



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108578679 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810318137.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2013.08.30

A61K 38/17(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 38/45(2006.01)

61/694,968 2012.08.30 US

A61K 38/48(2006.01)

61/830,425 2013.06.03 US

A61K 39/008(2006.01)

A61P 33/02(2006.01)

(62)分案原申请数据

C07K 19/00(2006.01)

201380053720.8 2013.08.30

(71)申请人 梅里亚有限公司

地址 美国佐治亚

(72)发明人 L·B·菲舍

N·P·Y·卡尔布莱克 F·卢克斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张小勇

权利要求书2页 说明书19页

序列表10页 附图27页

(54)发明名称

嵌合KSAC蛋白的表达和由高压产生可溶性蛋白的方法

(57)摘要

本发明包括包含具有免疫原性和保护性性质的嵌合KSAC蛋白的疫苗或组合物,及使用方法,其包括给动物施用其抗原性KSAC蛋白,以保护动物。本发明也包括自从原核生物或真核生物产生的包含体制造及产生可溶性,解聚的,再折叠的或有活性的蛋白的方法。

1. 组合物,其包含由利什曼原虫抗原动体目原生动膜蛋白11 (KMP11)、甾醇甲基转移酶(SMT)、A2和半胱氨酸蛋白酶(CP)组成的融合蛋白。

2. 权利要求1的组合物,其中所述融合蛋白与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性。

3. 权利要求1的组合物,其中所述融合蛋白由与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的多核苷酸编码。

4. 权利要求1~3之任一组的组合物,其中所述融合蛋白基本上溶解于水溶液或基本上再折叠。

5. 权利要求1~3之任一组的组合物,其中所述融合蛋白由高压溶解或再折叠。

6. 权利要求5的组合物,其中所述高压是约1000巴~约5000巴。

7. 权利要求6的组合物,其中所述高压施加至少20小时。

8. 权利要求1~7之任一组的组合物,其中所述融合蛋白自大肠埃希氏菌(E.coli)包含体溶解或再折叠。

9. 权利要求8的组合物,其中所述大肠埃希氏菌(E.coli)包含体在不包含脲或包含低脲的缓冲剂中制备。

10. 权利要求8的组合物,其中所述大肠埃希氏菌(E.coli)包含体在包含二硫代苏糖醇(DTT)的缓冲剂中制备。

11. 权利要求9或10的组合物,其中所述大肠埃希氏菌(E.coli)包含体还经历约1000巴~约5000巴的高压。

12. 权利要求11的组合物,其中所述大肠埃希氏菌(E.coli)包含体在高压下处理约20小时~约100小时。

13. 权利要求12的组合物,其中所述大肠埃希氏菌(E.coli)包含体以约83巴/hr~125巴/hr的速度减压。

14. 权利要求5~13之任一组的组合物,其中所述高压逐步增加。

15. 治疗对利什曼原虫感染敏感的动物的方法,其包括给动物施用包含由利什曼原虫抗原动体目原生动膜蛋白11 (KMP11)、甾醇甲基转移酶(SMT)、A2和半胱氨酸蛋白酶(CP)组成的融合蛋白的组合物。

16. 通过在动物中诱导针对利什曼病的免疫应答来预防利什曼病的方法,其包括给动物施用包含由利什曼原虫抗原动体目原生动膜蛋白11 (KMP11)、甾醇甲基转移酶(SMT)、A2和半胱氨酸蛋白酶(CP)组成的融合蛋白的组合物步骤。

17. 权利要求15或16的方法,其中所述融合蛋白与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性。

18. 权利要求15或16的方法,其中所述融合蛋白由与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的多核苷酸编码。

19. 权利要求15或16的方法,其中所述动物是犬科动物。

20. 产生在原核生物或真核生物中表达的可溶性蛋白的方法,其包括下列步骤:

(i) 在不包含脲或包含低浓度的脲的缓冲剂中制备大肠埃希氏菌(E.coli)包含体以形成包含体悬浮液;以及

(ii) 使包含体悬浮液经历高压。

21. 产生在原核生物或真核生物中表达的可溶性蛋白的方法,其包括下列步骤:

- (i) 在不包含脲或包含低浓度的脲的缓冲剂中制备包含体以形成包含体悬浮液;
  - (ii) 使包含体悬浮液经一定时间经历逐步压力增加;及
  - (iii) 使施加到包含体的高压维持一定时间。
22. 权利要求20或21的方法,其中所述缓冲剂还包含DTT。
23. 权利要求20或21的方法,其中所述高压处于约2000巴~约5000巴。
24. 权利要求20或21的方法,其中使所述包含体经历高压约20小时~约100小时。
25. 权利要求22的方法,其中所述DTT浓度为约1mM~约100mM。
26. 权利要求20或21的方法,其中所述脲浓度为0M~约7M。
27. 权利要求20或21的方法,其中所述方法还包括减压步骤。
28. 权利要求27的方法,其中所述减压以约83巴/hr~125巴/hr的速度进行。

## 嵌合KSAC蛋白的表达和由高压产生可溶性蛋白的方法

[0001] 本分案申请是基于申请号为201380053720.8、申请日为2013年8月30日、申请人为“梅里亚有限公司”、发明名称为“嵌合KSAC蛋白的表达和由高压产生可溶性蛋白的方法”的原始中国专利申请(原国际申请号为PCT/US2013/057430)的分案申请。

[0002] 【相关申请的交叉引用】

[0003] 本申请要求2012年8月30日提交的US临时申请系列No.61/694,968和2013年6月3日提交的US临时申请系列No.61/830,425的权利。

### 【技术领域】

[0004] 本发明涉及对抗动物或人中的利什曼原虫属(*Leishmania*)感染的制剂。特别是,本发明提供包含嵌合利什曼原虫属(*Leishmania*)抗原的药物组合物和针对利什曼原虫属(*Leishmania*)疫苗接种的方法。本发明也涉及使用高压产生可溶性或解聚的蛋白的方法。

### 【背景技术】

[0005] 利什曼病是影响人,犬科动物及更少程度,猫科动物的主要和严重的寄生虫疾病。

[0006] 利什曼原虫属(*Leishmania*)和圭亚那亚属基于分子,生物化学和免疫学相似性分组进物种和亚种综合。有由它们的临床表现命名的几种形式的疾病,所述临床表现包括皮肤,粘膜皮肤或内脏利什曼病。各这些形式的疾病由在世界的不同地区发现的不同物种的白蛉导致。人的皮肤利什曼病在旧大陆与埃塞俄比亚利什曼原虫(*L.aethiopica*),硕大利什曼原虫(*L.major*)及热带利什曼原虫(*L.tropica*)复合的成员相关,在新大陆与墨西哥利什曼原虫(*L.mexicana*)及巴西利什曼原虫(*L.braziliensis*)复合相关。内脏利什曼病在旧大陆地区由杜氏利什曼原虫(*L.donovani*)及婴儿利什曼原虫(*L.infantum*)导致,而恰加斯利什曼原虫(*L.chagasi*)主要负责新大陆的内脏疾病。因为婴儿利什曼原虫(*L.infantum*)是与犬科动物利什曼病关联的主要病因,狗中的感染常常被认为是内脏感染,即使它们趋向于导致内脏和皮肤疾病。

[0007] 内脏利什曼病的病因是原生动物寄生虫,且属于杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)复合。此寄生虫广泛分布于南欧洲,非洲,亚洲,南美洲和中美洲的温带和亚热带国家(Desjeux P.et al.,1984,Nucl.Acids Res.,12:387-395)。杜氏利什曼原虫婴儿亚种(*Leishmania donovani infantum*) (婴儿利什曼原虫(*L.infantum*))在南欧洲,非洲和亚洲负责猫科动物和犬科动物疾病。在南美洲和中美洲,病因是杜氏利什曼原虫恰加斯亚种(*Leishmania donovani chagasi*) (恰加斯利什曼原虫(*L.chagasi*)),其与婴儿利什曼原虫(*L.infantum*)紧密相关。在人中,病因是杜氏利什曼原虫杜氏亚种(*Leishmania donovani donovani*) (杜氏利什曼原虫(*L.donovani*)),其也与婴儿利什曼原虫(*L.infantum*)及恰加斯利什曼原虫(*L.chagasi*)相关。

[0008] 利什曼病是缓慢进行性疾病,其可经时达7年而变得临床上明显(McConkey SE et al.,2002,Canine Vet J 43:607-609)。甚至然后,迹象常是非特异性和罕考虑利什曼原虫属(*Leishmania*)的诊断。狗最通常被在人中负责亲内脏疾病的婴儿利什曼原虫

(*L. infantum*) (杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*) 复合) 感染。但是, 达90%的感染的狗呈现内脏和皮肤损伤 (Slappendel RJ et al., 1998, In: Greene CE: Infectious Diseases of the Dog and Cat, pp450-458)。另一方面, 许多狗对此寄生虫呈现天然地抗性, 和可保持无症状, 尽管知道感染。(Grosjean NL等人, 2002, Vet Rec 150:241-244)。估计在病区的仅10%的狗实际上发展临床疾病 (Lindsay DS等人, 2002, Compend Cont Educ Pract Vet 24:304-312)。此临床疾病的更低发生率归因于特定狗的遗传倾向, 以引发相比体液应答更保护性的细胞-介导的免疫应答 (Lindsay DS等人, McConkey SE等人, Slappendel RJ, 等人)。此外, 已报道达20%的感染的狗可引发充足的免疫应答和自临床病自发恢复 (McConkey SE等人)。在引发体液应答的动物中, IgG1呈现与临床疾病关联, 而无症状狗具有更高IgG2抗体水平 (Lindsay等人)。

[0009] 利什曼病的一些更频繁地报道的临床体征包括倦怠, 疲乏和与厌食症偶联的运动不耐性和最终以消耗病达到极点的体重减轻 (McConkey SE等人)。这些迹象可伴随或不伴随发热, 局部或一般化的淋巴结病 (90%) 和/或肝脾肿大 (Grosjean NL等人, 2003, J Am Vet Med Assoc 222:603-606; Lindsay DS等人, McConkey SE等人; Martínez-Subiela S等人, 2002, Vet Rec 150:241-244)。关节牵连也是相当常见的, 和可表现为伴随肿胀的关节的跛或简单表现为僵步态。欠常见的发现包括眼损伤 (<5%), 慢性腹泻 (30%) 和被称为甲弯曲的长, 变形的脆甲 (20%) (Lindsay DS等人, Slappendel RJ等人)。皮肤损伤存在于达89%的感染的狗, 有或无内脏涉及的明显的迹象。皮肤利什曼病损伤可在身体的任何部位发生, 但最常见的部位是暴露于环境的那些及因此更敏感于白蛉叮咬。初始丘疹快速引起溃疡。如果不立即治疗, 内脏利什曼病一向是致死的。内脏利什曼病影响内部身体器官, 特别脾脏和肝。

[0010] 狗被认为是利什曼病的主要携带者。疾病特征在于在少于50%的感染的动物中发生的内脏-皮肤迹象的慢性进化 (Lanotte G. 等人, 1979, Ann. parasitol. hum. comp. 54: 277-95)。具有可检测的抗体的无症状和有症状狗可为感染性的 (Molina R. et al., 1994, Trans. R. Soc. Med. Hyg. 88:491-3; Courtenay O. et al., 2002, J. Infect. Dis., 186:1314-20)。猫也可为原生动物寄生虫的携带者, 及由此被认为是第二潜在携带者。

[0011] 由于许多因素, 狗中利什曼病的治疗选项和对治疗的应答充其量也被限制。由于一些未定义的原因, 相比在人中, 在狗中内脏利什曼病更难治疗。无治疗选项对于清除寄生虫感染100%有效, 和临床疾病随着停止治疗而常常再现 (Lindsay DS等人)。在病区, 最常见的治疗方案曾是别嘌醇与五价锑诸如亚锑酸葡甲胺或葡萄糖酸锑钠的组合 (Lindsay DS等人, Slappendel RJ等人)。但是, 近年来此流程被冷落, 由于增加的寄生虫对药物的抗性以及与这些化合物关联的不利的副作用 (Lindsay DS等人)。为了进一步限定治疗选项, **PENTOSTAM®** (葡萄糖酸锑钠) 是在美国仅可利用的锑, 和其分布由位于Atlanta, GA的疾病控制和预防中心 (CDC) 调控 (Lindsay DS等人)。其他调查寻求鉴定通过, 例如, 施用抗原性融合多肽预防和利什曼病的方法 (见US 2009/0291099, 其通过引用以其整体在本文合并)。

[0012] 已尝试不同流程, 但证明在清除寄生虫感染或在预防临床复发中不更有效。此外, 各流程相关于潜在不利效果。两性霉素B结合甾醇及破坏细胞膜通透性, 但是肾毒性的 (Lindsay DS等人)。当肠胃外提供时, 巴龙霉素与锑协同而导致更高水平的锑更长时间, 但

也是肾毒性的,且目前未被建议临床应用(Lindsay DS等人)。羟乙磺酸喷他脒有效抵抗利什曼病,但需要至少15次肌肉注射,及相当地疼痛(Lindsay DS等人)。酮康唑,咪康唑,氟康唑和伊曲康唑是可为在含有疾病中有用的口腔药物,但是成本禁止,及当症状性地治疗患者时携带药物抗性风险。总之,已研究各种在狗中利什曼病的治疗方案,但不是100%有效;复发是规则而非例外。最终,在美国国内,兽医学医师面对治疗处于发展此寄生虫的药物抗性株的风险的狗中利什曼病的症状性暴发的困境。

[0013] 血清阳性狗的质量检测之后是淘汰和/或药物治疗,或溴氰菊酯-浸渍的项圈的质量应用,显示对在南欧洲,非洲和亚洲的病区减少人和犬科动物利什曼病流行具有影响(Maroli M.et al.,2001,Med.Vet.Entomol.15:358-63;Mazloumi Gavgani A.S.et al.,2002,Lancet 360:374-9),尽管消除血清阳性犬科动物的功效曾有争议(Dietze R.et al.,1997,Clin.Infect.Dis.25:1240-2;Moreira Jr.E.D.et al.,2004,Vet.Parasitol.122:245-52)。这些控制措施或被认为无法接受,昂贵的或不有效(Gradoni L.et al.,2005,Vaccine 23:5245-51)。

[0014] 用于比较各种控制利什曼病的工具的有效性的数学模型提示,犬科动物疫苗可为最实践性的和有效的方法(Dye C.,1996,Am.J.Trop.Med.Hyg.55:125-30)。因此,开发能保护犬科动物免于利什曼病和/或预防感染的动物中的疾病进展的疫苗对于利什曼病控制程序的实现、也对于兽医学社区是高度期望的(Gradoni L.等人)。

[0015] Haynes等人(Biotechnol.Prog.,2010,Vol.26,No.3,743~749)讨论使用高流体静力学压力达到大肠埃希氏菌(E.coli)包含体中产生的生长激素(GH)的高溶解度和高再折叠产率。US6,489,450,US7,064,192,US7,767,795和US7,615,617公开了通过施加高压逆转变性的蛋白的聚集及增加变性的蛋白的再折叠。

[0016] 仍有对产生处理利什曼原虫属(Leishmania)的亚单位(蛋白)疫苗的有效和有效方法的需求。本发明的疫苗制剂和产生该疫苗的方法解决了本领域此长期渴望解决的需求。

#### [0017] 【发明概述】

[0018] 本发明首次展示,在大肠埃希氏菌(E.coli)包含体中表达的嵌合KSAC蛋白在高压处理之后基本上溶解及再折叠。

[0019] 本发明显示惊人结果,施加逐步压力增加伴随包含体在高压下延长的处理产生高产率的可溶性,解聚的,再折叠的及有活性的蛋白。

[0020] 提供包含嵌合KSAC蛋白的组合物和疫苗。该疫苗或组合物可用于免疫接种动物及提供针对利什曼病的保护。KSAC蛋白可在大肠埃希氏菌(E.coli)包含体中表达及随后由高压处理溶解。KSAC蛋白具有免疫原性和保护性性质。

[0021] 本发明的方法包括在高压下经延长的时间自包含体制造及产生可溶性,解聚的,再折叠的或有活性的蛋白的方法。方法也包括使用方法,其包括给动物施用有效量的其抗原性KSAC蛋白,以引发保护性免疫原性应答。

#### 【附图说明】

[0022] 以下详述,由例的方式给出,及其未旨在限制本发明到所描述的特定实施方式,可结合附图理解,在本文通过引用合并,其中:

- [0023] 图1是表显示分配给各DNA和蛋白序列的SEQ ID NO。
- [0024] 图2A~2C显示DNA和蛋白序列。
- [0025] 图3是表示KSAC包含体的压力和时间处理的图。
- [0026] 图4是比较高压处理和典型层析再折叠之间的示意表示。
- [0027] 图5是KSAC再折叠过程的图形表示。
- [0028] 图6描绘通过排阻层析再折叠的KSAC的SDS-PAGE。
- [0029] 图7描绘通过排阻层析再折叠的KSAC的HPLC图。
- [0030] 图8A和8B描绘使用排阻层析再折叠的KSAC蛋白的动态光散射(DLS)。
- [0031] 图9描绘用3000巴处理的KSAC样品的定量点印迹。
- [0032] 图10描绘用3000巴处理的KSAC样品的SDS-PAGE。
- [0033] 图11描绘在3000巴处理之后对照样品及溶解的KSAC的HPLC。
- [0034] 图12描绘3000巴压力处理的KSAC样品和用典型再折叠过程获得的KSAC蛋白的上清液的重叠的HPLC层析谱。
- [0035] 图13描绘用无脲的缓冲剂中3000巴加压的蛋白和用典型再折叠过程获得的蛋白获得的DLS数据的叠加。
- [0036] 图14显示压力和缓冲剂对蛋白尺寸的效应。
- [0037] 图15描绘4000巴处理的样品的HPLC层析谱。
- [0038] 图16显示不合脲的5000巴处理的样品的由数的DLS粒度分布。
- [0039] 图17显示由HPLC和定量点印迹测定的KSAC可溶性蛋白含量的比较。
- [0040] 图18A和18B描绘在高压处理之后KSAC样品的SDS-PAGE分析。
- [0041] 图19A~19D描绘在高压处理之后KSAC样品的Q-点印迹分析。
- [0042] 图20描绘在工序A处理之后KSAC样品的HPLC分析。
- [0043] 图21描绘在工序B处理之后KSAC样品的HPLC分析。
- [0044] 图22描绘在工序A,工序B和典型过程处理之后KSAC样品的HPLC分析。

[0045] **【发明详述】**

[0046] 需知,在本公开和特别在权利要求中,术语诸如“包含(comprises)”,“包含(comprised)”,“包含(comprising)”等可具有美国专利法中规定的含义;例如,它们可表示“包括(includes)”,“包括(included)”,“包括(including)”,等;及术语诸如“基本上由…组成(consisting essentially of)”和“基本上由…组成(consists essentially of)”具有美国专利法中规定的含义,例如,它们允许不明确地叙述的要素,但排除见于现有技术或影响本发明的基本的或新的特征的要素。

[0047] 除非另外提及,根据常规利用使用技术术语。分子生物学中常见的术语的定义可见于由Oxford大学出版社,1994出版的Benjamin Lewin,Genes V. (ISBN 0-19-854287-9);由Blackwell Science Ltd,1994出版的Kendrew等人(ed.),分子生物学百科全书,(ISBN 0-632-02182-9);及Robert A.Meyers(ed.),分子生物学和生物技术:Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc,1995出版(ISBN 1-56081-569-8)。单数术语“a”,“an”和“the”包括复数个指示物,除非情景明显指示另外含义。类似地,词汇“或”旨在包括“及”除非情景明显指示另外含义。词汇“或”表示特定列表的任何一个成员,和也包括所列成员的任何组合。

[0048] 在本文所用术语“动物”包括全部哺乳动物,鸟和鱼。本文所用的动物可选自:马科动物(例如,马),犬科动物(例如,狗,狼,狐,山狗,豺),猫科动物(例如,狮,虎,家养猫,野生猫,其他大猫,及其他猫科动物包括猎豹和山猫),牛类(例如,牛),猪类(例如,猪),羊类(例如,绵羊,山羊,美洲驼,美洲野牛),禽(例如,鸡,鸭,鹅,火鸡,鹌鹑,雉鸡,鸚鵡,雀,鹰,乌鸦,鸵鸟,鹣鹣和鹤鸵),灵长类动物(例如,狐猴,跗猴,猴,长臂猿,猿),人和鱼。术语“动物”也包括发育的全部阶段的个体动物,包括胚胎和胚胎阶段。

[0049] 术语“多肽”和“蛋白”在本文互换使用而指称连续氨基酸残基的聚合物。

[0050] 术语“核酸”,“核苷酸”和“多核苷酸”互换使用及指称RNA,DNA,cDNA或cRNA和其衍生物,诸如含有修饰的主链的那些。需知,本发明提供包含与本文所述的那些互补的序列的多核苷酸。在本发明中涵盖的“多核苷酸”包括正向链(5'至3')和反向互补链(3'至5')。本发明的多核苷酸可以不同方式(例如由化学合成,由基因克隆等)制备,和可取各种形式(例如线性或分支的,单或双链,或其杂交体,引物,探针等)。

[0051] 术语“基因组DNA”或“基因组”互换使用,及指称宿主生物的可遗传的遗传信息。基因组DNA包含核DNA(也被称为染色体DNA)而且质体(例如,叶绿体)和其他细胞器(例如,线粒体)DNA。在本发明中涵盖的基因组DNA或基因组也指称病毒的RNA。RNA可为正链或负链RNA。在本发明中涵盖的术语“基因组DNA”包括含有与本文所述的那些互补的序列的基因组DNA。术语“基因组DNA”也指称信使RNA(mRNA),互补DNA(cDNA),及互补RNA(cRNA)。

[0052] 术语“基因”广义地用于指称与生物学功能关联的任何多核苷酸段。由此,基因或多核苷酸包括内含子和外显子,如在基因组序列中,或就包括编码序列,如在cDNA中,诸如开放阅读框(ORF),始于起始密码子(甲硫氨酸密码子)及结束于终止信号(终止密码子)。基因和多核苷酸也可包括调控它们的表达的区,诸如转录起始,翻译和转录终止。由此,也包括的是启动子和核糖体结合区(一般而言,这些调控元件位于编码序列或基因的起始密码子上游的大致60和250个核苷酸之间;Doree S M等人;Pandher K等人;Chung J Y等人),转录终止子(一般而言,终止子位于编码序列或基因的终止密码子的下游大致50个核苷酸内;Ward C K等人)。基因或多核苷酸也指称表达mRNA或功能RNA,或编码特异性蛋白的核酸片段,及其包括调控序列。

[0053] 本文所用的术语“异源DNA”指称源于与受者不同生物,诸如不同细胞类型或不同物种的DNA。术语也指称在宿主DNA的相同的基因组上的DNA或其片段,其中所述异源DNA被插入与其原位置不同的基因组区。

[0054] 如本文所用,术语“抗原”或“免疫原”是指在宿主动物中诱导特定免疫应答的物质。抗原可包含全生物,杀灭的,衰减的或活的;生物的亚单位或部分;含有具有免疫原性性质的插入子的重组载体;能在呈递给宿主动物后诱导免疫应答的DNA的块或片段;多肽,表位,半抗原,或其任何组合。或者,免疫原或抗原可包含毒素或抗毒素。

[0055] 本文所用的术语“免疫原性蛋白或肽”包括一旦施用给宿主就有免疫学活性的多肽,其能引发针对该蛋白的体液和/或细胞类型的免疫应答。优选蛋白片段使得其具有与总蛋白基本上相同的免疫学活性。由此,本发明的蛋白片段包含至少一个表位或抗原决定簇,或基本上由至少一个表位或抗原决定簇组成或由至少一个表位或抗原决定簇组成。“免疫原性”蛋白或多肽,如本文所用,包括蛋白的全长序列,其类似物,或其免疫原性片段。“免疫原性片段”是指包括一个或更多表位,由此引发上述免疫学应答的蛋白的片段。该片段可通

过使用本领域熟知的任意数的表位标位技术鉴定。

[0056] 术语“免疫原性蛋白或肽”还涵盖对序列的缺失,添加和取代,只要多肽发挥产生本文定义的免疫学应答的功能。术语“保守性变异”表示氨基酸残基由另一生物学类似残基的取代,或核酸序列中的核苷酸取代使得编码的氨基酸残基不变化或是另一生物学类似残基。在这点上,特别优选的取代通常会是在性质上保守性的,即,那些氨基酸家族之内发生的取代。例如,氨基酸通常分为4个家族:(1)酸性--天冬氨酸及谷氨酸;(2)碱性--赖氨酸,精氨酸,组氨酸;(3)非-极性--丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸,色氨酸;及(4)不带电的极性--甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,半胱氨酸,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸。苯丙氨酸,色氨酸和酪氨酸有时分类为芳族氨基酸。保守性变异的例包括将一种疏水残基诸如异亮氨酸,缬氨酸,亮氨酸或甲硫氨酸用另一疏水残基取代,或将一种极性残基用另一极性残基取代,诸如将精氨酸用赖氨酸,谷氨酸用天冬氨酸,或谷氨酰胺用天冬酰胺取代,等;或不会对生物学活性具有主要效应的氨基酸用结构上相关的氨基酸的类似保守性取代。因此,与参照分子具有基本上相同的氨基酸序列,但具有基本上不影响蛋白的免疫原性的少数氨基酸取代的蛋白在参照多肽的定义之内。由这些修饰产生的全部多肽包括在本文内。术语“保守性变异”也包括在未经取代的亲本氨基酸处使用取代的氨基酸,只要是对取代的多肽产生的抗体也与未经取代的多肽免疫反应。

[0057] 术语“表位”指称特定B细胞和/或T细胞与之应答的抗原或半抗原上的位点。术语也与“抗原决定簇”或“抗原决定簇位点”互换使用。识别相同的表位的抗体可在简单免疫测定中鉴定,显示一种抗体阻断另一抗体与靶抗原的结合的能力。

[0058] 对组合物或疫苗的“免疫学应答”在针对目标组合物或疫苗的细胞和/或抗体-介导的免疫应答的宿主中发展。通常,“免疫学应答”包括但不限于一种或更多以下效应:特异性针对在目标组合物中或疫苗包括的抗原的抗体,B细胞,辅助性T细胞,和/或细胞毒性T细胞的产生。优选地,宿主会显示治疗或保护性免疫学应答,使得对新感染的抗性会增强和/或疾病的临床严重性减小。该保护会展示为由感染的宿主正常显示的症状的减小或缺乏,更快恢复时间和/或在感染的宿主中降低的病毒滴度。

[0059] 术语“重组的”和“遗传修饰的”互换使用,及指称在其天然形式或结构中多核苷酸或蛋白的任何修饰,改变或加工,或在其天然环境或周围多核苷酸或蛋白的任何修饰,改变或加工。多核苷酸或蛋白的修饰,改变或加工可包括,但不限于,一个或更多核苷酸或氨基酸的缺失,整个基因的缺失,基因的密码子-优化,氨基酸的保守性取代,一个或更多异源多核苷酸的插入。

[0060] 本文所用的术语“包含体”指称在原核生物或真核生物中表达的异源蛋白的无活性聚集物。术语“基本上可溶性”,“基本上溶解的”,“基本上解聚的”或“基本上再折叠的”在本文互换使用,以指称在包含体中聚集的蛋白,其在水溶液中是至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,或至少98%可溶性的,或解聚,或在处理之后再折叠为有活性的形式。再折叠是指完全或部分变性的蛋白如天然分子采用二级,三级和四级结构。

[0061] 本发明的一实施方式提供组合物或疫苗,其包含自大肠埃希氏菌(*E. coli*)产生的蛋白。蛋白可为包含利什曼原虫属(*Leishmania*)蛋白的2种或更多免疫原性部分的融合蛋白,所述蛋白选自动体目原生动物膜蛋白11(KMP11),甾醇甲基转移酶(SMT),A2和半胱氨酸

蛋白酶(CP)。蛋白可为包含利什曼原虫属(*Leishmania*) KMP11, SMT, A2和CP的融合蛋白,其被称为嵌合KSAC蛋白。在实施方式的一方面,由高压自大肠埃希氏菌(*E. coli*)包含体溶解KSAC蛋白。在另一方面,KSAC蛋白在水溶液中是基本上可溶性的或基本上再折叠。

[0062] 而且,上述的蛋白或多核苷酸的同源物旨在本发明的范围之内。如本文所用,术语“同源物”包括直系同原物,类似物和旁系同原物。术语“类似物”指称具有相同的或类似功能,但在不相关的生物中独立地进化的2种多核苷酸或多肽。术语“直系同原物”指称来自不同物种,但自共同祖先基因通过物种形成进化的2种多核苷酸或多肽。正常情况下,直系同原物编码具有相同的或类似功能的多肽。术语“旁系同原物”指称通过在基因组之内的复制而相关的2种多核苷酸或多肽。旁系同原物通常不具有相同功能,但这些功能可相关。野生型多肽的类似物,直系同原物和旁系同原物可由翻译后修饰,由氨基酸序列差异,或由二者而不同于野生型多肽。尤其是,本发明的同源物会通常与上述多核苷酸或多肽序列的全部或部分呈现至少80~85%, 85~90%, 90~95%或95%, 96%, 97%, 98%, 99%序列同一性,及会呈现类似功能。

[0063] 在一实施方式中,嵌合KSAC蛋白与具有SEQ ID NO:2所示的序列的多肽具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%序列同一性。在另一实施方式中,编码嵌合KSAC蛋白的多核苷酸与具有SEQ ID NO:2所示的序列的多肽具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%序列同一性。在仍另一实施方式中,KSAC编码多核苷酸与具有SEQ ID NO:1所示的序列的多核苷酸具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%序列同一性。

[0064] 术语“同一性”关于序列可指称,例如,同一核苷酸或氨基酸的位置数除以2序列中的较短者中的核苷酸或氨基酸数,其中2序列的比对可根据Wilbur和Lipman算法(Wilbur和Lipman)测定。2个氨基酸序列的序列同一性或序列相似性,或2个核苷酸序列之间的序列同一性可通过使用Vector NTI软件包(Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA)测定。当RNA序列被认为类似,或与DNA序列具有一定程度的序列同一性或同源性时,DNA序列中的胸苷(T)被认为与RNA序列中的尿嘧啶(U)等同。由此,RNA序列在本发明的范围之内,和可源于DNA序列,通过DNA序列中的胸苷(T)被认为与RNA序列中的尿嘧啶(U)等同。

[0065] 公开的多核苷酸包括作为遗传密码,例如,对于特定宿主优化的密码子利用的结果的简并体的序列。如本文所用,“优化的”指称被遗传加工而增加其在给定物种中表达的多核苷酸。为了提供编码KSAC多肽的优化的多核苷酸,可将KSAC蛋白基因的DNA序列修饰为(1)包含由在特定物种中高度表达的基因优选的密码子;(2)包含在核苷酸碱基组成中的A+T或G+C含量至基本上在所述物种中发现的A+T或G+C含量;(3)形成所述物种的起始序列;或(4)消除导致去稳定,不适当的多聚腺苷酸化,RNA的降解和终止,或形成二级结构发夹或RNA剪接位点的序列。所述物种中KSAC蛋白的增加的表达可通过利用在真核生物和原核生物中,或在特定物种中密码子利用的分布频度达到。术语“优选的密码子利用的频度”指称由特定宿主细胞在利用核苷酸密码子而特定给定氨基酸上呈现的偏好。有20种天然的氨基酸,多数由多于一种密码子特定。因此,全部简并核苷酸序列包括在本公开中,只要由核苷酸序列编码的KSAC多肽的氨基酸序列未功能性地变化。

[0066] 在另一实施方式中,本发明提供产生在原核生物或真核生物中表达的可溶性,解聚的,再折叠的或有活性的蛋白的方法,其包括下列步骤:(i)在不含有或含有低浓度的脲

的缓冲剂中制备包含体,以形成包含体悬浮液;及(ii)使包含体悬浮液经历高压一定时间。

[0067] 在仍另一实施方式中,本发明提供产生在原核生物或真核生物中表达的可溶性,解聚的,再折叠的或有活性的蛋白的方法,其包括下列步骤:(i)在不含有或含有低浓度的脲的缓冲剂中制备包含体,以形成包含体悬浮液;(ii)使包含体悬浮液经一定时间经历逐步压力增加;及(iii)使施加到包含体的高压维持一定时间。

[0068] 在实施方式的一方面,缓冲剂可含有二硫代苏糖醇(DTT)。在另一方面,DTT浓度可跨约1mM~约100mM,约1mM~约90mM,约1mM~约70mM,约1mM~约60mM,约1mM~约50mM,或约1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,10mM,15mM,20mM,25mM,30mM,35mM,40mM,45mM,50mM,55mM,60mM,65mM,70mM,75mM,80mM,85mM,90mM,95mM,100mM。

[0069] 一方面,脲可不存在于缓冲剂中。在另一方面,脲可以约1M,约2M,约3M,约4M,约5M,约6M,约7M,约8M,约9M,及约10M的浓度存在于缓冲剂中。

[0070] 在实施方式的另一方面,高压可处于约1000巴~约5000巴,约2000巴~约4000巴。高压可为跨约2000巴~约4000巴的任何压力,例如但不限于2000巴,2100巴,2200巴,2300巴,2400巴,2500巴,2600巴,2700巴,2800巴,2900巴,3000巴,3100巴,3200巴,3300巴,3400巴,3500巴,3600巴,3700巴,3800巴,3900巴和4000巴。

[0071] 在实施方式的另一方面,逐渐压力增加可连续或逐步进行。一方面,将逐渐压力增加通过以恒定速度经时连续增加压力应用于包含体悬浮液,以达到期望的最终高压。例如,将压力以约200巴/min~约1000巴/min的速度经约2min~约10min连续增加至达到2000巴,以约200巴/min~约1000巴/min的速度经约3min~约15min连续增加至达到3000巴,以约200巴/min~约1000巴/min的速度经约4min~约20min连续增加至达到4000巴,以约200巴/min~约1000巴/min的速度经约5min~约25min连续增加至达到5000巴。在另一方面,逐步应用逐渐压力增加。例如,将压力以约1000巴/min增加约1分钟至达到1000巴,然后维持1000巴压力约1小时,以松弛蛋白,在松弛时期之后,以约1000巴/min再次增加压力约1分钟,以达到2000巴的最终期望的高压。压力也可以约1000巴/min增加约30秒至达到500巴,维持500巴压力约1小时而松弛蛋白,然后再次以约1000巴/min增加压力约30秒而达到1000巴,维持1000巴压力约1小时而松弛蛋白,再次以约1000巴/min增加压力约30秒而达到1500巴,维持1500巴压力约1小时而松弛蛋白,然后再次以约1000巴/min增加压力至达到2000巴的最终期望的压力。为了达到3000巴,4000巴和5000巴的最终期望的高压,可采用以约1000巴/min相同的逐步增加压力约1分钟或约30s,伴有蛋白中间松弛约1小时。例如,为达到3000巴的目标压力,以约1000巴/min增加压力约1分钟而达到1000巴,然后维持1000巴压力约1小时而松弛蛋白,再次以约1000巴/min增加压力约1分钟而达到2000巴的压力,然后维持2000巴压力约1小时而第二次松弛蛋白,再次以约1000巴/min增加压力约1分钟而达到3000巴的最终期望的压力。为了达到3000巴的目标压力,压力也可以约1000巴/min增加约30秒,伴有以各500巴的1小时持续时间的平台期,及可在5小时之后达到3000巴的目标压力。为了达到4000巴的最终期望的压力,以约1000巴/min增加压力约1分钟而达到1000巴,然后维持1000巴压力约1小时而松弛蛋白,再次以约1000巴/min增加压力约1分钟而达到2000巴的压力,然后维持2000巴压力约1小时而第二次松弛蛋白,再次以约1000巴/min增加压力约1分钟而达到3000巴的最终期望的压力,然后维持3000巴压力约1小时而第三次松弛蛋白,再次以1000巴/min增加压力约1分钟而达到4000巴的最终期望的压力。为了达到4000

巴的目标压力,压力也可以约1000巴/min增加约30秒,伴有以各500巴的1小时持续时间的平台期,及可在7小时之后达到4000巴的目标压力。

[0072] 包含体悬浮液可在高压下处理约10小时~约100小时,约20小时~约100小时。高压处理优选经久于24小时,例如,经约25小时~约100小时,约25小时~约80小时,约25小时~约60小时,约25小时~约50小时,约25小时,约26小时,约27小时,约28小时,约29小时,约30小时,约31小时,约32小时,约33小时,约34小时,约35小时,约36小时,约37小时,约38小时,约39小时,约40小时,约41小时,约42小时,约43小时,约44小时,约45小时,约46小时,约47小时,约48小时,约49小时,约50小时。

[0073] 在另一实施方式中,本发明提供产生在原核生物或真核生物中表达的可溶性,解聚的,再折叠的或有活性的蛋白的方法,其包括下列步骤:(i)在不含有或含有低浓度的脲的缓冲剂中制备包含体,以形成包含体悬浮液;(ii)使包含体悬浮液经时经历逐渐压力增加;(iii)使施加到包含体的高压维持一定时间;及(iv)通过减压回收蛋白。

[0074] 减压可以约83巴/hr-200巴/hr的速度实施。

[0075] 在本发明中涵盖的原核生物可包括禽杆菌属(*Avibacterium*),布鲁氏菌属(*Brucella*),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),嗜血杆菌属(*Haemophilus*) (例如,猪嗜血杆菌(*Haemophilus suis*)),沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如,肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*),鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),婴儿沙门氏菌(*Salmonella infantis*)),志贺菌属(*Shigella*),巴斯德菌属(*Pasteurella*)和里默氏杆菌属(*Riemerella*)。

[0076] 在原核生物系统中,可选择许多表达载体。该载体包括,但不限于,多功能大肠埃希氏菌(*E. coli*)克隆及表达载体,诸如PBLUESCRIPT (Stratagene);piN载体(Van Heeke & Schuster, *J. biol. chem.* 264:5503-5509 (1989));等;PGEX载体(Promega, Madison, Wis.);在真核生物系统中,细胞系可为酵母(诸如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)),杆状病毒细胞,哺乳动物细胞,植物细胞。真核生物表达载体系统包括,但不限于,pVR1020或pVT1012载体(Vical Inc., San Diego, CA), *Pichia* Pink载体(Invitrogen, CA, USA), pFasBac TOP0载体(Invitrogen)。

[0077] 在本发明中提供的产生在原核生物或真核生物中表达的可溶性,解聚的,再折叠的或有活性的蛋白的方法可用于溶解任何蛋白。蛋白可包括抗体和胰岛素。

[0078] 在另一实施方式中,本发明提供组合物或疫苗,其包含上述的嵌合KSAC蛋白及药学或兽医学地可接受的载体,赋形剂,媒质或佐剂。

[0079] 药学或兽医学地可接受的载体或佐剂或媒质或赋形剂为本领域技术人员所熟知。可用于本发明的方法的药学或兽医学地可接受的载体或佐剂或媒质或赋形剂包括,但不限于,0.9%NaCl (例如,盐水)溶液或磷酸缓冲液,聚-(L-谷氨酸)或聚乙烯吡咯烷酮。药学或兽医学地可接受的载体或媒质或赋形剂可为辅助载体施用(或自本发明的载体体外表达的蛋白),或辅助载体转染或感染和/或改善保存(或蛋白)的任何化合物或化合物的组合。剂量和剂量体积在本文在一般描述中讨论,和也可由本领域技术人员读本公开结合本领域知识确定,无需任何过度实验。

[0080] 任选地,其他化合物可作为药学或兽医学地可接受的载体或佐剂或媒质或赋形剂添加,包括但不限于矾; CpG寡核苷酸(ODN),尤其是ODN 2006, 2007, 2059或2135

(Pontarollo R.A. et al., Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84:43-59; Wernette C.M. et al., Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84:223-236; Mutwiri G. et al., Vet. Immunol. Immunopath, 2003, 91:89-103); 多聚A-多聚U, 二甲基二-十八烷基铵溴化物 (DDA) (“Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach”, edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, 6:p.03, p.157); N,N-二-十八烷基-N', N'-双(2-羟乙基)丙烷二胺 (诸如**阿夫立定®**) (Ibid, p.148); 卡波姆, 壳聚糖 (例如见美国专利No. 5,980,912)。

[0081] 本发明的药物组合物和疫苗可包含一种或更多佐剂或基本上由一种或更多佐剂组成。在本发明的实践中使用的适合的佐剂是 (1) 丙烯酸或甲基丙烯酸, 马来酸酐的聚合物和烯基衍生聚合物, (2) 免疫刺激序列 (ISS), 诸如具有一个或更多非-甲基化的CpG单元的寡脱氧核糖核苷酸序列 (Klinman等人, 1996; W098/16247), (3) 水包油乳剂, 诸如描述于由 M. Powell, M. Newman, Plenum出版社于1995出版的“Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach”的p 147的SPT乳剂, 及描述于相同的文献的p 183的乳剂MF59, (4) 含有季铵盐的阳离子脂质, 例如, DDA (5) 细胞因子, (6) 氢氧化铝或磷酸铝, (7) 皂苷或 (8) 本申请引用的及通过引用合并入本申请的任何文献中讨论的其他佐剂, 或 (9) 其任何组合或混合物。

[0082] 在一实施方式中, 在蒸馏水中制备佐剂, 尤其卡波姆 (Pharmeuropa, vol. 8, No. 2, 1996年6月) 溶液, 有利地在氯化钠的存在下, 获得的溶液处于酸性pH。通过向含NaCl的水, 有利地生理学盐水 (NaCl 9g/l) 同时以几部分添加此浓储物溶液至期望的量 (为获得期望的终浓度), 或其实质性部分来稀释, 相伴或随后中和 (pH7.3~7.4), 有利地用NaOH。将生理学pH的此溶液用于与疫苗混合, 其可尤其以冷冻干燥的, 液体或冷冻的形式存储。聚合物浓度在最终疫苗组合中可为0.01%~2%w/v, 0.06~1%w/v, 或0.1~0.6%w/v。

[0083] 可将亚单位 (蛋白) 疫苗与佐剂组合, 如基于矿物油和/或植物油的水包油, 水包油包水乳剂和非离子表面活性剂诸如嵌段共聚物, **TWEEN®**, **SPAN®**。该乳剂显著地是描述于“Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach”, 药学生物技术, 1995的第147页的那些或TS乳剂, 显著地TS6乳剂, 及LF乳剂, 显著地LF2乳剂 (关于TS和LF乳剂, 见W0 04/024027)。其他适合的佐剂是例如维生素E, 皂苷和**卡波泊爾®** (Noveon; 见W0 99/51269; W0 99/44633), 氢氧化铝或磷酸铝 (“Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach”, 药学生物技术, vol. 6, 1995), 生物学佐剂 (即.C4b, 显著地鼠C4b (Ogata R T等人) 或马科动物C4b, GM-CSF, 显著地马科动物GM-CSF (US 6,645,740)), 毒素 (即霍乱毒素CTA或CTB, 大肠埃希氏菌 (Escherichia coli) 热-不稳定的毒素LTA或LTB (Olsen C W等人; Fingerut E等人; Zurbriggen R等人. peppoloni S等人), 及CpG (即.CpG# 2395 (见Jurk M等人), CpG#2142 (见EP 1,221,955中的SEQ ID NO:890))。

[0084] 本发明的另一方面涉及在动物中针对一种或更多抗原诱导免疫学应答或在动物中针对一种或更多病原体诱导保护性应答的方法, 该方法包括用本发明的疫苗或药物组合物接种动物至少一次。本发明的仍另一方面涉及以初施-追施方案在动物中针对一种或更多抗原诱导免疫学应答, 或在动物中针对一种或更多利什曼原虫属 (Leishmania) 病原体诱导保护性应答的方法, 其包括使用至少一种常见的多肽, 抗原, 表位或免疫原至少一次初次

施用和至少一次追加施用。在初次施用中使用的免疫学组合物或疫苗可与用作追加施用的那些在性质上相同,可不同。初次施用可包括一次或更多施用。类似地,追加施用可包括一次或更多施用。初施-追施可每2~6周间隔,例如,约3周间隔实施。根据一实施方式也考虑,每半年追加或每年追加,有利地使用亚单位(蛋白)疫苗。

[0085] 初施-追施可包括亚单位疫苗或组合物,其包含上述的嵌合KSAC蛋白。初施-追施也可包括表达利什曼原虫属(*Leishmania*)抗原的重组病毒载体和质粒载体(见,例如,US2009/0324649,其通过引用以其整体在本文合并)。在初施-追施方案的一方面,施用包含KSAC蛋白的组合物或疫苗,之后施用包含含有及表达任何利什曼原虫属(*Leishmania*)抗原的重组病毒载体的疫苗或组合物,或含有及表达任何利什曼原虫属(*Leishmania*)抗原的DNA质粒疫苗或组合物,或包含利什曼原虫属(*Leishmania*)抗原的灭活的病毒疫苗或组合物。

[0086] 通常,在10~15周龄由皮下或肌内途径实施一次疫苗施用。可在第1次施用的2~6周之内进行第2或第3次施用。动物在第1次施用时间优选是至少4周龄。

[0087] 除了皮下或肌内之外,可使用各种施用途径,诸如真皮内或透皮。

[0088] 本发明的组合物或疫苗包含对于引发治疗性应答有效量的一种或更多在本文讨论的多肽或基本上由对于引发治疗性应答有效量的一种或更多在本文讨论的多肽组成或由对于引发治疗性应答有效量的一种或更多在本文讨论的多肽组成;及,有效量可从本公开确定,包括在本文合并的文献,及本领域知识,无需过度实验。

[0089] 对于本发明的包含表达的KSAC蛋白的组合物或疫苗,剂量可包括,约1 $\mu$ g~约2000 $\mu$ g,约5 $\mu$ g~约1000 $\mu$ g,约10 $\mu$ g~约100 $\mu$ g,约20 $\mu$ g~约1000 $\mu$ g,约30 $\mu$ g~约500 $\mu$ g,或约50 $\mu$ g~约500 $\mu$ g。剂量体积可在约0.1ml~约10ml之间,或约0.2ml~约5ml之间。

[0090] 本发明还会由以下非限制性实施例的方式描述。

### 【实施例】

[0091] DNA插入子,质粒和重组病毒或植物载体的构建使用由J. Sambrook等人(分子克隆:实验室手册,第2版,冷泉港实验室,冷泉港,纽约,1989)描述的标准分子生物学技术实施。

[0092] **【实施例1:大肠埃希氏菌(*E. coli*)包含体中表达的KSAC蛋白的增溶】**

[0093] 在以下3缓冲剂中制备自大肠埃希氏菌(*E. coli*)产生的KSAC包含体:(1) Tris 20mM, 50mM二硫代苏糖醇(DTT), pH8;(2) Tris 20mM, 50mM二硫代苏糖醇(DTT), pH8, 脲1M;(3) Tris 20mM, 50mM二硫代苏糖醇(DTT), pH8, 脲2M。将于室温、在整个处理持续时间期间无压力地在相同的缓冲剂中制备的KSAC包含体用作对照。

[0094] 图3显示在压力增加(逐步压力增加)期间用于蛋白松弛的压力水平的步骤。实施以目标压力加压48小时,然后对样品减压24小时。

[0095] 图4显示自包含体的重组蛋白的高压增溶及折叠和自包含体的重组蛋白的典型增溶及折叠之间的示意比较。

[0096] 图5显示KSAC再折叠的示意图。图6显示在将KSAC蛋白在7M脲, 20mM DTT中溶解和通过排除层析再折叠之后,KSAC蛋白的典型SDS-PAGE图案。图7显示KSAC蛋白的典型HPLC标绘图。HPLC层析谱由其质量鉴定KSAC蛋白的三聚体。估计对于总蛋白含量的蛋白浓度和相

对纯度。图8显示使用排除层析的再折叠的KSAC蛋白的动态光散射 (DLS)。图8A显示由数的分布,其表明大多数群具有12~18nm的尺寸。图8B显示未与相对群关联的测量的尺寸的全范围。检测10和800nm之间的对象。

[0097] 以3000巴加压的包含体和对照样品的Q点印迹(图9)和SDS-PAGE(图10)分析显示,全部蛋白处于在全部3种缓冲剂中处理的样品的上清液相中,其指示蛋白被溶解。

[0098] 对照(图11上图)和全部3000巴处理的样品(图11下图)的上清液的HPLC层析谱的叠加显示,在对照中检测不到蛋白,而在压力处理之后检测存在于包含体中的KSAC蛋白和全部其他蛋白,其表示全部蛋白在压力处理之后溶解。

[0099] 图12是3000巴压力处理的KSAC样品和用典型再折叠过程获得的KSAC蛋白的上清液的重叠的HPLC层析谱。结果显示,峰类似,由高压处理获得的可溶性蛋白组织为三聚体。

[0100] 下表1显示在3000巴处理之后KSAC蛋白由定量点印迹和HPLC的定量。

[0101] 表1

[0102]

	<b>2M 脲</b>		
	<b>对照</b>	<b>测定沉淀</b>	<b>测定上清</b>
<b>点印迹 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>347</b>	<b>10</b>	<b>797</b>
<b>HPLC <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	-	-	<b>723</b>
	<b>1M 脲</b>		
	<b>对照</b>	<b>测定沉淀</b>	<b>测定上清</b>
<b>点印迹 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>328</b>	<b>10</b>	<b>750</b>
<b>HPLC <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	-	-	<b>746</b>
	<b>无脲</b>		
	<b>对照</b>	<b>测定沉淀</b>	<b>测定上清</b>
<b>点印迹 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>123</b>	<b>15</b>	<b>649</b>

[0103]

<b>HPLC <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	-	-	<b>825</b>
---	---	---	------------

[0104] 溶解的蛋白量是约800 $\mu\text{g/ml}$ 。此非常接近作为包含体的初始KSAC蛋白的估计的量(1000 $\mu\text{g/ml}$ )。增溶产率非常高(75~100%)。

[0105] 图13显示用无脲的缓冲剂中的3000巴加压的蛋白(较浅线)和用典型再折叠过程获得的蛋白(较深线)获得的DLS数据的叠加。尺寸的全范围(上图)显示在加压的样品中检测到更高尺寸的更少对象。由数的分布(下图)显示,大多数压力-再折叠的群与由典型过程再折叠的群具有类似尺寸,且折叠似乎非常类似。

[0106] 图14显示对于使用的全部3种缓冲剂,以3000巴获得的蛋白尺寸与自典型层析再折叠获得的蛋白尺寸相同(圆形化的)。当以2000巴处理时,当将脲用于缓冲剂时,蛋白尺寸与自典型层析再折叠蛋白尺寸相同。在大于3000巴的压力下,当不使用脲时,高压聚集物呈现。当脲存在于缓冲剂中时,蛋白似乎崩溃(尺寸10nm),其指示发生了变性。

[0107] 图15显示4000巴处理的样品的HPLC层析谱。结果显示,当缓冲剂中不存在脲时,或仅将1M脲加入缓冲剂中时,呈现相比KSAC蛋白更大尺寸的蛋白。当将2M加入缓冲剂中时,蛋

白尺寸如预期。

[0108] 图16显示无脬的5000巴处理的样品的由数的DLS粒度分布。结果指示,3群的蛋白被检测具有达90nm的大尺寸。其尺寸类似于层析再折叠的KSAC的群是少数。

[0109] 图17显示由HPLC和定量点印迹测定的KSAC可溶性蛋白含量的比较。结果指示,用3000巴处理的样品获得最大浓度的溶解的蛋白,在HPLC和定量点印迹技术之间具有良好一致性。对于2000巴处理的样品,脬的存在辅助增加增溶产率。对于4000巴处理的样品,HPLC相比定量点印迹提供更高产率,指示抗原识别的损失。

[0110] 【实施例2:使用KSAC疫苗的狗的疫苗接种】

[0111] 在此研究,对49只15周龄小猎犬狗根据以下流程进行免疫接种。

[0112] 表2

[0113]

组	疫苗接种 在 D0, D21, D42 及 M12 (追加)1ml (10 $\mu$ g) SC	疫苗后测量***	为免疫学测量的采血
免疫接种的 (n=24)	KSAC*/GLA-SE**	-D0+4/6h, D1, D2 ● D21+4/6h, D22 和 D23 ● D42+4/6h, D43 和 D44 ● M12+1天和+3天	D0, D28, D35, D50, D56
对照(n=25)	安慰剂		

[0114] \*KSAC:Tris缓冲剂中纯化的KSAC蛋白(20mM,pH=8),10 $\mu$ g/ml

[0115] \*\*GLA-SE:水包油乳剂(4%油)

[0116] \*\*\*只要检测到任何迹象,就实施疫苗后测量

[0117] 在疫苗接种(在D77)之后,将狗转移到南意大利,在犬科动物利什曼病的高发地区,测试达15个月(M15)。疫苗后测量包括直肠温度,一般病情(见表3),触诊疼痛(存在/缺失),皮肤热(存在/缺失),瘙痒(存在/缺失)及肿胀的评估。肿胀评分如下:0=无肿胀,1=较少肿胀(仅可检测的),2=肿胀、但<2cm,3=肿胀>2cm。

[0118] 疫苗后测量显示,在观察时期期间检测到无主要迹象(持续疼痛,重要瘙痒)。

[0119] 表3:在犬科动物利什曼病测量期间评价的临床体征及总体临床分值(OCS)的计算

[0120]

临床体征	测量	评分
身体条件(见附件3)	中等, 强壮或肥胖	0
	瘦	1
	瘦弱的	3
通用的条件	良好=玩耍及有注意力的健康状态良好的动物	0
	冷漠=缺乏能量(相比其正常行为)的动物或躺着但应答刺激的动物	1
	抑郁=躺着而不应答刺激的动物	3
皮肤迹象	缺失	0
	两侧对称脱发	1
	溃疡/结瘤	2
	剥脱性皮炎	3
眼迹象	缺失	0

[0121]

	眼睑炎和/或结膜炎和/或角膜炎	1
	葡萄膜炎	2
鼻出血	缺失	0
	存在	3
关节炎	缺失	0
	存在	1
淋巴结和/或脾脏肿大	缺失	0
	淋巴结肩胛骨前或下颌后淋巴结及咽淋巴结-3 两侧肿大和/或脾脏肿大-3	3

[0122] 对于各类别, 仅在总体临床分值(OCS)的计算中考虑最高分值。对7类别的分值求和, 以测定OCS。

[0123] OCS数据指示, 在M15之前检测不到OCS的主要异常。

[0124] 感染模式分类为4类(Oliva et al.2006, J of Clin Microbiol 44:1318-22) 及依赖于是否基于培养的分析是阳性或阴性而再分组为非-建立的(别名非有活性的)和有活性的感染。

[0125] 表4: 用于根据它们的寄生物学, 血清学和临床体征而对狗分类的术语

[0126]

	健康	PCR 阴性 培养阴性 血清阴性
非建立的感染	亚显著	PCR 阳性 培养阴性 血清阴性或阳性
有活性的感染	无症状	PCR 阳性 培养阳性 血清阳性 健康
	有症状	PCR 阳性 培养阳性 血清阳性 临床和/或生物学迹象

[0127] PCR=对脾脏抽吸物的qPCR

[0128] 培养=对淋巴结抽吸物培养或对脾脏抽吸物LDA

[0129] 血清=由IFAT的血清学研究

[0130] 临床和/或生物学迹象=非无效OCS

[0131] 如由Oliva等人(2006)定义实施寄生物学和血清学测定以评价狗的状态。根据Gradoni等人(2005,Vaccine 23:5245-5251)实施对骨髓的套式PCR,对淋巴结抽吸物的培养。根据源于OIE的技术(2004,Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals,第5版OIE,巴黎)实施IFAT(免疫荧光抗体测试)血清滴度测试。通过使用分别源于Bretagne等人(2001,Clin Diagn Lab Immunol 8:828-831)和Hill等人(1983,Infect Immun 39:1087-1094)的方法实施对脾脏抽吸物的定量PCR和LDA(有限稀释测定)。

[0132] 表5:对淋巴结抽吸物的培养及对在M8,M12和M15收集的指示有活性的感染的样本实施的LDA的结果

[0133]

	M8		M12		M15	
免疫接种的组(24只狗)	培养 LN	LDA 脾脏	培养 LN	LDA 脾脏	培养 LN	LDA 脾脏
Neg	23	21 (2 NT*)	23	22	21	22
Pos	1	1	1	2	3	2
对照组(25只狗)						
Neg	24	24	23	19	16	15
Pos	1	1	3	6	9	10

[0134] \*NT:未测试的

[0135] 表6:对在M8,M12和M15收集的样本实施的血清学(IFAT)和寄生物学测定(对骨髓

抽吸物的nPCR及对脾脏抽吸物的定量PCR)的结果

[0136]

	M8			M12			M15		
	IFAT	nPCR BM	Q-PCR 脾脏	IFAT	nPCR BM	Q-PCR 脾脏	IFAT	nPCR BM	Q-PCR 脾脏
免疫接种的 组(24只狗)									
Neg	23	23	33 (1 NT)	21	21	21	20	16	21
Pos	1	1	1	3	3	3	4	8	3
对照组(25 只狗)									
Neg	24	24	23	21	15	17	28	10	15
Pos	1	1	2	4	10	8	7	15	10

[0137] 除了表6中做的测试之外,也对免疫接种的及对照狗二者,对在M0(对应于疫苗诱导的抗体应答的峰的时间)收集的样品测量IFAT滴度,及全部样品被发现是阴性。

[0138] 表7:根据表4中定义的类的狗的再划分

[0139]

		M8		M12		M15	
		Con*	Vac**	Con*	Vac**	Con*	Vac**
	健康	23	23	16	21	15	21
非建立的感染	亚显著	1	0	3	1	0	0
有活性的感染	无症状	1	1	6	2	8	1
	有症状	0	0	0	0	2	2

[0140] Con\*:对照

[0141] Vac\*\*:免疫接种的

[0142] 结果指示在对照狗之中高比例的有效感染的狗(在M15,40%,10/25)及在免疫接种的狗之中更低比例的有效感染的狗(在M15,12.5%,3/24)。

[0143] 研究显示,在15个月之后,在病区,对比对照狗,在免疫接种的狗中观察到有效利什曼原虫属(Leishmania)感染的狗的比例的减小(即疫苗功效)。疫苗功效评价为69%。这些结果与免疫接种的狗中寄生虫感染的显著对照一致。

[0144] 结果也展示,用亚单位KSAC疫苗的疫苗接种不干扰IFAT血清学测试。此支持在病区疫苗接种而不干扰持续的流行病学研究和临床评定狗的可能性。

[0145] 【实施例3:不同的溶解KSAC蛋白的过程的比较】

[0146] 研究目的是比较由不同过程溶解来自包含体的蛋白的效率。

[0147] 在以下缓冲剂中制备自大肠埃希氏菌(E.coli)产生的KSAC包含体,以形成包含体悬浮液:(a)20mM Tris缓冲剂,50mM二硫苏糖醇(DTT),pH=8.0;(b)20mM Tris缓冲剂,pH=8.0。

[0148] 在速封管中存储包含体悬浮液,用于以下描述的高压处理。

[0149] 在工序A中,将逐步加压应用于包含体悬浮液,将压力以1000巴/min从0巴增加至3000巴,具有各500巴的1小时持续时间的平台期(在5小时后达到3000巴的目标压力)。维持3000巴压力48小时。然后将样品经24小时以125巴/hr的恒定速度自3000巴减压至0巴。

[0150] 在工序B中,根据描述于US 6,489,450的方法处理包含体悬浮液。使样品在1小时内经历以恒定速度的加压达2500巴。维持2500巴压力6小时。以恒定速度实施减压1小时,将压力自2500巴减小至0巴。

[0151] 如下表8显示制备样品。

[0152] 表8:包含体悬浮液处理

[0153]

样品 (1mg/mL KSAC包含体)	缓冲剂	高压处理过程
1	Tris 20mM	工序A
2	Tris 20mM+DTT 50mM	工序A
3	Tris 20mM	对照*
4	Tris 20mM+DTT 50mM	对照
5	Tris 20mM	工序B
6	Tris 20mM+DTT 50mM	工序B
7	Tris 20mM	对照
8	Tris 20mM+DTT 50mM	对照

[0154] 对照\*:无高压处理,于室温存储。

[0155] 【SDS-PAGE分析】

[0156] 在高压处理之后,将样品离心,以分离上清液和沉淀,及进行处理,为在SDS-PAGE上蛋白分析。SDS-PAGE分析显示于图18A和18B。各孔装载5 $\mu$ l的样品(粗产物),5 $\mu$ l的上清液,5 $\mu$ l的在Tris缓冲剂中重悬浮的沉淀。

[0157] 自SDS-PAGE上的条带强度计算的KSAC蛋白量显示于下表9。

[0158] 表9:SDS凝胶上测量的条带强度的比较性整合

[0159]

样品	工序 A				工序 B			
	I.I. KSA C 条带	总蛋 白 I.I.	%KSA C /总	%KSAC-S /%KSAC-P*	I.I. KS AC 条带	总蛋 白 I.I.	%KSAC /总	%KSAC-S /%KSAC-P
KSAC 参照	36	49	73%		29	47	62%	
对照- 无 DTT	S <sup>1</sup> P <sup>2</sup> C <sup>3</sup>	0 13 3	0% 50% 14%	-	0 4 6	0 5 16	0% 80% 38%	-
处理- 无 DTT	S P C	0 43 27	0% 57% 31%	0%	0 28 14	2 39 41	0% 72% 34%	0%
对照- 有 DTT	S P C	1 20 16	8% 50% 52%	-	0 24 22	0 36 37	0% 67% 59%	-
处理- 有 DTT	S P C	55 8 45	43% 57% 42%	75%	18 8 28	29 9 47	62% 89% 60%	69%
KSAC 参照	38	52	73%		29	45	64%	

[0160] S<sup>1</sup>:上清液

[0161] P<sup>2</sup>:压粒

[0162] C<sup>3</sup>:粗产物,在离心之前

[0163] %KSAC-S/%KSAC-P\*: [上清液中的%KSAC/总和]/[沉淀中的%KSAC/总和]

[0164] 结果显示,在对照或当使用不含有DTT的缓冲剂时用工序A和B处理的样品的上清液中未检测到显著量的KSAC。可溶性KSAC蛋白见于当使用含有DTT的缓冲剂时用高压(二者工序A和B)处理的样品的上清液。意外地,自SAS-PAGE的蛋白定量结果也指示,工序A相比工序B提供更佳增溶。此惊人结果还通过使用Q-点印迹和HPLC的各高压过程的增溶产率的更精确的计算确认。

[0165] 【Q-点印迹分析】

[0166] 由Q-点印迹分析样品的上清液,以估计由处理溶解的KSAC蛋白的量。结果显示于图19A~19D和表10。

[0167] 表10:对照和高压处理的样品的见于上清液的溶解的KSAC的浓度

[0168]

鉴定	工序A	工序B
不用DTT处理	26.0g/ml	12.7g/ml
不用DTT对照	0	9.9g/ml
用DTT处理	632.1g/ml	368.9g/ml
用DTT对照	61.7g/ml	63.9g/ml

[0169] 在含及不含DTT的对照样品(无高压处理)之间未观察到显著差异。在上清液中未发现可溶性KSAC。Q-点印迹结果确认了SDS-PAGE结果。

[0170] 通过使用含DTT的过程A实施的处理允许KSAC蛋白的溶解及再折叠(由Q-点印迹检测)。通过使用过程A获得的可溶性KSAC蛋白的浓度发现是632μg/mL,而通过使用过程B获得的KSAC蛋白的浓度仅是约369g/mL。工序A获得的增溶产率是63%,和工序B获得的增溶产率是37%。Q-点印迹结果还展示,工序A在产生可溶性及再折叠的蛋白中更有效。

[0171] 【HPLC分析】

[0172] 图20显示对照和工序A处理的样品的上清液的HPLC层析谱的叠加。工序A处理的样品获得的滞留时间,保留体积及估计的纯度显示于下表11。

[0173] 表11:工序A处理的样品获得的滞留时间,保留体积及估计的纯度

[0174]

检测	信息	对照-无处理	工序 A 之后
UV	RT (滞留时间-min)	12.7	12.4
	VR (保留体积-mL)	6.64	6.46
	估计的纯度(%)	17.3	85.5

[0175] 图21显示工序A处理的样品和工序B处理的样品的上清液的HPLC层析谱的叠加。工序A处理的样品获得的滞留时间,保留体积及估计的纯度显示于下表12。

[0176] 表12:工序A和B处理的样品获得的滞留时间,保留体积及估计的纯度

[0177]

检测	信息	工序 A	工序 B
UV	RT (滞留时间-min)	12.4	12.4
	VR (保留体积-mL)	6.46	6.47
	估计的纯度(%)	85.5	74.2

[0178] 图22显示工序A处理的样品,工序B处理的样品和典型过程处理的样品(由脲和DTT处理获得的变性及再折叠)的上清液的HPLC层析谱的叠加。工序A处理的样品获得的滞留时间,保留体积及估计的纯度显示于下表13。

[0179] 表13:工序A,工序B和典型过程处理的样品获得的滞留时间,保留体积及估计的纯度

[0180]

检测	信息	典型工序	工序 A	工序 B
UV	RT (滞留时间-min)	12.5	12.4	12.4
	VR (保留体积-mL)	6.50	6.46	6.47
	峰面积 (mAU)	8628	25251	10506
	估计的纯度(%)	94.7	85.5	74.2

[0181] HPLC结果还确认,自峰面积判断,工序A相比工序B提供KSAC蛋白的更佳增溶(工序A是25251mAU,对比工序B是10506mAU)。工序A和B允许获得非常接近通过使用典型过程获得的再折叠的KSAC蛋白的再折叠(使用脲+DTT处理的增溶及由SEC层析的再折叠)。

[0182] 用工序A和B实施的试验在DTT缺失下未产生显著的可溶性KSAC蛋白。结果确认,在高压处理期间需要还原剂,以断裂二硫键。但是,预料不到的惊人发现是无需为了获得蛋白的正确的再折叠而去除DTT。与为了使蛋白适当地再折叠而不得不从缓冲剂除去DTT的一般知识相反,申请人意外地发现,在本发明的高压处理中,DTT的存在不干扰再折叠过程。自本发明的高压过程获得的KSAC可溶性蛋白在DTT的存在下正确地再折叠而形成三聚体。

[0183] \*\*\*

[0184] 虽已详细描述了本发明的优选的实施方式,需知,由以上实施例定义的本发明不限于以上描述给出的特定细节,由于在不离开本发明的精神或范围内,许多其明显的变异是可能的。

[0185] 在本文引用的或参考的全部文献(“在本文引用的文献”),及在本文引用的文献中引用的或参考的全部文献,以及本文或通过引用在本文合并的任何文献提及的任何产物的任何生产商的使用说明,描述,产品说明书,及产品书页通过引用在本文合并,及可在本发明的实践中采用。

## 序列表

&lt;110&gt; 梅里亚有限公司

&lt;120&gt; 嵌合KSAC蛋白的表达和由高压产生可溶性蛋白的方法

&lt;130&gt; MER 12-196

&lt;150&gt; 61/694,968

&lt;151&gt; 2012-08-30

&lt;150&gt; 61/830,425

&lt;151&gt; 2013-06-03

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3012

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; KSAC DNA

&lt;400&gt; 1

```

atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgceggaca agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgcga tgatcaagga acacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccgg tccaagacta gttccgcccgg tggcccgtgag 300
accgcgccga cgaacctgat tcgtcgccgc aacaaggacg agacaaacgg ggatgtcagc 360
gccgccgccc accgcttccg cgaccgcttc gagaaggcaa ccctcgagga gcgcaaggcc 420
gccaccacga cgatggtcaa cgagtactac gacctggtga cggacttcta cgagtacggc 480
tggggccaga acttccattt cgcgccgcgc tacgccggcg agaccttctt cgagtccctc 540
gcgcgccacg agtacttctt ggccgctcgc ggcggttca tggagggcga ccacatcgtc 600
gacgtgggct gcggcgtcgg cggtcggcg cgcaacatgg ttcgcctcac gcgctgcaac 660
gtcatcggcg tcaacaacaa cgattaccag atcagccgcg ctgcgccgta tgacgcgctc 720
gccggtatga gctccaagat cgactacgtc aagaccgact tctgcaacat gagcttagcc 780
gacaacacct tcgacggcgc ctacgccate gaggccacct gccacgcaa ggacaaggtc 840
aagtgtctata gcgaggtctt ccgtgtcctc aagcccggca cctgctttgt cctgtacgag 900
tggtgcatga ccgacaagta caacccaat gacgagtacc accgcacaat caagcaccgc 960
atcgagctgg gcgacggcct gccggagatg gagacgtgca aacaggtgat cgagtacatg 1020
aagcaggccg gcttcgtggt ggaggaggcc atagacgtca tcagtcagtt cgagtccagc 1080
cccatcaaga gtatcccgtg gtaccagccg ctggtcggcg actattcgtc cctgcagggc 1140
ctgcgctcta ccccgattgg ccgcatectc acgaacgtca tgtgtcgcgt gctggagttc 1200
gtgcgcctag ctccgaaggg cacgtacaag gcgacggaga ttttgaggga ggctgcggaa 1260

```

agcctggtgg tgggcggtca gctcggcacc ttcacgcegt cettctacat ccgcgctcgc 1320  
 aagccgtcca agcaggctgg atccaagatc cgcagegtgc gtccgcttgt ggtgttgctg 1380  
 gtgtgcgtcg cggcgggtgct cgcaactcagc gcctccgctg agccgcacaa ggcggccggtt 1440  
 gacgtcggcc cgctgagcgt tggcccgcag agcgtcggcc cgctgagcgt tggcccgcag 1500  
 gcggttggcc cgctgagcgt tggcccgcag agcgtcggcc cgctgagcgt tggcccgcag 1560  
 gcggttggcc cgctgagcgt tggcccgcag agcgttggcc cgctgagcgt tggcccgcag 1620  
 agcgttggcc cgcagagcgt tggcccgcag agcgttggca gccagagcgt cggcccgcag 1680  
 agcgttggtc cgcagagcgt cggcccgcag agcgttggcc cgcaggcggg tggcccgcag 1740  
 agcgttggcc cgcagagcgt cggcccgcag agcgttggcc cgcaggcggg tggcccgcag 1800  
 agcgttggcc cgcagagcgt tggcccgcag agcgttggcc cgcagagcgt tggcccgcag 1860  
 agcgttggca gccagagcgt cggcccgcag agcgttggtc cgcagagcgt cggcccgcag 1920  
 agcgttggcc cgcagagcgt cggcccgcag agcgttggcc cgcagagcgt cggcccgcag 1980  
 agcgttggtc cgcagagcgt tggcccgcag agcgttggcc cgcagagcgt tgacgttagc 2040  
 ccggtgagcg gatccgaatt cgatgcggtg gactggcgcg agaaggcgc cgtgacgccg 2100  
 gtgaagaatc aaggcgcgtg cgggtcgtgc tgggcttct cggcggtcgg caacatcgag 2160  
 tcgcagtggg cccgtgccgg ccacggcttg gtgagcctgt cggagcagca gctggtgagc 2220  
 tgcgatgaca aagacaatgg ctgcaacggc gggctgatgc tgcaggcgtt cgagtggctg 2280  
 ctgcgacaca tgtacgggat cgtgttcacg gagaagagct acccctacac gtccggcaac 2340  
 ggtgatgtgg ccgagtgtt gaacagcagt aaactcgttc ccggcgcgca aatcgacggc 2400  
 tacgtgatga tcccagcaa cgaaacggtt atggctgcgt ggcttgcgga gaatggcccc 2460  
 atcgcgattg cggctcagc cagctcctc atgtcttacc agagcggcgt gctgaccagc 2520  
 tgcgctggcg atgcactgaa ccacggcgtg ctgctcgtcg ggtacaacaa gaccggtggg 2580  
 gttccgtact ggggtgatcaa gaactcgtgg ggtgaggact ggggcgagaa gggctacgtg 2640  
 cgcgtggtca tggggctgaa cgcgtgcctg ctgagtgaat acccctgttc cgcgcatgtg 2700  
 ccgcgagtc tcaccctgg cccgggcacg gagagcagg agcgcgcccc taaacgggtg 2760  
 acggtggagc agatgatgtg caccgatatg tactgcaggg aggggtgcaa gaagagtctt 2820  
 ctcaccgcga acgtgtgcta caagaacggg ggaggcggct cctctatgac gaagtgcggt 2880  
 ccgcagaagg tgctgatgtg ctcgtactcg aaccctcatt gctttgttcc tgggctgtgc 2940  
 ctcgagactc ctgatggcaa gtgcgcgccg tacttcttgg gctcgateat gaacacctgc 3000  
 cagtacacgt aa 3012

<210> 2

<211> 1003

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KSAC 蛋白

<400> 2

Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp

1

5

10

15

Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala  
 20 25 30  
 Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr  
 35 40 45  
 Glu Lys Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys  
 50 55 60  
 Lys Met His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys Thr Ser Ser Ala  
 85 90 95  
 Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Thr Asn Leu Ile Arg Arg Arg Asn Lys  
 100 105 110  
 Asp Glu Thr Asn Gly Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Arg Phe Arg Asp  
 115 120 125  
 Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala Thr Thr Thr  
 130 135 140  
 Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr Glu Tyr Gly  
 145 150 155 160  
 Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly Glu Thr Phe  
 165 170 175  
 Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala Arg Gly Gly  
 180 185 190  
 Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Cys Gly Val Gly Gly  
 195 200 205  
 Pro Ala Arg Asn Met Val Arg Leu Thr Arg Cys Asn Val Ile Gly Val  
 210 215 220  
 Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ser Arg Ala Arg Arg His Asp Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Met Ser Ser Lys Ile Asp Tyr Val Lys Thr Asp Phe Cys Asn  
 245 250 255  
 Met Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Asp Gly Ala Tyr Ala Ile Glu Ala  
 260 265 270  
 Thr Cys His Ala Lys Asp Lys Val Lys Cys Tyr Ser Glu Val Phe Arg  
 275 280 285  
 Val Ile Lys Pro Gly Thr Cys Phe Val Leu Tyr Glu Trp Cys Met Thr  
 290 295 300  
 Asp Lys Tyr Asn Pro Asn Asp Glu Tyr His Arg Thr Ile Lys His Arg  
 305 310 315 320  
 Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Cys Lys Gln Val

	325	330	335
Ile Glu Tyr Met Lys Gln Ala Gly Phe Val Val Glu Glu Ala Ile Asp			
	340	345	350
Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile Pro Trp Tyr			
	355	360	365
Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu Arg Ser Thr			
	370	375	380
Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Cys Arg Val Leu Glu Phe			
385	390	395	400
Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu Ile Leu Glu			
	405	410	415
Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly Ile Phe Thr			
	420	425	430
Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln Ala Gly Ser			
	435	440	445
Lys Ile Arg Ser Val Arg Pro Leu Val Val Leu Leu Val Cys Val Ala			
	450	455	460
Ala Val Leu Ala Leu Ser Ala Ser Ala Glu Pro His Lys Ala Ala Val			
465	470	475	480
Asp Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser			
	485	490	495
Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val			
	500	505	510
Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly			
	515	520	525
Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro			
	530	535	540
Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser Gln Ser Val Gly Pro Leu			
545	550	555	560
Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala			
	565	570	575
Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val			
	580	585	590
Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly			
	595	600	605
Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser			
	610	615	620
Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu			
625	630	635	640

Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser  
 645 650 655  
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val  
 660 665 670  
 Gly Pro Gln Ser Val Asp Val Ser Pro Val Ser Gly Ser Glu Phe Asp  
 675 680 685  
 Ala Val Asp Trp Arg Glu Lys Gly Ala Val Thr Pro Val Lys Asn Gln  
 690 695 700  
 Gly Ala Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Val Gly Asn Ile Glu  
 705 710 715 720  
 Ser Gln Trp Ala Arg Ala Gly His Gly Leu Val Ser Leu Ser Glu Gln  
 725 730 735  
 Gln Leu Val Ser Cys Asp Asp Lys Asp Asn Gly Cys Asn Gly Gly Leu  
 740 745 750  
 Met Leu Gln Ala Phe Glu Trp Leu Leu Arg His Met Tyr Gly Ile Val  
 755 760 765  
 Phe Thr Glu Lys Ser Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Asn Gly Asp Val Ala  
 770 775 780  
 Glu Cys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Val Pro Gly Ala Gln Ile Asp Gly  
 785 790 795 800  
 Tyr Val Met Ile Pro Ser Asn Glu Thr Val Met Ala Ala Trp Leu Ala  
 805 810 815  
 Glu Asn Gly Pro Ile Ala Ile Ala Val Asp Ala Ser Ser Phe Met Ser  
 820 825 830  
 Tyr Gln Ser Gly Val Leu Thr Ser Cys Ala Gly Asp Ala Leu Asn His  
 835 840 845  
 Gly Val Leu Leu Val Gly Tyr Asn Lys Thr Gly Gly Val Pro Tyr Trp  
 850 855 860  
 Val Ile Lys Asn Ser Trp Gly Glu Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr Val  
 865 870 875 880  
 Arg Val Val Met Gly Leu Asn Ala Cys Leu Leu Ser Glu Tyr Pro Val  
 885 890 895  
 Ser Ala His Val Pro Arg Ser Leu Thr Pro Gly Pro Gly Thr Glu Ser  
 900 905 910  
 Glu Glu Arg Ala Pro Lys Arg Val Thr Val Glu Gln Met Met Cys Thr  
 915 920 925  
 Asp Met Tyr Cys Arg Glu Gly Cys Lys Lys Ser Leu Leu Thr Ala Asn  
 930 935 940  
 Val Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Gly Ser Ser Met Thr Lys Cys Gly

945                            950                            955                            960  
 Pro Gln Lys Val Leu Met Cys Ser Tyr Ser Asn Pro His Cys Phe Gly  
                                   965                            970                            975  
 Pro Gly Leu Cys Leu Glu Thr Pro Asp Gly Lys Cys Ala Pro Tyr Phe  
                                   980                            985                            990  
 Leu Gly Ser Ile Met Asn Thr Cys Gln Tyr Thr  
                                   995                            1000

<210> 3

<211> 92

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KMP11 蛋白

<400> 3

Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp  
 1                            5                            10                            15  
 Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala  
                                   20                            25                            30  
 Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr  
                                   35                            40                            45  
 Glu Lys Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys  
                                   50                            55                            60  
 Lys Met His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu  
 65                            70                            75                            80  
 Leu Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys  
                                   85                            90

<210> 4

<211> 352

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SMT 蛋白

<400> 4

Ser Ala Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Thr Asn Leu Ile Arg Arg Arg  
 1                            5                            10                            15  
 Asn Lys Asp Glu Thr Asn Gly Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Arg Phe  
                                   20                            25                            30  
 Arg Asp Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala Thr  
                                   35                            40                            45

Thr Thr Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr Glu  
 50 55 60  
 Tyr Gly Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Phe Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala Arg  
 85 90 95  
 Gly Gly Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Cys Gly Val  
 100 105 110  
 Gly Gly Pro Ala Arg Asn Met Val Arg Leu Thr Arg Cys Asn Val Ile  
 115 120 125  
 Gly Val Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ser Arg Ala Arg Arg His Asp  
 130 135 140  
 Ala Leu Ala Gly Met Ser Ser Lys Ile Asp Tyr Val Lys Thr Asp Phe  
 145 150 155 160  
 Cys Asn Met Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Asp Gly Ala Tyr Ala Ile  
 165 170 175  
 Glu Ala Thr Cys His Ala Lys Asp Lys Val Lys Cys Tyr Ser Glu Val  
 180 185 190  
 Phe Arg Val Ile Lys Pro Gly Thr Cys Phe Val Leu Tyr Glu Trp Cys  
 195 200 205  
 Met Thr Asp Lys Tyr Asn Pro Asn Asp Glu Tyr His Arg Thr Ile Lys  
 210 215 220  
 His Arg Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Cys Lys  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ile Glu Tyr Met Lys Gln Ala Gly Phe Val Val Glu Glu Ala  
 245 250 255  
 Ile Asp Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile Pro  
 260 265 270  
 Trp Tyr Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu Arg  
 275 280 285  
 Ser Thr Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Cys Arg Val Leu  
 290 295 300  
 Glu Phe Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Glu Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly Ile  
 325 330 335  
 Phe Thr Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln Ala  
 340 345 350

<210> 5

<211> 235  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> A2 蛋白  
 <400> 5  
 Lys Ile Arg Ser Val Arg Pro Leu Val Val Leu Leu Val Cys Val Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Val Leu Ala Leu Ser Ala Ser Ala Glu Pro His Lys Ala Ala Val  
                   20                   25                   30  
 Asp Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser  
                   35                   40                   45  
 Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val  
                   50                   55                   60  
 Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro  
                   85                   90                   95  
 Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser Gln Ser Val Gly Pro Leu  
                   100                   105                   110  
 Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala  
                   115                   120                   125  
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val  
                   130                   135                   140  
 Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly  
 145                   150                   155                   160  
 Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser  
                   165                   170                   175  
 Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu  
                   180                   185                   190  
 Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser  
                   195                   200                   205  
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val  
                   210                   215                   220  
 Gly Pro Gln Ser Val Asp Val Ser Pro Val Ser  
 225                   230                   235  
 <210> 6  
 <211> 316  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CBP 蛋白

<400> 6

```

Asp Ala Val Asp Trp Arg Glu Lys Gly Ala Val Thr Pro Val Lys Asn
1           5           10           15
Gln Gly Ala Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Val Gly Asn Ile
           20           25           30
Glu Ser Gln Trp Ala Arg Ala Gly His Gly Leu Val Ser Leu Ser Glu
           35           40           45
Gln Gln Leu Val Ser Cys Asp Asp Lys Asp Asn Gly Cys Asn Gly Gly
           50           55           60
Leu Met Leu Gln Ala Phe Glu Trp Leu Leu Arg His Met Tyr Gly Ile
65           70           75           80
Val Phe Thr Glu Lys Ser Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Asn Gly Asp Val
           85           90           95
Ala Glu Cys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Val Pro Gly Ala Gln Ile Asp
           100          105          110
Gly Tyr Val Met Ile Pro Ser Asn Glu Thr Val Met Ala Ala Trp Leu
           115          120          125
Ala Glu Asn Gly Pro Ile Ala Ile Ala Val Asp Ala Ser Ser Phe Met
           130          135          140
Ser Tyr Gln Ser Gly Val Leu Thr Ser Cys Ala Gly Asp Ala Leu Asn
145          150          155          160
His Gly Val Leu Leu Val Gly Tyr Asn Lys Thr Gly Gly Val Pro Tyr
           165          170          175
Trp Val Ile Lys Asn Ser Trp Gly Glu Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr
           180          185          190
Val Arg Val Val Met Gly Leu Asn Ala Cys Leu Leu Ser Glu Tyr Pro
           195          200          205
Val Ser Ala His Val Pro Arg Ser Leu Thr Pro Gly Pro Gly Thr Glu
           210          215          220
Ser Glu Glu Arg Ala Pro Lys Arg Val Thr Val Glu Gln Met Met Cys
225          230          235          240
Thr Asp Met Tyr Cys Arg Glu Gly Cys Lys Lys Ser Leu Leu Thr Ala
           245          250          255
Asn Val Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Gly Ser Ser Met Thr Lys Cys
           260          265          270
Gly Pro Gln Lys Val Leu Met Cys Ser Tyr Ser Asn Pro His Cys Phe

```

---

275	280	285
Gly Pro Gly Leu Cys Leu Glu Thr Pro Asp Gly Lys Cys Ala Pro Tyr		
290	295	300
Phe Leu Gly Ser Ile Met Asn Thr Cys Gln Tyr Thr		
305	310	315

SEQ ID NO:	类型	基因描述
1	DNA	KSAC DNA
2	蛋白	嵌合 KSAC 蛋白
3	蛋白	利什曼原虫属 (Leishmania) KMP11 蛋白
4	蛋白	利什曼原虫属 (Leishmania) SMT 蛋白
5	蛋白	利什曼原虫属 (Leishmania) A2 蛋白
6	蛋白	利什曼原虫属 (Leishmania) CBP 蛋白

图1

KSAC DNA 序列表 (SEQ ID NO:1)

ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCCGCTGGATGAGGAGTTCAAC  
 AGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG  
 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAGAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAG  
 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCTG  
 CTCGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGTCCAAGACTAGTTCCGCCGGTGGCCGTGAG  
 ACCGCGCCGACGAACTGATTCTGTCGCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGC  
 GCCGCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCC  
 GCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGGC  
 TGGGGCCAGAACTTCCATTTTCGCGCCGCGCTACGCCGGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCTC  
 GCGCGCCACGAGTACTTCCCTGGCCGCTCGCGCGGGCTTCATGGAGGGCGACCCACATCGTC  
 GACGTGGGCTGCGGCGTTCGGCGGTCCGGCGCGCAACATGGTTTCGCCTCACGCGCTGCAAC  
 GTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTTCATGACGCGCTC  
 GCCGGTATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCC  
 GACAACACCTTCGACGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTC  
 AAGTGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCCTGTACGAG  
 TGGTGTCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAATCAAGCACCGC  
 ATCGAGCTGGGCGACGCGCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAACAGGTGATCGAGTACATG  
 AAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGC  
 CCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTTCGGCGACTATTTCGTCCCTGCAGGGC  
 CTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGTCATGTGTGCGGTGCTGGAGTTC  
 GTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAA  
 AGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGCGCTCGC  
 AAGCCGTCCAAGCAGGCTGGATCCAAGATCCGCAGCGTGCCTCCGCTTGTGGTGTGCTG  
 GTGTGCGTTCGCGGCGGTGCTCGCACTCAGCGCCTCCGCTGAGCCGCACAAGGCGGCCGTT  
 GACGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAG  
 GCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAG  
 GCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAG  
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTG  
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTG  
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTG  
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTG  
 AGCGTTGGTCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGACGTTAGC  
 CCGGTGAGCGGATCCGAATTCGATGCGGTGGACTGGCGCGAGAAGGGCGCCGTGACGCCG  
 GTGAAGAATCAAGGCGCGTGCGGGTCTGCTGGGCGTTCCTCGGCGGTCCGCAACATCGAG  
 TCGCAGTGGGCCCGTGCCTGGCCACGGCTTGGTGGAGCTGTTCGGAGCAGCAGCTGGTGGAG  
 TGCGATGACAAAGACAATGGCTGCAACGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTCGAGTGGCTG  
 CTGCGACACATGTACGGGATCGTGTTACGGAGAAGAGCTACCCCTACACGTCCGGCAAC  
 GGTGATGTGGCCGAGTGCTTGAACAGCAGTAAACTCGTTCCCGGCGCGCAAATCGACGGC  
 TACGTGATGATCCCGAGCAACGAAACGGTTATGGCTGCGTGGCTTGGCGAGAATGGCCCC  
 ATCGCGATTGCGGTTCGAC

图2A

GCCAGCTCCTTCATGTCTTACCAGAGCGGCGTGCTGACCAGCTGCGCTGGCGATGCACTG  
 AACACGGCGTGCTGCTCGTTCGGGTACAACAAGACCGGTGGGGTTCCGTAAGGGTGATC  
 AAGAAGCTCGTGGGGTGAGGACTGGGGCGAGAAGGGCTACGTGCGCGTGGTTCATGGGGCTG  
 AACGCGTGCTGCTCAGTGAATACCCCGTGTCCGCGCATGTGCCGCGGAGTCTCACCCCT  
 GGCCCGGGCACGGAGAGCGAGGAGCGCGCCCTAAACGGGTGACGGTGGAGCAGATGATG  
 TGCACCGATATGTAAGTGCAGGGAGGGGTGCAAGAAGAGTCTTCTCACCGCGAACGTGTGC  
 TACAAGAACGGGGGAGGCGGCTCCTCTATGACGAAGTGGGTCCGCGAGAAGGTGCTGATG  
 TGCTCGTACTCGAACCTCATTGCTTTGGTCTGGGCTGTGCCTCGAGACTCCTGATGGC  
 AAGTGCGCGCCGTAAGTCTTGGGCTCGATCATGAACACCTGCCAGTACACGTA

KSAC protein 蛋白序列 (SEQ ID NO:2)

MATTYEEFSAKLDRLEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKF  
 ERMIKEHTEKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQYPSKTSAGGRET  
 APTNLIRRRNKDETNQDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYIDL  
 VTDFYEGWGWQNFHEAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDV  
 GCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKT  
 DFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTFCVLYEWCN  
 TDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVIS  
 QFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAPKGT  
 YKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQAGSKIRSVRPLVLLV  
 CVAAVLALSASAEPHKAADVGVPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVG  
 PLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQ  
 VGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVG  
 PLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLS  
 VGPQSVDVSPVSGSEFDVAVDWREKGAVTPVKNQGACGSCWAFSAVGNIESQ  
 WARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKDNCGNGLMLQAFEWLLRHMYGIVFTE  
 KSYPYTSGNGDVAECLNSSKLVPGAQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGP  
 IAVDASSFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTGGVPYWVIKNSWGED  
 WGEKGYVRVVMGLNACLLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTVEQ  
 MMCTDMYCREGCKKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVLMSYSNPH  
 CFGPGLCLETPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT

- KPM11 (in red)
- 甾醇甲基转移酶(绿色)
- A2 (蓝色).
- 半胱氨酸蛋白酶 (棕色)
- 接头 (斜体及黑色)

图2B

## KMP11 蛋白 (SEQ ID NO:3)

MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDSTLSPEMKEHYEKF  
ERMIKEHTEKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQYPSK

## SMT 蛋白 (SEQ ID NO:4)

SAGGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAAADRFDRDFEKATLEERKAATTTM  
VNEYDYLVTDFYEYGGWQNFHFAPRYAGETTFESLARHEYFLAARGGFME  
GDHIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSS  
KIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCE  
VLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFV  
VEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEF  
VRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQA

## A2 蛋白 (SEQ ID NO:5)

KIRSVRPLVLLVCVAAVLALSASAEPHKAAVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQ  
AVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSV  
GSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGP  
QSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSV  
GPLSVGPQSVGPLSVGPQSV DVSPVS

## CBP 蛋白 (SEQ ID NO:6)

DAVDWREKGA VTPVKNQGACGSCWAFSAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQ  
LVSCDDKDNGCNGGLMLQAFEWLLRHMYGIVFTEKSYPYTSGNGDVAECL  
NSSKLVPGAQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGPALAVDASSFMSYQSGVLT  
SCAGDALNHGVLLVGYNKITGGVPYWVIKNSWGEDWGEKGYVRVVMGLN  
ACLLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTVEQMMCTDMYCREGCK  
KSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVL MCSYSNPHCFGPGLCLETDPDGK  
CAPYFLGSIMNTCQYT

图2C

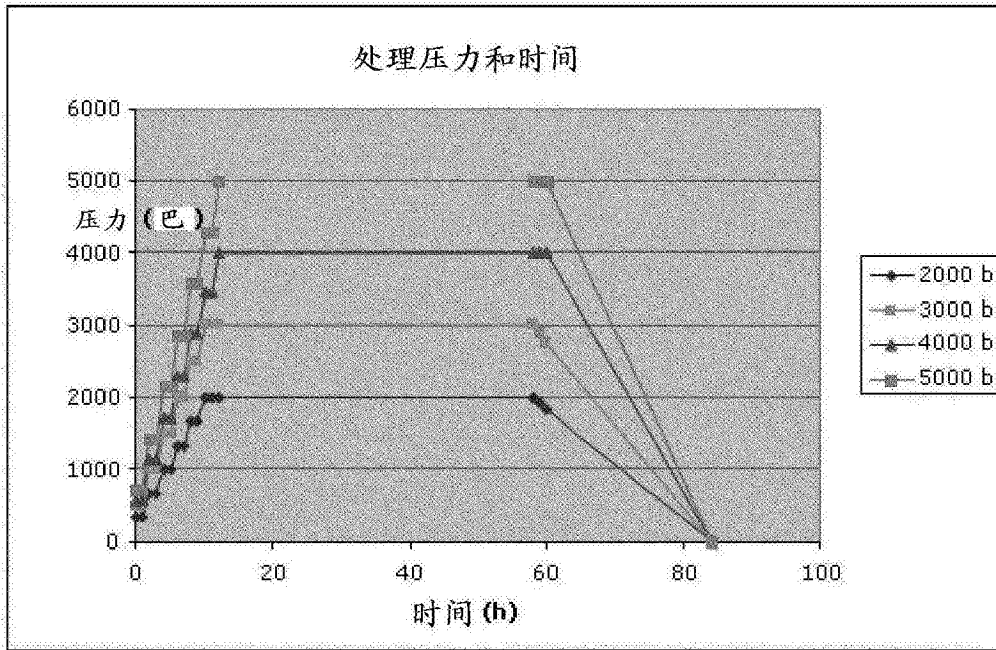


图3

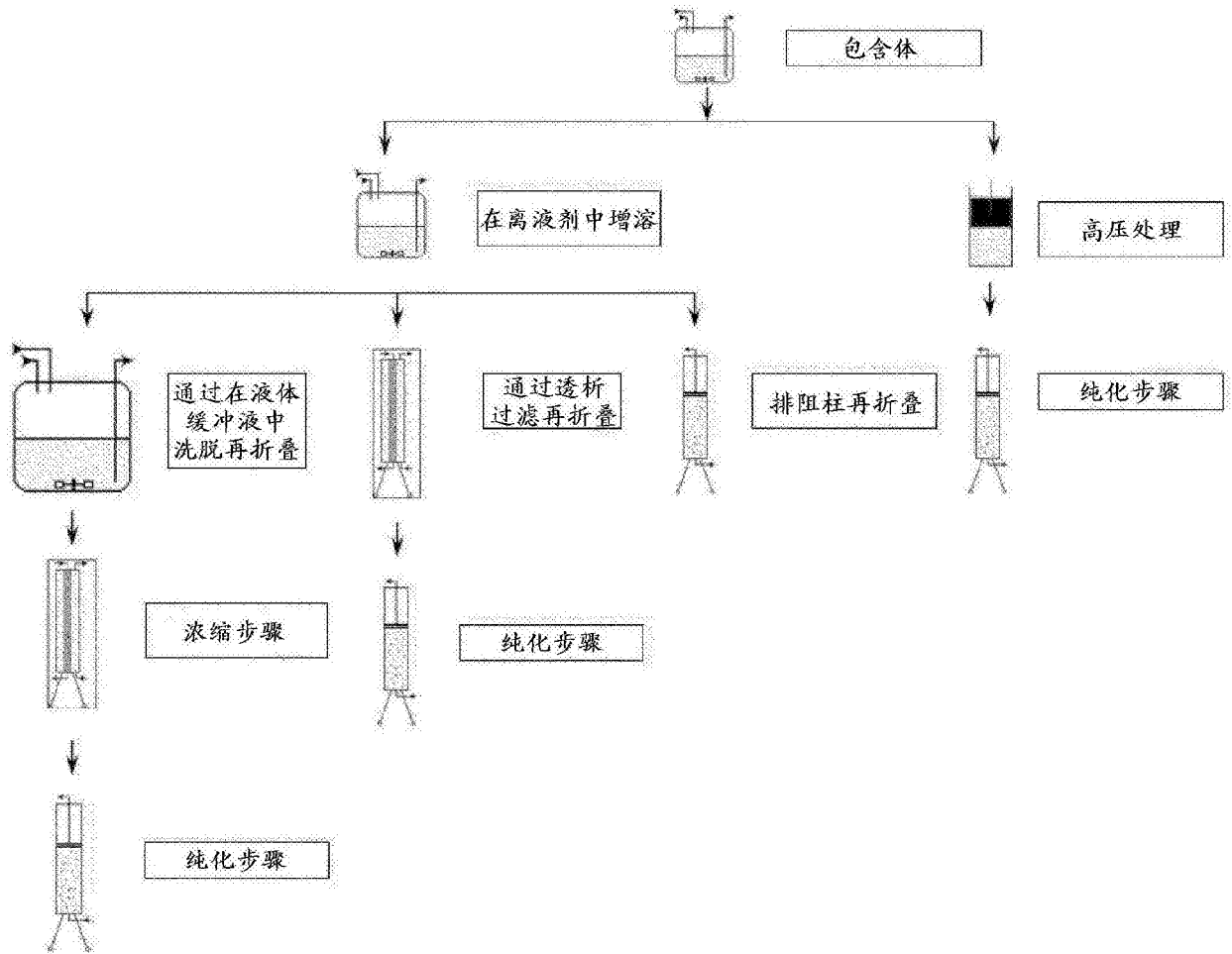


图4

KSAC的再折叠

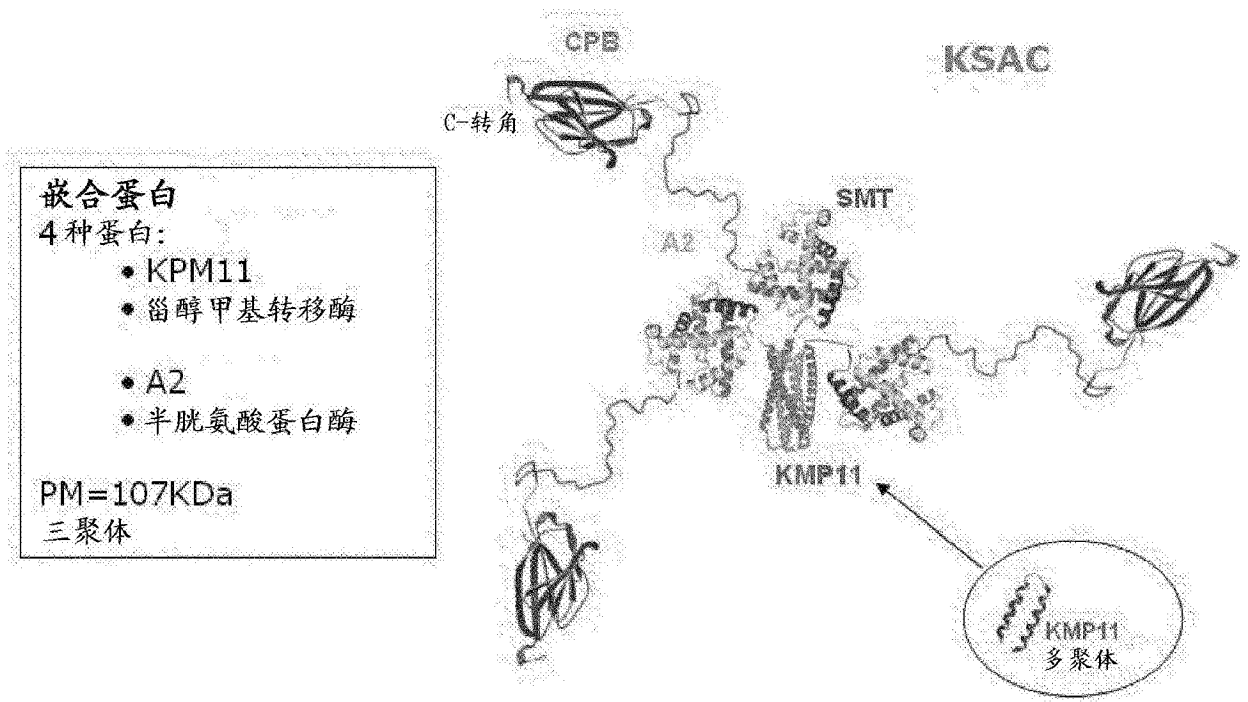


图5

通过排阻层析再折叠的 KSAC 蛋白的 SDS-PAGE 图案

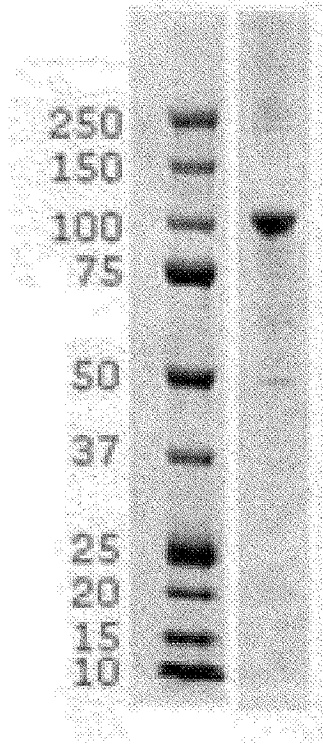


图6

由排阻层析再折叠的 KSAC 的 HPLC 图

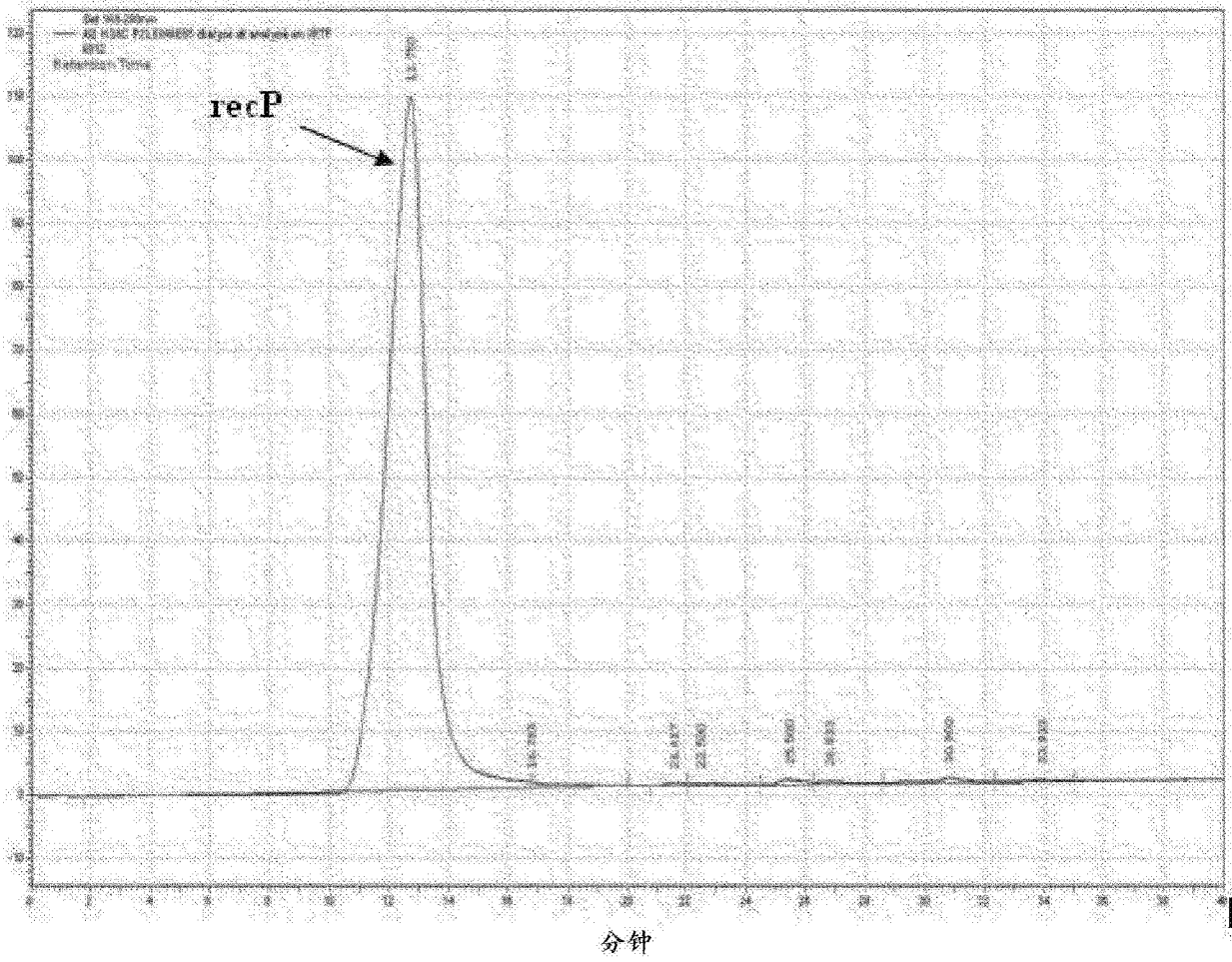


图7

使用排阻层析再折叠的 KSAC 蛋白的动态光散射 (DLS)

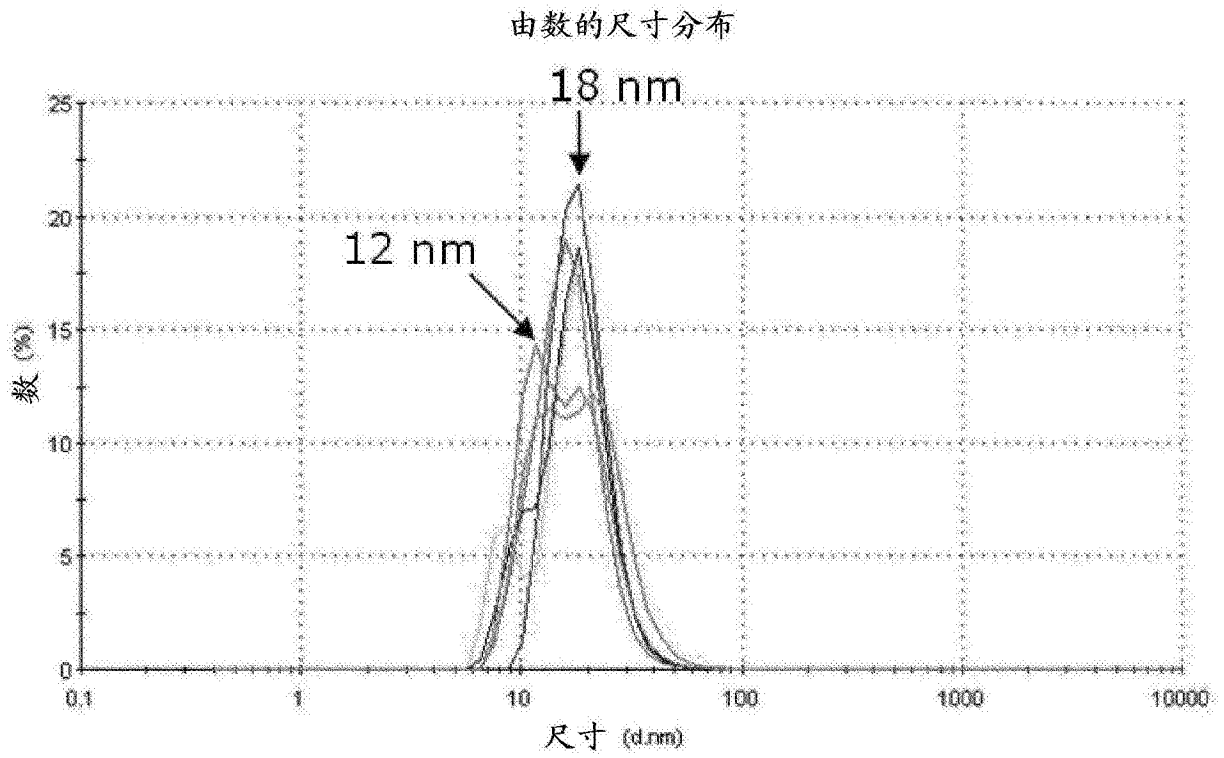


图8A

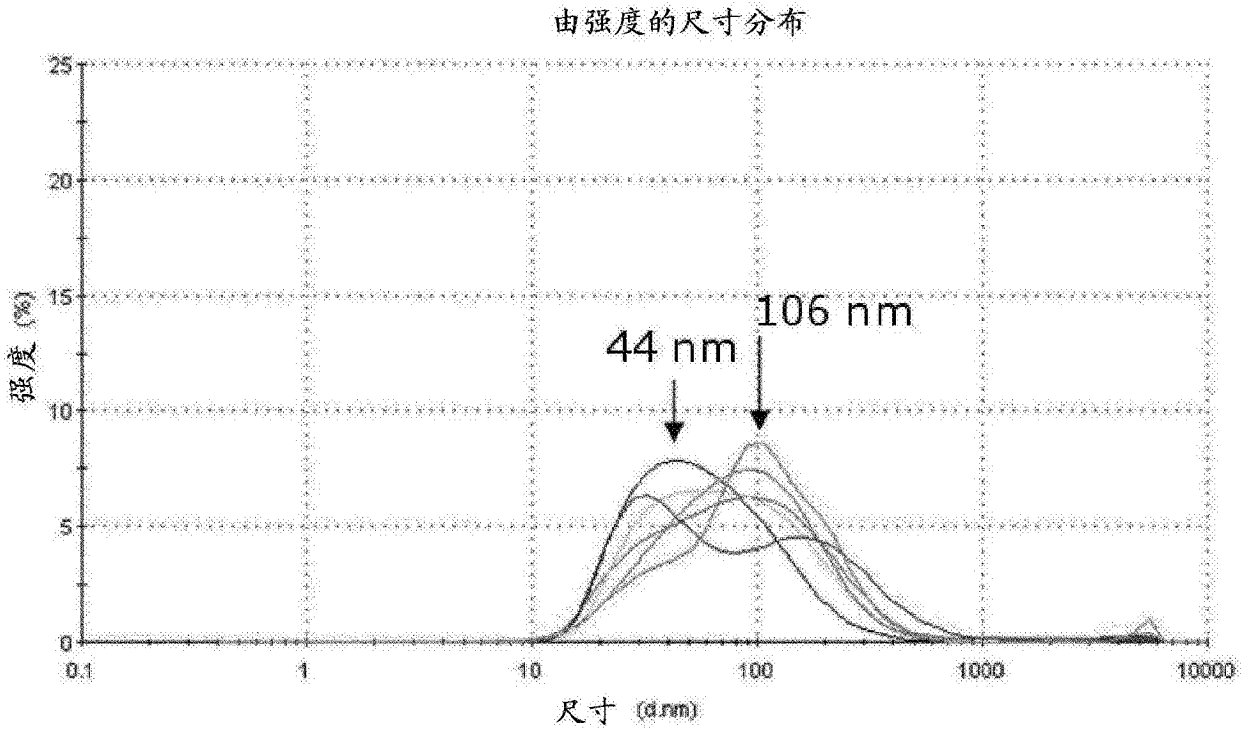


图8B

点印迹

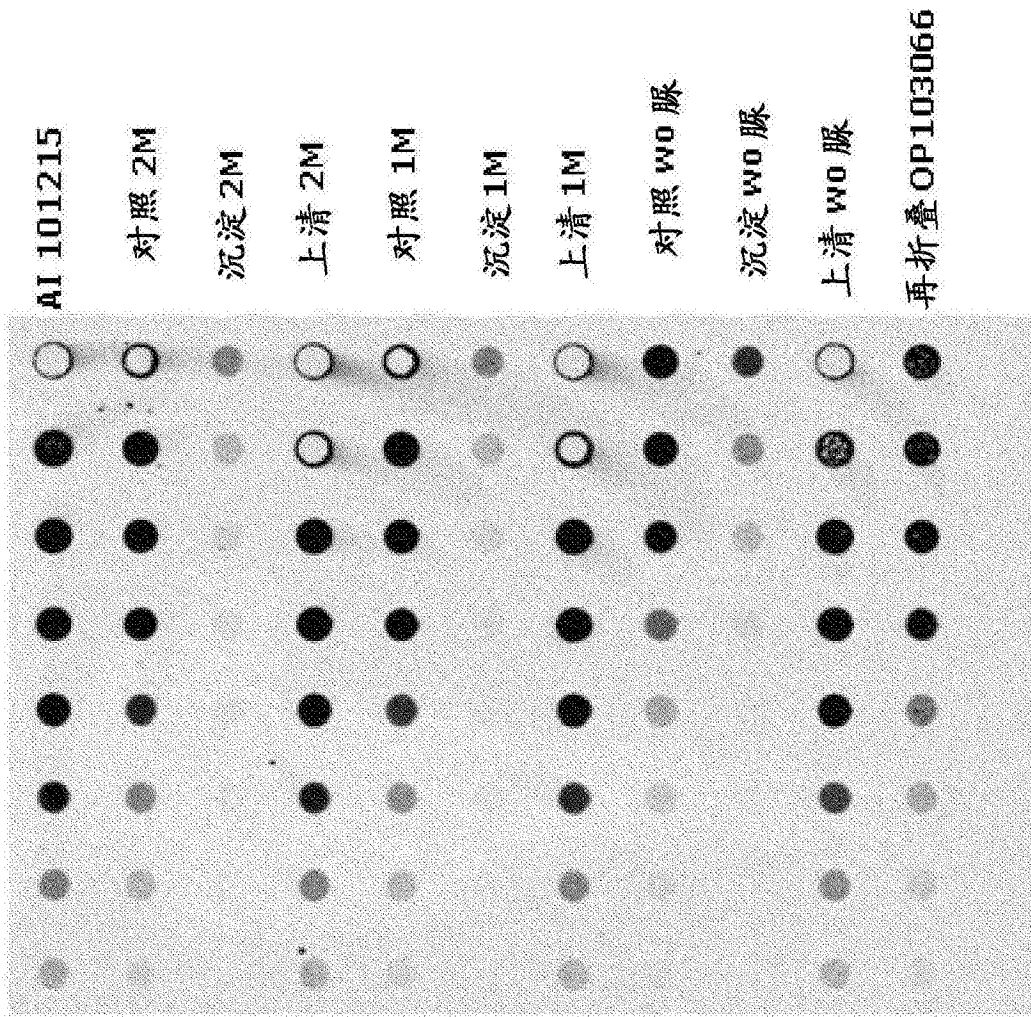


图9

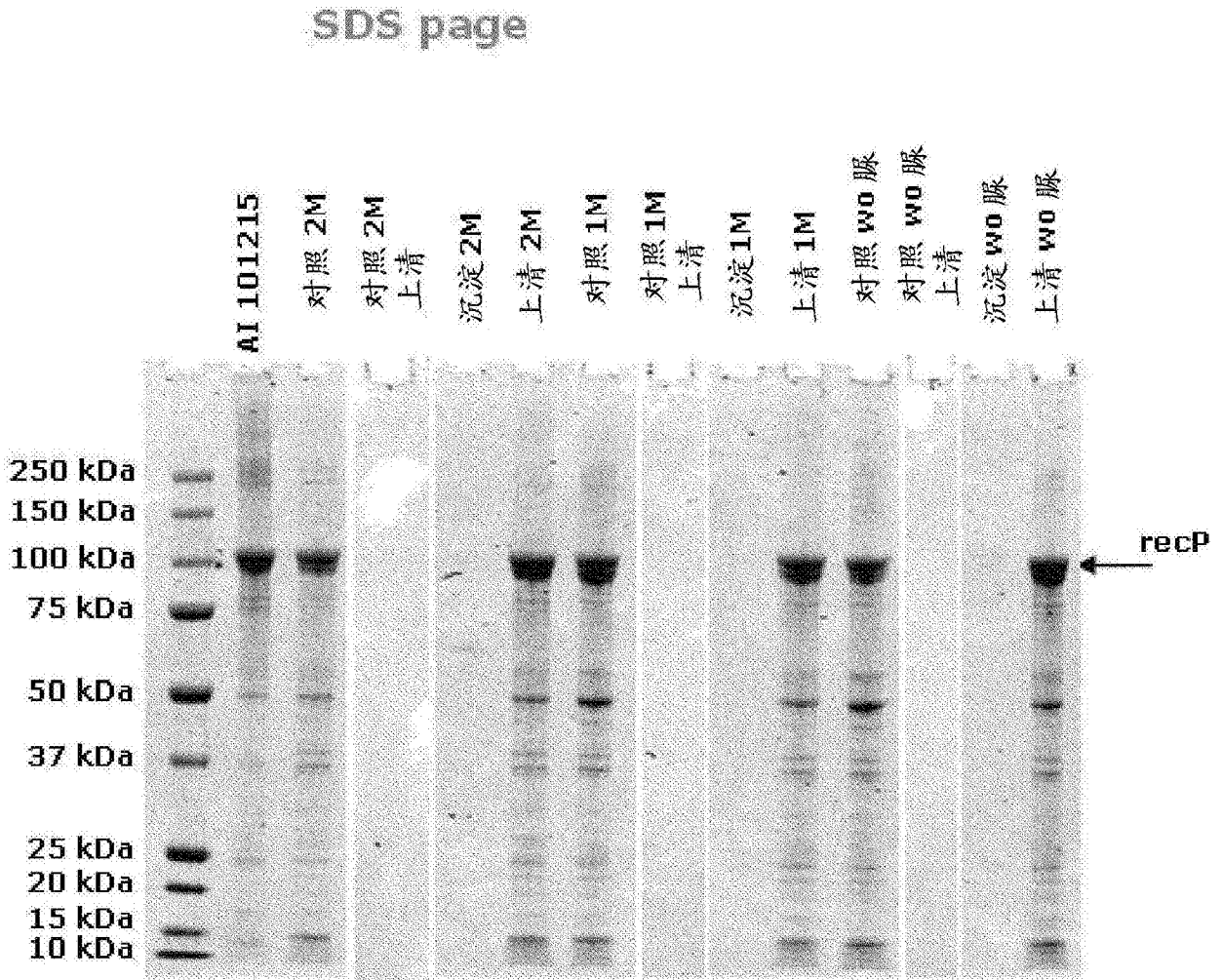


图10

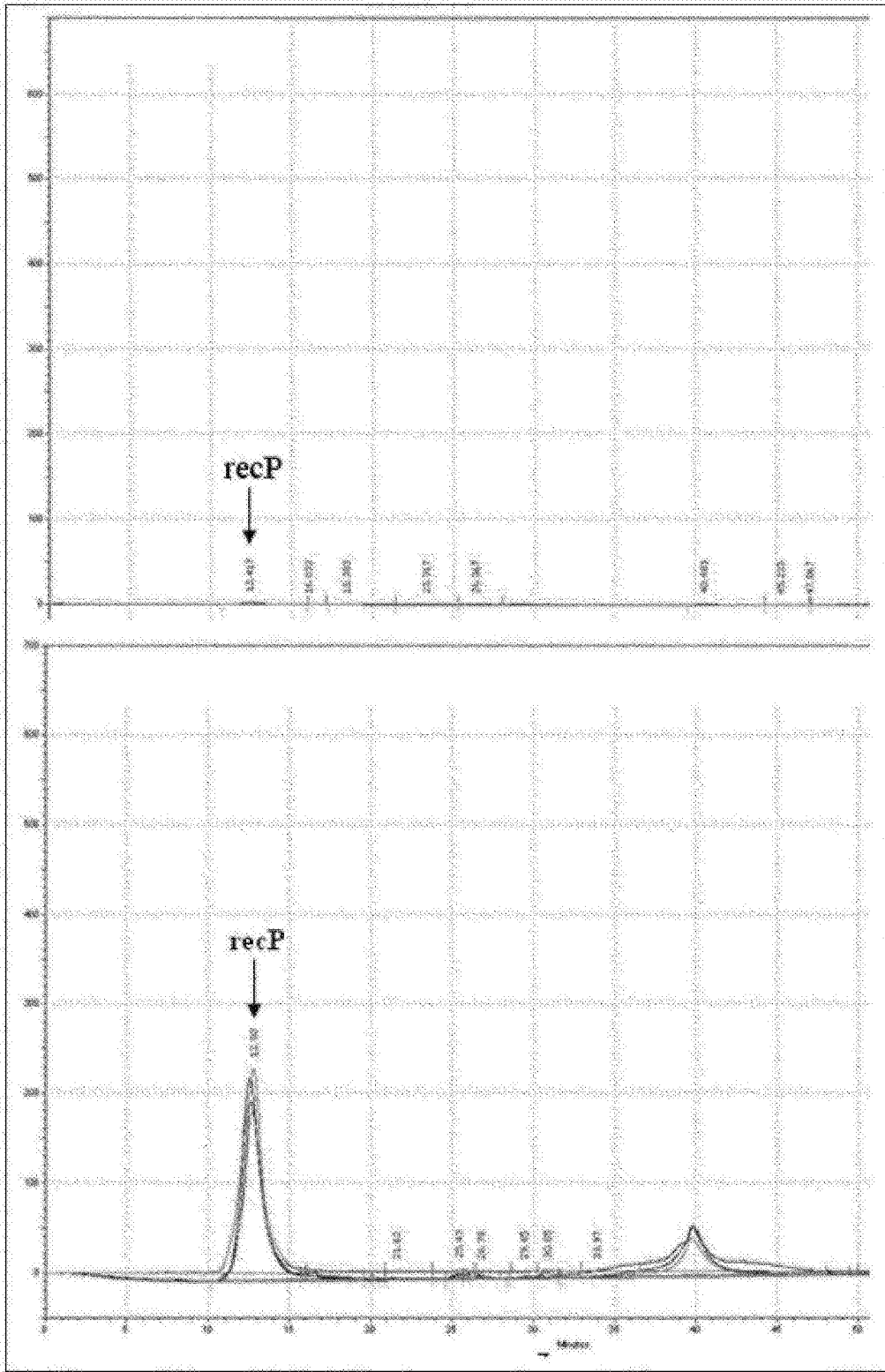


图11

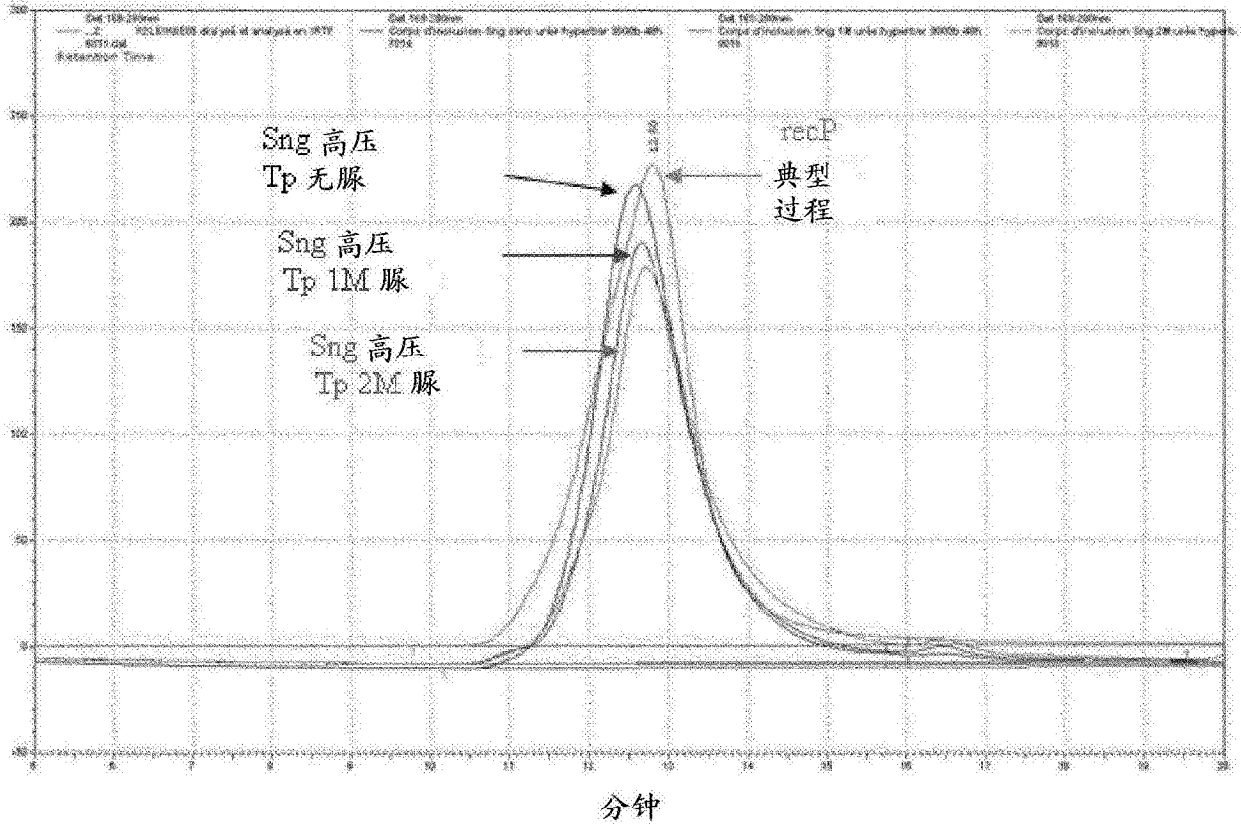
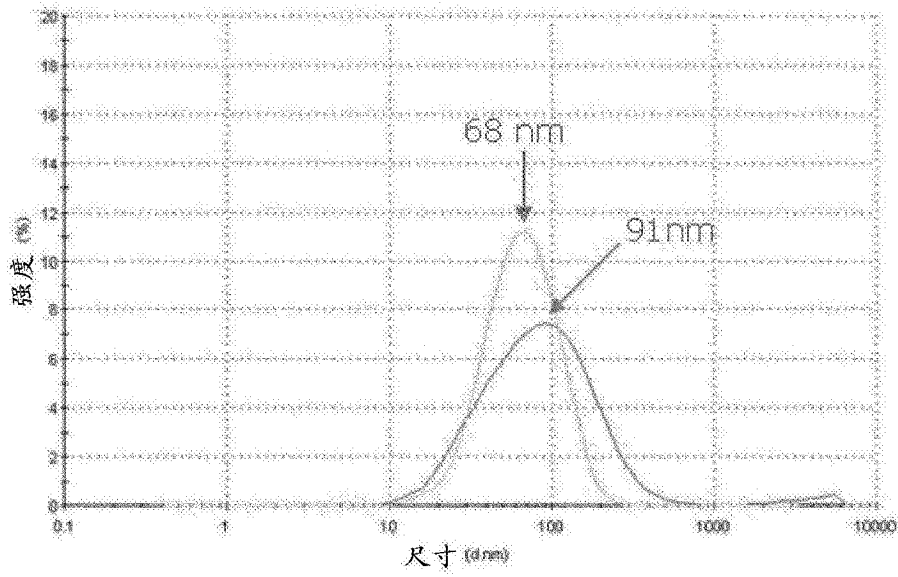


图12

由强度的尺寸分布



由数的尺寸分布

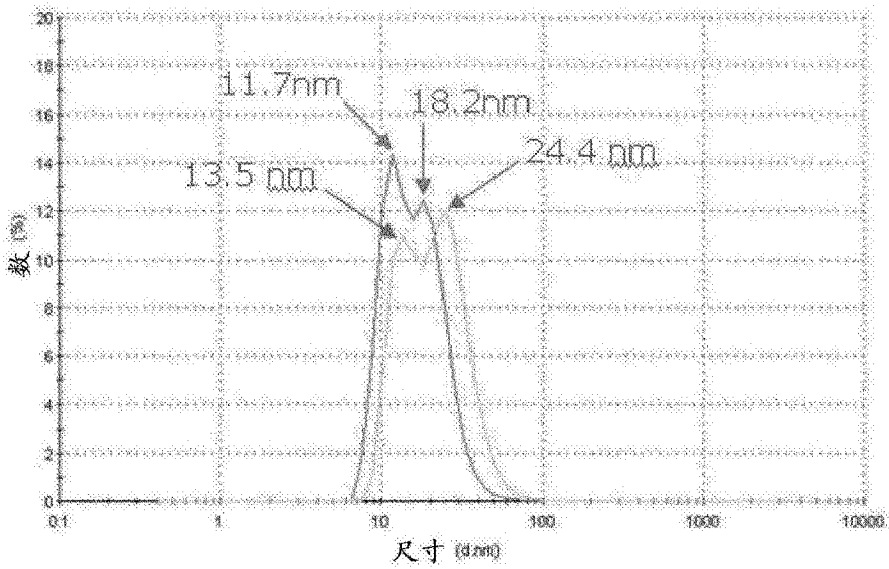


图13

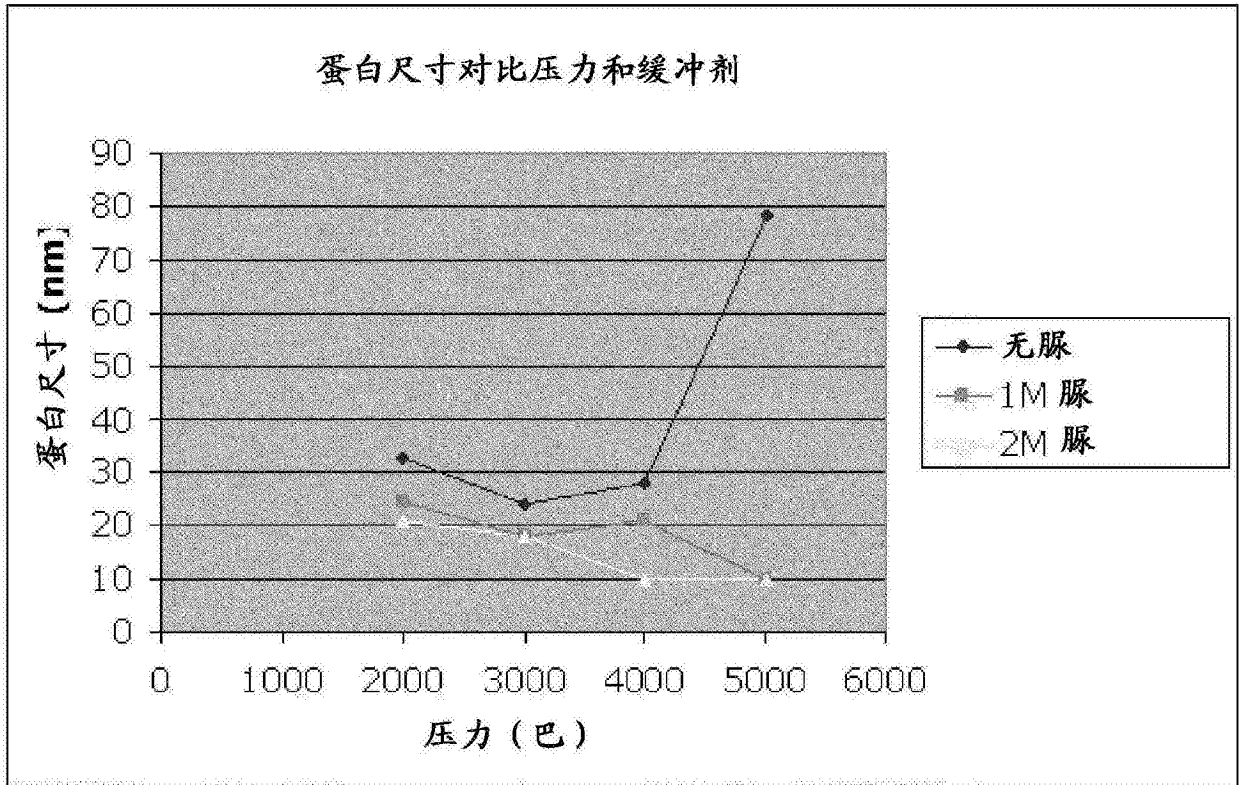


图14

400 巴处理的样品的 HPLC 层析图

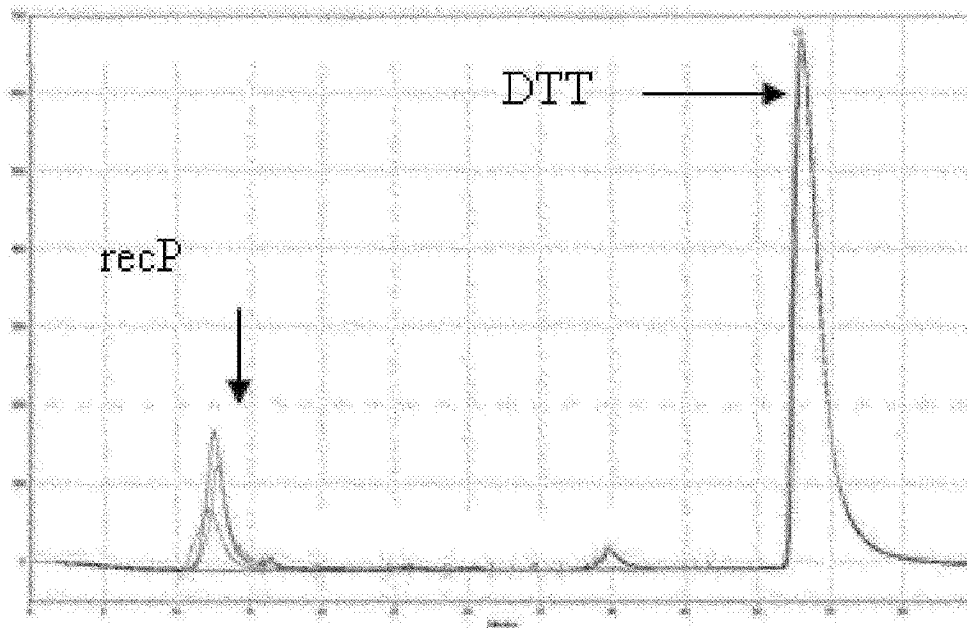


图15A

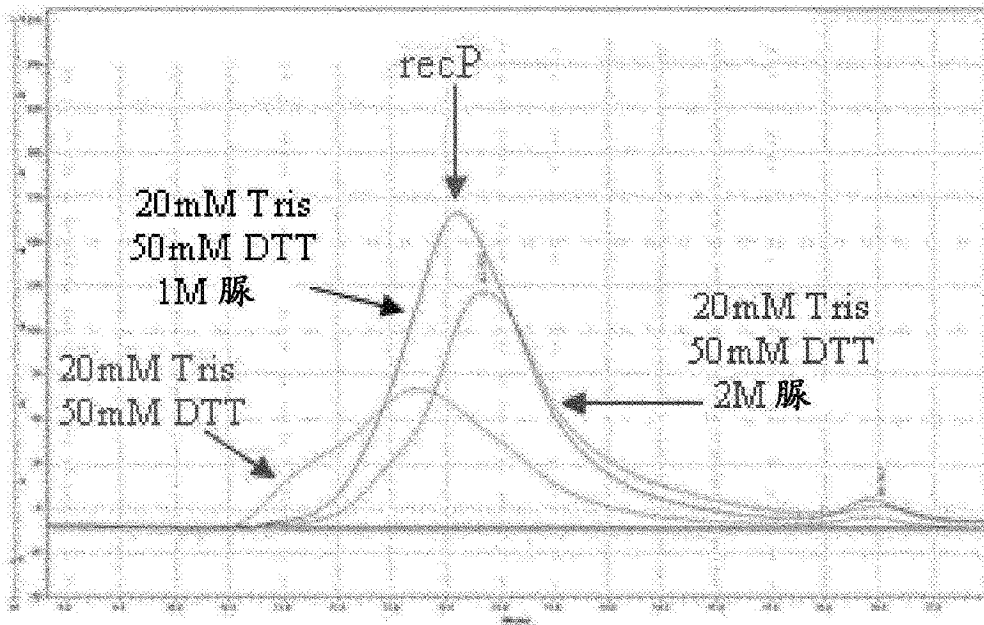


图15B

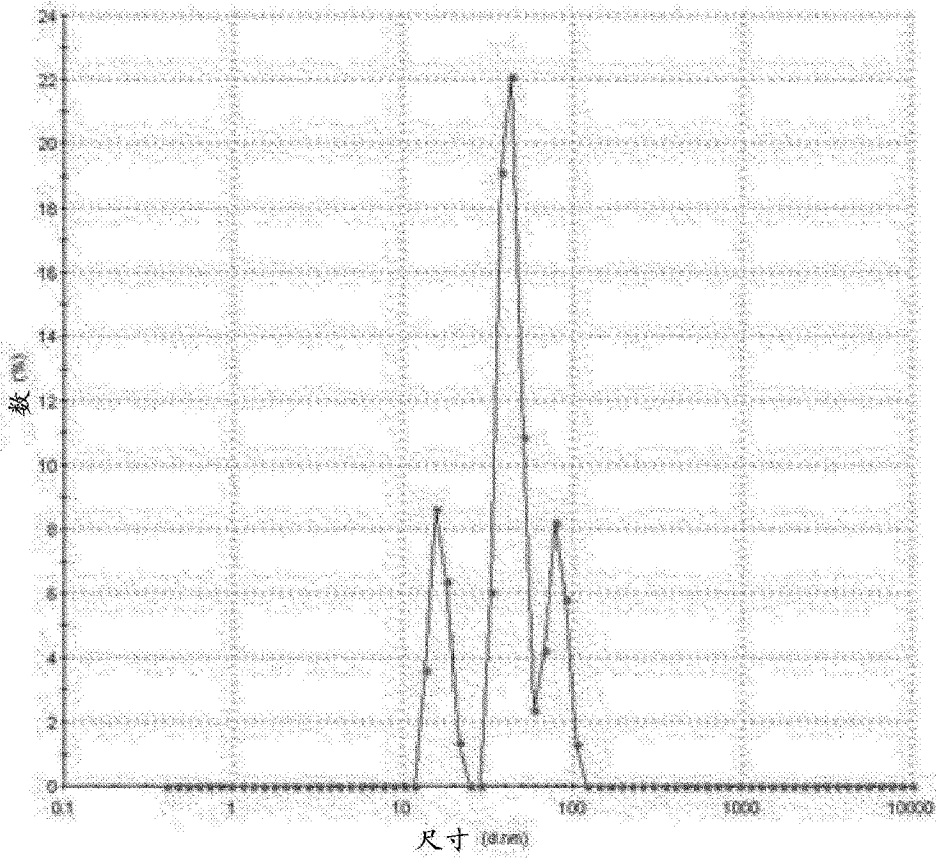


图16

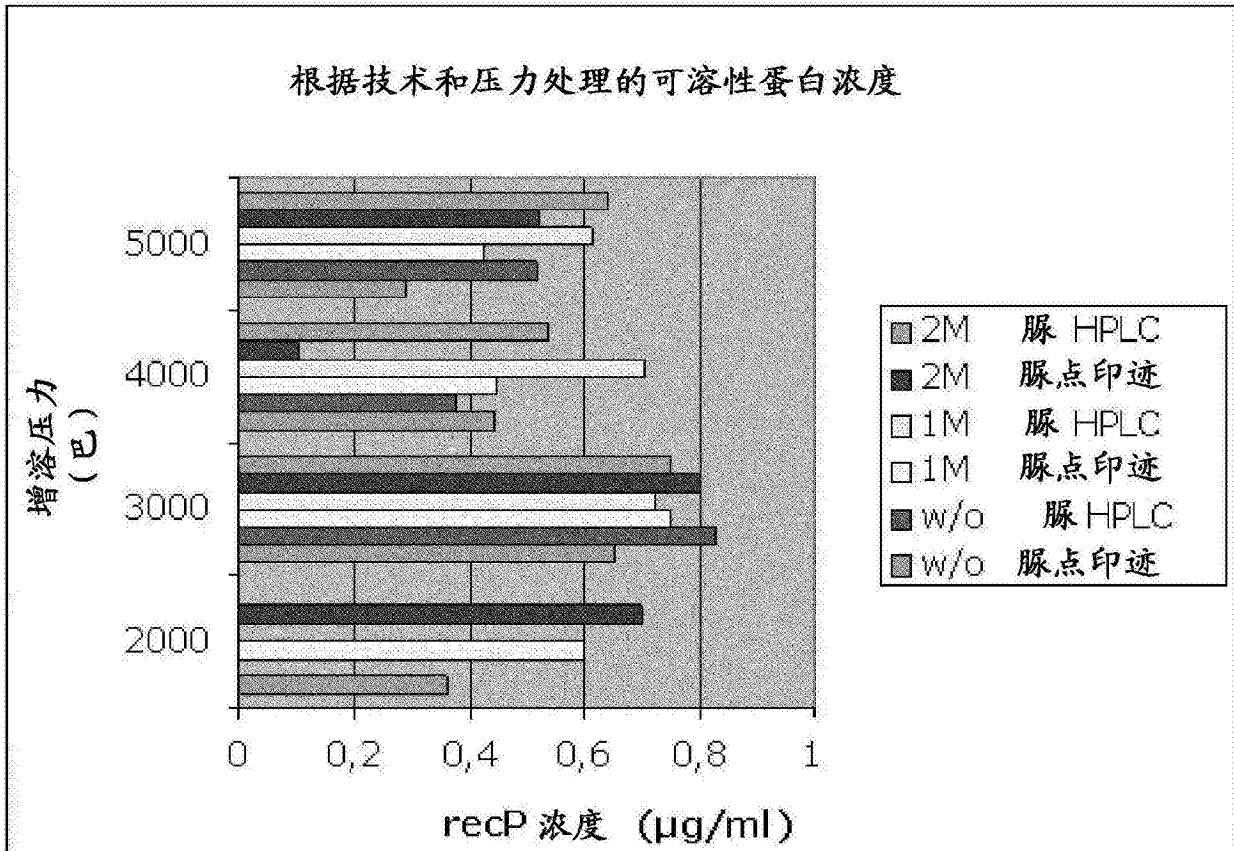
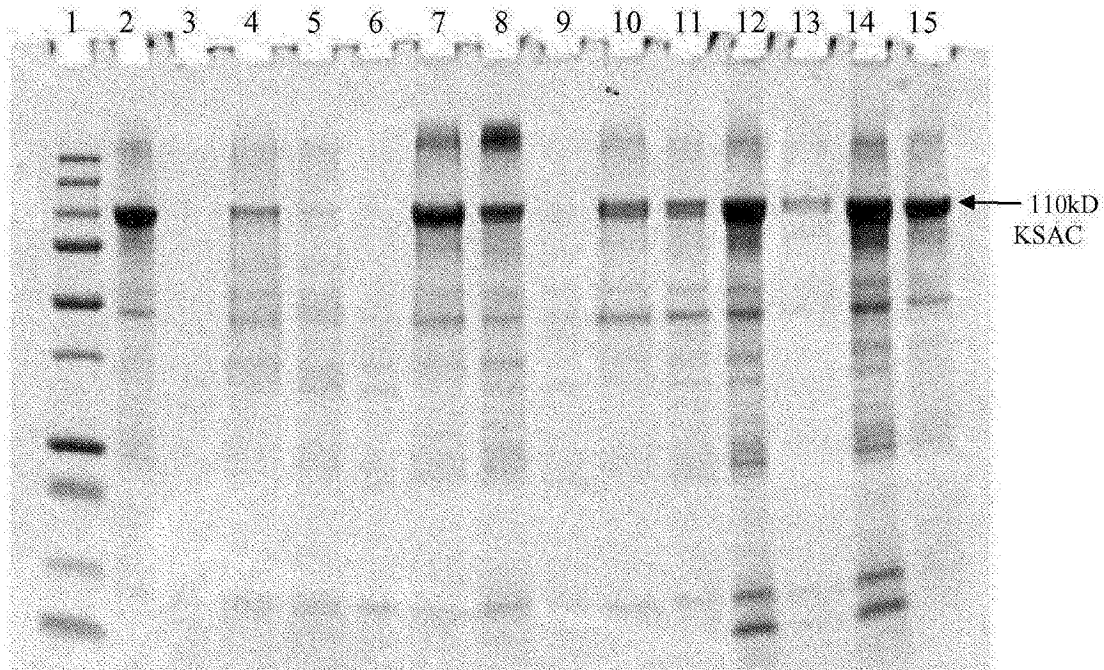


图17

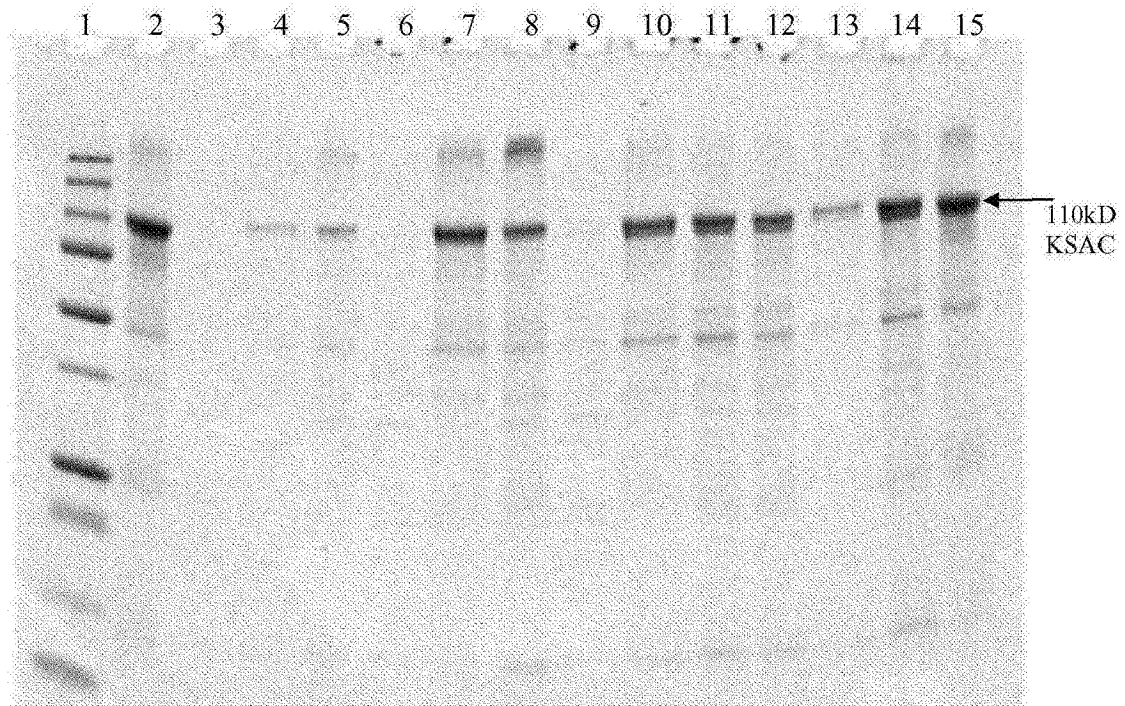
由过程 A 的 KSAC 蛋白的 SDS-PAGE 分析



- 泳道 1: 标志物  
泳道 2: KSAC 包含体对照  
泳道 3: 样品 3 上清  
泳道 4: 样品 3 沉淀  
泳道 5: 样品 3 离心前  
泳道 6: 样品 1 上清  
泳道 7: 样品 1 沉淀  
泳道 8: 样品 1 离心前  
泳道 9: 样品 4 上清  
泳道 10: 样品 4 沉淀  
泳道 11: 样品 4 离心前  
泳道 12: 样品 2 上清  
泳道 13: 样品 2 沉淀  
泳道 14: 样品 2 离心前  
泳道 15: KSAC 包含体对照

图18A

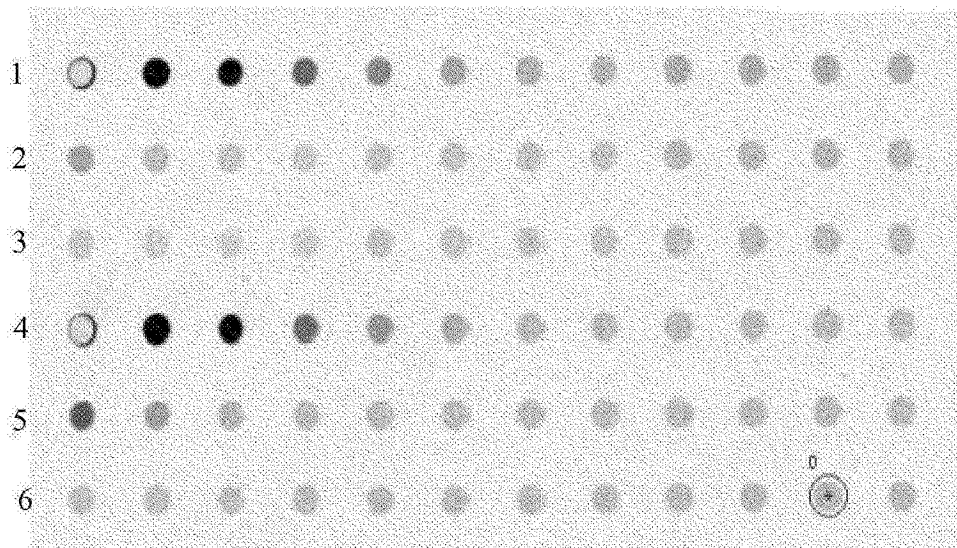
由过程 B 的 KSAC 蛋白的 SDS-PAGE 分析



- 泳道 1: 标志物
- 泳道 2: KSAC 包含体对照
- 泳道 3: 样品 7 上清
- 泳道 4: 样品 7 沉淀
- 泳道 5: 样品 7 离心前
- 泳道 6: 样品 5 上清
- 泳道 7: 样品 5 沉淀
- 泳道 8: 样品 5 离心前
- 泳道 9: 样品 8 上清
- 泳道 10: 样品 8 沉淀
- 泳道 11: 样品 8 离心前
- 泳道 12: 样品 6 上清
- 泳道 13: 样品 6 沉淀
- 泳道 14: 样品 6 离心前
- 泳道 15: KSAC 包含体对照

图18B

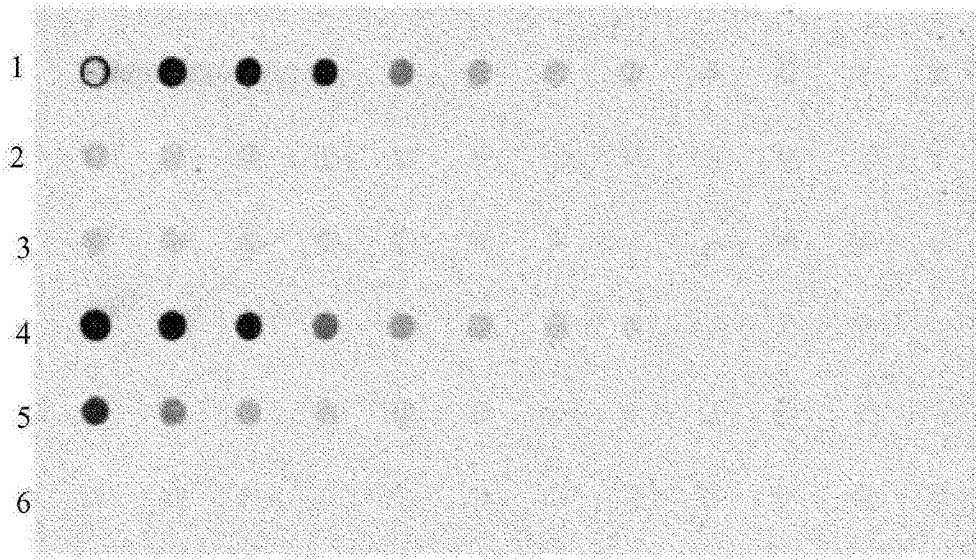
## 由过程 A 的 KSAC 蛋白的 Q 点印迹分析



- 1: KSAC 参照
- 2: 不含 DTT 的过程 A (样品 1)
- 3: 不含 DTT 的对照 (样品 3)
- 4: 含 DTT 的过程 A (样品 2)
- 5: 含 DTT 的对照 (样品 4)
- 6: 20 mM Tris 缓冲剂

图19A

## 由过程 B 的 KSAC 蛋白的 Q 点印迹分析



- 1: KSAC 参照
- 2: 不含 DTT 的过程 B(样品 5)
- 3: 不含 DTT 的对照(样品 7)
- 4: 含 DTT 的过程 B(样品 6)
- 5: 含 DTT 的对照(样品 8)
- 6: 20 mM Tris 缓冲剂

图19B

从 Q 点印迹的 KSAC 蛋白定量

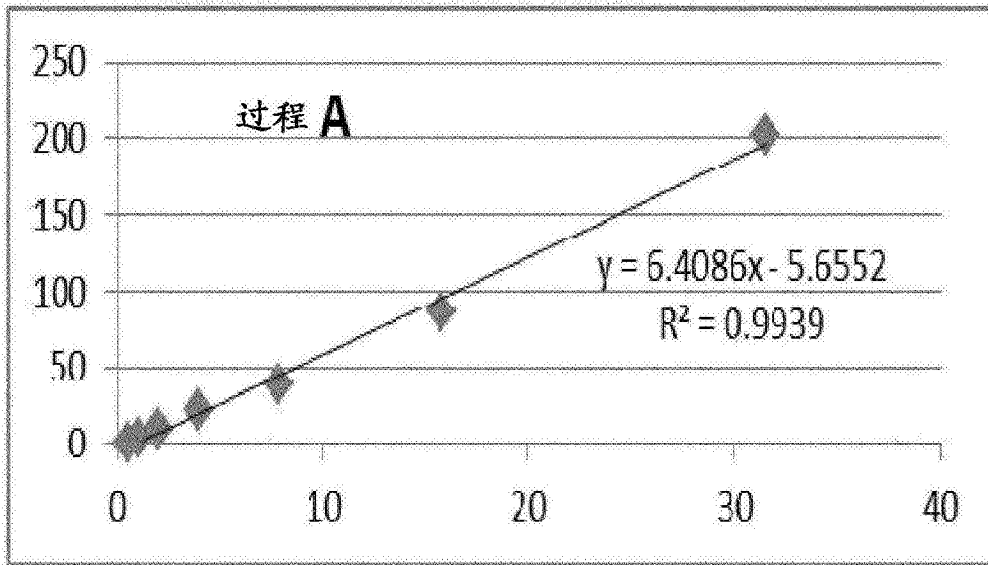


图19C

从 Q 点印迹的 KSAC 蛋白定量

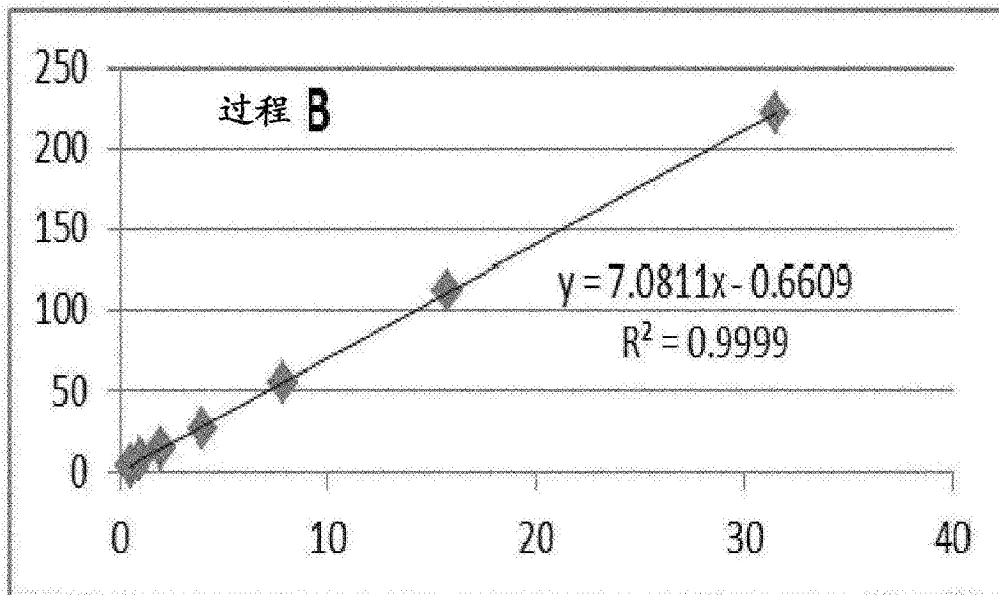


图19D

HPLC 分析

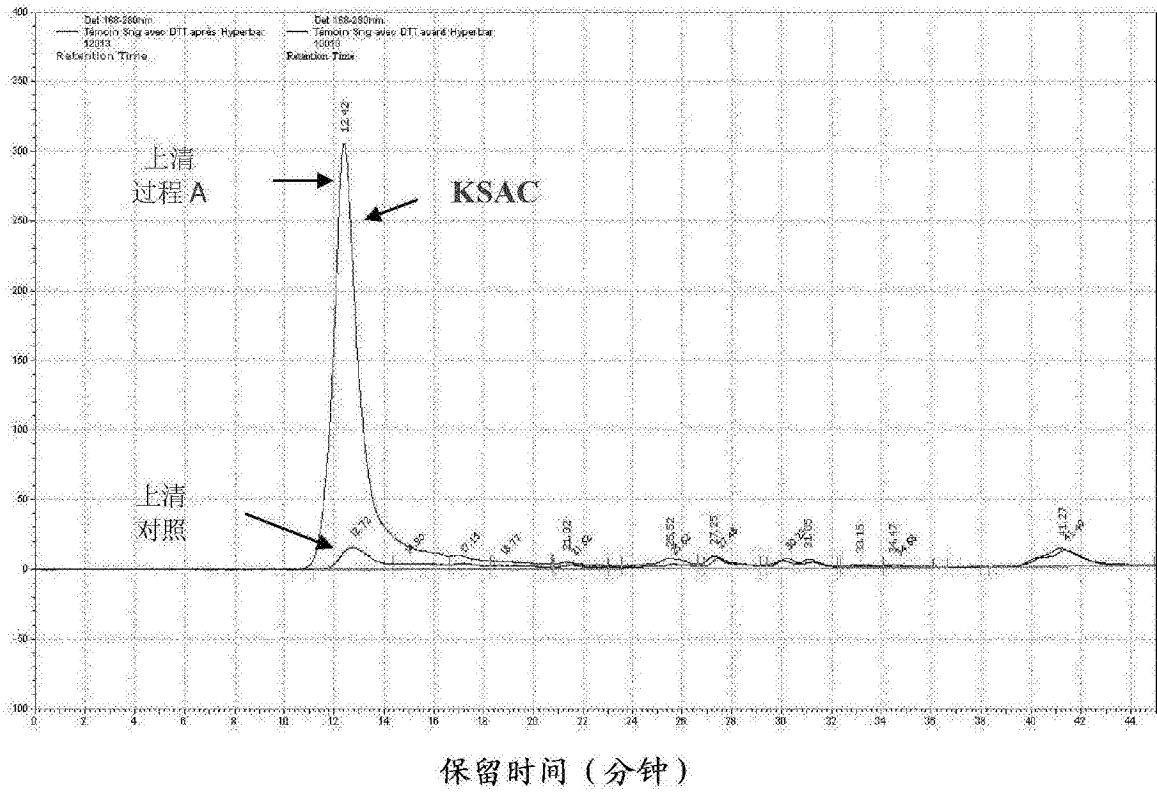


图20

HPLC 分析

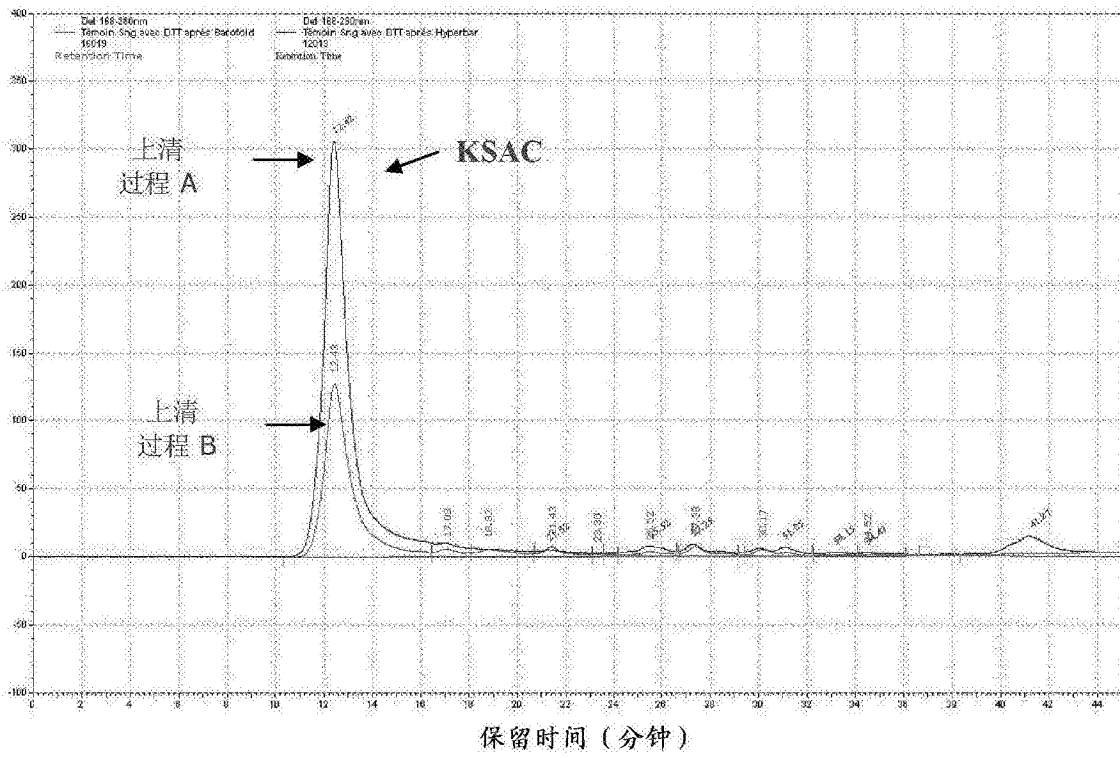


图21

HPLC 分析

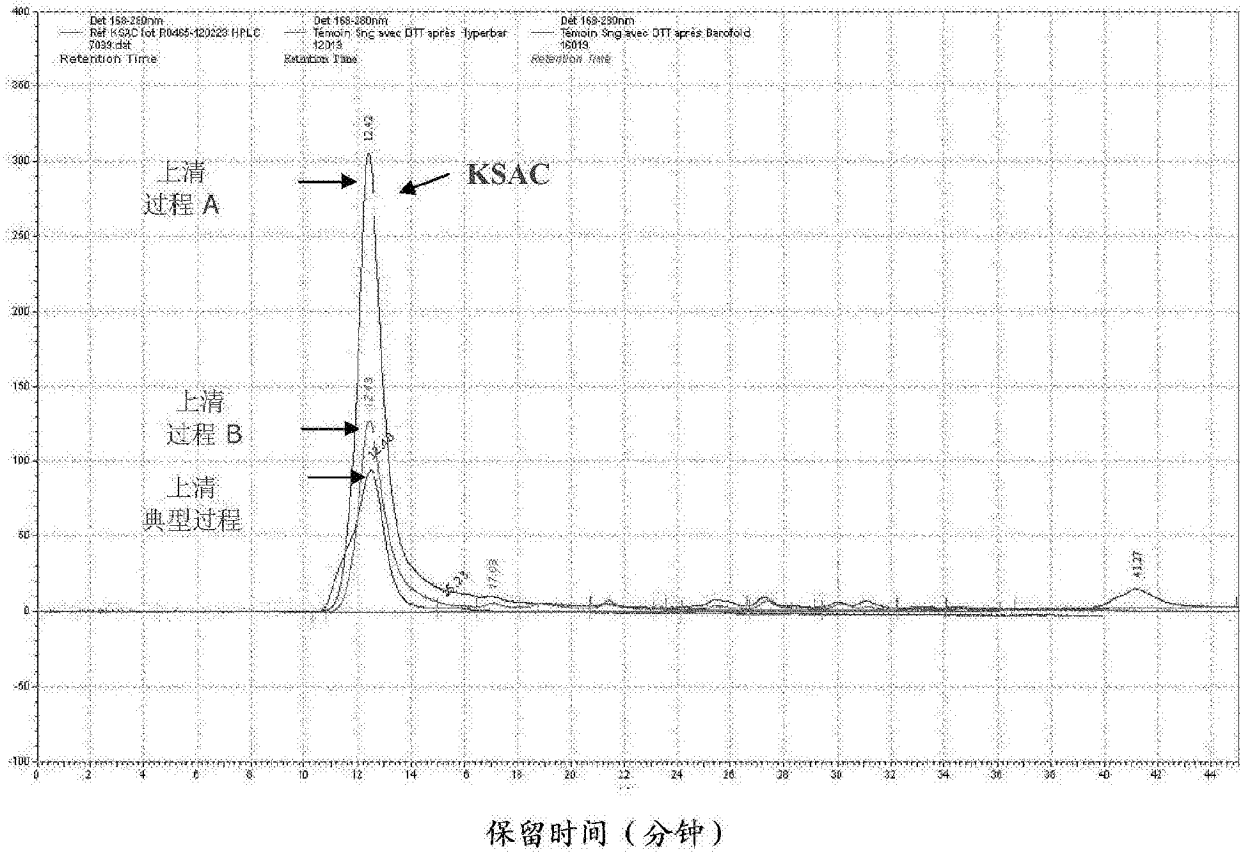


图22