



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112512552 B

(45) 授权公告日 2024.10.22

(21) 申请号 201980046185.0

(74) 专利代理机构 北京知帆远景知识产权代理

(22) 申请日 2019.07.12

有限公司 11890

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 苏志莲

申请公布号 CN 112512552 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2021.03.16

A61K 38/17 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 31/00 (2006.01)

62/697,132 2018.07.12 US

A61P 33/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00 (2006.01)

2021.01.08

A61P 37/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 37/04 (2006.01)

PCT/US2019/041601 2019.07.12

C07K 19/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C12N 15/62 (2006.01)

W02020/014609 EN 2020.01.16

(56) 对比文件

(73) 专利权人 海克斯麦治疗公司

WO 2015164798 A1, 2015.10.29

地址 美国华盛顿州

审查员 叶一达

(72) 发明人 柯思·道格拉斯·米勒

权利要求书1页 说明书16页

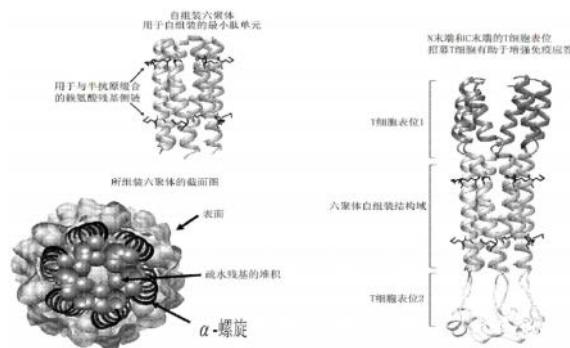
序列表7页 附图4页

(54) 发明名称

自组装肽支架

(57) 摘要

本公开描述了用于生产疫苗的肽支架。肽支架包括自组装为半抗原载体(hC)的肽，该半抗原载体包括两亲性 α -螺旋。肽按照特定模式包括七肽重复序列。hC还包括半抗原或与之偶联的试剂，并且可选地，hC在至少一个两亲性 α -螺旋的N末端和/或C末端包括至少一个T细胞表位。本公开还描述了包括免疫原性组合物的组合物，该免疫原性组合物包括半抗原-hC或试剂-hC缀合物。



1. 一种肽,由至少一个七肽组成,
其中所述肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:15。
2. 一种包括根据权利要求1所述的肽的低聚物,其中所述低聚物是二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。
3. 根据权利要求2所述的低聚物,其中所述低聚物是六聚体。
4. 一种组合物,包括:
根据权利要求1所述的肽或者根据权利要求2或3所述的低聚物,以及赋形剂。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物,以及所述赋形剂是药学上可接受的赋形剂。
6. 一种制备权利要求2或3所述的低聚物的方法,所述方法包括获得权利要求1所述的肽,并使得所述肽自组装成低聚物。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述低聚物是二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

自组装肽支架

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年7月12日提交的申请号为62/697,132的美国临时专利申请的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表信息

[0004] 于2019年7月10日或其附近创建的名为“A070-0003PCT_ST25.txt”的计算机可读文本文件,其文件大小约为7KB,包含本申请的序列表,并通过引用将其全部内容并入本文。

技术领域

[0005] 本公开描述了用于合成生产疫苗的肽支架。

背景技术

[0006] 重组蛋白在诸如细菌(主要是大肠杆菌)、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞的宿主中的表达是目前生产亚基疫苗(subunit vaccine)的最常用方法。它已经非常成功并且将仍然是疫苗生产的重要方法。通常,通过基因组学分析、功能测定、计算机分析(例如功能预测、结构分析、表位鉴定等)或这三者的组合来鉴定传染原蛋白。启动表达试验以评估免疫原性试验的产率和溶解度。然后将产生针对疾病靶标的高滴度抗体的亚基用于保护研究,在该研究中测试疫苗保护宿主免于感染和/或疾病表现和进展的能力。然后将满足所有这些标准的亚基向前推进以进行疫苗生产优化、稳定性和毒性/安全性/剂量研究。表达优化研究对于确定生产规模和可行性也很重要。众所周知,整个过程耗时、劳动密集并且非常昂贵。

[0007] 需要开发一种更有效和更具成本效益的生产疫苗的方法。

发明内容

[0008] 本公开描述了包括两个或多个七肽的单体肽,这些单体肽自组装成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。七肽中的每个包括如SEQ ID NO:1-11中所示的氨基酸序列。

[0009] 本文所述的肽自组装成半抗原载体(hC)。在实施例中,本文所述的肽自组装成六聚体,并且包括如SEQ ID NO:12-17中所示的氨基酸序列。六聚体半抗原载体(HhC)还包括与其缀合的至少一种半抗原。HhC在六聚螺旋的N末端和C末端还包括T细胞表位。

[0010] 在实施例中,本公开描述了包括本文所述的半抗原载体(hC)和药学上可接受的赋形剂的组合物,该半抗原载体含有至少一种半抗原和T细胞表位。药物组合物用于治疗有需要的对象。

[0011] 在实施例中,本公开描述了使用本文所述的药物组合物在有需要的对象中诱导强烈的免疫应答的方法。

附图说明

[0012] 图1示出自组装六聚体的结构。疏水残基在两亲性 α -螺旋的一侧,用于半抗原偶联的反应性残基(此处示出赖氨酸,但其它残基或含有反应性基团的非天然氨基酸也能适于共价偶联)在另一侧。在水合后,疏水残基缔合以排除水,这是能量上有利的配合物。物种特异性T细胞表位的设置是在N末端和C末端。

[0013] 图2示出HhC的免疫原性。支架的三个结构域在左侧以带状图和右侧以表面图显示。通过表位预测软件分析模型,并根据其在右侧的模型中的潜在免疫原性评分对元数据进行着色。红色=较高的潜在免疫原性;蓝色=较低的潜在免疫原性。

[0014] 图3示出半抗原缀合的HhC的合成。HhC上的反应性残基(示出为红键)被残基特异性异双功能交联剂激活,或直接与激活的半抗原肽反应(例如EDC/NHS酯化)以形成半抗原偶联的六聚体。使用大量过量(>10摩尔当量)的交联剂和肽进行该反应,以确保六聚体完全负载(这里示出12个偶联的肽)。天然存在的色氨酸,或在SPPS过程中加入的色氨酸,允许通过荧光光谱法进行偶联效率定量。这里单体的大小为60个残基。

[0015] 图4示出自组装肽的PAGE凝胶。通过SPPS合成肽(SEQ ID NO:15)并冻干以存储。将肽溶解在1×PBS中,然后上样到蓝色的非还原性PAGE凝胶上,通过4-16%丙烯酰胺梯度凝胶在150V(恒定)下电泳90分钟进行大小分级。将凝胶固定在甲醇:乙酸:水中,然后在相同溶液中漂洗以进行脱色。泳道1是作为参考蛋白的BSA,泳道2是自组装的六聚体。MW标准(未示出)在右侧。BSA为66kDa,六聚体的预期大小为20.7kDa。

具体实施方式

[0016] 半抗原是由于其小尺寸而缺乏抗原决定簇的小分子。为了具有抗原性,它们必须与更大的载体蛋白偶联以具有免疫原性。小肽(即通常小于5,000道尔顿的那些)也缺乏抗原决定簇来诱导强烈的免疫应答,因此它们也必须与更大的载体蛋白偶联以成为免疫原性。因此,如本文所用,“半抗原”是指1)任何缺少抗原决定簇的分子,直到它与较大的载体蛋白共价或非共价地结合,或2)其抗原性通过共价或非共价地偶联至较大的载体蛋白而增加的分子。

[0017] 本公开描述了一种用于生产疫苗的新颖方法,该疫苗包括含有至少一种半抗原的半抗原载体(hC)。该方法消除了传统亚基疫苗开发的许多成本高且耗时的步骤。灵活的模块化系统代替了在重组表达宿主中制备亚基,在该系统中所有疫苗成分均通过固相肽合成(SPPS)合成制备。在实施例中,本文所述的方法包括设计hC组分,其将短肽两亲性 α -螺旋自组装成足够大的载体复合物,以在偶联至少一种半抗原后诱导强烈的免疫应答。在实施例中,半抗原载体包括六个肽两亲性 α -螺旋。作为示例,图1示出本文所述的六聚体半抗原载体(HhC)的组分。有一个在水合后形成核心的中心区域,赖氨酸在该区域起到缀合半抗原的作用,例如小的内源肽或较大蛋白上包括B细胞表位的肽。HhC的大小可根据T细胞表位长度而变化。形成六聚体后,未缀合的六聚体为38.5kDa(图1)。取决于所缀合半抗原的长度和大小,缀合的六聚体将更大。例如,加载到六聚体上的2,156道尔顿的20个残基的肽将大小从38.5kDa增加到64kDa。

[0018] 本公开还描述了hC作为需要在体内递送的试剂的载体的用途。该试剂与hC缀合或连接用于在体内递送至特异性位点。

[0019] 本公开描述了hC的核心区域,其包括至少14个氨基酸残基长度的肽,并且包括至少两个七肽重复序列,每个七肽均具有hwxhxyz(SEQ ID NO:19)的模式,其中:

[0020] h是疏水或非极性残基;

[0021] w是带正电荷、带负电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基;

[0022] x是带负电荷、带正电荷、非极性脂族或极性不带电荷残基,或用于与半抗原或任何其它分子表位偶联的任何天然或非天然残基;

[0023] y是用于与半抗原或任何其它分子表位偶联的任何天然或非天然残基;以及

[0024] z是带负电荷、带正电荷、极性不带电荷、非极性脂族残基,或用于与半抗原或任何其它分子表位偶联的任何天然或非天然残基。

[0025] 在实施例中,hC核心区域包括具有模式(hwxhxyz)n(SEQ ID NO:20)的肽,其中:

[0026] h是I、L、V、F、W、Y、M、W、G或A;

[0027] w是G、R、A、N、Q、H、S、D、E、K或T;

[0028] x是R、S、N、Q、A、G、T、D、E、K、H或C;

[0029] y是K、H、C、D、E、R、W、Y、Q、N或含有适于共价偶联的反应性基团的非天然氨基酸或分子,

[0030] z是A、D、H、S、E、R、N、Q、K或G;以及

[0031] n是大于1的整数。

[0032] 在实施例中,本文所述的示例性七肽具有以下氨基酸序列:

[0033] LRSIGKD(SEQ ID NO:1);

[0034] LRSIGRD(SEQ ID NO:2);

[0035] IREISRA(SEQ ID NO:3);

[0036] IREVAQ(SEQ ID NO:4);

[0037] IRDIAKA(SEQ ID NO:5);

[0038] IRDIGRA(SEQ ID NO:6);

[0039] IRDVGQS(SEQ ID NO:7);

[0040] IRDLAKG(SEQ ID NO:8);

[0041] VKDVARG(SEQ ID NO:9);

[0042] IRDIGNS(SEQ ID NO:10);

[0043] IKDLARG(SEQ ID NO:11);或

[0044] IKKKKK(SEQ ID NO:12)。

[0045] 在实施例中,hC的核心区域包括本文所述的至少一个七肽,n是2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0046] 本公开描述了包括至少14个残基的肽的hC核心区域。在实施例中,肽包括14个残基至80个残基的长度,并包括两个至11个七肽重复序列。在实施例中,hC核心区域包括含有20至70个残基、25至60个残基、28至50个残基、28至40个残基、或28至30个残基的肽。包括14个残基至80个残基长度的肽是单体。

[0047] 在实施例中,本文所述的示例性肽具有以下氨基酸序列:

[0048] LRSIGKDLRSIGKDLRSIGKDLRSIGKD(SEQ ID NO:13)

[0049] LRSIGKDLRSIGKDLRSIGKDLRSIGKDS(SEQ ID NO:14);

- [0050] LRSIGKDLRSIGRDLRSIGKDLRSIGRD (SEQ ID NO:15)；
[0051] IREISRAIREVAQSIIRDIAKAIREIGKS (SEQ ID NO:16)；
[0052] IRDIGRAIRDVGQSIRDLAKGIRDISKG (SEQ ID NO:17)；或
[0053] VKDVARGIRDIGNSIKDLARGIRDIGRG (SEQ ID NO:18)。

[0054] 本文所述的肽可被修饰以包括至少一个取代、插入和/或缺失，并且保持上述hwxhxyz (SEQ ID NO:19) 的模式。在七肽重复序列或肽内的每个位置的修饰必须保持肽的两亲性 α -螺旋结构、稳定性和低聚状态。

[0055] 在实施例中，本文所述的肽包括包含这样氨基酸序列的肽，该氨基酸序列与 (SEQ ID NO:1)n、(SEQ ID NO:2)n、(SEQ ID NO:3)n (SEQ ID NO:4)n、(SEQ ID NO:5)n、(SEQ ID NO:6)n、(SEQ ID NO:7)n、(SEQ ID NO:8)n、(SEQ ID NO:9)n、(SEQ ID NO:10)n 或 SEQ ID NO:11)n 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性，其中 n 是 2 至 11 的整数。在实施例中，本文所述的肽包括包含这样氨基酸序列的肽，该氨基酸序列与 SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 或 17 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性。序列同一性是指比对中两条序列的对应的程度，通常表示为百分比。可以通过本领域常规实践以确定同一性的方法来确定两个序列之间的差异，该方法被设计为在所测试的序列之间给出最大的匹配。可以通过使用可公开获得的计算机程序来确定确定序列同一性的方法。用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包括：例如 BLASTP, BLASTN 和 FASTA。BLAST 系列程序可从 NCBI 和其他来源公开获得。

[0056] 在实施例中，可将残基添加至本文所述肽的 N 末端或 C 末端以增加肽在体内的稳定性。例如，可以将 V(缬氨酸)、M(甲硫氨酸)、G(甘氨酸)、I(异亮氨酸)、D(天冬氨酸) 或 P(脯氨酸) 添加至肽的 N 末端或 C 末端。另外，可将保护基团加至残基以增加肽的稳定性。这种保护基的示例包括乙酰基、丙烯酰基、9-芴基甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、烯丙氧基羰基、苄氧基羰基和 PEG(聚乙二醇)。

[0057] 本文所述的肽(包括经修饰的肽)可以通过人工技术或通过自动化程序化学合成。例如，自 1960 年代初期以来就已经进行了固相多肽合成 (SPPS)。多年来，已经对早期 SPPS 进行了改进，并且许多方法已经自动化。已经开发出用于保护末端和其他反应性基团的化学物质。

[0058] 本文所述的肽也可在异源表达系统中生物制备或重组制备。任何异源表达系统都可以用于产生本文所述的肽。在实施例中，表达系统包括大肠杆菌，其缺乏用于翻译后修饰的机制，使其成为制备本文所述肽的合适宿主。

[0059] 本文所述的肽可以是半抗原单体载体 (hC)，但是由于该肽是自组装肽，它可以自组装成 hC，该 hC 是由二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体组成的低聚物。在实施例中，该肽自组装成六聚体，其具有六个两亲性 α -螺旋。

[0060] 在实施例中，本公开描述了自组装六聚体，其是六聚体半抗原载体 (HhC)，包括用于缀合半抗原的至少一个残基。HhC 上用于与半抗原偶联的最佳位点是七肽重复序列中的 y 残基，但半抗原偶联也可发生在 w、x 和 z 残基，因为它们是溶剂可及的，并且半抗原可使用可偶联半抗原表位的任何残基偶联。在实施例中，y 残基是 K、H、C、D、E、R、W、Y、Q、N 或含有易于共价偶联的反应性基团的非天然氨基酸。在实施例中，在六个两亲性 α -螺旋中的每个的一

侧上存在两个至四个y残基以提供偶联位点。在实施例中，y残基是赖氨酸(K)。

[0061] 可以使用y残基将hC与至少一种半抗原缀合。与半抗原缀合的hC是肽缀合物，称为半抗原-hC缀合物或半抗原-低聚物缀合物。在实施例中，hC与1至100、10至90、20至80、30至70、40至60或50个半抗原连接。半抗原可以相同或不同。

[0062] 术语“半抗原”是指这样的分子，其本身不是良好的免疫原，但是当它们与较大分子连接时变得具有免疫原性。半抗原可以是例如小的有机分子、单糖、二糖、寡糖、脂质、核酸、肽或多肽。尽管半抗原可能能够与抗体结合，但使用半抗原免疫通常不会引起强烈的抗体应答。然而，当半抗原通过与较大的载体分子例如大于5,000道尔顿的半抗原-载体缀合物连接或缀合而共价连接时，可以实现免疫原性。本文所述的半抗原载体(hC)是这种半抗原-载体缀合物的示例。

[0063] 可与hC缀合的半抗原包括可引起抗体产生的任何试剂，这些抗体可用于治疗、预防、减轻对象的症状或降低对象发生疾病或病症的风险，包括对药物成瘾。半抗原的示例包括肽、脂质、脂肽、脂蛋白、碳水化合物和小分子。可用作半抗原的肽的示例包括T细胞表位和B细胞表位。肽、T细胞表位和B细胞表位包括合成或重组制备的或天然的肽或蛋白质，其包含天然或非天然的D-氨基酸或L-氨基酸。可用作半抗原的脂质包括通过结合TLR和MHC I或II受体诱导先天性和/或适应性免疫应答的脂质。脂质也可以作为B细胞表位。可用作半抗原的碳水化合物包括葡萄糖、二糖、三糖和更大的糖，包括复合碳水化合物。

[0064] 半抗原可以使用任何已知的方法偶联至hC上，包括单击化学或同或异双功能交联试剂或肽键形成。在实施例中，可以使用EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)/NHS(N羟基琥珀酰亚胺)或NHS/马来酰亚胺交联化学(其通常用于缀合分子)将半抗原与hC缀合。y残基(例如赖氨酸)被设置为用于提供明确定义的半抗原放置和偶联化学计量。

[0065] 半抗原也可通过任何合适的接头部分(moiety)与hC偶联。接头的示例包括形成酰胺键、酯键和二硫键的那些。接头可以是可裂解的接头，例如蛋白酶可裂解的肽接头、核酸酶敏感的核酸接头、脂肪酶敏感的脂质接头、糖苷酶敏感的碳水化合物接头、pH敏感的接头、低氧敏感的接头、光可裂解的接头、热不稳定的接头或酶可裂解的接头。接头也可以是不可裂解的接头。可以使用任何已知的方法将接头与hC结合，例如单击化学、被动吸附、多价螯合、高亲和力非共价结合或共价键形成。半抗原也可以不采用连接物与hC连接。

[0066] 此外，半抗原可以通过另一分子与hC缀合。例如，半抗原，例如B细胞表位或T细胞表位，可以首先与用于展示目的表位的载体偶联，然后与hC缀合。这种载体的示例包括蛋白质、肽、纳米颗粒、病毒样颗粒或可以用作展示目的表位的载体的任何物质。

[0067] 另外，本公开描述了可选地包括至少一个T细胞表位的hC，该至少一个T细胞表位与hC核心中的至少一个螺旋的N末端和/或C末端连接。在实施例中，至少一个T细胞表位与hC核心中的每个螺旋的N末端和/或C末端连接。N末端和/或C末端招募T细胞的T细胞表位有助于提供来自半抗原缀合的六聚体的强烈的免疫应答。选择T细胞表位肽的方法是众所周知的。例如，可以通过本领域已知的实验方法来选择T细胞表位，该实验方法可以从科学文献中鉴定出来，可以使用生物信息学工具进行预测，可以从头设计，也可以将这些方法结合使用。在实施例中，N末端和C末端的T细胞表位相同或不同。在实施例中，T细胞表位是例如CD4+T细胞表位，已知其增强产生高亲和力抗体的记忆B细胞和浆细胞的发育。

[0068] 可以使用天然化学连接(NCL)而非固相合成将T细胞表位偶联至N末端和/或C末

端。T细胞表位可以使用同或异双功能交联剂或使用单击化学试剂与N末端和/或C末端偶联，该试剂是偶联分子的公知试剂。

[0069] N末端或C末端的T细胞表位可以通过中间功能试剂例如反应性小分子或大分子与hC连接或缀合。这种小分子的示例包括催化剂、稳定的中间体或盐。这种大分子的示例包括多抗原肽、蛋白质或酶。

[0070] 另外，T细胞表位在hC末端的缀合或半抗原或其它分子与hC核心的缀合可以使用任何类型的接头进行。接头可以是可裂解的或不可裂解的。可裂解的接头包括蛋白酶可裂解的肽接头、核酸酶敏感的核酸接头、脂肪酶敏感的脂质接头、糖苷酶敏感的碳水化合物接头、pH敏感的接头、酶可裂解的接头、热不稳定的接头、光可裂解的接头。也可通过激活侧链原子或末端原子与中间或最终分子原子共价反应以形成共价键来使用交联剂。

[0071] 可将半抗原以外的试剂与hC缀合以进行体内递送。术语“试剂”包括分子，例如核酸、肽和治疗剂。例如，核酸或核酸衍生物也可以通过共价键与hC缀合，以递送至细胞或细胞器的内部。T细胞表位可以与例如可裂解的间隔区或可以在体内裂解的接头缀合。一旦被裂解，可通过与主要组织相容性复合体(MHC)结合来呈递T细胞表位，以触发T细胞免疫应答。治疗剂的示例包括用于癌症治疗的小分子，例如紫杉醇和阿霉素。

[0072] 使用已知的和本文所述的用于将半抗原与hC连接的任何方法，本文所述的至少一种试剂可以通过y残基在至少一个N末端和/或C末端或在hC的核心与hC缀合或连接。所得试剂-hC缀合物不包括T细胞表位。例如，治疗剂可以通过可裂解或不可裂解的交联剂与hC连接或缀合，以递送至特异性位点。

[0073] 在实施例中，包括治疗剂的试剂-hC缀合物还可以包括至少一种用于靶向特异性位点的靶向剂(替代T细胞表位)。特异性位点可以是细胞外或细胞内位点，例如亚细胞器。亚细胞器的示例包括线粒体、过氧化物酶体、细胞核、胞质溶胶、ER或高尔基体复合物。

[0074] 在实施例中，靶向剂是细胞穿透肽(CPP)。CPP的示例包括TAT(来源于HIV蛋白)、Penetratin(pAntp(4358))、Rn和pVEC。这些是阳离子CPP。CPP的其它示例包括两亲性CPP，其为嵌合肽。这些嵌合肽包括疏水结构域和核定位信号(NLS)。这种嵌合肽的示例包括MPG和pep-1。

[0075] 本公开描述了包括本文所述的hC和至少一种赋形剂的组合物。在实施例中，将hC与至少一种半抗原(半抗原-hC缀合物)或试剂(试剂-hC缀合物)缀合，并且可选地将至少一个T细胞表位连接(或缀合)至hC的核心的N末端和/或C末端。在实施例中，组合物是药物组合物，赋形剂是药学上可接受的赋形剂。在实施例中，hC是HhC。

[0076] 术语“赋形剂”是指与hC一起给药的稀释剂、佐剂或载体。佐剂的示例包括完全和不完全弗氏佐剂，其用于动物，特别是研究动物。药学上可接受的赋形剂可以是无菌液体，例如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内给药时，水是优选的赋形剂。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体赋形剂，特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。药学上可接受的佐剂包括基于与油混合的单磷酰脂质-A的佐剂，例如角鲨烯。

[0077] 如果需要，组合物或药物组合物还可以含有少量的湿润剂或乳化剂，或pH缓冲剂。

这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。口服制剂可以包括标准的赋形剂，例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这种制剂含有治疗有效量的纯化形式的hC，以及适量的赋形剂，以提供适当给予对象的形式。该制剂应适合给药方式。

[0078] 本文所述的药物组合物的给药可以以任何方便的方式进行，包括通过气雾吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。本文所述的组合物还可口服、局部、鼻内、肠内、直肠、含服、阴道、舌下、皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌内、静脉内、颅内、腹膜内或其组合给药至对象。药物组合物的给药可以以任何能有效递送治疗和/或预防有效量的半抗原-hC或试剂-hC缀合物给需要的对象的方式进行。

[0079] 本公开描述了用于生产疫苗的肽支架。本公开还描述了制备疫苗的方法，该方法包括设计和制备用于本文所述的hC的核心的单体肽，使单体肽低聚化，以及将目的半抗原缀合至低聚化的hC上。如上所述，可以通过SPPS合成单体肽，该SPPS包括提供冻干形式的所制备的单体肽。冻干的单体肽的水合允许发生低聚化。包括盐和缓冲能力的PBS可以用于水合冻干的单体肽。在实施例中，低聚的hC是HhC。该方法还可包括将至少一个T细胞表位连接至hC核心的至少一个螺旋的N末端或C末端。在实施例中，合成的单体肽具有至少一个与其N末端和/或C末端连接的T细胞表位。

[0080] 另外，本文所述的方法包括增加半抗原的免疫原性。该方法包括将目的半抗原与本文所述的hC缀合。该方法还可包括将至少一个T细胞表位连接至hC核心的至少一个螺旋的N末端或C末端。将半抗原免疫原性的增加与半抗原本身的免疫原性进行比较，例如，不与赋形剂关联或与赋形剂不相关。

[0081] 在实施例中，本公开描述了包含如上所述的半抗原-hC缀合物的免疫原性组合物。该半抗原-hC缀合物可选地包括至少一个T细胞表位。免疫原性组合物包括至少一种药学上可接受的赋形剂。赋形剂可以是佐剂，其以治疗有效的方式用于改善或增强对半抗原-hC缀合物的免疫应答。免疫原性组合物可通过本文所述的任何途径为有需要的对象给药，以将有效量的药物组合物递送至有需要的对象。

[0082] 向对象给药本文所述的药物组合物和免疫原性组合物的剂量将随所治疗的病症的精确性质和治疗的接受者而变化。可以取决于各种因素由医师根据本领域公认的实践来进行用于人类给药的剂量比例的缩放。

[0083] 本文所述的药物组合物或免疫原性组合物可以是制剂。在实施例中，药物组合物或免疫原性组合物可以被配制用于立即释放或用于持续或缓慢释放。可以使用公知的技术制备这样的制剂。持续释放制剂可以含有分散在赋形剂基质中和/或包含在由速率控制膜包围的贮库中的半抗原-hC或试剂-hC缀合物。在这种制剂中使用的赋形剂是生物相容的和/或可生物降解的。该制剂提供相对恒定水平的活性成分释放。持续释放制剂中半抗原-hC或试剂-hC缀合物的含量取决于植入部位、释放速率和预期释放持续时间、以及要治疗或预防的疾病的性质。

[0084] 本公开还描述了具有单位剂量的本文所述的半抗原-hC或试剂-hC缀合物的试剂盒。这种试剂盒可以包括装有单位剂量的容器、其中包含使用试剂盒治疗或预防目的疾病或病症的说明的的信息性包装插页、以及可选地用于递送组合物的器具或装置。

[0085] 本文所述的方法包括治疗对象，例如人、兽医动物(狗、猫、爬行动物、鸟类等)、家

畜(马、牛、山羊、猪、鸡等)和研究动物(猴、大鼠、小鼠、鱼等)。需要治疗(有需要)的对象是患有需要使用疫苗或免疫原性组合物治疗的疾病或病症的对象,该疫苗或免疫原性组合物将在对象中诱导足以或治疗上有效治疗疾病或病症的对象的免疫应答。

[0086] 本文所述的方法还包括对有需要的对象的预防性治疗。本文所述的方法通过在对象中诱导足以或治疗上有效保护对象免受疾病或病症的免疫应答来保护对象免受疾病或病症。

[0087] 治疗包括给药有效量的半抗原-hC或试剂-hC缀合物,或者包括有效量的半抗原-hC或试剂-hC缀合物的组合物。“有效量”是在体内或体外导致期望的生理变化所必需的活性剂的量,例如半抗原-hC或试剂-hC或本文所述的组合物。治疗有效量包括提供有效量的那些。

[0088] 有效的疫苗含有能够在免疫后诱导先天性和适应性免疫应答的组分。尽管使用佐剂诱导先天免疫,但在实施例中,本文所述的hC是HhC,其含有图1所示的适应性B细胞表位。在表位缀合之后,六聚体-表位缀合物包含最少的外来序列,以针对B细胞表位产生更集中和更强的免疫应答。在实施例中,对于CD4+T细胞激活,六个螺旋中每个的N末端和C末端和/或HhC的核心含有招募辅助型T细胞、产生长寿命的浆细胞和高滴度/高亲和力抗体和引导稳健的免疫记忆应答所需的物种特异性CD4+T细胞表位。这些表位位于HhC的末端,因此它们不干扰半抗原偶联。选择它们以使其在B细胞表位偶联过程中不被半抗原化或不可控地交联。已经显示T细胞表位中的赖氨酸半抗原化大大降低了它们的活性和功能。来自许多不同物种的T细胞表位可以从IEDB数据库中获得,并且基于阳性T细胞和B细胞测定进行选择,包括MHC配体结合测定、招募辅助型T细胞的能力和诱导B细胞增殖。本文所述的疫苗技术的模块性质简化了疫苗构建体在物种之间的转移,因为如果靶向不同的疾病或病症,则替换T细胞表位和修饰B细胞表位是简单的事情。

[0089] 本文所述的HhC核心区域的独特优点是其降低的免疫原性(图2),这使非生产性或非保护性免疫优势表位的呈递最小化。因此,呈递多个B细胞表位与减少非生产性免疫优势表位的、以及呈递多个T细胞表位的组合产生了高度有效的疫苗。

[0090] 可以使用反向疫苗学方法设计半抗原,例如包含短肽(8-10个残基)、中等长度肽(10-40个残基)、合成长肽(SLP,40-100个残基)或肽或蛋白质的B细胞表位,以初步鉴定产生结合靶并抑制功能的抗体的半抗原。例如,抗体与丰富的病毒包膜糖蛋白的结合具有干扰病毒与宿主细胞表面受体结合的潜力,从而破坏病毒进入细胞。类似地,抗体与丰富的病原性细菌表面蛋白(例如外膜蛋白的细胞外部分)结合可抑制功能或抑制与宿主细胞表面受体的结合并防止细胞进入。已知的癌抗原蛋白或需要增强抗原性的那些蛋白(例如被免疫系统识别为“自身”的蛋白)是可以与HhC共价偶联的肽/蛋白的另一示例。一旦鉴定出候选肽或蛋白质,就在计算机上分析它们以鉴定线性表位。通过三维结构分析、同源性建模和结构表位预测软件来鉴定构象表位。许多公开可用的基于网络和服务器的软件程序可用于执行这些分析,并且我们还具有若干独立程序对表位鉴定和分析进行微调。据报道,反向疫苗学方法成功地使用了用于包括小分子半抗原在内的若干表位的三聚体卷曲螺旋支架。使用相同的方法来鉴定功能相关的细胞表面蛋白、胞质蛋白或传染物分泌因子上的连续和构象表位,以设计不仅能够诱导高滴度/高亲和力抗体而且能够产生能够中和、减少或消除宿主抗原的抗体的疫苗。

[0091] 使用完全合成的疫苗支架的优点很多。现代SPPS通常产生长度高达70-75个残基的肽。本文所述HhC的大小范围为55至65个残基,T细胞表位的长度定义HhC将比28-30个残基的核心区域长多少。共价偶联至HhC的肽表位大小不同,但最佳长度为10至50个残基,使得疫苗的全合成构建可行。在cGMP设施中生产千克量的疫苗肽可省去昂贵,耗时且资源密集的工业生产和重组蛋白的纯化,并且不需要随后进行病毒清除、内毒素去除或检测感染因子的存在。通常认为肽合成对于大规模疫苗生产来说太昂贵。然而,如果可以使用高纳克至低微克的剂量,肽疫苗都成本效益可以比重组亚基疫苗高出数倍。

[0092] 包括至少一种CPP的试剂-hC缀合物可以将试剂运输和递送至靶位点。本公开还描述了一种制备用于递送至靶位点的试剂的方法和一种将试剂递送至靶位点的方法。制备用于递送至靶位点的试剂的方法包括:制备用于递送试剂至靶位点的递送媒介物,其包括制备本文所述的肽,允许所述肽自组装成低聚物,以及将试剂缀合至低聚物。该方法还包括在自装配成低聚物之前将CPP缀合至肽,或将CPP缀合至低聚物。将试剂递送至靶位点的方法包括:在有需要的对象体内将试剂-hC缀合物递送至靶位点,以及在体外将试剂-hC缀合物递送至培养的细胞。

[0093] 术语“残基”和“氨基酸残基”在整个公开中可互换使用,以指“氨基酸”。

[0094] 如本领域普通技术人员将理解的,本文公开的每个实施例可以包括、基本上由或由其具体陈述的要素、步骤、成分或组分组成。因此,术语“包括”或“包含”应被解释为叙述:“包含、由或基本上由以下组成”。过渡术语“包含”或“含有”是指包括但不限于,并且允许包括未指定的元素、步骤、成分或组分,即使是大量也包括在内。过渡短语“由...组成”排除未指定的任何元件、步骤、成分或组件。过渡短语“基本上由...组成”将实施例的范围限制为指定的元件、步骤、成分或组件以及实质上不影响实施例的元件、步骤、成分或组件。在实施例中,缺乏实质效果由实施例在体外或体内执行功能的能力缺乏统计学上显着的降低来证明。

[0095] 此外,除非另有说明,否则在说明书和权利要求书中使用的表示成分、组分、反应条件等的数量的数字应理解为由术语“约”修饰,因此,除非有相反的指示,否则说明书和所附权利要求书中列出的数值参数是近似值,其可根据本文所呈现的主题寻求获得的期望特性而变化。至少,并且不试图将等同原则的应用限制于权利要求的范围,每个数字参数至少应根据所报告的有效数字的数目并通过应用普通的舍入技术来解释。尽管阐述本文所呈现的主题的宽范围的数值范围和参数是近似值,但在具体示例中阐述的数值尽可能精确地报告。然而,任何数值固有地包含必然由在它们各自的测试测量中发现的标准偏差引起的某些误差。

[0096] 当需要进一步清楚时,术语“约”具有本领域技术人员在与所述数值或范围结合使用时合理地赋予它的含义,即表示比所述数值或范围稍微大或稍微小:在所述数值的±20%的范围内;所述数值的±15%的范围内;所述数值的±10%的范围内;所述数值的±5%的范围内;所述数值的±4%的范围内;所述数值的±3%的范围内;所述数值的±2%的范围内;所述数值的±1%的范围内;或±所述数值的1%和20%之间的任何百分比。

[0097] 在描述本发明的上下文中(尤其是在所附权利要求的上下文中)使用的术语“一”、“一个”、“该”和类似指示物应被解释为覆盖单数和复数,除非本文另有指示或与上下文明显矛盾。

[0098] 本文中数值范围的列举仅旨在用作分别指代该范围内的每个单独的值的简捷方法。除非本文另有说明，否则每个单独的值都将并入说明书中，就像在本文中单独列举一样。应当理解的是，范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁，而不应当被解释为对本公开的范围的不灵活的限制。因此，范围的描述应被认为具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如，对范围如1至6的描述应被认为具体公开了子范围如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及该范围内的单个数值如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6，这与范围的宽度无关。

[0099] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾，否则本文所述的所有方法可以任何合适的顺序进行。

[0100] 本文提供的任何和所有实施例或示例性语言（例如，“例如”）的使用仅旨在更好地说明本发明，而不是对本发明的范围进行限制。说明书中的语言不应被解释为指示对本发明的实践必要的任何未要求保护的元素。

[0101] 本文公开的本发明的可选元件或实施例的分组不应被解释为限制。每个组成员可以单独地或与组的其他成员或本文中发现的其他元素任意组合地被引用和要求保护。可以预期，出于方便和/或专利性的原因，组的至少一个成员可以被包括在组中或从组中删除。当发生任何这样的包括或删除时，认为本说明书包含经修改的组，从而满足所附权利要求中使用的所有马库什基团的书面描述。

[0102] 以下实施例说明本发明提供的示例性方法。这些实施例不是为了限制本公开的范围，也不应被解释为限制本公开的范围。显然，除了本文具体描述的方法之外，可以实施所述方法。鉴于本文的教导，许多修改和变化是可能的，并且因此在本公开的范围内。

[0103] 实施例

[0104] 实施例1：自组装半抗原载体(hC)的合成

[0105] Hhc核心区域的长度为至少28-30个残基，并含有2-10个具有通式hwxhxyz (SEQ ID NO:19) 的七肽重复，其中h为疏水或非极性残基（例如，I、L、V、F、W、Y、G、A或M）；w是带正电荷、带负电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基（例如G、R、A、N、Q、H、S、D、K、T或E）；x是带负电荷、带正电荷、非极性脂肪族或极性不带电荷残基（例如，R、S、N、Q、A、G、T、D、E、K、H或C）；y是发生表位偶联的残基（例如，K、H、C、D、E、R、W、Y、Q或N）；以及z是带负电荷、带正电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基（例如A、D、H、S、E、R、N、Q、K或G）。设计w和z位置的碱性残基和酸性残基，使得在相邻螺旋之间发生盐桥或氢键相互作用以增加复合物的稳定性。

[0106] 使用凝胶过滤色谱法和/或非还原性PAGE确认六聚体的正确组装。这些分析表明高阶结构形成的程度。使用圆二色性来确认六聚体核心区域包含 α -螺旋。确定在不同温度和离液剂浓度下六聚体的 α -螺旋性质，以限定稳定性并确保赖氨酸暴露在溶剂中用于缀合反应。

[0107] 六聚体的CD谱在22°C至95°C的温度和0至6M的盐酸胍浓度下获得，用于限定单体肽的折叠/展开平衡以及六聚体作为温度和变性试剂的函数的稳定性，这两者都是表征基于肽的疫苗的稳定性的重要因素。

[0108] 进行实验以确认在单体水合后形成六聚体，阐明表位偶联的六聚体的溶解度，确定表位偶联的最大密度，并确认在表位偶联后六聚体结构得以维持。使用前述方案合成代表性肽SEQ ID NO:15。甲硫氨酸和天冬氨酸残基位于N末端，甲硫氨酸残基通过乙酰化保护

形成乙酰基-MD- (SEQ ID NO:15)。SPPS后,将肽冻干以储存。为了显示自组装,将肽溶解在1X PBS缓冲液中,在室温下温育5分钟,并使用购自Life Technologies的系统加载到Blue NativePAGENovexBis-Tris凝胶上。使用制造商的方案制备样品并电泳。图4示出该实验的结果。未组装的肽的大小为3.443kDa,因此六聚体的预期大小为20.7kDa。该实验清楚地显示六聚体的自组装,并且显示没有可检测的更高级结构或聚集体。因此,我们已经示出我们的计算机设计方案的效用,随后进行实验分析以证实功能。

[0109] 为了辅助鉴定B细胞表位序列,将全长抗原蛋白的氨基酸序列用于同源性建模和构象B细胞表位鉴定。获得同源性模型允许搜索构象B细胞表位,其通常产生更稳健的抗原肽序列。IEDB网站上的服务器(<https://www.iedb.org>)用于连续和构象表位预测。目前,仅有少数的网络服务器能够分析蛋白质的3D结构的表位。使用IEDB位点上的E11iPro和Discotope作为初始筛选。第三种独立程序称为PTools,其基于蛋白质表面上的静电去溶剂化电势预测表位,随后用于构象测定。这些软件程序已经证明对于预测三聚体卷曲螺旋半抗原载体上的表位特别准确。一旦在蛋白质上鉴定出抗原性最强的区域,就鉴定肽序列并分析其溶解性。因为20个残基或更长的肽序列倾向于形成可辨别的三级结构,所以选择至少10个残基长但少于40个残基的表位,更长的肽促进天然折叠并具有向免疫系统呈递结构表位的最大潜力。合成肽并在N末端保护(例如乙酰化)并具有适于共价偶联的C末端残基,例如半胱氨酸。六聚体半抗原载体上的赖氨酸残基用异双功能交联剂磺基-SIAB(磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)衍生化,随后加入含有C末端半胱氨酸残基的肽。通过向反应中加入三(2-羧乙基)膦还原半胱氨酸巯基。用巯基反应性基团(碘乙酰基)衍生化赖氨酸的独特优点是它防止六聚体彼此交联(六聚体不含半胱氨酸残基)。

[0110] 实施例2:通过六聚体-表位缀合构建疫苗

[0111] 在每个六聚体载体上有多达24个偶联位点用于半抗原偶联(图1),但由于空间位阻,缀合不可能发生在所有位点上。先前已经表明,用半抗原饱和载体并不总是产生最强烈的免疫应答,并且在偶联密度、表位空间/空间可用性(对于正确的B细胞表位呈递)和抗体滴度之间存在折中。因此,对于每个选择的表位,进行三个单独的六聚体缀合反应以获得具有不同表位加载水平的缀合物。例如,一个反应用3-5摩尔当量进行,使得仅3或4个肽被缀合,另一个反应含有8至10摩尔当量以形成与6-10个肽的缀合物,并且第三个反应使用25-50摩尔当量进行以偶联尽可能多的表位(饱和条件)。

[0112] 图3示出肽缀合过程。设计肽以使N末端残基乙酰化,从而保护N末端胺不被交联剂衍生化。C末端添加了残基以调节pI,如果需要(例如调节等电点),添加残基以进行基于荧光的肽定量(W),以及添加巯基以用于缀合特异性(C)。六聚体载体的pI为10.1,因此具有高pI(例如>8.5)的肽的偶联效率可能由于电荷排斥而降低。将至少一个酸性残基添加到C末端以减少碱性肽的pI,直到其具有净负电荷并被吸引到六聚体。如果肽的pI是酸性或中性的,那么G或S残基取代D残基,并单独作为间隔区。

[0113] 色氨酸荧光、凝胶过滤层析、非还原性PAGE和SELDI-TOF(理想地适用于测定蛋白质-肽缀合物的分子量的MALDI样MS仪器)是我们用于定量肽表位偶联效率的方法。计算与六聚体载体和BSA缀合的肽的数目是相对简单的。因为KLH如此之大,所以在不计算缀合的肽的确切数量的情况下,仅可能证实成功的缀合。

[0114] 鉴定HhC疫苗构建体

[0115] 辅料:为了增强适应性B细胞和T细胞应答,调节保护性免疫的程度,并使抗原特异性抗体应答最大化,佐剂用于所有免疫。最佳佐剂直接刺激树突细胞成熟,并且引导这种成熟的最有效方式是通过TLR介导的激活。合成的基于TLR4的佐剂是一些最有效的佐剂,因此测试了这些佐剂中的至少两种。单磷酰脂A (MPL) 是有效的TLR4激动剂 (Persing等2002; Evans等2003; Singh和Srivastava 2003; Pfar等2012; Del Giudice等2018), 其将作为我们的主要佐剂起作用。MPL用角鲨烯 (Sq) (Ciabattini等2018; Seydoux等2018) 乳化形成MPL-Sq。乳剂有效地引发CD4T细胞,这对于诱导记忆和长寿命抗体应答是重要的。我们还将测试佐剂E6020和GLA,两者都被批准用于人。所有佐剂将有助于CD4+诱导的抗原摄取进入树突细胞并诱导表位特异性Th1 CD4+T细胞。为了评估佐剂功能,在免疫小鼠血清中定量CD4+T细胞和IgG同种型类别转换。佐剂的另一个重要益处是抗原剂量节省的高可能性,这也是将被测试的。节省剂量将减少每次免疫的抗原量,并增加可从合成肽批次获得的剂量数量,并且是降低合成疫苗制造成本的关键决定因素。

[0116] 对于每个六聚体表位缀合物,进行至少三组实验。小鼠接受初免-加强免疫 (IM), 在指定时间测量B细胞和T细胞功能。在第一个实验中,比较疫苗的三个剂量水平以确定在哪个水平获得最大滴度。六聚体最大限度地负载肽表位,并在免疫前用MPL-Sq佐剂配制。在0.1、1和10的三个剂量水平(根据IgG效价测试和优化),该实验还通过测量对单独的六聚体、单独的肽表位和六聚体+肽表位(未缀合但组合)的IgG应答来测试六聚体-表位缀合物的特异性。

[0117] 小鼠免疫:近交小鼠 (10/grp) 接受用佐剂化六聚体-肽表位缀合物或对照 (KLH-肽表位) 的初免/加强免疫。第一组研究提供了最佳六聚体肽表位剂量,并测量针对未缀合的六聚体载体和游离肽的抗体滴度以证实特异性。在初免和加强免疫(D35)后14天收集血清,并测量抗体中点滴度。小鼠血液用于进行B细胞和T细胞测定。

[0118] B细胞功能:通过测定收集的小鼠血清中的抗原特异性抗体滴度,使用标准ELISA测定疫苗效力。ELISA板用肽表位-BSA缀合物包被,制备封闭缓冲液中8个连续10倍稀释(1:103至1:1010)的血清,并加入ELISA板孔中。加入HRP标记的抗小鼠二抗,用比色底物显色平板,在ELISA平板读数器中测定。绘制数据,曲线拟合,并使用Prism Graph Pad软件进行统计分析,以计算中点和终点滴度。

[0119] T细胞功能:通过已建立的T细胞ELISA试验测定T细胞表位和佐剂功能。市售的包被试剂和一/二抗是根据制造商的方案购买和使用的。IFN- γ , IL-2, IL-4和TNF- α 在小鼠血清中定量为T细胞功能的读数,这些靶可以容易地扩展为包括T细胞功能的其它标记,包括IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p70和IL-13,通过ELISA使用对总IgG, IgG1和IgG2a特异的试剂测定疫苗诱导的T细胞依赖性同种型类别转换。

[0120] 疫苗安全性:在非GLP环境中进行安全性的初始评估以确保小鼠对疫苗组分(合成肽、六聚体载体、佐剂)没有不良反应。在GLP研究的后期进行更精确和详细的安全性研究,但是这种初步评价提供了一些重要的读数以指导疫苗剂量、佐剂剂量和免疫接种方案。通过观察注射部位反应和炎症迹象以及小鼠行为(例如嗜睡迹象)来评价潜在的局部和全身毒性。如果观察到毒性,则评价不同的佐剂和/或T细胞表位。

[0121] 本文描述了本发明的某些实施例,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。当然,在阅读了前述说明书之后,这些描述的实施例的变型对于本领域的普通技术人员

将变得显而易见。发明人预期本领域技术人员适当地采用这些变化，并且发明人希望本发明以不同于本文具体描述的方式实践。因此，本发明包括适用法律所允许的所附权利要求中所述主题的所有修改和等同物。此外，本发明包括上述元件在其所有可能变化中的任何组合，除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。

[0122] 上述主题仅通过说明的方式提供，而不应被解释为限制。在不遵循所示出和描述的示例实施例和应用并且不脱离在所附权利要求中阐述的本公开的真实精神和范围的情况下，可以对本文描述的主题做出各种修改和改变。

[0123] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用整体并入本文，如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指示通过引用并入。虽然已经根据各种实施例描述了前述内容，但是本领域技术人员将理解，在不背离其精神的情况下，可以进行各种修改、替换、省略和改变。

[0124] 参考文献

[0125] Betakova,T.,D.Svetlikova and M.Gocnik,2013Overview of measles and mumps vaccine:origin,present,and future of vaccine production.Acta Virol 57: 91-96.

[0126] Bill,R.M.,2015Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes:a role for yeast?J Pharm Pharmacol 67:319-328.

[0127] Buckland,B.C.,2015the development and manufacture of influenza vaccines.Hum Vaccin Immunother 11:1357-1360.

[0128] Butler,M.,and M.Spearman,2014the choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering.Curr Opin Biotechnol 30:107-112.

[0129] Chou,M.L.,A.Bailey,T.Avory,J.Tanimoto and T.Burnouf,2015Removal of transmissible spongiform encephalopathy prion from large volumes of cell culture media supplemented with fetal bovine serum by using hollow fiber anion-exchange membrane chromatography.PLoS One 10:e0122300.

[0130] Ciabattini,A.,E.Pettini,F.Fiorino,S.Lucchese,G.Pastore et al., 2018Heterologous Prime-Boost Combinations Highlight the Crucial Role of Adjuvant in Priming the Immune System.Front Immunol 9:380.

[0131] Clark,T.G.,and D.Cassidy-Hanley,2005Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints.Dev Biol (Basel) 121:153-163.

[0132] Corradin,G.,N.Cespedes,A.Verdini,A.V.Kajava,M.Arevalo-Herrera et al., 2012Malaria vaccine development using synthetic peptides as a technical platform.Adv Immunol 114:107-149.

[0133] Corradin,G.,A.V.Kajava and A.Verdini,2010Long synthetic peptides for the production of vaccines and drugs:a technological platform coming of age.Sci Transl Med2:50rv53.

[0134] Del Giudice,G.,R.Rappuoli and A.M.Didierlaurent,2018Correlates of adjuvanticity:A review on adjuvants in licensed vaccines.Semin Immunol.

[0135] Evans,J.T.,C.W.Cluff,D.A.Johnson,M.J.Lacy,D.H.Persing et al.,

2003 Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. Expert Rev Vaccines 2:219-229.

[0136] Fiorucci,S.,and M.Zacharias,2010 Prediction of protein-protein interaction sites using electrostatic desolvation profiles.Biophys J 98:1921-1930.

[0137] Fiorucci,S.,and M.Zacharias,2014 Computational antigenic epitope prediction by calculating electrostatic desolvation penalties of protein surfaces.Methods Mol Biol 1184:365-374.

[0138] Genzel,Y.,2015 Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?

[0139] Biotechnol J 10:728-740.

[0140] Grein,T.A.,R.Michalsky and P.Czermak,2014 Virus separation using membranes.Methods Mol Biol 1104:459-491.

[0141] Haste Andersen,P.,M.Nielsen and O.Lund,2006 Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures.Protein Sci 15: 2558-2567.

[0142] Hermanson,G.T.,2013a Chapter 2-Functional Targets for Bioconjugation, pp.127-228 in Bioconjugate Techniques(Third Edition) ,edited by G.T.Hermanson.Academic Press,Boston.

[0143] Hermanson,G.T.,2013b Chapter 6-Heterobifunctional Crosslinkers, pp.299-339 in Bioconjugate Techniques(Third Edition) ,edited by G.T.Hermanson.Academic Press,Boston.

[0144] Hu,Y.C.,2005 Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells.ActaPharmacol Sin 26:405-416.

[0145] Hu,Y.C.,K.Yao and T.Y.Wu,2008 Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens.Expert Rev Vaccines 7:363-371.

[0146] Jespersen,M.C.,B.Peters,M.Nielsen and P.Marcatili,2017 BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes.Nucleic Acids Res 45:W24-W29.

[0147] Josefsberg,J.O., and B.Buckland ,2012 Vaccine process technology.BiotechnolBioeng 109:1443-1460.

[0148] Kawakami,K.,and R.K.Puri,2004 Regulatory expectations during product development for tumour vaccines.Dev Biol(Basel)116:53-59;discussion 69-76.

[0149] Khan,A.,S.Datta,S.C.Das,T.Ramamurthy,J.Khanam et al.,2003 Shiga toxin producing Escherichia coli infection:current progress&future challenges.Indian J Med Res 118:1-24.

[0150] Kim,H.J.,and H.J.Kim,2017 Yeast as an expression system for producing virus-like particles:what factors do we need to consider?Lett Appl Microbiol 64:111-123.

- [0151] Kost,T.A.,and C.W.Kemp,2016 Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications.
- [0152] Adv Exp Med Biol 896:187-197.
- [0153] Legastelois,I.,S.Buffin,I.Peubez,C.Mignon,R.Sodoyer et al.,2017Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules.Hum Vaccin Immunother 13:947-961.
- [0154] Miller,K.D.,R.Roque and C.H.Clegg,2014 Novel Anti-Nicotine Vaccine Using a Trimeric Coiled-Coil Hapten Carrier.PLoS One 9:e114366.
- [0155] Nielsen,J.,2013 production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering.Bioengineered 4:207-211.
- [0156] Olugbile,S.,C.Habel,C.Servis,F.Spertini,A.Verdini et al.,2010 Malaria vaccines-the long synthetic peptide approach:Technical and conceptual advancements.Curr Opin Mol Ther 12:64-76.
- [0157] Perez,S.A.,E.von Hofe,N.L.Kallinteris,A.D.Gritzapis,G.E.Peoples et al.,2010 A new era in anticancer peptide vaccines.Cancer 116:2071-2080.
- [0158] Persing,D.H.,R.N.Coler,M.J.Lacy,D.A.Johnson,J.R.Baldridge et al.,2002Taking toll:lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators.Trends Microbiol 10:S32-37.
- [0159] Pfaar,O.,D.Cazan,L.Klimek,D.Larenas-Linnemann and M.A.Calderon,2012Adjuvants for immunotherapy.Curr Opin Allergy Clin Immunol 12:648-657.
- [0160] Pietersz,G.A.,D.S.Pouniotis and V.Apostolopoulos,2006 Design of peptide-based vaccines for cancer.Curr Med Chem 13:1591-1607.
- [0161] Ponomarenko,J.,H.H.Bui,W.Li,N.Fusseder,P.E.Bourne et al.,2008 ElliPro:a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes.BMC Bioinformatics 9:514.
- [0162] Roohvand,F.,M.Shokri,M.Abdollahpour-Alitappeh and P.Ehsani,2017Biomedical applications of yeast-a patent view,part one:yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines.Expert Opinther Pat 27:929-951.
- [0163] Rowland,S.S.,R.L.Mayner and L.Barker,2005 Advancing TB vaccines to Phase I clinical trials in the US:regulatory/manufacturing/licensing issues.Tuberculosis(Edinb)85:39-46.
- [0164] Safdar,A.,and M.M.Cox,2007 Baculovirus-expressed influenza vaccine.A novel technology for safe and expeditious vaccine production for human use.Expert OpinInvestig Drugs 16:927-934.
- [0165] Sari,D.,K.Gupta,D.B.ThimirGovinda Raj,A.Aubert,P.Drncova et al.,2016theMultiBacBaculovirus/Insect Cell Expression Vector System for producing Complex Protein Biologics.Adv Exp Med Biol 896:199-215.
- [0166] Seydoux,E.,H.Liang,N.Dubois Cauwelaert,M.Archer,N.D.Rintala et al.,

- 2018 Effective Combination Adjuvants Engage Both TLR and Inflammasome Pathways To Promote Potent Adaptive Immune Responses. *J Immunol* 201:98-112.
- [0167] Singh,M.,and I.Srivastava,2003 Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases. *Curr HIV Res* 1:309-320.
- [0168] Smith,L.A.,M.J.Jensen,V.A.Montgomery,D.R.Brown,S.A.Ahmed et al., 2004 Roads from vaccines to therapies. *MovDisord* 19 Suppl 8:S48-52.
- [0169] Tapia,F.,I.Jordan,Y.Genzel and U.Reichl,2017 Efficient and stable production of Modified Vaccinia Ankara virus in two-stage semi-continuous and in continuous stirred tank cultivation systems. *PLoS One* 12:e0182553.
- [0170] Thomson,A.R.,C.W.Wood,A.J.Burton,G.J.Bartlett,R.B.Sessions et al., 2014 Computational design of water-soluble alpha-helical barrels. *Science* 346: 485-488.
- [0171] van Oers,M.M.,2006 Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res* 68:193-253.
- [0172] Vlak,J.M.,and R.J.Keus,1990 Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines. *AdvBiotechnol Processes* 14:91-128.
- [0173] Warnock,J.N.,and M.Al-Rubeai,2006 Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *BiotechnolApplBiochem* 45: 1-12.
- [0174] Wood,C.W.,J.W.Heal,A.R.Thomson,G.J.Bartlett,A.A.Ibarra et al., 2017 ISAMBARD:an open-source computational environment for biomolecular analysis,modelling and design. *Bioinformatics* 33:3043-3050.
- [0175] Wood,C.W.,and D.N.Woolfson,2018 CCBUILDER 2.0:Powerful and accessible coiled-coil modeling. *Protein Sci* 27:103-111.
- [0176] Wu,Y.,and J.H.Collie,2017 alpha-Helical coiled-coil peptide materials for biomedical applications. *Wiley Interdiscip Rev NanomedNanobiotechnol* 9.
- [0177] Yamada,A.,T.Sasada,M.Noguchi and K.Itoh,2013 Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci* 104:15-21.
- [0178] Zaccai,N.R.,B.Chi,A.R.Thomson,A.L.Boyle,G.J.Bartlett et al.,2011 A de novo peptide hexamer with a mutable channel. *Nat Chem Biol* 7:935-941.
- [0179] Geysen et al.,*J.Immun.Meth.*102:259-274(1987)
- [0180] Miranda et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:1181-86(1999)
- [0181] Merrifield,*J.Am.Chem.Soc.*85:2149-2154(1963))
- [0182] Altschul,S.F.et al.,*J.Mol.Biol.*215:403-410(1990)
- [0183] Pearson and Lipman,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85;2444-2448(1988)
- [0184] BLAST Manual,Altschul,S.,et al.,NCBI NLM NIH Bethesda,Md.)

- [0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> Amplicon Vaccine, LLC
[0003] <120> 自组装肽支架
[0004] <130> A070-0003PCT
[0005] <150> US 62/697,132
[0006] <151> 2018-07-12
[0007] <160> 20
[0008] <170> PatentIn version 3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 7
[0011] <212> PRT
[0012] <213> 人工序列
[0013] <220>
[0014] <223> 七肽
[0015] <400> 1
[0016] Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp
[0017] 1 5
[0018] <210> 2
[0019] <211> 7
[0020] <212> PRT
[0021] <213> 人工序列
[0022] <220>
[0023] <223> 七肽
[0024] <400> 2
[0025] Leu Arg Ser Ile Gly Arg Asp
[0026] 1 5
[0027] <210> 3
[0028] <211> 7
[0029] <212> PRT
[0030] <213> 人工序列
[0031] <220>
[0032] <223> 七肽
[0033] <400> 3
[0034] Ile Arg Glu Ile Ser Arg Ala
[0035] 1 5
[0036] <210> 4
[0037] <211> 7
[0038] <212> PRT

- [0039] <213> 人工序列
[0040] <220>
[0041] <223> 七肽
[0042] <400> 4
[0043] Ile Arg Glu Val Ala Gln Ser
[0044] 1 5
[0045] <210> 5
[0046] <211> 7
[0047] <212> PRT
[0048] <213> 人工序列
[0049] <220>
[0050] <223> 七肽
[0051] <400> 5
[0052] Ile Arg Asp Ile Ala Lys Ala
[0053] 1 5
[0054] <210> 6
[0055] <211> 7
[0056] <212> PRT
[0057] <213> 人工序列
[0058] <220>
[0059] <223> 七肽
[0060] <400> 6
[0061] Ile Arg Asp Ile Gly Arg Ala
[0062] 1 5
[0063] <210> 7
[0064] <211> 7
[0065] <212> PRT
[0066] <213> 人工序列
[0067] <220>
[0068] <223> 七肽
[0069] <400> 7
[0070] Ile Arg Asp Val Gly Gln Ser
[0071] 1 5
[0072] <210> 8
[0073] <211> 7
[0074] <212> PRT
[0075] <213> 人工序列
[0076] <220>
[0077] <223> 七肽

- [0078] <400> 8
- [0079] Ile Arg Asp Leu Ala Lys Gly
- [0080] 1 5
- [0081] <210> 9
- [0082] <211> 7
- [0083] <212> PRT
- [0084] <213> 人工序列
- [0085] <220>
- [0086] <223> 七肽
- [0087] <400> 9
- [0088] Val Lys Asp Val Ala Arg Gly
- [0089] 1 5
- [0090] <210> 10
- [0091] <211> 7
- [0092] <212> PRT
- [0093] <213> 人工序列
- [0094] <220>
- [0095] <223> 七肽
- [0096] <400> 10
- [0097] Ile Arg Asp Ile Gly Asn Ser
- [0098] 1 5
- [0099] <210> 11
- [0100] <211> 7
- [0101] <212> PRT
- [0102] <213> 人工序列
- [0103] <220>
- [0104] <223> 七肽
- [0105] <400> 11
- [0106] Ile Lys Asp Leu Ala Arg Gly
- [0107] 1 5
- [0108] <210> 12
- [0109] <211> 7
- [0110] <212> PRT
- [0111] <213> 人工序列
- [0112] <220>
- [0113] <223> 七肽
- [0114] <400> 12
- [0115] Ile Lys Lys Leu Lys Lys Lys
- [0116] 1 5

- [0117] <210> 13
[0118] <211> 28
[0119] <212> PRT
[0120] <213> 人工序列
[0121] <220>
[0122] <223> 六聚体
[0123] <400> 13
[0124] Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg
[0125] 1 5 10 15
[0126] Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp
[0127] 20 25
[0128] <210> 14
[0129] <211> 29
[0130] <212> PRT
[0131] <213> 人工序列
[0132] <220>
[0133] <223> 六聚体
[0134] <400> 14
[0135] Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg
[0136] 1 5 10 15
[0137] Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp Ser
[0138] 20 25
[0139] <210> 15
[0140] <211> 28
[0141] <212> PRT
[0142] <213> 人工序列
[0143] <220>
[0144] <223> 六聚体
[0145] <400> 15
[0146] Leu Arg Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg Ser Ile Gly Arg Asp Leu Arg
[0147] 1 5 10 15
[0148] Ser Ile Gly Lys Asp Leu Arg Ser Ile Gly Arg Asp
[0149] 20 25
[0150] <210> 16
[0151] <211> 28
[0152] <212> PRT
[0153] <213> 人工序列
[0154] <220>
[0155] <223> 六聚体

- [0156] <400> 16
- [0157] Ile Arg Glu Ile Ser Arg Ala Ile Arg Glu Val Ala Gln Ser Ile Arg
- [0158] 1 5 10 15
- [0159] Asp Ile Ala Lys Ala Ile Arg Glu Ile Gly Lys Ser
- [0160] 20 25
- [0161] <210> 17
- [0162] <211> 28
- [0163] <212> PRT
- [0164] <213> 人工序列
- [0165] <220>
- [0166] <223> 六聚体
- [0167] <400> 17
- [0168] Ile Arg Asp Ile Gly Arg Ala Ile Arg Asp Val Gly Gln Ser Ile Arg
- [0169] 1 5 10 15
- [0170] Asp Leu Ala Lys Gly Ile Arg Asp Ile Ser Lys Gly
- [0171] 20 25
- [0172] <210> 18
- [0173] <211> 28
- [0174] <212> PRT
- [0175] <213> 人工序列
- [0176] <220>
- [0177] <223> 六聚体
- [0178] <400> 18
- [0179] Val Lys Asp Val Ala Arg Gly Ile Arg Asp Ile Gly Asn Ser Ile Lys
- [0180] 1 5 10 15
- [0181] Asp Leu Ala Arg Gly Ile Arg Asp Ile Gly Arg Gly
- [0182] 20 25
- [0183] <210> 19
- [0184] <211> 7
- [0185] <212> PRT
- [0186] <213> 人工序列
- [0187] <220>
- [0188] <223> 七肽模式
- [0189] <220>
- [0190] <221> MISC_FEATURE
- [0191] <222> (1) .. (1)
- [0192] <223> Xaa 是疏水或非极性残基
- [0193] <220>
- [0194] <221> MISC_FEATURE

- [0195] <222> (2) .. (2)
- [0196] <223> Xaa是带正电荷、带负电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基
- [0197] <220>
- [0198] <221> MISC_FEATURE
- [0199] <222> (3) .. (3)
- [0200] <223> Xaa 是带负电荷、带正电荷、非极性脂族或极性不带电荷残基
- [0201] <220>
- [0202] <221> MISC_FEATURE
- [0203] <222> (4) .. (4)
- [0204] <223> Xaa 是疏水或非极性残基
- [0205] <220>
- [0206] <221> MISC_FEATURE
- [0207] <222> (5) .. (5)
- [0208] <223> Xaa 是带负电荷、带正电荷、非极性脂族残基或极性不带电荷
- [0209] <220>
- [0210] <221> MISC_FEATURE
- [0211] <222> (6) .. (6)
- [0212] <223> Xaa是用于与半抗原或任何其它分子表位偶联的任何天然或非天然残基
- [0213] <220>
- [0214] <221> MISC_FEATURE
- [0215] <222> (7) .. (7)
- [0216] <223> Xaa是带负电荷、带正电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基
- [0217] <400> 19
- [0218] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0219] 1 5
- [0220] <210> 20
- [0221] <211> 7
- [0222] <212> PRT
- [0223] <213> 人工序列
- [0224] <220>
- [0225] <223> 肽
- [0226] <220>
- [0227] <221> MISC_FEATURE
- [0228] <222> (1) .. (1)
- [0229] <223> Xaa 是疏水或非极性残基
- [0230] <220>
- [0231] <221> MISC_FEATURE
- [0232] <222> (1) .. (7)
- [0233] <223> 该序列整体重复n次,其中,n是大于1的整数

- [0234] <220>
- [0235] <221> MISC_FEATURE
- [0236] <222> (2) .. (2)
- [0237] <223> Xaa是带正电荷、带负电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基
- [0238] <220>
- [0239] <221> MISC_FEATURE
- [0240] <222> (3) .. (3)
- [0241] <223> Xaa是带负电荷、带正电荷、非极性脂族或极性不带电荷残基
- [0242] <220>
- [0243] <221> MISC_FEATURE
- [0244] <222> (4) .. (4)
- [0245] <223> Xaa 是疏水或非极性残基
- [0246] <220>
- [0247] <221> MISC_FEATURE
- [0248] <222> (5) .. (5)
- [0249] <223> Xaa是带负电荷、带正电荷、非极性脂族或极性不带电荷残基
- [0250] <220>
- [0251] <221> MISC_FEATURE
- [0252] <222> (6) .. (6)
- [0253] <223> Xaa是用于与半抗原或任何其它分子表位偶联的任何天然或非天然残基
- [0254] <220>
- [0255] <221> MISC_FEATURE
- [0256] <222> (7) .. (7)
- [0257] <223> Xaa是带负电荷、带正电荷、极性不带电荷或非极性脂族残基
- [0258] <400> 20
- [0259] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0260] 1 5

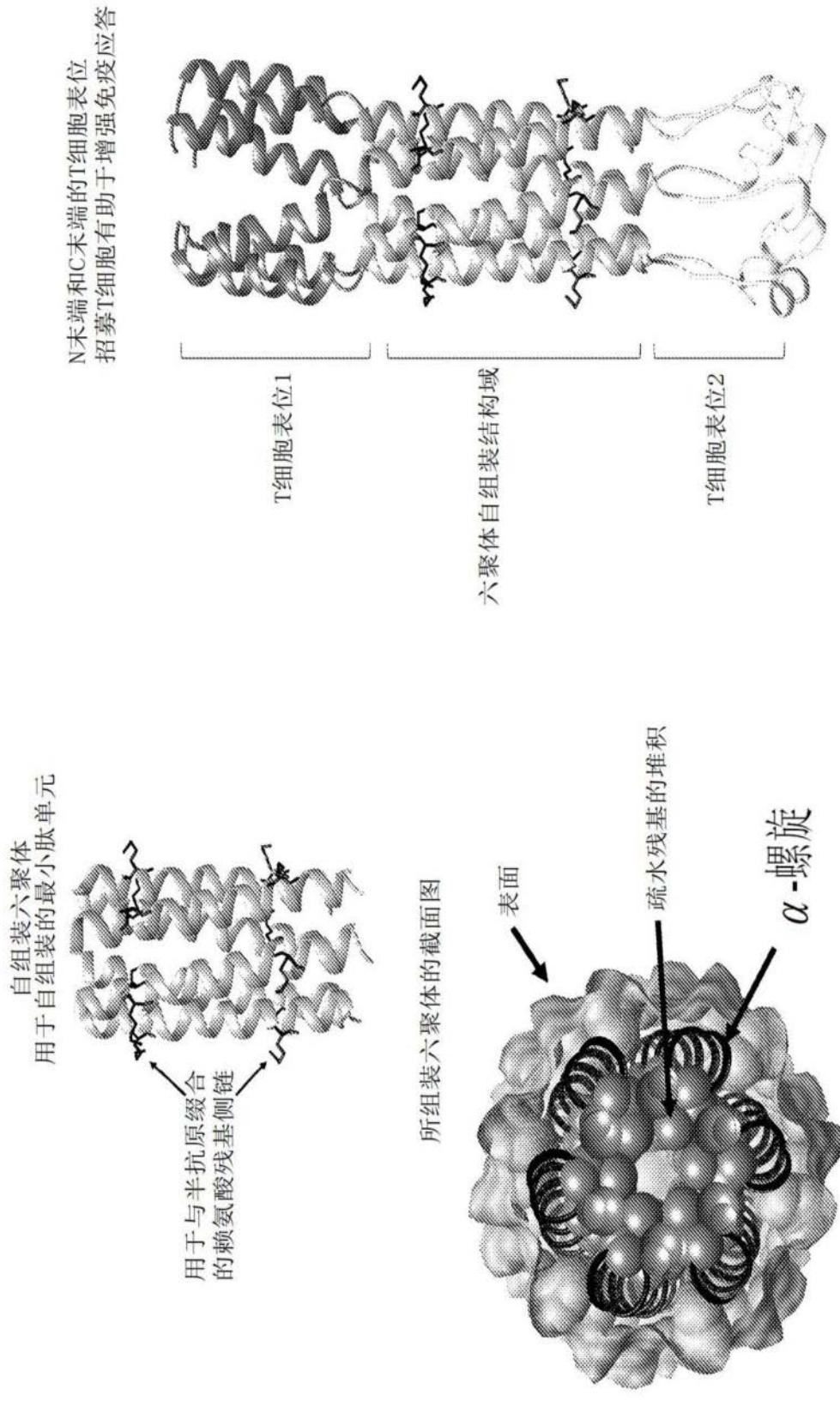


图1

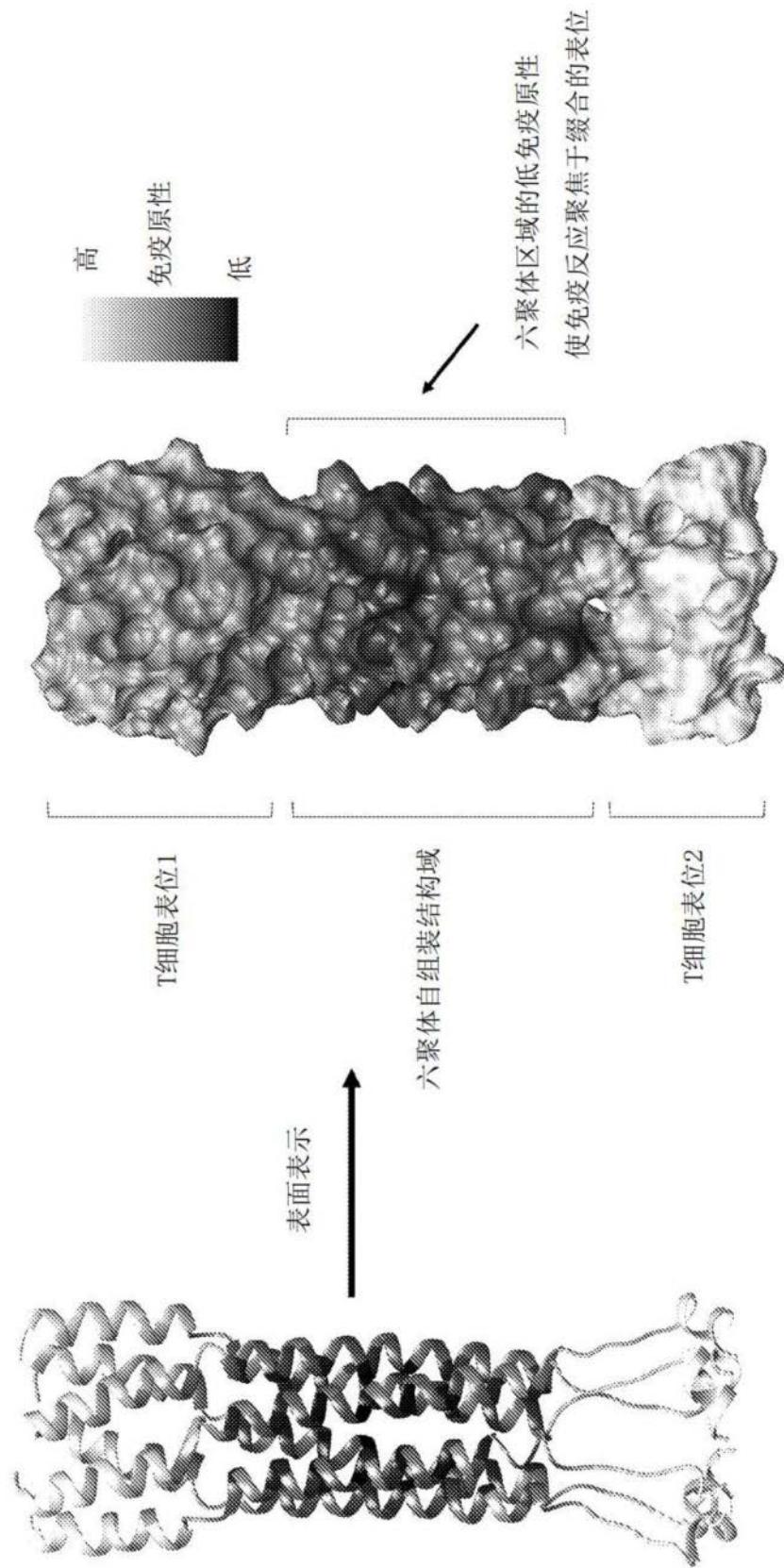


图2

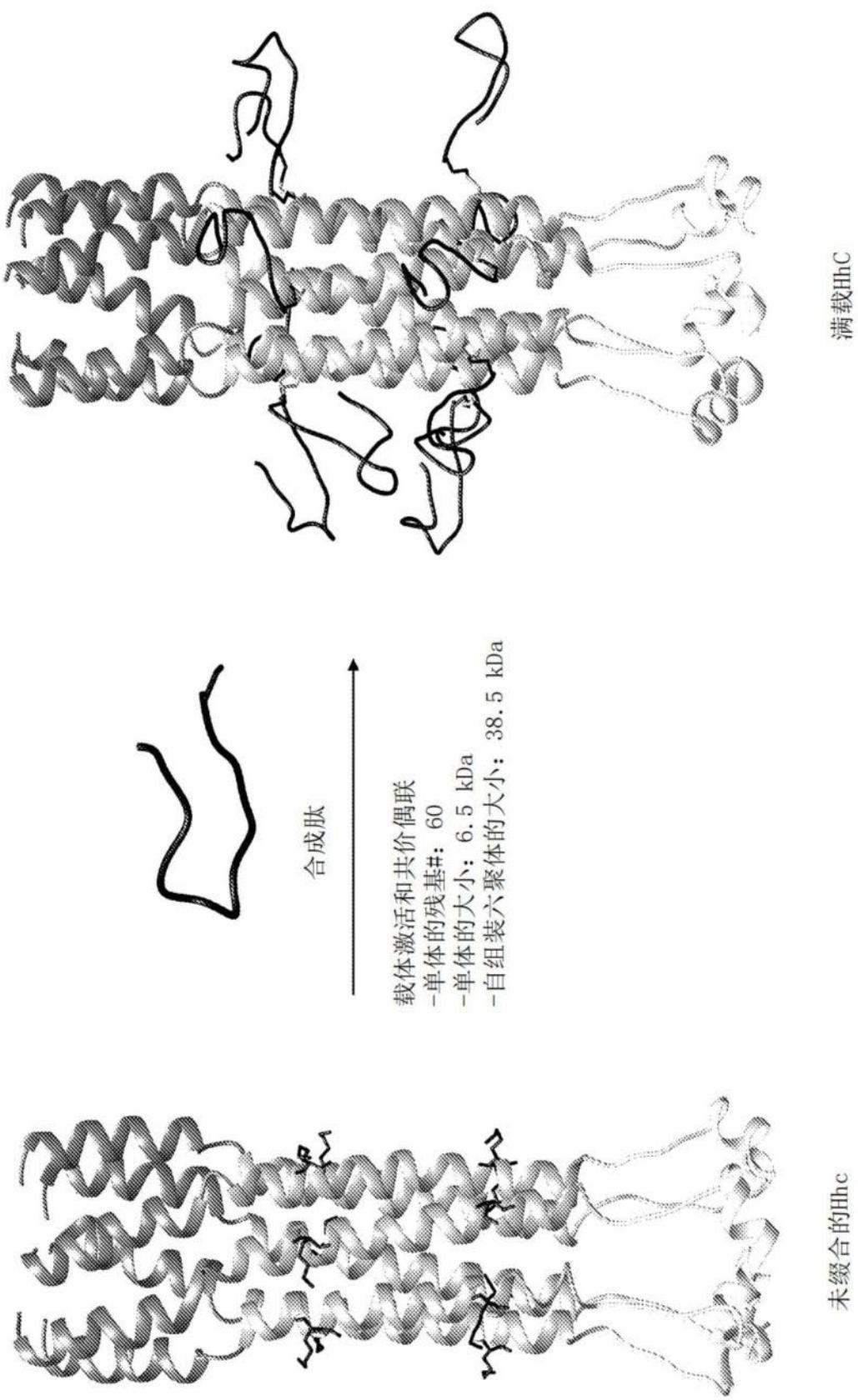


图3

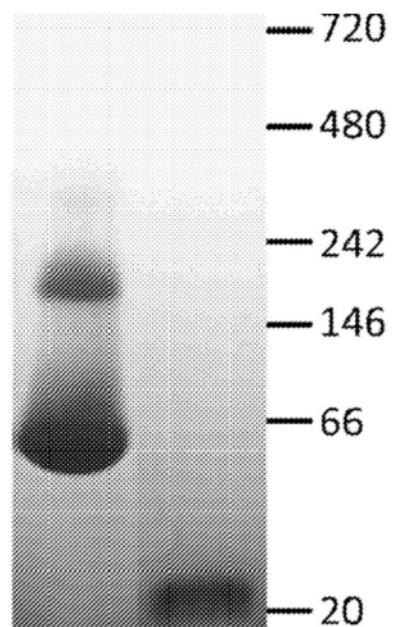


图4