6-SEQ ID NO. 6

[0191]

肽名称	序列
INF-H1-88-S1	SWPNHTTTGVSASSSHNGESSFYKNLLWLTGKNGLYPNLSKSYA NNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHKENAYVSWSIIFEANG

[0192] 表 7-SEQ ID NO. 7

[0193]

肽名称	序列
INF-H3-88-S1	NWTGVTQNGTSSSSKRRSNNSEFFSRLNWLTHLKFKYPALNTMPN NEKFDKLYIWGVHHPVTDNDQIFLYAQASGRITVSTLLINSTG

[0194] 表 8-SEQ ID NO. 8

[0195]

肽名称	序列
INF-HB-98-S1	NAEKAPGGPYKIGTSGSSPNVTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTA TNSLTIEVPYISTEGEDQITIWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKF TSSAGTITYQ

[0196] 表 9-SEQ ID NO. 9

[0197]

肽名称	序列
一致	YACKXGGKSSGSSYPVLXXX
取代 1 号	----R-----KVS-
取代 2 号	----Y-----SRT-
INF-HA-2-V1/1	YACKRGGKSSGSSYPVLKVS
INF-HA-2-V1/2	YACKRGGKSSGSSYPVLKVY
INF-HA-2-V1/3	YACKRGGKSSGSSYPVLKRS
INF-HA-2-V1/4	YACKRGGKSSGSSYPVLKRT
INF-HA-2-V1/5	YACKRGGKSSGSSYPVLSVS
INF-HA-2-V1/6	YACKRGGKSSGSSYPVLSVT
INF-HA-2-V1/7	YACKRGGKSSGSSYPVLSRS
INF-HA-2-V1/8	YACKRGGKSSGSSYPVLSRT
INF-HA-2-V1/9	YACKYGGKSSGSSYPVLKVS
INF-HA-2-V1/10	YACKYGGKSSGSSYPVLKVY
INF-HA-2-V1/11	YACKYGGKSSGSSYPVLKRS
INF-HA-2-V1/12	YACKYGGKSSGSSYPVLKRT
INF-HA-2-V1/13	YACKYGGKSSGSSYPVLSVS

INF-HA-2-V1/14	YACKYGGKSSGSSYPVLSVTY
INF-HA-2-V1/15	YACKYGGKSSGSSYPVLSRSY
INF-HA-2-V1/16	YACKYGGKSSGSSYPVLSRTY

[0198] 实例 3 :ELISPOT 分析

[0199] 在本实例中,通过在 ELISPOT 分析中测量人类 PBMC 的活化(如通过 IFN γ 产量来测量),来测试实例 1 的肽组合物的免疫原性。在 4°C 下,用含 10 μ g/ml 抗小鼠 IFN γ 抗体(mAb AN18,得自俄亥俄州(OH) 马里蒙特市(Mariemont)的马伯科技公司(Mabtech))的 PBS 涂布多筛 HTS 培养板(得自马萨诸塞州(MA) 贝德福德市(Bedford)的密理博公司(Millipore)),过夜。接着用 PBS 洗涤培养板,且在室温下用含有 10% FCS 和 100U/ml 青霉素(penicillin)/链霉素(streptomycin)的 IMDM 阻断 1 小时。去掉培养基,且将 2×10^5 个来自接种流行性感疫苗人类个体的周围血液单核细胞(PBMC)(每孔 200 μ l)与肽组合物(40 μ g/ml,参见图 2 和表 1-9)混合,加入各孔中,维持 2 天。培育后,除去细胞,用 PBS+0.05% Tween 20 洗涤,且在室温下与 1 μ g/ml 生物素标记的抗小鼠 IFN γ 抗体(mAb R4-6A2-生物素,马伯科技公司)一起培育 2 小时。洗涤后,加入含 100 微升/孔的 1/1000 抗生蛋白链菌素-ALP-PQ(马伯科技公司)的 PBS+0.5% FCS,且在室温下培育 1 小时。如上洗涤培养板,且在室温下用每孔 100 μ l BCIP/NBT 碱性磷酸酶(莫斯公司(Moss Inc))显影 20 分钟。通过用自来水清洗培养板来停止反应。放大并计数各孔中斑点的数目。图 2 中展示关于包含表 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 的肽的组合物的结果。

[0200] 如图 2 中所示,在此分析中,某些肽组合物引起强烈的反应,证实这些组合物具有免疫原性。

[0201] 实例 4 :其它肽

[0202] 本实例中的表 10-14 描述可用于本文所述的组合物和方法中的其它示范性肽。

[0203] 表 10-SEQ ID NO. 10

[0204]

肽名称	序列
一致	YACKXGGKSSGSSYPVLXVXX
取代 1 号	----R-----N-SY
取代 2 号	----H-----S-TM
INF-HA-1-V1/1	YACKRGGKSSGSSYPVLNVSY
INF-HA-1-V1/2	YACKRGGKSSGSSYPVLNVSM
INF-HA-1-V1/3	YACKRGGKSSGSSYPVLNVTY
INF-HA-1-V1/4	YACKRGGKSSGSSYPVLNVTM

INF-HA-1-V1/5	YACKRGGKSSGSSYPVLSVSY
INF-HA-1-V1/6	YACKRGGKSSGSSYPVLSVSM
INF-HA-1-V1/7	YACKRGGKSSGSSYPVLSVTY
INF-HA-1-V1/8	YACKRGGKSSGSSYPVLSVTM
INF-HA-1-V1/9	YACKHGGKSSGSSYPVLNVSY
INF-HA-1-V1/10	YACKHGGKSSGSSYPVLNVSM
INF-HA-1-V1/11	YACKHGGKSSGSSYPVLNVTY
INF-HA-1-V1/12	YACKHGGKSSGSSYPVLNVTM
INF-HA-1-V1/13	YACKHGGKSSGSSYPVLSVSY
INF-HA-1-V1/14	YACKHGGKSSGSSYPVLSVSM
INF-HA-1-V1/15	YACKHGGKSSGSSYPVLSVTY
INF-HA-1-V1/16	YACKHGGKSSGSSYPVLSVTM

[0205] 表 11-SEQ ID NO. 11

[0206]

肽名称	序列
一致	YASKXGGKSSGSSYPVLXVXX
取代 1 号	----R-----N-SY
取代 2 号	----H-----S-TM
INF-HA-1-V1 (C3S) /1	YASKRGGKSSGSSYPVLNVSY
INF-HA-1-V1 (C3S) /2	YASKRGGKSSGSSYPVLNVSM
INF-HA-1-V1 (C3S) /3	YASKRGGKSSGSSYPVLNVTY
INF-HA-1-V1 (C3S) /4	YASKRGGKSSGSSYPVLNVTM
INF-HA-1-V1 (C3S) /5	YASKRGGKSSGSSYPVLSVSY
INF-HA-1-V1 (C3S) /6	YASKRGGKSSGSSYPVLSVSM

INF-HA-1-V1 (C3S) /7	YASKRGGKSSGSSYPVLSVTY
INF-HA-1-V1 (C3S) /8	YASKRGGKSSGSSYPVLSVTM
INF-HA-1-V1 (C3S) /9	YASKHGGKSSGSSYPVLNVSY
INF-HA-1-V1 (C3S) /10	YASKHGGKSSGSSYPVLNVSM
INF-HA-1-V1 (C3S) /11	YASKHGGKSSGSSYPVLNVTY
INF-HA-1-V1 (C3S) /12	YASKHGGKSSGSSYPVLNVTM
INF-HA-1-V1 (C3S) /13	YASKHGGKSSGSSYPVLSVSY
INF-HA-1-V1 (C3S) /14	YASKHGGKSSGSSYPVLSVSM
INF-HA-1-V1 (C3S) /15	YASKHGGKSSGSSYPVLSVTY
INF-HA-1-V1 (C3S) /16	YASKHGGKSSGSSYPVLSVTM

[0207]

[0208] 表 12

[0209]

肽名称	序列	SEQ ID NO.
02-HB-01-S1-01	AEKAPGGPYKIGTSGSSPNVTNGNGFFATMAWAVPKNDN NKTATNSLT	12
02-HB-01-S2-01	FHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGF PNQTEDGGLPQSGRI	13

[0210] 表 13-SEQ ID NO. 14

[0211]

肽名称	序列
一致	SVQRNLPFXXTXMA
取代 1 号	-----EKS-V--
取代 2 号	-----DRT-I--
INF-NP-1-V1/1	SVQRNLPFEKSTVMA
INF-NP-1-V1/2	SVQRNLPFEKSTIMA
INF-NP-1-V1/3	SVQRNLPFEKTTVMA
INF-NP-1-V1/4	SVQRNLPFEKTTIMA

INF-NP-1-V1/5	SVQRNLPFERSTVMA
INF-NP-1-V1/6	SVQRNLPFERSTIMA
INF-NP-1-V1/7	SVQRNLPFERTTVMA
INF-NP-1-V1/8	SVQRNLPFERTTIMA
INF-NP-1-V1/9	SVQRNLPFDKSTVMA
INF-NP-1-V1/10	SVQRNLPFDKSTIMA
INF-NP-1-V1/11	SVQRNLPFDKTTVMA
INF-NP-1-V1/12	SVQRNLPFDKTTIMA
INF-NP-1-V1/13	SVQRNLPFDRSTVMA
INF-NP-1-V1/14	SVQRNLPFDRSTIMA
INF-NP-1-V1/15	SVQRNLPFDRTTVMA
INF-NP-1-V1/16	S VQRNLPFDRTTIMA

[0212] 表 14-SEQ ID NO. 15

[0213]

肽名称	序列
一致	XXXSSTLELRSXYWAI
取代 1 号	NMG-----G----
取代 2 号	AIE-----R----
INF-NP-2-V2/1	NMGSSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/2	NMGSSTLELRSRYWAI
INF-NP-2-V2/3	NMESSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/4	NMESSTLELRSRYWAI
INF-NP-2-V2/5	NIGSSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/6	NIGSSTLELRSRYWAI

INF-NP-2-V2/7	NIESSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/8	NIESSTLELRSRYWAI
INF-NP-2-V2/9	AMGSSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/10	AMGSSTLELRSRYWAI
INF-NP-2-V2/11	AMESSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/12	AMESSTLELRSRYWAI
INF-NP-2-V2/13	AIGSSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/14	AIGSSTLELRSRYWAI
INF-NP-2-V2/15	AIESSTLELRSGYWAI
INF-NP-2-V2/16	AIESSTLELRSRYWAI

[0214]

[0215] 实例 5 :肽组合物 INF-61P

[0216] 肽组合物 INF-61P 包括如表 15 中所阐述的肽的混合物。

[0217] 表 15

[0218]

肽	SEQ ID NO.
表 11 的所有十六 (16) 种变异体	11 ¹
表 6 的肽	6
表 8 的肽	8

[0219] ¹SEQ ID NO. 11 为一致序列且涵盖 16 种不同变异体。

[0220] 实例 6 :肽组合物 INF-63P

[0221] 肽组合物 INF-63P 包括如表 16 中所阐述的肽的混合物。

[0222] 表 16

[0223]

肽	SEQ ID NO.
表 11 的所有十六 (16) 种变异体	11 ¹
表 6 的肽	6
表 12 的两种肽	12、13

[0224] ¹SEQ ID NO. 11 为一致序列且涵盖 16 种不同变异体。

[0225] 实例 7 :肽组合物 SFV2

[0226] 肽组合物 SFV2 包括如表 17 中所阐述的肽的混合物。

[0227] 表 17

[0228]

肽	SEQ ID NO.
表 11 的所有十六 (16) 种变异体	11 ¹
表 6 的肽	6
表 12 的两种肽	12、13
表 13 的所有十六 (16) 种变异体	14 ²

[0229] ¹SEQ ID NO. 11 为一致序列且涵盖 16 种不同变异体。

[0230] ²SEQ ID NO. 14 为一致序列且涵盖 16 种不同变异体。在某些实施例中, SFV2 中的肽可通过在各肽的 N 端添加 KSS 连接子而不同于所述序列, 所述连接子可任选用于 N 端赖氨酸部分的脂质化。

[0231] 实例 8 :胆汁盐体 INF-61P 组合物

[0232] 本实例描述用于实例 9 和 11 中经口传递肽组合物的胆汁盐体 INF-61P 组合物的制备。将脂质 (单棕榈酰基 - 甘油、胆固醇和二鲸蜡基磷酸酯) 溶于氯仿中并干燥成膜, 接着与实例 5 的 INF-61P 肽和脱氧胆酸钠 (一种“胆汁盐”) 一起再水合。使用动力学光散射, 来评估所得胆汁盐体的尺寸, 且使用茚三酮分析, 评估截留效率。接着调整经负载的胆汁盐体的体积, 以产生含有所需量肽的组合物。如下所述, 这些经负载的胆汁盐体甚至在经口授予时也能够传递免疫原性肽组合物至雪貂和小鼠。

[0233] 实例 9 :口服胆汁盐体 INF-61P 组合物对雪貂进行流行性感胃免疫

[0234] 本实例描述某些免疫原性肽组合物在雪貂中的活体内测试。流行性感胃病毒感染的雪貂模型是评估候选流行性感胃疫苗的黄金标准哺乳动物模型。实际上, 雪貂可感染 A 和 B 型流行性感胃的所有主要亚型的临床分离株, 且显示的临床病程可类似于在人类中所见到的临床病程 (包括体温增加, 和在一些状况下重量损失)。

[0235] 众多研究人员证明, 通过肌肉内 (IM) 注射给予目前许可的流行性感胃疫苗会诱导也具有血凝抑制活性的中和 IgG 抗体。这些现有疫苗对细胞免疫的诱导和免疫诱导在保护中的作用尚不清楚。如下所讨论, 我们已经展示经口授予的免疫原性肽组合物会全身性 (血清) 和在粘膜 (直肠和鼻洗液样品) 诱导 IgA 抗体。因为流行性感胃感染通过粘膜表面出现, 所以 IgA 反应 (粘膜免疫反应的标志) 可能比全身性 IgG 反应有效。如实例 13 中所示, 当免疫原性肽组合物通过标准不经肠途径 (例如通过肌肉内注射) 授予时, 获得全身性 IgG 反应。

[0236] 对于接种和激发实验, 选择通过血凝抑制分析预先筛检为血清阴性的雄性雪貂。经口传递的组合物经调配, 使得肽包含于 0.5ml 的体积中。所有雪貂都在进行免疫的前 3 天时放血, 并收集血清、血浆和 PBMC。在禁食后第 0、3、14 和 17 天, 通过洗胃, 对接收 INF-61P

组合物的雪貂经口免疫。对于市售疫苗对照,在第 0 天和第 17 天经肌肉内注射流感灵疫苗至四头肌中。

[0237] 在第 27 天,将雪貂放血,以获得血清,并收集唾液和直肠洗液。接着经鼻内用经 PBS 稀释至 2×10^6 pfu/ml 的流行性感冒病毒激发所有雪貂(每鼻孔 0.5ml)。在病毒激发 10 天后,收集鼻洗液,并称重所有动物,且每日监测感染的临床征象(通过各动物体内的植入物电子测量体温)。处死时,将动物放血,以获得血清、血浆、PBMC 和(在一些情况下)全血细胞计数(CBC),并收集和处理脾以获得单核细胞。

[0238] 如图 3 中所示,当动物接种免疫原性肽组合物 INF-61P(参见实例 5)并用 H3N2(A/威斯康星/2005)病毒激发时,其显示发热计数减少,表明组合物 INF-61P 发挥保护作用。此外,接种 INF-61P 的动物(参见图 4)在病毒激发后的数天中的重量损失不如对照小鼠剧烈。

[0239] 如图 5 中所描绘,组合物 INF-61P 诱发粘膜 IgA 反应,如直肠洗液(上图)和鼻洗液(下图)样品中所示。大多数(3/4)接种 INF-61P 的动物都显示 IgA 效价相对于直肠或者鼻洗液样品中的预先接种反应增加至少两倍。正如所料,通过标准肌肉内注射给予市售疫苗诱导全身性(血清)IgG 反应(资料未示)。然而,如图 5 中所示,其未诱导 IgA 反应。

[0240] 当用包括 SFV2 肽的免疫原性肽组合物(参见实例 7)复制此实验时,观测到类似结果(资料未示)。值得注意的是,在接种组合物 SFV2 的动物中检测到针对 B 型流行性感冒的重组 HA 蛋白质的血清 IgA(参见图 6)。

[0241] 实例 10:皮下投予的 INF-09L-A 组合物的免疫反应研究

[0242] 本实例描述通过向小鼠皮下投予表 13 的肽组合物(INF-NP1-V1)的改进型式(INF-09L-A)所诱导的免疫反应。INF-09L-A 肽组合物与表 13 中所示的 INF-NP1-V1 组合物的不同之处是在各肽的 N 端包括 KSS 连接子。N 端赖氨酸部分用以双重脂质化各肽。

[0243] 用 INF-09L-A 肽组合物接种成年(> 12 个月)HLA(A*0201)转基因小鼠三次。所投组合物中包括所有十六种变异体。组合物还包括明矾佐剂。对照组仅仅接收佐剂。用多个亚型的流行性感冒不同病毒株来感染脾细胞:H3N2(A/HK/1/18、A/维多利亚/3/75)和 H1N1(A/NC/20/99、A/PR/8/34)。通过在 ELISPOT 分析中定量 IFN γ 分泌 T 细胞的频率,来测量 T 细胞反应(方法参见实例 3)。斑点表示对各病毒株具有特异性的 IFN γ 分泌 T 细胞的频率,且误差线表示每组小鼠中的标准偏差(n = 3)。结果从左至右如下呈现:H3N2(A/HK/1/18)、H3N2(A/维多利亚/3/75)、H1N1(A/NC/20/99)和 H1N1(A/PR/8/34)。如图 7 中所示,所述肽组合物诱导广泛的细胞(CTL)免疫反应。

[0244] 实例 11:佐剂对经口投予的肽组合物所诱导的免疫反应的影响

[0245] 本实例比较在有和没有佐剂下向小鼠经口投予肽组合物所诱导的免疫反应。

[0246] 小鼠(n = 4)接收截留于胆汁盐体中的肽组合物,有或者没有基于 TLR-3 的佐剂(polyI:C)。经口免疫小鼠 4 次(第 0、3、14 和 17 天)。接种后收获脾细胞,并在活体外用肽组合物中所存在的四种个别肽分开刺激。使用 IFN γ ELISPOT 测量反应(方法参见实例 3)。图 8 中比较各肽激发的结果。如图 8 中所示,接收肽组合物与佐剂组合的动物反应比接收单独肽组合物的动物反应大。

[0247] 实例 12:微脂粒 SFV2 组合物

[0248] 本实例描述用于实例 13 中肌肉内(IM)注射肽组合物的组合物的制备。微脂粒由

以下脂质构成：1-单棕榈酰基甘油（非离子型表面活性剂）、胆固醇（类固醇）和二鲸蜡基磷酸酯（离子型两性分子）。具体地说，将 5 : 4 : 1 摩尔比率的脂质（270mg 1-单棕榈酰基甘油（MPG）、255mg 胆固醇（CHO）和 90mg 二鲸蜡基磷酸酯（DCP））放在 25ml 平底玻璃烧杯中，确保没有粉末粘附在玻璃烧杯的侧面上。将烧杯夹紧，且用铝箔覆盖，并在热油浴中于 135℃ 下使脂质熔融，维持 10 分钟，偶尔在烧杯中旋涡。在一些组合物中，合成 TLR-4 激动剂 PHAD（得自雅凡蒂极性脂质公司的磷酸化己酰二糖，图 13 中所示）与其它脂质共熔融，在其它组合物中 PHAD 与肽组合物 SFV2（实例 7 中所描述）一起加入。在热水浴中于 30℃ 下，将肽组合物 SFV2（400 μg/ml）与 PHAD（100 μg/ml）的 10ml 所得混合物在碳酸氢钠溶液（pH 8.5）中预先培育 5 分钟。在 8,000rpm 下匀化肽溶液，接着转移至熔融脂质溶液中，此刻在 30℃ 下继续均化 10 分钟（应了解，或者加热的脂质溶液可转移至抗原溶液中，随后匀化）。最后，10ml 含 400mM 蔗糖溶液的缓冲液加入微脂粒 / 肽溶液中并涡动 30 秒。微脂粒（有或者没有肽）等分至小瓶（每小瓶 0.5ml）中并冻干。冻干微脂粒（有或者没有肽）在投药前在 0.5ml 盐水中再水合并吸收至明矾（氢氧化铝）。

[0249] 实例 13：用微脂粒 SFV2 组合物不经肠免疫雪貂

[0250] 本实例描述在雪貂中用实例 12 的微脂粒 SFV2 组合物进行的活体内测试。对于接种和激发实验，选择通过血凝抑制分析预先筛检为血清阴性的雄性雪貂。肌肉内注射的组合物如实例 12 中所述调配，使得肽包含于 0.5ml 的体积中。所有雪貂都在离免疫还有 3 天时放血，并收集血清、血浆和 PBMC。在第 0 天和第 28 天，通过肌肉内注射（IM）有或者没有 SFV2 肽组合物的微脂粒使雪貂免疫。对于市售疫苗对照，在第 0 天和第 28 天经肌肉内注射凡尔灵市售疫苗至四头肌。此市售疫苗是针对 2008-2009 季节的 A 型和 B 型病毒株（具体地说，A/布里斯班（Brisbane）/59/2007 H1N1；A/布里斯班 /10/2007 H3N2 和 B/佛罗里达（Florida）/4/2006）的三价灭活流感疫苗。表 18 中概述用于此研究的实验组。

[0251] 表 18

[0252]

组	组合物	抗原 (μg)	PHAD (μg)	投药途径	动物数目
1	具有 SFV2 肽、PHAD 和明矾的微脂粒	200	50	IM	4
3	凡尔灵	45	-	IM	4
4	具有 PHAD 和明矾的空微脂粒	0	50	IM	4

[0253] 在第 28 天，将雪貂放血并收集血清样品。接着经鼻内用经 PBS 处理为 2×10^5 pfu/ml 的流行性感冒病毒激发所有雪貂（每鼻孔 0.5ml）。在病毒激发 10 天后，收集鼻洗液，并称重所有动物，且每日监测感染的临床征象（通过各动物体内的植入物电子测量体温）。处死时，将动物放血，以获得血清、血浆、PBMC 和（在一些情况下）全血细胞计数（CBC），并收集和处理脾以获得单核细胞。

[0254] 如图 10A-B 中所示，经肌肉内给予的组合物 SFV2 诱导体液反应。免疫后血清显示，对于经肌肉内投予的肽组合物 SFV2 免疫的雪貂，ELISA 中对 rHA 所罗门（A）与威斯康星（B）的免疫反应均为显著的。在 ELISA 中，经凡尔灵处理的动物仅仅展示很小的免疫反应，且经空微脂粒（即无 SFV2 肽）处理的动物未展示反应性。任何动物组中都未检测到针对 rHA 马来西亚的 IgG 反应（资料未示）。

[0255] 如图 11 中所示,经肌肉内给予的组合物 SFV2 给予保护以免病毒激发。用实例 12 的免疫原性肽组合物 SFV2 接种动物,且用 2×10^5 个 pfu H1N1 (A/ 所罗门岛 /03/06) 激发,并在病毒血症最高峰(第 2 天)时通过空斑分析来测量鼻洗液样品的病毒载量。各符号表示个别动物中所测量的病毒载量。接种 SFV2 的动物显示鼻洗液样品中的病毒载量相较于经空微脂粒处理的对照动物显著减少 ($p < 0.05$)。同样通过标准肌肉内注射给予的市售季节性流行性感疫苗未减少鼻洗液样品中的病毒载量。

[0256] 如图 12 中所示,经肌肉内给予的组合物 SFV2 诱导针对潜在大流行性感病毒株的体液免疫。在第二次接种两周后(在病毒激发前)从动物中收集血清,并通过 ELISA 来测试样品中与假定大流行性猪 (H1N1/ 加利福尼亚 /2009) 分离株的重组血凝素 (rHA) 蛋白质的反应性。接种 SFV2 的动物显示针对 rHA H1N1/ 加利福尼亚 (大流行性猪 H1N1) 的血清 IgG 反应性比经空微脂粒处理的对照动物高。图 12 中的资料展示,接种市售季节性流行性感疫苗的动物血清未能对此新颖流行性感病毒株起反应。

[0257] 实例 14 :投药方案

[0258] 本实例描述在人类中使用实例 12 的微脂粒 SFV2 组合物的示范性投药方案。进行部分盲法的随机化安慰剂对照研究,特征是以下处理组:

[0259] ●处理组 1 :对应于抗原剂量 1 的两次肌肉内注射微脂粒 SFV2 组合物 (1mg 肽),在第 0 天和第 28 天给予 ($n = 50$)。

[0260] ●处理组 2 :对应于剂量 2 的两次肌肉内注射 SFV2 (0.2mg 肽) 与 NAM1 组合,在第 0 天和第 28 天给予 ($n = 50$)。

[0261] ●处理组 3 :两次肌肉内注射磷酸盐缓冲盐水,安慰剂组,在第 0 天和第 28 天给予 ($n = 25$)。

[0262] 个体以 2 : 2 : 1 方式随机化。

[0263] 在投药后第 7 天评估短期耐受性。投药 28 天后,收集自发报导的不良事件。收集整个 168 天 (± 14 天) 跟踪期内严重不良事件和医学上有意义事件。评估每一注射前后和 168 天跟踪期结束时的生物安全性。

[0264] 在第 0 天、第 28 天 (± 3 天)、第 56 天 (± 7 天) 和 168 天 (± 14 天) 跟踪期结束时收集的血清样品中评估免疫原性。免疫学读数 (read-out) 为血清 HI 抗体 (血凝抑制分析)、rHA 特异性血清 IgG (ELISA) 以及通过微量中和分析测出的中和抗体。关于细胞 (CTL) 免疫评估,通过 ELISPOT 和细胞内细胞因子染色来评估 T 细胞反应。

[0265] 序列表

[0266] 根据 37CFR 1.52(e)(5),呈文本文件(名为“序列表.txt”,在 2009 年 6 月 18 日建立,且具有 14kb) 的形式并与本文一同申请的序列表以全文引用的方式并入本文中。

[0267] 其它实施例

[0268] 所属领域的技术人员根据本文所揭示的本发明的说明或实践,将显而易知本发明的其它实施例。本说明书和实例仅欲视为示范性的,本发明的真正范围通过以下权利要求书来指明。本文中所提及的任何参考文献的内容都以全文引用的方式并入本文中。

[0002]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Arg或Lys

<400> 2

Xaa Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Xaa Ser Ser Phe
 1 5 10 15

Tyr Xaa Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys
 20 25

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Arg或Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Ala或Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Asp或Asn

<400> 3

His Tyr Ser Arg Xaa Phe Thr Pro Glu Ile Xaa Lys Arg Pro Lys Val
 1 5 10 15

Arg Xaa Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro
 20 25 30

Gly

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

[0003]

<223> Ala或Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Val或Ala

<400> 4

Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Xaa Lys Leu
1 5 10 15

Arg Met Xaa Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser
20 25 30

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Lys或Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Thr或Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Tyr或His

<400> 5

Cys Glu Leu Leu Ile Ser Xaa Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Xaa
1 5 10 15

Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Xaa Phe
20 25

<210> 6

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 6

Ser Trp Pro Asn His Thr Thr Thr Gly Val Ser Ala Ser Ser Ser His
1 5 10 15

[0004]

Asn Gly Glu Ser Ser Phe Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys
20 25 30

Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu
35 40 45

Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly
50 55 60

Asp Gln Arg Ala Leu Tyr His Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val
65 70 75 80

Ser Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly
85

<210> 7
<211> 87
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 7

Asn Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ser Ser Lys Arg
1 5 10 15

Arg Ser Asn Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu
20 25 30

Lys Phe Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe
35 40 45

Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Asn Asp
50 55 60

Gln Ile Phe Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr
65 70 75 80

Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly
85

<210> 8
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 8

Asn Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Lys Ile Gly Thr Ser Gly

[0005]

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Arg或His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Asn或Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Ser或Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Tyr或Met

<400> 10

Tyr Ala Cys Lys Xaa Gly Gly Lys Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Pro Val
 1 5 10 15

Leu Xaa Val Xaa Xaa
 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Arg或His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Asn或Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Ser或Thr

<220>

[0007]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Tyr或Met

<400> 11

Tyr Ala Ser Lys Xaa Gly Gly Lys Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Pro Val
 1 5 10 15

Leu Xaa Val Xaa Xaa
 20

<210> 12
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 12

Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Lys Ile Gly Thr Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Pro Asn Val Thr Asn Gly Asn Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp
 20 25 30

Ala Val Pro Lys Asn Asp Asn Asn Lys Thr Ala Thr Asn Ser Leu Thr
 35 40 45

<210> 13
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 13

Phe His Ser Asp Asn Glu Thr Gln Met Ala Lys Leu Tyr Gly Asp Ser
 1 5 10 15

Lys Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr
 20 25 30

Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu
 35 40 45

Pro Gln Ser Gly Arg Ile
 50

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT

[0008]

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Glu或Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Lys或Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Ser或Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Val或Ile

<400> 14

Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Met Ala
1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Asn或Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Met或Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Gly或Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Gly或Arg

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Xaa Tyr Trp Ala Ile
1 5 10 15

[0009]

<210> 16
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 16

Cys Glu Leu Leu Ile Ser Arg Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys
 1 5 10 15

Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe Ser Trp Pro
 20 25 30

Asn His Thr Thr Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu
 35 40 45

Ser Ser Phe Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu
 50 55 60

Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val
 65 70 75 80

Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg
 85 90 95

Ala Leu Tyr His Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser His Tyr
 100 105 110

Ser Arg Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp
 115 120 125

Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Ile
 130 135 140

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr
 145 150 155 160

Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro
 165 170 175

Ser Ile Gln Ser
 180

<210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 免疫原性流行性感胃肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Ser或Cys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Arg、His或Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Asn、Ser或Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Val或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Ser或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Tyr或Met

<400> 17

Tyr Ala Xaa Lys Xaa Gly Gly Lys Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Pro Val
1 5 10 15

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 18
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 免疫原性流行性感胃肽

<400> 18

Asn Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Lys Ile Gly Thr Ser Gly
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Val Thr Asn Gly Asn Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala
20 25 30

Trp Ala Val Pro Lys Asn Asp Asn Asn Lys Thr Ala Thr Asn Ser Leu
35 40 45

[0011]

Thr Ile Glu Val Pro Tyr Ile Ser Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr
50 55 60

Ile Trp Gly Phe His Ser Asp Asn Glu Thr Gln Met Ala Lys Leu Tyr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Lys Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr
85 90 95

Thr His Tyr Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp
100 105 110

Gly Gly Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Gly Thr Ile Thr Tyr Gln
115 120 125

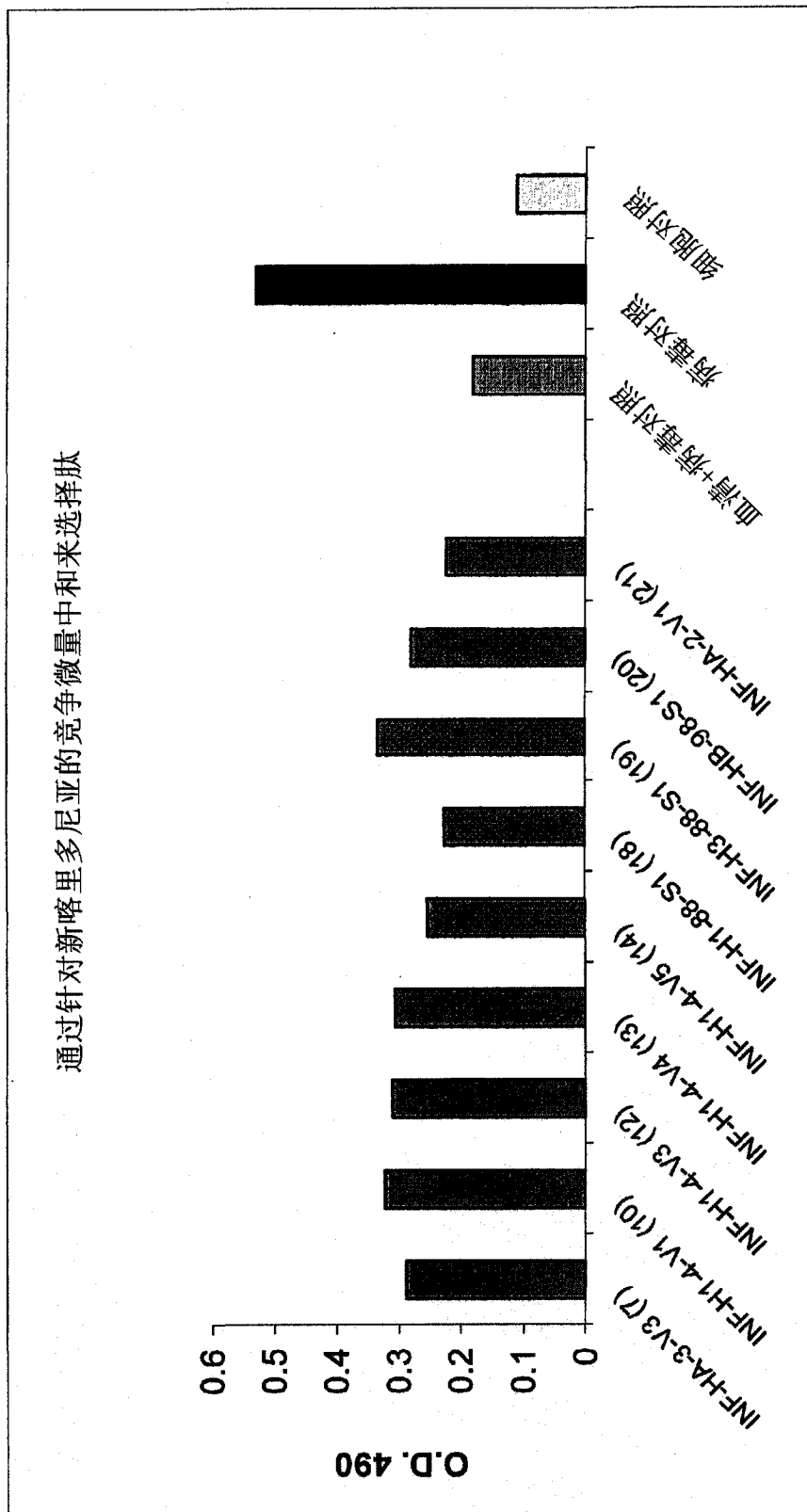


图 1A

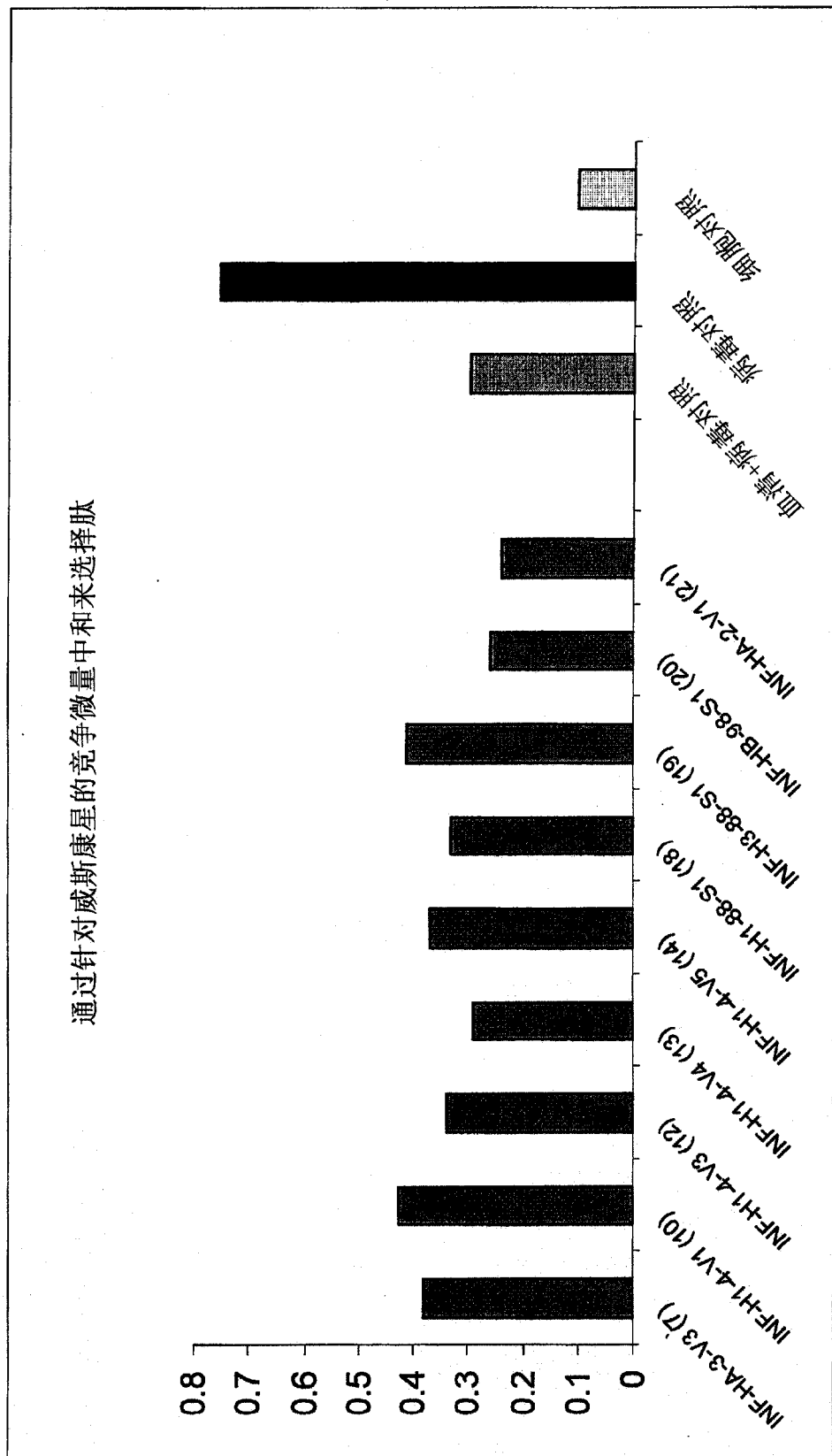


图 1B

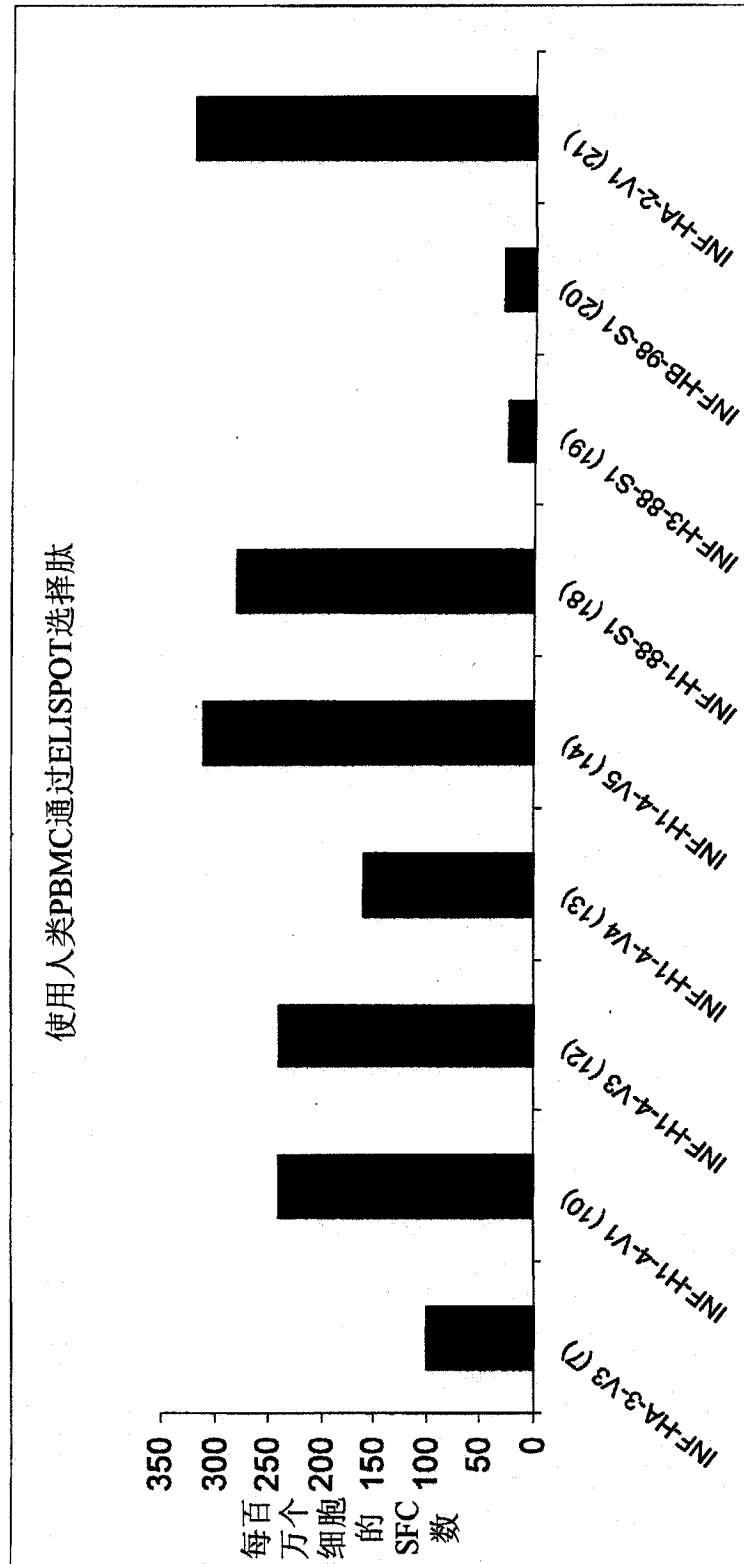


图 2

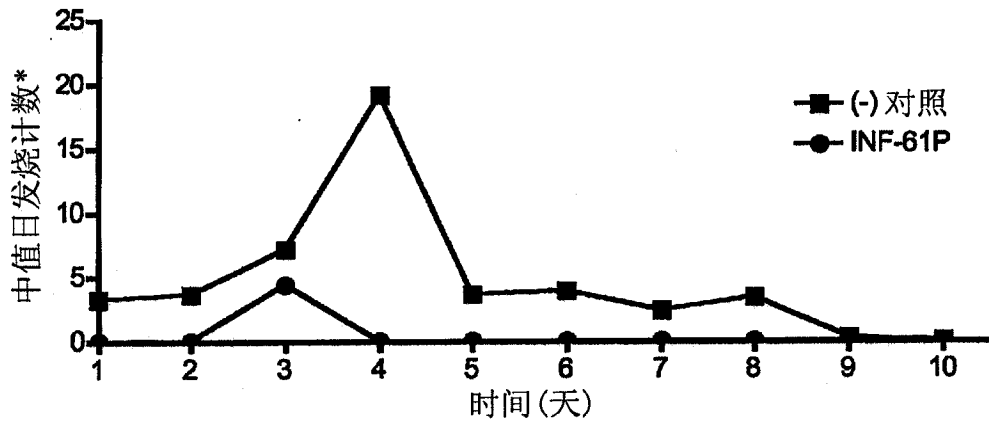


图 3

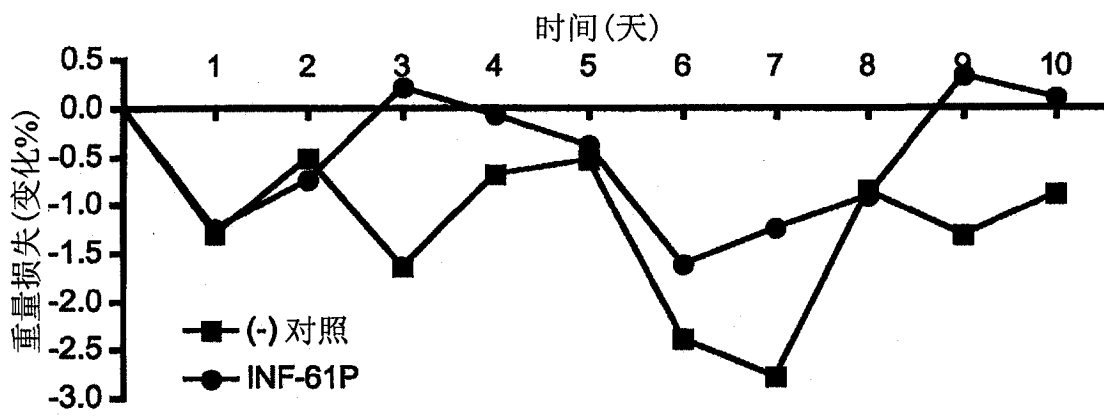


图 4

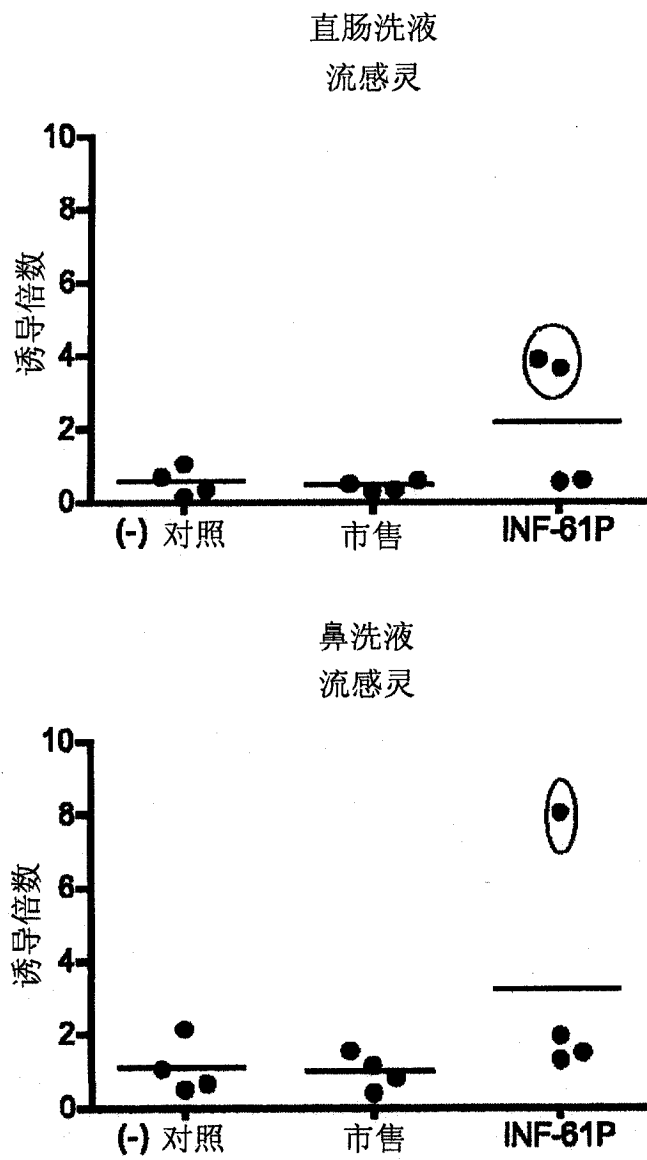


图 5

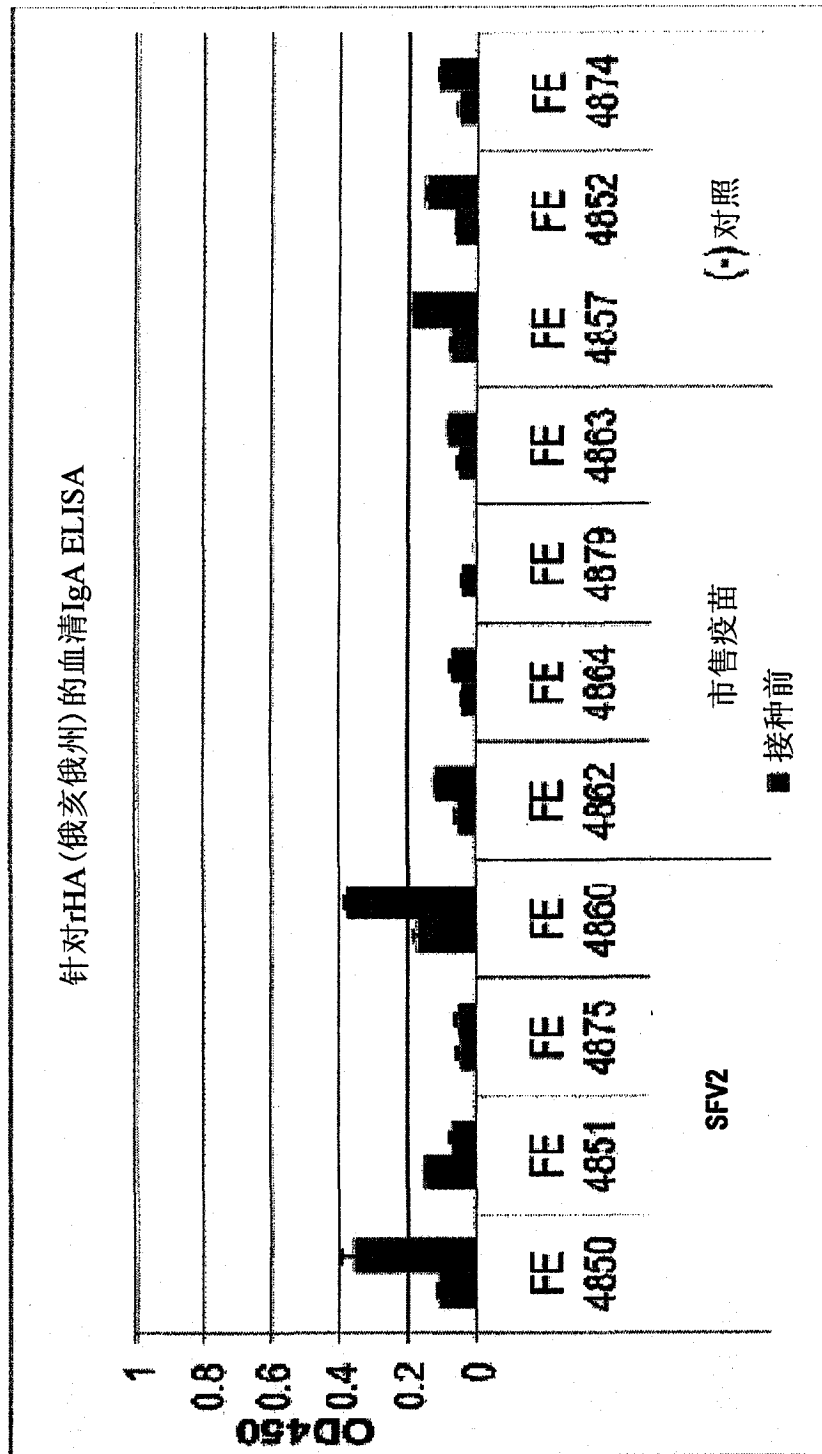


图 6

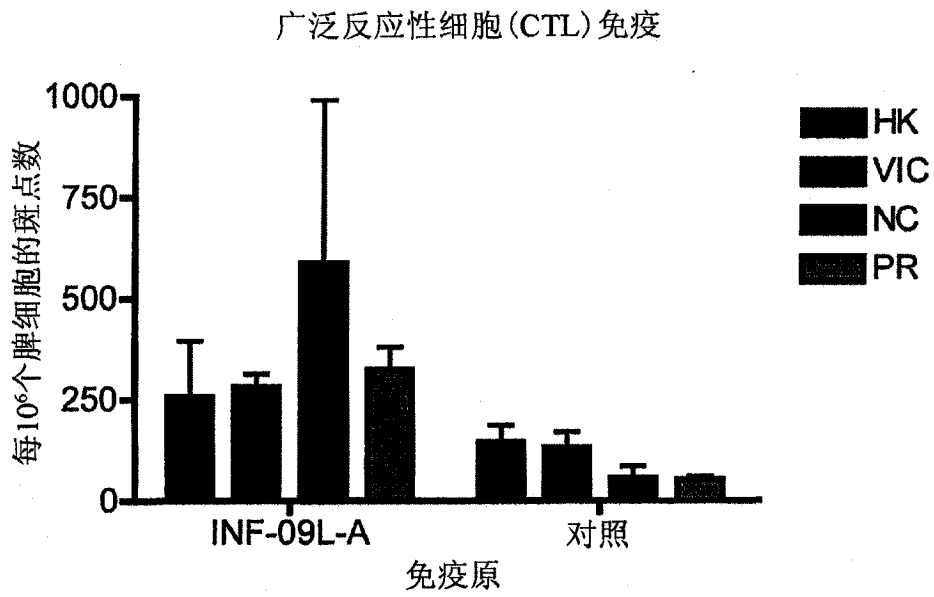


图 7

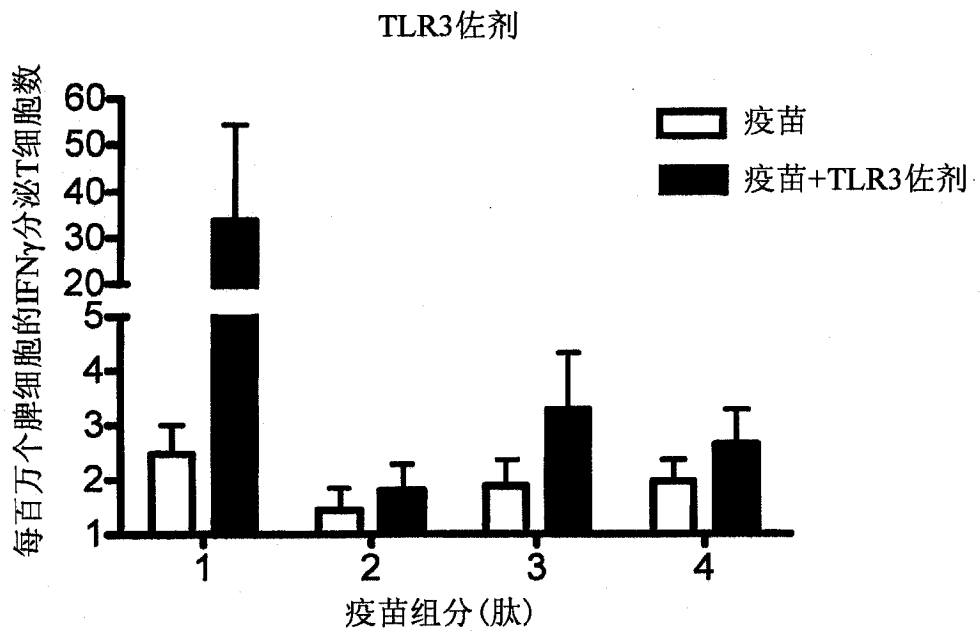


图 8

SEQ ID NO. 16

CELLISRESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFSWPNHTTTGVSASCSHNGESSFYKNLLWLTG
 KNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHKENAYVSVVSHYSRKFTPEI
 AKRPKVRDQEGRINYWTLLLEPGIIFEANGPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQS

SEQ ID NO. 17

描述	序列
一致	YAXKXGGKSSGSSYPVLXXXX
取代1号	---S-R-----NVSY
取代2号	---C-H-----SSTM
取代3号	----Y-----K---

SEQ ID NO. 18

NAEKAPGGPYKIGTSGSSPNVTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYISTEGE
 DQITIWFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGR
 IGTITYQ

图 9

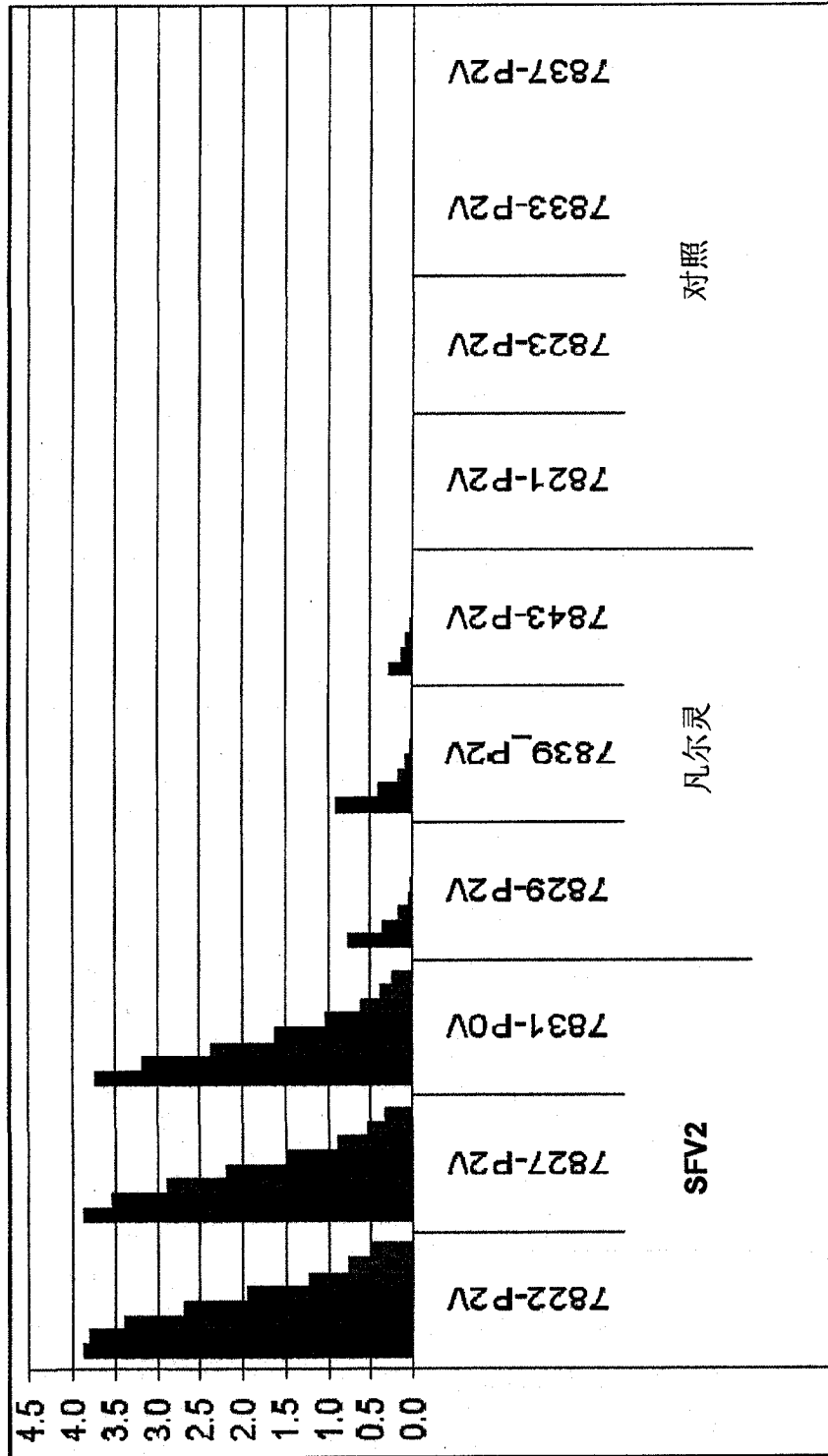


图 10A

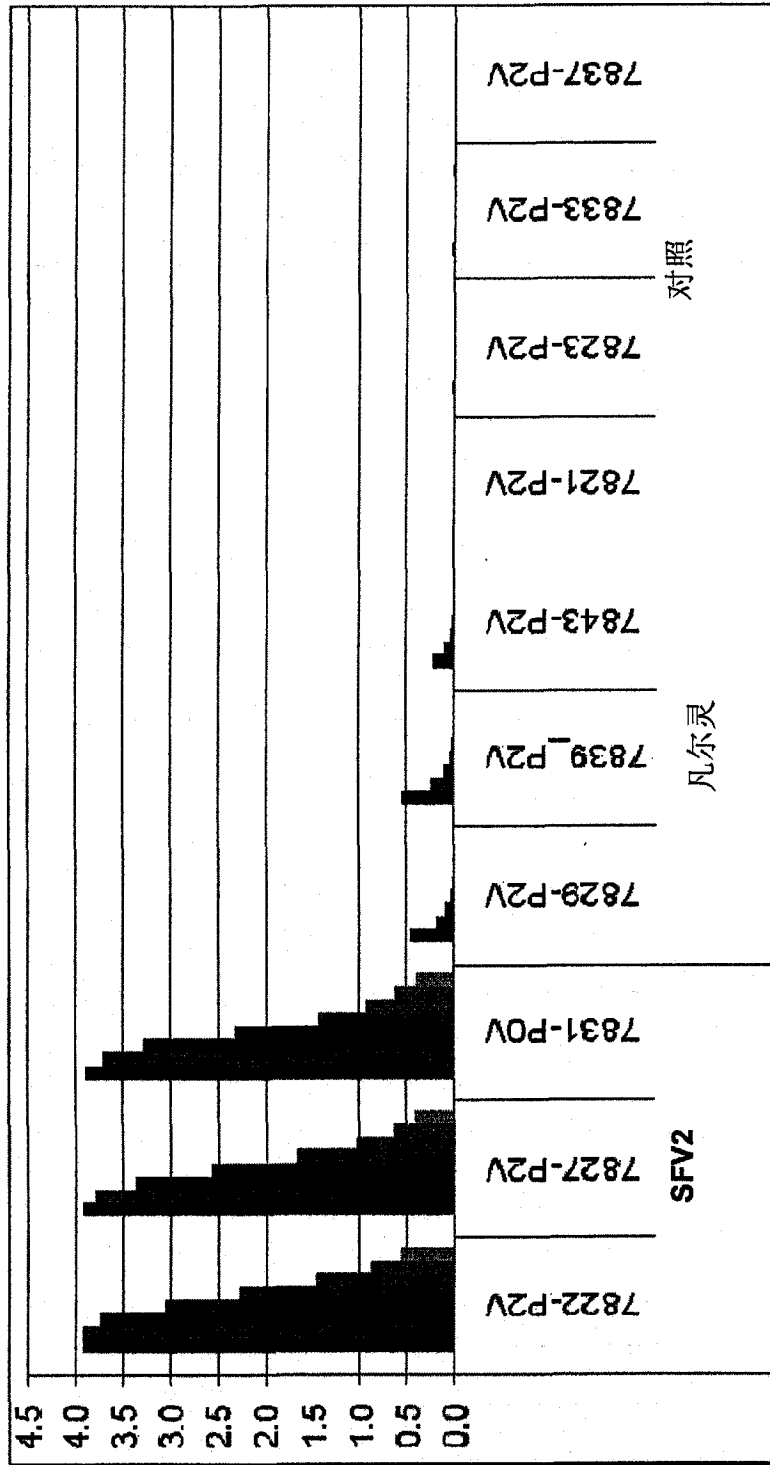


图 10B

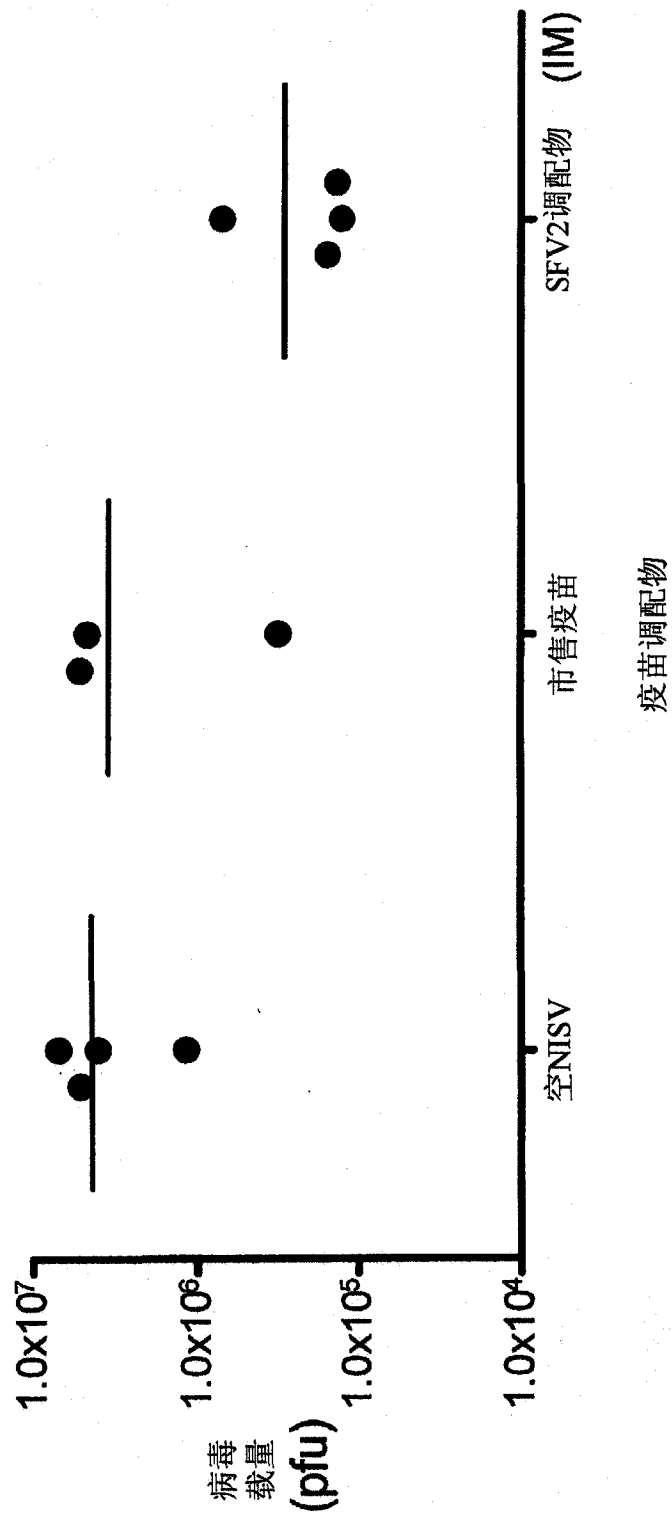


图 11

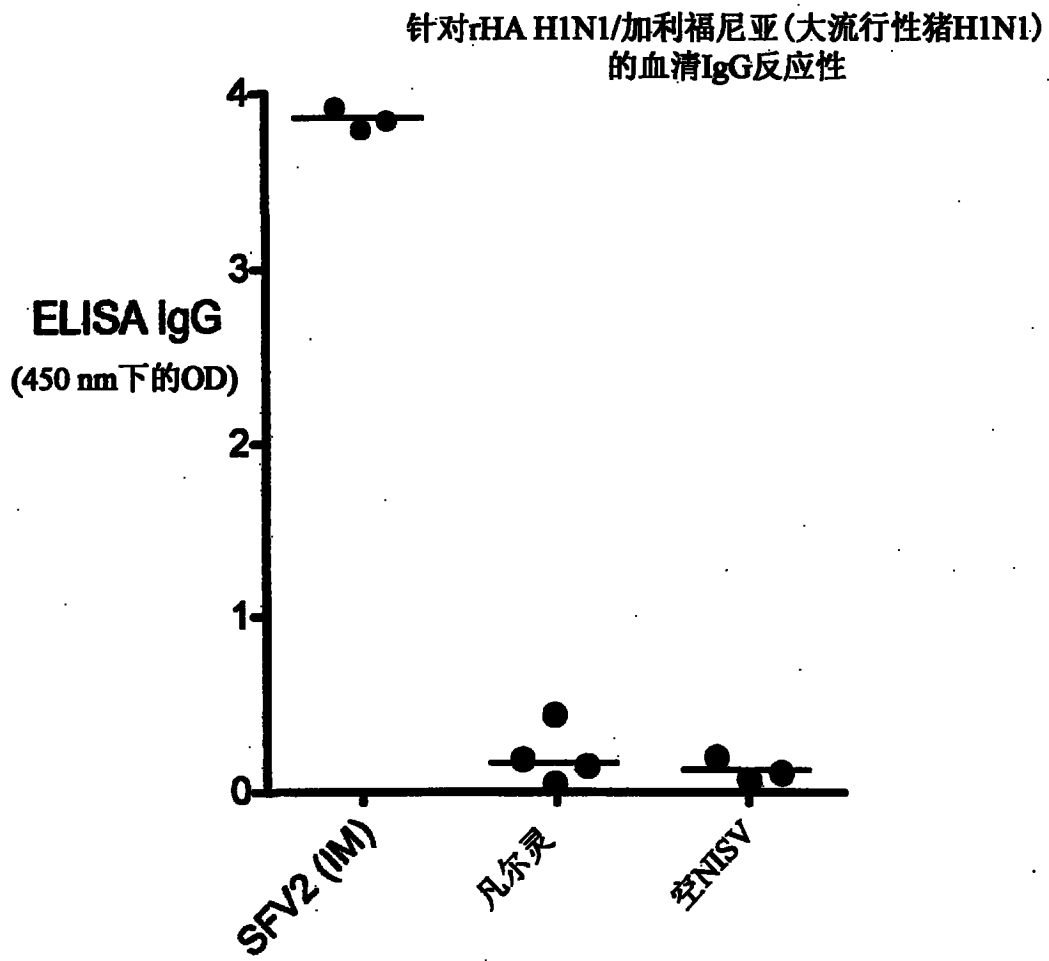


图 12

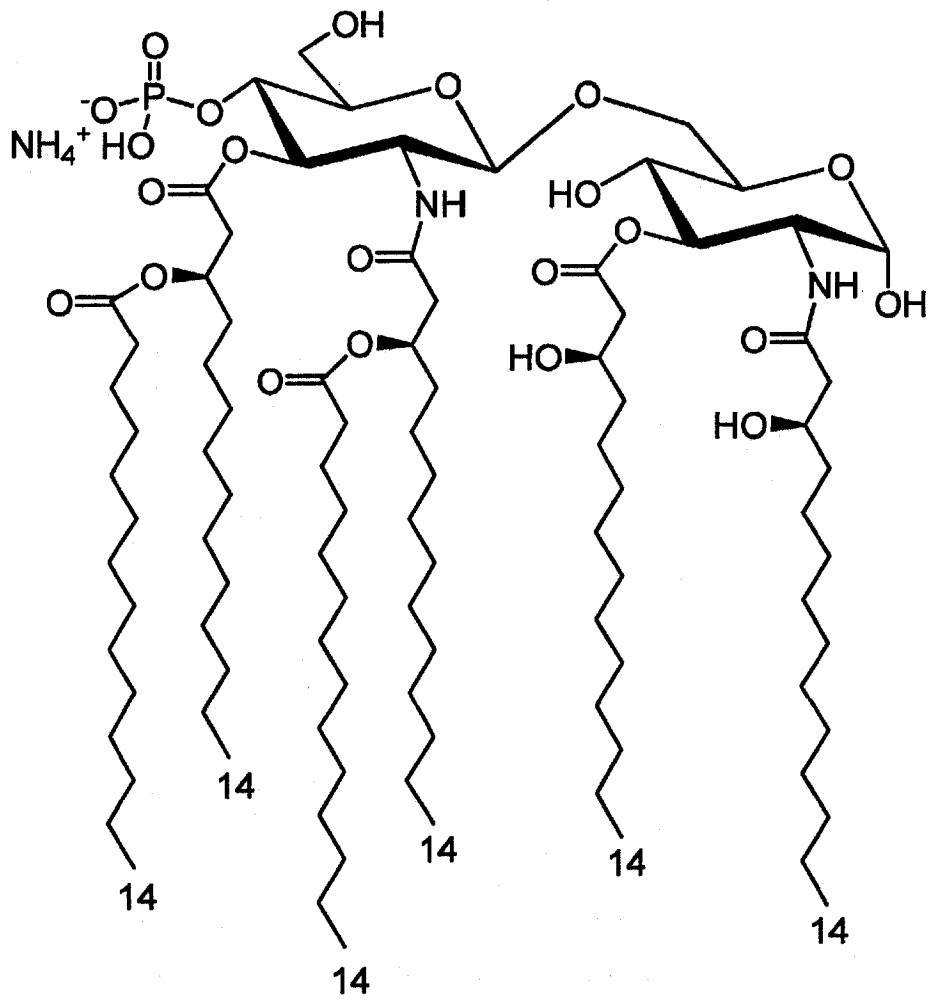


图 13

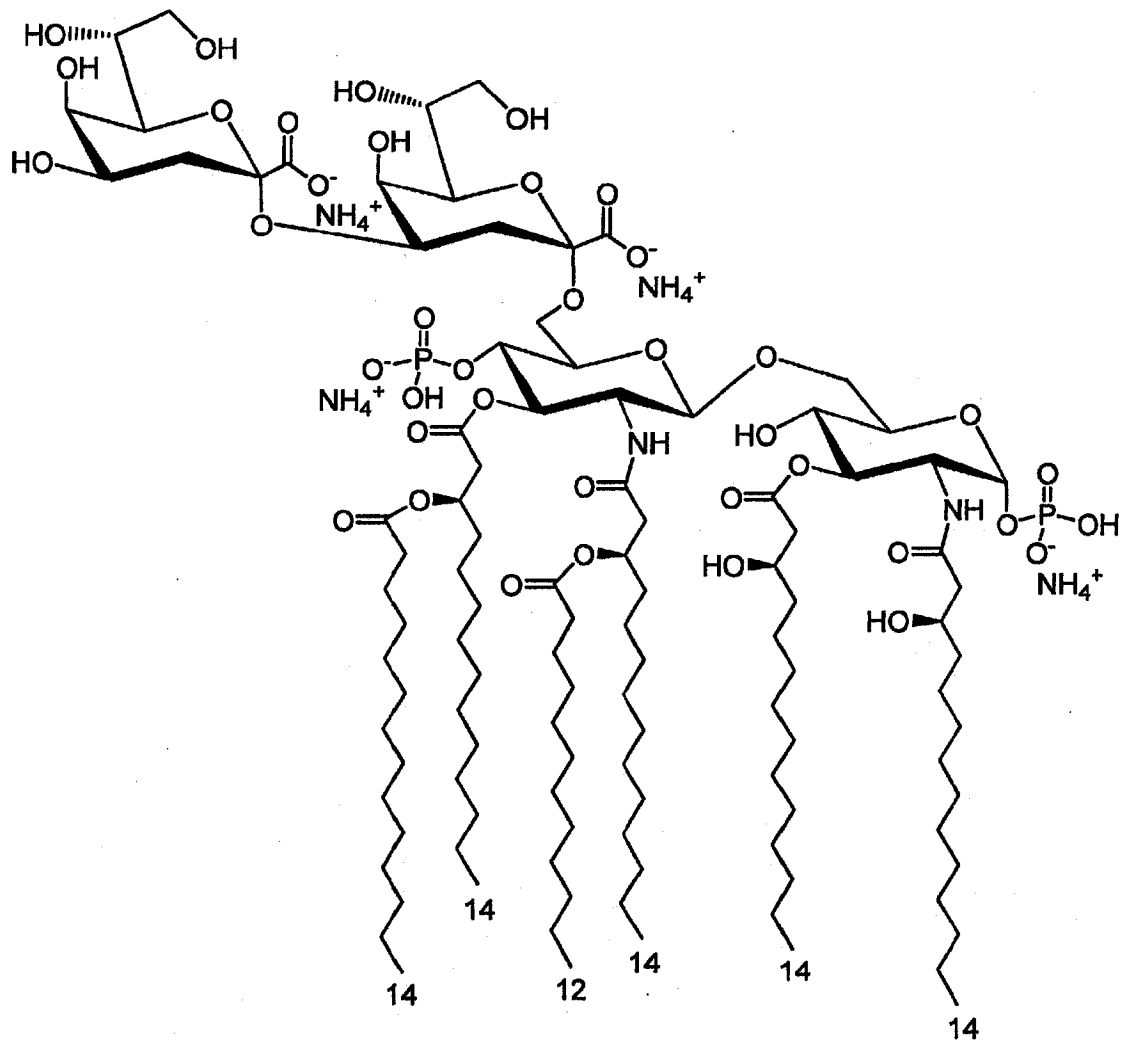


图 14