



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104244971 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201380018173.X

(22)申请日 2013.03.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104244971 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(30)优先权数据

61/617,998 2012.03.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/033070 2013.03.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/148426 EN 2013.10.03

(73)专利权人 人工细胞科技公司

地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 托马斯·J·鲍威尔

(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 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

A61K 39/015(2006.01)

A61K 39/385(2006.01)

(56)对比文件

W0 2009082440A2 ,2009.07.02,

Thomas J.Powell et al.Synthetic nanoparticle vaccines produced by layer-by-layer assembly of artificial biofilms induce potent protective T-cell and antibody responses invivo.《Vaccine》.2010,第29卷(第3期),第558-569页.

审查员 程婷

权利要求书2页 说明书23页

序列表5页 附图12页

(54)发明名称

抗疟疾微颗粒疫苗

(57)摘要

多层膜包含来自恶性疟原虫的多肽表位,特别是环孢子T1、B或T*表位。所述多层膜在向宿主施用后能够在所述宿主中诱发免疫应答。所述多层膜可包含至少一种经设计肽,其包含一个或多个来自疟原虫原生动物的多肽表位。

1. 组合物,其包含:

第一多层膜,其包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中所述多层膜中的所述聚电解质层之一包含第一抗原性聚电解质,

其中所述第一抗原性聚电解质包含与第一聚电解质共价连接的恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)环孢子T1BT*表位,

其中所述多层膜中的所述聚电解质包含聚阳离子材料或聚阴离子材料,其具有大于1000的分子量和每分子至少5个电荷,并且

其中所述第一多层膜沉积在核心颗粒上或者为通过溶解所述核心颗粒制备的胶囊形式,

其中T1表位的序列为DPNANPNVDPNANPNV;

所述B表位的序列为NANP;并且

所述T*表位的序列为EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT。

2. 权利要求1所述的组合物,其中所述第一抗原性聚电解质是多肽。

3. 权利要求2所述的组合物,其中所述多肽是长度为至少15个氨基酸并且在pH 7.0时具有量级大于或等于每个残基0.2个净电荷的经设计多肽。

4. 权利要求1所述的组合物,其中所述多层膜是共价交联的。

5. 权利要求4所述的组合物,其中所述共价交联是涉及氨基酸侧链官能团的酰胺键。

6. 权利要求1所述的组合物,其中所述第一多层膜还包含TLR配体。

7. 权利要求6所述的组合物,其中所述TLR配体与所述第一抗原性聚电解质共价连接。

8. 权利要求1所述的组合物,其还包含第二多层膜,所述第二多层膜包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中所述第二多层膜中的所述层之一包含第二抗原性聚电解质,

其中所述第二抗原性聚电解质包含与第二聚电解质共价连接的恶性疟原虫环孢子T1、B或T*表位,其中所述第一和第二抗原性聚电解质包含不同的恶性疟原虫环孢子表位。

9. 权利要求8所述的组合物,其中所述第一和第二聚电解质是多肽。

10. 权利要求8所述的组合物,其中所述第一和第二多层膜沉积到核心颗粒上。

11. 权利要求8所述的组合物,其中所述第一和/或所述第二多层膜还包含TLR配体。

12. 权利要求11所述的组合物,其中所述TLR配体与所述第一和/或第二抗原性聚电解质共价连接。

13. 权利要求8所述的组合物,其还包含第三多层膜,所述第三多层膜包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中所述第三多层膜中的所述层之一包含第三抗原性聚电解质,

其中所述第三抗原性聚电解质包含与第三聚电解质共价连接的恶性疟原虫环孢子T1、B或T*表位,其中所述第一、第二和第三抗原性聚电解质包含不同的恶性疟原虫环孢子表位。

14. 权利要求13所述的组合物,其中所述第一、第二和第三聚电解质是多肽。

15. 权利要求13所述的组合物,其中所述第一、第二和第三多层膜沉积到核心颗粒上。

16. 权利要求13所述的组合物,其中所述第一、第二和/或第三多层膜还包含TLR配体。

17. 权利要求16所述的组合物,其中所述TLR配体与所述第一、第二和/或第三抗原性聚电解质共价连接。

18. 组合物,其包含:

第一多层膜,其包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中所述多层膜中的所述聚电解质层之一包含第一抗原性多肽,

其中所述第一抗原性多肽包含与第一多肽共价连接的恶性疟原虫环子孢子T1BT*表位,并且

其中所述多层膜中的所述聚电解质包含聚阳离子材料或聚阴离子材料,其具有大于1000的分子量和每分子至少5个电荷,

其中所述多肽是长度为至少15个氨基酸并且在pH 7.0时具有量级大于或等于每个残基0.2个净电荷的经设计多肽,并且

其中所述第一多层膜沉积在核心颗粒上或者为通过溶解所述核心颗粒制备的胶囊形式,

其中T1表位的序列为DPNANPNVDPNANPNV;

所述B表位的序列为NANP;并且

所述T*表位的序列为EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT。

19. 权利要求1至18中任一项所述的组合物在制备用于在哺乳动物生物体中诱发免疫应答之药物中的用途。

抗疟疾微颗粒疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年3月30日提交的美国临时申请序列号61/617,998的优先权，其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及用于预防疟疾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] 疟疾是全世界热带和亚热带地区最流行的感染之一。疟疾感染每年在全世界范围造成数以亿计个体的严重疾病，导致数以百万计的个体死亡，其主要存在于发展中国家和新兴国家。疟疾的广泛发生和发病率的提高是抗药寄生虫和抗杀虫剂寄生虫载体的数目提高的结果。其他因素包括环境和气候变化、内乱以及人口迁移的增长。

[0005] 疟疾由蚊传播的属于疟原虫(*Plasmodium*)属的血液原生动物(hematoprotzoan)寄生虫造成。4个种的疟原虫原生动物(恶性疟原虫(*P.falciparum*)、间日疟原虫(*P.vivax*)、卵形疟原虫(*P.ovale*)和三日疟原虫(*P.malariae*))是人类中疾病的原因；其他许多疟原虫在动物中造成疾病，例如小鼠中的约氏疟原虫(*P.yoelii*)和伯氏疟原虫(*P.berghei*)。恶性疟原虫占了感染中的大部分，是最致命的类型，其有时候被称为“热带疟疾”。疟疾寄生虫的生命周期由多个阶段组成。每一阶段能够诱导针对相应出现的阶段特异性抗原的特异性免疫应答。

[0006] 需要适于刺激针对疟疾的免疫应答的改进的抗原性组合物。

发明内容

[0007] 在一个方面中，组合物包含：

[0008] 第一多层膜，所述第一多层膜包含多个带相反电荷的聚电解质(polyelectrolyte)层，其中所述多层膜中的所述聚电解质层之一包含第一抗原性聚电解质，

[0009] 其中所述第一抗原性聚电解质包含与第一聚电解质共价连接的恶性疟原虫环子孢子(circumsporozoite)T1、B或T*表位，并且

[0010] 其中所述多层膜中的所述聚电解质包含聚阳离子材料或聚阴离子材料，其具有大于1000的分子量和每分子至少5个电荷。

[0011] 在另一个实施方案中，组合物包含：

[0012] 第一多层膜，其包含多个带相反电荷的聚电解质层，其中所述多层膜中的所述聚电解质层之一包含第一抗原性多肽，

[0013] 其中所述第一抗原性多肽包含共与第一多肽共价连接的恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位，并且

[0014] 其中所述多层膜中的所述聚电解质包含聚阳离子材料或聚阴离子材料,其具有大于1000的分子量和每分子至少5个电荷。

[0015] 附图简述

[0016] 图1示出了含有环孢子肽的纳米颗粒的表位和经设计肽。(上图)恶性疟原虫CS蛋白的图示出了T1、B和T*表位的位置和序列。(下图)与多赖氨酸尾融合的CS亚基肽的设计。

[0017] 图2和3示出了用含有疟疾CS表位的纳米颗粒进行免疫接种后的抗体应答。在第0天、第21天和第42天对BALB/c(图2)和C57BL/6(图3)小鼠(3只/组,5至6周龄)进行免疫。在第28天,对小鼠放血并通过ELISA测试合并血清中的T1BT*-特异性IgG滴度。

[0018] 图4示出了疟疾纳米颗粒的抗原性。用图例中指示的纳米颗粒包被ELISA板并使用连续稀释的NANP特异性mAb 2A10探测。在用与HRP缀合的第二抗体孵育后,用Ultra TMB底物对板显色。结果反映为一式三份样品OD450的平均值 $\pm$ SD。

[0019] 图5和6示出了CS LbL纳米颗粒在BALB/c(图5)和C57BL/6(图6)小鼠中诱导的T细胞应答。如上所述对小鼠进行免疫。在第49天收集脾细胞,浓缩CD4+或CD8+细胞,在ELISPOT板中用T*或T1再刺激。结果表示为每组3只小鼠的平均值 $\pm$ SD。

[0020] 图7示出了含有疟疾CS表位的纳米颗粒诱发的T细胞应答。将用T1BT*肽或纳米颗粒进行免疫随后用PfPb攻击(challenge)的小鼠的脾在抗T1BT*(图A)或T1(图B)肽的IL-5和IFN γ ELISPOT中进行测试。数据表示为每组7只小鼠的平均值 $\pm$ SD。

[0021] 图8示出了被攻击小鼠的肝中的寄生虫RNA水平。从图7报道的被PfPb攻击小鼠的肝中提取RNA并通过qPCR分析寄生虫负载(parasite burden)。结果示出了单个小鼠中每份肝RNA样品中的寄生虫rRNA拷贝数。灰色柱表示寄生虫rRNA拷贝数与7只PBS处理小鼠的平均值相比降低 $>90\%$ ($1-\log$);点刻的(stippled)浅灰色柱表示与PBS平均值相比降低 $>80\%$ 。

[0022] 图9示出了含有疟疾T1BT*表位的LbL微颗粒的免疫原性和效力。如上所述在第0天和第21天对C57BL/6小鼠进行免疫。在第28天收集血清并通过ELISA测试T1B-特异性IgG滴度以及通过TSNA测试功能性抗体。抗体滴度(灰色柱)和抑制%(红色柱)的结果表示为每组五只小鼠的平均值 $\pm$ SD;将来自5只模拟免疫(PBS)小鼠的合并血清用于这两个测定。与1140相比,ELISA的 $*P<0.05$;与1140相比,ELISA和TSNA的 $**P<0.05$ 。

[0023] 图10示出了图9中所述小鼠的T细胞应答。在第28天,收集脾细胞并在IFN γ 和IL-5 ELISPOT板中用T1BT*肽再刺激,在AID ViruSpot Reader中对每个板中斑点形成细胞进行计数。结果表示为每组3只小鼠的平均值 $\pm$ SD。

[0024] 图11示出了用含有T1BT*表位的LbL微颗粒进行免疫的小鼠中的保护效力。在第0天、第21天和第42天对C57BL/6小鼠进行免疫,并在第56天进行攻击。在攻击后2天时通过qPCR测量肝中的寄生虫负载。结果示出了个体小鼠的寄生虫rRNA拷贝数(灰色圆)和每一组的平均值(红条);插入内容示出了每组中被保护(寄生虫rRNA降低 $\geq 90\%$)的小鼠的数量、组寄生虫rRNA降低%以及 $*P<0.05$,其均与PBS对照组比较;NS=不显著。

[0025] 图12示出了来自图11中MP-1141组的8个随机选择个体血清的体内对抗寄生虫攻击的保护与体外中和活性的比较。

[0026] 图13示出了来自图11中MP-1142组的8个随机选择个体血清的体内对抗寄生虫攻

击的保护与体外中和活性的比较。

[0027] 图14示出了图11中所述小鼠的T细胞应答。在第0天、第21天和第42天通过所指示处理(分别为CFA和IFA中的肽2062)对小鼠进行免疫。在第49天收集脾细胞并在IFN γ 和IL-5ELISPOT板中用T1BT*再刺激。数据表示为每组3只小鼠的平均值 $\pm$ SD。

[0028] 图15示出了含有疟疾T1BT*表位的LbL微颗粒诱导的细胞免疫。对BALB/c小鼠用PBS进行模拟免疫或用MP-1141进行免疫,7天后,耗尽CD4+细胞或CD8+细胞或它们二者。耗尽后的第二天测量体内CTL活性。结果表示为每组3只小鼠中肽特异性杀死的百分比的平均值 $\pm$ SD。X轴表示攻击当天小鼠中保留的T细胞的表型。

[0029] 图16示出了含有疟疾伯氏疟原虫CS表位的LbL微颗粒诱导的细胞免疫。如上文所述,在第0天和第28天用弗氏佐剂中的DP 2147(Pb CD4+:CD8+融合肽)或者负载有Pb CD4+肽的MP(MP-1182)、负载有Pb CD8+肽的MP(MP-1183)或负载有Pb CD4+:CD8+融合肽的MP(MP-1184)对BALB/c小鼠进行免疫(每个剂量10 μ gDP)。在第35天,测量每组3只小鼠的体内CTL活性。结果表示为用靶肽脉冲细胞肽特异性杀死的百分比的平均值 $\pm$ SD。

[0030] 图17是示出了通过暴露于被PfPb感染的蚊子攻击的图16中每组其余10只小鼠的效力以及40个小时后通过qPCR测量的肝中的寄生虫负载。结果如图11的图例中的描述所示。

[0031] 图18示出了疟疾Pam3Cys.T1B微颗粒在C57BL/6小鼠中诱发的抗体应答。在第0天和第21天对小鼠进行免疫,并在第28天放血,用抗T1B肽的ELISA来测试血清。结果表示为每组10只小鼠的抗-T1B IgG抗体滴度的平均值 $\pm$ SD。§与MP-1167组相比, $P<0.05$ 。

[0032] 图19示出了图18血清中的抗体应答的同种型分布。用1:250稀释的个体血清重复T1B ELISA,用同种型特异性检测抗体探测每一份血清。结果表示为每组10只小鼠的平均值 $\pm$ SD。

[0033] 图20示出了图18中所述小鼠中的效力。对C57BL/6小鼠,在第0天、第21天和第42天用Pam3Cys.T1B微颗粒进行免疫,并在第56天通过暴露于被PfPb感染的蚊子攻击。攻击后第40小时通过qPCR测量肝中的寄生虫负载。

[0034] 通过以下发明详述、附图和所附权利要求,本领域技术人员将领会和理解上述和其他特征。

[0035] 发明详述

[0036] 本文公开了包含来自疟原虫原生动物的多肽表位的多层膜,其中所述多层膜在向宿主施用后能够在宿主中诱发免疫应答。特别地,所述膜包含一种或更多种恶性疟原虫环孢子蛋白质抗原,其中所述环孢子蛋白质抗原包含T1表位、B表位和/或T*表位。还包括包含两个或更多个不同多层膜的组合物。

[0037] 本文使用的恶性疟原虫环孢子蛋白质抗原是:

[0038] T1:DPNANPNVDPNANPNV(SEQ ID NO:1)

[0039] B:NANP(SEQ ID NO:2)

[0040] T*:EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT(SEQ ID NO:3)

[0041] 在某些实施方案中,T1、B或T*表位(尤其是B表位)重复2次或更多次。

[0042] 特别地,多层膜包含带相反电荷的聚电解质的交替层。任选地,一种或更多种聚电解质是多肽。在某些实施方案中,多层膜包含多个来自疟原虫原生动物的表位。例如,第一

和第二疟原虫原生动物多肽表位可与相同或不同的聚电解质连接,和/或可存在于相同或不同的多层膜中。在一个实施中,第一和第二疟原虫原生动物多肽表位与相同的聚电解质共价连接,因此在相同的多层膜中。在另一个实施方案中,第一和第二疟原虫原生动物多肽表位与不同的聚电解质共价连接,但是在相同的多层膜中成层。在又一个实施方案中,第一和第二疟原虫原生动物多肽表位与不同的聚电解质共价连接,但是在不同的多层膜中成层,所述多层膜随后在施用前混合。

[0043] 在一个实施方案中,组合物包含第一多层膜,所述第一多层膜包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中所述多层膜中的聚电解质层之一包含第一抗原性聚电解质,其中所述第一抗原性聚电解质包含与第一聚电解质共价连接的恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位,其中所述多层膜中的所述聚电解质包含聚阳离子材料或聚阴离子材料,其具有大于1000的分子量和每分子至少5个电荷。

[0044] 第一抗原性聚电解质包含恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位中的至少一种。在一个实施方案中,第一抗原性聚电解质包含恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位中的两种,例如任意顺序的T1T*、T1B或BT*。在又一个实施方案中,第一抗原性聚电解质包含恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位中的全部三种。

[0045] 在一个实施方案中,第一聚电解质是包含恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位中的至少一种表位的多肽。在一个实施方案中,第一抗原性多肽包含恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位中的两种,例如任意顺序的T1T*、T1B或BT*。所述表位在多肽链上可以是相邻的或者被间隔区隔开。类似地,所述表位可以在多肽的N端、多肽的C端或者它们之间的任意地方。在又一个实施方案中,第一抗原性聚电解质是包含恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位中的全部三种的多肽。T1、B或T*表位可以是多肽上的相邻部分,或者任意或全部表位被间隔区隔开。

[0046] 应注意的是,当第一抗原性聚电解质是多肽时,所述多肽带有足够沉积到多肽多层膜中的电荷。在一个实施方案中,如本文中说明的,在pH 7.0下,多肽的每个残基的净电荷大于或等于0.1、0.2、0.3、0.4或0.5。

[0047] 在另一个实施方案中,恶性疟原虫环子孢子T1、B和T*表位不是位于相同的聚电解质上,而是两个或更多个表位可存在于分开的聚电解质上,并成层到相同的多层膜中。在一个实施方案中,第一多层膜还包含第二抗原性聚电解质,所述第二抗原性聚电解质包含与第二聚电解质共价连接的恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位,其中所述第一和第二抗原性聚电解质包含不同的恶性疟原虫环子孢子表位。在另一个实施方案中,第一多层膜还包含第三抗原性聚电解质,所述第三抗原性聚电解质包含与第三聚电解质共价连接的恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位,其中第一、第二和第三抗原性聚电解质包含不同的恶性疟原虫环子孢子表位。在一个实施方案中,第一、第二和/或第三聚电解质是多肽。

[0048] 在一个实施方案中,第一、第二和任选地第三聚电解质存在于分开的多层膜中,例如两个或三个独立的包衣核心的群,每一个群包含不同的多层膜。因此,在一个实施方案中,组合物包含上述第一多层膜和第二多层膜,所述第二多层膜包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中第二多层膜中的层之一包含第二抗原性聚电解质,其中所述第二抗原性聚电解质包含与第二聚电解质共价连接的恶性疟原虫环子孢子T1、B或T*表位,其中所述第一和第二抗原性聚电解质包含不同的恶性疟原虫环子孢子表位。在另一个实施方案中,所

述组合物还包含第三多层膜,所述第三多层膜包含多个带相反电荷的聚电解质层,其中所述第三多层膜中的层之一包含第三抗原性聚电解质,其中所述第三抗原性聚电解质包含与第三聚电解质共价连接的恶性疟原虫环孢子T1、B或T*表位,其中所述第一、第二和第三抗原性聚电解质包含不同的恶性疟原虫环孢子表位。在某些实施方案中,所述第一、第二和/或第三聚电解质是多肽。在一些实施方案中,所述第一、第二和第三多层膜成层在核心颗粒上,从而使得组合物包含两个或三个不同的颗粒群。

[0049] 在某些实施方案中,多层膜还包含tol1样受体配体。本文使用的tol1样受体配体或TLR配体是与TLR结合并活化或抑制TLR受体的分子。TLR信号转导通过识别病原体关联性分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)及模拟物活化,导致编码促炎细胞因子、趋化因子和共刺激分子的基因的转录活化,其可控制抗原特异性适应性免疫应答的活化。TLR已被作为多种炎症疾病和癌症的潜在治疗靶标。在活化之后,TLR诱导若干蛋白质家族的表达,包括炎性细胞因子、I型干扰素和趋化因子。TLR受体配体可充当免疫应答的佐剂。

[0050] 示例性TLR配体包括TLR1配体、TLR2配体、TLR3配体、TLR4配体、TLR5配体、TLR6配体、TLR7配体、TLR8配体、TLR9配体及其组合。

[0051] 示例性TLR1配体包括细菌脂肽。示例性TLR2配体包括脂肽,例如Pam3Cys([N-棕榈酰基-S-[2,3-双(棕榈酰氧基)丙基]半胱氨酸])和Pam2Cys(Pam2Cys[S-[2,3-双(棕榈酰氧基)丙基]半胱氨酸])。示例性TLR6配体是二酰基脂肽。TLR1和TLR6需要与TLR2异源二聚化以识别配体。TLR1/2被三酰基脂蛋白(或脂肽,例如Pam3Cys)活化,而TLR6/2被二酰基脂蛋白(例如Pam2Cys)活化,但是其有时候可交叉识别。

[0052] 示例性TLR3配体是聚(I:C)。示例性TLR4配体是脂多糖(LPS)和单磷脂A(MPL)。示例性TLR5配体是鞭毛蛋白。示例性TLR7配体是咪喹莫特。示例性TLR8配体是单链RNA。示例性TLR9配体是未甲基化的CpG寡脱氧核苷酸DNA。

[0053] 在一个实施方案中,第一、第二或第三抗原性聚电解质(例如,抗原性多肽)具有与其共价连接的TLR配体。例如,可通过标准合成化学使Pam3Cys与多肽链共价连接。

[0054] 在另一个实施方案中,基底(例如,模板核心)在聚电解质层沉积之前,TLR配体已经沉积在其上。在另一个实施方案中,在多层膜的组装过程中,TLR配体与一种或更多种聚电解质层共沉积。

[0055] 在一个实施方案中,多层膜沉积在核心颗粒上,例如CaCO₃纳米颗粒、乳胶颗粒或铁颗粒。直径为5纳米(nm)至500微米(μm)量级的颗粒大小特别有用,直径为1μm或更大的较大颗粒(例如3μm直径颗粒)同样如此。也可使用由其他材料制成的颗粒作为核心,只要其生物相容、具有受控的大小分布并且具有足够结合聚电解质多肽的表面电荷(阳性或阴性)即可。实例包括由例如以下材料制成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。核心颗粒也可由被认为不适用于人类使用的材料制成,只要其在膜制造后可溶解并与多层膜分开即可。模板核心基底的实例包括有机聚合物(例如乳胶)或无机材料(例如二氧化硅)。

[0056] 聚电解质多层膜是由带相反电荷的聚电解质的交替层组成的薄膜(例如,厚几纳米至微米)。这种膜可通过在适当的基底上逐层组装形成。在静电逐层自组装(“LBL”)中,聚合物基质缔合的物理基础是静电吸引。由于沉积的连续层上膜表面电荷密度的符号相反,

所以膜可以堆积。LBL膜工艺的通用性和相对简便性允许在许多不同种类的表面上沉积许多不同种类的聚电解质。多肽多层膜是聚电解质多层膜的子集,包括至少一个包含带电多肽的层,所述带电多肽在本文中被称为经设计多肽。多肽多层膜优于由其他聚合物制成的膜的关键优势是其生物相容性。LBL膜还可用于封装。多肽膜和微胶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。

[0057] 术语“聚电解质”包括聚阳离子材料和聚阴离子材料,其具有大于1000的分子量和每分子至少5个电荷。合适的聚阳离子材料包括例如多肽和多胺。多胺包括例如:多肽,例如聚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(乙撑亚胺)、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化物)、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前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,例如聚L-谷氨酸(PGA)和聚L-天冬氨酸、核酸如DNA和RNA、藻酸类(alginate)、角叉菜胶、红藻胶(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基纤维素、包含侧链羧基的合成聚合物和共聚物,以及包含一种或更多种前述聚阴离子材料的组合。在一个实施方案中,疟原虫原生动物表位和聚电解质具有相同电荷符号。

[0058] 在一个实施方案中,膜的一个或更多个聚电解质层(任选地包括包含疟原虫原生动物表位的聚电解质)是经设计多肽。在一个实施方案中,适合于静电逐层沉积的多肽设计原则描述于美国专利公开No.2005/0069950中,其关于多肽多层膜的教导通过引用并入本文导。简言之,主要的设计关注点在于多肽的长度和电荷。作为LBL的基础,静电是最重要的设计关注点。没有合适的电荷性质,多肽就可能无法基本上溶解在pH 4至10的水溶液中并且不能容易地用于通过LBL制造多层膜。其他设计关注点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。

[0059] 经设计多肽是指具有足以与带相反电荷的表面结合的电荷的多肽,即可沉积到多层膜的层中的多肽,其中用于成膜的驱动力是静电。短的稳定膜是一旦形成,在37℃下于PBS中孵育24小时后保持超过一半其组分的膜。在一些具体实施方案中,经设计多肽长度为至少15个氨基酸,并且在pH 7.0时多肽每个残基的静电电荷的量级大于或等于0.1、0.2、0.3、0.4或0.5。在pH 7.0下带正电荷(碱性)的天然氨基酸是精氨酸(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)的天然氨基酸是谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)。可使用带相反电荷的氨基酸残基的混合物,只要电荷的总的净比例满足指定的标准即可。在一个实施方案中,经设计多肽不是均聚物。在另一个实施方案中,经设计多肽无支链。

[0060] 一个设计关注点是控制多肽LBL膜的稳定性。离子键、氢键、范德华相互作用和疏水相互作用均对多层膜的稳定性具有贡献。另外,同一层或相邻层中的多肽中含巯基氨基酸之间形成的共价二硫键可提高结构强度。含巯基氨基酸包括半胱氨酸和同型半胱氨酸,这些残基可容易地引入到合成的经设计肽中。此外,可通过文献中充分描述的方法将巯基

引入到聚电解质均聚物(如聚L-赖氨酸或聚L-谷氨酸)中。通过改变氧化电势,可将含巯基氨基酸用于“锁定”(结合在一起)或“解锁”的多层多肽膜的层。另外,向经设计肽中引入含巯基氨基酸能够借助分子间二硫键的形成使用相对短的肽制造薄膜。

[0061] 在一个实施方案中,无论是化学合成的还是在宿主生物体中产生的,在还原剂的存在下通过LBL来组装经设计的含巯基多肽,以防止过早形成二硫键。在膜组装之后,除去还原剂并添加氧化剂。在氧化剂的存在下,巯基之间形成二硫键,从而在巯基存在的地方将层内和层间的多肽“锁定”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)、以及超过一种这些化学物质的组合。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、溴化钠、过氧化氢、连四硫酸钠、porphyrindin、邻亚碘酰苯甲酸钠(orthoiodosobenzoate)及超过一种这些化学物质的组合。

[0062] 作为二硫键的替选,可使用产生其他共价键的化学物质稳定LBL膜。对于由多肽构成的膜,产生酰胺键的化学物质特别有用。在适当的偶联剂的存在下,酸性氨基酸(侧链包含羧基的那些,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。在生理条件下,酰胺键比二硫键更稳定,并且酰胺键不发生交换反应。许多试剂可用于活化用于酰胺键合的多肽侧链。碳二亚胺试剂(例如水溶性1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC))将在微酸性pH下与天冬氨酸或谷氨酸反应,形成中间产物,所述中间产物将与氨基不可逆地反应产生酰胺键。通常向反应中添加添加剂如N-羟基琥珀酰亚胺以加快酰胺形成的速度和效率。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试剂。其他偶联剂的实例包括二异丙基碳二亚胺、HBTU、HATU、HCTU、TBTU和PyBOP。其他添加剂的实例包括磺基-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,并且可通过例如傅里叶变换红外光谱(FT-IR)的技术来监测。

[0063] 共价交联的LBL膜具有期望的性质,例如提高的稳定性。更高的稳定性允许在纳米颗粒、微颗粒、纳米胶囊或微胶囊的制造过程中使用更严格的条件。严格条件的例子包括高温、低温、深冷温度(cryogenic temperature)、高离心分离速度、高盐缓冲液、高pH缓冲液、低pH缓冲液、过滤和长期储存。

[0064] 制造聚电解质多层膜的方法包括在基底上沉积多个带相反电荷的化学物质层。在一个实施方案中,至少一个层包含经设计多肽。相继沉积的聚电解质具有相反静电荷。在一个实施方案中,聚电解质的沉积包括在聚电解质具有用于LBL的合适静电荷的pH下,将基底暴露于包含聚电解质的水溶液。在另一些实施方案中,通过连续喷射带相反电荷多肽的溶液来取得聚电解质在基底上的沉积。在又一些实施方案中,通过同时喷涂带相反电荷的聚电解质的溶液来在基底上沉积。

[0065] 在形成多层膜的LBL方法中,相邻层的相反电荷为组装提供了驱动力。相对层中聚电解质是否具有相同的净线性电荷密度并不重要,只要相对层具有相反电荷即可。一种通过沉积进行的标准膜组装方法包括:在其离子化的pH(即,pH 4-10)下形成聚离子的水溶液,提供具有表面电荷的基底,将所述基底交替沉浸在带电荷的聚电解质溶液中。任选地在交替层沉积之间洗涤所述基底。

[0066] 本领域技术人员可容易地确定适合于聚电解质沉积的聚电解质浓度。示例性浓度是0.1mg/mL至10mg/mL。对于典型的非多肽聚电解质,例如聚(丙烯酸)和聚(烯丙胺盐酸盐),典型的层厚度为约**3 Å**至约**5 Å**,取决于溶液的离子强度。短聚电解质通常形成比长聚电解质更薄的层。对于膜厚度,聚电解质膜厚度取决于湿度以及膜的层数和组成。例如,在利用氮气干燥后,50nm厚的PLL/PGA膜收缩至1.6nm。一般来说,可根据膜的水合状态和组装中使用的聚电解质的分子量形成1nm至100nm或更厚的膜。

[0067] 另外,形成稳定的聚电解质多层膜所需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个或更多个带相反电荷的多肽双层。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,包含带相反电荷的聚电解质单个双层的膜可以是稳定的。研究表明,聚电解质膜是动态的。当混悬在聚电解质溶液中时,膜中包含的聚电解质可在层之间迁移并可与相同电荷的可溶性聚电解质交换。另外,聚电解质膜可响应于环境如温度、pH、离子强度或悬液缓冲剂的氧化电势的改变而拆卸或溶解。因此,一些电解质聚电解质(并且特别是肽聚电解质)表现出瞬态稳定性。可通过在受控的条件下将膜混悬在合适的缓冲液中固定的一段时间,然后通过合适的试验如氨基酸分析、HPLC测定或荧光测定来测量膜内肽的量来检测肽聚电解质的稳定性。在肽聚电解质膜作为疫苗储存和使用的相关条件下,肽聚电解质膜最稳定,例如在中性缓冲液中以及在环境温度如4°C至37°C下。在这些条件下,稳定的肽聚电解质膜将使其大部分组分肽保持至少24小时,通常长达14天或更久。

[0068] 在一个实施方案中,经设计多肽包含与一个或更多个疟原虫原生动物表位共价连接的一个或更多个表面吸附区,其中所述经设计多肽与所述一个或更多个表面吸附区具有相同的电荷符号,即,二者整体均带正电荷或负电荷。本文使用的表面吸附区是经设计多肽的带电区域,其有利地提供足够的电荷以使得含有来自疟原虫原生动物的表位的肽能够例如沉积到多层膜中。在一个实施方案中,一个或更多个表面吸附区和一个或更多个疟原虫原生动物表位具有相同净极性。在另一个实施方案中,经设计多肽在pH 4至10下的溶解度大于或等于约0.1mg/mL。在另一个实施方案中,经设计多肽在pH 4至10下的溶解度大于或等于约1mg/mL。溶解度是促进多肽从水溶液中沉积的实际限制。抗原性多肽聚合度的实际上限是约1000个残基。但是,可以想到的是,通过合适的合成方法,可产生更长的复合多肽。

[0069] 在一个实施方案中,经设计多肽包含被两个表面吸附区(N端表面吸附区和C端表面吸附区)侧翼的单个抗原性疟原虫原生动物表位。在另一个实施方案中,经设计多肽包含单个抗原性疟原虫原生动物表位,其侧翼是一个与疟原虫原生动物表位的N端连接的表面吸附区。在另一个实施方案中,经设计多肽包含单个抗原性疟原虫原生动物表位,其侧翼是一个与疟原虫原生动物表位的C端连接的表面吸附区。

[0070] 可通过溶液相肽合成、固相肽合成或合适宿主生物体的基因工程来分别合成经设计肽的每个独立区域(例如,疟原虫原生动物表位和表面吸附区)。溶液相肽合成是目前用于生产市场上大部分经批准肽药物的方法。溶液相和固相的组合可用于合成相对长的肽,甚至是小的蛋白质。在按服务收费的基础上,肽合成公司具有合成难以合成之肽的专业知识和经验。合成在药品生产质量管理规范(good manufacturing practices,GMP)条件和适于进行临床试验和商业药物的规模下进行。

[0071] 或者,可通过溶液相肽合成、固相肽合成或合适宿主生物体的基因工程将多个独

立区域作为单个多肽链一起合成。任何具体情况下方法的选择是方便和经济的问题。

[0072] 如果分别合成疟原虫原生动物表位和表面吸附区,那么一旦通过例如离子交换色谱或高效液相色谱纯化,就通过肽键合成使其连接。即,将表面吸附区的N端与疟原虫原生动物表位的C端共价连接以产生经设计肽。或者,将表面吸附区的C端与疟原虫原生动物表位的N端共价连接以产生经设计肽。个体片段可通过固相方法合成,并作为完全保护、完全未保护或部分保护的片段获得。可在溶液相反应或固相反应中使片段共价连接。如果一条多肽片段包含半胱氨酸作为其N端残基,另一条多肽片段在其C端残基包含硫酯或硫酯前体,那么两条片段将通过(本领域技术人员)公知为天然连接(Native Ligation)的特定反应在溶液中自发结合。在经设计肽的合成中,天然连接是特别有吸引力的选择,因为其可在水溶液和稀浓度下利用完全去保护或部分保护的肽来进行。

[0073] 在一个实施方案中,疟原虫原生动物表位和/或表面吸附区通过肽键或非肽键连接,如美国专利No.7,723,294所述,其关于使用非肽键连接用于多层膜的多肽片段的教导通过引用并入本文。合适的非肽接头包括例如烷基接头,例如 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_s\text{-C(O)-}$,其中 $s=2$ 至20。烷基接头任选地被非空间位阻基团取代,例如低级烷基(例如, $\text{C}_1\text{-C}_6$)、低级酰基、卤素(例如, Cl 、 Br)、 CN 、 NH_2 、苯基等。另一种示例性非肽接头是聚乙二醇接头,例如 $\text{-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-C(O)-}$,其中 n 使得接头的分子量为100Da至5000Da,特别地100Da至500Da。许多本文所述接头可以以适合于在固相肽合成中使用的方式从供应商处得到。

[0074] 在一个实施方案中,来自疟原虫原生动物的一个或更多个多肽表位与一种或更多种聚电解(例如,多肽或其他聚电解质)通过共价键共价连接。合适的共价键的实例包括酰胺、酯、醚、硫醚和二硫化物。本领域技术人员可利用表位肽中发现的一系列官能团来设计适合电解质的键。例如,可在天冬氨酸或谷氨酸氨基酸的C端或侧链发现表位肽中的羧酸。可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)活化羧酸以与肽聚电解质如聚L-赖氨酸中存在的伯胺或仲胺反应。所得酰胺键在环境条件下稳定。相反地,可利用EDC活化肽聚电解质中的酸基团以与表位肽中的氨基反应。可在表位肽的N端或赖氨酸的侧链上发现可用的氨基。

[0075] 也可通过二硫键将表位肽连接到聚电解质上。可以对聚电解质如PGA或PLL进行化学修饰以使其侧链的一部分含有巯基。在合适的氧化剂的存在下,这些巯基与表位肽中包含的半胱氨酸残基的巯基反应。所述半胱氨酸可以是来自病原体如疟原虫原生动物的蛋白质序列的天然半胱氨酸或者其可以是在肽合成中有意引入到表位中的非天然半胱氨酸。合适的氧化剂包括DTNB、2,2'-二硫代吡啶、过氧化氢、胱氨酸和氧化型谷胱甘肽。通过二硫键将表位肽连接到聚电解质上特别有用。在制造和储存膜的正常条件下,二硫键是稳定的,但是容易被细胞中天然存在的还原剂裂解,其释放表位肽用于免疫过程。

[0076] 还可通过硫醚键将表位肽连接到聚电解质上。合成表位肽可利用特异性与巯基反应的合适亲电子体如卤代乙酰基合成。例如,在N端含有氯乙酰基的表位肽可与聚电解质如上述PGA-SH上的巯基形成稳定的键。

[0077] 还可通过双官能接头分子将表位肽共价连接到聚电解质上。双官能接头通常包含两个亲电子基团,其可与表位肽或聚电解质分子上存在的亲核体反应。市售两类接头分子,同型双官能接头和异型双官能接头。同型双官能接头包含通过不反应的间隔区连接的两个拷贝的亲电子基团。通常,亲电子体是与亲核胺反应的活性酯,例如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)。同型双官能NHS酯的实例包括双(磺基琥珀酰亚胺)辛二酸酯、双琥珀酰亚胺戊二酸酯、二硫代双(琥珀酰亚胺)丙酸酯、双琥珀酰亚胺辛二酸酯、双琥珀酰亚胺酒石酸酯。有时,亲电子体是醛基,其与表位和聚电解质分子上的亲核胺反应形成酰亚胺。酰亚胺键短暂稳定,但是可利用还原剂如硼氢化钠或催化加氢转变成稳定的结构。最常用的同型双官能醛接头是戊二醛。

[0078] 另一些常用同型双官能接头包含与亲核巯基特异性反应的亲电子体,其可用于连接含有半胱氨酸的表位肽和上述含巯基的聚电解质。巯基特异性同型双官能接头的实例包括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、 ν 双马来酰亚胺己烷、双马来酰亚胺乙烷、1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫代)-丙酰胺基]丁烷、二硫代-双马来酰亚胺乙烷、1,6-己烷-双-乙烯砜。

[0079] 异型双官能类交联剂的成员包含两种不同的反应性基团(通常是但不总是亲电子体),其与基底分子中的不同官能团特异性反应。特别有用的是这样的接头,其包含巯基特异性的一个亲电子基团和氨基特异性的另一个亲电子体。这些试剂的实例包括N-磺基琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯、琥珀酰亚胺基3-[溴乙酰氨基]丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯、磺基琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯、琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯、([N-e-马来酰亚胺基己酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、间马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸酯、琥珀酰亚胺基6-(3-[2-吡啶二硫代]-丙酰胺基)己酸酯、4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-甲基-a-[2-吡啶二硫代]甲苯。

[0080] 通常存在于表位肽和聚电解质二者中的或可容易地固定在二者中任一种分子中的范围广泛的功能团(functionality)允许人们选择最匹配目的基底的连接策略。可能的例子是将含有半胱氨酸的表位肽与PLL连接。

[0081] 根据非肽接头的化学性质,可通过多种方式连接多肽片段。例如,第一多肽片段的N端与第二多肽片段的C端连接;第一多肽片段的N端与第二多肽片段的N端连接;第一多肽片段的C端与第二多肽片段的C端连接;第一多肽片段的C端与第二多肽片段的N端连接;第一多肽片段的C端或N端与第二多肽片段的侧链(pendant side chain)连接;或者第二多肽片段的C端或N端与第一多肽片段的侧链连接;但是,无论连接点如何,第一片段与第二片段都是通过非肽接头共价连接。

[0082] 在一个实施方案中,经设计肽是共价连接的一个或更多个表面吸附区和一个或更多个疟原虫原生动物表位的独特组合。对于疟原虫原生动物表位的长度没有特别限制,其可以是线性表位或构象表位。表位可包含从约三个氨基酸残基至复杂构象表位的数百氨基酸残基的任意长度。

[0083] 在一个实施方案中,经设计多肽包含一个疟原虫原生动物表位和一个表面吸附区。在另一个实施方案中,经设计多肽包含一个疟原虫原生动物表位和两个表面吸附区,其中一个与所述疟原虫原生动物表位的N端连接,一个与所述疟原虫原生动物表位的C端连接。表面吸附区的目的是使所述多肽能够吸附在带相反电荷的表面上以构建多层膜。

[0084] 经设计多肽中表面吸附区的数量相对于疟原虫原生动物表位的数量和/或长度与所需溶解度有关。例如,如果疟原虫原生动物表位是短氨基酸序列(例如,三个氨基酸残基),仅需要一个至少8个氨基酸残基的表面吸附区来将经设计多肽吸附在合适的带电表面

上。相反地,如果疟原虫原生动物表位是包含例如120个氨基酸残基的蛋白质的可溶性折叠结构域,可需要两个表面吸附区以使经设计多肽具有足够的电荷以便在水中可溶并且适于吸附。表面吸附区可以是连续的并且位于结构域的N端,连续的并且位于结构域的C端,或者不连续的并且一个位于N端而另一个位于C端。另外,疟原虫原生动物表位可在其自身序列中包含带电片段(带负电荷或带正电荷),其可充当表面吸附区。

[0085] 多肽或抗原可包含一个或更多个不同的抗原决定簇。抗原决定簇可指多链蛋白质的免疫原性部分。

[0086] 用于确定特定抗体的抗原决定簇或表位的位置和组成的方法和技术是本领域中公知的。可使用这些技术鉴定和/或表征表位以用作疟原虫原生动物表位。在一个实施方案中,可通过对抗原蛋白质中暴露的氨基/羧基进行化学修饰的表位“足迹”,确定抗原特异性抗体的表位作图/表征方法。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),其中发生受体和配体蛋白质酰胺质子的氢/氘交换、结合和返交换(back exchange),其中参与蛋白质结合的骨架酰胺基被保护而不进行返交换,因此将保持为氘化。此时,可通过消化性蛋白质水解、快速微孔高效液相色谱分离和/或电喷雾离子化质谱鉴别相关区域。

[0087] 在另一个实施方案中,合适的表位鉴定技术是核磁共振表位作图(NMR),其中通常比较二维NMR谱中游离抗原和与抗原结合肽(例如,抗体)复合之抗原的信号的位置。通常用¹⁵N对抗原进行选择同位素标记以使得在NMR谱中仅看到抗原对应的信号而没有来自抗原结合肽的信号。与游离抗原的光谱相比,复合物的光谱中来源于参与到与抗原结合肽的相互作用中的氨基酸的抗原信号通常移动位置,可以以这种方式鉴定参与结合的氨基酸。

[0088] 在另一个实施方案中,可通过肽扫描进行表位作图/表征。在这种方式中,制备跨越抗原的全长多肽链的一系列重叠肽并单独测试免疫原性。通过标准方法如酶联免疫吸附测定来确定相应肽抗原的抗体滴度。然后可将所述多个肽按照免疫原性排序,提供选择用于疫苗开发的肽设计的经验基础。

[0089] 在另一个实施方案中,还可将蛋白酶消化技术用于表位作图和鉴定。可通过进行蛋白酶消化,例如使用与抗原蛋白质的比例为1:50的胰蛋白酶在37℃、pH 7-8下消化过夜(O/N),然后进行用于鉴定肽的质谱分析(MS)来确定抗原决定簇相关区域/序列。随后可通过将用胰蛋白酶消化的样品与同CD38BP一起孵育然后通过例如胰蛋白酶消化的样品进行比较来鉴定被抗原性蛋白质保护不受胰蛋白酶裂解的肽(从而揭示粘合剂的足迹)。另一些酶可同样用于或替选用于类似的表位表征方法,如胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等。另外,蛋白酶消化可提供使用已知抗体快速确定已知抗原性蛋白质中潜在抗原决定簇之位置的方法。在另一个实施方案中,蛋白酶消化技术可用于表位作图和鉴定。

[0090] 本文还公开了免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含多层膜,所述多层膜包括两个或更多个聚电解质层,其中相邻层含有带相反电荷的聚电解质,其中一个层包含疟原虫原生动物表位。所述免疫原性组合物任选地还包含一个或更多个含有经设计多肽的层。

[0091] 在一个实施方案中,免疫原性组合物包含多个疟原虫原生动物表位,所述多个疟原虫原生动物表位在相同或不同聚电解质如经设计多肽上。多个抗原决定簇可来自相同或不同的感染性病原体(infectious agent)。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。在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含多种免疫原性聚电解质,每一种聚电解质中包含多个疟原虫原生动物表位。这些免疫原性组合物的优点在于单个合成疫苗颗粒中可存在多个抗原决定簇或单个线性抗原决定簇的多种构象。这种具有多个抗原决定簇的组合物可潜在地产生针对多种表位的抗体,提高至少由生物体的免疫系统产生的一些抗体中和病原体或靶向例如癌细胞上的特定表位的机会。

[0092] 可通过多种方法来增强免疫原性组合物的免疫原性。在一个实施方案中,多层膜任选地包含一种或更多种另外的免疫原性生物活性分子。虽然不是必需的,但所述一种或更多种另外的免疫原性生物活性分子通常包含一种或更多种另外的抗原决定簇。合适的另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者包含一种或更多种前述生物活性分子的组合。其他类型的另外的免疫增强剂包括功能性膜碎片、膜结构、病毒、病原体、细胞、细胞集合体、细胞器或者包含一种或更多种前述生物活性结构的组合。

[0093] 在一个实施方案中,多层膜任选地包含一种或更多种另外的生物活性分子。所述一种或更多种另外的生物活性分子可以是药物。或者,免疫原性组合物是中空壳或包围核心的涂层的形式。所述核心包含多种不同的包封物,例如,一种或更多种另外的生物活性分子,包括例如药物。因此,如本文所述设计的免疫原性组合物还可用于联合疗法,例如诱发免疫应答并且用于靶向药物递送。可用包含抗原性多肽的免疫原性组合物封装“结晶”形式的合适的治疗材料的微米级“核心”,并且可将所得微胶囊可用于药物递送。在一些条件下,例如高pH或低温下,所述核心可不溶,而在进行控释的条件下可溶。可通过 ζ 电位测量(用于在液体介质中确定胶体颗粒上静电单位中的电荷)确定晶体的表面电荷。微胶囊内容物从微胶囊内部释放到周围环境的速率取决于多种因素,包括封装壳的厚度、壳中使用的抗原性多肽、二硫键的存在、肽交联的程度、温度、离子强度和组装肽所使用的方法。通常来说,胶囊越厚,释放时间越长。

[0094] 在另一个实施方案中,另外的免疫原性生物分子是核酸分子,其能够指导宿主生物体合成期望的免疫原或干扰病原体遗传信息的表达。在前一种情况下,这样的核酸序列被例如通过本领域技术人员已知的方法插入到合适的表达载体中。适于在体内高效率地进行基因转移的表达载体包括逆转录病毒、腺病毒和痘苗病毒载体。这样的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载体核酸的适当转录和随后翻译所必需的或优选的任意其他NDA序列。特别地,预期这样的载体将包含至少一个被宿主生物体所鉴定的复制起点,以及至少一个选择性标记和至少一个能够开始核酸序列的专利的启动子序列。在后一种情况下,将制备多拷贝的这种核酸序列来用于递送,例如通过将核酸封装在胶囊形式的多肽多层膜内用于静脉内递送。

[0095] 在重组表达载体的构建中,还应注意的是,可在每一个载体中插入多拷贝的目的核酸序列及其伴随的操作元件。在这样的一个实施方案中,宿主生物体每个载体将产生更大量的期望蛋白质。可插入到载体中的多拷贝核酸序列的数目仅受因大小导致的待转移到合适的宿主微生物中并在合适的宿主微生物中复制和转录的所得载体的能力的限制。

[0096] 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。这些可来源于相同的抗原,其可以是来自相同感染原或疾病的不同抗原,或者其可来源于不同感染原或疾病。因此,所述复合物或混合物将提高针对递送系统的抗原

肽/蛋白质组分所指定的若干抗原和可能的若干感染原或疾病的免疫应答。

[0097] 在一个实施方案中,多层膜/免疫原性组合物诱发免疫系统对病原体的应答。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。

[0098] 可药用载体包括但不限于:大的缓慢代谢的大分子,例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物、无活性的病毒颗粒等。还可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,以及有机酸的盐,例如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐或苯甲酸盐。组合物还可包含液体,例如水、盐水、甘油和乙醇,以及例如湿润剂、乳化剂或pH缓冲剂的物质。也可使用脂质体作为载体。

[0099] 在脊椎动物中诱发针对疾病或病原体的免疫应答的方法(例如,疫苗接种)包括施用免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含含有疟原虫原生动物表位的多层膜。在一个实施方案中,含有疟原虫原生动物表位的聚电解质是多层膜的最外层或溶剂暴露层。免疫原性组合物可经口、鼻内、静脉内、肌内、皮下、腹膜内、舌下、皮内、经肺或经皮施用,具有或不具有加强剂量。通常来说,以与剂量配方相容的方式以及有预防和/或治疗效果的量施用组合物。免疫原性组合物的精确待施用量取决于实施者的判断,并且可能对每一位对象是独特的。对本领域技术人员明显的是,免疫原性组合物的治疗有效量尤其取决于施用方案、施用的抗原的单位剂量、组合物是否与其他治疗剂组合施用以及接受者的免疫状态和健康状况。本领域中公知,治疗有效量可由普通技术的医务工作者根据患者特性(年龄、体重、性别、状况、并发症、其他疾病等)来确定。此外,随着进一步的日常研究的进行,关于治疗不同患者中的不同病症的适当的剂量水平的更具体的信息将出现,在考虑接受者的治疗背景、年龄和总体健康状态的基础上,普通技术人员能够确定恰当的剂量。

[0100] 免疫原性组合物任选地包含佐剂。佐剂通常包含以非特定方式加强宿主的免疫应答的物质。佐剂的选择取决于待进行疫苗接种的对象。优选地,使用可药用佐剂。例如,用于人的疫苗应避免油或烃乳剂佐剂,包括完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂。适于人类使用的佐剂的一个实例是明矾(氧化铝凝胶)。但是,用于动物的疫苗可包含不适于人类使用的佐剂。

[0101] 考虑可通过递呈任何能够诱发免疫应答的蛋白质或肽来诱发免疫应答。在一个实施方案中,抗原是诱发针对特定传染病原的强免疫应答的关键表位,即免疫显性表位。若期望,免疫组合物中可包含超过一种抗原或表位以提高免疫应答的可能性。

[0102] 在一个实施方案中,在LBL膜中引入多个疟原虫原生动物的肽或蛋白质表位。可在单个经设计肽分子中合成和表达不同的表位。预期将多个表位定位给在单个经设计肽中具有某些优点。例如,其应当简化LBL制造过程并提高再现性。另外,将多个表位定位给在单个经设计肽中将使期望表位的摩尔比例锁定在期望比例,例如1:1。

[0103] 作为替代地,可将表位引入到分开的经设计肽中。在一个或更多个成层步骤中将经设计肽引入到LBL膜中。使用多种不同经设计肽生产的膜也可具有某些优点。其可简化设计合成并降低成本。还能够改变并优化膜内每一种经设计肽的相对剂量。如果例如临床前或临床生物学数据表明最佳疫苗应包含5个拷贝的一种表位来对应于每个拷贝的第二表位(5:1比例),分开表位的经设计肽方法应有利于生产这样的疫苗。

[0104] 经设计肽通过经设计肽的带电的表面吸附区与带相反电荷的膜表面之间静电引

力吸附于LBL膜的表面。吸附的效率主要取决于表面吸附区的组成。因此,具有不同表位但是类似表面吸附区的经设计肽将以类似效率吸附。为了制造具有1:1摩尔比的两种不同经设计肽的膜,可将该摩尔比的肽混合然后将其同时沉积在特定层上。或者,可将每一种肽分别沉积在分开的层上。吸附的肽的摩尔比很大长度上反映为其成层的相对浓度或者将其引入的成层步骤的数目。

[0105] 可用多种方式测量引入到LBL膜中的经设计肽的数量。定量氨基酸分析(amino acid analysis,AAA)尤其适于该目的。通过利用浓盐酸(6M)并加热(通常在115℃)处理15个小时来使包含经设计肽的膜分解成其构成氨基酸。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。可使用仅存在于一种经设计肽中的氨基酸作为所述肽的示踪物。当经设计肽缺少特有氨基酸时,可在合成过程中向将非天然氨基酸(例如,氨基丁酸或高缬氨酸(homovaline))引入到所述经设计肽中。这些示踪物氨基酸在AAA试验中容易鉴定并可用于对膜中肽的量进行定量。

[0106] 本文使用的特异性T细胞应答是对目的表位、特别是疟原虫原生动物表位特异的应答。特异性T细胞应答是IFN γ 和/或IL-5T细胞应答。

[0107] 本文使用的特异性抗体应答是对目的表位、特别是本文公开的疟原虫原生动物表位特异的应答。

[0108] 本文使用的“层”是指在吸附步骤之后例如用于成膜的模板上厚度的增量。“多层”是指多个(即,2个或更多个)厚度提高。“聚电解质多层膜”是包含聚电解质的一个或更多个厚度提高的膜。在沉积后,多层膜的层可能不保持为离散层。事实上,可能具有物质的显著混合,特别是在厚度提高的界面处。可通过分析技术监测混合的存在与否,所述分析技术例如 ζ 电位测量、X射线光电子能谱和飞行时间二次离子质谱。

[0109] “氨基酸”是指多肽的结构单元。本文使用的“氨基酸”包括20种常见的天然L-氨基酸、全部其他天然氨基酸、全部非天然氨基酸和全部氨基酸模拟物,例如类肽(peptoid)。

[0110] “天然氨基酸”是指甘氨酸加上20种常见的天然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。

[0111] “非天然氨基酸”是指任意20常见的天然L-氨基酸以外的氨基酸。非天然氨基酸可具有L或D立体化学。

[0112] “类肽”或N-取代的甘氨酸是指相应氨基酸单体的类似物,其与相应氨基酸具有相同侧链,但是所述侧链附接在氨基的N原子上而不是残基的 α 碳上。因此,聚类肽(polypeptoid)中单体之间的化学键不是肽键,其可用于限制蛋白质水解消化。

[0113] “氨基酸序列”和“序列”是指多肽链的连续长度,其长至少两个氨基酸残基。

[0114] “残基”是指聚合物或低聚物中的氨基酸,其为形成聚合物的氨基酸的剩余部分。多肽合成涉及到脱水,即,在向多肽链上添加一个氨基酸时失去一个水分子。

[0115] 本文使用的“肽”和“多肽”均指通过相邻氨基酸的 α 氨基和 α 羧基之间的肽键彼此连接的一系列氨基酸,可包含或不包含修饰,例如糖基化、侧链氧化或磷酸化,只要这样的修饰(或缺少这样的修饰时)不破坏免疫原性即可。本文使用的术语“肽”是指肽和多肽或蛋白质二者。

[0116] “经设计多肽”是指带有足够与带相反电荷的表面稳定结合的电荷的多肽,即可沉

积到多层膜的层中的多肽,其中成膜的驱动力是静电。在一些具体实施方案中,经设计多肽长度为至少15个氨基酸,在pH 7.0下多肽每个残基静电荷的量级大于或等于0.1、0.2、0.3、0.4或0.5。在一个实施方案中,在pH 7.0下多肽中相同极性的带电残基的数目减去同其相反极性的残基数目后与残基总数的比例大于或等于0.5。换言之,多肽每个残基的静电荷的量级大于或等于0.5。尽管多肽的长度没有绝对上限,但是通常,适于LBL沉积的经设计多肽的实际长度上限为1000个残基。经设计多肽可包含天然存在的序列如疟原虫原生动物表位和为所述肽提供功能的区域,例如允许经设计肽沉积到多肽多层膜中的在本文中也称为表面吸附区的带电区域。

[0117] “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(通常为氢键)稳定的多肽链中的或多或少规则的结构类型。二级结构的例子包括 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角。

[0118] “多肽多层膜”是指包含一种或更多种如上文定义的经设计多肽的膜。例如,多肽多层膜包括:包含经设计多肽的第一层和包含与经设计肽具有相反极性的静电荷的聚电解质的第二层。例如,如果第一层具有净正电荷,则第二层具有净负电荷;如果第一层具有净负电荷,则第二层具有净正电荷。第二层包含另一种经设计多肽或另一种聚电解质。

[0119] “基底”是指具有适于吸附水溶液中的聚电解质的表面的固相材料。基底的表面基本可具有任意形状,例如平面、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。基底大小为纳米级至微米级。另外,基底任选地包含多个小的亚颗粒。基底可由有机材料、无机材料、生物活性材料或其组合制成。基底的非限制性实例包括:硅片;带电胶体颗粒,例如 CaCO_3 或三聚氰胺甲醛的微颗粒;生物细胞,例如红细胞、肝细胞、细菌细胞或酵母细胞;有机聚合物晶格,例如聚苯乙烯或苯乙烯共聚物晶格;脂质体;细胞器;以及病毒。在一个实施方案中,基底是医疗设备,例如人工起搏器、耳蜗植入物或支架。

[0120] 当在成膜过程中或成膜后分解或以其方式除去基底时,其被称为“模板”(用于成膜)。可将模板颗粒溶解在合适的溶剂中或通过热处理除去。如果,例如使用部分交联的三聚氰胺甲醛模板颗粒,则可通过温和的化学方法如在DMSO中或通过改变pH值使模板分解。在模板颗粒溶解后,留下由交替的聚电解质构成的中空的多层壳。

[0121] “胶囊”是中空壳或包围核心的涂层形式的聚电解质膜。核心包含多种不同的封装物,例如蛋白质、药物或其组合。直径小于约 $1\mu\text{m}$ 的胶囊被称为纳米胶囊。直径大于约 $1\mu\text{m}$ 的胶囊被被称为微胶囊。

[0122] “交联”是指两个或更多个分子之间形成共价键、或数个键或许多键。

[0123] “生物活性分子”是指具有生物学效应的分子、大分子或大分子组装体。利用合适的试验,并经每单位重量或每分子标准化后,可测出生物活性分子的具体生物学作用。可以将生物活性分子封装入胶囊、固定在聚电解质膜后面或封装在聚电解质膜内。生物活性分子的非限制性实例是:药物、药物结晶、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。本文使用的“生物活性分子”还包括生物活性结构,例如,功能性膜碎片、膜结构、病毒、病原体、细胞、细胞集合体和细胞器。可被封装在胶囊内或固定在多肽膜后面的蛋白质的实例是:血红蛋白;酶,例如葡萄糖氧化酶、脲酶、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。可封装在胶囊内或固定在多肽膜后面的细胞的实例是:移植的胰岛细胞、真核细胞、细菌细胞、植物细胞和酵母细胞。

[0124] “生物相容性”是指经口服、局部施用、透皮施用、皮下注射、肌肉注射、吸入、植入或静脉内注射后不会对健康产生显著的不良影响。例如,生物相容性膜包括那些与免疫系统(如人的免疫系统)接触后不会诱发显著免疫应答的膜。

[0125] “免疫应答”是指细胞或体液免疫系统对体内任何部位存在的物质所产生的反应。免疫应答可以以多种方式表征,例如,血液中能识别特定抗原之抗体数量的提高。抗体是由B细胞分泌的蛋白质,免疫原是诱发免疫应答的实体。人体通过提高血液及其他部位中抗体数量来对抗感染并抑制再感染。

[0126] “抗原”是指在被引入到易感性脊椎动物生物体中后诱发免疫应答(例如,产生特定抗体分子)的外来物质。抗原具有一个或更多个表位。抗原可以是纯物质,物质的混合物(包括细胞或细胞碎片)。术语抗原包括合适的抗原决定簇、自身抗原、自体抗原、交叉反应抗原、同种抗原、耐受原、过敏原、半抗原和免疫原或其一部分,以及它们的组合,这些术语可相互交换使用。抗原通常为高分子量,并且通常是多肽。诱发强免疫应答的抗原被称为具有强免疫原性。抗原上可与互补抗体特异性结合的部位被称为表位或抗原决定簇。

[0127] “抗原性”是指组合物诱发所述组合物的特异性抗体或产生细胞介导的免疫应答的能力。

[0128] 本文使用的术语“表位”和“抗原决定簇”可互换使用,并且是指抗原(例如蛋白质或经设计肽)的被抗体鉴定的序列或结构。表位通常在蛋白质的表面。“连续表位”是指表位中包括的若干氨基酸残基相互连接、而不是在折叠蛋白中碰巧接触或处于有限的空间区域内。“构象表位”是指表位中来自蛋白质的线性序列中的不同部位的氨基酸残基在蛋白质的三维结构中接触。为了在抗原和抗体之间高效进行相互作用,表位必须容易用于结合。因此,表位或抗原决定簇必须存在于抗原的天然细胞环境中,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)、膜结合的或分泌的。表位的数目、位置和大小取决于抗体产生过程中呈递的抗原的量。

[0129] 本文使用的“疫苗组合物”是在所施用的哺乳动物中诱发免疫应答并且保护被免疫的生物体对抗随后免疫剂或免疫交叉反应剂的攻击的组合物。保护可以是与未接种疫苗的生物体相比症状或感染方面的下降。免疫交叉反应剂可以是例如全蛋白质(例如,葡萄糖转移酶),由其衍生的亚基肽被用作免疫原。或者,免疫交叉反应剂可以是不同的蛋白质,其全部或部分被有免疫剂诱发的抗体识别。

[0130] 本文使用的“免疫原性组合物”在旨在涵盖在所施用的生物体中诱发免疫应答并且可能保护或不保护被免疫的哺乳动物对抗随后免疫剂的攻击的组合物。在一个实施方案中,免疫原性组合物是疫苗组合物。

[0131] 通过以下非限制性实施例,进一步举例说明本发明。

实施例

[0132] 测试方案

[0133] 小鼠和免疫接种:6至8周龄的雌性C57BL/6J和BALB/c小鼠获自Jackson Laboratories,并饲养在NorthEast Life Sciences,New Haven。在使用前,使小鼠对环境

适应至少1周。将纳米颗粒、微颗粒或微胶囊在PBS中重悬至期望DP浓度(例如,10 μ g/100 μ l/注射)并用声波处理10分钟,之后立即用注射器装载总并进行免疫接种。在第0天、第21天和第42天用悬液在后脚掌对小鼠进行免疫。阳性对照小鼠用CFA(d0)或IFA(d21,d42)中的DP进行s.c.免疫;阴性对照小鼠用PBS进行模拟免疫。

[0134] ELISA:在第28天(第一次加强后)、第49天(第二次加强后)和第58天(攻击后)对小鼠放血并收集血清用于使用包被有T1B、T1BT*或B重复肽的ELISA板分析抗体应答。为了确定纳米颗粒上展示的表位,用所指示纳米颗粒包被板、封闭并用MAb 2A10(抗B重复)探测。用HRP标记的山羊抗小鼠IgG检测抗体结合。

[0135] ELISPOT:在第28天、第49天和第58天处死小鼠,收集脾并处理成单细胞悬液。使用商业试剂(BD Biosciences)和板(Millipore Corporation)根据制造商说明书在IFN γ 或IL-5ELISPOT板中用所指示最小表位肽再刺激未分级的脾细胞。在AID Viruspot Reader中对每个板的印记计数。

[0136] PfPb攻击:如图中描述所指示的,在第0天、第21天和第42天对C57BL/6J或BALB/c小鼠进行免疫。如上所述在第49天对小鼠放血并通过ELISA测量抗体滴度。在抗体测量之后,用PfPb(转染有恶性疟原虫的CS基因的伯氏疟原虫)攻击小鼠。攻击如下进行:麻醉小鼠并允许被PfPb感染的蚊子对其叮咬10分钟。攻击后两天,对经攻击的小鼠放血并将其处死,提取肝RNA以通过qPCR分析寄生虫负载。

[0137] 转基因孢子中和试验(TSNA):通过本领域已知方法在TSNA中进行血清的寄生虫中和活性。简言之:将1:5稀释的每一种血清样品用PfPb寄生虫(转染有恶性疟原虫的CS基因的伯氏疟原虫)在冰上孵育40分钟。将该混合物添加到含有HepG2细胞的孔中并在37 $^{\circ}$ C孵育72小时。通过qPCR测量各细胞培养物中的寄生虫18S rRNA水平并与由已知量的质粒18S cDNA产生的标准曲线进行比较。通过与含有PfPb以及没有血清的HepG2细胞的孔的比较来计算寄生虫生长的抑制百分比。

[0138] RNA分离和qPCR:在攻击后约40小时处死小鼠,收集肝并用10ml无菌PBS洗涤两次。使用polytron匀浆机(Fisher Scientific PowerGen500)在最高设置下将肝在10ml TriReagent(Molecular Research Center,cat#TR118)中均质化1分钟。使匀浆涡旋2分钟,在室温静置10分钟。将澄清匀浆收集到无菌Eppendorf管中,向其中添加200 μ l氯仿(Sigma C-0549)。将样品涡旋2分钟,在室温静置15分钟,然后在4 $^{\circ}$ C下以14,000rpm离心15分钟。将水相(450 μ l)收集到无菌的1.5ml Eppendorf管中,向其中添加等体积异丙醇(Sigma 405-7)。将样品涡旋10秒,在室温静置10分钟,然后在室温下以14,000rpm离心10分钟。倾出上清液,将沉淀用1ml 70%EtOH(Sigma E7023)洗涤,涡旋10秒,并于在室温以14,000rpm离心10分钟。倾析出上清液,将沉淀在室温干燥。将干燥的沉淀重悬在200 μ l DEPC H₂O(Invitrogen cat#750023)中用于qPCR。

[0139] 还使用Qiagen RNeasy MiniPrep方案(Qiagen)从TriReagent匀浆分离RNA,并使用iScript RT Supermix(Bio-Rad)转换成cDNA,其均根据制造商的说明书进行。在CFX96(Bio-Rad)上进行PCR以测定肝组织中伯氏疟原虫18S rRNA的拷贝数。所使用的引物序列是:

[0140] 正向5'-AAGCATTAATAAAGCGAATACATCCTTAC-3'(SEQ ID NO:4)

[0141] 反向5'-GGAGATTGTTTTGACGTTTATGTG-3'(SEQ ID NO:5)

[0142] 使用iQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad)的循环条件为:95℃下3分钟,然后[95℃下20秒,60℃下30秒,72℃下30秒]重复40次。为了测定拷贝数,使用已知浓度的含有伯氏疟原虫18S rRNA序列(NYU)的质粒建立标准曲线。

[0143] 实施例1:示例性的肽设计和合成

[0144] 经设计多肽以恶性疟原虫CS的T1BT*多价肽为基础。一种、两种或全部三种表位的每一种组合均在C端用K₂₀Y(SEQ ID NO:6)修饰以产生用于引入到LbL颗粒中的经设计肽(DP)(图1)。最小表位肽和DP由ACT科学家们使用标准固相肽化学合成。通过RP-HPLC纯化所述肽并通过氨基酸分析进行定量(数据未示出)。

[0145] T1BT*K₂₀Y:(DP-2062)(SEQ ID NO:7)

[0146] DPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANPEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTSGNGKKKK

[0147] KKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0148] T1K₂₀Y:(SEQ ID NO:8)

[0149] DPNANPNVDPNANPNVDPNAKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0150] BK₂₀Y:(SEQ ID NO:9)

[0151] NANPNANPNANPNANPKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0152] T*K₂₀Y:(SEQ ID NO:10)

[0153] EYLNKIQNSLSTEWSPCSVTSGNGKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0154] T1BK₂₀Y:(SEQ ID NO:11)

[0155] DPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANPNANPKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0156] T1T*K₂₀Y:(SEQ ID NO:12)

[0157] DPNANPNVDPNANPNVEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTS GNGKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0158] BT*K₂₀Y:(SEQ ID NO:13)

[0159] NANPNANPNANPEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTSGNGKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0160] 实施例2:制造LBL纳米颗粒的程序:

[0161] CaCO₃核心获自新加坡的NanoMaterials Technology Pte Ltd(50nm,固体,立方)。PLL和PGA获自美国的Sigma-Aldrich。将PLL、PGA和DP溶解在10mM pH 7.4的HEPES中。在连续吸附步骤中,允许带相反电荷的多肽在CaCO₃纳米颗粒上自组装成多层膜。简言之,将PLL、PGA和DP(如指出的)在10mM pH 7.4的HEPES中溶解至1mg/ml,通过0.22μm过滤器过滤。将CaCO₃纳米颗粒核心用不含内毒素的水洗涤三次并在微量离心管中以16,000×g离心1分钟。将纳米颗粒核心在1mg/ml PGA中重悬至6%(w/v)作为第一层。在中性pH,PGA具有净负电荷,而CaCO₃颗粒具有净正电荷,因此静电相互作用并成功沉积第一层。将该混合物在室温孵育10分钟,然后用10mM HEPES缓冲液洗涤两次并以48,700×g离心1分钟(TL-100Ultracentrifuge,Beckman)。为了第二层的沉积,将纳米颗粒在1mg/ml PLL(正电荷)中重悬至6%(w/v)并处理作为第一层。通过相同的方法,并在交替层总使用PGA和PLL来沉积后续层,在指出的地方,在指出的层中使用DP(正电荷)。在最后一层沉积之后,洗涤成熟的颗粒并作为潮湿沉淀在4℃或室温下储存至使用。使用表1所述方法监测颗粒完整性和质量控制,特定构建体示出在表2中。

[0162] 表1:使用的QC标准和方法

[0163]

参数	方法
大小和分散度	动态光散射
内毒素	商业 LAL 试剂盒
PGA/PLL 浓度	重悬后进行氨基酸分析
DP 浓度	重悬后进行氨基酸分析
37°C 的稳定性	在选择的时间点进行氨基酸分析

[0164] 表2:纳米颗粒列表

[0165]

ACT #	DP (DP #)	颗粒大小 <400 nm
1051-02	T1BT*K ₂₀ Y (SEQ ID NO: 7) (2062)	143
1052-02	BK ₂₀ Y (SEQ ID NO: 9) (2060)	165
1056-02	T1T*K ₂₀ Y (SEQ ID NO: 12) (2063)	170
1129-01	T*K ₂₀ Y (SEQ ID NO: 10) (2057)	143
1130-01	T1K ₂₀ Y (SEQ ID NO: 8) (2059)	163
1131-01	T1BK ₂₀ Y (SEQ ID NO: 11) (2119)	123
1132-01	BT*K ₂₀ Y (SEQ ID NO: 13) (2120)	143

[0166] 实施例3:纳米颗粒诱发的抗体应答

[0167] 在第0天、第21天和第42天,用PBS(阴性对照)、CFA中的10μgDP(阳性对照)或10μg含有T*表位(ACT-1051(SEQ ID NO:7),ACT-1056(SEQ ID NO:12),ACT-1129(AEQ ID NO:10)和ACT-1132(SEQ ID NO:13))的纳米颗粒通过f.p.对BALB/c小鼠进行免疫。在第0天、第21天和第42天,用PBS(阴性对照)、CFA中的10μgDP(阳性对照)或10μg含有B表位(ACT-1052(SEQ ID NO:9))或T1表位(ACT-1051(SEQ ID NO:7),ACT-1056(SEQ ID NO:12),ACT-1130(SEQ ID NO:8),以及ACT-1131(SEQ ID NO:11))的纳米颗粒通过f.p.对C57BL/6小鼠进行免疫。在第49天(第二次加强后7天)对所有小鼠放血并每组三只小鼠处死用于ELISPOT分析。ELISA结果证明ACT-1051(T1BT*K₂₀Y;SEQ ID NO:7)和ACT-1132(BT*K₂₀Y;SEQ ID NO:13)在两种小鼠中诱导T1BT*特异性抗体应答;ACT-1131(T1BK₂₀Y;SEQ ID NO:11)在C57BL/6小鼠中诱导适度的T1BT*特异性抗体应答,而ACT-1052(BK₂₀Y;SEQ ID NO:9)不能诱发可检测的抗体应答(图2和3)。在ELISA中没有被B重复表位识别的抗血清(数据未示出)。

[0168] 缺少对B重复的抗体应答可能是由于表位在颗粒中的不正确展示。通过用所指示纳米颗粒包被ELISA板并用连续稀释的特异性针对B重复(NANP序列)的mAb 2A10探测,研究这种可能性。图4中的结果表明重复的特异性mAb与含有T1或B重复表位的所有纳米颗粒反

应,但是不与仅含T*或来源于LCMV的无关表位的纳米颗粒反应。这些结果表明B重复抗体应答的缺少不是因为纳米颗粒上表位的不充分展示。

[0169] 实施例4:纳米颗粒的T细胞应答

[0170] 为了确定图2和3中所示小鼠的CD4+和CD8+应答的特异性,测试富集的抗T1或T*的CD4+和CD8+细胞的ELISPOT响应。在第49天,处死每组三只小鼠,收集脾细胞并使用磁珠富集器(magnetic bead enrichment)和autoMACS细胞分选仪将其分级成CD4+或CD8+群;每一个群的纯度大于90%(数据未示出)。将细胞在具有有所指示肽的IL-5或IFN γ ELISPOT板中再刺激。图5和6中的结果表明利用纳米颗粒ACT-1056(T1T*K₂₀Y(SEQ ID NO:12))或ACT-1129(T*K₂₀Y(SEQ ID NO:10))进行三次免疫接种在BALB/c小鼠中诱发强的T*特异性CD4+T细胞应答,而利用纳米颗粒ACT-1056(T1T*K₂₀Y(SEQ ID NO:12))或ACT-1130(T1K₂₀Y(SEQ ID NO:8))进行三次免疫接种在C57BL/6小鼠中诱发强的T1特异性CD4+T细胞应答。在大多数情况下,T细胞应答较IFN γ (Th1)更偏向于IL-5(Th2)。所有构建体在两种小鼠中诱导弱的CD8+T细胞应答。

[0171] 实施例5:利用纳米颗粒的PfPb攻击

[0172] 在一个独立的试验中,对每组7只小鼠用纳米颗粒ACT-1051或其经设计肽ACT-2062(T1BT*K₂₀Y(SEQ ID NO:7))进行免疫,然后用PfPb进行攻击。攻击后两天时处死小鼠,提取肝以通过qPCR(NYU)分析寄生虫负载。另外,收获脾并在IL-5和IFN γ ELISPOT中分析针对T1BT*和T1表位的T细胞应答。图7表明免疫的小鼠对全长T1BT*和T1表位二者具有弱的IFN γ 应答。出乎意料地,在用纳米颗粒免疫免疫的小鼠中检测到了强的IL-5应答。由于PBS和2062/CFA组均不表现出该应答,因此IL-5的产生不是由于单独的感染,而表现为与感染之前的纳米颗粒免疫接种相关。

[0173] 对由被攻击的小鼠中提取的肝RNA进行病毒负载的qPCR分析。图8中的结果表明,全部2062/CFA-免疫小鼠都被保护不受PfPb攻击,如由寄生虫RNA水平比PBS处理小鼠的平均值降低90%证明的。令人鼓舞的是,至少三只经免疫小鼠(f.p.组一只,s.c.组两只)表现出类似的保护水平,s.c.组的另外两只表现出微弱的保护(降低>80%)。但是,当将个体的寄生虫负载与免疫应答(抗体滴度和ELISPOT应答)进行比较时,未发现保护的清晰的免疫关联(数据未示出)。

[0174] 实施例6:微颗粒的制造

[0175] 使用标准固相肽化学合成肽ACT-2062(T1BT*K₂₀Y(SEQ ID NO:7)),通过RP-HPLC纯化并通过氨基酸分析进行量化。

[0176] CaCO₃核心获自德国的PlasmaChem GmbH(3 μ m,中孔,球形)。PLL和PGA获自美国的Sigma-Aldrich。将PLL、PGA和ACT-2062溶解在10mM pH 7.4的HEPES中。基本如纳米颗粒那样制造LbL颗粒。在用PGA和PLL组装7个基本层后,使用200mM EDC和50mM磺基-NHS在200mM pH 6.5的磷酸盐缓冲液中使膜交联。将颗粒用10mM HEPES缓冲液洗涤2次以除去任何残余试剂。添加DP(ACT-2062,T1BT*K₂₀Y(SEQ ID NO:7))作为第8层以产生微颗粒ACT-1140。在微颗粒ACT-1141中,使7个基础层交联,然后沉淀DP。通过用0.5M EDTA处理ACT-1141以溶解CaCO₃核心,然后沉积DP来制备微胶囊ACT-1142。洗涤成熟颗粒和胶囊并作为潮湿沉淀在4℃或室温储存待用。

[0177] 实施例7:微颗粒和微胶囊的免疫原性

[0178] 用各自装载有DP 2062(T1BT * K₂₀Y; SEQ ID NO:7)的MP-1140、MP-1141或MC-1142对C57BL/6J小鼠进行免疫接种。通过ELISA和TSNA测试抗体应答,而通过ELISPOT测试T细胞应答。MP-1141和MC-1142是最有效的LbL构建体,诱发的抗体滴度(图9)和IFN γ +应答(图10)与阳性对照小组相当。图9还表明T1B ELISA结果与TSNA测量的功能抗体活性的水平相关($r^2=0.79$, $P=0.0004$,两个试验中个体血清滴度的皮尔逊相关系数分析(Pearson Correlation Coefficient analysis)),表明ELISA作为快速筛选方法测量功能性抗-T1B抗体应答的效用。

[0179] 实施例8:微颗粒和微胶囊的效力

[0180] 将小鼠用MP-1141或MC-1142进行免疫并通过暴露于被PfPb感染的蚊子的叮咬进行攻击。攻击后40小时,通过qPCR量化伯氏疟原虫18SrRNA的水平,以此监测肝中的寄生虫负载。保护定义为与未进行免疫的被攻击小鼠相比寄生虫负载降低 $\geq 90\%$ 。用MP-1141进行免疫接种使10只小鼠中的8得到保护,导致与用弗氏佐剂中的DP 2062进行免疫的对照小鼠相比,处理组中的平均寄生虫负载降低94%($P<0.05$, Wilcoxon秩和检验)(图11)。用MC-1142进行免疫接种使一半小鼠得到保护,但是不导致组中平均寄生虫负载比PBS对照组显著降低。

[0181] 在TSNA中测试在攻击之前由小鼠采集的血清,以在体外测量有效阻止孢子入侵人肝癌细胞的寄生虫中和活性,其定义为通过qPCR测量的HepG2细胞中寄生虫rRNA水平降低 $>90\%$ 。在一半MP-1141免疫小鼠中,TSNA活性与体内效力的比较表明效力与强效中和抗体活性相关(图12,空心圆)。但是,两个组中有多只小鼠被保护不受体内寄生虫攻击,并且同时仅具有适度中和抗体滴度(图12和13,实心圆),表明细胞机制也可参与保护。

[0182] 实施例9:微颗粒诱发的T细胞应答

[0183] 在采集血清用于ELISA(图12和13)的同一天,收集脾细胞并在IFN γ 和IL-5 ELISPOT板中用T1B肽刺激。用ACT-1141或ACT-1142免疫的小鼠产生Th1(IFN γ)应答和Th2(IL-5)应答二者,而用佐剂中的DP 2062免疫的小鼠产生偏向Th1(IFN γ)的反应(图14)。

[0184] 实施例10:细胞免疫在LbL颗粒的效力中的作用

[0185] 在ELISPOT中检测IFN γ 分泌细胞(图10)表明,如先前发现的,在LbL颗粒免疫接种之后细胞毒性效应T细胞潜在活化。由于C57BL/6J小鼠不能对CS蛋白产生强的CTL应答并且T * 表位中包含有已知的H-2^d受限的CD8+T细胞表位,使用BALB/c小鼠在体内CTL测定中检验疟疾特异性细胞毒性效应细胞应答的产生。用PBS或MP-1141免疫小鼠,7天后,通过施用相关的单克隆抗体耗尽CD4+、CD8+或这两种体细胞表型。第二天,测量体内CTL活性。图15表明在具有完整的T细胞群的免疫小鼠中,检测到负载T * 的靶细胞被被中等水平的杀死。耗尽CD8+细胞不降低体内CTL活性,而耗尽CD4+细胞完全阻止了效应器活性,表明用具有T1BT * 抗原的LbL MP进行免疫接种诱发CD4+细胞毒性效应细胞,符合已公开的结果,在人志愿者中证明了CD4+效应器活性。

[0186] 鉴于在ELISPOT(图10)和体内CTL试验(图15)中检测的T细胞应答以及在多个免疫小鼠中效力与TSNA滴度之间的明显不一致性(图12和13),本发明人检查了细胞免疫对LbL微颗粒效力的贡献。为了测试在不存在T1B特异性抗体应答的情况下单独细胞应答的效力,本发明人构建了负载有来自伯氏疟原虫(小鼠病原体)的CS蛋白质的T细胞表位的MP(表3)。由于在H-2^d小鼠中CD4+和CD8+T细胞表位二者均被识别,本发明使用BALB/c小鼠。在第0天

和第28天用含有伯氏疟原虫CD4+T细胞表位的MP(MP-1182)、CD8+T细胞表位的MP(MP-1183)和这两种T细胞表位的融合蛋白的MP(MP-1184)或弗氏佐剂中的DP融合肽免疫小鼠。在第35天,使用负载有免疫表位的靶细胞进行体内CTL试验。用负载有任一种伯氏疟原虫T细胞表位的MP进行免疫菌诱发对抗负载有免疫肽的靶细胞的效应器活性(图16)。但是,CTL活性不足以保护小鼠免受表达伯氏疟原虫T细胞表位的PfPb孢子的攻击(图17),表明图11中报道的效力是抗体介导的。

[0187] 图3:负载有来自伯氏疟原虫的CS蛋白的T细胞表位的微颗粒

[0188]

颗粒#	DP#	表位和来源	序列
MP-1182	DP-2145	CD4Pb	SEQ ID NO:14
MP-1183	DP-2146	CD8Pb	SEQ ID NO:15
MP-1184	DP-2147	CD8:CD4Pb	SEQ ID NO:16

[0189] SEQ ID NO:14

[0190] LEFVKQIRDSITEEWSQCNVKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0191] SEQ ID NO:15

[0192] KNNNDDSYIPSAEKILEFVKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0193] SEQ ID NO:16

[0194] KNNNDDSYIPSAEKILEFVKQIRDSITEEWSQCNVKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0195] 实施例11:Pam3Cys.T1B疟疾微颗粒的免疫原性

[0196] 疟疾肽疫苗的临床试验已经证明佐剂可显著提升抗体和细胞应答,但通常是以反应原性(reactogenicity)提高为代价。使用更精确地靶向先天免疫的TLR激动剂可帮助避免过度的与强佐剂相关的炎症反应。Pam3Cys是一种合成的脂肽TLR2激动剂,它是用于LBL方式的一种特别有吸引力的先天免疫刺激物,因为其可被直接引入到DP中。合成了一系列含有DP的多种T1B构型(见表4)。以下给出了T1和B恶性疟原虫环孢子蛋白抗原的序列:

[0197] T1:DPNANPNVDPNANPNV(SEQ ID NO:1)

[0198] B:NANP(SEQ ID NO:2)

[0199] CaCO₃核心获自德国的PlasmaChem GmbH(3μm,介孔,球形)。PLL和PGA获自美国的Sigma-Aldrich。将PLL、PGA和ACT-2062(T1BT * K₂₀Y:

[0200]

DPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANPEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTSGNGKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY(SEQ ID NO:7))

[0201] 溶解在10mM pH 7.4的HEPES中。基本如纳米颗粒一样来制备LbL颗粒。在用PGA和PLL组装7个基础层之后,使用200mM pH 6.5的磷酸盐缓冲液中的200mM EDC和50mM磺基-NHS使膜交联。用10mMHEPES缓冲液将颗粒洗涤两次以除去任何残余试剂。添加DP作为第8层以产生表4中所列微颗粒。洗涤成熟颗粒并作为潮湿沉淀储存在4℃或室温下待用。

[0202] 在溶液相合成方法中通过添加丝氨酸-赖氨酸-赖氨酸-赖氨酸-赖氨酸间隔区然后N端与Pam3-修饰的半胱氨酸残基偶联来延伸DP-2163(T1₃B₅Pf)的N端,从而并入TLR2配体Pam3Cys以产生DP-2167(Pam3.T1₃B₅Pf)。

[0203] 表4:微颗粒列表

[0204]	颗粒 #	DP #	表位和来源	序列
	MP-1140	DP-2062	T1BT* <i>Pf</i>	SEQ ID NO: 7
	MP-1141			
	MC-1142			
	MP-1167	DP-2163	T1 ₃ B ₅ <i>Pf</i>	SEQ ID NO: 17
	MP-1164	DP-2167	Pam3.T1 ₃ B ₅ <i>Pf</i>	Pam ₃ - SEQ ID NO: 17

[0205] SEQ ID NO:17(SKKKK(NANPNVDP)₃(NANP)₅K₂₀Y)

[0206]

SKKKKNANPNVDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKY

[0207] 用MP-1141、MP-1167或MP-1164免疫C57BL/6小鼠；将用PBS或用CFA中的DP-2062(T1BT*(SEQ ID N:6))免疫的小鼠作为阳性对照。在第28天收集的血清的ELISA分析表明含有Pam₃Cys修饰的DP的MP-1164与阳性对照弗氏佐剂中的DP-2062(T1BT*)相当,并且在统计学上比含有相同DP但是没有Pam₃Cys的MP-1167更强效(P=0.02,Wilcoxon秩和检验)(图18)。MP-1164也产生与阳性对照组相同的抗体同种型谱,包括由MP-1167或MP-1141(其各自缺少Pam₃Cys)最低限度诱导的Th1相关的IgG2c同种型(图19)。Pam₃Cys-修饰的MP-1164与DP 2062肽/CFA阳性对照组一样有效,保护90%的小鼠不受肝阶段的感染(图20)。在MP-1164组中,保护与中和抗体的相关性最强(数据未示出),MP-1141组中中等(数据未示出),MP-1167组中最弱(数据未示出)。因此,DP的简单的Pam₃Cys修饰产生改善的LbL疫苗,其诱发更强的抗体应答并提供更高水平的对抗寄生虫攻击的保护。

[0208] 无量词修饰的名词以及类似的指代(特别是在所附权利要求书上下文中)应解释为表示一个/种或更多个/种,除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾。本文使用的术语第一、第二等并未想要表明任何特定的顺序,而仅是为了方便表示多个例如层。术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”应解释为开放式术语(即,意指“包含”,但不限于),除非另外指明。除非在本文中另外指明,否则本文对数值范围的记载仅用作单独地引用落入所述范围内的每个单独的值的速记方法,且每个单独的值如同它们在本文中被单独记载一样包含在说明书中。所有范围的端点包含在该范围内,并且可独立组合。本文描述的所有方法均可以按照合适的顺序进行,除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾。使用的任何和全部实施例或示例性语言(例如,“例如/如”)仅旨在更好地说明本发明,而不是为了限制本发明的范围,除非另外要求。说明书中任何语言均不应解释为将任何未要求保护的特征作为实施本文所述发明的必要特征。

[0209] 尽管参照示例性实施方案描述了本发明,但是本领域技术人员理解的是,在不脱离本发明的范围的情况下,可对其进行各种修改以及用等同物替换其要素。另外,按照本发明的教导,在不脱离其本质范围的情况下,可以作许多修改以适合特殊的情况或材料。因此,本发明旨在不局限于本申请作为实施本发明的最佳方式公开的具体实施方案,本发明将包括落入所附权利要求的范围的所有实施方案。本发明包括上述要素的所有可能改变的任意组合,除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾。

IP1459479P. 序列表.TXT

序列表

<110> Artificial Cell Technologies, Inc.
Powell, Thomas J

<120> 抗疟疾组合物和方法

<130> ATE0022US2

<150> 61/617998

<151> 2012-03-30

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫

<400> 1

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
1 5 10 15

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫

<400> 2

Asn Ala Asn Pro
1

[0001]

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫

<400> 3

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

Cys Ser Val Thr
20

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 4

aagcattaaa taaagcgaat acatccttac

30

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 5

ggagattggt tttagacgttt atgtg

25

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经设计的肽

<400> 6

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Tyr
 20

<210> 7
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经设计的肽

<400> 7

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
 1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Glu Tyr Leu Asn
 20 25 30

[0002]

Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr
 35 40 45

Ser Gly Asn Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
 65 70

<210> 8
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经设计的肽

<400> 8

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
 1 5 10 15

Asp Pro Asn Ala Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
 35 40

<210> 9
 <211> 37
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 9

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Tyr
35

<210> 10

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 10

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

Cys Ser Val Thr Ser Gly Asn Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

[0003]

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
35 40 45

<210> 11

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 11

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Lys Tyr
50

<210> 12

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 12

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
1 5 10 15

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro
20 25 30

Cys Ser Val Thr Ser Gly Asn Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
50 55 60

<210> 13

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 13

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Glu Tyr Leu Asn
1 5 10 15

Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr
20 25 30

[0004]

Ser Gly Asn Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
50 55

<210> 14

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 14

Leu Glu Phe Val Lys Gln Ile Arg Asp Ser Ile Thr Glu Glu Trp Ser
1 5 10 15

Gln Cys Asn Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
35 40

<210> 15

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 15

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

Leu Glu Phe Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
35 40

<210> 16

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 16

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

Leu Glu Phe Val Lys Gln Ile Arg Asp Ser Ile Thr Glu Glu Trp Ser
20 25 30

Gln Cys Asn Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

[0005]

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
50 55

<210> 17

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经设计的肽

<400> 17

Ser Lys Lys Lys Lys Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn
1 5 10 15

Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn
20 25 30

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn
35 40 45

Pro Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
50 55 60

Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
65 70

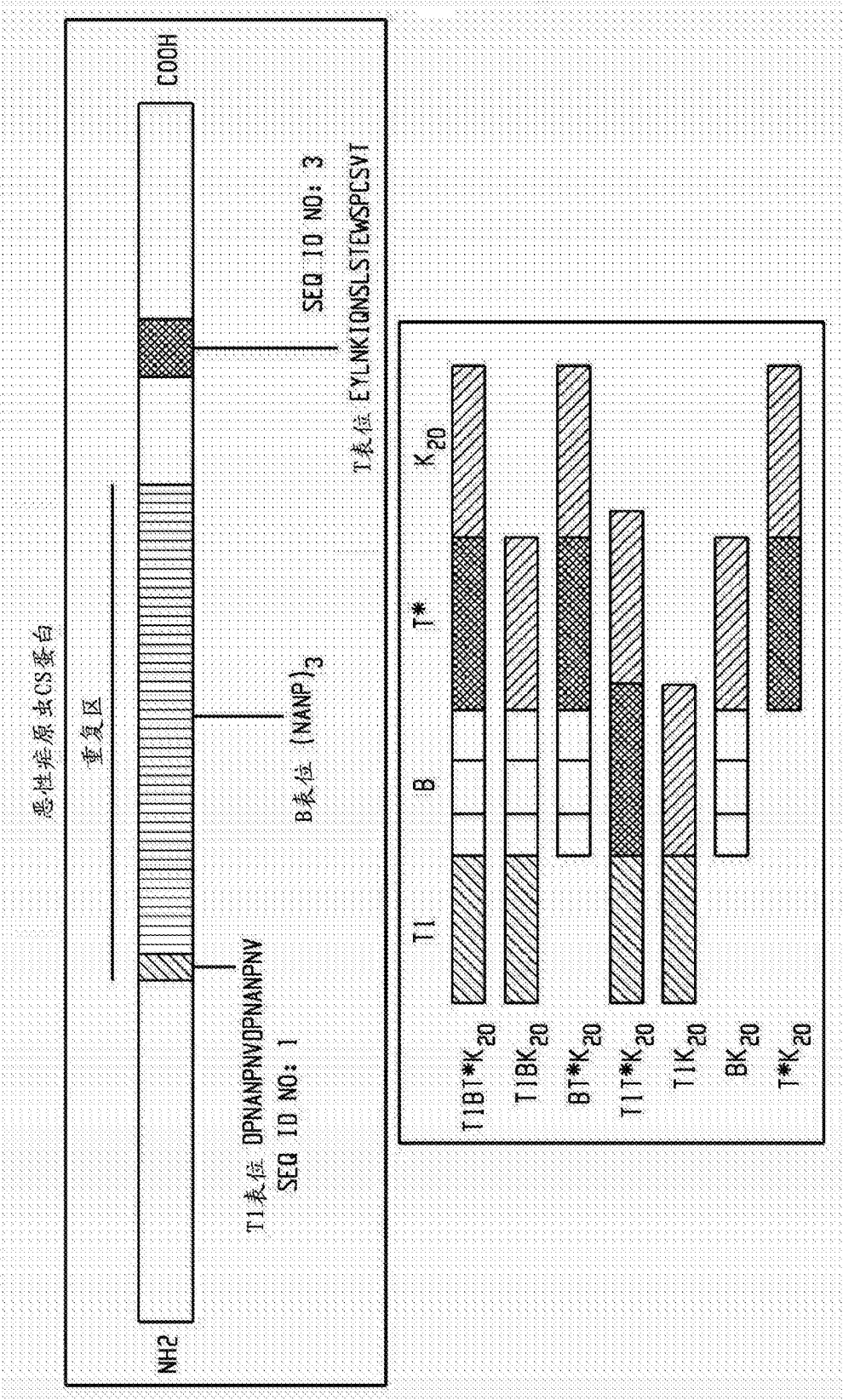


图1

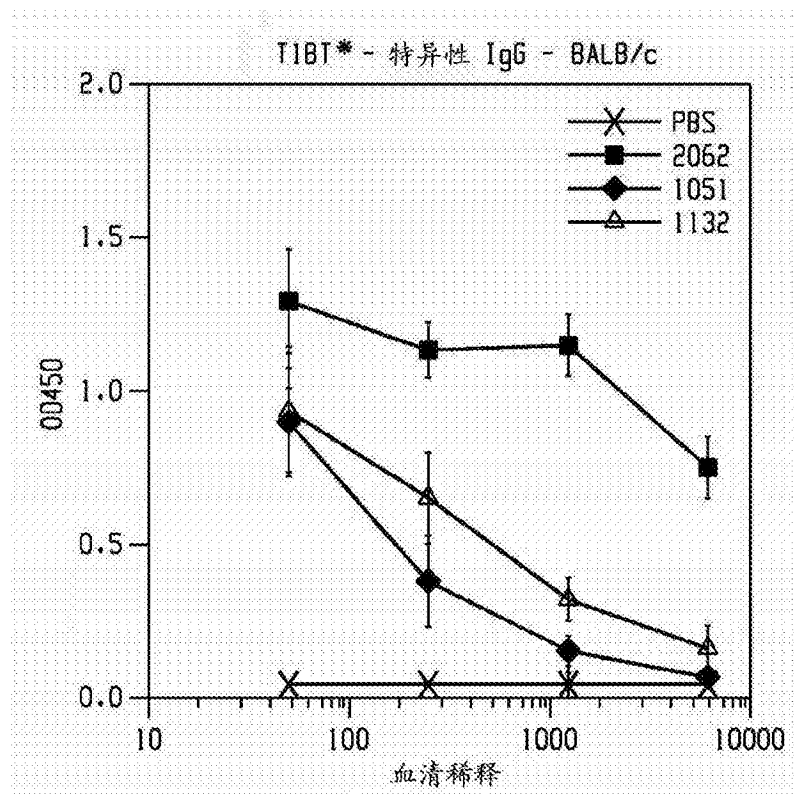


图2

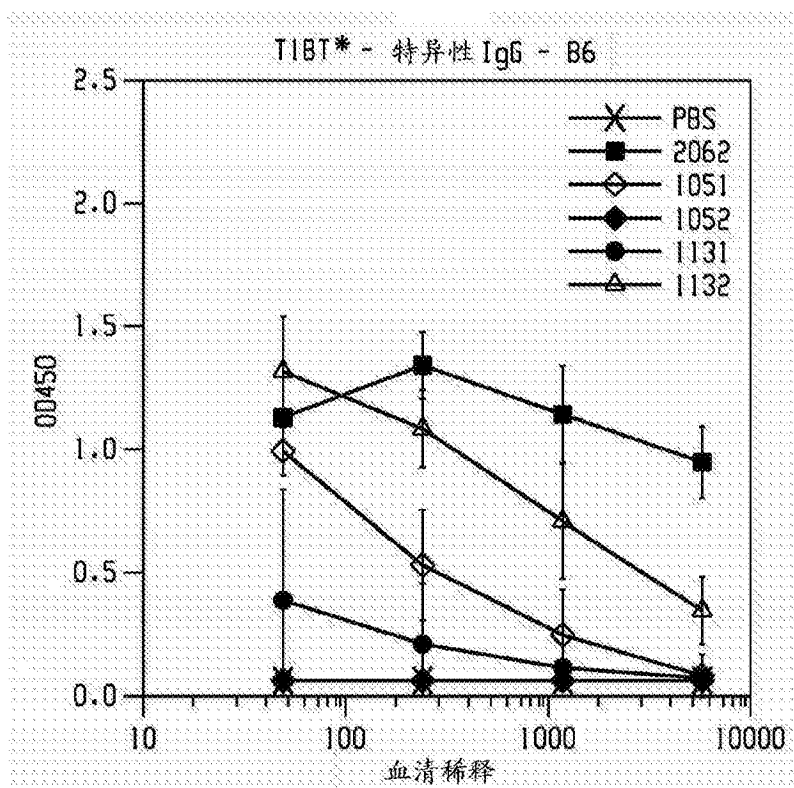


图3

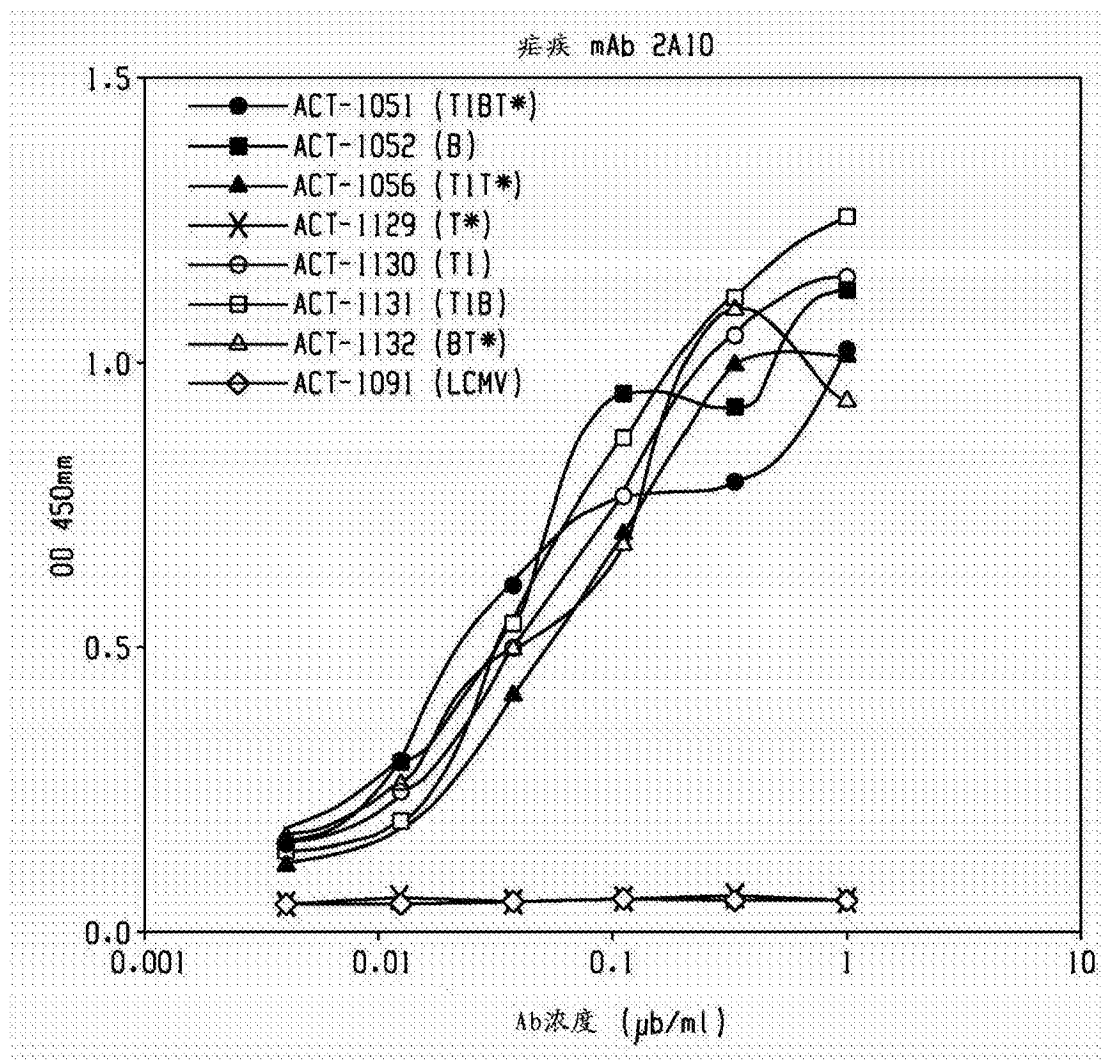


图4

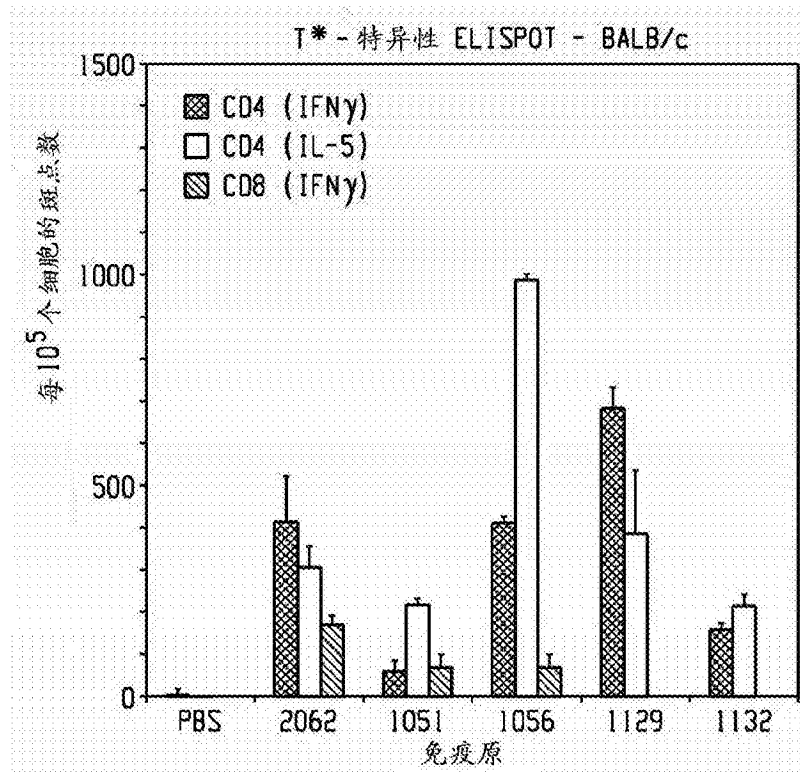


图5

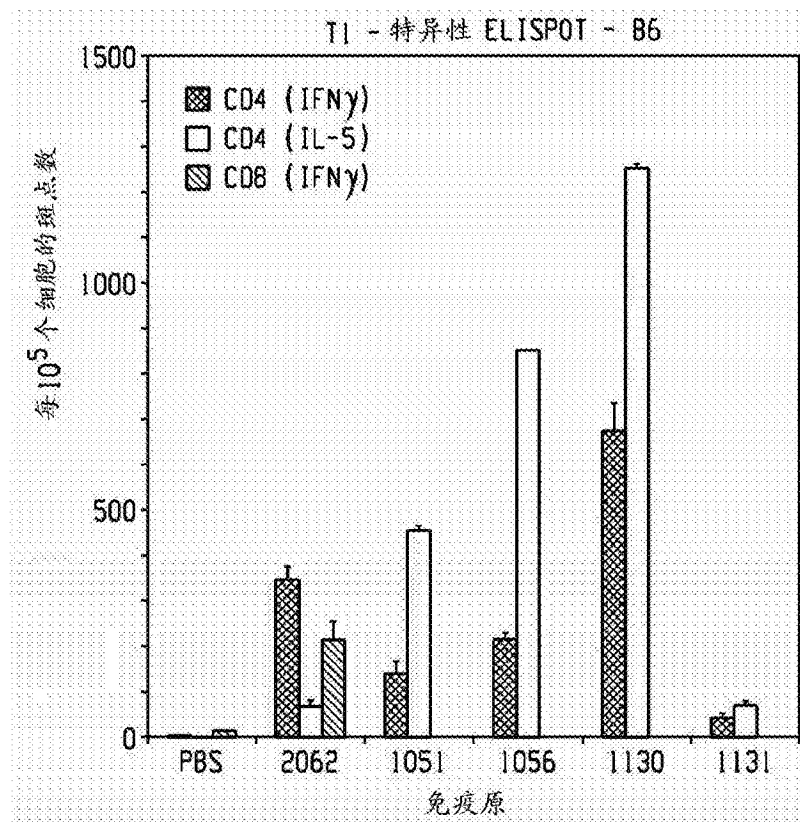


图6

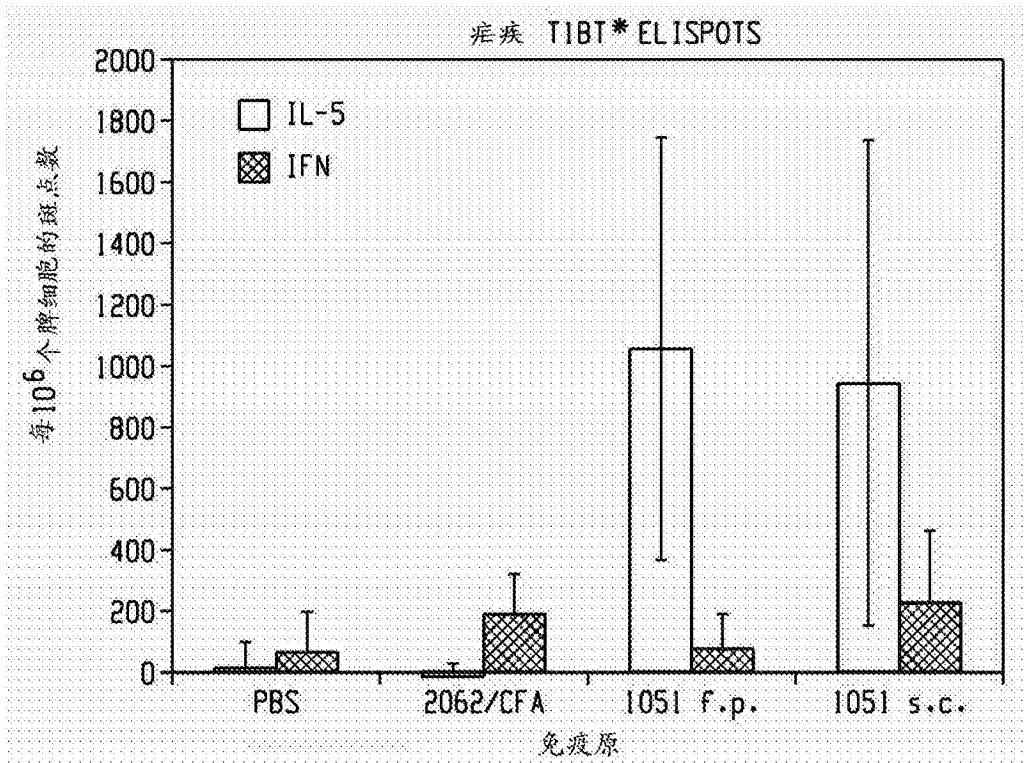


图7A

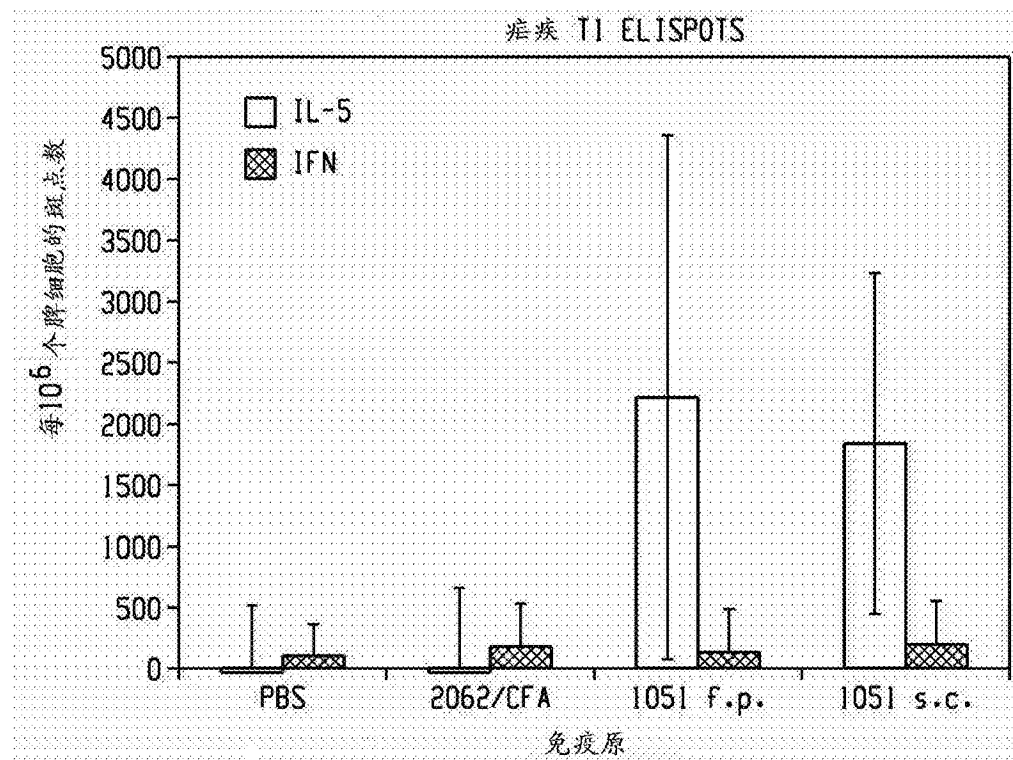


图7B

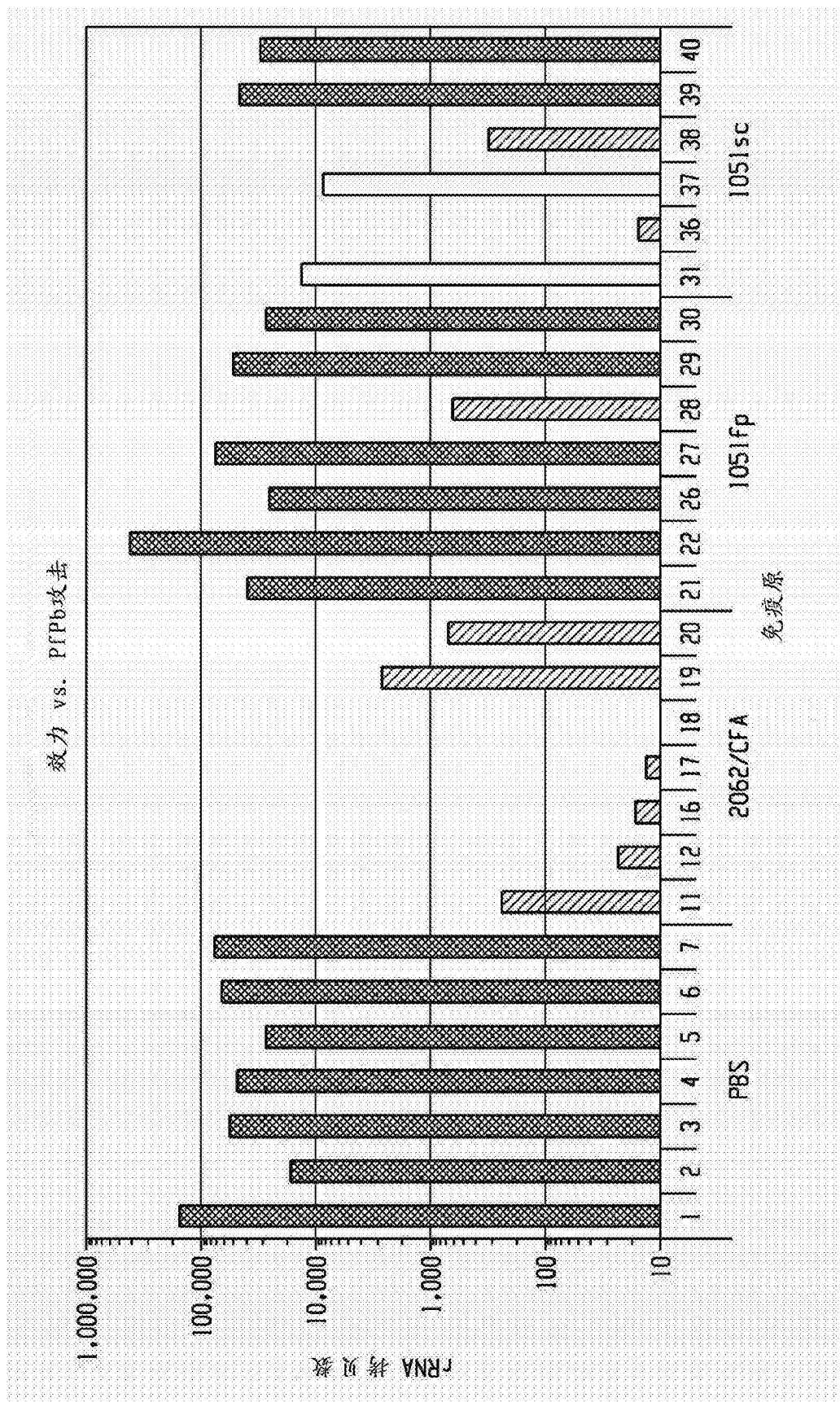


图8

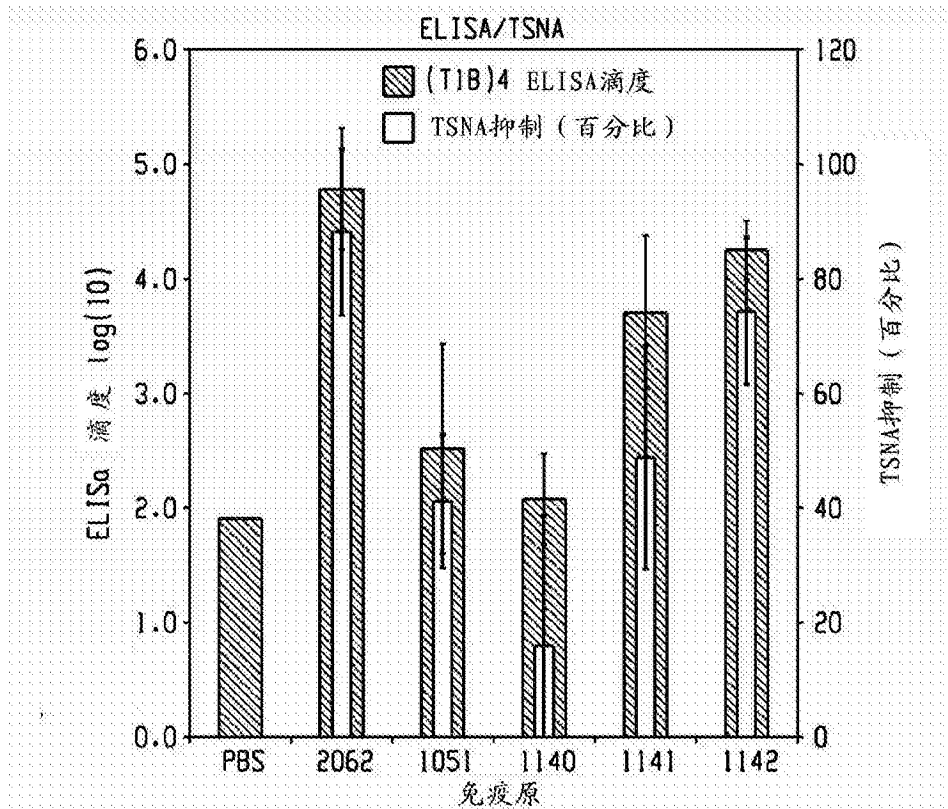


图9

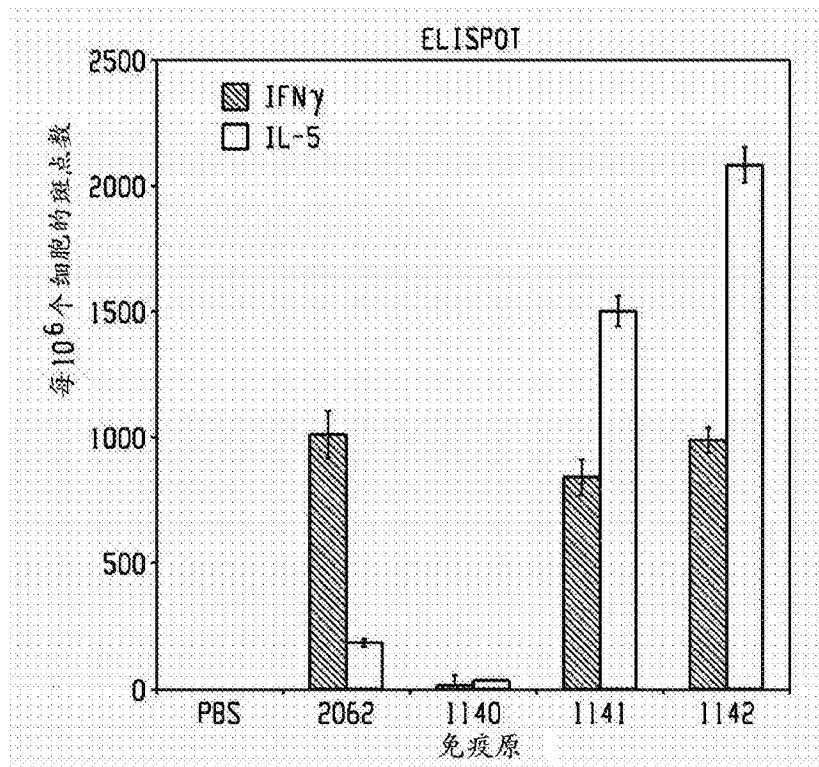


图10

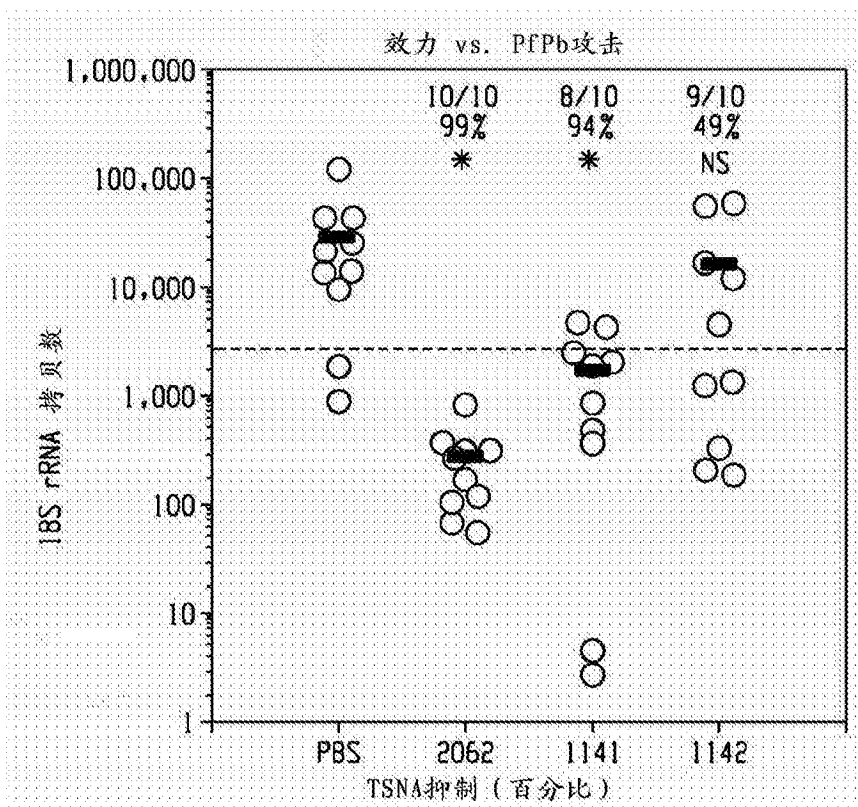


图11

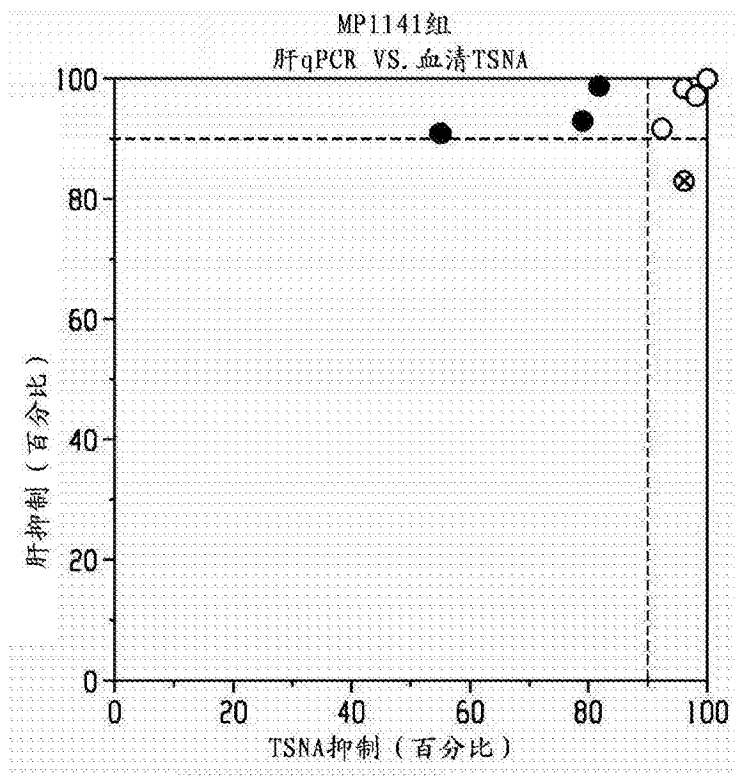


图12

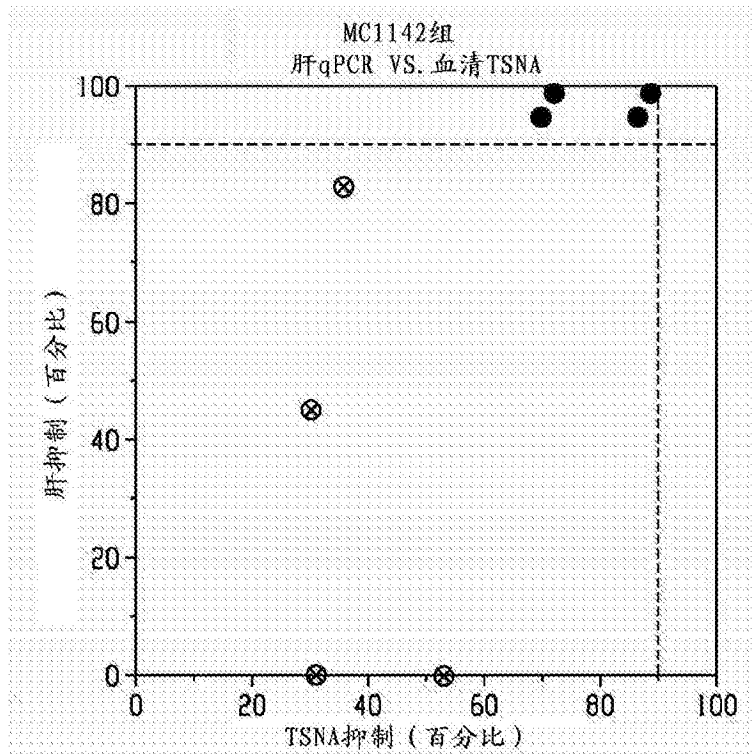


图13

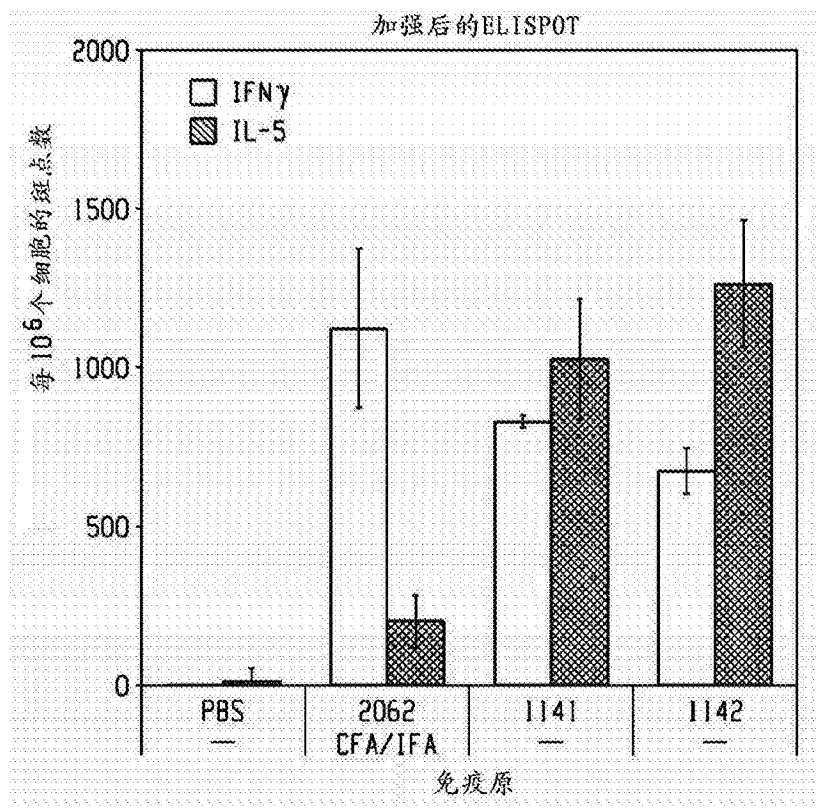


图14

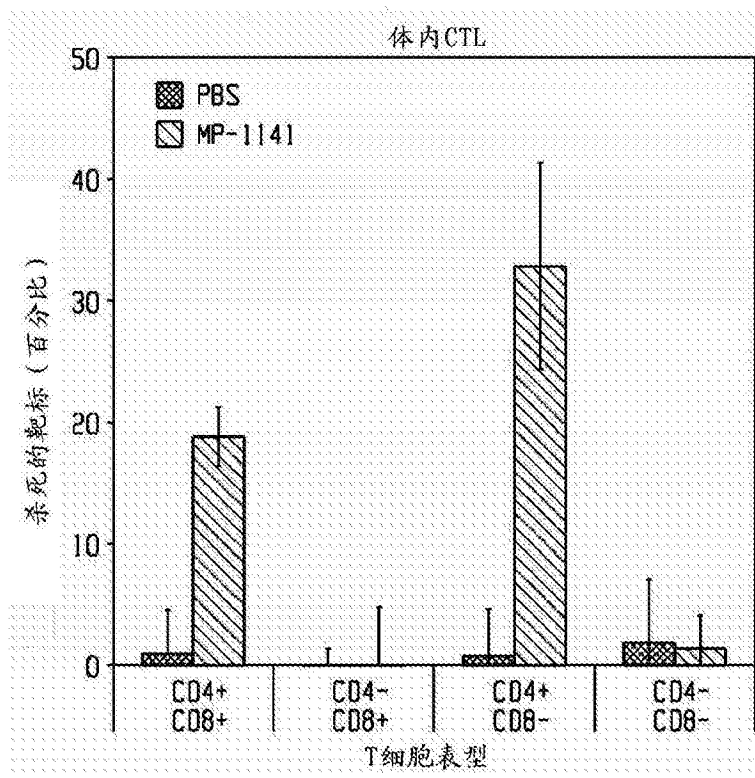


图15

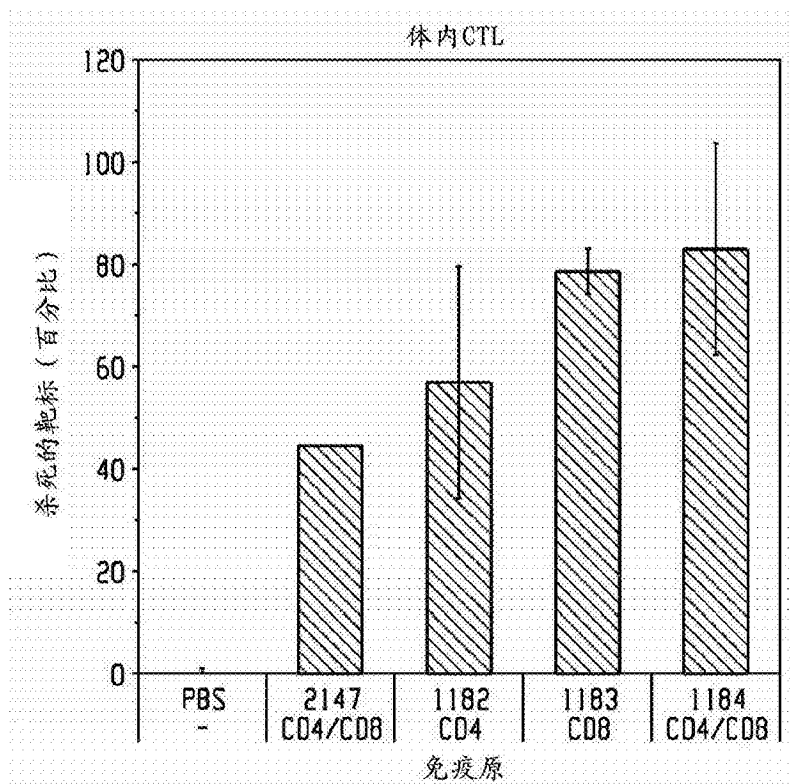


图16

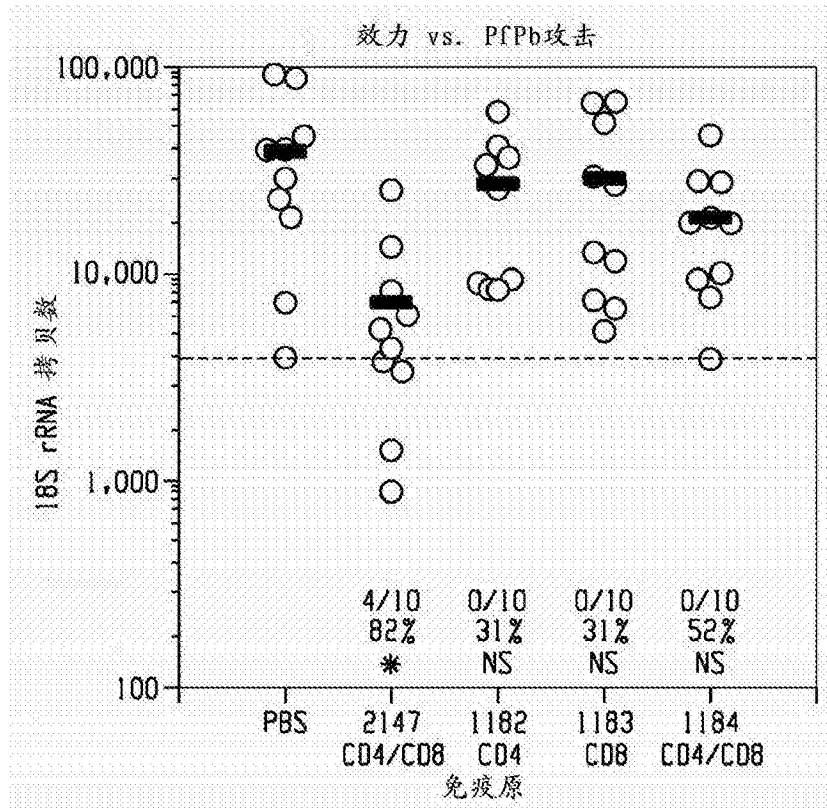


图17

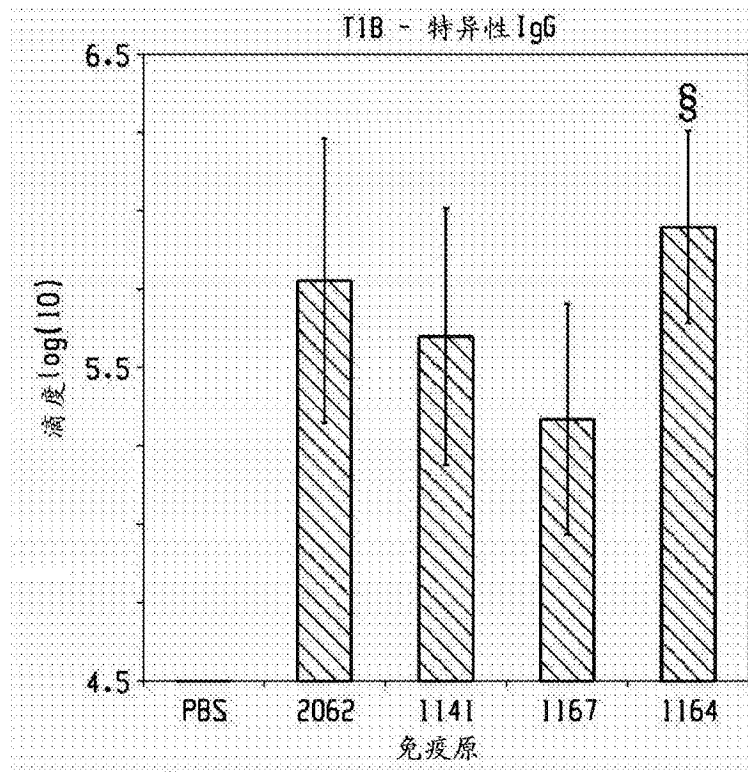


图18

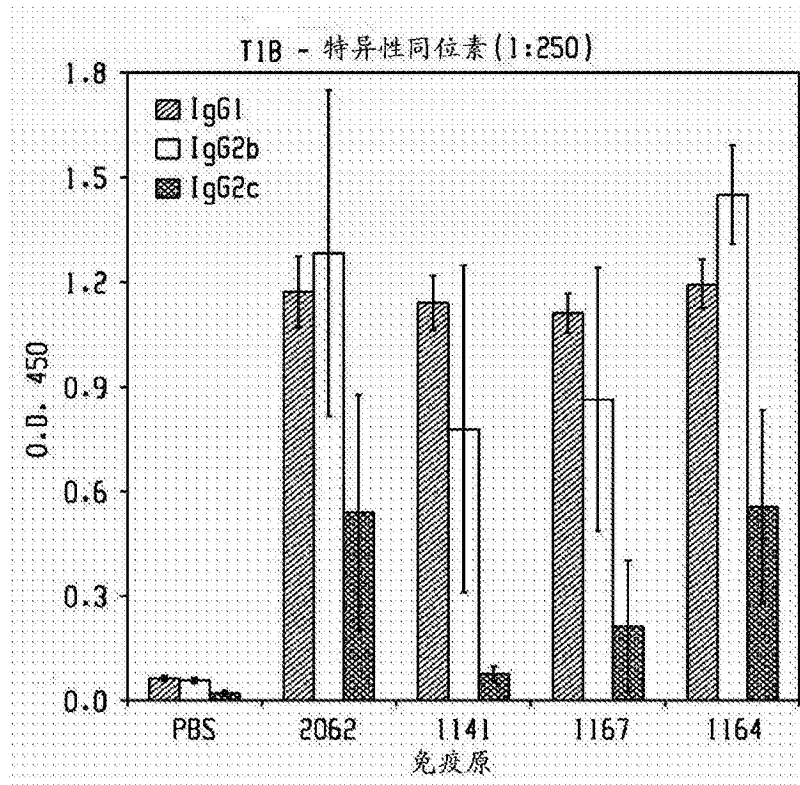


图19

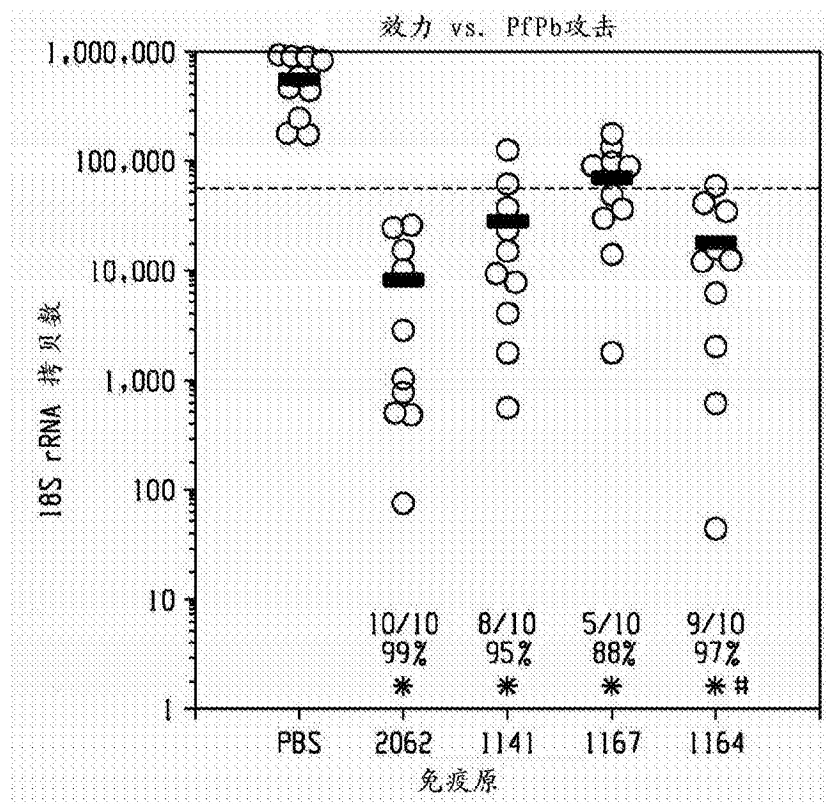


图20