



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106008716 B

(45)授权公告日 2019.08.13

(21)申请号 201610369657.4

C07K 17/10(2006.01)

(22)申请日 2011.07.07

C07K 17/08(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 17/06(2006.01)

申请公布号 CN 106008716 A

C07K 14/135(2006.01)

(43)申请公布日 2016.10.12

A61K 39/155(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 47/64(2017.01)

61/362,029 2010.07.07 US

A61P 31/14(2006.01)

61/485,669 2011.05.13 US

(56)对比文件

(62)分案原申请数据

Yoshihiko Murata.Respiratory

201180033742.9 2011.07.07

syncytial virus vaccine development.

(73)专利权人 人工细胞科技公司

『Clinics in Laboratory Medicine』.2009, 第
29卷(第4期), 第725-739页.

地址 美国康涅狄格州

Jean-Claude Voegel.Multilayered
polyelectrolyte films: from active
molecular delivery to vaccine therapy.
『ACS NANO』.2009, 第3卷(第11期), 第3343-3346
页.

(72)发明人 托马斯·J·鲍威尔

审查员 吴颖

詹姆斯·戈勒姆·博伊德

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 卢蓓

(51)Int.Cl.

权利要求书3页 说明书29页

C07K 17/14(2006.01)

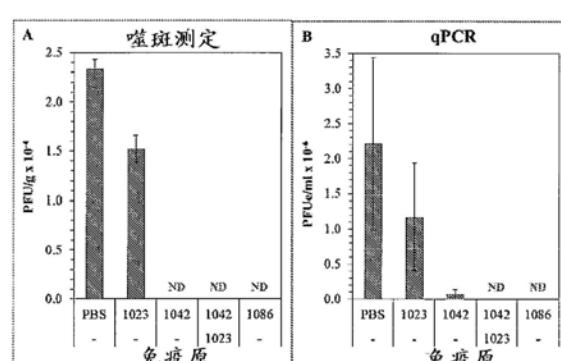
序列表11页 附图13页

(54)发明名称

呼吸道合胞病毒抗原组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及呼吸道合胞病毒抗原组合物和方法,以及包含来自RSV之多肽表位的多层膜。所述多层膜在向宿主施用后能够在宿主体内引起免疫应答。所述多层膜包含至少一种经设计的肽,所述经设计的肽包含一种或更多种来自RSV的多肽表位。特别地,所述多层膜包含两种来自RSV的多肽表位,例如引起特异性T细胞应答如细胞毒性T细胞应答的表位,以及引起特异性抗体应答的表位。



1. 组合物, 其包含:

来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位, 其中一种或更多种聚电解质在一个或更多个多层膜中,

其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质, 其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质, 其中至少一种聚电解质是经设计的多肽, 以及

其中所述聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料, 以及

其中所述来自RSV的第一多肽表位和所述来自RSV的第二多肽表位存在于同一多层膜或不同的多层膜中,

其中所述来自RSV的第一多肽表位由NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNK或NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNKKPGKKT组成且为第一经设计之多肽的形式, 其中所述第一经设计的多肽由与一个或更多个第一表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第一多肽表位组成, 所述第一表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成, 其中所述第一表面吸附区域和所述第一经设计的多肽具有相同的电荷符号, 其中所述第一经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg/ml的溶解度,

其中所述来自RSV的第二多肽表位由ESYIGSINNITKQSA (SEQ ID NO. 7)、ESYIGSINNITKQSASVA或ESYIGSINNITKQSASGS组成且为第二经设计之多肽的形式, 其中所述第二经设计的多肽由与一个或更多个第二表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第二多肽表位组成, 所述第二表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成, 其中所述第二表面吸附区域和所述第二经设计的多肽具有相同的电荷符号, 其中所述第二经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg/ml的溶解度,

或者

其中所述来自RSV的第一多肽表位由NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNK或NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNKKPGKKT组成并且所述来自RSV的第二多肽表位由ESYIGSINNITKQSA (SEQ ID NO. 7)、ESYIGSINNITKQSASVA或ESYIGSINNITKQSASGS组成, 并且所述来自RSV的第一和第二多肽表位为经设计之多肽的形式, 其中所述经设计的多肽由与一个或更多个表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第一和第二多肽表位组成, 所述表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成, 其中所述表面吸附区域和所述经设计的多肽具有相同的电荷符号, 其中所述经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg/ml的溶解度,

并且其中所述经设计的多肽不包含C末端酰胺。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述经设计的多肽包含C末端酰胺。

3. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于单一经设计的多肽中并且在同一多层膜中。

4. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于不同的经设计之多肽中。

5. 根据权利要求4所述的组合物, 其中包含所述来自RSV的第一多肽表位的第一经设计的多肽与包含所述来自RSV的第二多肽表位的第二经设计的多肽存在于同一多层膜中。

6. 根据权利要求4所述的组合物, 其中包含所述来自RSV的第一多肽表位的第一经设计

之多肽存在于第一多层膜中,以及包含所述来自RSV的第二多肽表位的第二经设计之多肽存在于第二多层膜中。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述膜沉积在核心颗粒上。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述多层膜为中空囊的形式。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层共价交联。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过酰胺键共价交联。
11. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过二硫键共价交联。

12. 组合物,其包含:

来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位,其中所述第一多肽表位和第二多肽表位为一个或更多个多层膜的形式,

其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,并且其中所述多层膜的至少一种聚电解质包含经设计的多肽,

其中所述经设计的多肽带有足以与带相反电荷之表面稳定结合的电荷,以及其中所述经设计的多肽包含所述来自RSV的第一多肽表位、所述来自RSV的第二多肽表位或二者,

其中不是经设计之多肽的聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料,以及

其中所述来自RSV的第一多肽表位和所述来自RSV的第二多肽表位存在于同一多层膜或不同的多层膜中,

其中所述来自RSV的第一多肽表位由NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNK或NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNKKPGKKT组成且为第一经设计之多肽的形式,其中所述第一经设计的多肽由与一个或更多个第一表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第一多肽表位组成,所述第一表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成,其中所述第一表面吸附区域和所述第一经设计的多肽具有相同的电荷符号,其中所述第一经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg/ml的溶解度,

其中所述来自RSV的第二多肽表位由ESYIGSINNITKQSA (SEQ ID NO. 7)、ESYIGSINNITKQSASVA或ESYIGSINNITKQSASGS组成且为第二经设计之多肽的形式,其中所述第二经设计的多肽由与一个或更多个第二表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第二多肽表位组成,所述第二表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成,其中所述第二表面吸附区域和所述第二经设计的多肽具有相同的电荷符号,其中所述第二经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg /ml的溶解度,

或者

其中所述来自RSV的第一多肽表位由NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNK或NFVPCSICSNPCTCWAICKRIPNKKPGKKT组成并且所述来自RSV的第二多肽表位由ESYIGSINNITKQSA (SEQ ID NO. 7)、ESYIGSINNITKQSASVA或ESYIGSINNITKQSASGS组成,并且所述来自RSV的第一和第二多肽表位为经设计之多肽的形式,其中所述经设计的多肽由与一个或更多个表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第一和第二多肽表位组成,所述表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成,其中所述表面吸附区域和所述经设计的多肽具有

相同的电荷符号,其中所述经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg/ml的溶解度,

并且其中所述经设计的多肽不包含C末端酰胺。

13.根据权利要求12所述的组合物,其中所述经设计的多肽包含C末端酰胺。

14.根据权利要求12所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于单一经设计的多肽中并且在同一多层膜中。

15.根据权利要求12所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于不同的经设计之多肽中。

16.根据权利要求15所述的组合物,其中包含所述来自RSV的第一多肽表位之所述第一经设计的多肽与包含所述来自RSV的第二多肽表位之所述第二经设计的多肽存在于同一多层膜中。

17.根据权利要求15所述的组合物,其中包含所述来自RSV的第一多肽表位之所述第一经设计的多肽存在于第一多层膜中,以及包含所述来自RSV的第二多肽表位之所述第二经设计的多肽存在于第二多层膜中。

18.根据权利要求12所述的组合物,其中所述膜沉积在核心颗粒上。

19.根据权利要求12所述的组合物,其中所述多层膜为中空囊的形式。

20.根据权利要求19所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层共价交联。

21.根据权利要求20所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过酰胺键共价交联。

22.根据权利要求20所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过二硫键共价交联。

23.根据权利要求1或12所述的组合物,其中所述来自RSV的第二多肽表位由ESYIGSINNITKQSA (SEQ ID NO.7) 组成。

24.组合物,其包含:

与一种或更多种聚电解质共价连接的RSV-G多肽表位,其中所述一种或更多种聚电解质在一个或更多个多层膜内,其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,

其中所述聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料,以及

其中所述RSV-G多肽表位由N F V P C S I C S N N P T C W A I C K R I P N K 或N F V P C S I C S N N P T C W A I C K R I P N K P G K K T 组成且为第一经设计之多肽的形式,其中所述第一经设计的多肽由与一个或更多个第一表面吸附区域共价连接的所述来自RSV的第一多肽表位组成,所述第一表面吸附区域由至少八个氨基酸残基组成,其中所述第一表面吸附区域和所述第一经设计的多肽具有相同的电荷符号,其中所述第一经设计的多肽具有大于或等于0.4的每残基净电荷以及在pH 4至10时大于0.1mg/ml的溶解度,

并且其中所述经设计的多肽不包含C末端酰胺。

25.根据权利要求24所述的组合物,其中所述经设计的多肽包含C末端酰胺。

26.权利要求1至25中任一项所述组合物在制备用于在有需要的个体中针对RSV进行免疫的药物中的用途。

呼吸道合胞病毒抗原组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2011年7月7日、申请号为“201180033742.9”、发明名称为“呼吸道合胞病毒抗原组合物和方法”的中国专利申请的分案申请，原申请是国际申请PCT/US2011/043136的中国国家阶段申请。相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是于2011年5月13日提交的美国临时申请No. 61/485669和于2010年7月7日提交的美国临时申请No. 61/362029的正式申请，其二者都整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及用于预防呼吸道合胞病毒感染的组合物和方法，特别是包含抗原表位的多层膜组合物。

背景技术

[0004] 呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是造成全世界婴幼儿严重下呼吸道疾病的最重要原因，也威胁着老年人和免疫缺陷患者。在美国，RSV感染每年导致多至126,000个婴儿住院治疗，以及多至60,000个老年人住院治疗。因为自然RSV感染不诱发持久的长期免疫，所以患者在一生中均可以被相同或不同的病毒株再感染。RSV与继发感染如中耳炎相关，其可使得幼儿在之后易于患哮喘相关疾病。

[0005] 在经过40多年的努力以后，依旧没有安全有效的RSV疫苗。在二十世纪六十年代最早尝试开发出的福尔马林灭活明矾沉淀RSV (formalin-inactivated alum-precipitated RSV, FI-RSV) 疫苗实际上表现出易于使被接种的儿童在随后的自然感染中患上更加严重的疾病甚至是死亡。尚未全面表征出该应答的准确机制，但是其似乎依赖于使免疫应答向以细胞因子和趋化因子途径之不恰当活化为特征的炎性Th2优势表型 (Th2-dominant phenotype) 偏移。

[0006] 考虑到RSV疾病对经济的影响 (2004年在美国估计为每年近700百万美元) 以及RSV感染婴儿、老人和免疫缺陷患者可造成的威胁生命的并发症，开发安全有效的RSV疫苗极为重要。

[0007] 需要适于刺激针对RSV之免疫应答的改进的抗原组合物。

发明内容

[0008] 在一个实施方案中，组合物包含来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位，其中第一多肽表位和第二多肽表位与一种或更多种聚电解质共价相连，其中所述一种或更多种聚电解质在一个或更多个多层膜中，其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质，其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质，其中聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料，其中来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位存在于同一多层膜或不同的多层膜中。

[0009] 在另一实施方案中，组合物包含来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位，其中第一多肽表位和第二多肽表位为一个或更多个多层膜的形式，其中所述一个或更

多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,其中多层膜的至少一种聚电解质包含经设计的多肽,其中经设计的多肽带有足以与带相反电荷的表面稳定结合的电荷,其中经设计的多肽包含来自RSV的第一多肽表位、来自RSV的第二多肽表位或二者,其中不是经设计的多肽的聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料,其中来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位存在于同一多层膜或不同的多层膜中。

[0010] 组合物包含与一种或更多种聚电解质共价连接的RSV-G多肽表位,其中所述一种或更多种聚电解质在一个或更多个多层膜中,其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,其中聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料。

附图说明

[0011] 图1:完整ACT-2044 (SEQ ID NO:8) 的MH₆⁺⁶电荷态的放大FT-ICR质谱图。全氧化肽的预期单同位素m/z=1015.43,实测值=1015.6008。该结果与ACT-2044中两个分子内二硫键完全相符。

[0012] 图2:ACT-2086 (SEQ ID NO:13) 的FT-ICR质谱图。MH₉⁺⁹单同位素峰的m/z为867.1571,对应于7795.344amu的单同位素质量,其非常接近于7795.33amu的单同位素质量计算值。该结果完全与ACT-2086中两个二硫键的存在符合。

[0013] 图3:在每一ELBL成层步骤后测量的纳米颗粒的表面(ζ)电势。未包被颗粒(EP)具有正ζ值。包被单层PGA得到负ζ值。随后用经设计的肽ACT-2031、多肽PGA和PLL、或经设计的肽ACT-2044进行的成层步骤造成ζ电势交替正或负移,表明成功的ELBL步骤。

[0014] 图4:通过足垫注射用纳米颗粒ACT-1042 (SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₄₋₁₉₁) 免疫BALB/c小鼠三次;获取血清并且用ELISA进行测定。血清识别RSV-G CX3C构象表位肽ACT-2044 (SEQ ID NO:8)。

[0015] 图5:通过足垫注射用纳米颗粒ACT-1042 (SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₄₋₁₉₁) 免疫BALB/c小鼠三次;获取血清并且用ELISA进行测定。血清不识别同一肽通过半胱氨酸残基加帽来线化的形式 (ACT-2054; SEQ ID NO:9)。

[0016] 图6:通过足垫注射用纳米颗粒ACT-1042 (SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₄₋₁₉₁) 免疫BALB/c小鼠三次;获取血清并且用ELISA进行测定。血清也识别天然RSV-G蛋白。

[0017] 图7:通过足垫注射用纳米颗粒ACT-1042 (SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₄₋₁₉₁) 免疫BALB/c小鼠三次;获取血清并且在测量RSV-G与CX3CR1趋化因子受体结合之抑制的生物化学结合测定中进行检测。由ACT-1042引起的抗体应答的生物活性通过RSV-G与趋化因子受体结合的抑制来确定。

[0018] 图8:通过足垫注射用纳米颗粒ACT-1042 (SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₄₋₁₉₁) 免疫BALB/c小鼠三次;获取血清并且在细胞迁移实验中进行测定。由ACT-1042引起的抗体应答的生物活性通过人PBMC向经纯化RSV-G迁移的抑制来确定。

[0019] 图9:通过s.c.、i.p.、i.n.和足垫施用用ACT-1023 (SEQ ID NO:12; RSV-M2₈₁₋₉₈) 免疫后的RSV-M2特异性T细胞应答。在免疫后14天从小鼠体内获取脾细胞,在IL-4或IFN γ ELISPOT板中用RSV-M2肽ACT-2019 (SEQ ID NO:7) 再刺激。结果显示在单个未处理或免疫动

物中每 10^6 细胞抗原特异性T细胞的数量。

[0020] 图10:多价RSV纳米颗粒混合疫苗的免疫原性。在第0天和第21天免疫BALB/c小鼠(5只/组,5至6周龄)。针对RSV-G的抗体应答:在第28天采集血清,用ELISA测量RSV-G特异性IgG抗体效价。数据为每组5只小鼠的平均值±SD。

[0021] 图11:多价RSV纳米颗粒混合疫苗的免疫原性。在第0天和第21天免疫BALB/c小鼠(5只/组,5至6周龄)。针对RSV-M2的T细胞应答:在第28天获取脾细胞,在IFN γ 或IL-4ELISPOT板中用RSV-M2 (ACT-2031; SEQ ID NO:12) 再刺激。数据为每组5只小鼠的平均值±SD。

[0022] 图12:通过RSV纳米颗粒免疫诱导体内CTL活性。如所示免疫BALB/c小鼠,在7天后通过i.v.注射用ACT-2031 (RSV-M2; SEQ ID NO:12) 脉冲(pulse)并且标记有高剂量荧光示踪剂CFSE的同基因脾细胞(蓝色峰)与标记有低剂量CFSE并且无靶标肽的同基因脾细胞(红色峰)的混合物来进行攻击。次日,利用流式细胞术分析免疫小鼠的脾,以检测具有不同标记的供体靶细胞的存活。各柱图示出来自处理组中单个免疫小鼠的结果。

[0023] 图13:通过RSV纳米颗粒免疫诱导体内CTL活性。结果示出图12中被特异性杀死的RSV-M2标记靶细胞的百分比,其通过比较柱状图中每个峰的相对细胞数来计算。

[0024] 图14和15示出在利用单表位和多表位构建物的RSV颗粒免疫后的初始后(14)和加强后(15)的抗体应答。

[0025] 图16是图14和15所示结果的柱状图。

[0026] 图17示出了用活RSV攻击被含有RSV-G、RSV-M2或其组合之RSV纳米颗粒免疫的小鼠的结果。数据以噬斑测定和qPCR测定示出。

[0027] 图18:通过RSV纳米颗粒免疫诱导体内CTL活性。如所示免疫BALB/c小鼠,在7天后通过i.v.注射用ACT-2031 (RSV-M2; SEQ ID NO:12) 脉冲且标记有高剂量荧光示踪剂CFSE的同基因脾细胞(蓝色峰)与标记有低剂量荧光示踪剂CFSE且无靶标肽的同基因脾细胞(红色峰)的混合物来进行攻击。次日,利用流式细胞术分析免疫小鼠的脾脏,来检测具有不同标记的供体靶细胞的存活。各柱图示出来自处理组中单个免疫小鼠的结果。

[0028] 图19:通过RSV纳米颗粒免疫诱导体内CTL活性。结果示出图18中被特异性杀死的RSV-M2标记靶细胞的百分比,其通过比较柱状图各峰中细胞的相对数来计算。

[0029] 图20和21:RSV-G特异性抗体应答。在第0天和第21天免疫BALB/c小鼠。利用ELISA测量加强后血清中RSV-G特异性IgG抗体的效价。(20) OD值,1:50稀释的各血清。混合物(cocktail)=ACT-1023+1042。水平条代表组中各值的平均数。(21)在连续滴定中每组5种血清的平均。

[0030] 通过以下具体实施方式、附图和所附权利要求,本领域技术人员将理解并领会上述及其他特征。

[0031] 详述

[0032] 本文公开的是包含来自RSV的多肽表位的多层膜,其中多层膜在给宿主施用后能够引起宿主体内的免疫应答。在一个实施方案中,多层膜包含两种来自RSV的多肽表位,特别是引发特异性T细胞应答(如细胞毒性T细胞应答)的表位和引发特异性抗体应答的表位。在该实施方案中,本发明人出乎意料地发现与仅施用一种成分相比,将引发特异性T细胞应答的表位与引发特异性抗体应答的表位进行组合使得以T细胞应答测量的免疫效力出乎意

料地增强。特别地,与仅含RSV-M2表位的多层膜相比,采用一个或更多个多层膜形式的RSV-G(特异性抗体应答)和RSV-M2(特异性T细胞应答)表位的组合引起显著增强的T细胞应答。

[0033] 特别地,多层膜包含带相反电荷的聚电解质的交替层,其中一个聚电解质层包含共价连接有至少一种来自RSV之多肽表位的聚电解质。第一和第二RSV多肽表位可以连接在相同或不同的聚电解质上,和/或可以存在于同一多层膜或不同的多层膜中。在一个实施方案中,第一和第二RSV多肽表位共价连接在相同聚电解质上,因此位于相同多层膜中。在另一实施方案中,第一和第二RSV多肽表位共价连接在不同的聚电解质上,但成层于同一多层膜内。而在另一实施方案中,第一和第二RSV多肽共价连接在不同的聚电解质上,但是成层于不同的多层膜内(其随后在施用前混合)。

[0034] 在一个实施方案中,多层膜包含带相反电荷的聚电解质的交替层,其中一个聚电解质层为包含至少一种来自RSV之多肽表位的经设计的多肽。第一和第二RSV多肽表位可以存在于相同或不同的经设计的多肽中,和/或可以存在于同一多层膜或不同的多层膜中。在一个实施方案中,第一和第二RSV多肽表位存在于相同的经设计的多肽中,因此位于相同多层膜中。在另一实施方案中,第一和第二RSV多肽表位存在于不同的经设计的多肽中,但成层于同一多层膜内。而在另一实施方案中,第一和第二RSV多肽表位存在于不同的经设计的多肽中,但是成层于不同的多层膜内(其随后在施用前混合)。

[0035] 在一个实施方案中,RSV多肽表位来自RSV-G蛋白。RSV-G(粘附)蛋白与很多失常相关,包括CC和CXC趋化因子mRNA表达的改变以及Th2细胞因子应答的改变,其似乎帮助产生不恰当的免疫结果和增强的疾病。RSV-G蛋白的富含半胱氨酸的中央保守区在氨基酸182至186位包含CX3C趋化因子基序,其与CXXXC趋化分子(fractalkine)(CX3CL1)受体CX3CR1结合。RSV-G对CX3CL1的模拟促进RSV感染并干扰针对病毒的正常适应性免疫应答。利用跨RSV-G CX3C基序的肽进行主动免疫保护小鼠免受RSV感染和肺部炎症。迄今,还未将这些RSV-G肽开发成安全有效的疫苗。

[0036] 在另一实施方案中,RSV多肽表位来自RSV-F或RSV-M2蛋白。除了RSV-G蛋白外,RSV-F(融合)蛋白和RSV-M2(基质)蛋白也是可行的疫苗候选物。开发仅含一种主要抗原决定簇的单价RSV疫苗的尝试因不能完全形成针对感染和炎性疾病的保护而受到阻碍,提示多价方法可能更成功。实际上,利用引起抗体和CD8+T细胞应答二者的多价疫苗免疫小鼠导致Th2的降低和Th1/CD8应答的提高,其与针对病毒感染的更强保护和更少的炎性肺病相关。这些结果提示理想的RSV疫苗设计应包含来自两种或更多种病毒蛋白质的表位,并且能引发抗体和分泌IFN γ 的CD8+T细胞二者。

[0037] 在另一实施方案中,多层膜包含来自RSV的多肽表位,其中多肽表位来自RSV-G蛋白(特异性抗体应答)。出乎意料地发现用包含RSV-G CX3C表位的纳米颗粒免疫小鼠保护其免受活RSV的攻击。有趣的是,RSV-M2表位不提供针对活RSV攻击的保护,与单独的RSV-G相比,RSV-G和RSV-M2组合疫苗不提供增强的保护。不受理论的约束,认为在这些实验中所使用的高浓度纳米颗粒可能掩盖了组合纳米颗粒的潜在益处。

[0038] 在一个实施方案中,多层膜沉积(deposit)在核心颗粒上,例如CaCO₃纳米颗粒、胶乳颗粒或铁颗粒。具有直径为5纳米(nm)至50微米(μ m)左右的大小的颗粒尤其有用。也可以使用由其他材料制作的颗粒作为核心,前提是它们是生物相容的,具有可控制的大小分布,并且具有足以结合聚电解质肽的表面电荷(无论正或负)。实例包括由例如以下的材料制作

的纳米颗粒和微颗粒:聚乳酸(PLA)、聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乙二醇(PEG)、壳聚糖、透明质酸、明胶或其组合。核心颗粒还可以由被认为不适于在人类使用的材料制作,前提是它们可在膜制作后被溶解并且与多层膜分离。模板核心物质的例子包括有机聚合物如胶乳或无机材料如硅石。

[0039] 聚电解质多层膜是由带相反电荷的聚电解质的交替层构成的薄膜(例如,几纳米至微米厚)。这些膜可以通过在合适底物上通过层层组装(layer-by-layer assembly)形成。在静电层层自组装(“ELBL”)中,聚电解质结合的物理基础是静电引力。因为在连续膜沉积时膜表面电荷密度的符号转变,所以膜的构建是可行的。ELBL膜方法的通用性和相对简便性允许很多不同类型的聚电解质沉积在很多不同类型的表面上。多肽多层膜是聚电解质多层膜的亚类型,其包含至少一层这样的层,所述层包含带电多肽(在本文称作经设计的多肽)。与由其他聚合物制作的膜相比,多肽多层膜的主要优点是其生物相容性。ELBL膜也可以用于封装(encapsulation)。多肽膜和微囊的应用包括,例如纳米反应器、生物传感器、人造细胞和药物递送载体。

[0040] 术语“聚电解质”包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子和聚阴离子材料。合适的聚阳离子材料包括例如多肽和聚胺。聚胺包括例如:多肽如聚L-赖氨酸(PLL)或聚L-鸟氨酸、聚乙烯胺、聚(氨基苯乙烯)、聚(氨基丙烯酸酯)、聚(N-甲基氨基丙烯酸酯)、聚(N-乙基氨基丙烯酸酯)、聚(N,N-二甲基氨基丙烯酸酯)、聚(N,N-二乙基氨基丙烯酸酯)、聚(氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N-甲基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N-乙基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N,N-二甲基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N,N-二乙基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(乙烯亚胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(N,N,N-三甲基氨基丙烯酸酯氯)(poly(N,N,N-trimethylaminoacrylate chloride))、聚(甲基丙烯酰胺基丙基三甲基氯化铵)、壳聚糖以及包含一种或更多种上述聚阳离子材料的组合。合适的聚阴离子材料包括例如:多肽如聚L-谷氨酸(PGA)和聚L-天冬氨酸、核酸如DNA和RNA、藻酸盐、角叉菜胶(carageenan)、帚叉藻胶(furcellaran)、果胶、黄原胶、透明质酸、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸葡聚糖、聚(甲基)丙烯酸、氧化纤维素、羧甲基纤维素、酸性多糖和交联羧甲纤维素(croscarmelose),包含悬垂(pendant)羧基的共聚物和合成聚合物,以及包含一种或更多种上述聚阴离子材料的组合。在一个实施方案中,RSV表位和聚电解质具有相同的电荷符号。

[0041] 在一个实施方案中,膜的一个或更多个聚电解质层(任选地包括包含RSV表位的聚电解质)为经设计的多肽。在一个实施方案中,适于静电层层沉积的多肽的设计原理在美国专利公开No.2005/0069950中说明,其关于多肽多层膜的教导通过引用并入本文。简单来说,主要设计考虑为多肽的长度和电荷。静电是最重要的设计考虑,因为它是ELBL的基础。没有合适的电荷性质,多肽可能无法基本溶解在pH4至10的水溶液中,也无法容易地用于通过ELBL制造多层膜。其他设计考虑包括多肽的物理结构、由多肽形成的膜的物理稳定性,以及膜和组分多肽的生物相容性和生物活性。

[0042] 经设计的多肽是指带有的电荷足以与带相反电荷的表面稳定结合的多肽,即,可以沉积成多层膜的层的多肽,其中形成膜的驱动力是静电作用。短期稳定膜是指形成后在PBS中于37°C孵育24小时后保留其一半以上成分的膜。在一些具体实施方案中,经设计的多肽的长度为至少15个氨基酸,在pH7.0多肽每残基的静电荷的大小大于或等于0.1、0.2、

0.3、0.4或0.5。在pH 7.0下带正电荷(碱性)的天然氨基酸为精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、鸟氨酸(Orn)和赖氨酸(Lys)。在pH 7.0下带负电荷(酸性)的天然氨基酸为谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)。也可以使用带相反电荷的氨基酸残基的混合,只要电荷的总的净比率满足特定标准。在一个实施方案中,经设计的多肽不是同聚物。在另一实施方案中,经设计的多肽无支链。

[0043] 一个设计考虑是多肽ELBL膜稳定性的控制。离子键、氢键、范德华相互作用和疏水相互作用促进多层膜的稳定。此外,在同一层或相邻层内多肽含巯基氨基酸之间形成的共价二硫键可以增加结构强度。含巯基氨基酸包括半胱氨酸和高半胱氨酸,这些残基可以容易地整合入合成的经设计多肽中。此外,可以利用文献中充分描述的方法将巯基整合进聚电解质同聚物如聚L-赖氨酸或聚L-谷氨酸中。通过改变氧化电势,含巯基氨基酸可被用于“锁”(结合在一起)和“解锁”多层多肽膜的层。此外,在经设计的多肽中整合含巯基氨基酸使得通过在分子间形成二硫键来在薄膜制造中使用相对短的肽。

[0044] 在一个实施方案中,在还原剂的存在下通过ELBL组装经设计的含巯基多肽(无论是化学合成的还是在宿主生物中产生的)以防止过早形成二硫键。在膜组装之后,去除还原剂并且加入氧化剂。在氧化剂的存在下巯基间形成二硫键,由此在硫醇基存在处将层内和层间的多肽“锁”在一起。合适的还原剂包括二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇(BME)、还原型谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)以及多于一种这些化学物的组合。合适的氧化剂包括氧化型谷胱甘肽、叔丁基过氧化氢(t-BHP)、硫柳汞、二酰胺、5,5'-二硫代-双(2-硝基-苯甲酸)(DTNB)、4,4'-二硫代二吡啶、溴酸钠、过氧化氢、连四硫酸钠、porphyrindin、sodium orthoiodosobenzoate以及多于一种这些化学物的组合。

[0045] 作为二硫键的代替物,也可以使用产生其他共价键的化学成分来稳定ELBL膜。对于由多肽构成的膜,产生酰胺键的化学成分尤其有用。在合适偶联剂的存在下,酸性氨基酸(侧链包含羧酸基团的氨基酸,例如天冬氨酸和谷氨酸)将与侧链包含氨基的氨基酸(例如赖氨酸和鸟氨酸)反应形成酰胺键。在生物条件下酰胺键比二硫键更稳定,并且酰胺键不进行交换反应(exchange reaction)。可以使用很多试剂来活化多肽侧链以进行酰胺结合。碳二亚胺试剂(如水溶性1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC))在弱酸性pH下与天冬氨酸或谷氨酸反应形成中间产物,所述中间产物与氨基不可逆反应形成酰胺键。经常向反应中加入添加剂如N-羟基琥珀酰亚胺以加快形成酰胺的速率和效率。反应之后,通过离心和抽吸从纳米颗粒或微颗粒中除去可溶性试剂。其他偶联剂的例子包括二异丙基碳二亚胺、HBTU、HATU、HCTU、TBTU和PyBOP。其他添加剂的例子包括磺基-N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑和1-羟基-7-氮杂-苯并三唑。可以通过调节偶联剂的化学计量、反应时间或反应温度来控制酰胺交联的程度,并且可以通过例如傅里叶变换红外光谱(FT-IR)对其进行监测。

[0046] 共价交联的ELBL膜具有期望的性质,例如增加的稳定性。较高的稳定性允许在纳米颗粒、微颗粒、纳米囊、或微囊的制造中使用更加严酷的条件。严酷条件的例子包括高温、低温、制冷温度、高离心速度、高盐缓冲液、高pH缓冲液、低pH缓冲液、过滤和长期储存。

[0047] 制作聚电解质多层膜的一种方法包括在基底上沉积带相反电荷的化学物质的多个层。在一个实施方案中,至少一个层包含经设计的多肽。连续沉积的聚电解质具有相反的静电荷。在一个实施方案中,聚电解质的沉积包括将基底暴露于包含聚电解质的水溶液,其

pH使聚电解质带有适于ELBL的静电荷。在另一些实施方案中,聚电解质在基底上的沉积通过连续喷洒带相反电荷的多肽的溶液来实现。而在另一些实施方案中,在基底上的沉积通过同时喷洒带相反电荷的聚电解质的溶液来实现。

[0048] 在形成多层膜的ELBL方法中,相邻层的相反电荷为组装提供驱动力。相对层中聚电解质是否带有相同的净线性电荷密度并不关键,只要相对层带有相反电荷即可。一种通过沉积作用进行的标准模组装程序包括在聚离子电离的pH(即,pH4-10)下形成聚离子的水溶液,提供具有表面电荷的基底,将基底交替浸没在带电的聚电解质溶液中。任选地,在交替层的沉积之间洗涤基底。

[0049] 本领域一般技术人员可以容易确定适于聚电解质沉积的聚电解质浓度。一个示例性浓度为0.1至10mg/mL。对于典型的非多肽聚电解质如聚(丙烯酸)和聚(烯丙胺盐酸盐),典型的层厚度为约3至约5 Å,这取决于溶液的离子强度。短的聚电解质通常比长的聚电解质形成更厚的层。就膜厚度而言,聚电解质膜的厚度取决于水分含量以及膜的层数和组成。例如,在用氮气干燥后,PLL/PGA膜的厚度由50nm缩至1.6nm。一般而言,根据膜的水化状态和组装中所使用的聚电解质的分子量,可以形成厚度为1nm至100nm或更厚的膜。

[0050] 此外,形成稳定聚电解质多层膜所需的层数取决于膜中的聚电解质。对于仅包含低分子量多肽层的膜,膜通常具有4个以上的带相反电荷之多肽形成的双层。对于包含高分子量聚电解质如聚(丙烯酸)和聚(烯丙胺盐酸盐)的膜,包含单个带相反电荷之聚电解质形成的双层的膜可以是稳定的。研究表明聚电解质膜是动态的。包含在膜内的聚电解质可以在层间迁移,并且当悬浮在聚电解质溶液中时,可以与带相同电荷的可溶性聚电解质交换。此外,响应于环境(如温度、pH、离子强度或缓冲悬液的氧化电势)的改变,聚电解质膜可以分解或溶解。因此一些聚电解质并且尤其是肽聚电解质表现出瞬时稳定性。可以这样来监测肽聚电解质膜的稳定性:在受控条件下将膜悬浮在合适的缓冲液中一段固定时间,然后利用合适的测定如氨基酸分析、HPLC测定或荧光测定来测量膜内肽的量。肽聚电解质膜在其作为疫苗储存和使用相关的条件下最稳定,例如在中性缓冲液和在环境温度如4°C至37°C下。在这些条件下,稳定的肽聚电解质膜将其大多数组分肽保留至少24小时,通常多至14天及以上。

[0051] 在一个实施方案中,经设计的多肽包含与一种或更多种RSV表位共价连接的一个或更多个表面吸附区域,其中经设计的多肽和所述一个或更多个表面吸附区域具有相同的电荷符号,即均带总体正电荷或负电荷。本文所使用的表面吸附区域是经设计的多肽的带电区域,其有利地提供足够电荷以使例如包含来自RSV之表位的肽可以沉积为多层膜。在一个实施例中,所述一个或更多个表面吸附区域与所述一种或更多种RSV表位具有相同的净极性。在另一实施方案中,经设计的多肽在pH4至10的溶解度大于或等于约0.1mg/mL。在另一实施方案中,经设计的多肽在pH4至10的溶解度大于或等于约1mg/mL。溶解度是促使多肽从水溶液中沉积的实际限制。抗原多肽的聚合的程度的实际上限为约1,000个残基。但是可以想象,通过合适的合成方法可以得到较长的合成多肽。

[0052] 在一个实施方案中,经设计的多肽包含侧翼为两个表面吸附区域(一个N末端表面吸附区域和一个C末端表面吸附区域)的单个抗原性RSV表位。在另一实施方案中,经设计的多肽包含侧翼为一个表面吸附区域(与RSV表位之N末端相连)的单个抗原性RSV表位。另一实施方案中,经设计的多肽包含侧翼为一个表面吸附区域(与RSV表位的C末端相连)的单个

抗原性RSV表位。

[0053] 经设计的多肽的各独立区域(例如,RSV表位和表面吸附区域)可以通过溶液相肽合成、固相肽合成或合适宿主生物的遗传工程来分别合成。溶液相肽合成是用于生产目前市场上大多数经批准肽药物的方法。可以使用溶液相方法和固相方法的组合来合成相对长的肽,甚至是小蛋白质。在付费服务的基础上,肽合成公司具有合成复杂肽的专长和经验。在优良制造规范(GMP)条件下以及适于临床试验和发售药物的规模下进行合成。

[0054] 或者,可以通过溶液相肽合成、固相肽合成或合适宿主生物的遗传工程将多个独立区域作为单个多肽链一起合成。在任何特定情况下方法的选择将考虑方便或经济。

[0055] 如果将多个RSV表位和表面吸附区域分开合成,那么一旦通过如离子交换色谱或高效液相色谱法纯化,它们就通过肽键合成结合。即,表面吸附区域的N末端与RSV表位的C末端共价结合以产生经设计的多肽。或者,表面吸附区域的C末端与RSV表位的N末端共价结合以产生经设计的多肽。单个片段可以通过固相方法合成,并且作为完全保护、完全未保护或部分保护的区段获得。这些区段可以在溶液相反应或固相反应中共价结合。如果一个多肽片段包含半胱氨酸作为其N末端残基,而另一多肽片段包含硫酯或硫酯前体作为其C末端残基,那么这两个片段将在溶液中通过公知(对于本领域技术人员)为Native Ligation的特定反应自发连接。对于经设计的肽的合成来说,Native Ligation是特别具有吸引力的选择,因为其可以在水溶液以及稀浓度下用完全去保护或部分保护的肽片段进行。

[0056] 在一个实施方案中,RSV表位和/或表面吸附区域通过肽或非肽连接(美国专利No.7,723,294所述,对于使用非肽连接来将多层膜中所使用的多肽区段连接的教导通过引用并入本文)结合。合适的非肽接头包括例如烷基接头,如-NH-(CH₂)_s-C(0)-,其中s=2至20。烷基接头任选地被非空间位阻基团如低级烷基(例如,C₁-C₆)、低级酰基、卤素(例如,Cl、Br)、CN、CN₂、苯基等取代。另外的示例性非肽接头为聚乙二醇接头,如-NH-(CH₂-CH₂-O)_n-C(0)-,其中n使接头的分子量为100至5000Da,尤其地为100至500Da。本文所述的很多接头可以适用于固相肽合成的形式从商业渠道得到。

[0057] 在一个实施方案中,来自RSV的一种或更多种多肽表位通过共价键共价连接在一种或更多种聚电解质上,如多肽或其他聚电解质。合适的共价键的例子包括酰胺、酯、醚、硫醚和二硫键。本领域技术人员可以利用存在于表位肽中的一系列官能团来将键改造成合适的电解物。例如,可以表位肽中的羧酸位于C末端或者氨基酸天冬氨酸或谷氨酸的侧链上。可以利用合适的肽偶联剂如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)活化羧酸,来与肽聚电解质如聚L-赖氨酸中的伯胺或仲胺反应。所得酰胺键在环境条件下是稳定的。与之不同地,可以利用EDC活化肽聚电解质中的酸性基团来与表位肽中的胺基反应。在表位肽的N末端或赖氨酸残基的侧链上可能存在可用的胺基。

[0058] 表位肽也可以通过二硫键连接在聚电解质上。可以将聚电解质如PGA或PLL进行化学修饰,以使得其一部分侧链包含巯基。在合适氧化剂的存在下,这些巯基与包含在表位肽中的半胱氨酸残基的巯基反应。半胱氨酸可以是来自病原体(如RSV)蛋白质序列的本源半胱氨酸,或者可以是在肽合成过程中有意引入表位中的非本源半胱氨酸。合适的氧化剂包括DTNB、2,2'-二巯基吡啶、过氧化氢、胱氨酸和氧化型谷胱甘肽。表位肽通过二硫键与聚电解质连接尤其有用。二硫化物在制造和储存膜的正常条件下是稳定的,但是容易被细胞中天然存在的还原剂切割,释放用于免疫过程的表位肽。

[0059] 表位肽也可以通过硫醚键连接在聚电解质上。合成的表位肽可以利用合适亲电子试剂如卤代乙酰基基团(其特异地与巯基反应)合成。例如,在N末端包含氯乙酰基的表位肽将与具有巯基的聚电解质如上述PGA-SH形成稳定的键。

[0060] 表位肽还可以通过双功能接头分子共价连接在聚电解质上。双功能接头通常包含两个亲电子基团,其可以与表位肽或聚电解质分子上存在的亲核基团反应。市售的有两类接头分子,同型双功能接头和异型双功能接头。同型双功能接头含有由不反应间隔物连接的两拷贝亲电子基团。亲电子基团通常是与亲核胺反应的活性酯,如N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯或磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(磺基NHS)。同型双功能NHS酯的例子包括双(磺基琥珀酰亚胺)辛二酸酯、二琥珀酰亚胺戊二酸酯、二硫代双(琥珀酰亚胺)丙酸酯、二琥珀酰亚胺辛二酸酯、二琥珀酰亚胺酒石酸酯。有时亲电子基是醛基,其与表位和聚电解质分子上的亲核胺形成亚胺。亚胺键是短暂稳定的,但是可以利用还原剂如硼氢化钠或催化氢化作用转换成稳定结构。最经常使用的同型双功能醛接头是戊二醛。

[0061] 另一些经常使用的同型双功能接头包含与亲核硫醇特异反应的亲电子基,其可以用于连接含半胱氨酸的表位肽和上述含巯基的聚电解质。巯基特异的同型双功能接头的例子包括1,4-双马来酰亚胺丁烷、1,4双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷、v双马来酰亚胺己烷(vbismaleimidohexane)、双马来酰亚胺乙烷、1,4-二-[3'-(2'-吡啶二硫代)-丙酰胺基]丁烷、二硫代-双马来酰亚胺乙烷、1,6-己烷-双-乙烯基砜。

[0062] 异型双功能团类交联剂的成员含有与底物分子中不同官能团特异反应的两个不同反应基团,其通常是但并不总是亲电子的。包含对巯基特异的一个亲电子基和对胺特异的另一个亲电子基的接头特别有用。这些试剂的例子包括:N-[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯、N-[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸琥珀酰亚胺酯、3-[溴乙酰胺]丙酸琥珀酰亚胺酯、N-碘乙酸琥珀酰亚胺酯、4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯、4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、([N-e-马来酰亚胺己酰基氧]磺基琥珀酰亚胺酯、m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、N-3-(2-吡啶二硫)-丙酸琥珀酰亚胺酯、6-(3-[2-吡啶二硫]-丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯、4-琥珀酰亚胺氧羰基-甲基-a-[2-吡啶二硫]甲苯。

[0063] 通常存在于表位肽和聚电解质二者中或可以容易地安装在两种分子上的大量官能团使得能够选择最适于目标底物的连接策略。一个可能的例子是将包含半胱氨酸的表位肽与PLL连接。

[0064] 根据非肽接头的化学性质,多肽区段可以通过多种方式连接。例如,第一多肽区段的N末端与第二多肽区段的C末端连接;第一多肽区段的N末端与第二多肽区段的N末端连接;第一多肽区段的C末端与第二多肽区段的C末端连接;第一多肽区段的C末端与第二多肽区段的N末端连接;第一多肽区段的C末端或N末端与第二多肽区段的悬垂侧链连接;或第二多肽区段的C末端或N末端与第一多肽区段的悬垂侧链连接。但是,无论连接点为何,第一和第二区段都通过非肽接头连接。

[0065] 在一个实施方案中,经设计的多肽为一个或更多个表面吸附区域与一个或更多个RSV表位共价连接的独特组合。RSV表位的长度没有特别限制,其可以是线性表位或构象表位。表位可以包含约3个氨基酸残基至复杂构象表位的数百个氨基酸残基。

[0066] 在一个实施方案中,经设计的多肽包含一个RSV表位和一个表面吸附区域。在另一

实施方案中,经设计的多肽包含一个RSV表位和两个表面吸附区域,它们一个连接在RSV表位的N末端,一个连接在RSV的C末端。表面吸附区域的目的是使多肽能够吸附在带相反电荷的表面上,以便构建多层膜。

[0067] 经设计的多肽中表面吸附区域的数量相对于RSV表位的数量和/或长度与对溶解度的要求有关。例如,如果RSV表位是短氨基酸序列,例如三个氨基酸残基,那么仅需要一个至少8个氨基酸残基的表面吸附区域以将经设计的多肽吸附在合适的带电表面上。与之不同的是,如果RSV表位是包含例如120个氨基酸残基的蛋白质可溶折叠结构域,那么可能需要两个表面吸附区域以赋予经设计的多肽足以在水中溶解并适于吸附的电荷。表面吸附区域可以邻接并且位于结构域的N末端;邻接并且位于结构域的C末端;或不邻接,其中一个位于N末端,一个位于C末端。此外,RSV表位可在其天然序列中包含带电区段(带负电或带正电),其可以作为表面吸附区域。

[0068] 多肽或抗原可含有一个或更多个特有的抗原决定簇。抗原决定簇可指多链蛋白质的免疫原性部分。

[0069] 用于确定特定抗体的抗原决定簇或表位的位置和组成成分的方法和技术在本领域是公知的。可以使用这些技术来鉴定和/或表征用作RSV表位的表位。在一个实施方案中,抗原特异性抗体的表位的作图/表征方法可以通过对抗原蛋白质中暴露的氨基/羧基的化学修饰使用表位“足迹(foot-printing)”来确定。这种足迹技术的一个例子是使用HXMS(通过质谱检测的氢-氘交换),其中发生受体与配体蛋白质酰胺质子的氢/氘交换、结合和反交换,其中参与蛋白质结合的骨架酰胺基被保护而不进行反交换,因此将保持氘化。这时可以通过胃蛋白酶蛋白水解、快速微高效液相色谱分离(fast microbore high-performance liquid chromatography separation)和/或电喷雾电离质谱来确定相关区域。

[0070] 在另一实施方案中,合适的表位鉴定技术是核磁共振表位作图(NMR),其中通常将游离抗原和与抗原结合肽(如抗体)结合之抗原的二维NMR谱中信号的位置进行比较。抗原通常选择性地用¹⁵N进行同位素标记,以使得在NMR谱中仅看到与抗原对应的信号,而不会看到来自抗原结合肽的信号。与游离抗原的谱相比,复合物的谱中来自参与抗原结合肽相互作用之氨基酸的抗原信号通常移位,这样可以鉴定参与结合的氨基酸。

[0071] 在另一实施方案中,可通过肽扫描完成表位作图/表征。在该方法中,制备跨抗原多肽链全长的一系列重叠肽,并且单独测定其免疫原性。通过标准方法如酶联免疫吸附测定确定相应肽抗原的抗体效价。然后可以将多种肽根据免疫原性进行分级,提供用于疫苗开发的肽设计物的选择的经验性基础。

[0072] 在另一实施方案中,在表位作图和鉴定方面也可以使用蛋白酶消化技术。可以通过蛋白酶消化来确定抗原决定簇相关区域/序列,例如,在37℃、pH7-8下使用胰蛋白酶(与抗原蛋白质的比率为约1:50)消化过夜(0/N),之后进行质谱(MS)分析来鉴定肽。随后可通过将经过胰蛋白酶消化的样品与同CD38BP一起孵育然后进行如胰蛋白酶消化(借此暴露连接物的足印)的样品进行比较,来鉴定被抗原蛋白质保护而未被胰蛋白酶切割的肽。在类似的表位表征方法中,还可以使用或替代性使用其他酶,如胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等。此外,蛋白酶消化可以提供这样的快速方法,其利用已知抗体来确定已知抗原蛋白质中潜在的抗原决定簇序列的位置。在另一实施方案中,蛋白酶消化技术也可用于表位作图和鉴定中。

[0073] 本文还公开了免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含含有两层或更多层聚电

解质的多层膜,其中相邻层包含带相反电荷的聚电解质,其中一层包含RSV表位。任选地,所述免疫原性组合物还包含一层或更多层含有经设计之多肽的层。

[0074] 在一个实施方案中,免疫原性组合物包含在相同或不同的聚电解质(如经设计的多肽)上的多种RSV表位。多种抗原决定簇可以来自相同或不同的感染原。在一个实施方案中,免疫原性组合物包含多种独特的抗原性聚电解质。在另一实施方案中,免疫原性组合物包含多种免疫原性聚电解质,在每种聚电解质中含有多种RSV表位。这些免疫原性组合物的一个优点是可以在单个合成的疫苗颗粒中存在多种抗原决定簇或单个线性抗原决定簇的多种构型。这种具有多种抗原决定簇的组合物可以潜在地产生针对多种表位的抗体,增加了例如以下的机会,即至少一些机体免疫系统产生的抗体将中和病原体或癌细胞上的目的特异抗原。

[0075] 免疫原性组合物的免疫原性可以通过多种方式增强。在一个实施方案中,多层膜任选的包含一种或更多种额外的免疫原性生物活性分子。尽管非必需,但是所述一种或更多种额外的免疫原性生物活性分子通常包含一种或更多种额外的抗原决定簇。合适的额外的免疫原性生物活性分子包括例如:药物、蛋白质、寡核苷酸、核酸、脂质、磷脂、碳水化合物、多糖、脂多糖、低分子量免疫刺激分子或包含一种或更多种上述生物活性分子的组合。另一些类型的额外的免疫增强剂包括功能性膜片段、膜结构、病毒、病原体、细胞、细胞聚集体、细胞器或包含一种或更多种上述生物活性结构的组合。

[0076] 在一个实施方案中,多层膜任选包含一种或更多种额外的生物活性分子。所述一种或更多种额外的生物活性分子可以是药物。或者,免疫原性组合物是空心壳或围绕核心的包衣的形式。核心包含多种不同的囊,例如一种或更多种额外生物活性分子(包括如药物)。因此,如本文所述设计的免疫原性组合物还可以被用于联合治疗,如引发免疫应答和用于靶向药物递送。可以将“结晶”形式的合适治疗物质的微米大小的“核心”用包含抗原性多肽的免疫原性组合物包封,并且所得微囊可用于药物递送。在一些条件下核心可以是不可溶的,如高pH或低温,而在发生受控释放的条件下可溶。可以通过ζ电势测量来确定(用于确定液体介质中胶体颗粒上静电单位的电量)晶体上的表面电荷。微囊内含物从微囊内释放到周围环境中的速率取决于多个因素,包括包封壳的厚度、壳中所使用的抗原性多肽、二硫键的存在、肽的交联程度、温度、离子强度和组装肽所使用的方法。一般而言,囊越厚,释放时间越长。

[0077] 在另一实施方案中,额外的免疫原性生物分子是能够指导宿主生物合成期望免疫原或干扰病原体遗传信息表达的核酸序列。在前一种情况下,该核酸序列被例如利用本领域技术人员已知的方法插入到合适的表达载体中。适于在体内产生高效基因转移的表达载体包括逆转录病毒、腺病毒和牛痘病毒载体。这些表达载体的操作元件包括至少一个启动子、至少一个操纵子、至少一个前导序列、至少一个终止密码子以及对于载体核酸的正确转录和随后的翻译必需或优选的任何其他DNA序列。特别地,考虑到这种载体将包含至少一个被宿主生物识别的复制起点,以及至少一个可选择标记和至少一个能够启动核苷酸序列转录的启动子序列。在后一种情况下,制备这种核苷酸序列的多个拷贝用于递送,例如以用于静脉内递送的囊形式将核酸包封在多肽多层膜中。

[0078] 在重组表达载体的构建中,另外应当注意的是多拷贝的目的核酸序列及其附带的操作元件可插入到各载体中。在这样的一个实施方案中,对于每个载体宿主生物将产生更

多量的期望蛋白质。可插入载体中的多拷贝核酸序列的数量仅受所得载体向合适的宿主微生物中转移以及在其中复制和转录的能力(由于其大小)的限制。

[0079] 在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含抗原性聚电解质/免疫原性生物活性分子的混合物。这些可来源于同一抗原,它们可以是来自同一感染源或疾病的不同抗原,或者它们可来自不同的感染源或疾病。因此,复合物或混合物将引起针对若干抗原并且也可能是若干感染源或疾病(由递送系统的抗原性肽/蛋白质成分确定)的免疫应答。

[0080] 在一个实施方案中,多层膜/免疫原性组合物引起免疫系统针对病原体的应答。在一个实施方案中,疫苗组合物包含与可药用载体组合的免疫原性组合物。因此对抗病原性疾病的疫苗接种方法包括向需要疫苗接种的对象施用有效量的免疫原性组合物。

[0081] 可药用载体包括但不限于:大的代谢缓慢的大分子如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物、灭活病毒颗粒等。也可以在组合物中使用可药用盐,例如矿物盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐或硫酸盐,以及有机酸盐如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐或苯甲酸盐。组合物还可以包含液体,例如水、盐水、甘油和乙醇,以及例如润湿剂、乳化剂或pH缓冲剂的物质。也可以使用脂质体作为载体。

[0082] 在脊椎动物中引起针对疾病或病原体的免疫应答的方法(例如,接种疫苗)包括施用包含多层膜的免疫原性组合物,所述多层膜包含RSV表位。在一个实施方案中,包含RSV表位的聚电解质在多层膜的最外层或溶剂暴露层。免疫原性组合物可以经口、鼻内、静脉内、肌内、皮下、腹膜内、舌下、皮内、肺部或经皮施用,使用或不使用加强剂量。一般而言,组合物以与药物制剂相容的方式、以预防和/或治疗有效的量施用。免疫原性组合物的精确施用量取决于从业者的判断,对于每个对象可以是独特的。对于本领域技术人员很明显的是:免疫原性组合物的治疗有效量尤其取决于施用时间、所施用抗原的单位剂量、组合物是否与其他治疗剂联合施用以及接受者的免疫状态和健康状况。如本领域熟知的,治疗有效剂量可以由一般医学工作者根据患者的特征(年龄、体重、性别、病症、并发症、其他疾病等)来确定。此外,随着进一步进行常规研究,关于治疗不同患者的不同病症的合适剂量水平的更详细信息将出现,一般技术人员在考虑接受者的治疗背景、年龄和一般健康状况的基础上能够确定合适的剂量。

[0083] 免疫原性组合物任选包含佐剂。佐剂一般包括以非特异方式加强宿主免疫应答的物质。佐剂的选择取决于待接种的对象。优选地,使用可药用佐剂。例如,人疫苗应当避免油或烃乳剂佐剂,包括完全或不完全的弗氏佐剂。适于人类使用的佐剂的一个例子是明矾(氧化铝胶)。但是,用于动物的疫苗可以含有不适于人类使用的佐剂。

[0084] 考虑到可以通过提呈能够引起免疫应答的任何蛋白质或肽来引起免疫应答。在一个实施方案中,抗原是关键表位,其引起针对特定感染性病源的强免疫应答,即免疫显性表位。如果期望,可以在免疫原性组合物中包含多于一种的抗原或表位,以便增加免疫应答的可能性。

[0085] 在一个实施方案中,在ELBL膜中整合了多种RSV表位或蛋白质表位。可以在单个经设计的肽分子中合成或表达独立的表位。预期将多种表位置于单个经设计的肽中具有一些优点。例如,简化ELBL制造过程并增加再现性。此外,将多种表位置于单个经设计的肽中将使不同表位的摩尔比锁定在期望比率,例如1:1。

[0086] 或者,可以将表位整合进不同的经设计的肽中。在一个或更多个成层步骤中将经

设计的肽组合进ELBL膜。使用多种不同经设计的肽制造膜也可具有一些优点。可简化经设计的肽合成并降低成本。还使膜内的每种经设计的肽的相对剂量不同并且被优化。例如,如果临床前或临床生物数据表明最佳疫苗应当包含五拷贝的一种表位与一拷贝第二表位(5:1比率),那么表位分开的经设计的肽方式将有利于这种疫苗的制造。

[0087] 通过经设计的肽的带电表面吸附区域与带相反电荷的膜表面之间的静电引力,经设计的肽吸附在ELBL膜的表面。吸附效率主要取决于表面吸附区域的组成。因此具有不同表位但是表面吸附区域相似的经设计的肽将具有相似的吸附效率。为了制造具有两种不同经设计的肽并且每种摩尔比为1:1的膜,可以以该摩尔比将肽混合,并且将其同时沉积在特定层上。或者,可以单独将各个肽沉积在分开的层上。所吸附肽的摩尔比主要反映在整合它们的过程中其成层的相对浓度或成层步骤数上。

[0088] 可以通过多种方式测量整合进ELBL膜的经设计的肽的量。定量氨基酸分析(AAA)特别适于这个目的。通过浓盐酸(6M)处理和加热(通常115°C加热15小时),包含经设计的肽的膜分解成其成分氨基酸。然后使用本领域技术人员公知的色谱技术测量每一种氨基酸的量。可以使用仅存在于一种经设计的肽中的氨基酸作为该肽的示踪物。当经设计的肽没有特有氨基酸时,可以在合成过程中向经设计的肽中整合非天然氨基酸(例如,氨基丁酸或高缬氨酸)。这些示踪氨基酸在AAA试验中很容易被鉴定,并且可用于测定膜中肽的量。

[0089] 本文所使用的特异性T细胞应答是指对目标表位(尤其是本文所公开的RSV表位如RSV-M2表位)特异的应答。特异性T细胞应答可以是细胞毒性T细胞应答或辅助T细胞应答,但是优选细胞毒性T细胞应答。

[0090] 本文所使用的特异性抗体应答是指对目标表位(尤其是本文所公开的RSV表位如RSV-G表位)特异的应答。

[0091] 本文所使用的“层”是指吸附步骤后在例如用于形成膜之模板上的厚度增加物。“多层”是指多个(即两个或更多个)厚度增加物。“聚电解质多层膜”是指包含聚电解质的一个或更多个厚度增加物的膜。在沉积后,多层膜的层可不保持为分别的层。实际上,可以有物质的明显混合,尤其在厚度增加物的交界面。混合的存在与否可以通过分析技术(例如电势测量、X射线光电子分光光谱和飞行时间二次离子质谱)进行监测。

[0092] “氨基酸”是指多肽的构建块。本文所使用的“氨基酸”包括20种常见天然L氨基酸、所有其他的天然氨基酸、所有的非天然氨基酸以及所有的氨基酸模拟物(例如类肽)。

[0093] “天然氨基酸”是指甘氨酸加上20中常见天然L氨基酸,即丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、酪氨酸、色氨酸和脯氨酸。

[0094] “非天然氨基酸”是指非任何20种常见天然L氨基酸的氨基酸。非天然氨基酸可以具有L或D立体化学。

[0095] “类肽”,或N取代的甘氨酸,是对应氨基酸单体的类似物,其具有与对应氨基酸相同的侧链,但是侧链连接在氨基的氮原子上而不是残基的α-碳上。因此,聚合类肽单体之间的化学连接不是肽键,这可以用于限制蛋白水解性消化。

[0096] “氨基酸序列”和“序列”是指多肽链的连续长度,其至少为2个氨基酸残基长。

[0097] “残基”是指聚合物或寡聚物中的氨基酸,它是形成聚合物之氨基酸单体的残基。多肽合成涉及脱水,即,在向多肽链上添加氨基酸时“失去”单个水分子。

[0098] 本文所使用的“肽”和“多肽”都是指通过相邻氨基酸的 α -氨基与 α -羧基之间的肽键彼此相连的一系列氨基酸，并且可包含或不具有修饰，例如糖基化、侧链氧化或磷酸化，前提是这些修饰或缺少修饰不破坏免疫原性。本文所使用的术语“肽”是指肽以及多肽或蛋白质二者。

[0099] “经设计的多肽”是指带有足以与带相反电荷的表面稳定结合的电荷的多肽，即可以沉积成多层膜的层的多肽，其中形成膜的驱动力是静电作用。在一些具体实施方案中，经设计的多肽的长度为至少15个氨基酸，在pH 7.0，多肽每残基的静电荷量大于或等于0.1、0.2、0.3、0.4或0.5。在一个实施方案中，在pH 7.0，相同极性的带电残基数减去相反极性的残基数与多肽中的残基总数的比率大于或等于0.5。换言之，多肽每残基的静电荷量大于或等于0.5。虽然多肽的长度没有绝对上限，但是一般地，适于ELBL沉积的经设计的多肽的实际长度上限为1,000个残基。经设计的多肽可以包含天然序列(如RSV表位)和为肽提供功能的区域，如带电区域(本文也称作表面吸附区域)，其使得经设计的多肽沉积成多肽多层膜。

[0100] “一级结构”是指多肽链中氨基酸的连续线性序列，“二级结构”是指通过非共价相互作用(通常是氢键)来稳定的多肽链的大体规则的结构类型。二级结构的例子包括 α -螺旋、 β -折叠 β -转角。

[0101] “多肽多层膜”是指包含一种或更多种以上定义的经设计的多肽的膜。例如，多肽多层膜包含含有经设计之多肽的第一层和包含聚电解质的第二层，所述聚电解质具有与经设计的多肽极性相反的净电荷。例如，如果第一层具有净正电荷，那么第二层具有净负电荷；如果第一层具有净负电荷，那么第二层具有净正电荷。第二层包含另一经设计的多肽或另一聚电解质。

[0102] “基底(substrate)”是指具有适于从水溶液中吸附聚电解质的表面的固体物质。基底的表面基本上可以具有任何形状，例如平面形、球形、杆形等。基底表面可以是规则的或不规则的。基底可以是晶体。基底可以是生物活性分子。基底的大小为纳米尺度至微米尺度。此外，基底任选地包含若干小的亚颗粒。基底可以由有机材料、无机材料、生物活性材料或其组合制成。基底的非限制性例子包括硅片；带电胶体颗粒如CaCO₃或三聚氰胺甲醛微粒；生物细胞如红细胞、肝细胞、细菌细胞或酵母细胞；有机聚合物晶格如聚苯乙烯或苯乙烯共聚物晶格；脂质体；细胞器；和病毒。在一个实施方案中，基底是医疗设备如人工起搏器、耳蜗植入物或支架。

[0103] 当基底在膜形成中或之后被分解或以另外方式去除，那么就将其称作“模板”(用于膜形成)。可将模板颗粒溶解在合适的溶剂中或通过热处理去除。例如，如果使用部分交联的三聚氰胺甲醛模板颗粒，那么可以通过温和的化学方法如DMSO或通过改变pH值来使模板分解。在模板颗粒溶解后，留下中空的多层壳，其由交替的聚电解质层构成。

[0104] “囊(capsule)”是空心壳或包围核心的包衣层形式的聚电解质膜。核心包括各种不同的被囊(encapsulant)，例如蛋白质、药物或其组合。直径小于约1 μ m的囊称作纳米囊。直径大于约1 μ m的囊称作微囊。

[0105] “交联”是指在两个或更多个分子之间形成共价键，或几个键，或多个键。

[0106] “生物活性分子”是指具有生物作用的分子、大分子或大分子组装物。可以通过合适的测定测量特定的生物作用，并且对每单位重量或每分子生物活性分子进行归一化。可以将生物活性分子包封，保留在聚电解质膜后，或包封在聚电解质膜内。生物活性分子的非

限制性例子有药物、药物晶体、蛋白质、蛋白质的功能片段、蛋白质复合物、脂蛋白、寡肽、寡核苷酸、核酸、核糖体、活性治疗剂、磷脂、多糖、脂多糖。本文所使用的“生物活性分子”还包括生物活性结构,例如功能性膜片段、膜结构、病毒、病原体、细胞、细胞聚集体和细胞器。可以封装于多肽膜中或保留在多肽膜后的蛋白质的例子有血红蛋白;酶,例如葡萄糖氧化酶、尿素酶和溶菌酶等;细胞外基质蛋白质,例如纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白;以及抗体。可以封装在多肽膜内或保留在多肽膜后的细胞的例子有移植的胰岛细胞、真核细胞、细菌细胞、植物细胞和酵母细胞。

[0107] “生物相容性”是指经口摄取、表面施用、经皮施用、皮下注射、肌内注射、吸入、植入或静脉内注射后基本不引起不利的健康作用。例如,生物相容性膜包括与例如人的免疫系统接触后基本不引起免疫应答的膜。

[0108] “免疫应答”是指针对身体任何地方出现的物质的细胞或体液免疫系统的应答。免疫应答可以通过很多方式表征,例如血流中识别特定抗原之抗体的数量的增加。抗体是由B细胞分泌的蛋白质,免疫原是引起免疫应答的实体。人类机体通过增加血流和其他部位的抗体数量来与感染斗争并且抑制再感染。

[0109] “抗原”是指当引入到易感脊椎动物生物的组织后,引起免疫应答(例如,产生特异性抗体分子)的外源物质。抗原包含一个或更多个表位。抗原可以是纯的物质、物质的混合物(包括细胞和细胞片段)。术语抗原包括适当的抗原决定簇、自体抗原(auto-antigen)、自身抗原(self-antigen)、交叉反应抗原、异体抗原、耐受原(tolerogen)、变应原、半抗原和免疫原,或其一部分,以及其组合,并且这些术语可互换使用。抗原一般具有高分子量,并且一般为多肽。引起强免疫应答的抗原被称为强免疫原性。抗原上互补抗体可以特异性结合的位点称作表位或抗原决定簇。

[0110] “抗原性”是指组合物引起特异性针对组合物的抗体或引起细胞介导的免疫应答的能力。

[0111] 本文所使用的术语“表位”和“抗原决定簇”可互换使用,是指被抗体识别的抗原(如蛋白质或经设计的肽)结构或序列。通常表位位于蛋白质表面。“连续表位”是这样的表位,其涉及若干连续氨基酸残基,而不是涉及恰巧接触或位于折叠蛋白质的限定空间区域的氨基酸残基。“构象表位”涉及来自蛋白质线性序列的不同部分且在蛋白质的三维结构中接触的氨基酸残基。为了在抗原和抗体之间发生有效的相互作用,表位必须对于结合有易获得性。因此,表位或抗原决定簇存在于抗原的天然细胞环境,或仅在变性时暴露。在其天然形式中,其可以是细胞质的(可溶性)、膜连接的或分泌的。表位的数量、位置和大小取决于抗体生成过程中存在多少抗原。

[0112] 本文所使用的“疫苗组合物”是指在施用它的哺乳动物中引起免疫应答的组合物,并且其保护被免疫生物在随后不受免疫物质或免疫交叉反应物质的攻击。与未接种生物相比,保护可以完全或部分降低症状或感染。免疫交叉反应物质可以是例如,来自其亚单位肽已经被用作免疫原的全蛋白(例如,葡萄糖基转移酶)。或者,免疫交叉反应物质可以是被免疫物质所引发的抗体全部或部分识别的不同蛋白质。

[0113] 本文所使用的“免疫原性组合物”意于涵盖在施用它的生物中引起免疫应答的组合物,其可以保护或可以不保护被免疫哺乳动物抵抗随后的免疫物质攻击。在一个实施方案中,免疫原性组合物是疫苗组合物。

[0114] 通过以下非限制性实施例来对本发明作进一步描述。

实施例

[0115] 实施例1:经设计的多肽(Designed polypeptide,DP)的合成

[0116] 经设计的多肽来自RSV-G、RSV-F或RSV-M2蛋白质序列中的表位。全长蛋白质的氨基酸序列如下(整合进经设计的多肽的选定肽表位标有下划线)。

[0117] RSV-G-SEQ ID NO:1

1 MSKNKDQRTA KTLERTWDTL NHLLFISSCL YKLNLSVVAQ ITLSILAMII
STSLI~~AA~~II 60
61 FIASANHKVT PTTAIQDAT SQIKNTTPTY LTQNPQLGIS PSNPSEITSQ
ITTILASTTP 120
121 GVVKSTLQSTT VKTKNTTTQ TQPSKPTTKQ RQNKP~~PSKPN~~
NDFHFEVFNF VPCSICSN~~N~~ 180
181 TCWAICKRIP NKKPGKKTTT KPTKKPTLKT TKKDPKPQTT
KSKEVPTTKP TEEPTINTTK 240
241 TNIITLLTS NTTGNPELTS QMETFHSTSS EGNPSPSQVS TTSEYPSQPS
SPPNTPRQ 298

[0119] RSV-F-SEQ ID NO:2

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE 60
61 LSNIKENKCN GTDAKV~~KLIK~~ QELDKYKNAV TELQLLMQST
PPTNNRARRE LPRFMNYTLN 120
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL
EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS 180
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVN~~KQ~~ SCSISNIETV IEFQQKNNRL
LEITREFSVN 240
241 AGVTPVSTY MLTNSELLSL INDM~~P~~ITNDQ KKLMSNNVQI
[0120] VRQQSYSIMS IIKEEV~~LAYV~~ 300
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICL~~TRT~~DRG
WYCDNAGSVS FFPOAETCKV 360
361 QSNRVFCDTM NSLTPSEIN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCY~~GK~~ 420
421 KCTASNKNRG IIKTF~~SNG~~CD YVSNKGMDTV SVGNTLYYVN
KQEGKSLYVK GEPIINFYDP 480
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHN~~VN~~NAGK STTNIM~~ITTI~~
II~~V~~IVILLS 540

541 LIAVG~~LL~~LYC KARSTPV~~TL~~S KDQLSGINNI AFSN

574

[0121] RSV-M-SEQ ID NO:3

1 MSRRNPCKFE IRGHCLNGKR CHFSHNYFEW PPHALLVRQN
FMLNRILKSM DKSIDLSEI 60

61 SGAAELDRTE EYALGVVGVL ESYIGSINNI TKOSACVAMS KLLTELNSDD
[0122] IKKLRDNEEL 120
121 NSPKIRVYNT VISYIESNRK NNKQTIHLLK RLPADVLKKT IKNTLDIHK
ITINNPKEST 180

181 DTNDHAKN NDTT 194

[0123] 利用微波控温的LibertyTM(CEM, Matthews, NC)自动合成器通过分步固相肽合成来合成经设计的肽。利用标准Fmoc氨基酸、HBTU/DIEA活化和常规双偶联将肽合成在Rink Amide或Wang酸聚苯乙烯树脂支持物上。合成之后,将树脂干燥,通过用TFA/三异丙基硅烷/苯酚/3,6-二氧-1,8-辛二硫醇/水(86:4:4:3:3)处理2小时来切割肽。将粗制肽用醚沉淀、离心并真空干燥。将肽用水(0.1%三氟乙酸)/乙腈梯度的C₁₈反向HPLC进行纯化。利用电喷雾质谱(ESMS)确定每种经纯化肽的身份。通过280nm处的紫外吸收和/或氨基酸分析计算最终产率。将肽等分、冻干并且作为三氟乙酸盐储存在-20℃备用。

[0124] 表1示出了来自RSV-G、RSV-F和RSV-M2蛋白质的所选表位。通过添加C末端聚离子尾如Lys₂₀(K₂₀)或Lys-Val-Lys-Ala重复(KVKA)₄将每一表位整合进经设计的肽(DP)。通常整合C末端酪氨酸,以便于通过UV定量。RSV-M2的天然序列包含96位的半胱氨酸。在合成的表位肽中,该残基被丝氨酸(C96S)替换,以避免该位点处不期望的二硫键。

[0125] 表1:所选择RSV表位的序列和特征

名称	表位序列	SEQ ID NO:	说明或描述
G ₁₆₄₋₁₉₈	HFEVFNFVPCSICCSNNPT CWAICKRIPNK	4	含有与炎症相关的趋化因子基序的保守序列
F ₅₁₋₆₅	GWYTSVITIELSNIK	5	引发IFN γ 应答的保守CD4+ (Th1) 表位
F ₃₃₈₋₃₅₄	DRGWYSDNAGSVSFFRG	6	引发IFN γ 应答的保守CD4+ (Th1) 表位
ACT-2019	ESYIGSINNITKQSA	7	M2 ₈₁₋₉₅ ; 表现为调节针对 RSV-G 的Th2应答的CD8+ T-细胞靶标
ACT-2044	HFEVFNFVPCSICCSNNPT CWAICKRIPNKKKKKKKK KKKKKKKKKKKKKKY	8	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y 酰胺
ACT-2054	HFEVFNFVPXSIKSNNPT XWAIXKRIPNKKKKKKKK KKKKKKKKKKKKKKY	9	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y 酰胺 具有加帽的半胱氨酸残基 C* = 甲酰胺基-甲基半胱氨酸
G ₁₇₅₋₁₈₄	cyclo-ICCSNNPTCWA	10	RSV-G ₁₇₅₋₁₈₄
ACT-2042	NFVPCSICCSNNPTCWAIC KRIPNKKKKKKKKKKKK KKKKKKKKY	11	RSV-G ₁₆₉₋₁₉₁ K ₂₁ Y
ACT-2031	ESYIGSINNITKQSASVA KVAKVAKVAKVAKVKA	12	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ 酰胺
ACT-2086	ESYIGSINNITKQSASGS HFEVFNFVPCSICCSNNPT CWAICKRIPNKKKKKKKK KKKKKKKKKKKKY	13	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y 酰胺
ACT-2087	NFVPCSICCSNNPTCWAIC KRIPNKKPGKKTKKKKKK KKKKKKKKKKKKKKY	14	RSV-G ₁₆₉₋₁₉₈ K ₂₀ Y 酰胺
ACT-2088	HFEVFNFVPCSICCSNNPT CWAICKRIPNKKPGKKT KKKKKKKKKKKKKKKK KY	15	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₈ K ₂₀ Y 酰胺

[0126]

名称	表位序列	SEQ ID NO:	说明或描述
[0127] ACT-2033	ESYIGSINNITKQSASVA KKKKKKKKKKKKKKKKKK KKY	16	RSV M2 ₈₁₋₉₈ K ₂₀ Y 酰胺

[0128] 实施例2:含有来自RSV-G蛋白之构象表位的经设计的多肽的折叠和结构确认

[0129] RSV粘附蛋白(RSV-G蛋白)含有4个保守半胱氨酸残基,其在氨基酸169至191之间形成两个内部二硫键。识别该区域的抗体可以中和RSV,因此来自该区段的构象受限的合成肽可以是有效的疫苗组分。之前的研究人员使用蛋白水解消化、HPLC和质谱的组合表明Cys173与Cys186键合,Cys176与Cys182键合。利用固相肽合成合成了含有RSV-G蛋白残基169-191的肽。在中性pH,这些肽易于氧化,而且如通过ESMS谱中丢失四个质子以及E11man's (DTNB) 测定中的负信号所测量的,所得产物表现出含有两个内部二硫键。氧化反应容易发生以及转化的彻底都强烈提示形成了天然二硫键。在一个典型实验中,将还原的RSV-G肽(例如,SEQ ID NO:8、11、13、14、15)以1至5mg/ml的浓度溶解在含有2.5mM谷胱甘肽和2.5mM氧化型谷胱甘肽(glutathiol)的Tris pH 7.4缓冲液中。通过C₁₈反相HPLC将折叠反应监测为氧化产物相对于还原肽向稍更短的停留时间偏移。通过该标准,判断在室温2小时后或4°C18小时后折叠反应完成。

[0130] 利用电喷雾傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS)分析折叠的ACT-2044(RSV-G₁₆₄₋₁₉₁K₂₁Y酰胺)(SEQ ID NO:8)样品。MH₆⁺⁶电荷状态给出了强信号,MH₆⁺⁶峰的放大谱图在图1中示出。质荷比(m/z)为1015.6008的单同位素峰对应于6087.56amu的单同位素质量,其非常接近于6088.51amu的单同位素质量计算值,该结果完全符合于在ACT-2044中存在两个二硫键。同样,利用FT-ICR MS分析折叠的ACT-2086(RSV-M₂₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y酰胺)(SEQ ID NO:13))的样品,谱图在图2中示出。观察到MH₆⁺⁶-MH₁₀⁺¹⁰电荷状态的强峰。MH₉⁺⁹单同位素峰具有对应于7795.344amu的单同位素质量的867.1571的m/z,其非常接近于7795.33amu的单同位素质量计算值。同样,该结果完全符合于两个二硫键的存在。

[0131] 将ACT-2044(RSV-G₁₆₄₋₁₉₁K₂₁Y)(SEQ ID NO:8)样品进行嗜热菌蛋白酶消化。消化物的HPLC分析表明起始肽的完全消耗。该产物的FT-ICR谱含有产物的复杂混合物,但是在m/z 1106.4发现了主要离子。该物质对应于具有分子内二硫键之RSV-G₁₇₅₋₁₈₄(环-ICSNNPTCWA)(SEQ ID NO:10),预计MH⁺质量=1106.440,实测值=1106.438)的MH⁺¹带电状态。该肽为Cys176与Cys182之间的天然二硫键的指示。总之,FT-ICR MS数据强烈支持这样的观点:ACT-2044(和紧密相关的肽ACT-2042(SEQ ID NO:11)、ACT-2086(SEQ ID NO:13)、ACT-2087(SEQ ID NO:14)、ACT-2088(SEQ ID NO:15))以正确(天然)的模式包含两个内部二硫键。

[0132] 实施例3:制备ELBL纳米颗粒的一般程序

[0133] CaCO₃纳米颗粒(NPCC-111)获自NanoMaterials Technology (Singapore)。扫描电子显微镜(SEM)实验表明颗粒具有立方体形态,且直径为约50nm。多肽聚1-赖氨酸15kDa(PLL,目录号P6516)、聚1-谷氨酸14.5kDa(PGA,目录号P4636)和1M HEPES缓冲液(目录号H-3662)获自Sigma-Aldrich(美国)。在连续吸附步骤中,使带相反电荷的多肽在CaCO₃纳米颗粒核心上自组装成多层膜。简单来说,将PLL、PGA或经设计的多肽(称作DP)以1mg/ml(重量/

体积)溶解在10mM HEPES (pH为7.4) 中,并且通过0.22μm滤器过滤。将CaCO₃纳米颗粒核心用无内毒素的水洗涤三次,在微型离心机中以16,000g离心1分钟。将纳米颗粒核心在1mg/ml PGA中重悬成6% (重量/体积) 作为第一层。在中性pH,PGA表现出净负电荷,而CaCO₃颗粒为净正电荷,从而使得发生静电相互作用和第一层的成功沉积。将混合物在室温超声处理10分钟,然后用10mM HEPES缓冲液洗涤两次,在48,700×g离心1分钟(TL-100Ultracentrifuge,Beckman)。对于第二层的沉积,与第一层一样,将纳米颗粒在1mg/ml PLL(带正电荷)中重悬成6% (w/v) 并且在室温超声处理10分钟。如表2或表3所说明的,通过相同方法用PGA、PLL或DP沉积随后的每一层。通常以0.5至1mg/mL的浓度包被经设计的肽。在最后一层沉积后,将纳米颗粒用10mM HEPES (pH7.4) 洗涤两次,将等分试样部分离心(spun down)、吸取并且以湿颗粒储存在4°C直至使用。使用基本相同的程序(改变经设计的多肽的序列和位置)来产生若干设计物;在多肽生物膜中,所有纳米颗粒包含总计八层。纳米颗粒设计物总结在表2中。通过氨基酸分析确定纳米颗粒上的多肽或DP的浓度。纳米颗粒大小通过pH 7.4的HEPES中0.06% (w/v) 悬液的动态光散射来确定,在测量前在超声水浴(Branson 1510,USA)中超声处理20分钟。通过Limulus Amebocyte Lysate测定、终点显色测定 (#50-647U,Lonza,Walkersville,MD) 确定纳米颗粒中的内毒素水平。将所制备的纳米颗粒作为湿颗粒储存在4°C备用。

[0134] 表2:单价纳米颗粒设计物。ACT#指不同纳米颗粒设计物的名称。DP#指不同的经设计的肽。DP序列列出了包含于每个DP中的特异性RSV表位和聚离子尾。

ACT #	层	DP ACT #	DP 序列
1023	PGA/PLL/PGA/RSV-M2/PGA/PLL/PGA/PLL	2031	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
1041	PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/RSV-G	2042	RSV-G ₁₆₉₋₁₉₁ K ₂₁ Y(SEQ ID NO: 11)
1042	PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/RSV-G	2044	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y(SEQ ID NO:8)

[0135] [0136] 实施例4:ELBL纳米颗粒ACT-1077的制备和表征:

[0137] 根据实施例3所述的标准程序。在第二ELBL包被步骤中使用1.0mg/mL的经设计的肽ACT-2031 (RSV-M2₈₁₋₉₈(KVKA)₄ (SEQ ID NO:12)) 的溶液,在第八ELBL步骤中使用1.0mg/mL的经设计的肽ACT-2044 (RSV-G₁₆₄₋₁₉₁K₂₁Y (SEQ ID NO:8)) 的溶液。每一成层步骤后,将纳米颗粒洗涤并且重悬成6%。取出10μL等分试样并且稀释入1.0mL的10mM HEPES缓冲液中,用于表面(ζ)电势分析。图3示出ELBL过程中每一步骤所测量的纳米颗粒的表面ζ电势。在包被之前,CaCO₃颗粒表现出约+28mV的正表面电势。在包被单层PGA后,测量到了-18mV的负表面电势。在第二层包被ACT-2031 (SEQ ID NO:12) 使ζ电势增加至约0mV,表明肽的吸附。之后,每一成层步骤导致ζ电势的负或正移,表明成功的ELBL吸附。制备后,通过来自氨基酸色谱中特有氨基酸的信号计算每一经设计的肽的吸附量。甘氨酸是ACT-2031特有的,可用于确定ACT-2031浓度,而精氨酸、组氨酸和苯丙氨酸是ACT-2044特有的,可用于确定ACT-2044浓度。在4个独立批次中,吸附在1%CaCO₃颗粒悬液上的ACT-2031和ACT-2044的平均量分别为21μg/mL和53μg/mL。

[0138] 实施例5:ELBL纳米颗粒ACT-1086的制备:

[0139] 利用实施例3所述ELBL包被方法将50nm CaCO₃纳米颗粒用七层PGA和PLL包被。最后一层用10mM HEPES缓冲液中的0.5mg/mL经设计的肽ACT-2086 (SEQ ID NO:13; RSV-M2₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y酰胺) 溶液包被。用氨基酸分析测量经设计的肽的吸附量。在3个独立批次中,吸附在1%CaCO₃颗粒悬液上的ACT-2086的平均量为37μg/mL。

[0140] 实施例6:ELBL纳米颗粒ACT-1139的制备:

[0141] 利用实施例3所述ELBL包被方法将50nm CaCO₃纳米颗粒用七层PGA和PLL包被。最后一层用终浓度都为0.25mg/mL的经设计的肽ACT-2033 (SEQ ID NO:16; RSV M2₈₁₋₉₈K₂₀Y酰胺) 和ACT-2044 (SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₁₋₁₉₁K₂₁Y酰胺) 的10mM HEPES溶液包被。将纳米颗粒洗涤、离心 (spun) 并且作为湿颗粒储存在4℃。每一经设计的肽的吸附量用来自氨基酸色谱中特有氨基酸的信号测量。甘氨酸是ACT-2033特有的,可用于确定ACT-2033的浓度,而精氨酸、组氨酸和苯丙氨酸是ACT-2044特有的,可用于确定ACT-2044的浓度。通过该分析确定1%颗粒悬液含有25μg/mL ACT-2033和24μg/mL ACT-2044。

[0142] 实施例7:ELBL微颗粒ACT-1145的制备:

[0143] 中等孔径3μm CaCO₃微颗粒获自PlasmaChem GmbH (Berlin, 目录号PL-CA3)。将颗粒在10mM HEPES中悬浮成6% (重量/体积)。使用实施例3所述的CaCO₃纳米颗粒的ELBL包被方法并作以下修改。因为3μm CaCO₃微颗粒在正常重力下在水悬液中易于沉积,所以未在成层步骤中进行超声波处理,而是将悬液在旋转器上轻轻混合10分钟。而且,在成层和洗涤步骤后,使用较慢的离心速度来沉淀微颗粒。因此,将微颗粒悬液在1500g离心1分钟。对于ACT-1145的制备,使用1.0mg/mL的PGA溶液来包被第一层,标记有荧光素的1.0mg/mLPLL层 (PLL-FITC, Sigma目录号P3543) 用于第二层。在接下来的5个成层步骤中使用PGA和PLL包被总共7个多肽层的微颗粒 (这些颗粒可用于实施例8所述的酰胺交联实验)。使用0.5mg/mL ACT-2086 (SEQ ID NO:13; RSV-M2₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y酰胺) 溶液包被最终层。将微颗粒洗涤、离心并且以湿颗粒储存在4℃。通过氨基酸分析计算吸附到颗粒上的ACT-2086的量,发现对于1%颗粒悬液为43μg/mL。通过荧光显微镜检测颗粒,发现直径为3.0 (+/- 1.5) μm的球。颗粒为良好分散的单颗粒,具有少量二或三个颗粒的聚集物。

[0144] 实施例8:ELBL微颗粒ACT-1146的制备

[0145] 使用实施例7的方法制备具有七个肽层 (PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA) 的3μm CaCO₃微颗粒。新配制含有38mg/mL (0.20M) 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC, Sigma目录号#E6383) 和11mg/mL (0.05M) N-羟基磺基琥珀酰亚胺钠盐 (磺基-NHS, Sigma目录号56485) 的0.2M磷酸钠pH 6.5溶液。将七层微颗粒在EDC/磺基-NHS溶液中悬浮成3%悬液。将悬液在室温轻轻混合30分钟,然后将颗粒离心,并用10mM HEPES缓冲液洗涤三次。用0.5mg/mL ACT-2086 (SEQ ID NO:13; RSV-M2₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y酰胺) 溶液包被最终层。将微颗粒洗涤、离心并以湿颗粒储存在4℃。通过氨基酸分析计算颗粒吸附的ACT-2086的量,发现对于1%颗粒悬液为49μg/mL。

[0146] 实施例9:ELBL微囊 (microcapsule) ACT-1147的制备

[0147] 将来自实施例8的CaCO₃微颗粒ACT-1146在0.5M EDTA钠pH8.0溶液中悬浮成6% (重量/体积)。将颗粒在室温轻轻混合30分钟,在1500g离心3分钟并且吸取EDTA溶液。将所得微囊两次在10mM HEPES缓冲液中再悬浮并在1500g离心3分钟以除去过量盐。将微囊离心、吸取并且以湿颗粒储存在4℃。通过氨基酸分析计算囊吸附的ACT-2086的量,发现对于

1%颗粒悬液为41 μ g/mL。通过荧光显微镜检测囊,发现直径为3.0 (+/-1.5) μ m的球。囊为分散良好的单囊,具有少量二或三个囊的聚集物。

[0148] 实施例10:RSV-G单价纳米颗粒的免疫原性

[0149] 通过足垫注射将BALB/c小鼠用纳米颗粒ACT-1042 (DP SEQ ID NO:8; RSV-G₁₆₄₋₁₉₁) 免疫三次,采集血清并且用ELISA测试。血清识别RSV-G CX3C构象表位ACT-1042 (图4),但是不识别相同肽通过半胱氨酸残基加帽来线性化的形式 (ACT-2054) (图5)。血清也识别天然RSV-G蛋白 (图6),表明利用RSV-G ELBL纳米颗粒免疫引起构象依赖的抗体应答。在测量RSV-G CX3C趋化因子结合的抑制 (图7) 和人PBMC向经纯化RSV-G迁移的抑制 (图8) 的实验中确认了由ACT-1042引起的抗体应答的生物活性。因此,整合了经设计的肽 (基于构象约束的RSV-G CX3C表位) 的新纳米颗粒疫苗设计物可以引起生物相关的抗体应答。

[0150] 实施例11:RSV-M2单价纳米颗粒的免疫原性

[0151] 通过s.c. (皮下)、i.p. (腹膜内)、i.n. (鼻内) 或足垫将BALB/c小鼠用纳米颗粒ACT-1023 (RSV-M2₈₁₋₉₈) (DP SEQ ID NO:12) 免疫。阳性对照小鼠利用完全弗氏佐剂 (CFA) 中的肽ACT-2019 (RSV-M2₈₁₋₉₅; SEQ ID NO:7) 通过s.c. 免疫,并且用不完全弗氏佐剂 (IFA) 中的ACT-2019进行加强。使用未处理小鼠作为阴性对照。免疫后14天利用IL-4和IFN γ ELISPOT 测定测量脾中的T细胞应答。图9中的数据表明用ACT-1023免疫诱导了弱的IL-4ELISPOT,这与对包含在DP中的CD8表位所预期的一样。相比之下,通过足垫免疫的小鼠在单免疫后产生了强IFN γ 应答。s.c. 和i.p. 组产生了弱的应答,但是其依然与阳性对照CFA组相当。在该实验中,鼻内递送未表现出免疫原性。仅用肽免疫产生了低水平的IFN γ 应答。因此我们确定,将RSV-M2肽包埋在ELBL纳米颗粒中显著增加了其效力。

[0152] 实施例12:当组合到多价混合疫苗 (multivalent cocktail vaccine) 中时,RSV-G 和RSV-M2纳米颗粒的免疫原性提高:

[0153] 用任一种单价纳米颗粒疫苗免疫小鼠都引起预期的免疫应答 (见图4-8和9)。有意思的是注意到图4-8所示抗体应答需要三次免疫 (初始 (prime) +两次加强 (boost)),而图9所示T细胞应答仅需一次免疫 (初始)。为了确定含有RSV-G和RSV-M2二者的多价纳米颗粒疫苗是否能够提高RSV-G组分的免疫效力,用RSV-G (ACT-1042, 1 μ g DP/剂量) 和RSV-M2 (ACT-1023, 5 μ g DP/剂量) 纳米颗粒的混合物通过足垫或鼻内递送来免疫小鼠。用ELISA测量初始后和加强后的抗体效价,用ELISPOT监测加强后的T细胞应答。接受任何构建物的小鼠都不具有可测量的初始抗体应答 (数据未示出)。图10示出来自测量RSV-G特异性IgG的加强后ELISA的结果。在仅接受ACT-1042的小鼠中,仅有通过足垫的施用产生了可检测效价。在足垫组中添加RSV-M2纳米颗粒产生的抗体效价与由CFA中5 μ g RSV-G肽诱发的相等。鼻内施用混合物产生的效价与单独足垫 (f.p.) 注射RSV-G纳米颗粒的几乎相等,而i.n. 单独施用RSV-G纳米颗粒未诱发可检测的抗体效价 (在加强时)。这些结果表明加入RSV-M2纳米颗粒表现出RSV-G抗体表位效力的增加,i.n. 施用纳米颗粒可以引起免疫应答。

[0154] 利用ELISPOT测量相同小鼠的T细胞应答。图11表明,如所期望的,通过f.p. 用包含RSV-M2的纳米颗粒或混合物 (cocktail) 免疫小鼠产生抗几乎全部为IFN γ 的针对M2表位的T细胞应答。当鼻内施用时,单独的RSV-M2纳米颗粒 (ACT-1023) 未引起T细胞应答。相比之下,共施用RSV-M2和RSV-G纳米颗粒 (混合) 引起了强IFN γ 应答,其与单独用RSV-M2通过足垫免疫所诱发的相当。

[0155] 还在体内CTL测定中测量了T细胞应答,其测量宿主动物中细胞毒性T细胞的活性。在单价组中,通过单注射PBS(阴性对照)、不完全弗氏佐剂(IFA)中的肽ACT-2031(RSV-M2)或纳米颗粒ACT-1023(RSV-M2)来通过足垫免疫BALB/c小鼠。在多价组中,用PBS、IFA中的肽ACT-2031(RSV-M2)加上肽ACT-2044(RSV-G)或ACT-1023(RSV-M2)加上ACT-1042(RSV-G)来免疫小鼠。七天后,通过用肽ACT-2031脉冲同基因未处理(**naïve**)脾细胞来制备RSV-M2靶细胞,并且用高剂量荧光示踪剂CFSE标记,而通过用低剂量CFSE标记同基因未处理脾细胞来制备对照靶细胞(无靶标肽)。将CFSE标记的两种细胞群以1:1的比率混合,将 5×10^6 个细胞通过i.V.注射进被免疫的小鼠体内,其深入到宿主脾脏中。24小时后,处死被免疫小鼠并且将其脾脏细胞用CFSE荧光进行分析,以监测两种细胞群的存活。在图12中,柱状图最左边的峰代表存活的对照靶细胞,而最右边的峰代表存活的RSV-M2标记的靶细胞。和预期一样,在未免疫(PBS)小鼠中两种细胞群同样存活。相比之下,在用肽ACT-2031/IFA免疫的小鼠中,约18%的RSV-M2靶细胞被杀(比较ACT-2031/IFA柱状图中右峰的大小与左峰的大小)。在用高剂量(75 μ g)纳米颗粒ACT-1023免疫的小鼠中得到了类似的结果,相比之下,在用低剂量(10 μ g)ACT-1023免疫的小鼠中未杀死标记的靶细胞。在用两种肽或两种纳米颗粒的组合免疫的小鼠中,观察到更高程度的标记靶细胞被杀。特别地,用纳米颗粒(ACT-1023+ACT-1042,各为10 μ g)混合物免疫的小鼠中,35%的RSV-M2标记靶细胞被杀死,其甚至比由高剂量单价免疫(ACT-1023/75 μ g)诱发的应答都要高。图13总结了RSV-M2标记靶细胞被特异性杀死的百分比。这些结果与用RSV-G和RSV-M2纳米颗粒混合物免疫的小鼠体内检测到了IFN γ ELISPOT数量增加(见图10、11)相符合。这些数据表明将RSV-G和RSV-M2纳米颗粒组合成混合疫苗使两种组分的免疫效力共同提高。尽管针对RSV-G的抗体应答的提高(图10)可归因于RSV-M2引起的T细胞辅助,但是未预料到鼻内施用混合物后针对RSV-M2的T细胞应答互惠提高(图11)。

[0156] 实施例13:多价纳米颗粒的设计

[0157] 设计了其它颗粒以在同一颗粒中包含多种表位,无论是作为分别的DP共同成层在同一颗粒中,还是作为含有RSV-G表位和RSV-M2表位二者的融合DP。表3描述了多表位RSV纳米颗粒的构建,图4描述了每一种中所使用的DP序列。纳米颗粒ACT-1077至-1079在一层或多层中含有RSV-M2的T细胞表位,而在第8层含有RSV-G的B细胞表位。纳米颗粒ACT-1086至-1088分别含有双表位肽ACT-2086至-2088,仅沉积在第8层。可以预计使用这些或另一些RSV表位其他的设计,无论是共同成层还是在单个融合肽中。

[0158] 表3:多价RSV纳米颗粒、RSV微颗粒和RSV微囊设计物的构建。ACT-1077至-1079含有沉积在同一ELBL纳米颗粒中不同层上的两种分开的DP。ACT-1139含有沉积在同一ELBL纳米颗粒中第8层上的两种分开的DP。ACT-1086至-1088含有沉积在ELBL纳米颗粒第8层上的单一融合肽,所述融合肽整合了抗体和T细胞靶表位二者。ACT-1145和-1146含有沉积在ELBL微颗粒第8层上的单一融合肽,所述融合肽整合了抗体和T细胞靶表位二者。ACT-1147含有沉积在ELBL微囊第8层上单一融合肽,所述融合肽整合了的抗体和T细胞靶表位二者。

ACT #	层	DP ACT #	DP 序列
[0159]	1077 PGA/RSV-M2/(PGA/PLL) ₂ /PGA/RSV-G	2031	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
		2044	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
	1078 (PGA/RSV-M2) ₂ /PGA/PLL/PGA/RSV-G	2031	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
		2044	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
	1079 (PGA/RSV-M2) ₃ /PGA/RSV-G	2031	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
		2044	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
	1086 (PGA/PLL) ₃ /PGA/RSV-G+M2	2086	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)
	1087 (PGA/PLL) ₃ /PGA/RSV-G	2087	RSV-G ₁₆₉₋₁₉₈ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:14)
	1088 (PGA/PLL) ₃ /PGA/RSV-G	2088	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₈ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:15)
[0160]	1139 PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/RSV-M2 + RSV-G mixed	2033	RSV M2 81-98 K ₂₀ Y (SEQ ID NO:16)
		2044	RSV-G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
	1145 PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/RSV-G	2086	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)
	1146 PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/RSV-G	2086	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)
	1147 PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/RSV-G	2086	RSV-M2 ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)

[0160] 表4:表3中多价ELBL纳米颗粒设计物中所使用的RSV DP序列。B细胞表位以下划线示出, T细胞表位以粗体示出, 保守的半胱氨酸以阴影表示, 非天然序列以斜体示出。

	M2 蛋白序列	连接	G 蛋白序列	尾
[0161]	ACT-2031 ESYIG SINNIT KQSAS VA SEQ ID NO:12			<i>(KVKA)₄</i> SEQ ID NO:16
	ACT-2033 ESYIG SINNIT KQSAS VA SEQ ID NO:12			<i>K₂₀Y</i> SEQ ID NO:17
	ACT-2042 NFVPCSICSNNPTCWAI CKRIPN SEQ ID NO:18			<i>K₂₁Y</i> SEQ ID NO:19
	ACT-2044 HFEVFNFVPCSICSNNP TCWAICKRIPN SEQ ID NO:20			<i>K₂₁Y</i>
	ACT-2086 ESYIG SINNIT KQSA SEQ ID NO: 7	SGS	HFEVFNFVPCSICSNNP TCWAICKRIPN SEQ ID NO:21	<i>K₂₀Y</i>
	ACT-2087 NFVPCSICSNNPTCWAI CKRIPNKKPGKKT SEQ ID NO:22			<i>K₂₀Y</i>
	ACT-2088 HFEVFNFVPCSICSNNP TCWAICKRIPNKKPGK KT SEQ ID NO:23			<i>K₂₀Y</i>

[0162] 实施例14:DP纳米颗粒构建物的剂量依赖性

[0163] 在阳性对照(CFA) 和纳米颗粒(1042)组中使用相同剂量的经设计的肽(1 μ g)。在之前的实验中,对于CFA使用了5-10 μ g,而对于纳米颗粒使用了1 μ g。这些结果表明在相同的剂量,纳米颗粒比CFA对照更具免疫原性。

[0164] 表5:用于RSV混合研究的组

[0165]

组	描述
1	幼稚
2	(ACT-2044+ACT-2031) /CFA (IFA) s.c
3	ACT-1042 1 μ g f.p.
4	ACT-1042 1 μ g+ACT-1023 1 μ g f.p.
5	ACT-1077 1 μ g f.p.
6	ACT-1078 1 μ g f.p.
7	ACT-1079 1 μ g f.p.

[0166] 数据在图14-16示出。

[0167] 实施例15:聚L-谷氨酸的硫醇化 (PGA-SH) 和含半胱氨酸肽的连接

[0168] 将32mg中等分子量的PGA钠盐(购自Sigma)溶解在1.0mL的0.1M磷酸钠pH7.2缓冲

液中。加入22mg的1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和15mg碘基-NHS,并且将溶液在室温保持15分钟。加入4.6mg盐酸胱胺盐并且使溶液反应90分钟。用通过pH 4.5的稀醋酸盐缓冲液预平衡的**Desalt®**柱(购自Pierce)来纯化产物。将洗脱液冷冻并且在-80°C储存。通过E11man's(DTNB)测定评估硫醇化程度,发现为总谷氨酸残基的约24%。

[0169] 可以通过标准固相肽合成方法容易地合成含有来自RSV G蛋白之已知T细胞表位(RSV G残基186-198,SEQ ID NO:24CKRIPNKKPGKKT)的合成肽。可以将0.5mL pH7磷酸盐缓冲液中的15mg PGA-SH在室温用0.4mg DTNB(~1.0umol)处理30分钟。溶液变成黄色。可以通过UV光谱监测活化反应,当412nm吸光度不增加时判断反应完全。然后可以加入1.5mg含半胱氨酸的表位肽(~1umol),并且使溶液反应10分钟。可以通过使用5000MW截断值的透析管进行透析来将产物部分纯化,通过氨基酸分析确认肽负荷。

[0170] 实施例16:表位肽与PGA-SH的硫醚连接。

[0171] 可以在固相肽合成树脂上合成含有来自RSV G蛋白之已知T细胞表位(RSV G残基187-198,SEQ ID NO:25KRIPNKKPGKKT)的合成肽。在切割树脂前,可以通过将树脂用溴代乙酸酐处理来在N末端置入溴乙酰基。在切割树脂和进行纯化后,可以向pH 7的磷酸盐缓冲液中的15mg PGA-SH溶液中加入1.5mg (~1umol) 肽(溴乙酰基-KRIPNKKPGKKT)。可以通过使用5000MW截断值的透析管进行透析来将产物部分纯化,通过氨基酸分析确认肽负荷。

[0172] 实施例17:含半胱氨酸的表位肽与PLL的交联

[0173] 将适当浓度(通常0.5至50mg/mL)且近中性pH(通常pH 6至8)的中度分子量PLL(购自Sigma)储液与交联剂如4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸碘基琥珀酰亚胺酯(碘基-SMCC)混合。碘基-SMCC的量可以不同,但是使用足够的量以修饰PLL中1%至25%的赖氨酸残基。通常反应时间为0.5至5小时。然后通过使反应溶液通过凝胶过滤柱或者通过透析来除去过量的碘基-SMCC反应物。之后使经修饰PLL在近中性pH(通常pH 6至8)下与稍过量的含半胱氨酸之表位肽反应。最后通过使溶液通过凝胶过滤柱或者通过透析来纯化最终的PLL-表位缀合物。该反应物适于通过与对PLL所使用之方法类似的方法整合进聚电解质ELBL膜。

[0174] 实施例18:在用纳米颗粒免疫小鼠后保护不受RSV攻击

[0175] 在第28天用RSV对小鼠进行鼻内攻击,5天后处死小鼠。收集肺并匀浆,通过Vero细胞测定和RSV-M基因的qPCR扩增来测量病毒效价。结果(图17)证明使用含有RSV-G的任何制剂(组3至6)均实现基本上完全的保护。在该研究中,单独RSV-M2没有保护作用,多价疫苗也没有比单独RSV-G发挥更好的作用,这可能是因为使用了相对高的剂量(10 μ g)。

[0176] 实施例19:在相同或不同层中含有RSV-G和RSV-M2表位的多价纳米颗粒的免疫原性

[0177] 在第0天通过在后足垫注射RSV纳米颗粒构建物来免疫小鼠;免疫原包括ACT-1023(RSV-M2)、ACT-1042(RSV-G)+ACT-1023(RSV-M2)、ACT-1086(单层中的RSV-M2+G融合肽)和ACT-1077(不同层中的RSV-G+RSV-M2肽)。在第7天将小鼠用载有RSV-M2的CFSE标记的靶细胞攻击。在接下来的一天,通过流式细胞术分析脾细胞,以检测CFSE标记的靶细胞的存活。结果(图18和19)表明,尽管用任何含RSV-M2表位的纳米颗粒免疫时引起RSV-M2特异性效应细胞,但用多价(RSV-M2+G)构建物免疫的小鼠比用单价(RSV-M2)构建物免疫的小鼠的应答更强。

[0178] 在一个单独的研究中,在第0天和21天通过在后足垫注射RSV纳米颗粒构建物来免疫小鼠;免疫原包括ACT-1023 (RSV-M2)、ACT-1042 (RSV-G)、ACT-1042+ACT-1023、ACT-1086 (单层中的RSV-M2+G融合肽) 和ACT-1139 (共装载在同一层的RSV-G+RSV-M2肽)。在第28天从小鼠取血,用ELISA分析血清的RSV-G特异性抗体。结果表明(图20、21)表明所有含RSV-G表位的制剂都能引起抗体效价,但是ACT-1139多价纳米颗粒表现出最强的效力。

[0179] 除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则应当将所未用数量词限制的指示物(尤其在以下权利要求书中)理解为包括单数和复数二者。本文所使用的术语第一、第二等不是想要指示任何特定顺序,而仅是为了方便指示多数要素,例如层。应当将术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”理解为开放式术语(即,意为“包括但不限于”),除非另外指出。除非本文另外指出,否则对值的范围的列举仅是为了作为单独查阅落在该范围内的各个单独值的便捷方法,并且每个单独值都被整合进本说明书(如果在本文中被单独引用)。所有范围的端值均包含在范围内并且可以独立地进行组合。本文所描述的全部方法可以以合适的顺序完成,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。使用的任何及全部例子,或者示例性语言(例如“例如”),仅意在更好地说明本发明,而不形成对本发明范围的任何限制,除非另外主张。如本文所使用的,不应当将本说明书中的任何语言理解为指示了对进行本发明的实践所必须的任何未要求保护的要素。

[0180] 当引用示例性实施方案来描述本发明时,本领域技术人员应当理解可以做出各种改变,可以用等价物替换其要素,而不离开本发明的范围。此外,可以做出很多修改以适于特定情况或本发明所教导的材料,而不离开其最基本的范围。因此,意图不是用所公开的预期作为实施本发明的最佳模式的具体实施方案来限制本发明,但是本发明将包括所有落在所附权利要求范围内的实施方案。本发明包含上述要素所有可能变化的组合,除非本文明确指出或与上下文明显矛盾。

[0181] 以下实施方案内容对应于原申请的权利要求书:

[0182] 1.组合物,其包含:

[0183] 来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位,其中所述第一和第二多肽表位与一种或更多种聚电解质共价连接,其中所述一种或更多种聚电解质在一个或更多个多层次膜中,

[0184] 其中所述一个或更多个多层次膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,以及

[0185] 其中所述聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料,以及

[0186] 其中所述来自RSV的第一多肽表位和所述来自RSV的第二多肽表位存在于同一多层次膜或不同的多层次膜中。

[0187] 2.根据实施方案1所述的组合物,其中所述多层次膜的至少一种聚电解质包含经设计的多肽,其中所述经设计的多肽具有足以与带相反电荷之表面稳定结合的电荷。

[0188] 3.根据实施方案2所述的组合物,其中所述经设计的多肽的长度为至少15个氨基酸,并且在中性pH下每残基的静电荷大于或等于0.1,并且其中所述经设计的多肽包含所述来自RSV的第一多肽表位、所述来自RSV的第二多肽表位或二者。

[0189] 4.根据实施方案1所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自

RSV的第二多肽表位存在于单一聚电解质中并且在同一多层膜中。

[0190] 5. 根据实施方案1所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于不同的聚电解质中。

[0191] 6. 根据实施方案5所述的组合物,其中包含所述来自RSV的第一多肽表位的第一聚电解质与包含所述来自RSV的第二多肽表位的第二聚电解质存在于同一多层膜中。

[0192] 7. 根据实施方案5所述的组合物,其中包含所述来自RSV的第一多肽表位的第一聚电解质存在于第一多层膜中,以及包含所述来自RSV的第二多肽表位的聚电解质存在于第二多层膜中。

[0193] 8. 根据实施方案1所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位引起特异性细胞毒性或辅助T细胞应答,以及所述来自RSV的第二多肽表位引起特异性抗体应答。

[0194] 9. 根据实施方案8所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位为RSV-M2蛋白表位,以及所述来自RSV的第二多肽表位为RSV-G蛋白表位。

[0195] 10. 根据实施方案9所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位包含SEQ ID NO:7,以及所述来自RSV的第二多肽表位包含SEQ ID NO:4。

[0196] 11. 根据实施方案8所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位为RSV-F蛋白表位,以及所述来自RSV的第二多肽表位为RSV-G蛋白表位。

[0197] 12. 根据实施方案1所述的组合物,其中所述膜沉积在核心颗粒上。

[0198] 13. 根据实施方案1所述的组合物,其中所述多层膜为中空囊的形式。

[0199] 14. 根据实施方案13所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层共价交联。

[0200] 15. 根据实施方案14所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过酰胺键共价交联。

[0201] 16. 根据实施方案14所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过二硫键共价交联。

[0202] 17. 组合物,其包含:

[0203] 来自RSV的第一多肽表位和来自RSV的第二多肽表位,其中所述第一多肽表位和第二多肽表位为一个或更多个多层膜的形式,

[0204] 其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,并且其中所述多层膜的至少一种聚电解质包含经设计的多肽,

[0205] 其中所述经设计的多肽带有足以与带相反电荷之表面稳定结合的电荷,以及其中所述经设计的多肽包含所述来自RSV的第一多肽表位、所述来自RSV的第二多肽表位或二者,

[0206] 其中不是经设计之多肽的聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料,以及

[0207] 其中所述来自RSV的第一多肽表位和所述来自RSV的第二多肽表位存在于同一多层膜或不同的多层膜中。

[0208] 18. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述经设计的多肽的长度至少为15个氨基酸,并且在中性pH下每残基的静电荷大于或等于0.1。

[0209] 19. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于单一经设计的多肽中并且在同一多层膜中。

[0210] 20. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位与所述来自RSV的第二多肽表位存在于不同的经设计的多肽中。

[0211] 21. 根据实施方案20所述的组合物,其中包含所述来自RSV的第一多肽表位的第一经设计的多肽与包含所述来自RSV的第二多肽表位的第二经设计的多肽存在于同一多层膜中。

[0212] 22. 根据实施方案20所述的方法,其中包含所述来自RSV的第一多肽表位的第一经设计的多肽存在于第一多层膜中,以及包含所述来自RSV的第二多肽表位的第二经设计的多肽存在于第二多层膜中。

[0213] 23. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位引起特异性细胞毒性或辅助T细胞应答,以及所述来自RSV的第二多肽表位引起特异性抗体应答。

[0214] 24. 根据实施方案23所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位为RSV-M2蛋白表位,以及所述来自RSV的第二多肽表位为RSV-G蛋白表位。

[0215] 25. 根据实施方案24所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位包含SEQ ID NO:7,以及所述来自RSV的第二多肽表位包含SEQ ID NO:4。

[0216] 26. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述来自RSV的第一多肽表位为RSV-F蛋白表位,以及所述来自RSV的第二多肽表位为RSV-G蛋白表位。

[0217] 27. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述膜沉积在核心颗粒上。

[0218] 28. 根据实施方案17所述的组合物,其中所述多层膜为中空囊的形式。

[0219] 29. 根据实施方案28所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层共价交联。

[0220] 30. 根据实施方案29所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过酰胺键共价交联。

[0221] 31. 根据实施方案29所述的组合物,其中所述多层膜的两层或更多层通过二硫键共价交联。

[0222] 32. 组合物,其包含:

[0223] 与一种或更多种聚电解质共价连接的RSV-G多肽表位,其中所述一种或更多种聚电解质在一个或更多个多层膜内,其中所述一个或更多个多层膜各包含两层或更多层聚电解质,其中相邻的层包含带相反电荷的聚电解质,以及

[0224] 其中所述聚电解质包括分子量大于1,000并且每分子至少带5个电荷的聚阳离子材料或聚阴离子材料。

[0225] 33. 根据实施方案32所述的组合物,其中所述RSV-G多肽表位包含SEQ ID NO:4。

[0226] 34. 向需要针对RSV进行免疫的个体施用实施方案1至33中任一项所述组合物的方法。

序列表

<110> Artificial Cell Technologies
Powell, Thomas J.
Boyd, James

<120> 呼吸道合胞病毒抗原组合物和方法

<130> ATE0019US4

<150> 61/485669

<151> 2011-05-13

<150> 61/362029

<151> 2010-07-07

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 298

<212> PRT

<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 1

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
20 25 30

[0001]

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
290 295

<210> 2

<211> 574

<212> PRT

[0002] 呼吸道合胞病毒

<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

[0003]

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

[0004]

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 3

<211> 192

<212> PRT

<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 3

Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu
1 5 10 15

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

His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys
35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu
65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys
85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys
100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr
115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln
130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro
165 170 175

Lys Glu Ser Thr Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp Thr Thr
180 185 190

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 4

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

[0005] Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
20 25

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 5

Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys
1 5 10 15

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 6

Asp Arg Gly Trp Tyr Ser Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Arg
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 显示出调节对RSV-G的Th2应答的CD8+ T-细胞靶标

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RSV-G164-191K21Y酰胺

<400> 8

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
 1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Lys Lys
 20 25 30

Lys
 35 40 45

Lys Tyr
 50

<210> 9
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0006]

<220>
 <223> RSV-G164-191K21Y酰胺, 具有加帽的半胱氨酸残基

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa是甲酰胺基甲基半胱氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa是甲酰胺基甲基半胱氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa是甲酰胺基甲基半胱氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa是甲酰胺基甲基半胱氨酸

<400> 9

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Xaa Ser Ile Xaa Ser Asn Asn
 1 5 10 15

Pro Thr Xaa Trp Ala Ile Xaa Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Lys Lys
 20 25 30

Lys Lys

35

40

45

Lys Tyr
50

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

<220>
<223> 环-RSV-G175-184

<400> 10

Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RSV-G169-191K21Y

<400> 11

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
1 5 10 15

[0007] Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Tyr
35 40 45

<210> 12
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RSV-M281-98 (KVKA)4酰胺

<400> 12

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

Val Ala Lys Val Lys Ala Lys Val Lys Ala Lys Val Lys Ala Lys Val
20 25 30

Lys Ala

<210> 13
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> RSV-M281-98G164-191 K20Y酰胺

<400> 13

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

Gly Ser His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
20 25 30

Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
35 40 45

Lys
50 55 60

Lys Lys Tyr
65

<210> 14

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RSV G169 198 K20Y酰胺

<400> 14

[0008] Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
1 5 10 15

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Lys Lys
20 25 30

Lys
35 40 45

Lys Lys Tyr
50

<210> 15

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RSV-G164-198 K20Y酰胺

<400> 15

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Lys Thr Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
50 55

<210> 16
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RSV M2 81-98 K20Y酰胺

<400> 16

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

Val Ala Lys
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
35

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

<220>
<223> K20Y尾

[0009] <400> 17

Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Tyr
20

<210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G蛋白序列

<400> 18

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
1 5 10 15

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
20

<210> 19
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> K21Y尾

<400> 19

Lys													
1				5			10					15	

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Tyr
				20	

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G蛋白序列

<400> 20

His	Phe	Glu	Val	Phe	Asn	Phe	Val	Pro	Cys	Ser	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn
1				5			10					15			

Pro	Thr	Cys	Trp	Ala	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn
				20			25				

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G蛋白序列

[0010]

<400> 21

His	Phe	Glu	Val	Phe	Asn	Phe	Val	Pro	Cys	Ser	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn
1				5			10				15				

Pro	Thr	Cys	Trp	Ala	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn
				20			25				

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G蛋白序列

<400> 22

Asn	Phe	Val	Pro	Cys	Ser	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn	Pro	Thr	Cys	Trp	Ala
1				5			10				15				

Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Lys	Thr
				20			25				30		

<210> 23

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G蛋白序列

<400> 23

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Lys

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

[0011] <220>

<223> RSV G残基186-198

<400> 24

Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RSV G残基187-198

<400> 25

Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
1 5 10

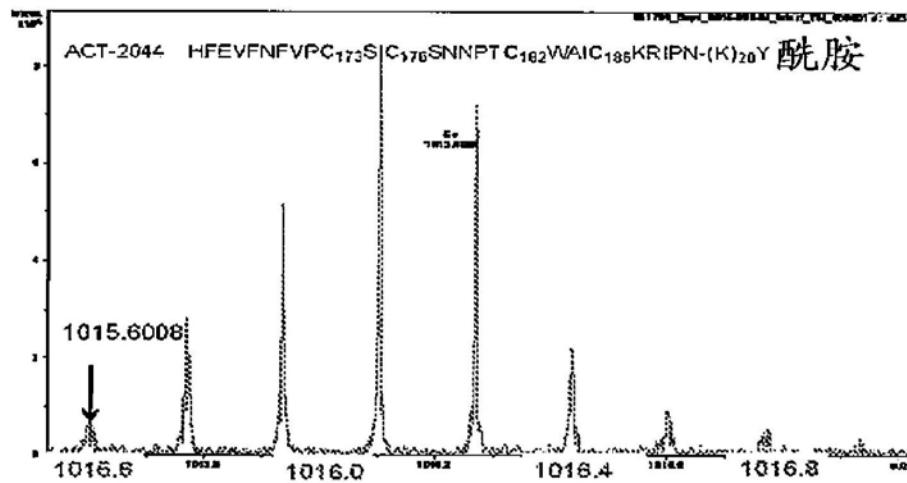
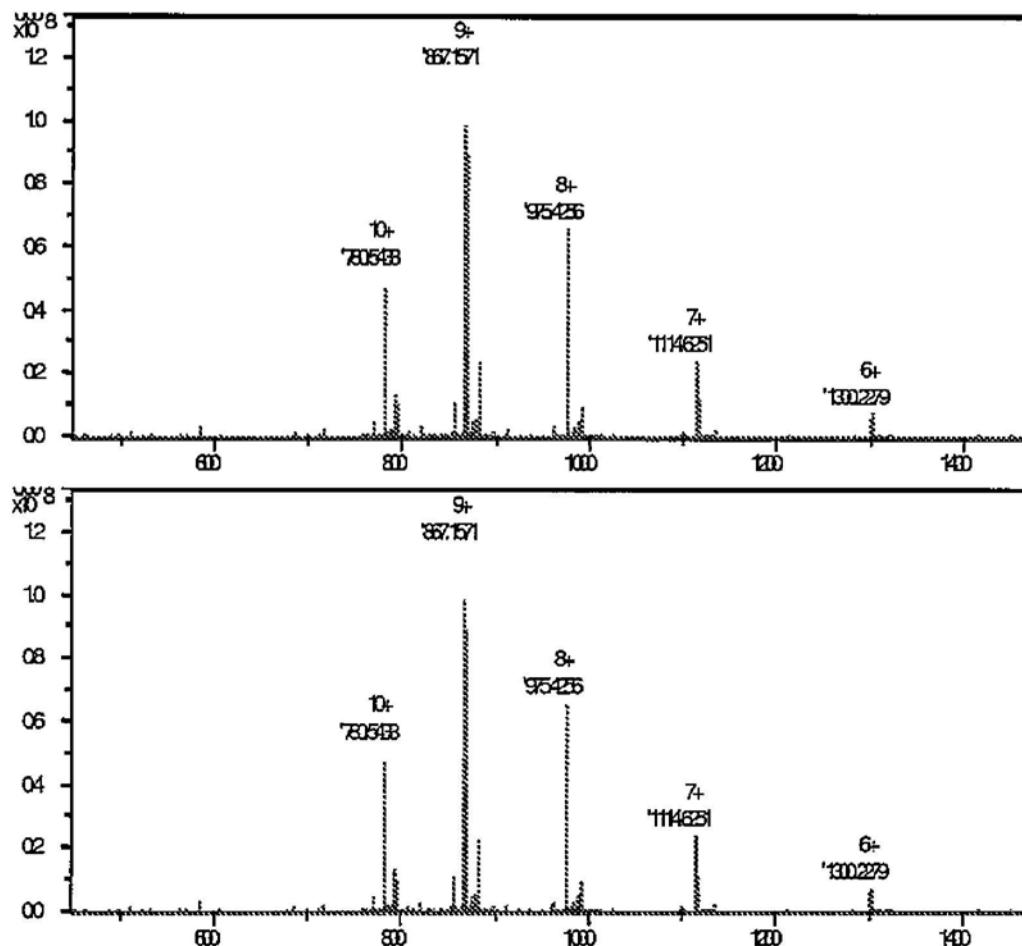
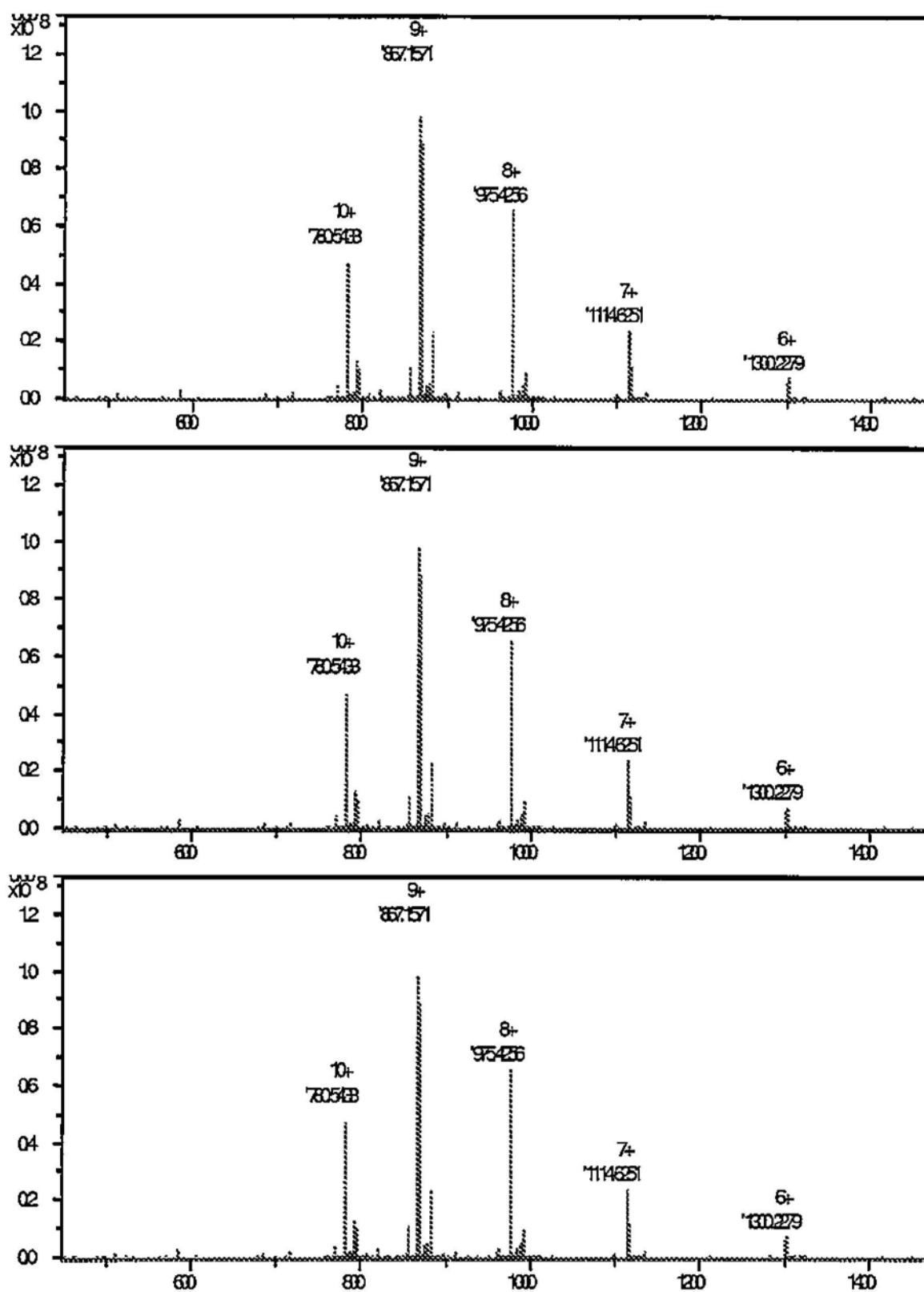


图1





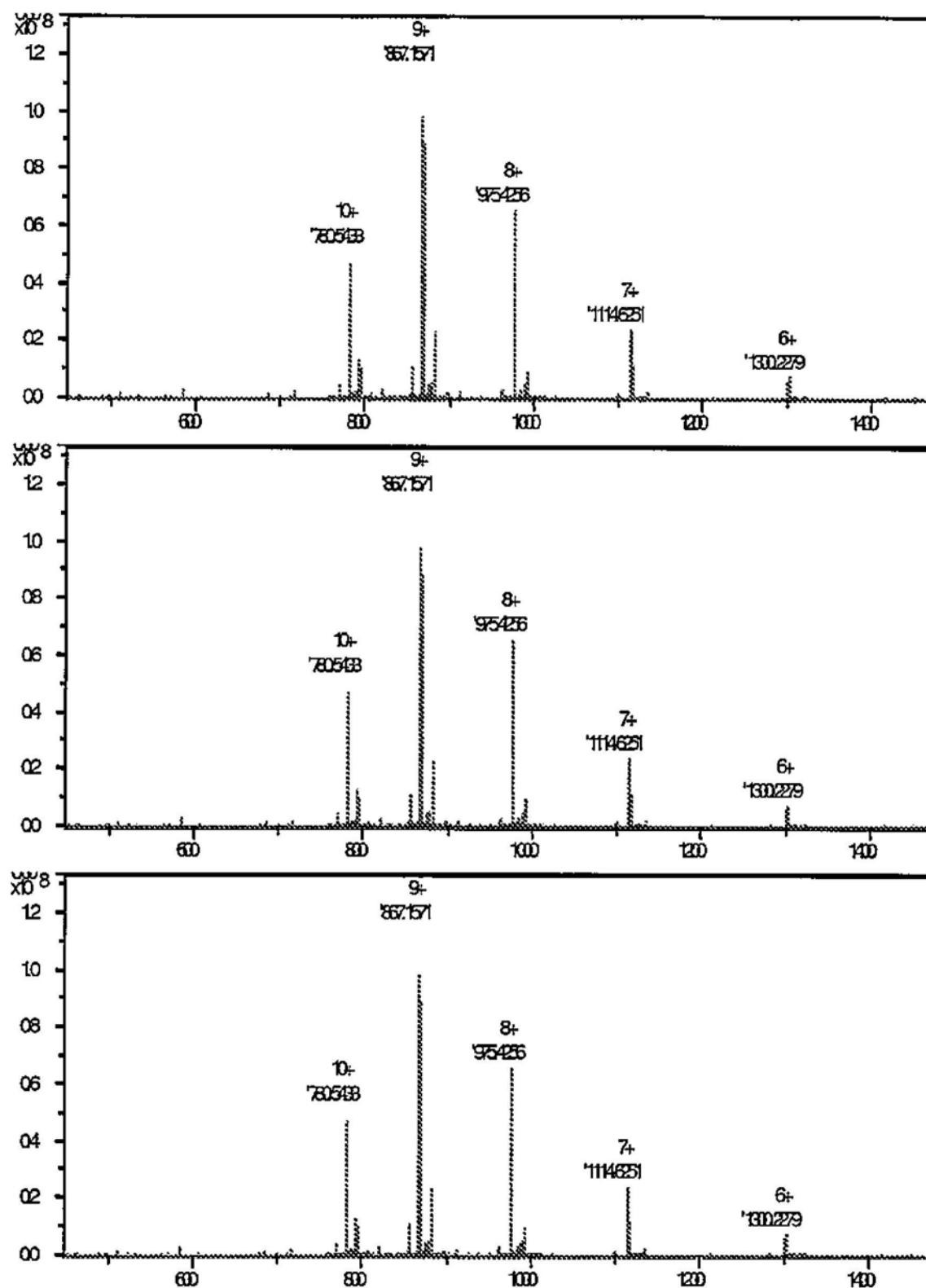
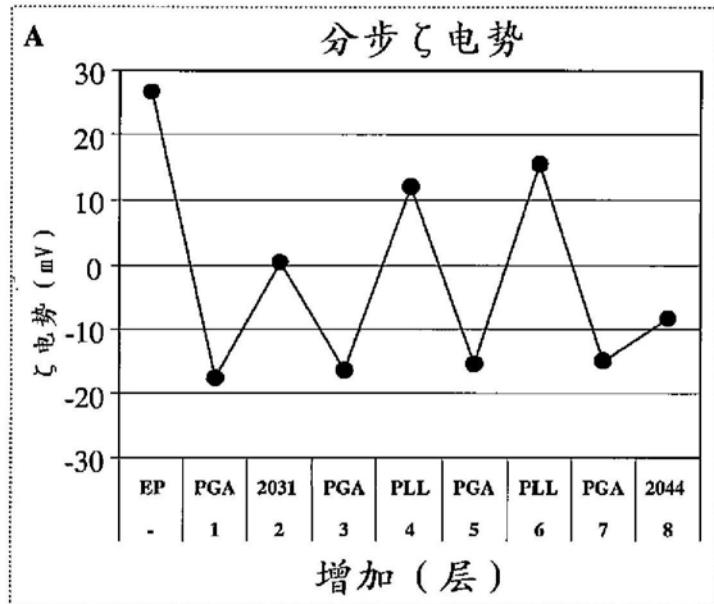
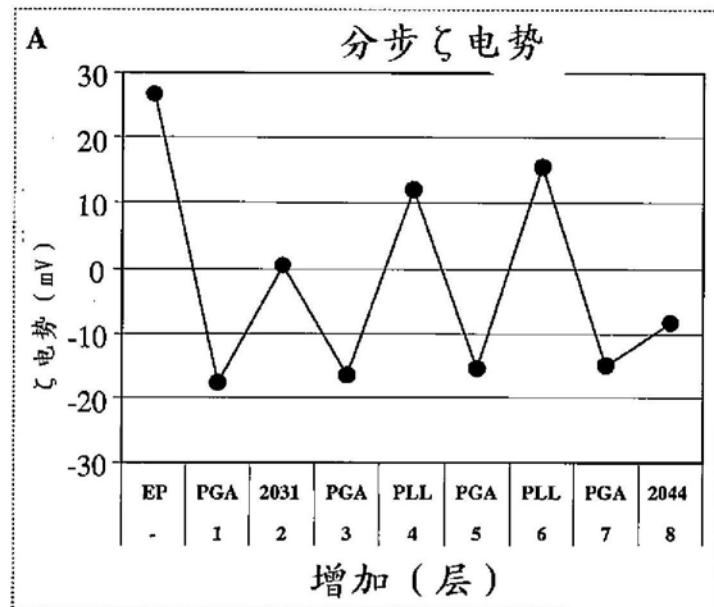


图2



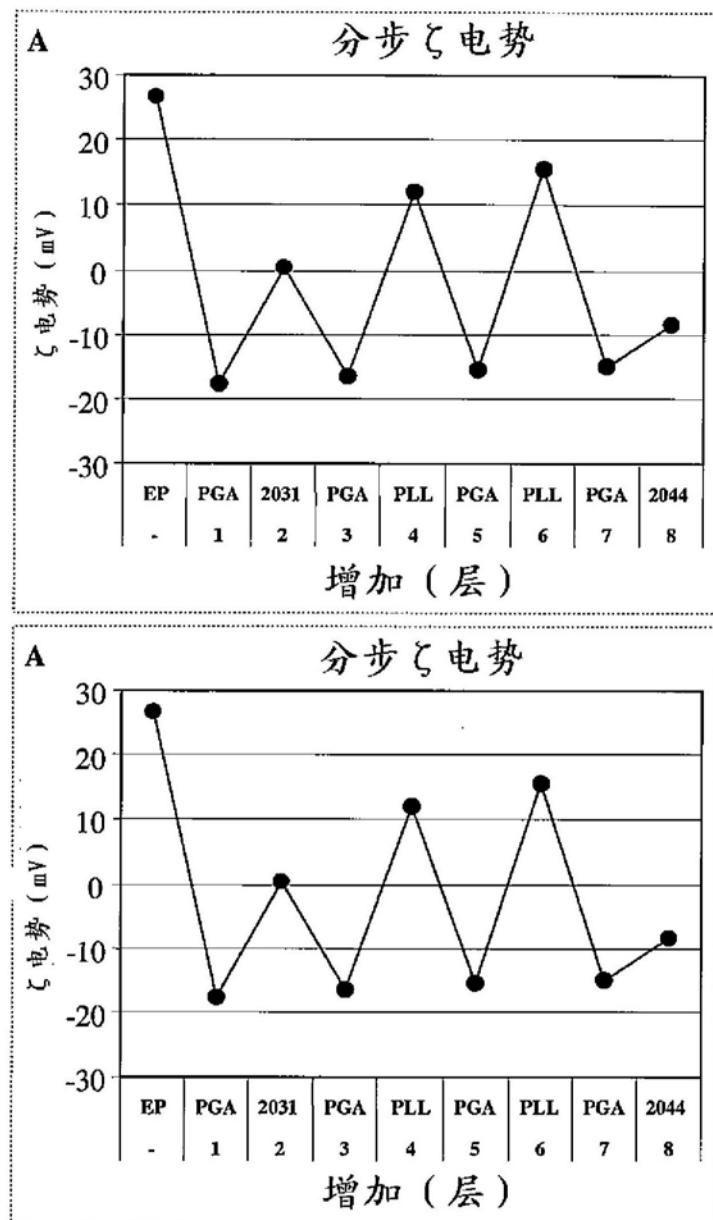


图3

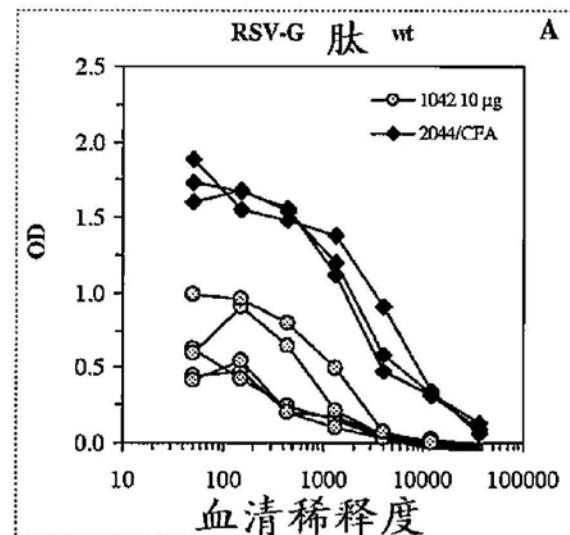


图4

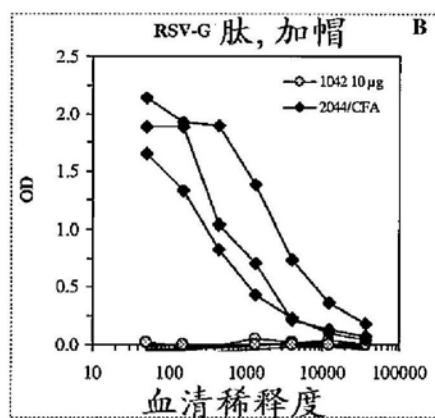


图5

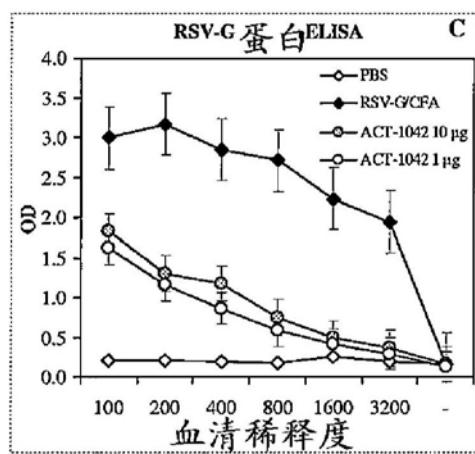


图6

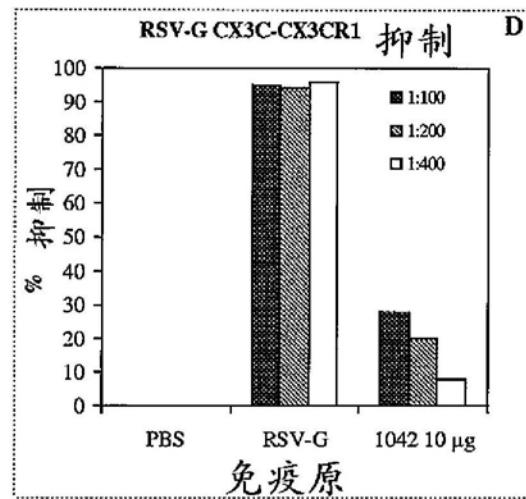


图7

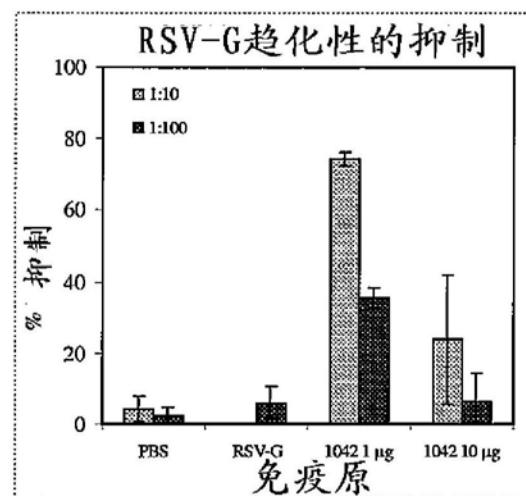


图8

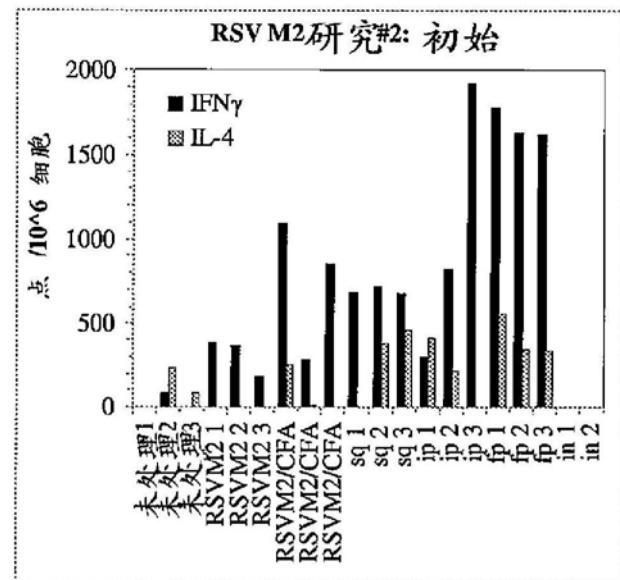


图9

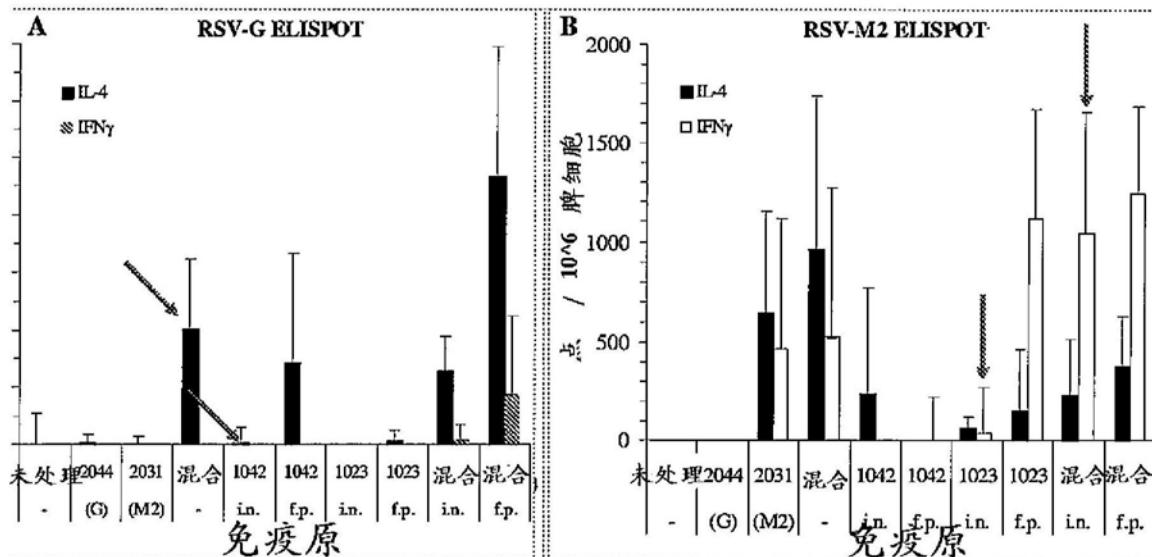


图10

图11

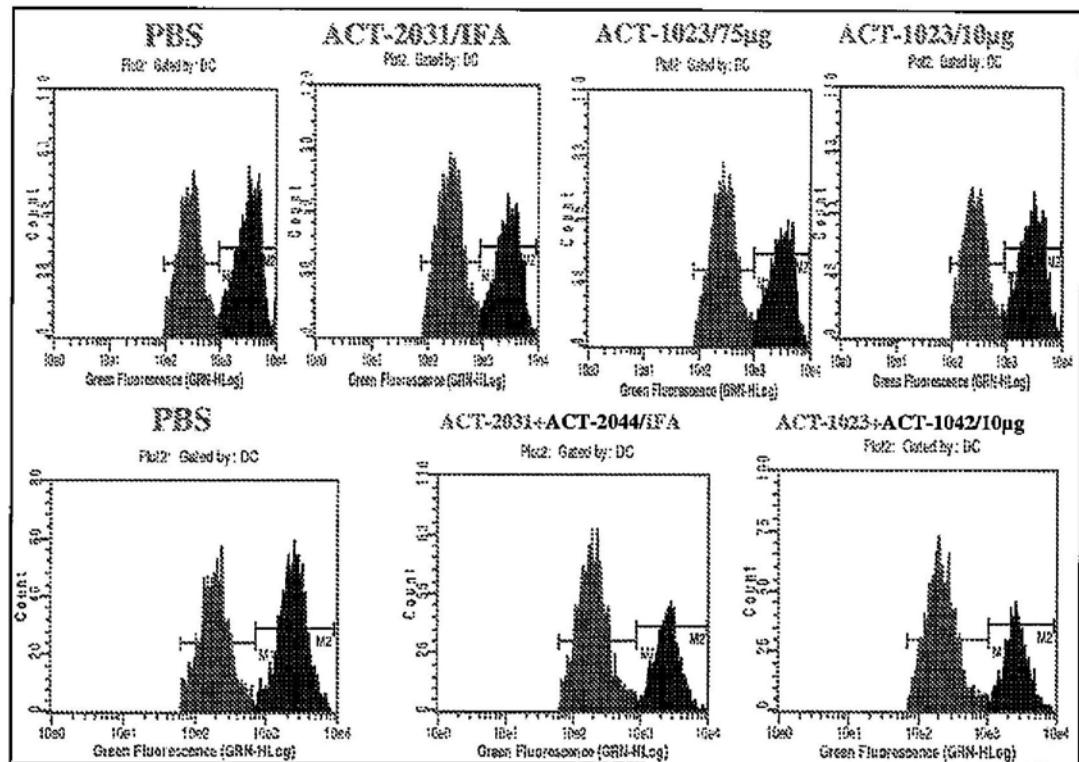


图12

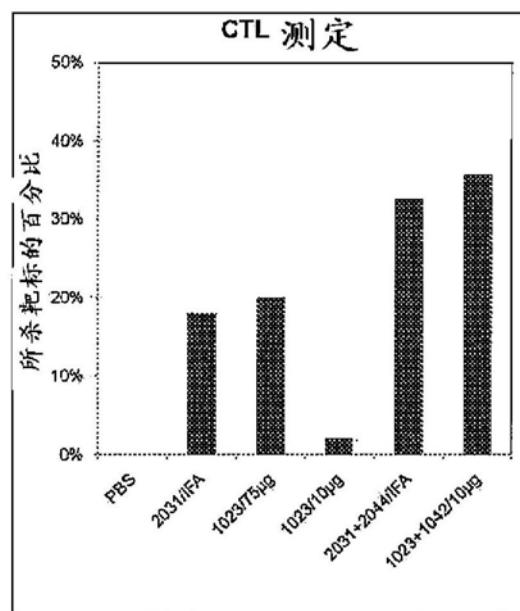


图13

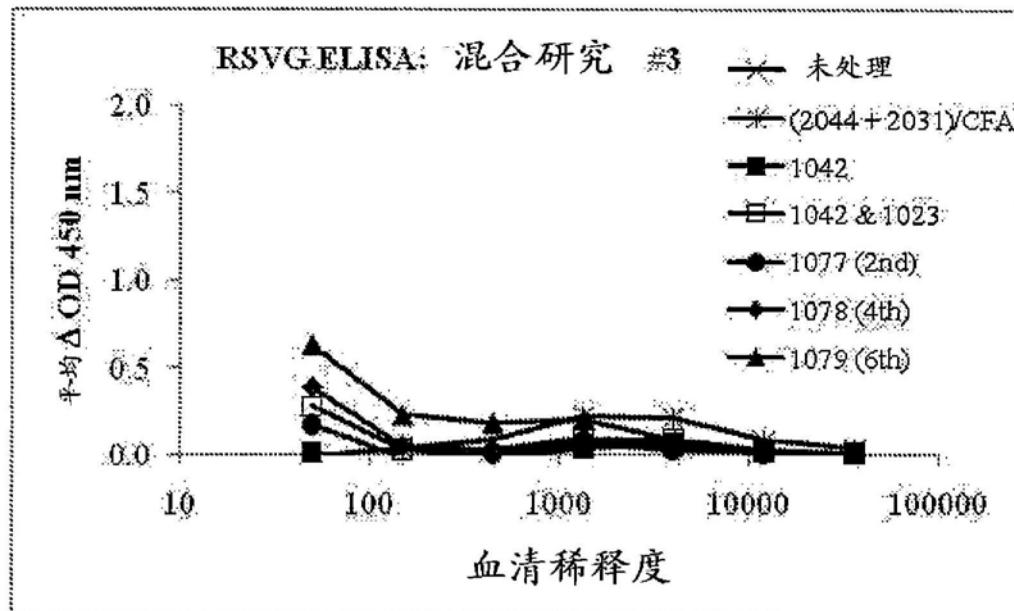


图14

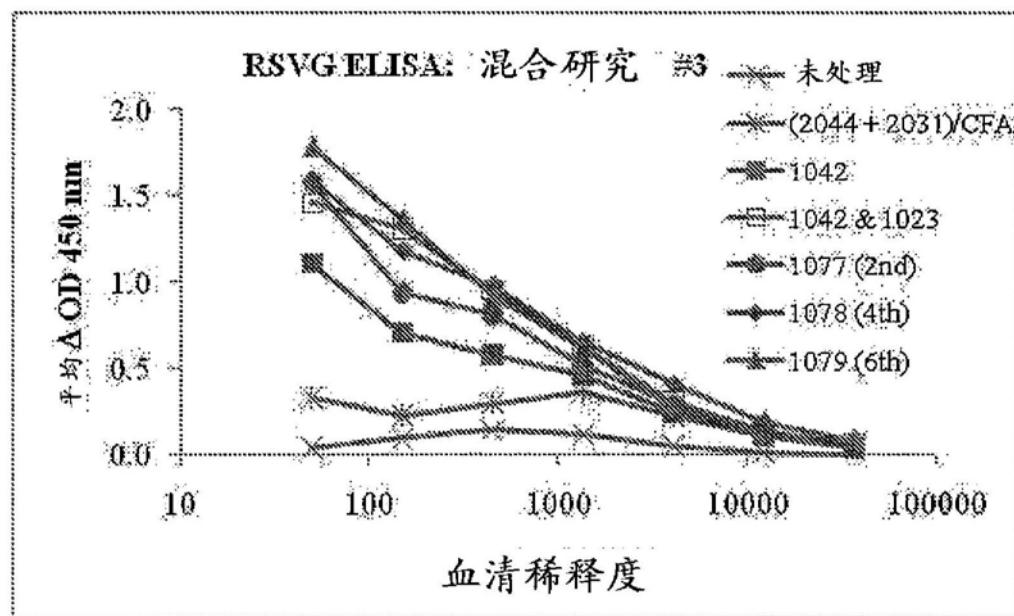


图15

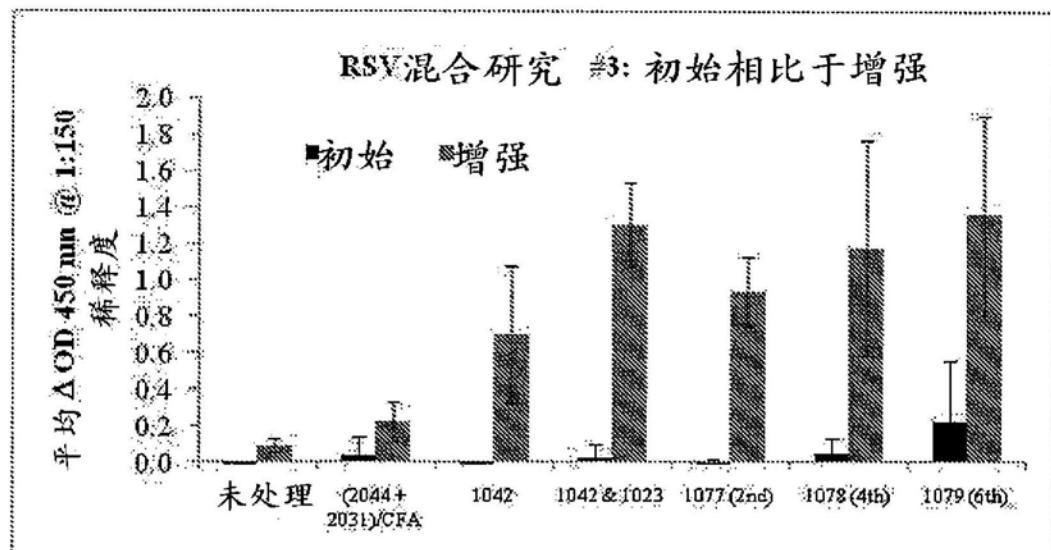


图16

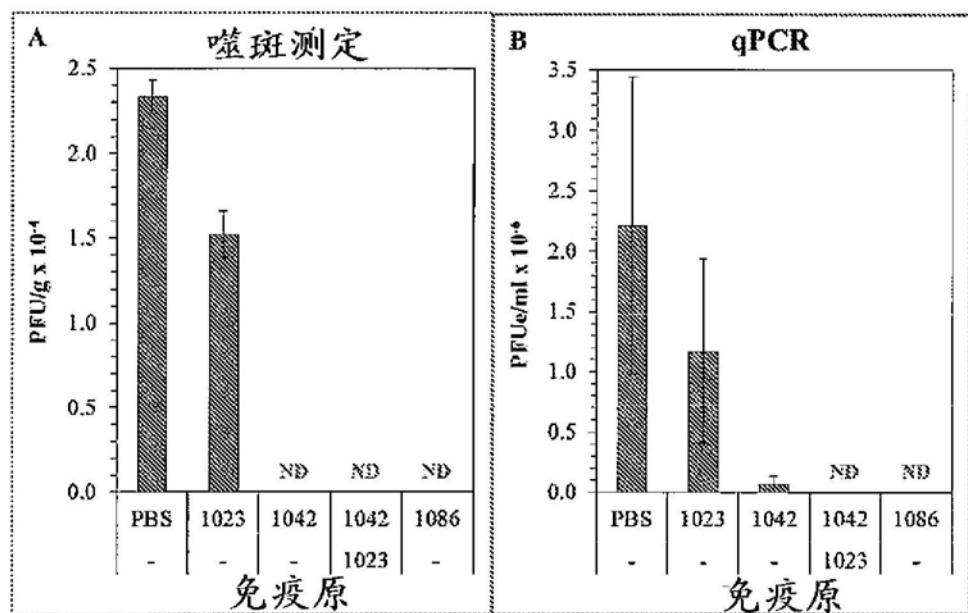


图17

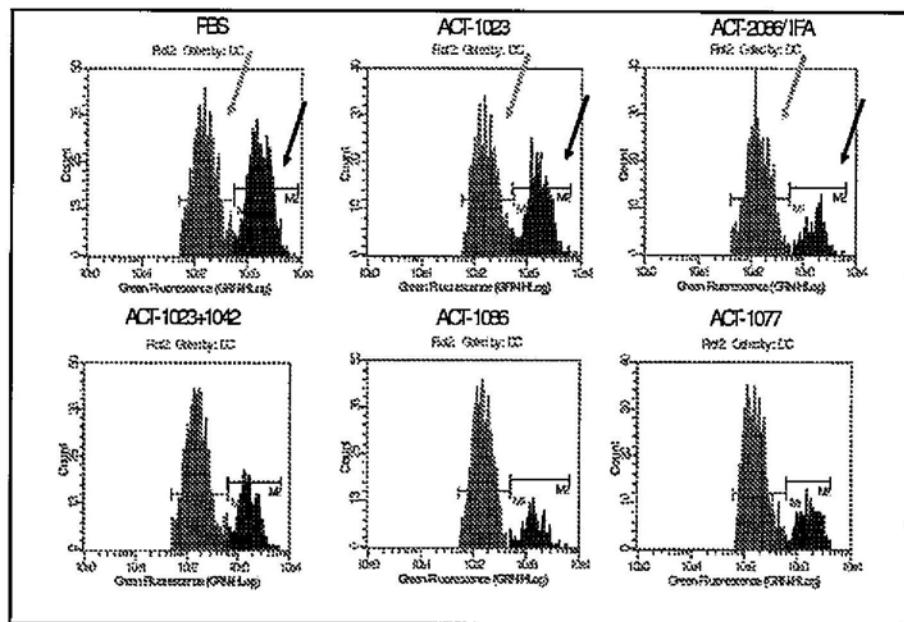


图18

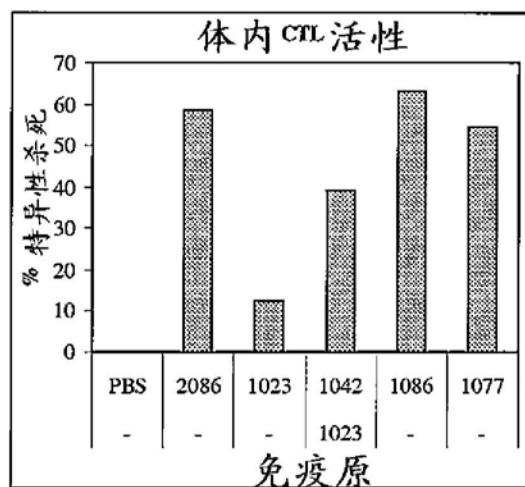


图19

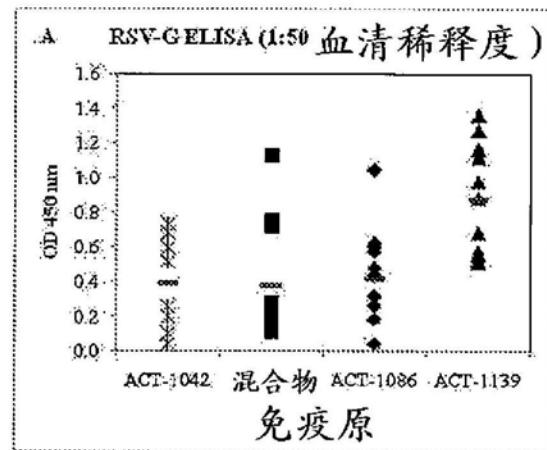


图20

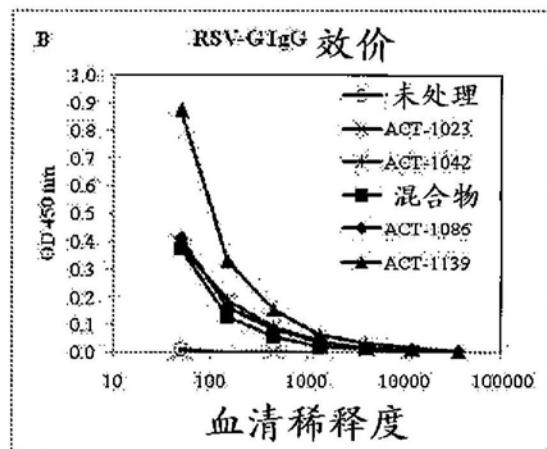


图21