



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105148265 B

(45)授权公告日 2018.09.21

(21)申请号 201510511728.5

(22)申请日 2011.12.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105148265 A

(43)申请公布日 2015.12.16

(30)优先权数据

1022147.1 2010.12.31 GB

(62)分案原申请数据

201180067838.7 2011.12.30

(73)专利权人 英国阿尔特免疫公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 C·B·布朗 B·V·G·乔治斯

J·F·施博莱特

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51)Int.Cl.

A61K 39/385(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61K 47/54(2017.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 9/19(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101827607 A,2010.09.08,

CN 1980695 A,2007.06.13,

WO 2005094891 A3,2006.03.16,

审查员 张蕊

权利要求书2页 说明书29页

序列表9页 附图12页

(54)发明名称

碳氟连接的肽制剂

(57)摘要

本发明提供了一种适合用于制备可药用碳氟连接的肽制剂的水性酸性制剂,所述水性酸性制剂包含第一碳氟连接的肽,其中:连接到所述碳氟的所述肽为长度至少20个氨基酸残基,包含至少50%的疏水性氨基酸残基并具有大于或等于7的等电点;并且所述碳氟连接的肽以微团存在。

1. 一种适合用于制备可药用碳氟连接的肽制剂的水性酸性制剂,所述制剂包含
 - a) 乙酸;和
 - b) 至少一种碳氟连接的肽,其中:
 - (i) 连接到所述碳氟的所述肽包含至少20个氨基酸残基,包含至少50%的疏水性氨基酸残基并且具有大于或等于7的等电点;并且
 - (ii) 所述碳氟连接的肽以小于0.22 μ m的直径的微团存在,其中所述制剂具有5或小于5的pH。
2. 权利要求1的制剂,其中连接到所述碳氟的所述肽是衍生自病原体、自体蛋白或肿瘤细胞的免疫原性肽。
3. 权利要求2的制剂,其中所述病原体是病毒、细菌、分枝杆菌、寄生物或真菌。
4. 权利要求1的制剂,还包含可药用载体或稀释剂。
5. 权利要求1的制剂,其中所述碳氟包含3-20个碳原子的链,其中一个或多个氟部分任选地用卤素部分氯、溴或碘、甲基或氢替代。
6. 权利要求1的制剂,其中所述碳氟包含式 $C_8F_{17}(CH_2)_2$ 。
7. 一种获得可药用碳氟连接的肽制剂的方法,所述方法包括:
 - (i) 将碳氟连接的肽溶解于5-80%体积/体积(v/v) 乙酸水溶液中;
 - (ii) 将所述溶解的碳氟连接的肽过滤除菌;和
 - (iii) 干燥所述过滤除菌的碳氟连接的肽。
8. 权利要求7的方法,其中连接到所述碳氟的所述肽的长度为至少20个氨基酸残基,并且包含至少50%的疏水性氨基酸残基并且具有大于或等于7的等电点。
9. 权利要求7的方法,其中:
 - (a) 连接到所述碳氟的所述肽的长度为至少20个氨基酸残基,并且包含至少50%的疏水性氨基酸残基并且具有大于或等于7的等电点;
 - (b) 将所述碳氟连接的肽与一种或多种另外的碳氟连接的肽的混合物溶解于乙酸;
 - (c) 所述方法还包括将所述溶解的碳氟连接的肽与一种或多种另外的溶解的碳氟连接的肽混合;
 - (d) 所述溶解的碳氟连接的肽通过冷冻干燥进行干燥;
 - (e) 所述方法还包括将所述经干燥的碳氟连接的肽在水相中复原;
 - (f) 在步骤(ii)之前加入可药用载体、稀释剂和/或佐剂;
 - (g) 所述方法还包括将所述经干燥或复原的碳氟连接的肽保存在无菌容器中;并且/或者
 - (h) 连接到所述碳氟的所述肽为衍生自病原体、自体蛋白或肿瘤细胞的免疫原性肽。
10. 权利要求7的方法,其中连接到所述碳氟的所述肽为衍生自病原体、自体蛋白或肿瘤细胞的免疫原性肽。
11. 权利要求7的方法,其中所述碳氟包含3-20个碳原子的链,其中一个或多个氟部分任选地用卤素部分氯、溴或碘、甲基或氢替代。
12. 一种可通过权利要求7-11任一项的方法获得的制剂。
13. 权利要求12的制剂在制造用于通过疗法治疗人体或动物体的药物中的用途。
14. 权利要求12的制剂在制造用于治疗或预防病原体感染、自身免疫性疾病或癌症的

药物中的用途。

15. 权利要求12的用途,其中所述病原体感染是乙型肝炎病毒。

16. 一种无菌的、经干燥的碳氟连接的肽的混合物,其中所述经干燥的混合物包含一种以上碳氟连接的肽,其中至少一种连接到所述碳氟的所述肽包含至少20个氨基酸残基,包含至少50%的疏水性氨基酸残基并且具有大于或等于7的等电点并且以小于0.22 μ m的直径的微团存在;并且其中所述混合物是固体形式的。

17. 权利要求16的经干燥的混合物,其中所述固体形式被冷冻干燥为无定形结块或粉剂。

18. 权利要求17的经干燥的混合物,其中所述固体形式通过真空干燥、喷雾干燥、冷冻干燥或流化床干燥进行冷冻干燥。

19. 权利要求16的经干燥的混合物,其中所述固体被冷冻干燥。

20. 权利要求16的经干燥的混合物,进一步包括密封的瓶、安瓿或注射器。

21. 一种可药用制剂,其包含以小于0.22 μ m的直径的微团存在的一种或多种碳氟连接的肽,其中所述碳氟连接的肽在水中不溶并且能够在乙酸中形成微团,其中:

(a) 连接到所述碳氟的所述肽的长度为至少20个氨基酸残基,并且包含至少50%的疏水性氨基酸残基并且具有大于或等于7的等电点;并且

(b) 所述制剂是:

(i) 干燥形式,其能够被复原以形成无可见聚集体的澄清水溶液;或

(ii) 无可见聚集体的澄清水溶液。

22. 权利要求21的制剂,其中所述肽的长度为25-45个氨基酸。

23. 权利要求21的制剂,其中所述干燥形式被冷冻干燥为无定形结块或粉剂。

24. 权利要求21的制剂,其中所述干燥形式通过真空干燥、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥或流化床干燥进行冷冻干燥。

25. 权利要求21的制剂,其中所述干燥形式被冷冻干燥。

26. 权利要求21的制剂,进一步包括密封的瓶、安瓿或注射器。

碳氟连接的肽制剂

[0001] 本申请是申请日为2011年12月30日,申请号为201180067838.7,发明名称为“碳氟连接的肽制剂”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含碳氟连接的肽的可药用制剂、用于制备这类可药用制剂的制剂、制备这类制剂的方法以及这类制剂作为疫苗和免疫治疗剂的用途。

背景技术

[0003] 将合成肽抗原用于疫苗以预防感染性疾病(例如病毒感染、细菌感染、寄生虫感染和真菌感染)受到关注。合成肽抗原在免疫治疗剂领域——包括治疗感染、刺激对癌细胞的免疫、下调多肽激素以及控制不恰当的免疫应答例如过敏反应和变态反应——也受到关注。

[0004] 实际使用基于肽的疫苗和免疫治疗中的一个难点是确保通过有效地递送肽抗原至抗原呈递细胞而诱导免疫应答。如果没有这种靶向作用,则可能需要难以实施的量的肽,这不仅在制造上是不经济的而且也会导致毒性问题。

[0005] 肽递送的增强可通过专门的递送载体来实现,例如能够持续释放的基于微粒的结构。另外,已经开发了包含共价连接到递送增强剂的目的肽的肽衍生物或修饰肽,以改进生物利用度及呈递所述肽至特定靶细胞和受体。

[0006] 通过将碳氟链共价连接至肽N末端或C末端,或两者之间的任何位置以产生碳氟连接的肽(FCP)而构建了被修饰以改善至抗原呈递细胞的递送的一类具体肽。碳氟连接的肽的实例在W02005/099752和W02009/027688中给出,其中提供了在增强对所述肽的免疫应答中由碳氟连接赋予的优点。

[0007] 疫苗设计者会理解,可能需要多于一种肽以提供更宽的预防或免疫治疗效果。这类多组分产品是合乎需要的,因为它们很可能更有效地激发恰当的免疫应答。

[0008] 为了制造该性质的药剂,必须合成、纯化、以恰当的比例混合所述碳氟连接的肽,使其无菌并以适于给药的同质形式提供。

发明内容

[0009] 本发明人已发现,碳氟连接的肽经常难溶于水性介质,例如水或磷酸盐缓冲盐水,即使当未连接的肽可溶于水性介质时也如此。他们还发现,碳氟连接的肽中肽组分的长度和疏水性影响所述碳氟连接的肽的溶解性。尤其地,已发现连接到显示出更好免疫遗传性质的更长、疏水性更强的肽的碳氟载体是尤其不溶的。

[0010] 碳氟连接的肽是双亲性的,并特征性地在极性(质子和非质子)溶剂和非极性溶剂中形成多分子微团型结构。天然未连接的肽通常不形成这类结构。但是,本发明人已发现,许多碳氟连接的肽,尤其是具有最佳免疫原性性质的那些,在水性介质和其他溶剂中倾向于形成大的可见聚集体。这类聚集体的形成在需要产生同质的、可表征的制剂的药物制造

过程中是不可接受的。

[0011] 已经认识到了该问题,本发明人已经将其解决并设计了一种制备碳氟连接的肽制剂的方法,其中维持了支持所述碳氟连接的肽的溶解性的超分子结构。发明人开发的配制方法使得有可能制造包含以前被发现难以配制的免疫原性的碳氟连接的肽的稳定产品,所述产品可用水性介质容易地复原以获得可药用溶液。

[0012] 具体地,发明人已发现,使用酸性溶液可促进微团形成并避免不溶性聚集体的形成。所述溶解的碳氟连接的肽可通过过滤除菌,而不损失溶液中的碳氟连接的肽。在冷冻干燥之后,通常在冷冻保护剂的存在下,可将碳氟连接的肽以稳定的形式储存并溶解于水性介质中以获得用于给药的可药用溶液。

[0013] 发明人已发现,对于宽范围的碳氟连接的肽,乙酸是尤其适合的溶剂,尽管不同肽的电荷和疏水性具有高度的可变性。因此,乙酸也尤其适用于溶解碳氟连接的肽的混合物。

[0014] 因此,本发明提供了一种适合用于制备可药用碳氟连接的肽制剂中的水性酸性制剂,所述制剂包含第一碳氟连接的肽,其中:

[0015] (i) 连接到所述碳氟的肽为长度至少20个氨基酸残基,包含至少50%的疏水性氨基酸残基并且具有大于或等于7的等电点;并且

[0016] (ii) 所述碳氟连接的肽以直径小于0.22 μ m的微团存在。

[0017] 优选地,所述制剂包含乙酸。所述水性制剂可具有例如5或小于5的pH。

[0018] 所述制剂可包含存以直径小于0.22 μ m的微团存在的一种或多种另外的碳氟连接的肽。优选地,所述制剂中存在的至少80%的碳氟连接的肽微团具有小于100nm的直径。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的制剂不包含这样的碳氟连接的肽,即其中连接到所述碳氟的所述肽:(i) 具有小于7的等电点;(ii) 在所述碳氟远端的最后15个连续氨基酸中不包含带正电的氨基酸;并且/或者(iii) 包含含有多于80%的疏水性氨基酸残基的20个氨基酸残基的连续序列。

[0020] 连接到所述碳氟的所述肽通常是衍生自病原体、自体蛋白或肿瘤细胞的免疫原性肽。本发明的制剂还可包含可药用载体或稀释剂和/或佐剂。

[0021] 本发明还提供了:

[0022] 一种获得可药用的碳氟连接的肽制剂的方法,所述方法包含:

[0023] (i) 将碳氟连接的肽溶解于乙酸;

[0024] (ii) 将所述溶解的碳氟连接的肽过滤除菌;和

[0025] (iii) 干燥所述过滤除菌的碳氟连接的肽。

[0026] 一种可通过本发明的方法获得的碳氟连接的肽制剂;

[0027] 一种包含6种碳氟连接的肽的可药用制剂,其中连接到所述碳氟的肽包含SEQ ID NO:1-6中列出的序列,并且其中所述制剂不包含其他碳氟连接的肽;

[0028] 一种本发明的可药用制剂,用于通过疗法来治疗人体或动物体的方法中;

[0029] 一种本发明的可药用制剂,用于治疗或预防病原体感染、自身免疫性疾病或癌症的方法中;

[0030] 本发明的可药用制剂在制造用于治疗或预防病原体感染、自身免疫性疾病或癌症的药剂中的用途;以及

[0031] 一种治疗或预防病原体感染、自身免疫性疾病或癌症的方法,所述方法包含向需

要其的个体给予有效量的本发明的可药用制剂。

附图说明

[0032] 图1示出了典型的碳氟连接的肽制造过程流程的实例。

[0033] 图2示出了备选的碳氟连接的肽制造过程流程。

[0034] 图3的表示出溶于多种溶剂的各个FCP的目视检查结果。漩涡后目视检查每种溶液的澄清度,对于澄清溶液指定“+++”的得分至对于高度浑浊的溶液指定“-”的得分。还记录了泡沫形成程度和微粒的存在情况,“+++”表示高水平,“-”表示均不存在。“*”表示溶液变粘稠。

[0035] 图4的表示出用甘露醇溶液稀释后溶于每种溶剂中的各个FCP的目视检查的结果。目视检查每种溶液的澄清度,对于澄清溶液指定“+++”的得分至对于高度浑浊的溶液指定“-”的得分。还记录了泡沫形成程度和微粒的存在情况,“+++”表示高水平,“-”表示均不存在。

[0036] 图5示出了通过动态光散射 (Dynamic Light Scattering, DLS) 评估的混合和稀释后溶液中碳氟连接的肽的粒度。

[0037] 图6示出了通过透射电子显微术 (TEM) 评估的混合和稀释后溶液中碳氟连接的肽颗粒的大小和形状。

[0038] 图7示出了通过DLS评估的在除菌级过滤之前 (A) 和之后 (B) 的碳氟连接的肽颗粒的以体积表示的大小分布。

[0039] 图8示出了通过DLS评估的在Tris 10mM pH7.85 (A) 和水 (B) 中复原的碳氟连接的肽颗粒的以体积表示的大小分布。

[0040] 图9示出了暴露于50% (v/v) 乙酸中24小时的7种碳氟连接的肽的混合物的RP-HPLC分析的结果。

[0041] 图10示出了用手摇动后,碳氟连接的肽的经配制混合物和未经配制混合物的照片。瓶A:经配制的+甘露醇/水;瓶B:经配制的+甘露醇/组氨酸;瓶C:未经配制的+甘露醇/水;瓶D:未经配制的+甘露醇/组氨酸。

[0042] 图11示出了漩涡和超声后的碳氟连接的肽的经配制混合物和未经配制混合物的照片。瓶A:配制的+甘露醇/水;瓶B:经配制的+甘露醇/组氨酸;瓶C:未经配制的+甘露醇/水;瓶D:未经配制的+甘露醇/组氨酸。

[0043] 图12示出了包含6种碳氟连接的流感肽的制剂 (FP-01.1) 的透射电子显微镜照片。

[0044] 图13示出了过滤后的FR01.1在 t_0 (上图) 和24小时后 (下图) 的HPLC谱。

[0045] 图14示出了在水中复原后FP01.1的HPLC谱。

[0046] 图15示出了在水中复原的经配制的碳氟肽 (FP01.1) 和未经配制的肽的比较。左照片在20分钟静置后拍摄,右照片在3分钟超声处理后拍摄。

[0047] 图16示出了在28mM L-组氨酸中复原的经配制的碳氟肽 (FP01.1) 与未经配制的肽的比较。左照片在20分钟静置后拍摄,右照片在3分钟超声处理后拍摄。

[0048] 图17示出了大鼠中的体积调整的剂量应答。在测试的所有剂量水平下,FP-01.1以剂量依赖的形式诱导了阳性IFN- γ T细胞应答。

[0049] 图18示出了使用体外IFN- γ ELISpot测定观察到的疫苗诱导的T细胞应答。用6种

个体肽(对应于所述疫苗中含有的肽)刺激PBMC 18小时。阳性测定响应被定义为阴性对照孔中斑点数的平均值+所述平均值的2倍标准差。计算了6种肽的每一个的斑点数以获得“长肽的总和”，并表示为每一百万输入的PBMC的斑点数。

[0050] 序列说明

[0051] 对应于实施例中使用的肽的序列列表如下表所示。

[0052]

序列	肽
SEQ ID NO:1	没有N末端赖氨酸的P1
SEQ ID NO:2	没有N末端赖氨酸的P8
SEQ ID NO:3	没有N末端赖氨酸的P9
SEQ ID NO:4	没有N末端赖氨酸的P2
SEQ ID NO:5	没有N末端赖氨酸的P4
SEQ ID NO:6	没有N末端赖氨酸的P5
SEQ ID NO:7	没有N末端赖氨酸的P1变体
SEQ ID NO:8	没有N末端赖氨酸的P8变体
SEQ ID NO:9	没有N末端赖氨酸的P8变体
SEQ ID NO:10	没有N末端赖氨酸的P10
SEQ ID NO:11	没有N末端赖氨酸的P3

[0053]

SEQ ID NO:12	没有N末端赖氨酸的P4变体
SEQ ID NO:13	没有N末端赖氨酸的P6
SEQ ID NO:14	没有N末端赖氨酸的P7
SEQ ID NO:15	没有N末端赖氨酸的P11
SEQ ID NO:16	没有N末端赖氨酸的P12
SEQ ID NO:17	有N末端赖氨酸的P1
SEQ ID NO:18	有N末端赖氨酸的P8
SEQ ID NO:19	有N末端赖氨酸的P9
SEQ ID NO:20	有N末端赖氨酸的P2
SEQ ID NO:21	有N末端赖氨酸的P4
SEQ ID NO:22	有N末端赖氨酸的P5
SEQ ID NO:23	有N末端赖氨酸的P3
SEQ ID NO:24	有N末端赖氨酸的P6
SEQ ID NO:25	有N末端赖氨酸的P7
SEQ ID NO:26	有N末端赖氨酸的P10
SEQ ID NO:27	有N末端赖氨酸的P11
SEQ ID NO:28	有N末端赖氨酸的P12

具体实施方式

[0054] 本发明提供了一种配制用于给予人或动物的碳氟连接的肽的方法和可通过本发

明的方法获得的可药用的碳氟连接的肽制剂。本发明的方法包含将所述碳氟连接的肽溶于酸性溶液,优选溶于乙酸的步骤。本发明还提供了水性制剂,所述水性制剂是酸性的并因此不适用于给予人或动物,但是其对于获得所述可药用的制剂是重要的。

[0055] 通常,在配制方法中使用的或者在本发明的水性酸性制剂或可药用制剂中存在的至少一种碳氟连接的肽包含至少20个氨基酸残基的肽,所述肽具有至少50%的疏水性氨基酸残基并具有大于或等于7的等电点。

[0056] 本发明的制剂可包含,或者本发明的配制方法可使用,至少一种碳氟连接的肽,其中所述肽包含至少约20个氨基酸,其中至少约50%的氨基酸是疏水性的。所述制剂中存在的其他碳氟连接的肽可以短于20个氨基酸并且/或者可具有少于50%的疏水性残基。

[0057] 本发明的制剂可含有包含至少7个氨基酸至最高达约100个氨基酸,例如约9至约50个氨基酸,优选约15至约45个氨基酸,更优选约20至约40个氨基酸,例如约25至约38,例如30、31、32、33、34、35、36或37个氨基酸的序列的碳氟连接的肽。

[0058] 本发明的制剂可包含至少一种碳氟连接的肽,其中所述肽中至少50%的氨基酸是疏水性的。通常,约50%至约80%,例如约70%或约75%的残基是疏水性的。下限可以为48%或49%。优选地,所述肽包含约55%至约60%或约65%的疏水性残基。当所述制剂包含另外的碳氟连接的肽时,所述另外的碳氟连接的肽可具有少于50%的疏水性。例如,另外的碳氟连接的肽的肽组分可包含约30%至约70%的疏水性残基,例如约40%,例如约45%、50%、55%、60%或65%的疏水性残基。色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、异亮氨酸(I)、苯丙氨酸(F)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、甲硫氨酸(M)、精氨酸(A)、脯氨酸(P)、甘氨酸(G)和半胱氨酸(C)为疏水性氨基酸。在一个优选实施方案中,所述制剂中存在的肽都不包含其中多于80%的残基为疏水性的具有20或更多个氨基酸残基的连续序列。

[0059] 所述一种或多种另外的碳氟连接的肽可包含这样的肽:长度为至少20个氨基酸残基;包含至少50%的疏水性氨基酸残基;并且/或者具有大于或等于7的等电点。所述第一碳氟连接的肽和/或一种或多种另外的碳氟连接的肽可包含这样的肽:在所述碳氟远端最后的15个连续氨基酸中包含带正电的氨基酸;并且/或者不包含含有多于80%疏水性氨基酸残基的20个氨基酸残基的连续序列。

[0060] 在一个实施方案中,本发明制剂中的肽都不具有小于7的等电点,在碳氟远端的最后15个连续氨基酸中不包含带正电的氨基酸,并且/或者包含含有多于80%疏水性氨基酸残基的20个氨基酸残基的连续序列。

[0061] 在本发明的制剂中所述碳氟连接的肽通常以直径小于0.22 μ m的微团存在。所述微团通常具有约15至约200nm,通常约20nm至约100nm,例如约20nm至约30nm或约30nm至约50nm的直径。然而,可存在一些更大的微团。通常,不多于20%,例如约10%至约15%的聚集体具有大于100nm的直径。优选地,所述碳氟连接的肽微团的至少80%具有小于100nm的直径。微团大小可通过任何合适的方法测定,例如通过动态光散射(DLS)或使用透射电子显微术(TEM)。

[0062] 通过将所述碳氟连接的肽溶于酸性溶液可有助于微团的形成。例如,如本文所述,可将所述碳氟连接的肽溶于乙酸。用于制备可药用制剂的本发明的水性制剂可以是酸性的,具有例如5或更小的pH。

[0063] 本发明的可药用制剂可以是干燥形式例如冻干形式。本发明的可药用制剂可以为

水溶液,例如通过将冻干物或其他干燥的制剂溶于水性介质形成的溶液。所述水溶液通常是pH中性的。

[0064] 在本发明的水性(液体)制剂中,所述溶液通常是澄清的,没有可见的聚集体。尤其地,在通过漩涡和超声处理扰动后,所述溶液中没有可见微粒。这对所述酸性制剂和所述可药用制剂都适用。

[0065] 所述肽通常是能够诱导动物(包括人)中免疫应答的肽抗原或变应原,即所述肽通常是免疫原性肽。所述免疫应答优选在宿主中具有有益的效应。免疫原性肽可衍生自传染原(病原体),例如病毒、细菌、分枝杆菌、寄生物或真菌,或者衍生自自体蛋白,例如癌抗原(衍生自肿瘤细胞的蛋白),或衍生自变应原。

[0066] 病毒的实例包括但不限于动物病毒和人病毒,例如流感病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV)、甲型肝炎病毒(HAV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)、日本脑炎病毒(JEV)、巨细胞病毒(CV)、EB病毒(EBV)、疱疹病毒(HSV-1或HSV-2)、埃博拉病毒(Ebola)、马尔堡病毒(Marburg)、登革热病毒(Dengue)、西尼罗河病毒(West Nile)和黄热病病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)和猫免疫缺陷病毒(Feline Immunodeficiency Virus,FIV)。

[0067] 细菌和分枝杆菌的实例包括但不限于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、军团菌、立克次氏体、衣原体和单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)。

[0068] 寄生物的实例包括但不限于恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)和疟原虫家族的其他种。

[0069] 真菌的实例包括但不限于白色念珠菌(*Candida albicans*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)和肺囊虫(*Pneumocystis*)。

[0070] 自抗原或自身抗原包括但不限于以下与癌症相关的抗原:P53、MAGE-A3、NY-ESO-1、SURVIVIN、WT1、HER-2/neu、MUC 1、hTERT、MAGE-1、LAGE-1、PAP、T21、TRP-2、PSA、Livin、HAGE、SSX-1、PRAME、PASD1、IMP-3、SSX-4、CDCA-1和/或BAGE。

[0071] 变应原包括但不限于与对蜜蜂的严重反应有关的磷脂酶A₂(API m1),与抗屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*)反应有关的Derp-2、Der p2、Der f、Der p5和Der p7,蟑螂变应原Bla g2及主要桦树花粉变应原Bet v1。

[0072] 在一个实施方案中,所述肽衍生自流感病毒。流感肽抗原可包含来自A型流感蛋白、B型流感蛋白或C型流感蛋白的一个或多个表位。来自A型流感和B型流感的流感病毒蛋白的实例包括任意组合的血凝素、神经氨酸酶、基质(M1)蛋白、M2、核蛋白(NP)、PA、PB1、PB2、NS1或NS2。

[0073] 本文使用的术语“免疫原性的”是指分子具有被免疫受体例如T细胞受体(TCR)或B细胞受体(BCR或抗体)识别的能力。免疫原性肽可以是天然的或非天然的,只要它呈现至少一个表位,例如T细胞表位和/或B细胞表位。所述肽可含有一个或多个T细胞表位,包括T辅助细胞表位和/或细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位,和/或一个或多个B细胞表位或T细胞表位与B细胞表位的结合物,例如MHC I类或MHC II类表位。鉴定表位的方法在本领域是熟知的。

[0074] 所述肽可包含一个或多个表位。所述肽可包含连接在一起的多于一个表位。一个

这样的实例是使用融合肽,其中杂乱的(promiscuous)T辅助细胞表位可共价连接到一个或多个CTL表位或者一个或多个B细胞表位。例如,所述杂乱的T辅助细胞表位可以是PADRE肽、破伤风毒素肽(830-843)或流感血凝素HA(307-319)。

[0075] 所述表位可以是重叠的线性表位,从而使所述肽包含密集排列的多特异性表位的簇。

[0076] 未缀合到所述碳氟联结物(attachment)的肽的末端可被改变以通过形成微团来提升所述构建体的溶解性。例如,可向所述肽添加带正电的氨基酸以促进微团的装配。可将肽的N末端或C末端偶联至所述载体以产生所述构建体。为了有利于所述构建体的大规模合成,可修饰所述肽的N末端或C末端氨基酸残基。当所需要的肽对肽酶的切割尤其敏感时,正常的肽键可由不可切割的模拟肽替代。这种键和合成方法在本领域是熟知的。

[0077] 非标准的、非天然的氨基酸也可被纳入肽序列中,只要它们不干扰所述肽与MHC分子相互作用的能力并保持与识别所述天然序列的T细胞的交叉反应。非天然氨基酸可用于改进对蛋白酶的肽抗性或化学稳定性。非天然氨基酸的实例包括D-氨基酸和半胱氨酸修饰。

[0078] 所述肽可源自天然蛋白的纯化,或者通过重组技术或通过化学合成而产生。肽的制备方法在本领域是熟知的。

[0079] 疫苗设计者会理解,可能需要多于一种的肽以提供更广泛的预防或免疫治疗效果。这种多组分产品是合乎需要的,因为它们很可能更有效地激发恰当的免疫应答。例如,流感疫苗的最优制剂可包含来自不同流感蛋白的数个肽表位,或者HIV免疫治疗剂的最优制剂可包含来自不同HIV蛋白的数个表位。或者,可将多个表位纳入至制剂中以赋予抗一系列病原体的免疫。例如,呼吸道感染疫苗可含有来自流感病毒和呼吸道合胞病毒的表位。

[0080] 本发明的制剂可包含多种免疫原性肽。通常每种肽包含不同的表位。可将每种肽连接至常用的碳氟载体。更实际地,碳氟连接的肽的结合物可存在于本发明的制剂中,其中将不同的肽单独地连接到碳氟链。在碳氟连接的肽的混合物中,可将每种肽连接到单一结构的碳氟链。或者,所述混合物可包含连接到具有不同结构的碳氟链的肽。

[0081] 本发明的制剂可包含一种或多种碳氟连接的肽,优选约2至约20种,优选约3至约10种。在具体实施方案中,所述多组分疫苗可含有4、5、6、7、8或9种碳氟连接的肽。这有助于产生多表位免疫应答。

[0082] 在多组分产品中存在的不同肽可以是来自相同病原体的不同抗原,或者可以是来自不同病原体的抗原。或者,所述肽可以是不同肿瘤抗原或者是来自自体蛋白的不同部分的抗原。

[0083] 在实施例中使用了包含免疫原性流感肽的碳氟连接的肽。本发明不限于这些具体的肽,而是扩展至具有上述性质的任何免疫原性肽。但是,本发明的优选制剂包括选自PA、PB1、PB2、NP&M1蛋白的高度保守片段的以下6种免疫原性流感肽中的一种或多种:

[0084] HMAIIKKYTSGRQEKNP SLRMKWMAMKYPITADK (SEQ ID NO:1)

[0085] VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG (SEQ ID NO:2)

[0086] YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE (SEQ ID NO:3)

[0087] APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA (SEQ ID NO:4)

[0088] DQVRESRNP GNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS (SEQ ID NO:5)

[0089] DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSEK (SEQ ID NO:6)

[0090] 优选将所述肽各自分别连接到碳氟载体。本发明尤其优选的制剂包含全部6种上述碳氟连接的肽,并且不包括包含具有SEQ ID NO:13、14、23和24中任一示出的序列的肽的碳氟连接的肽。本发明的优选制剂可包括其他碳氟连接的肽。但是,优选地,所述制剂包含上述6种碳氟连接的肽,并且不包含其他碳氟连接的肽。

[0091] 可用包含1、2或3个氨基酸置换的变体肽替代所述6种肽中的一种或多种。所述变体肽可包含衍生自不同流感毒株的序列。例如,SEQ ID NO:1可被SEQ ID NO:7取代,SEQ ID NO:2可被SEQ ID NO:8或9取代,SEQ ID NO:3可被SEQ ID NO:10取代,SEQ ID NO:4可被SEQ ID NO:11取代并且/或者SEQ ID NO:5可被SEQ ID NO:12取代。

[0092] 可将所述肽经如下所述的间隔部分连接至碳氟载体。所述间隔部分优选为赖氨酸残基。因此,本发明的优选制剂可包含其中肽具有一个或多个SEQ ID NO:17-22中示出的序列的碳氟连接的肽。所述肽的N末端赖氨酸优选连接到式 $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ 的碳氟。优选将所述碳氟偶联至N末端赖氨酸残基的 ϵ 链。

[0093] 因此,在一个优选实施方案中,本发明提供了一种由包含SEQ ID NO:1-6的6种碳氟连接的肽、可药用载体或稀释剂和任选的佐剂组成,或者基本上由其组成的可药用制剂。

[0094] 在所述6种碳氟连接的肽的每一种中,所述肽优选由加有N末端赖氨酸残基的SEQ ID NO:1-6之一(即,SEQ ID NO:17-22之一)组成,所述赖氨酸残基经所述赖氨酸残基的 ϵ 链偶联到式 $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ 的碳氟链。

[0095] 所述碳氟连接的肽中的碳氟联结物可包含衍生自全氟碳或者混合的碳氟/烃基的一条或多条链,并且可以是饱和的或不饱和的,每条链具有3-30个碳原子。

[0096] 因此,所述碳氟联结物中的链通常是饱和的或不饱和的,优选饱和的。所述碳氟联结物中的链可以是直链的或支链的,但是优选直链的。每条链通常含有3-30个碳原子,优选5-25个,更优选8-20个。

[0097] 为了使所述碳氟联结物与所述肽共价连接,将反应基团或配体例如 $-CO-$ 、 $-NH-$ 、 $S-$ 、 $O-$ 或任何其他合适的基团包括在内。使用这类配体以实现共价连接在本领域是熟知的。所述反应基团可位于所述碳氟分子上的任意位置。

[0098] 将碳氟部分偶联至所述肽可通过天然存在或引入至所述肽的任意位点的官能团例如 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 和 $-NH_2$ 来实现。这类键的实例包括酰胺键、胺键、二硫键、硫醚键和酯键。

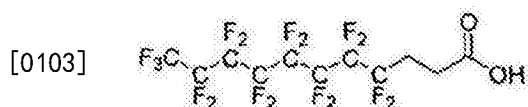
[0099] 任选地,可纳入间隔元件(肽类或非肽类)以允许从所述碳氟元件切割所述肽(用于在抗原呈递细胞中的加工)并优化所述肽的空间呈递。也可将所述间隔物纳入以帮助分子的合成并以改进其稳定性和/或溶解性。间隔物的实例包括聚乙二醇(PEG)或可被蛋白水解酶切割的氨基酸例如赖氨酸或精氨酸。

[0100] 在一个实施方案中,所述碳氟连接的肽可以具有化学结构 $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$ 或其衍生物,其中 $m=3-30$, $n\leq 2m+1$, $y=0-15$, $x\leq 2y$, $(m+y)=3-30$, Sp 为任选的化学间隔部分, R 为肽抗原。通常, m 和 n 满足关系 $2m-1\leq n\leq 2m+1$,优选 $n=2m+1$ 。通常, x 和 y 满足关系 $2y-2\leq x\leq 2y$,优选 $x=2y$ 。所述 $C_mF_n-C_yH_x$ 部分优选为直链的。

[0101] 优选地, m 为5-15,更优选为8-12。同样地, y 优选为0-8,更优选为0-6或0-4。因此,尤其优选地,所述 $C_mF_n-C_yH_x$ 部分是饱和的(即, $n=2m+1$ 且 $x=2y$)和直链的,并且 $m=8-12$, y

=0-6或0-4。

[0102] 在一个具体实例中,所述碳氟联结物衍生自下式的2H,2H,3H,3H-全氟十一烷酸:

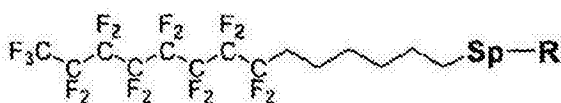
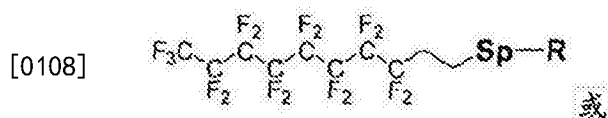
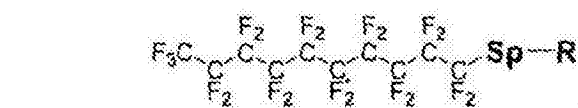


[0104] 因此,优选的碳氟联结物是线性饱和的部分 $C_8F_{17}(CH_2)_2-$ 。

[0105] 碳氟联结物的其他实例具有以下式:

[0106] $C_6F_{13}(CH_2)_2-$, $C_7F_{15}(CH_2)_2-$, $C_9F_{19}(CH_2)_2-$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2-$, $C_5F_{11}(CH_2)_3-$, $C_6F_{13}(CH_2)_3-$, $C_7F_{15}(CH_2)_3-$, $C_8F_{17}(CH_2)_3-$ 和 $C_9F_{19}(CH_2)_3-$,其分别衍生自 $C_6F_{13}(CH_2)_2COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_2COOH$, $C_9F_{19}(CH_2)_2COOH$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2COOH$, $C_5F_{11}(CH_2)_3COOH$, $C_6F_{13}(CH_2)_3COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_3COOH$, $C_8F_{17}(CH_2)_3COOH$ 和 $C_9F_{19}(CH_2)_3COOH$ 。

[0107] 碳氟载体-抗原构建体的合适的结构的优选实例具有式:



[0109] 其中,Sp和R如上文所定义。Sp优选衍生自赖氨酸残基,并具有式 $-CONH-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-$ 。R优选为SEQ ID NO:1-6中的任一个。因此,SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6的N末端氨基酸的氨基与式 $-CONH-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-$ 的间隔物的C末端羧基形成酰胺键。

[0110] 在本发明的上下文中,可修饰所述碳氟联结物以使所得到的复合物仍能够将所述肽递送至抗原呈递细胞。因此,例如多个氟原子可用其他卤原子例如氯、溴或碘替代。另外,可用甲基替代多个氟原子,并仍保持本文描述的分子的性质。

[0111] 本发明提供了一种酸性水性制剂和一种包含一种或多种(例如两种或多于两种)碳氟连接的肽和任选的可药用载体或赋形剂的可药用制剂。优选地,所述制剂中的至少一种碳氟连接的肽包含至少20个氨基酸残基的肽,所述肽具有至少50%的疏水性氨基酸残基并具有大于或等于7的等电点。所述赋形剂可以是有效冷冻干燥所必需的稳定剂或填充剂。实例包括山梨糖醇、甘露醇、聚乙烯吡咯烷酮和其混合物,优选甘露醇。可存在的其他赋形剂包括本领域熟知的防腐剂例如抗氧化剂、润滑剂、冷冻保护剂和粘合剂。

[0112] 本发明提供了一种制备本发明的制剂的方法。

[0113] 在本发明的方法中,将至少一种碳氟连接的肽溶于乙酸作为配制药剂的第一步骤。用作原料的碳氟连接的肽通常是干燥形式。溶于乙酸的碳氟连接的肽通常包含长度至少约20个氨基酸的肽,其中至少约50%的氨基酸为疏水性的。可将其他碳氟连接的肽溶于乙酸或其他溶剂中。具体地,可将包含少于20个氨基酸并且/或者具有少于50%的疏水性残

基的肽的碳氟连接的肽溶于乙酸以外的溶剂中。

[0114] 本文使用的术语“溶解”意指,碳氟连接的肽分散在溶剂中形成看起来澄清且在除菌过滤时不损失物质的溶液。所述碳氟连接的肽可以以多分子微团结构存在。“分散”意指,溶解冻干的碳氟连接的肽以破坏微粒并通过形成微团结构而实现溶解。

[0115] 本文使用了术语“聚集体”以描述大分子的碳氟连接的肽结构。碳氟连接的肽的微团聚集体可有助于溶解。碳氟连接的肽的大聚集体产生可见微粒。本文使用的术语“微粒”意指肉眼可见的碳氟连接的肽的聚集体。

[0116] 所述碳氟连接的肽在乙酸中的溶解通常导致形成含有碳氟连接的肽的微团聚集体的澄清溶液。所述微团聚集体通常具有约20nm至约50nm,例如约17nm至约30nm的直径。但是,一些更大的聚集体具有大于约50nm的直径,通常不多于20%,例如约10%至约15%的聚集体具有大于100nm的直径。优选地,没有聚集体是肉眼可见的。粒度可通过任何合适的方法测定,例如通过动态光散射(DLS)或使用透射电子显微术(TEM)。例如,负染中使用TEM时,将20 μ l碳氟连接的肽溶液放置于Formvar碳包覆的铜电子显微镜网格(300目)上。然后,加入20 μ l的铀酰乙酸(uranyl acetate, 1%水溶液)。30秒后,用Whatman滤纸将过量的溶液快速吸净。然后,使所述样品在分析前干燥至少2分钟。然后,在Philips CM120 biotwin上以120kV加速加压进行透射电子显微术。在50000 $\times$ -150000 $\times$ 的直接放大率下进行图像采集。

[0117] 所述溶液中碳氟连接的肽的浓度通常为约0.1mM至约10mM,例如约0.5mM、1mM、2mM、2.5mM或5mM。合适的浓度的实例为约10mg/ml。

[0118] 图1和2提供了典型的制造流程的实例,从最初的溶解步骤开始直至最终的产品出现。这些强调了对溶剂的要求,不仅要实现碳氟连接的肽的溶解性,还要与下游过程(包括与可能的稳定剂混合、除菌过滤和冷冻干燥)相容。在所述流程图中,用字母n表示可包括在所述制剂内的另外的碳氟连接的肽的可变数目。

[0119] 如本领域技术人员已知的,允许改变所述过程流程,以获得相同的所得到产品的特征;即,将输入组分同质地混合在一起至所需的比例,聚集体都被分散,除菌并以适合给药的形式提供。这类实例可包括在混合后或稀释阶段后引入漩涡和/或超声处理以有利于溶解。所述制造过程流程的其他变换可包括在所述过程的较早阶段进行除菌过滤或省略冷冻干燥以允许最终呈现液体。

[0120] 或者,可将一组碳氟连接的肽各自溶于一种有机溶剂,然后混合在一起并除菌过滤,将第二组碳氟连接的肽溶于另一种溶剂,混合并除菌过滤(图2),然后将所述两组碳氟连接的肽混合在一起用于进一步处理。

[0121] 对于每种碳氟连接的肽,所述初始溶剂可以是相同的或不同的,以便可将所述碳氟连接的肽的一种或多种溶于乙酸,将所述碳氟连接的肽的一种或多种溶于另一具有可接受的性质的溶剂。例如,在图1的过程中, B可以是与A不同的溶剂。

[0122] 或者,对于不同的碳氟连接的肽,可将乙酸用作初始溶剂,但是,对于不同的碳氟连接的肽,可以以不同的优化浓度使用乙酸。例如,在图1的过程中, B可以是不同浓度的与A相同的溶剂。

[0123] 可将所述不同的碳氟连接的肽混合,然后进行溶解。

[0124] 乙酸可以以5-80% (v/v) 乙酸水溶液的浓度,例如以10-70% (v/v) 的浓度,例如约

20% (v/v) 或50% (v/v) 的浓度使用。在配制碳氟连接的肽的混合物的方法中,可将不同的肽溶于不同浓度的乙酸中,然后进行混合。例如,可以将一种或多种碳氟连接的肽溶于10% (v/v) 乙酸中,可以将一种或多种肽溶于80% (v/v) 乙酸中。

[0125] 当在制造过程中使用了多于一种的溶剂时,使用的每种溶剂通常:能够溶解所述碳氟连接的肽(所述溶剂用于在相对高的浓度(例如,最高达10毫摩尔,例如最高达2毫摩尔)下溶解);与水混溶以有利于在冷冻干燥前用水进行稀释;与制造过程中可能使用的冷冻干燥稳定剂例如甘露醇相容;具有药品监管部门可接受的安全性,例如符合ICH Q3C的要求(关于杂质的指导说明:残留溶剂(Note for Guidance on Impurities:Residual Solvents))以及如USP残留溶剂<467>所定义的III类溶剂的要求(在成品中残留溶剂限是50mg/天,或少于5000ppm或0.5%);能够冷冻干燥,即具有充分的挥发性以在冷冻干燥时可被除去至安全水平;能够以可再现且均匀的方式有效地分散所述碳氟连接的肽分子以使得在除菌级过滤上的产率损失最小;不与所述碳氟连接的肽分子发生反应或促进其降解;并且/或者与药剂制造中常规使用的材料(容器/滤膜/管道等)相容。

[0126] 可用于分散混合物中一种或多种碳氟连接的肽的溶剂的实例包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)、2-丙醇、叔丁醇、丙酮和其他有机溶剂。

[0127] 当将所述不同的碳氟连接的肽分别溶解于例如不同溶剂或溶解于不同浓度的乙酸时,将所述溶解的肽混合以形成碳氟连接的肽的混合物。

[0128] 还可向所述溶解的碳氟连接的肽或碳氟连接的肽的混合物中加入一种或多种药用赋形剂和/或佐剂。

[0129] “赋形剂”意指用作所述碳氟连接的肽的载体的惰性物质。通常,将所述溶解的碳氟连接的肽与所述赋形剂混合。在制造过程中可以使用的潜在赋形剂包括有效冷冻干燥所必需的稳定剂或填充剂。实例包括山梨糖醇、甘露醇、聚乙烯吡咯烷酮和其混合物,优选甘露醇。其他赋形剂包括本领域熟知的防腐剂例如抗氧化剂、润滑剂、冷冻保护剂和粘合剂。

[0130] 为了增强对所述肽抗原的免疫应答的广度和强度,所述制剂可以包括一种或多种佐剂和/或其他免疫增效剂。在本文的上下文中,“佐剂”是一种这样的试剂,即它能够调节针对共同给予的抗原的免疫应答,而在其独立给予时即使有也只有很少的直接效应。这类佐剂能够在幅度和/或细胞因子谱方面增强免疫应答。

[0131] 合适的佐剂包括:

[0132] (1) 天然的或合成来源的细菌的天然组分的精制物,例如弗氏佐剂及其衍生物、胞壁酰二肽(MDP)衍生物、CpG、单磷酰脂质A;

[0133] (2) 其他已知的佐剂或增效剂例如皂苷类、铝盐和细胞因子;

[0134] (3) 水包油佐剂例如亚微米水包油乳剂MF-59,油包水佐剂例如免疫刺激复合物(ISCOM)、脂质体、配制的纳米颗粒和微米颗粒;

[0135] (4) 细菌毒素和类毒素;以及

[0136] (5) 本领域技术人员熟知的其他有用的佐剂。

[0137] 溶解和混合后,稀释所述碳氟连接的肽的溶液。例如,将所述混合物用水稀释。

[0138] 含有所述碳氟连接的肽的溶液优选为灭菌的。当意欲全身使用所述制剂时,灭菌是尤其优选的。可使用任何合适的灭菌方式,例如UV灭菌或过滤除菌。优选地,使用过滤除菌。过滤除菌可包括用0.45 μ m的过滤器,然后用0.22 μ m的除菌级过滤器组。

[0139] 灭菌可在加入任何赋形剂和/或佐剂之前或之后进行。

[0140] 过滤除菌后,无菌溶液中存在的碳氟连接的肽的产率通常为除菌之前碳氟连接的肽存在量的至少80%,优选至少90%,更优选至少95%。可达到多于95%的产率,例如98%、99%或更高的产率,例如100%的产率。

[0141] 除菌后,碳氟连接的肽通常在溶液中以具有约20nm至约100nm,例如约30nm或约50nm直径的微团结构存在。除菌前溶液中存在的较大颗粒通常可被过滤除菌而重定形。可将除过菌的溶液保存在无菌容器中。

[0142] 干燥所述无菌制剂以除去乙酸。干燥所述制剂还有利于长期保存。可使用任何合适的干燥方法。优选冷冻干燥,但是可使用其他合适的干燥方法,例如真空干燥、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥或流化床干燥。所述干燥步骤可导致形成其中掺入碳氟连接的肽的无定形结块。

[0143] 为了长期保存,可冻干所述无菌制剂。冷冻干燥可通过进行冷冻-干燥实现。冷冻-干燥通常包括进行冷冻,然后进行干燥。例如,可将碳氟连接的肽混合物在-80℃下冷冻2小时,并在冷冻干燥机中冷冻-干燥24小时。

[0144] 本发明的可药用制剂可以是固体组合物。所述碳氟连接的肽组合物可以以干粉剂形式获得。可将冷冻干燥产生的结块磨成粉剂形式。因此,本发明的固体组合物可以为自由流动的颗粒的形式。所述固体组合物通常在密封的瓶、安瓿或注射器中以粉剂提供。如果用于吸入,所述粉剂可在干粉剂吸入器中提供。或者,所述固体基质可作为贴片提供。可将粉剂压缩成片剂形式。

[0145] 可在给药前,将所述经干燥例如冻干的碳氟连接的肽制剂复原。本文使用的术语“复原”意指使用之前将所述干燥的疫苗产品溶解。干燥例如冷冻干燥之后,优选将所述碳氟连接的肽产品复原以形成等渗、pH中性的同质悬浮液。通常,将所述制剂在水相中复原,例如通过添加注射用水(Hyclone)、组氨酸缓冲溶液(例如28mM L-组氨酸缓冲液)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。通常,将所述经复原的制剂分配至无菌容器,例如瓶、注射器或任何其他合适形式用于保存或给药。

[0146] 本发明提供了一种可通过本发明的方法获得的碳氟连接的肽制剂。所述制剂可以是制备药剂中的中间体。

[0147] 本发明提供了一种适合在制备用于给予人或动物的碳氟连接的肽制剂中用作中间体的水性制剂,所述水性组合物是酸性的并包含如上所述的一种或多种溶解的碳氟连接的肽。所述酸性溶液通常包含乙酸。至少一种碳氟连接的肽可以是长度至少20个氨基酸残基,包含至少50%的疏水性氨基酸残基并具有大于或等于7的等电点;并且/或者以直径小于0.22 μ m的微团存在。所述水性溶液优选是无菌的。它还可包含可药用载体或稀释剂。

[0148] 本发明还提供了一种可药用的碳氟连接的肽制剂。所述可药用制剂可以是固体例如粉剂、结块或片剂。所述药物制剂可以是水性溶液。

[0149] 可将所述制剂保存在容器例如无菌的瓶或注射器中。

[0150] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种包含碳氟连接的肽的制剂和可药用量的乙酸,其中所述碳氟连接的肽以微团结构存在。在本发明的其他制剂中,所述乙酸通过所述干燥步骤完全除去。

[0151] ICH推荐的乙酸的最大量为50mg/天。通常,根据USP残留溶剂<467>定义的III类溶

剂的要求,本发明制剂中的乙酸水平低于5000ppm或0.5%。本发明还提供了一种包含溶于乙酸的碳氟连接的肽的中间体制剂。

[0152] 一方面,本发明提供了一种含有两种或多种碳氟连接的肽的制剂,其中所述碳氟连接的肽以微团结构存在。

[0153] 另一方面,本发明提供了一种包含碳氟连接的肽的制剂,其中所述碳氟连接的肽以微团结构存在,并且所述制剂是冻干形式。

[0154] 在本发明的制剂中,所述碳氟连接的肽通常以多微团结构存在。所述微团结构通常具有约20nm至约100nm,例如约50nm或约70nm的直径。优选地,所述制剂中存在的微团结构的至少80%,例如至少90%或至少95%具有低于100nm的直径,例如约20nm至约50nm的直径。

[0155] 另一方面,本发明的制剂还包含可药用赋形剂和/或佐剂。例如,在一个实施方案中,所述制剂还包含甘露醇和/或其他赋形剂。

[0156] 在另一方面,本发明提供了本发明的制剂在制造用于诱导人或动物中免疫应答的药剂中的用途。本发明还提供了本发明的制剂在制造用于治疗或预防人或动物体的疾病的药剂中的用途。

[0157] 另一方面,本发明提供了本发明的制剂用于通过疗法治疗人体或动物体的方法中。还提供了本发明的制剂用于刺激人或动物中免疫应答的方法中以及本发明的制剂用于治疗或预防人体或动物体的疾病的方法中。

[0158] 另一方面,本发明提供了一种在有此需要的人或动物中诱导免疫应答的方法,所述方法包含向所述人或动物给予预防或治疗量的本发明的制剂。所述免疫应答可有效治疗或预防疾病。

[0159] 所述疾病通常为传染病、自身免疫性疾病、变态反应、激素疾病或癌症。选择所述制剂中的碳氟连接的肽以包括来自引起传染病的病原体、自身免疫性疾病或激素疾病中涉及的自体蛋白、引起变态反应的变应原或癌细胞上表达的肿瘤抗原的一个或多个表位。

[0160] 可使用本发明的碳氟连接的肽制剂治疗或预防的传染病的实例包括但不限于由以下病毒、细菌、分枝杆菌、寄生物和真菌引起的感染:流感病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV)、甲型肝炎病毒(HAV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)、日本脑炎病毒(JEV)、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、疱疹病毒(HSV-1或HSV-2)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒和黄热病病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、结核分枝杆菌、军团杆菌、立克次氏体、衣原体和单核细胞增生李斯特氏菌、恶性疟原虫和疟原虫家族的其他种、白色念珠菌、隐球菌属、破伤风梭菌、红酵母属和肺囊虫。

[0161] 可使用本发明的碳氟连接的肽制剂治疗或预防的癌症的实例包括乳癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、鼻咽癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)和其他人类癌症。

[0162] 在一个优选实施方案中,本发明的制剂可用于治疗流感或者防流感接种。在该实施方案的另一方面,所述流感疫苗制剂可与抗病毒治疗组合物(包括神经氨酸酶抑制剂治疗如金刚胺(amanidine)、金刚乙胺(rimantidine)、扎那米韦(zanamivir)或奥司他韦(oseltamivir))组合给药。另一方面,所述流感疫苗制剂可与其他流感疫苗例如常规的抗体产生流感疫苗组合给药。所述其他流感疫苗优选为季节性流感疫苗。

[0163] 给药可同时或时间间隔进行。可在所述抗病毒治疗组合物和/或其他流感疫苗之前,同时或之后给予本发明的可药用制剂。

[0164] 提供了包含流感肽,尤其是具有SEQ ID NO:1-6中示出的序列的6种流感肽的制剂,用于防流感接种的方法中。因此,包含这类肽的本发明的可药用制剂可用于制备用于治疗或预防流感的药剂。本发明还提供了一种治疗或预防流感的方法,所述方法包含向有此需要的受试者给予治疗有效量的本发明的碳氟连接的流感肽制剂。

[0165] 可使用多种已知的途径和技术向人或动物受试者体内给予本发明的制剂。例如,所述制剂可以作为可注射的溶液、悬浮液或乳剂提供,使用常规的针及注射器或者使用液体喷射注射系统经肠胃外、皮下、口服、表皮、真皮内、肌肉内、动脉内、腹膜内、静脉注射给予。所述制剂可局部给予至皮肤或粘膜组织,例如鼻、气管内、肠、舌下、直肠或阴道,或者作为适合呼吸或肺部给药的极细喷雾提供。

[0166] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括将所述混合物加工成适于作为液体注射液给药的制剂的步骤。优选地,所述方法还包括将所述混合物加工成适于经摄入或经肺途径给药的制剂的步骤。

[0167] 将所述制剂以与剂量制剂(dosage formulation)相容且在预防和/或治疗上有效的量给予受试者。给予本发明的制剂可以用于“预防性”或“治疗性”目的。本文使用的术语“治疗性”或“治疗”包括以下的任何一种或多种:预防感染或再感染;减轻或消除症状;减少或完全消除病原体。可在预防(感染前)或治疗(感染后)方面实现治疗。

[0168] 如果需要,载体的选择经常是所述组合物的递送途径的函数。在本发明中,可配制组合物用于任何合适的给药途径和方式。可药用的载体或稀释剂包括在适于经口、眼、直肠、鼻、局部(包括含服和舌下)、阴道或肠胃外(包括皮下、肌肉内、静脉内、真皮内、经皮)给药的制剂中使用的那些。

[0169] 所述制剂可以任何合适的形式给予,例如液体、固体、气雾剂或气体。例如,口服制剂可采取乳剂、糖浆剂或溶液或片剂或胶囊剂的形式,其可被包覆肠衣以防止活性成分在胃中降解。鼻制剂可以是喷雾剂或溶液。经皮制剂可适于它们具体的递送系统并且可包含贴片。注射制剂可以是在蒸馏水或者其他可药用溶剂或助悬剂中的溶液或悬浮液。

[0170] 向患者给予的疫苗或免疫治疗剂的合适剂量会在临床中确定。然而,作为指导,合适的人剂量可取决于优选的给药途径,可为1-1000 μ g,例如约100 μ g、200 μ g或500 μ g。可能需要多个剂量以达到免疫效果或临床效果,如果需要,其通常会在2-12周分开给予。当需要加强长期的免疫应答时,可以间隔1个月到5年使用重复剂量。

[0171] 以下实施例解释了本发明。

[0172] 实施例1:肽的合成

[0173] 合成了具有SEQ ID NO:1-6、10、11和13-16中示出的氨基酸序列的肽。使用经典的9-苄氧羰基/叔丁基(Fmoc/t-butyl)策略和TentaGel HL NH₂树脂,在固相上进行每个肽的合成。将赖氨酸残基加至每条序列的N末端。加有N末端赖氨酸残基的序列示于SEQ ID NO:17-28。加上N末端赖氨酸残基后,将树脂块分成两部分。一部分用于在N末端赖氨酸的 ϵ 链上掺入碳氟链(C₈F₁₇(CH₂)₂COOH)以衍生出碳氟连接的肽(FCP)。对于第二部分,进行所述N末端赖氨酸 ϵ 链的乙酰化以衍生出用于对比研究的天然肽。经纯化的碳氟连接的肽(FCP)和天然肽都通过在三氟乙酸(TFA)存在下切割和通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行最终

纯化获得。下文描述的FCP和天然肽在C末端都具有氨基。所有制剂都具有95%或更高的纯度,并以干燥、冻干的粉剂提供。基于氮含量分析计算了净肽质量。

[0174] 将以下肽P1至P12连接到碳氟链以产生FCP,或被乙酰化以产生天然肽(使用了氨基酸的标准单字母代码表示;X=碳氟载体(碳氟连接的肽);Z=乙酰基(天然肽)):

[0175] P1:NH₂-K (X或Z) HMAIIKKYTSGRQEKNP SLRMKWMAMKYPITADK-CONH₂

[0176] P2:NH₂-K (X或Z) APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA-CONH₂

[0177] P3:NH₂-K (X或Z) APIMFSNKMARLGKGYMFESKSMKLRTQIPAEMLA-CONH₂

[0178] P4:NH₂-K (X或Z) DQVRESRNP GNAEIEDLIFLARSALILRGSAVHK S-CONH₂

[0179] P5:NH₂-K (X或Z) DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVP SER-CONH₂

[0180] P6:NH₂-K (X或Z) SPGMMMGFMNLS TVLGVSILNLGQKKYTKTTY-CONH₂

[0181] P7:NH₂-K (X或Z) KKKS YINKTGT FEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG-CONH₂

[0182] P8:NH₂-K (X或Z) VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLH LTQG-CONH₂

[0183] P9:NH₂-K (X或Z) YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-CONH₂

[0184] P10:NH₂-K (X或Z) YITKNQPEWFRNLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-CONH₂

[0185] P11:NH₂-K (X或Z) QSRMQFSSLTVNVRGSGMRILVRGNSPVFNYNK-CONH₂

[0186] P12:NH₂-K (X或Z) PDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIYYLEKANKIKSE-CONH₂

[0187] 所述天然肽的生理化学性质在下表1中列出。被认为是疏水性的残基为W、Y、I、F、L、V、M、A、P、G和C。带电的残基为(+):K、R、H。(-):D、E

[0188] 表1:选择的肽的生理化学性质

[0189]

肽	百分数 疏水性残基	正电荷 (包括在N-末端加 上的赖氨酸残基)	负电荷
P1	51	10	2
P2	60	8	2
P3	60	7	2
P4	49	7	5
P5	60	5	4
P6	61	4	0
P7	55	6	2
P8	60	6	3
P9	60	6	2
P10	60	6	2
P11	48	6	0
P12	46	9	7

[0190] 实施例2:天然肽和FCP在水中的溶解性

[0191] 评估了每种FCP在水中的溶解性。将每种FCP分散在300 μ l水中至终浓度为1.333mM,并进行漩涡和超声处理。典型的分散条件为进行4次3分钟超声浴(bath sonication),中间穿插30秒漩涡。检查之后,将产生的溶液用甘露醇(候选的冷冻干燥介质,肽的终浓度为0.167mM,1.33% (w/v) 甘露醇)溶液稀释。通过目视观察所得的分散相的浑浊度(等级:澄清/浑浊-/浑浊/浑浊+)和微粒的存在评估溶解性。所述结果示于表2中。

[0192] 表2:FCP在水和1.33 (w/v) 甘露醇溶液中的分散性和溶解性

[0193]

碳氟连接的肽	在水中的分散	在甘露醇:水中的进一步稀释
	溶解性	溶解性
FCP1	浑浊/有微粒	澄清/有微粒
FCP2	浑浊-/无微粒	澄清/无微粒
FCP3	浑浊-/有微粒	澄清/有微粒
FCP4	澄清/无微粒	澄清/无微粒
FCP5	浑浊/有微粒	浑浊-/有微粒
FCP6	浑浊-/有微粒	澄清/有微粒
FCP7	浑浊+/无微粒	浑浊+/无微粒
FCP8	浑浊/有微粒	浑浊/有微粒
FCP9	浑浊-/有微粒	澄清/有微粒
FCP10	浑浊-/有微粒	澄清/有微粒
FCP11	澄清/无微粒	澄清/无微粒
FCP12	浑浊/有微粒	浑浊-/有微粒

[0194] 在水中初始分散后,各个碳氟连接的肽溶液的目视检查表明,只有P4和P11是完全溶于水的;这些溶液各自都是澄清的且不存在微粒。其余所有溶液都是浑浊的且含有微粒,表明这些FCP不是完全可溶的。用甘露醇溶液进行随后的稀释后,P2、P4和P11完全溶解,溶液澄清且无可见微粒。溶液P1、P3、P6、P9和P10也是澄清的,但可观察到微粒,表明它们在甘露醇/水溶液中是部分可溶的。P5、P7、P8和P12在甘露醇/水溶液中是不可溶的,给出了含有微粒的浑浊溶液。没有发现所述肽序列的疏水性百分数或者带正电或带负电与溶解性有关。

[0195] 为了比较,还评估了相同的分子浓度下天然肽在水中的溶解性;对于P8以外的所有天然肽,溶液都是澄清的且目视没有察觉到微粒。

[0196] 总之,每种碳氟连接的肽的溶解性取决于其聚集性质;大部分FCP在水或甘露醇溶液中不完全可溶。不能从其生理化学特征预测每种FCP的溶解性。等价的天然肽在水中比相同浓度的FCP更可溶。

[0197] 还评估了碳氟连接的肽混合物的溶解性。制备了八价的制剂(每种肽的终浓度为0.167mM, 1.33% (w/v) 甘露醇, 表3中提供了FCP组成)。除菌过滤(0.22 μ m Millex 25mm PVDF过滤器)后每种肽的回收率通过RP-HPLC测定。

[0198] 表3:FCP八价混合物的组成和除菌过滤后每种FCP的回收率

[0199]

碳氟连接的肽	混合后的 MIX 1	产率 %	碳氟连接的肽	混合后的 MIX 2	产率 %
FCP1	浑浊且有微粒	89.9	FCP10	浑浊且有微粒	90.7
FCP4		25.1	FCP2		97.3
FCP5		93.8	FCP4		82.3
FCP6		74.1	FCP5		35.6
FCP7		31.7	FCP6		8.8
FCP3		28.6	FCP7		63.2
FCP9		22.9	FCP8		25.3
FCP12		29.6	FCP11		49.4

[0200] 通过HPLC过滤回收率结果确认了目视观察。对于MIX 1和MIX 2, 总RP-HPLC过滤回收产率分别为约50%和57%, 表明FCP的大微粒在过滤时被除去。因此, FCP的混合物也是难溶于水的。

[0201] 实施例3:FCP在赋形剂和分散剂中的溶解性

[0202] 为了改善碳氟连接的肽在水中的溶解性, 评估了以前已被证明在药剂制备中有益的一系列赋形剂和分散剂。它们包括聚乙二醇, Pluronic表面活性剂、卵磷脂、甘油、大豆油、红花油、糖原质(glycofurol)、二棕榈酰磷脂酰胆碱、Labrafac CC(中链甘油三酯)、羟基丙基 β -环糊精(HPBCD)和磺丁基醚- β -环糊精和其结合物。碳氟连接的肽的七价等质量(equimassic)混合物的溶解性通过显微镜检查确定(终浓度为2.5mg/ml)。

[0203] 所测试的条件都不能实现碳氟连接的肽的良好分散。发现了HPBCD可改善溶解, 但是实现70-80%的溶解度需要在室温下孵育一天。总之, 所述碳氟连接的肽对分散剂例如环糊精、表面活性剂或嵌段共聚物的作用有抗性。

[0204] 实施例4:FCP在有机溶剂中的溶解性。

[0205] 评估了碳氟连接的肽在一系列有机溶剂中的溶解性。对于80% (v/v) 2-丙醇、叔丁醇、DMSO和丙酮, 制备了碳氟连接的肽终浓度同为1.33mM的溶液。对于80% (v/v) 乙酸, 碳氟连接的肽的终浓度为2.0mM。所述结果示于图3中。

[0206] 总之, 所有的碳氟连接的肽可溶于80% v/v乙酸, 未观察到泡沫或微粒。80% (v/v) 2-丙醇、叔丁醇、DMSO和丙酮溶液不能完全溶解所评估的FCP。

[0207] 实施例5:甘露醇对溶解的效应

[0208] 研究了稀释和加入甘露醇对多种溶剂中溶解的效应。根据图4将碳氟连接的肽各

自分散于80% v/v溶剂的水溶液中,并漩涡,然后用甘露醇溶液进行7倍稀释。对于80% v/v 2-丙醇、叔丁醇、DMSO和丙酮,制备了碳氟连接的肽终浓度同为0.167mM,甘露醇终浓度为1.33% (w/v)的溶液。对于80% v/v乙酸,碳氟连接的肽的终浓度为0.25mM。所述结果示于图4中。

[0209] 还如上所述制备了碳氟连接的肽的等摩尔混合物,每种溶剂中含有以下的肽:

[0210] Mix 1:FCP1、FCP3、FCP4、FCP5、FCP6、FCP7、FCP9、FCP12。

[0211] Mix 2:FCP2、FCP4、FCP5、FCP6、FCP7、FCP8、FCP10、FCP11。

[0212] 如图4所示,仅在使用80% (v/v) 乙酸时,可实现各个FCP以及Mix 1和2的有效溶解。

[0213] 实施例6:FCP溶液除菌过滤后FCP的回收率

[0214] 通过RP-HPLC确定了实施例4中制备的混合物中每种碳氟连接的肽在除菌过滤(0.22μm Millex 25mm PVDF过滤器)后的回收率。结果示于下文表4和5中。

[0215] 表4:八价混合物Mix 1中各个FCP的过滤回收率%

[0216]

碳氟连接的肽	80% v/v 乙酸	80% v/v 2-丙醇	80% v/v 叔丁醇	80% v/v DMSO	80% v/v 丙酮
FCP1	100.2	97.8	96.1	95.1	89.9
FCP12	100.2	16.9	6.6	32.0	12.7
FCP3	100.5	97.9	102.0	100.8	99.6
FCP4	99.8	20.5	19.3	77.2	24.4
FCP7	99.4	90.9	99.9	47.8	42.7
FCP9	99.8	84.3	84.9	87.7	69.1
FCP5	100.2	34.3	90.2	17.2	3.2
FCP6	101.3	78.4	62.3	85.8	63.2
平均值	100.2	65.1	70.2	67.9	50.6

[0217] 表5:八价混合物Mix 2中各个FCP的过滤回收率百分数

[0218]

碳氟连接的肽	80% v/v	80% v/v	80% v/v	80% v/v	80% v/v
	乙酸	2-丙醇	叔丁醇	DMSO	丙酮
FCP11	99.5	57.4	52.3	85.4	76.4
FCP2	99.8	92.7	99.5	98.2	85.4
FCP4	100	21.6	10.0	73.0	4.5
FCP7	93.3	90.5	89.2	46.4	43.7
FCP8	99.8	20.7	21.2	34.9	17.6
FCP10	98.1	87.7	87.3	89.4	79.4
FCP5	99.1	35.9	51.8	18.1	2.9
FCP6	97.4	69.5	82.1	91.0	64.1
平均值	98.4	59.5	61.7	67.1	46.7

[0219] 对于使用80% (v/v) 乙酸制备的混合物,除菌过滤后没有检测到碳氟连接的肽的损失。据推断,乙酸与随后的水性稀释物是用于溶解和过滤碳氟连接的肽的优选溶剂,但是必须降低所使用的浓度以使成品中残留乙酸的水平最低。

[0220] 实施例7:乙酸浓度对FCP溶解性的效应

[0221] 为了限制配制过程和成品中的下游乙酸浓度,对于每种碳氟连接的肽,确定了实现有效分散和维持可见溶解性的水中最低乙酸浓度。当甘露醇用作冷冻保护剂时,为了获得稳定且无定形的冷冻-干燥产品,在冷冻干燥阶段使乙酸的浓度最低是重要的。确定了实现各个碳氟连接的肽的可接受的分散性和溶解性的最低乙酸浓度。初始乙酸分散后所述碳氟连接的肽的终浓度为2 μ mol/ml,用甘露醇稀释之后为0.250 μ mol/ml。

[0222] 表6:各个FCP和七价混合物(Mix 3)在乙酸中的分散性和溶解性

[0223]

碳氟连接的肽	乙酸百分数 (%v/v)	通过超声处理/漩涡进行分散的容易性	分散后的目视外观	分散后混合物的目视外观: Mix 3
FCP1	10	+++	澄清	澄清
FCP2	10	+++	澄清	
FCP4	10	+++	澄清	
FCP8	80	+	澄清	
FCP9	80	+	澄清	
FCP5	10	+++	澄清	
FCP6	80	+	澄清	

[0224] 低至10%v/v的乙酸浓度被发现可充分分散数种碳氟连接的肽。然而,同时,某些碳氟连接的肽需要低于80% (v/v) 乙酸以实现完全溶解,所产生的制剂被证明在物理上是随时间不稳定的,形成凝胶或可溶微粒(例如FCP6、FCP8和FCP9)。对于这三种肽,已发现80% (v/v) 乙酸可实现完全分散,同时防止物理状态的任何改变。

[0225] 通过在除菌过滤之前和之后RP-HPLC比较Mix 3混合物中每种碳氟连接的肽的峰面积来测定过滤回收率。测量了每种FCP的回收率百分数,平均回收率计算为每种个体FCP的回收率百分数的平均值。混合和稀释之后测量的总过滤回收率(基于0.22μm过滤器)通常大于95%。

[0226] 表7:过滤回收率

FCP	过滤回收率
FCP1	100.0
FCP2	99.3
FCP4	98.6
FCP5	98.7
FCP6	100.0
FCP8	97.0
FCP9	95.4
平均值	98.4

[0227]

[0228] 实施例8:碳氟连接的肽形成的结构的表征

[0229] 自组装的多分子微团结构的形成可在碳氟连接的肽的溶解过程中起核心作用。以这种方式,可在分散之后和随后整个配制过程中,尤其是在冻干产品的复原中,维持碳氟连接的肽的溶解性。使用动态光散射(DLS)和透射电子显微术(TEM)进行了分散过程中组装的

多分子结构的物理表征。

[0230] 基于DLS,使用了Zetasizer Nano S(能够测量0.6纳米-6微米的颗粒)以监测碳氟连接的肽混合物的粒度。用甘露醇稀释剂制备了如实施例1所述的Mix 1(FCP1、FCP3、FCP4、FCP5、FCP6、FCP7、FCP9和FCP 12)(表3)。

[0231] 在25℃下使用Nanosizer(Zetasizer Nano Series ZS,Malvern Instruments, UK)测量了每种混合物的平均粒度(nm)。使用了250μl溶液,并将其发送到塑料微量杯中。相关时间基于10s/运行,每次测量进行总计5次运行。使用Dispersion Technology Software(Malvern Instruments,UK)分析了结果。对于Mix 1,获得了以体积和强度表示的大小分布。基于体积测量的平均大小通过Dispersion Technology Software进行计算。

[0232] 溶液中碳氟连接的肽的DLS证明了存在直径集中在约20-50nm的多分子结构(>95%,以体积计),大小超过100nm的群体大约12-16%(以强度计)(图5)。

[0233] TEM表明了存在尺度与DLS一致的球状结构的同质群体(图6)。

[0234] 实施例9:除菌级过滤对多分子FCP结构的影响

[0235] 研究了除菌级过滤对多分子结构的影响。将实施例7的Mix 1经无菌0.22μm Millex 25mm PVDF过滤器过滤,然后通过DLS使用实施例7中描述的Zetasizer Nano S进行分析。

[0236] DLS分析证明了,所形成的结构是高度动态的,具有变化的再现性,即使在一组分析中也如此。收集了5-7次测量结果以计算平均粒度(在图7中,由不同的谱表示)。

[0237] 出人意料地,发现0.22μm过滤可以对初始溶解于乙酸中的碳氟连接的肽形成的多分子结构重定形。DLS表明,过滤后大的颗粒被重定形成更小的颗粒,并且过滤后Kcount(与溶液中颗粒的数目有关的参数)也显著降低(过滤前,200Kcounts;过滤后,120Kcounts)。此外,在0.22μm过滤器之前引入0.45μm过滤器不会降低过滤回收率。因此,除菌级过滤不是通过简单地从所述制剂除去大的颗粒和限制它们进入制备过程的下游(伴有产率降低),而是通过用变形对所述结构重定形以使得它们能够通过过滤器来影响组装的结构的大小。根据DLS数据,大小超过220nm的颗粒占所述混合物中颗粒的约12-16%(以强度计)。这些颗粒似乎不能从所述溶液中除去,因为通过HPLC确定的过滤回收率超过97%。

[0238] 冷冻-干燥然后在Tris-HCl 10mM或水中将样品复原后,还评估了MIX 1制剂粒度分布(图8)。分别用水或Tris-HCl 10mM容易地复原MIX 1制剂,获得澄清或稍呈乳色的溶液。粒度集中在约20-50nm,并且谱与配制过程中(冷冻干燥前)观察到的谱大体上相似。这证明了,复原后;FCP多分子结构得到维持,不形成大的可见聚集体。

[0239] 实施例10:FCP的化学稳定性

[0240] 通过将7种碳氟连接的肽的冻干制剂暴露于50%(v/v)乙酸持续24小时,评估了碳氟连接的肽的化学稳定性。通过将FCP初始溶解于乙酸(对于每种FCP,溶剂的浓度如实施例6中所给出的),然后用甘露醇溶液稀释和混合而制备了Mix 3。然后,冻干所述混合物,然后将其在50%(v/v)乙酸中复原。

[0241] 与未处理的对照比,通过RP-HPLC没有观察到降解(见图9)。这证明了在药物制造过程中的一般混合步骤期间,所选择的碳氟连接的肽在50%v/v乙酸中是化学稳定的。

[0242] 实施例11:成品中的残留乙酸浓度

[0243] 在配制下游中使乙酸浓度最低是重要的。这会在冻干过程中允许稳定结块的形成

并将所述制剂的pH提高至接近所要的中性。乙酸是挥发性的,因此在冷冻-干燥过程中其含量降低。

[0244] 对于冷冻干燥,首先将如实施例9所述制备的Mix 3制剂(将1.4ml体积装入3ml冷冻-干燥瓶)在-80℃冰箱中冷冻2小时,然后冷冻干燥(benchtop Christ Alpha2-4LSC) 24小时。该步骤可产生具有稳定结构和均匀稠度的冻干结块。计算了冷冻干燥前所述制剂中乙酸的浓度,为8.8% v/v。

[0245] 对于三个不同的批次,冷冻干燥后瓶中的残留乙酸浓度(乙酸抗衡离子加乙酸)经实验确定分别为0.3-0.4、0.7和0.5% (w/w)。对于乙酸,确认了该分析的标准差为+/-0.07% (w/w);定量限为0.1% (w/w)。残留乙酸的平均值等于约0.35mg/人剂量的可接受水平,远低于ICH推荐值(最大量50mg/天)。

[0246] 实施例12:冻干FCP制剂的复原

[0247] 将配制的碳氟连接的肽(七价,Mix 3)的复原与未经配制的等价制剂比较。如实施例9所述,将各个FCP溶于乙酸,混合,用甘露醇溶液稀释并冻干(终浓度为0.35mg/FCP)。将一瓶配制的混合物用0.7ml注射用水(Hyclone)复原;另一瓶用0.7ml 28mM组氨酸缓冲溶液复原。对于未经配制的混合物,将0.35mg的每种未处理的FCP分配到瓶中,不作另外的处理。将一瓶所述未经配制的混合物用0.7ml 45%甘露醇溶液复原以提供与所述经配制的瓶相同的赋形剂浓度。将另一瓶未经配制的混合物用0.7ml的4.5%甘露醇溶液中的28mM组氨酸复原。

[0248] 下图(图10和11)示出了通过手工摇动和随后漩涡30秒并超声浴1小时的时间初始分散之后FCP的溶解性。

[0249] 在用甘露醇/水和组氨酸缓冲溶液复原之后,未经配制的样品的目视检查结果表明所述溶液没有完全分散和溶解。每种溶液都是浑浊的且可观察到大微粒,尤其地粘附到玻璃瓶侧壁,所述微粒不随时间而分散。相比之下,分散于水和组氨酸缓冲溶液中的配制的疫苗溶液都是澄清的,不存在微粒。

[0250] 这些结果证明了,初始溶解的方法对最终复原的制剂的聚集性质有影响。在配制过程早期,FCP在乙酸中的分散导致了微团结构的形成,所述微团结构在整个随后的混合、过滤和冷冻干燥过程中得到保持。这有利于最终冻干制剂在水相中以非微粒的形式复原。

[0251] 结论

[0252] 对于所评估的所有个体碳氟连接的肽,证明了乙酸是良好的溶剂。可在高FCP浓度下(最高达2000nmol/ml;约10mg/ml)在通过漩涡和超声处理扰动之后实现完全溶解,未观察到微粒。在进一步的下游加工过程中,溶解性得到维持,这是因为碳氟连接的肽的两亲性质导致了通过动态光散射和透射电子显微术观察到的自发自组装的大分子结构的形成。因此,所述溶剂起到了双重作用;第一确保存在足够的断裂能力以确保使大的无序微粒结构断裂,第二支持了可形成并支持多分子、有序的微团结构的环境。这些结构小的足以允许FCP的溶解,使得在无菌过滤时不发生物质损失。所述微团结构在冷冻干燥过程中也得到维持,并且对于在给予人之前有利于在水性介质中冷冻干燥物的再溶解是必需的。先前没有在乙酸中溶解的FCP不能在水或组氨酸缓冲液中从冻干状态令人满意地复原(实施例12)。

[0253] 80% (v/v) 乙酸被发现可溶解所有FCP。但是,过量的乙酸可妨碍冷冻干燥后可接受的冻干结块的形成。另外,对药剂中的乙酸水平有规定限制。因此,检查了较低浓度的乙

酸;证明了10% (v/v) 对于7种FCP中的4种是合适的,同时对于剩余3种FCP,80% (v/v) 是可行的最低浓度。加工时,7种FCP的混合物产生了符合每人剂量的乙酸顺应水平的可接受冻干结块。

[0254] 研究的所有其他溶剂都不能实现所有FCP的完全溶解。乙酸的成功是不可预测的,因为碳氟链赋予了所述分子不寻常的物理化学性质(例如实施例1中比较FCP和等价天然肽的溶解性)。另外,10% (v/v) 乙酸成功溶解FCP与所述肽的疏水性或带电残基含量之间没有关联。

[0255] 总地来说,乙酸具有以下优点:

[0256] -能够提供不仅对各个FCP,而且也对其混合物的充分溶解性;

[0257] -适用于所评估的所有FCP;

[0258] -产生一致和均匀的产品;

[0259] -在意欲使用的浓度下可与水混溶(10-80% (v/v));

[0260] -能够以相对高的浓度溶解FCP(至少10毫摩尔);

[0261] -被列为ICH III类溶剂,适于人使用;

[0262] -可进行冷冻干燥(一般的冷冻干燥阶段之后水平降低);

[0263] -在随后的混合并稀释后,产生可进行除菌级过滤而产量损失最小的溶液;

[0264] -在冷冻干燥后,产生可容易地复原以形成等渗、pH中性、均质的悬浮液的产品;

[0265] -不与碳氟连接的肽发生反应或促进其降解;以及

[0266] -与药剂制造中常规使用的物质相容。

[0267] 实施例13:碳氟连接的肽流感疫苗的制备

[0268] 本研究的目的是证明为可药用的含有6种氟肽的通用A型流感疫苗(FP01.1)的药品生产质量管理规范(GMP)生产而设计的配制方法的有利之处,所述氟肽包含SEQ ID NO: 1-6中示出的氨基酸序列的肽。具体的目的是:

[0269] 1. 评估制造FP-01.1的关键配制参数。

[0270] a. 氟肽溶于乙酸溶液的容易性;

[0271] b. 过滤时微团大小确定;

[0272] c. 过滤回收率;

[0273] d. 所述氟肽的化学和物理稳定性;以及

[0274] 2. 比较复原的FP-01.1疫苗(经配制的氟肽)与含有未经配制的氟肽的等价制剂的品质。

[0275] 发明人开发了一种配制方法,并将其应用于制造通用的A型流感疫苗FP-01.1——由6种分别包含SEQ ID NO: 1-6的碳氟连接的肽组成。将所述具有SEQ ID NO: 1-6示出的序列的6种肽经N末端赖氨酸间隔物的ε链偶联至碳氟链 $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ 。因此,所述6种碳氟连接的肽对应于先前实施例中描述的FCP1、FCP8、FCP9、FCP2、FCP4和FCP5。所述配制方法基于乙酸的使用,所述乙酸是发明人已发现可保证所述氟肽的良好分散性同时在此过程中维持所述氟肽的物理和化学稳定性的一种酸性溶剂。乙酸是高度挥发性的,可在冷冻-干燥过程中升华,并且已发现其一直减少至对复原产品的pH几乎无影响的残留水平。

[0276] 下文描述的配制方法实现了冻干FP01.1疫苗的制备(确保长期稳定性),所述疫苗要用缓冲溶液(28mM L-组氨酸)复原以生成具有中性pH(6-7.5)和可接受的重量摩尔渗透

压浓度 (280-320mOsm) 的稳定均质溶液 (无可见聚集体)。已经有效生产了几个GMP临床批次,并且发明人已经证明了所述产品在人中是安全和具有免疫原性的。

[0277] 材料和仪器

[0278] -由American Peptide Company制造的氟肽 (包含在FP-01.1中)

[0279] -冰醋酸 (Sigma#27225)、D-甘露醇 (Merck Emprove)

[0280] -Hyclone水 (Fisher#HYC-001-189G)

[0281] -Millex、PVDF Durapore、0.2 μ m (ø33mm) Millipore。

[0282] -30高压灭菌的 (冻干瓶 (Adelphi#VC002-13C)+塞子 (Adelphi#FDW13))。

[0283] -HPLC,配备有Discovery Column C18,250 $\times$ 2.1mm,5 μ m

[0284] -Combitips移液管10ml (Fisher#PMP-117-523N)+Eppendorf Stepper分液器

[0285] -冷冻干燥器2-4-LSC (Christ)

[0286] -渗透压计:Osmomat 030 (Gonotec)

[0287] -配备microInlab®电极的pH计 (Mettler)

[0288] -

[0289] 方法

[0290] 溶液制备

[0291] 1.50ml的水中3.3%w/w甘露醇 (200ml水中6.6g),在4℃下冷却。

[0292] 2.无菌水中5ml 10% (v/v) 的乙酸溶液。

[0293] 3.无菌水中5ml 80% (v/v) 的乙酸溶液。

[0294] 对碳氟连接的肽称重

[0295] 表8:FCP称重和分散

[0296]

FCP	质量 (mg) (净重)	肽含量 (%)	质量(mg) 理论值 总重	质量(mg) 实验值	乙酸 含量 (%)	乙酸的体积 (μ l) 理论值	乙酸的体积 (μ l) 实验值
FCP1	10	87.0	11.49	12.27	10	1000	1068
FCP2	10	87.6	11.41	12.49	10	1000	1094
FCP4	10	90.6	11.04	11.68	10	1000	1058
FCP5	10	92.0	10.87	11.67	10	1000	1074
FCP9	10	90.3	11.07	11.60	80	1000	1048
FCP8	10	92.0	10.87	11.78	80	1000	1084

[0297] FP-01.1的制剂制备

[0298] 1.在2ml玻璃瓶中称重每种肽 (目标为10mg净肽)

[0299] 2.将每种氟肽以10mg净重/ml的浓度分散在约1.0ml (根据称重调节体积以获得正好10mg净重/ml) 的10%或80%乙酸水溶液中 (见表10)。

[0300] 3.漩涡并超声处理,记录目视外观

[0301] 4.重复步骤3直至完全溶解

[0302] 5.将每个950 μ l的分散的6种氟肽在40ml玻璃容器中混合在一起。然后加入950 μ l 80%乙酸(总体积为6.65ml)。每种肽以1.428mg/ml的浓度在40%乙酸中。

[0303] 6.记录混合溶液的目视外观

[0304] 7.用25.93ml 3.3%甘露醇稀释所述混合的氟肽(每种肽0.2915mg/ml的溶液),总乙酸为8.16%。

[0305] 8.记录所述稀释溶液的目视外观

[0306] 9.用Millex PVDF 33mm,0.2 μ m过滤约32ml溶液(保留0.3ml未过滤溶液用于过滤回收率)。

[0307] 填充

[0308] 根据表9(填充体积:每种制剂1.2ml),使用10ml combitips冷冻标记2ml的等份。

[0309] 表9:氟肽制剂FP-01.1的制备

[0310]

总体积 (ml)	肽含量 (mg/肽/ml)	用于冷冻干燥 的等份(μ l)	肽的质量 (μ g/瓶/ 肽)	用于复原的 缓冲液体积 (μ l)	复原后的 终浓度
29-30	0.2915 /ind	1200(24-25瓶)	350	700	0.500 mg/ 肽/ml

[0311] 冷冻干燥

[0312] 1.在-80℃下冷冻所述瓶1小时。

[0313] 2.冻干干燥40小时

[0314] 3.在氮气下进行冷冻干燥通风,并且为瓶塞塞子在400-600mbar的压力下进行。

[0315] 使用未经配制的氟肽制备FP-01.1等价物

[0316] 制备了两瓶,含有所述6种氟肽FCP1、FCP8、FCP9、FCP2、FCP4和FCP5的每一种0.35g。

[0317] 透射电子显微术

[0318] 负染的TEM,将20 μ l碳氟连接的肽溶液放置于Formvar碳包覆的铜电子显微镜网格(300目)上。然后加入20 μ l的铀酰乙酸(1%水溶液)。30秒后,用Whatman滤纸将过量的溶液快速吸去。然后,使所述样品干燥至少2分钟,然后进行分析。然后,在Philips CM120 biotwin上以120kV加速电压进行透射电子显微术。在50000 $\times$ -150000 $\times$ 的直接放大率下进行图像采集。

[0319] RP-HPLC分析

[0320] HPLC方法:FP-01.1

[0321] • 柱:Discovery C18:2.1 $\times$ 25mm,5 μ m,流速0.3ml/min。

[0322] • 溶剂A:90%水/10%乙腈/0.04%TFA

[0323] • 溶剂B:90%乙腈10%水0.04%TFA。

[0324] • 梯度:

[0325]

时间(分钟)	溶剂B
0.01	10%
1	10%
6	28%
46	44%
50	57%
60	70%
68	82%
70	82%
71	10%

[0326] 结果

[0327] 配制步骤(冷冻干燥前)

[0328] 肽分散

[0329] 表10:漩涡/超声处理循环之后溶解每种肽的容易性

[0330]

FCP	循环 1		循环 2		循环 3	
	漩涡	超声处理	漩涡	超声处理	漩涡	超声处理
FCP1	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
FCP2	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
FCP4	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
FCP5	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
FCP9	微粒-	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
FCP8	微粒+	一些微粒	一些微粒	1 或 2 个微粒	1 或 2 个微粒	澄清

[0331] 无需超声处理,肽容易地被溶解,而所述在乙酸80%中可溶的两种肽需要至少一个循环的超声处理。

[0332] 混合/稀释

[0333] 所述6种肽混合的溶液是澄清的(无可见聚集体)。一旦使用3.3%的甘露醇稀释,所述溶液仍是澄清的(无可见聚集体)。

[0334] 表11:制剂的目视外观

[0335]

肽	乙酸百分数 (% v/v)	分散的容易 性 (见表 12)	分散后 的目视 外观	混合后混合 物的目视外 观	稀释后混合 物的目视外 观
FCP1	AcOH 10%	+++	澄清	澄清	澄清
FCP2	AcOH 10%	+++	澄清		
FCP4	AcOH 10%	+++	澄清		
FCP5	AcOH 10%	+++	澄清		
FCP9	AcOH 80%	++	澄清		
FCP8	AcOH 80%	+	澄清		

[0336] 过滤回收率

[0337] 实现了非常好的过滤回收率 (对于每种肽, >99%)。

[0338] 表12:过滤后的肽回收率

[0339]

FCP	FCP1	FCP2	FCP4	FCP5	FCP9	FCP8
肽回收率%	100.2	101.6	100.8	100.2	99.8	99.6

[0340] 透射电子显微术 (TEM) 成像

[0341] 过滤前形成的微团的TEM分析表明了存在大小范围为17-30nm的小球状微团的均质群体 (图12)。

[0342] 化学稳定性 (过滤后)

[0343] 化学稳定性通过RP-HPLC在T₀时和过滤后24小时之后确定。结果示于图13和表13中。

[0344] 表13:过滤后纯度随时间的变化

[0345]

	T0	2小时	6小时	24小时
纯度%	96.9	97.1	97.1	96.9
HPLC谱	8644	8645	8649	8651

[0346] 对FP-01.1成品 (冷冻干燥后) 进行的分析

[0347] 冷冻干燥之后的结块外观

[0348] 表14:结块检查结果

[0349]

产品	上好的结块	破裂的结块	总瓶数
FP01.1	25	0	25

[0350] 所述冻干产品形成上好的固体的均匀结块。

[0351] 冻干的FP-01.1产品的纯度分析

[0352] 将样品在0.70ml水中复原以获得0.5mg/肽的浓度。在所述冷冻干燥过程中没有出

现降解,纯度为97%。

[0353] 冻干的FP-01.1的复原-与未经配制的氟肽的比较

[0354] 为了证明将所述配制方法应用于生产FP-01.1的有利之处,比较了经复原的FP-01.1疫苗(经配制的氟肽)与含有未经配制的氟肽的等价制剂的品质。

[0355] 基于未经配制的氟肽的FP-01.1等价物通过在单个瓶中称重所述6种氟肽(每种肽0.35mg)来制备。用0.7ml水(含有4.5%甘露醇以等价于FP-01.1)或28mM L-组氨酸(含有4.5%甘露醇)复原所述未经配制的FP-01.1等价物,并将其与经配制的FP-01.1比较(通过上述配制方法获得并在相同条件下复原)。将所述复原的经配制的FP01.1通过RP-HPLC进行分析,所述分析的结果示于图14中。

[0356] 所述经配制的FP-01.1产品容易地在水中复原,而所述未经配制的FP-01.1等价物是不溶的,在悬浮液中有大聚集体并粘附在玻璃壁上(见图15)。FP-01.1在水中复原产生了无可见聚集体的稍呈乳色的均质溶液。所述未经配制的氟肽不能随着时间达到溶解,甚至是在超声处理和漩涡之后也如此。

[0357] 类似地,在28mM L-组氨酸(为临床产品设计的缓冲液以达到中性pH)中容易地复原了经配制的FP-01.1产品,而所述未经配制的肽是不溶的(形成大聚集体)(见图16)。FP-01.1在水中复原产生了无可见聚集体的稍呈乳色的均质溶液。所述未经配制的氟肽不能随时间达到溶解,甚至是在超声处理和漩涡之后也如此。

[0358] 基于这些结果,基于未经配制的氟肽的产品不被认为是可药用的,这是因为其分散性差且制剂无同质性。

[0359] L-组氨酸中制剂的重量摩尔渗透压浓度和pH

[0360] 表15:在L-组氨酸中经复原的制剂的pH和重量摩尔渗透压浓度

[0361]

	在28mM组氨酸中复原的FP-01.1
重量摩尔渗透压浓度(mOsm/kg)	302
pH	6.65

[0362] 结论

[0363] -在分散时所有氟肽达到完全溶解。

[0364] -形成了适合除菌过滤(截留220nm)的大小为17-30nm的微团。

[0365] -对于所有氟肽,除菌过滤回收率超过99%。

[0366] -FP-01.1可用其专用的28mM L-组氨酸缓冲系统容易地复原,产生具有近于中性pH和可接受的重量渗透压摩尔浓度(约300mOsm)的稍呈乳色的均质溶液。

[0367] -获自未经配制的氟肽的FP-01.1等价制剂被证明是难以复原的,氟肽形成大的不溶性聚集体,大部分粘附至玻璃壁上。这与经配制的FP-01.1的复原形成对比,证明了所述配制方法在生成可药用产品中的有利之处。

[0368] 实施例14:FP01.1在大鼠中的免疫原性

[0369] 评估了大鼠中由FP-01.1制剂产生的免疫应答,所述大鼠由CBS, St Mary's Campus, Imperial College的人员根据GD_RD004在左下侧经肌肉内免疫。

[0370] 脾细胞制备

[0371] 根据家庭诊所条例(home office regulations)和GD_RD004处死大鼠。收获脾(对

任何异常的脾拍照),根据GD_RD007制备单细胞悬浮液,细胞数目按照GD_RD001中所述(TruCount方法)确定。将脾细胞在完全培养基中重悬至 1×10^7 /mL并铺板用于IFN γ ELISpot和CBA。

[0372] IFN γ ELISpot

[0373] 用于刺激的抗原从储液以4 $\times$ 浓度新鲜制备,并将其以两次重复铺板于孔中,用于IFN γ ELISPOT。将细胞以 0.5×10^6 脾细胞/孔(50 μ l细胞悬浮液)铺板,含50 μ l的4 $\times$ 抗原制剂(即,各个长肽和LPMIX6用于刺激)及100 μ L完全培养基(总体积=200 μ L)。将ELISpot板在增湿的环境中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18小时。

[0374] 通过体积调节3个剂量的FP-01.1,维持500 μ g/ml/肽的恒定FCP浓度。在第0天和第14天用12.5、50或100 μ g/肽的FP-01.1肌肉内注射SD大鼠,在第24天收获它们的脾,与来自FP-01.1的各个天然肽孵育18小时后用于IFN- γ ELISPOT分析。12.5 μ g/肽和50 μ g/肽剂量都分别以25 μ l和100 μ l的体积在单个位点注射,而100 μ g/肽的剂量以2 $\times$ 100 μ l的体积在两个不同位点注射。

[0375] FP-01.1在所测试的所有剂量水平下以剂量依赖的方式诱导了阳性IFN- γ T细胞应答(图17)。

[0376] 实施例15:FP01.1的临床试验数据

[0377] 在I期临床试验中,在总共48名健康个体中评估了在第1、29天给予3个递增剂量的FP-01.1(50、150、500 μ g/肽)和安慰剂的安全性、耐受性和免疫原性。

[0378] 两次肌肉内注射后,所有3个组均对FP-01.1耐受良好。在TEAE发病率、实验室参数或注射部位反应中,没有剂量依赖关系的明确证据。在三个组的任一组中,没有受试者在第一次或第二次暴露中表现出对疫苗的任何显著的局部或全身反应。

[0379] 使用离体IFN- γ ELISpot测定评估了疫苗诱导的T细胞应答。以6种个体肽(对应于所述疫苗中包含的肽)刺激PBMC 18小时。阳性试验反应被定义为阴性对照孔中斑点数目的平均值+2倍的平均值的标准差。计算了所述6种肽每一种的斑点数目,以获得“长肽的总和”并以每百万输入PBMC的斑点数目表示。

[0380] 证明了FP-01.1是有免疫原性的。如图18中所观察到的,150 μ g FP-01.1剂量组与所述另外两个疫苗剂量组以及安慰剂组相比显示出更高的应答。在该剂量组中,在第二次注射后观察到了加强效应,支持了多次注射肽疫苗可加强放大的观点。

序列表

<110> 免疫目标指定系统 (ITS)有限公司

<120> 碳氟连接的肽制剂

<130> N110619A

<150> GB 1022147.1

<151> 2010-12-31

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 1

His	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	Thr	Ser	Gly	Arg	Gln	Glu	Lys	Asn
1				5					10					15	

Pro	Ser	Leu	Arg	Met	Lys	Trp	Met	Met	Ala	Met	Lys	Tyr	Pro	Ile	Thr
			20					25					30		

[0001] Ala Asp Lys
35

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 2

Val	Ala	Tyr	Met	Leu	Glu	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Thr	Arg	Phe	Leu
1				5					10					15	

Pro	Val	Ala	Gly	Gly	Thr	Ser	Ser	Val	Tyr	Ile	Glu	Val	Leu	His	Leu
			20					25					30		

Thr	Gln	Gly
		35

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 3

Tyr	Ile	Thr	Arg	Asn	Gln	Pro	Glu	Trp	Phe	Arg	Asn	Val	Leu	Ser	Ile
1				5					10					15	

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
20 25 30

Met Phe Glu
35

<210> 4
<211> 35
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 4

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
1 5 10 15

Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala Glu
20 25 30

Met Leu Ala
35

[0002] <210> 5
<211> 35
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 5

Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp
1 5 10 15

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala
20 25 30

His Lys Ser
35

<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 6

Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser
1 5 10 15

Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro
20 25 30

Ser Glu Arg
35

<210> 7
<211> 35
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 7

His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn
1 5 10 15

Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr
20 25 30

Ala Asp Lys
35

<210> 8
<211> 35
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 8

[0003]

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Ile Tyr Ile Glu Val Leu His Leu
20 25 30

Thr Gln Gly
35

<210> 9
<211> 35
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 9

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu
1 5 10 15

Pro Val Ser Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu
20 25 30

Thr Gln Gly
35

<210> 10
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 10

Tyr Ile Thr Lys Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile Leu Ser Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
 20 25 30

Met Phe Glu
 35

<210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 11

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
 1 5 10 15

[0004] Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala Glu
 20 25 30

Met Leu Ala
 35

<210> 12
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 12

Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala
 20 25 30

His Lys Ser
 35

<210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 13

Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val Leu
1 5 10 15

Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Lys Tyr Thr Lys Thr Thr
20 25 30

Tyr

<210> 14

<211> 35

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 14

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

Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro
20 25 30

[0005]

Ser Phe Gly
35

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 15

Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser
1 5 10 15

Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn
20 25 30

Lys

<210> 16

<211> 35

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 16

Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly Val
1 5 10 15

Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile
20 25 30

Lys Ser Glu
35

<210> 17
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 17

Lys His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys
1 5 10 15

Asn Pro Ser Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile
20 25 30

Thr Ala Asp Lys
35

[0006] <210> 18
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 18

Lys Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe
1 5 10 15

Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His
20 25 30

Leu Thr Gln Gly
35

<210> 19
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 19

Lys Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu Ser
1 5 10 15

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
20 25 30

Tyr Met Phe Glu
35

<210> 20
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 20

Lys Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
1 5 10 15

Tyr Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala
20 25 30

Glu Met Leu Ala
35

<210> 21
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 21

[0007] Lys Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu
1 5 10 15

Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val
20 25 30

Ala His Lys Ser
35

<210> 22
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 22

Lys Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu
1 5 10 15

Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val
20 25 30

Pro Ser Glu Arg
35

<210> 23

<211> 36
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 23

Lys Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
 1 5 10 15

Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala
 20 25 30

Glu Met Leu Ala
 35

<210> 24
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 24

Lys Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val
 1 5 10 15

[0008] Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Lys Tyr Thr Lys Thr
 20 25 30

Thr Tyr

<210> 25
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 25

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

Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu
 20 25 30

Pro Ser Phe Gly
 35

<210> 26
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 26

Lys Tyr Ile Thr Lys Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile Leu Ser
1 5 10 15

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly
20 25 30

Tyr Met Phe Glu
35

<210> 27
<211> 34
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 27

Lys Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly
1 5 10 15

[0009] Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr
20 25 30

Asn Lys

<210> 28
<211> 36
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 28

Lys Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly
1 5 10 15

Val Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys
20 25 30

Ile Lys Ser Glu
35

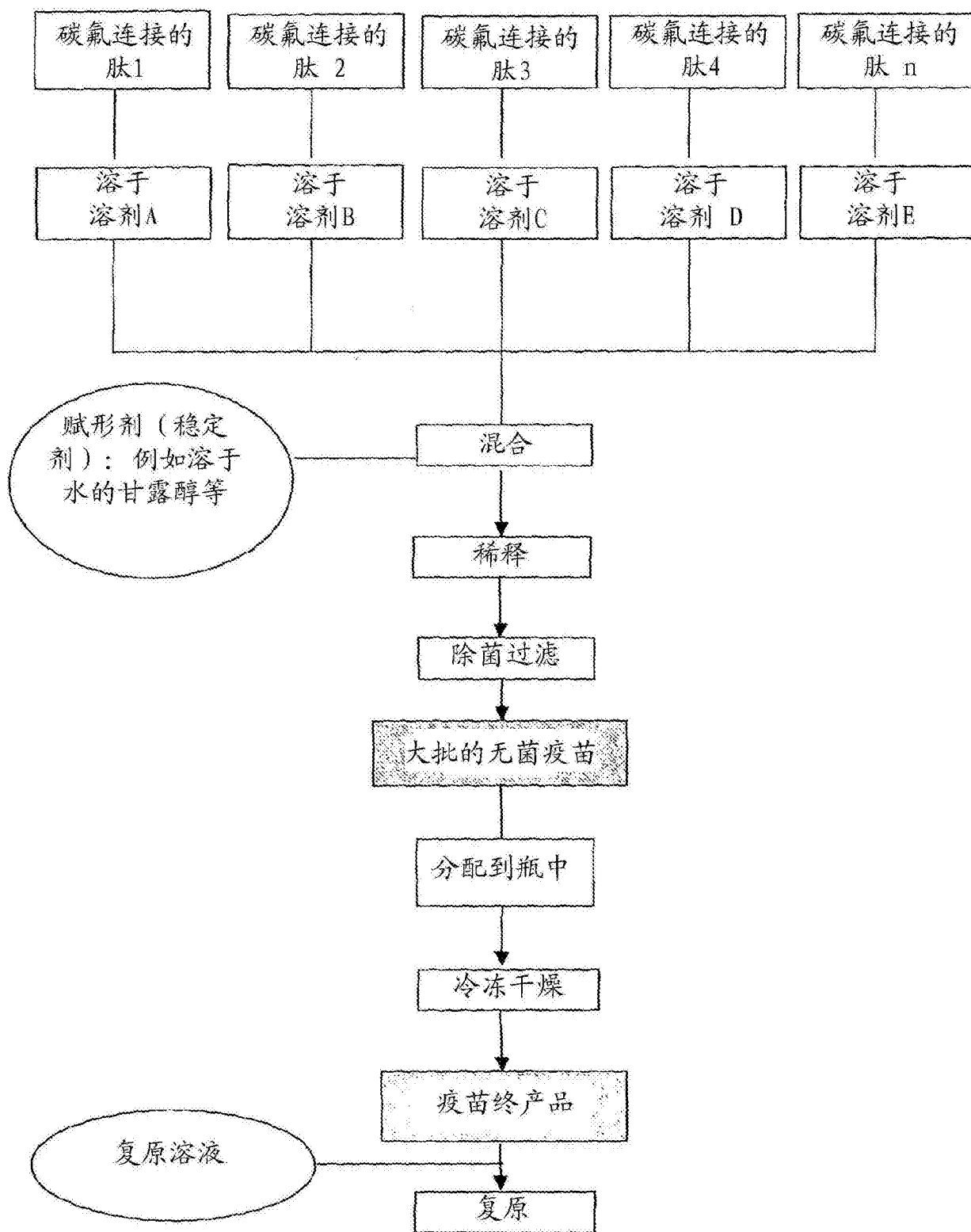


图1

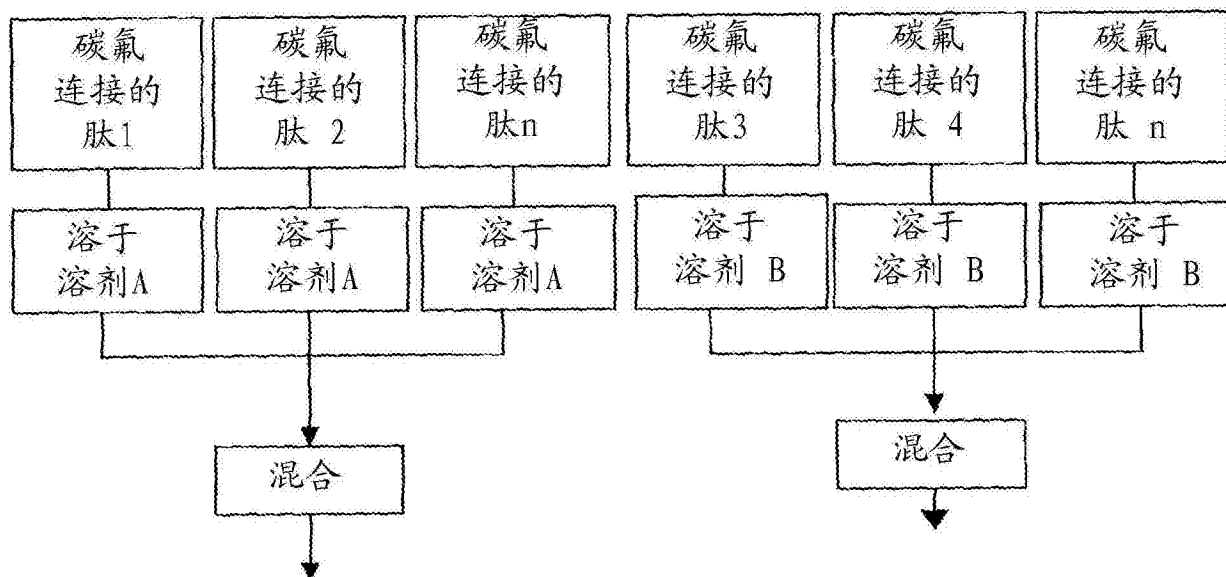


图2

FCP	80% v/v 乙酸		80% v/v 2-丙醇		80% v/v 叔丁醇		80% v/v DMSO		80% v/v 丙酮	
	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	微粒	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	微粒
FCP1	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP2	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP3	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP4	+++	-/-	+	++	+++	-/++	+	++/++	+++	++
FCP5	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP6	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	++/++*	-	++
FCP7	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP8	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+/++	+	++
FCP9	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP10	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP11	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	++/++	+	++
FCP12	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+/++	+	++

图3

FCP	80% v/v 乙酸		80% v/v 2-丙醇		80% v/v 叔丁醇		80% v/v DMSO		80% v/v 丙酮	
	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	泡沫/微粒	澄清度	泡沫/微粒
FCP1	+++	-/-	+++	-/-	+++	+/+	+++	-/-	++	+/+
FCP2	+++	-/-	+++	-/-	+++	+/+	+++	+/+	+++	+/+
FCP3	+++	-/-	+++	-/-	+++	+/+	+++	+/+	+++	+/+
FCP4	+++	-/-	+++	+/+	+++	+/+	+	+/+	+++	-/++
FCP5	+++	-/-	-	-/++	+++	+/+	+	+/+	+	-/++
FCP6	+++	-/-	+	+/+	+	+/+	+++	-/++	+++	-/-
FCP7	+++	-/-	+++	+/+	+++	-/-	+	+/+	+	-/++
FCP8	+++	-/-	-	+/+	+	+/+	+	+/+	+	+/++
FCP9	+++	-/-	+++	-/-	+++	+/+	+++	+/+	+++	+/+
FCP10	+++	-/-	+++	-/-	+++	+/+	+++	+/+	+++	+/+
FCP11	+++	-/-	-	+/+	+	+/+	+	+/+	+	+/+
FCP12	+++	-/-	-	+/+	+	+/+	+	+/+	+	+/+
Mix 1	+++	-/-	++	-/++	+	-/++	+	-/++	+	+/+
Mix 2	+++	-/-	++	-/++	+	-/++	+	-/++	+	+/+

图4

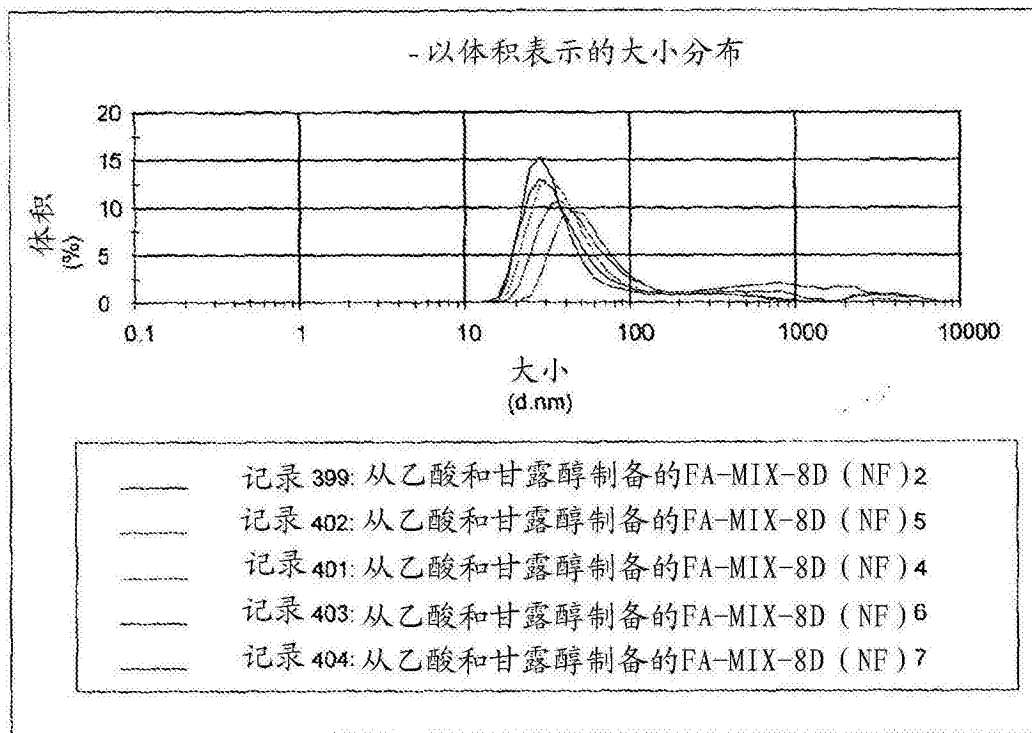


图5

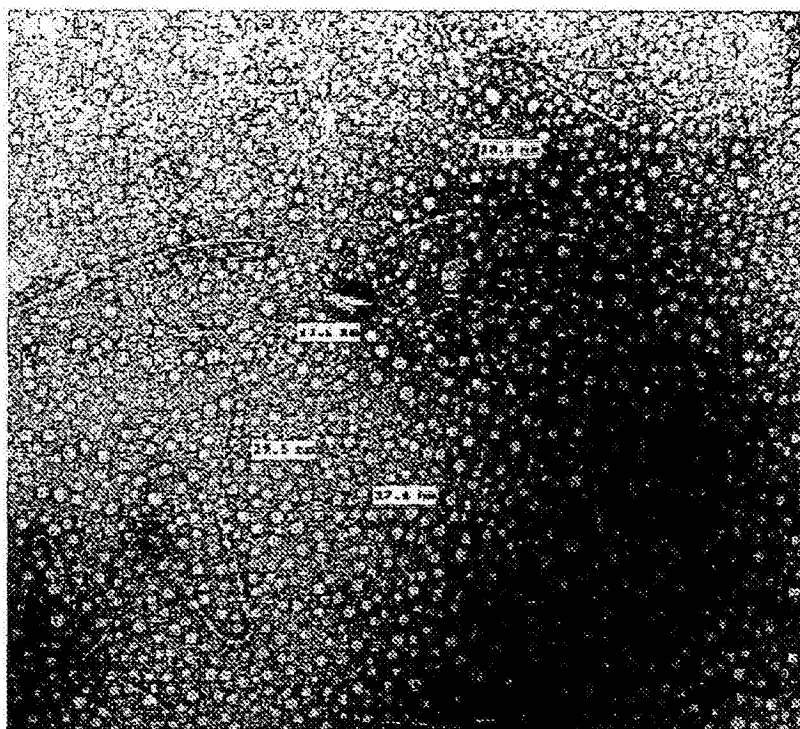


图6

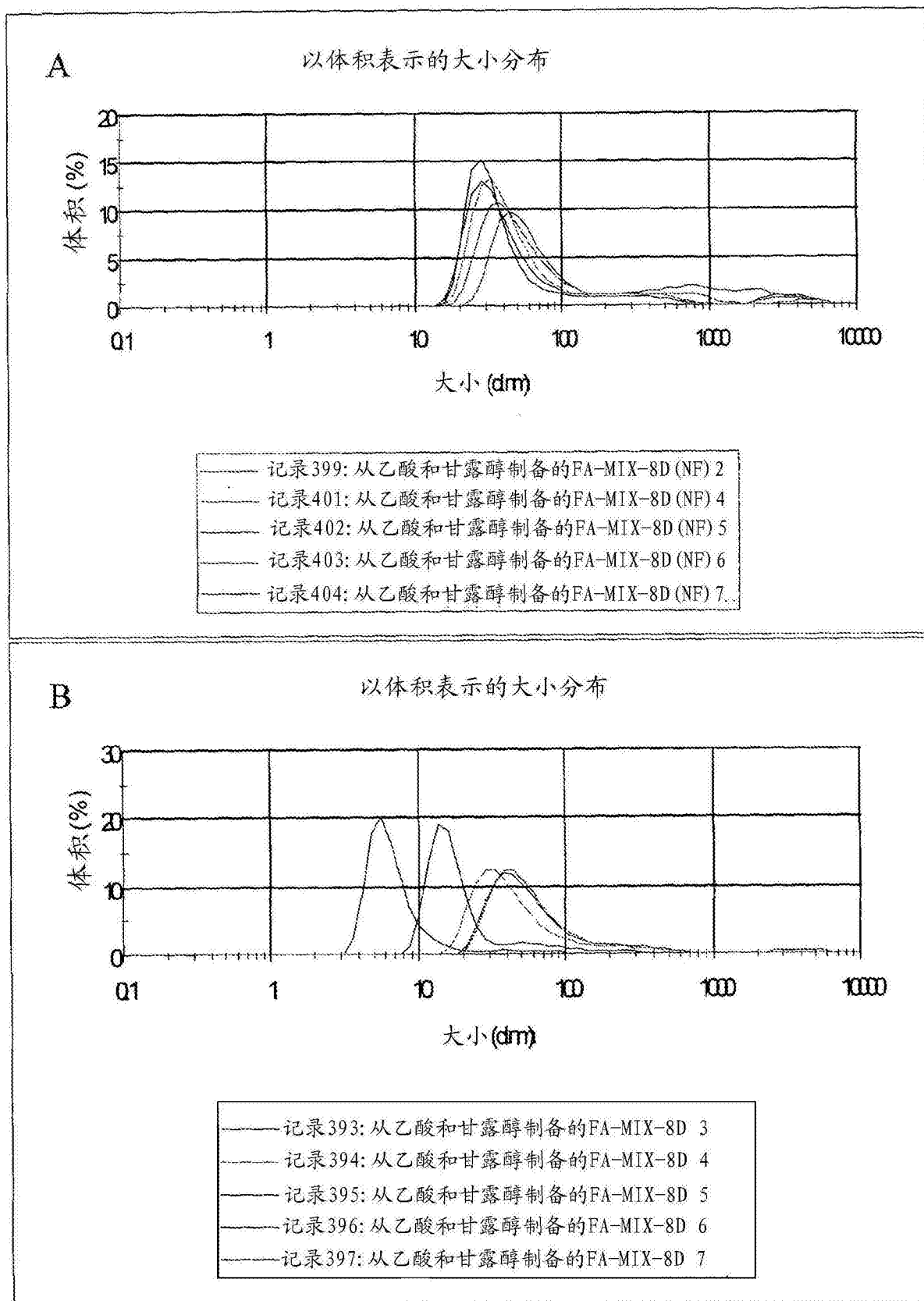


图7

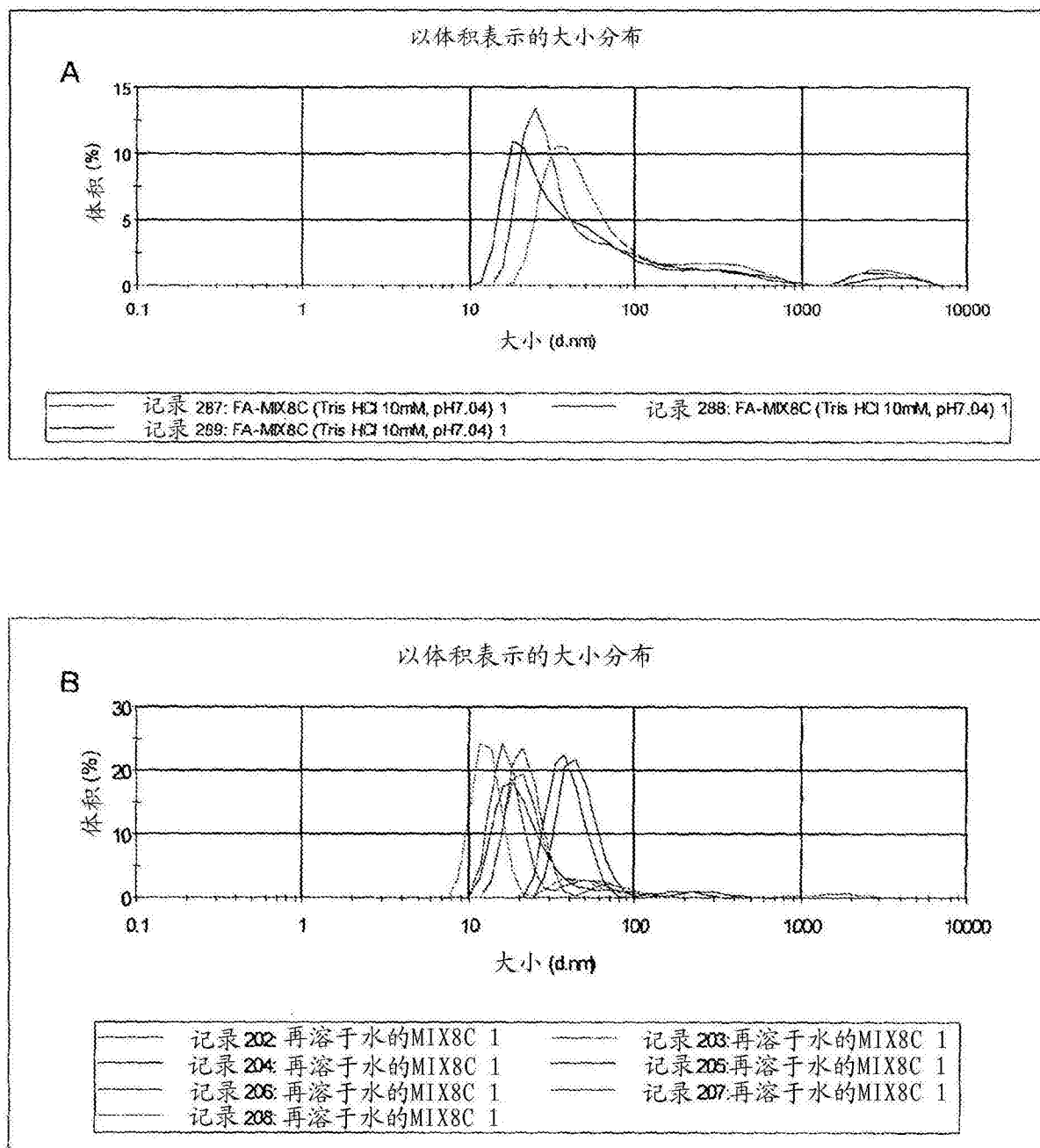


图8

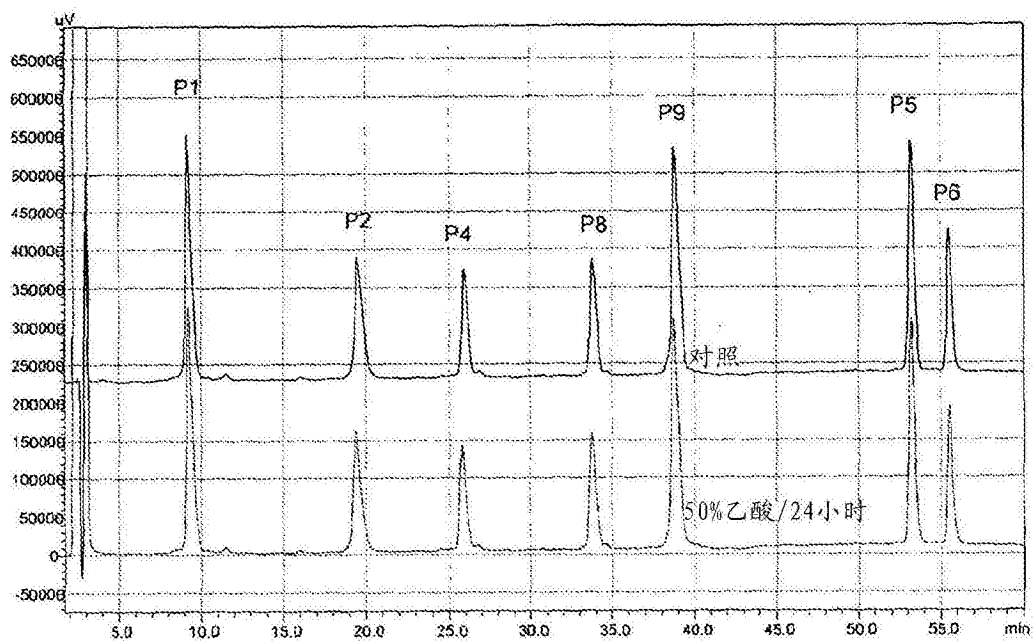


图9

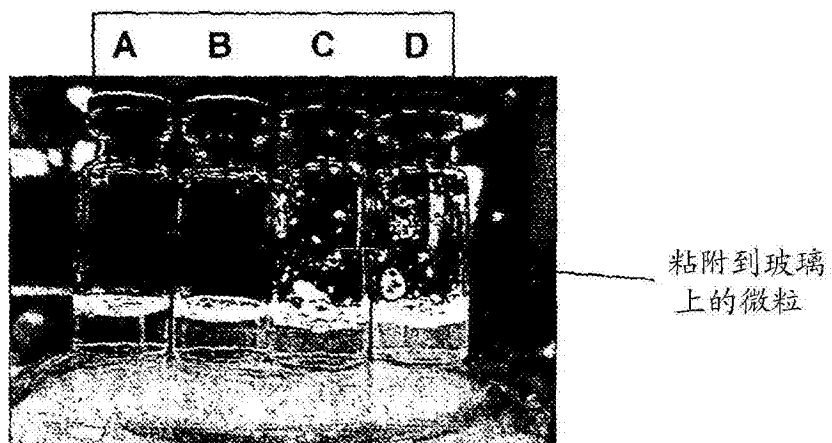


图10

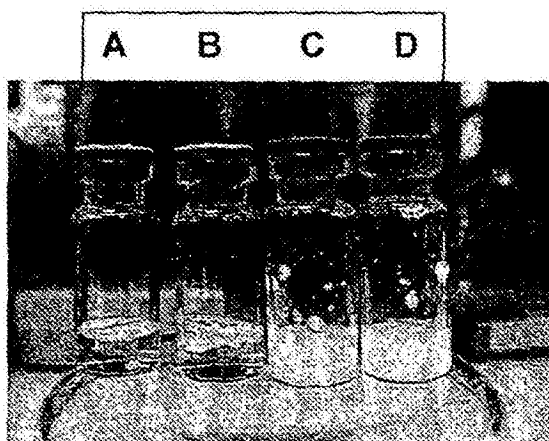


图11

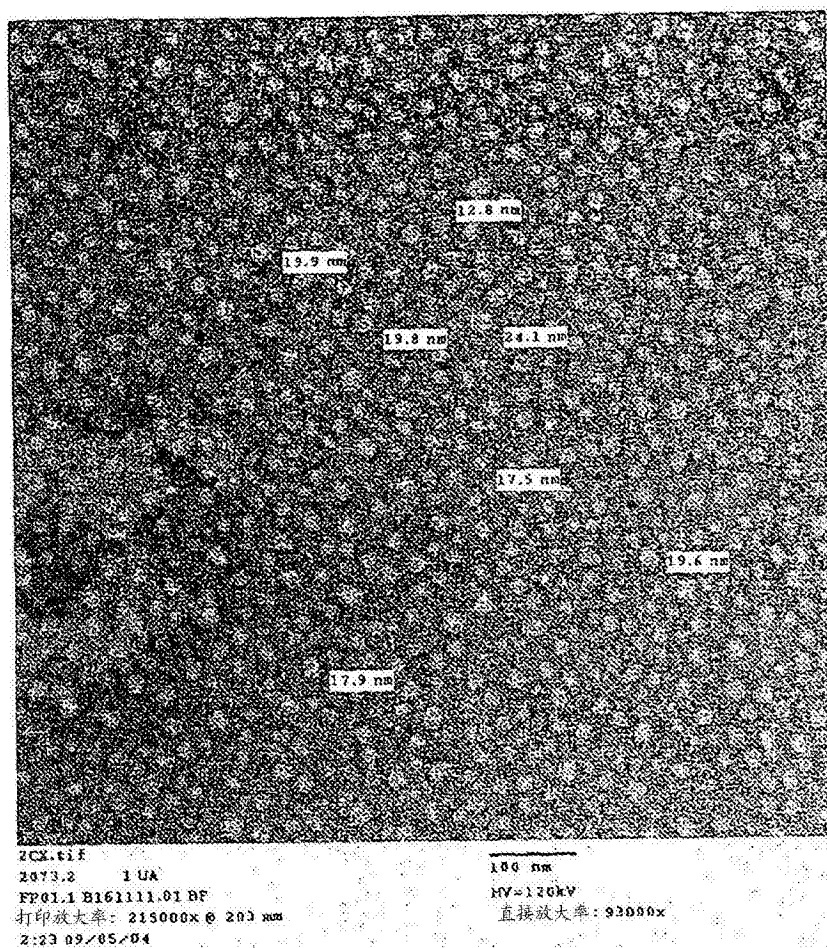


图12

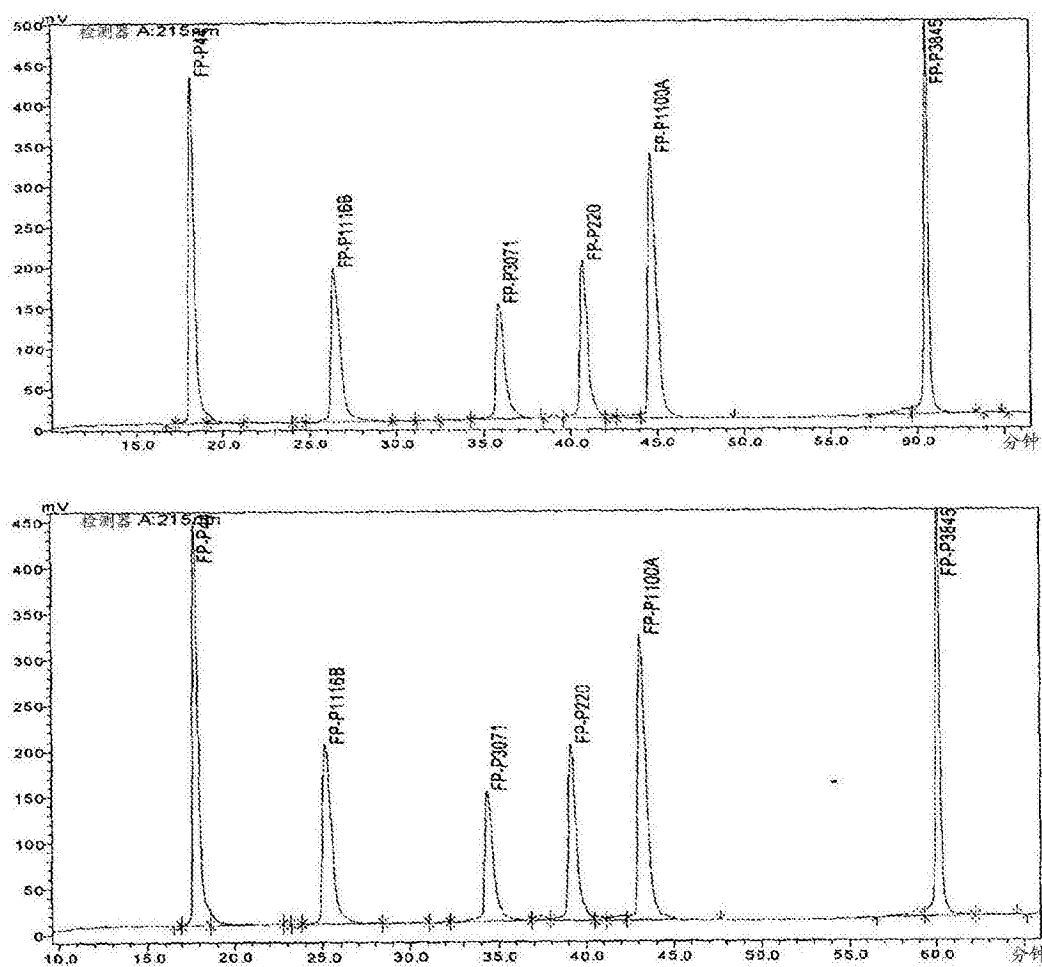


图13

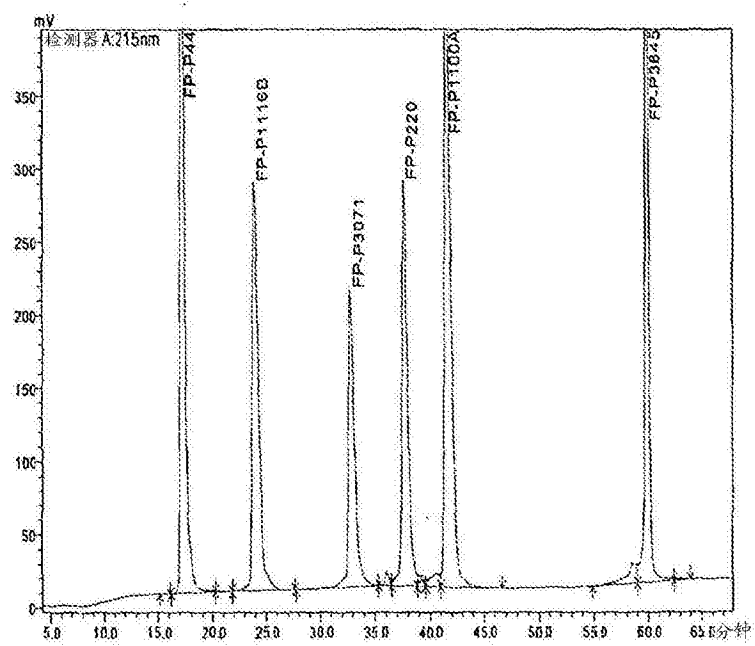


图14



图15

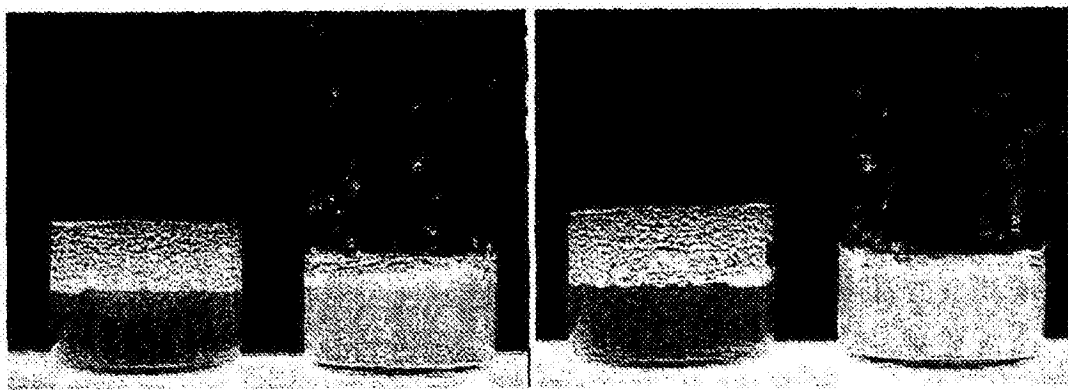


图16

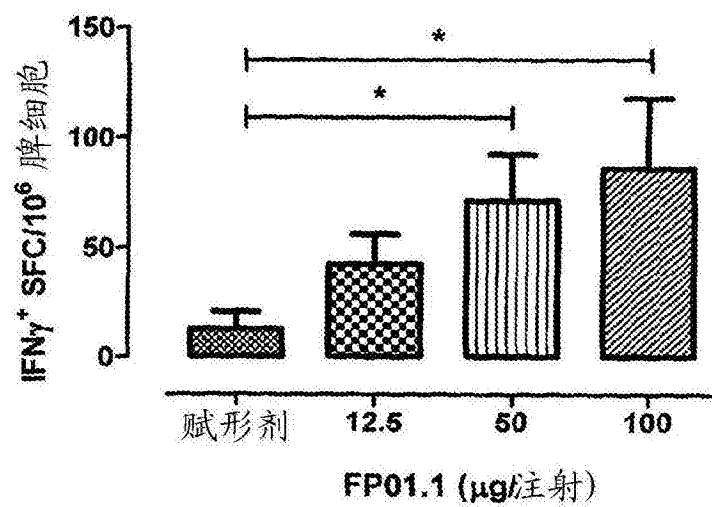


图17

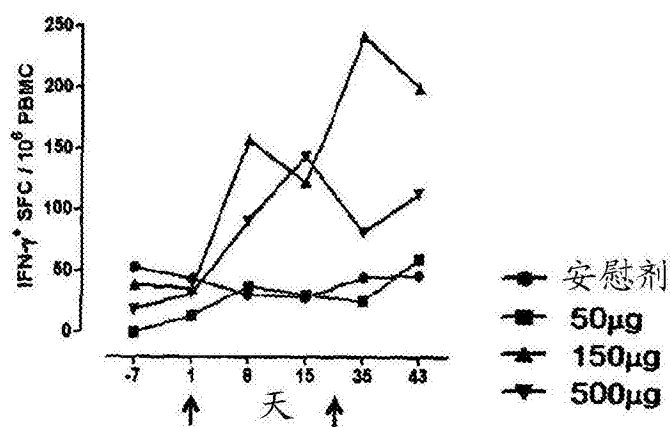


图18