



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0108754
 (43) 공개일자 2018년10월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/015 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/015 (2013.01)
A61K 2039/5256 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7024980
- (22) 출원일자(국제) 2017년02월13일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년08월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/017722
- (87) 국제공개번호 WO 2017/142843
 국제공개일자 2017년08월24일
- (30) 우선권주장
 62/296,464 2016년02월17일 미국(US)

- (71) 출원인
 캠리스 인터내셔널, 인코포레이티드
 미국, 메릴랜드 20814, 베데스다, 스위트 1600, 3
 베데스다 메트로 센터
- (72) 발명자
 아귀아 조아오 카를로스
 미국, 메릴랜드 20854, 포토맥, 10409 오버게이트
 플레이스
- (74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 말라리아 백신에 사용하기 위한 신규 항원

(57) 요 약

본 발명은 말라리아 기생충의 전-적혈구기에서 발현되는 항원으로서 유용한 폴리펩티드를 제공한다. 상기 항원은 백신 제제 내 항원으로 투여함으로써 또는 백신 제제로 전달되는 DNA 또는 기타 재조합 단백질 발현 시스템 내에서 항원을 발현함으로써 포유류에서 말라리아에 대한 면역 반응 및 멸균 보호를 유도하는데 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

C12N 2710/10043 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

말라리아로부터 포유류를 보호하기 위한 면역원성 조성물로서,

재조합 폴리펩티드로서, 상기 재조합 폴리펩티드는 서열번호 3, 서열번호 6, 및 그의 유도체의 아미노산 서열 중 하나를 포함하며, 상기 유도체는 서열번호 3 및 서열번호 6 중 하나의 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 서열번호 3 및 서열번호 6 중 하나와 85%의 동일성을 갖는 재조합 폴리펩티드;

약학적으로 허용가능한 담체; 및

항원보강제(adjuvant)를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

말라리아로부터 포유류를 보호하기 위한 면역원성 조성물로서,

약학적으로 허용가능한 담체 내의 2 이상의 재조합 폴리펩티드의 조합으로서, 상기 2 이상의 재조합 폴리펩티드 중 첫번째는 서열번호 3 및 그의 유도체의 아미노산 서열 중 하나를 포함하고, 상기 유도체는 서열번호 3과 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 서열번호 3과 85%의 동일성을 갖는 조합;

약학적으로 허용가능한 담체; 및

항원보강제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 2 이상의 재조합 폴리펩티드 중 두번째는 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 및 그의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 유도체는 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 및 서열번호 9 중 하나의 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 및 서열번호 9 중 하나와 85%의 동일성을 갖는, 면역원성 조성물.

청구항 4

포유류에서 말라리아에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로,

서열번호 3, 서열번호 6, 및 그의 유도체의 아미노산 서열 중 하나에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하는 면역학적으로 유효한 양의 조성물을 상기 포유류에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 유도체는 서열번호 3, 및 서열번호 6 중 하나의 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 서열번호 3, 및 서열번호 6 중 하나와 85%의 동일성을 갖는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 방법은 말라리아에 대한 1 이상의 일차 면역 또는 증강 예방 주사를 포유류에 투여하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 일차 면역 및 증강 예방 주사는 면역학적으로 유효한 양의 재조합 폴리펩티드를 포함하고, 상기 재조합 폴리펩티드는 서열번호 3, 서열번호 6 및 그의 유도체의 아미노산 서열 중 하나를 포함하며, 상기 유도체는 서열번호 3, 및 서열번호 6 중 하나의 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 서열번호 3, 및 서열번호 6 중 하나와 85%의 동일성을 갖는, 방법.

청구항 7

폴리펩티드의 발현을 위한 적절한 발현 벡터를 포유류에 도입함으로써 면역학적으로 유효한 양의 제1항의 조성물을 포유류에 투여하는 방법으로서, 상기 적절한 발현 벡터는 플라스미드, 복제 바이러스 벡터, 및 비복제 바

이러스 벡터로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 재조합 폴리펩티드는 플라스미드, 복제 바이러스 벡터, 및 비복제 바이러스 벡터로 이루어지는 군에서 선택되는 적절한 발현 벡터에 의해 발현되는, 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 재조합 폴리펩티드는 DNA 플라스미드, 배클로바이러스, VSV, MVA, GC46, 알파바이러스 레플리콘, 아데노바이러스, 수두바이러스, 아데노 연관 바이러스, 거대세포바이러스, 개 디스템퍼 바이러스, 황열 (yellow fever) 바이러스, 레트로바이러스, RNA 레플리콘, DNA 레플리콘, 알파바이러스 레플리콘 입자, 베네수엘라 말뇌염 (Venezuelan Equine Encephalitis) 바이러스, 셈리키 삼림 바이러스, 및 신드비스 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 적절한 발현 벡터에 의해 발현되는, 면역원성 조성물.

청구항 11

제4항에 있어서, 상기 조성물은 재조합 폴리펩티드를 발현하는 적절한 발현 벡터를 통해 투여되며, 상기 적절한 발현 벡터는 DNA 플라스미드, 배클로바이러스, VSV, MVA, GC46, SpyVLP, 알파바이러스 레플리콘, 아데노바이러스, 수두바이러스, 아데노 연관 바이러스, 거대세포바이러스, 개 디스템퍼 바이러스, 황열 (yellow fever) 바이러스, 레트로바이러스, RNA 레플리콘, DNA 레플리콘, 알파바이러스 레플리콘 입자, 베네수엘라 말뇌염 바이러스, 셈리키 삼림 바이러스, 및 신드비스 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는, 방법.

청구항 12

말라리아로부터 포유류를 보호하기 위한 면역원성 조성물로서,

재조합 폴리펩티드를 포함하며,

상기 재조합 폴리펩티드는 서열번호 3, 서열번호 6, 및 그의 유도체의 아미노산 서열 중 하나를 포함하며, 상기 유도체는 서열번호 3 및 서열번호 6 중 하나의 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 서열번호 3 및 서열번호 6 중 하나와 85%의 동일성을 가지고,

상기 면역원성 조성물은 건조 분말인 면역원성 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 건조 분말은 약학적으로 허용가능한 담체 내에 혼탁되거나 재구성되어 포유류에 투여하기 적합한, 면역원성 조성물.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001]

관련 출원의 교차-참조

[0002]

본 출원은 이의 내용 전체가 본원에서 참조로서 원용되는 2016년 2월 17일에 출원된 미국 가출원 제62/296,46호를 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 우선권 주장의 기초로 한다.

[0003]

수년간의 노력에도 불구하고, 허가된 말라리아 백신은 없다. 말라리아 백신의 개발에 직면한 장애물 중 하나는 많은 말라리아 항원의 광범위한 불균질성이다. 사람들에게 평가된 잠재적인 백신 항원은 지금까지 보호적 면역 반응을 유도하지 않았다.

- [0004] 말라리아는 매년 대략 863,000명의 사람을 사망시킨다. 다양한 항-말라리아 약물이 존재함에도 불구하고, 이러한 약물의 가격은 말라리아를 풍토병으로 하는 세계의 상대적으로 빈곤한 지역에서 엄청나게 비쌀 수 있다. 가장 보편적으로 사용되는 약물의 광범위한 사용은 또한 약물-내성 기생충이 확장되는 결과를 불러오며, 이들 많은 약물이 효과가 없도록 만든다. 심하고 매우 유력한 약물이 없다면, 예방 접종이 전통적인 말라리아 중재 (intervention)을 보완하는 가장 비용-효율적인 방법이다.
- [0005] 성공적인 말라리아 백신은 항원적으로 다양한 수많은 말라리아 기생충으로부터 인간을 보호할 필요가 있다. 단일 항원의 단일 분리물에 기초한 백신은 이러한 이종 개체군으로부터 개체를 보호하기에 충분히 폭넓은 면역 반응을 끌어낼 수 없다. 항원-기반 백신, 또는 임의의 기타 서브유닛 말라리아 백신의 효능을 잠재적으로 개선하는 하나의 방법은 추가적인 말라리아 항원을 백신에 포함시키는 것일 수 있으며, 이로 인해 백신에 의해 유발되는 면역 반응을 확장시킨다.
- [0006] 말라리아 백신 개발 노력은 거의 오로지 소수의 잘 특징지어진 플라스모디움 팔시파룸 (*P. falciparum*) 항원에 집중되어 왔다. 반세기 이상 동안 다른 대류의 많은 연구자들에 의한 혼신적인 연구에도 불구하고, 성공적인 말라리아 백신은 여전히 찾기 힘든 상태이다. 플라스모디움 팔시파룸 계놈의 서열분석은 5천개 이상의 유전자를 밝혔으나, 이들 5천개의 유전자 중 어느 것이 유용한 것인지, 또는 잠재적인 백신 표적을 어떻게 확인하는지에 대해 아무런 암시가 없었다.
- [0007] 말라리아는 플라스모디움 속에 속하는 모기-유래 혈액원생동물 기생충에 의해 유발된다. 4종의 플라스모디움 원생동물 (플라스모디움 팔시파룸, 플라스모디움 비박스 (*P. vivax*), 플라스모디움 오발레 (*P. ovale*) 및 플라스모디움 말라리아 (*P. malariae*))은 인간에서의 질병의 원인이 된다. 플라스모디움 요엘리 (*P. yoelii*) 및 플라스모디움 베르게이 (*P. berghei*)와 같이 다른 것들도 동물에서 질병을 유발한다. 플라스모디움 팔시파룸은 인간에서 대부분의 감염 및 사망의 이유가 된다. 말라리아 기생충은 4개의 별개의 단계로 이루어진 생활 주기를 가진다. 이들 단계 각각은 기생충에 대한 특이적 면역 반응과 상응하는 단계-특이적 항원의 발생을 유도할 수 있으나, 자연적으로 유도된 말라리아는 재감염으로부터 보호하지 않는다.
- [0008] 말라리아 기생충은 여러 종의 암컷 아노페LES (Anopheles) 모기에 의해 포유류에게 옮겨진다. 감염된 모기는 혈액 식사 (blood meal) 동안 포자소체 형태의 말라리아 기생충을 포유류 피부에 위치시키며, 이는 이어 혈류로 침입한다. 포자소체는 간세포를 공격하기 전 수 분간 혈류에 머무른다. 이 단계에서, 기생충은 세포외 환경에 위치하며 포자소체 표면의 주요 구성 성분인 포자소체 (circumsporozoite, CS) 단백질을 주로 겨냥한 항체 공격에 노출된다. 포자소체가 간세포를 공격하면, 기생충은 분화, 복제되어 열충 (schizont)이 된다. 이 단계 동안, 공격하는 기생충은 감염된 간세포 당 최대 20,000개의 딸 낭충 (merozoite)을 생성하는 무성 번식을 한다. 기생충의 상기 세포내 단계에서, 숙주의 면역 반응은 T 림프구, 특히 CD8⁺ T 림프구를 포함한다. 간 감염 10일 내지 14일 후, 수천개의 새로 형성된 낭충이 혈류로 방출되어 적혈구 (RBC)를 공격하며, 항체-매개 면역 반응 및 T-세포 분비된 사이토카인의 표적이 된다. 적혈구 공격 후, 낭충은 여러 단계로 복제되고, 영양체 (trophozoite) 및 열충으로 변화하며, 이는 파열되어 새로운 적혈구를 연이어 감염시키는 새로운 세대의 낭충을 생성한다. 기생충의 상기 단계 (적혈구 단계)는, 낭충의 적혈구 공격을 저해할 수 있고 상기 단계와 관련되는 병리에 대해 보통 보호 기능을 하는 강한 체액성 반응을 촉진한다. 상기 적혈구 단계는 명백한 임상 질환과 관련이 있다. 보다 적은 수의 영양체가 수컷 또는 암컷 생식 모세포 (gametocyte)가 될 수 있는데, 이는 기생충의 생식 단계이다. 취약한 모기가 생식 모세포를 섭취하면, 이들 생식세포 (gamete)의 수정은 접합자 형성 및 연이은 운동접합체 (ookinete) 및 접합자낭 (oocyst), 그리고 마지막으로 포자소체으로의 변환을 유발하며, 포자소체는 침샘으로 이동하여 주기를 완료한다.
- [0009] 기생충의 체내 진입 시 발생하는 병원체-특이적 면역 반응의 2가지 주된 갈래는 세포성과 체액성이다. 그 중 하나인 세포성 반응은 면역 반응에 참여하는 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포와 관련이 있다. 세포독성 T 림프구 (CTL)는 그들의 표면에 병원체 항원을 발현하는 감염된 세포를 특이적으로 살해할 수 있다. CD4+ T 세포 또는 보조 T 세포는 CTL의 발달을 지원하며, 다양한 사이토카인을 생성하고, 또한 B 세포가 분열하여 항원에 특이적인 항체를 생산하는 것을 돋는다. 체액성 반응 동안, 특정 항원에 특이적인 B 세포는 활성화되어, 복제되고, 분화되어 항원-특이적 항체를 생산한다.
- [0010] 면역 반응의 2가지 갈래는 말라리아 감염에 대한 보호와 관련이 있다. 감염성 포자소체가 간으로 이동하여 간세포에 침투하면, 포자소체는 세포내 병원체가 되며, 감염된 세포 외부에서는 거의 시간을 보내지 않는다. 이 단계에서, CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포가 특히 중요한데, 이는 이들 T 세포 및 인터페론-γ (IFN-γ)와 같은 그의

사이토카인 산물이 감염된 숙주의 간세포를 살해하는데 기여하기 때문이다. 쥐과 말라리아 모델의 세포내 간 기생충의 제거는, 간 단계의 기생충에 의해 발현되는 펩티드에 대항한 CD8⁺ T 세포 반응에 의존적인 것으로 나타났다. CD8⁺ T 세포의 감소는 포자소체 도발에 대항한 보호를 방해하며, CD8⁺ T 세포를 미경험 동물에 입양 전달 (adoptive transfer)하는 것은 보호능을 부여한다.

[0011] 말라리아 감염이 낭충이 적혈구에서 복제되는 적혈구기에 이르면, 낭충은 또한 새로운 적혈구를 공격할 때까지 짧은 시간 동안 혈류에서 자유롭게 순환하고 있는 것으로 나타난다. 적혈구는 T 세포와의 동족 상호작용에 필요한 클래스 I 그리고 II MHC 분자를 발현하지 않기 때문에, 기생충에 대한 항체 반응은 기생충 생활 주기 중 혈액기와 가장 관련 있는 것으로 생각된다. 결론적으로, 가능한 말라리아 백신 접근법이 만약 기생충이 인체 내 나타내는 상이한 단계에 맞서기 위하여 강한 체액성 면역 반응뿐만 아니라 강한 세포성 면역 반응을 유도한다면 가장 유용할 것이다.

[0012] 말라리아 백신 개발에 대한 현재 접근법은 앞서 기술한 것과 같이 기생충의 상이한 발달 단계에 따라 분류될 수 있다. 3가지 유형의 가능한 백신이 구별될 수 있다. 첫 번째는 전-적혈구기 백신으로, 포자소체 및/또는 열충-감염된 간세포에 대항한다. 역사적으로, 상기 접근법은 (CSP)-기반 전략에 의해 가장 두드러졌다. 감염의 전-적혈구기에는 증상이 없기 때문에, 전-적혈구기 백신의 목표는 체액성 그리고 세포성 면역 반응에 의해 매개되는 멸균 면역을 부여하여, 이에 따라 잠복중인 말라리아 감염을 방지하는 것이다. 상기 목표는 어떤 알려진 치료법에 의해서도 충족되지 않았다.

[0013] 백신 접근법의 두번째 유형은 감염된 적혈구와 낭충 자체에 대항하는 무성 혈액기 백신으로, 항체가 적혈구를 공격하는 낭충을 막는다면 임상 위중도를 최소화하거나 감염을 예방하도록 설계되었다. 이러한 백신을 제조하려는 현재까지의 시도는 질병 발병률과 사망률을 충분히 감소시키지 못했거나 기생충이 적혈구에 진입 및/또는 전개하는 것을 방지하지 못했다. 전염-차단 백신은 모기 숙주에서 기생충의 발달을 방해하도록 설계되었다. 이러한 유형의 백신을 제조하려는 현재까지의 시도는 전체 인구범위의 말라리아 감염률을 줄이지 못했다.

[0014] 마지막 유형의 백신 접근법은 여러 단계의 기생충 생활 주기를 표적하는 말라리아 백신의 조합이다. 상기 접근법은 다-성분 및/또는 다-단계의 백신의 개발을 시도하였다. 이러한 백신을 제조하려는 현재까지의 시도는 충분한 보호를 가져오지 못했다. 이러한 실패의 결과로, 현재까지 상업적으로 입수 가능한 말라리아 백신은 없다.

[0015] 설치류, 비-인간 영장류 및 인간을 방사선-약독 포자소체 (RAS)로 면역화하는 것은 살아있는 포자소체에 의한 연이은 도발에 대해 보호능을 가져오는 것으로 알려져 있다. 그러나, 방사선 조사된 포자소체 생산을 위한 비용 및 실현 가능한 대규모 배양 시스템의 부족, 상대적으로 단기간의 효능, 종간 (cross-strain) 보호의 부족, 및 정맥내 전달의 필요성은 이러한 백신 개발의 장애물이 되어왔다.

[0016] CS 단백질은, 인간에서 모기-유래 감염에 대한 활성 면역화의 기초로 사용되는 경우 말라리아 감염을 예방하는 것으로 유일하게 입증된 플라스모디움 팔시파룸 항원이다. 그러나 상기 항원의 보호 수준은 성공적인 치료를 뒷받침하기에 충분히 높지 않다. 이론적으로, 성공적인 치료법이 되기 위해서 백신 보호 수준은 85% 이상이어야 한다. 이보다 보호 수준이 낮은 경우, 보다 치명적인 변이체가 풍토성 지역에서 빠져나갈 수 있다. CS 항원-기반 백신은 단지 약 50%의 효능을 보여왔으며 보호능이 1년 이상 지속되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 이는 본 명세서 전까지는 아직 가장 잘 알려진 항원 반응이었다.

[0017] 플라스모디움 팔시파룸의 전체 게놈 서열은 서열분석되어 왔다. 문헌 [Bowman et al., Nature, 400: 532-538 (1999); Gardner, et al., Nature, 419: 498-511 (2002)]을 참고한다. 다른 인간 말라리아 기생충, 플라스모디움 비박스 또한 서열분석되어 왔다. 문헌 [Carlton et al., Nature, 455: 757-763 (2008)]을 참고한다. 설치류 말라리아 기생충, 플라스모디움 요엘리 또한 서열분석되어 왔다. 문헌 [Carlton et al., Nature, 419: 512-519 (2002)]을 참고한다. 그러나 이에도 불구하고, 유망한 항원을 확인할 수 없기 때문에 효과적인 항-말라리아 백신의 개발은 심각하게 저지되어 왔다. 플라스모디움 팔시파룸, 플라스모디움 비박스, 및 플라스모디움 요엘리 게놈의 서열분석을 통해 5,369, 5,433, 및 5,675개의 유전자가 각각 확인되었다. 그러나 이러한 서열을 알고 있다고 하여 새로운 백신 컨스트럭트가 만들어지지는 않을 것이다. 결과적으로, 플라스모디움 팔시파룸 단백질체의 0.2%에 대해서만 임상 시험이 수행되고 있으며, 이들 시험은 지원자에서 높은 수준의 보호를 유도하지 못했다.

발명의 내용

[0018] 본 발명은 말라리아 기생충의 전-적혈구기 및 적혈구기 모두에서 발현되는 항원으로서 유용한 폴리펩티드를 제

공한다. 상기 항원은, 백신 제제 내 항원을 투여함으로써 또는 백신 제제로 전달되는 DNA 또는 기타 핵산 발현 시스템 내에서 항원을 발현함으로써 포유류에서 말라리아에 대한 세포성 그리고 체액성 면역 반응 모두를 유도하는데 이용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 포유류는 인간이다.

[0019] 바람직한 일 실시양태에서, 본 발명은 말라리아 감염으로부터 포유류를 보호하기 위한 면역원성 조성물로, 서열 번호 3 또는 서열번호 6, 또는 그의 유도체 중 1 이상의 재조합 폴리펩티드를 약학적으로 허용가능한 담체 내 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 일반적으로, 유도체는 레페런스 서열과 적어도 10개의 인접한 아미노산을 갖고/갖거나 레페런스 서열과 85%의 동일성을 갖는다. 면역원성 조성물은 재조합 항원을 발현하는 분리된 또는 재조합 폴리펩티드 또는 담체 바이러스로부터 형성될 수 있으며 허용가능한 항원보강제와 짹을 이를 수 있다.

[0020] 본 명세서의 주제가 되는 항원은 본 기술 분야의 표준에서와 같이 상이한 맥락에서 상이한 명명법에 의해 식별된다. 편의를 위하여, 하기 표는 각 항원을 그의 서열, 선행 문헌 및 본 명세서에서 사용된 다양한 이름과 약칭으로 나타내었다:

표 1

| 약칭 | PlasmoDB 식별번호 (Identification) | 서열번호 |
|---------------------|--|------------------------|
| Py E140 | PY06306, PY17X_0210400, PYYM_0211900 | 1 (아미노산) 2 (뉴클레오티드) |
| Pf E140 | PFA0205w, MAL1P1.31, PF3D7_0104100, XP_001350973 | 3 (아미노산) 4 (뉴클레오티드) |
| Pv E140 | PVX_081555, PV081555, PVP01_0210600 | 6 (아미노산) 5 (뉴클레오티드) |
| Py 팔스타틴 (falstatin) | PY17X_0816300, PY03424, PYYM_0816000 | |
| PyCSP | PY03168, PYYM_0405600 | |
| Py E057 | PY03396, PY17X_1006600, PYYM_1006600 | |
| Py E137 | PY05693, PY17X_1006100, PYYM_1006100 | |
| Py UIS3 | PY03011, PY17X_1402400 | |
| Pffalstatin, ICP | PFI0580C 또는 PF3D7_0911900 | 7 (아미노산) |
| Pf CSP | PFC0210C, MAL3P2.11, PF3D7_0304600 | 8 (아미노산) |
| PF UIS3, ETRAMP13 | PF13_0012, PF3D7_1302200 | 9 (아미노산) |

[0022] 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 내 2 이상의 재조합 폴리펩티드의 조합을 포함할 수 있는데, 하나의 폴리펩티드는 서열번호 3, 서열번호 6, 또는 그의 유도체이고, 다른 폴리펩티드는 PyCSP, Py 팔스타틴 (falstatin), Py UIS3, PY03396, PY05693, PY03424, 및 PY03011의 팔시파룸 (*falciparum*) 또는 비박스 (*vivax*) 종분화적 상동체 (ortholog) 중 임의의 것이다.

[0023] 본 발명은 서열번호 3 또는 6, 또는 그의 유도체에 의해 코딩되는 1 이상의 폴리펩티드를 포함하는 면역학적으로 유효한 양의 조성물을 투여함으로써 포유류에서 말라리아에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 또한 포함한다. 또는, 상기 방법은 말라리아에 대한 1 이상의 일차 면역 (priming) 또는 증강 예방 주사 (immunization)를 투여하는 단계를 포함할 수 있는데, 상기 일차 면역 및 증강 예방 주사는 기술된 것과 같이 면역학적으로 유효한 양의 재조합 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드를 투여하는 방법은 플라스미드, 복제 바이러스 벡터, 또는 비복제 바이러스 벡터와 같은 적절한 발현 벡터의 사용을 포함할 수 있다. 적절한 발현 벡터는 DNA 플라스미드, 배콜로바이러스, rVSV, SpyVLP, 알파바이러스 레플리콘, 아데노바이러스, 수두바이러스, 아데노 연관 바이러스, 거대세포바이러스, 개 디스템퍼 바이러스, 황열 (yellow fever) 바이러스, 레트로바이러스, RNA 레플리콘, DNA 레플리콘, 알파바이러스 레플리콘 입자, 베네수엘라 말뇌염 (Venezuelan Equine Encephalitis) 바이러스, 셈리 키 삼립 바이러스, 또는 신드비스 바이러스일 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 개시된 항원으로 유용한 폴리펩티드는 감염성 플라스모디움 요엘리 포자소체 (sporozoite) 도발로부터 개체를 100% 멸균 보호할 수 있는 제1 플라스모디움 (*Plasmodium*) 전-적혈구기 항원이다. 이를 반응은 인간 종분화적 상동체에 대한 대용물로서 마우스에서 간편하게 측정된다. 말라리아 감염, 치료, 및 면역은 마우스와 인간 모두에게서 널리 연구되어 왔는데, 마우스 모델은 인간 및 다른 포유류 개체에서의 말라리아 백신 효능의 표준 지표로 여겨진다. 본 명세서에서 개시된 PY06306 항원은 단독으로 말라리아에 대한 CD1 마우스의 71% 내지 100%를 보호하며 나아가 보호되지 않은 나머지 마우스의 혈액 내에서 기생충의 개체를 지연시킬 수 있는

면역 반응을 유도한다. 전반적으로, 83% (384/461)의 PY06306-면역화된 마우스는 말라리아 감염으로부터 보호된다. 상기 보호는 이종 교배 (CD1) 및 동종 교배 (BABB/c) 주의 마우스 모두에서, 각각 흑독한 300- 및 100-포자 소체 도발과 멸균 보호로서의 효능 평가를 이용하여 보고된다. 본 명세서에서 개시된 항원의 효능은, 본 명세서에서 개시된 쥐파, 영장류, 및 인간의 말라리아 면역 반응과 백신 효능의 표준 지표 간의 관계를 고려할 때, 포유류에서 말라리아에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 폴리펩티드를 야기한다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 그룹 당 14마리의 CD1 이종 교배 마우스가 PY03396, PY05693, PY06306, PY00232 및 PyCeITOS를 발현하는 DNA 및 인간 아데노바이러스 유형 5 (Ad5) 백터의 조합을 이용하여 일차 면역-증강 요법으로 면역화된 매트릭스 실험에 대한 보호 결과를 나타낸다. 양성 대조군 마우스는 PyCSP를 발현하는 DNA 및 Ad5 백터를 이용하여 면역화된 마우스와 미경험 마우스이다. 회색 막대와 검정색 막대는 각각 PyCSP가 있는/없는 항원 조합 그룹을 나타낸다. 빛금친 막대와 체크무늬의 막대는 각각 PyCSP 및 미경험 그룹을 나타낸다. 마우스는 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발되었고, 김사 (Giemsa)-염색된 혈액 도말법을 수행하여 기생충혈증을 도발 14일 후까지 평가하였다. 맨 아래의 숫자는 각 그룹의 총 도발된 마우스 당 멸균 보호된 마우스의 수를 표시한다.

도 2는 PY06306 및 도 1에 도시된 다른 항원을 평가하는 실험의 매트릭스 디콘볼루션을 나타낸다. 그룹 당 14마리의 CD1 이종 교배 마우스는 PY03396, PY05693, PY06306, PY03424 및 PY03011을 발현하는 DNA 및 아데노바이러스 유형 5 (Ad5) 백터를 포함하는 일차 면역-증강 요법으로 면역화되었다. 양성 대조군 마우스는 PyCSP를 발현하는 DNA 및 Ad5 백터로 면역화되었다. 음성 대조군 마우스는 플라스모디움 요엘리 항원을 발현하지 않는 4X 상대적인 양의 DNA 및 Ad5 백터로 면역화되었다. 회색 막대와 검정색 막대는 각각 PyCSP가 있는/없는 항원 조합 그룹을 나타낸다. 빛금친 막대와 체크무늬의 막대는 각각 PyCSP 면역화된 마우스 및 면역화되지 않은 마우스를 나타낸다. 마우스는 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발되었고 김사-염색된 혈액 도말법을 수행하여 기생충혈증을 도발 17일 후까지 평가하였다. 맨 아래의 숫자는 각 그룹의 총 도발된 마우스 당 멸균 보호된 마우스의 수를 표시한다.

도 3은 도발 후 기생충혈증에 대해 보호된 마우스의 백분율을 시간에 대해 나타낸 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 곡선을 보여준다. 데이터는 매트릭스 디콘볼루션 실험 2로부터 추출, 분석하였다. 닫힌 원은 PY06306 항원 단독으로 면역화된 CD1 마우스를 나타내고, 기호 Xs, 사각형 및 삼각형은 각각 PyCSP, 4X Null (면역화되지 않은 마우스) 및 미경험 마우스를 나타낸다. 마우스는 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발되었고, 김사-염색된 혈액 도말법을 수행하여 기생충혈증을 도발 14일 (PyCSP, 4X Null 및 미경험) 또는 17일 (PY06306) 후까지 평가하였다.

도 4는 매트릭스 디콘볼루션 실험에 대한 항체 반응을 나타낸다. 종료점 면역형광 어세이 (IFA) 역가는 플라스모디움 요엘리 포자소체 및 혈액기 기생충에 대해 측정되었다. 아데노 5 증강 후 1주일 후에 수집된 혈청은 항원 조합의 그룹 당 모아졌고, 자연 조건된 기생충에 대한 반응성을 분석하였다. 회색 막대와 검정색 막대는 각각 포자소체 및 혈액기 반응성을 나타낸다. 양성 대조군 항체는 각각 NYS1 그리고 NYLS3 단일클론 항체였다. 4X null 및 미경험 동물로부터의 혈청은 음성 대조군이었다.

도 5는 도 4에 도시된 매트릭스 디콘볼루션 실험에 대하여 보호된 그리고 비-보호된 마우스의 항체 역가를 나타낸다. 종료점 면역형광 (IFA) 역가는 6마리의 PY06306 (E140)-포함 마우스 그룹의 개별 마우스에서 플라스모디움 요엘리 포자소체에 대하여 측정되었다. 매트릭스 실험 2 (Mx2)로부터 하나의 그룹; 매트릭스 디콘볼루션 실험 2 (MDx2)로부터 E140, E137, E057 조합 (닫힌 원) 및 5개 그룹; 140, E137, E057 조합 (닫힌 사각형), E140 단독 (닫힌 다이아몬드), E140, E137 조합 (닫힌 별), E140, E057 조합 (닫힌 삼각형), 및 E140, E137, E057, PY3424 조합 (닫힌 별표(*)). 모든 보호된 마우스는 닫힌 기호에 의해 표시되었고 모든 비-보호된 마우스는 X 기호로 표시되었다. 만-위트니 (Mann-Whitney) 비-모수적 검정 (non-parametric test)은 통계적 유의성을 나타낸다; **, p<0.005 그리고 ***, p=0.001.

도 6은 도 2에 도시된 디콘볼루션 연구에서 11주차의 연속된 보호를 나타낸다. 멸균 보호된 마우스는 11주 동안 휴식을 취한 후 200개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발되었다. 보호는 김사-염색된 혈액 도말법을 수행하여 도발 17일 후까지 측정되었다.

도 7은 Pf (인간 플라스모디움 팔시파룸), Pv (인간 플라스모디움 비박스), Pc (설치류 플라스모디움 카바우디

(*P. chabaudi*)), Py (설치류 플라스모디움 요엘리), Pb (설치류 플라스모디움 베르게이), Pk (영장류 플라스모디움 노우레시 (*P. knowlesi*)), Pr (영장류 플라스모디움 로디아니 (*P. rhodiana*)), 및 Pg (영장류 플라스모디움 가보니 (*P. gaboni*))를 포함한, 플라스모디움 종 중의 PY06306 (Py E140) 항원 상동성을 나타낸다.

도 8은 다양한 Pf 기생충 종 중 PY06306 (Pf E140) (PFA0205w 또는 MAL1P1.31 또는 PF3D7_0104100)의 아미노산 보존을 나타낸다. 이를 기생충은 다른 대류의 다양한 국가로부터 수집되었다. 가장 높은 (99%) 그리고 가장 낮은 (92%) 상동성이 강조 표시되었다.

도 9는 마우스에서의 생체내 T 세포 감소 실험의 결과를 나타낸다. CD1 이종 교배 마우스는 PY06306 DNA로 면역화되어 아데노 5 백신으로 증강되었고, 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발된 전후에 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ T 세포가 감소되었다 (검정 막대). 랫트 Ig 및 감소되지 않은 그룹은 양성 대조군으로 사용되었다. 면역화되지 않은 마우스 그룹 (회색 막대) 또한 동일한 방식으로 감소되었고 음성 대조군으로 사용되었다. PyCSP (사선 막대) 및 미경험 (줄무늬 막대) 그룹은 실험 양성 및 음성 대조군이었다. 화살표는 감소의 유형 및 면역화된 수 중 마우스 멸균 보호된 마우스의 수를 나타낸다. 도발된 마우스에 대해 김사-염색된 혈액 도말법을 수행하여 기생충혈증을 도발 19일 후까지 평가하였다.

도 10A 및 10B는 CD1 그리고 BALB/c 마우스에서의 혈청 전달 연구를 나타낸다. 도 10A에서, 14마리의 BALB/c 마우스 그룹은 PY06306 (검정 실선) 및 PyCSP (회색 실선)를 코딩하는 DNA/아데노바이러스 5로 면역화하였다. 면역화되고 도발되지 않은 마우스로부터의 혈청이 수집되어 도발하기 24시간 및 6시간 전에 미경험 수령 마우스 (PY06306 (검정 점선) 및 PyCSP (회색 점선))에게 전달되었다. 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발한 후, 마우스를 17일 동안 기생충혈증에 대해 모니터링하였다. 도 10B에서, 14마리의 CD1 마우스 그룹은 PY06306 (검정 실선) 및 PyCSP (회색 실선)를 코딩하는 DNA/아데노바이러스 5로 면역화되었다. 면역화되고 도발되지 않은 마우스로부터의 혈청이 수집되어 도발하기 24시간 및 6시간 전에 미경험 수령 마우스 (PY06306 (검정 점선) 및 PyCSP (회색 점선))에게 전달되었다. 100개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발한 후, 마우스를 17일 동안 기생충혈증에 대해 모니터링하였다. 각 그룹에 대해 멸균 보호된 마우스의 백분율은 범례 박스에 나타내었다.

도 11은 혈액기 도발에 대한 PY06306의 보호를 나타낸다. 그룹 당 14마리의 CD1 마우스는 1회분의 DNA로 면역화되고 PY06306 (검정 막대), PY06306 + PyFalstatin (회색 막대), 및 PyFalstatin 단독을 발현하는 아데노바이러스 5로 증강되었다. 면역화되지 않은 마우스와 미경험 마우스를 마우스의 음성 대조군 그룹으로 사용하였다. PyFalstatin은 PY03424로도 알려져 있다. 모든 마우스는 10,000개의 감염된 플라스모디움 요엘리-감염된 적혈구로 도발되었고 기생충혈증은 김사-염색된 박막 도말법에 의해 도발 후 17일 동안 모니터링되었다.

도 12는 본래의 (na) 그리고 코돈-최적화된 (co) PY06306와 면역화 경로를 비교하는 도표에서 포유류 코돈-최적화된 아데노바이러스 5를 이용한 보호를 나타낸다. CD1 마우스 (그룹 당 14마리)는 co E140 DNA로 일차 면역되고 본래의 PY06306 아데노 5 (검정 막대) 또는 포유류 co PY06306 아데노 5 (회색 막대)로 증강되었다. 두 아데노 5 컨스트럭트는 10^{^10}, 10^{^9}, 10^{^8}, 및 10^{^7} PU의 감소된 용량으로 근육내 (IM) 투여되었다. 2개의 추가적인 마우스 그룹은 피하 (SC) 그리고 정맥내 (IV) 투여된 Ad5로 증강되었다. 2개의 추가적인 마우스 그룹은 DNA 백신으로 일차 면역되지 않았고 대신 도발 2주 전에 단일 IM 용량의 na 그리고 co PY06306 Ad5로 면역되었다. 면역화되지 않은 마우스 (줄무늬 막대) 및 미경험 (체크무늬 막대) 마우스는 음성 대조군이었다. 모든 마우스는 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발되었고, 기생충혈증은 김사로 염색된 박막 혈액 도말법에 의해 18일 동안 모니터링되었다.

도 13은 Pf E140 (PFA0205w 또는 MAL1P1.31 또는 PF3D7_0104100)이 마우스에서 면역원성을 가짐을 보여준다. IFA 역가는 PFA0205w 백신에 의해 유도되었다. CD1 그리고 BALB/c 마우스는 모두 PFA0205w (PfE140) 백신 시약 (VR1020-DV 플라스미드 내 DNA 백신, 아데노바이러스 5, 및 맥아 시스템에 의해 GST 및 6xHis 융합체로 발현된 전장 재조합 단백질)으로 면역화되었다. 재조합 단백질은 몬타니드 (Montanide) ISA 720 항원보강제에서 유화되었고 5 μg/용량으로 피하 면역화시켰다. 면역형광 (IFA) 역가가 플라스모디움 팔시파룸 포자소체 그리고 여러 혈액기 혼합물에 대해 측정되었다.

도 14는 플라스모디움 팔시파룸 E 140 (PFA0205w)이 인간에서 자연적으로 면역원성을 가짐을 나타낸다. T 세포는 플라스모디움 팔시파룸 방사선 약독 포자소체 (RAS)-면역화된 인간 개체에 의한 PFA0205w (PfE140 또는 PF3D7_0104100)에 반응한다. PBMC는 브레펠린 (brefeldin) A를 이용하여 21시간 동안 오버랩핑 15mer 웹티드 PFA0205w 풀 A로 자극되고 생존능, 표현형 (CD14, CD19, CD3, CD4, 및 CD8), 및 세포내 기능 마커 (IFN-γ 및

CD154를 포함)에 대해 염색되었다. 백그라운드가 제외된, IFN- γ 및 세포내 CD154를 생성하는 CD4 $^{+}$ T 세포 (A) 및 IFN- γ 를 생성하는 CD8 $^{+}$ T 세포 (B)의 빈도가 도시되었다. 두 실험에서 PFA0205W 풀 A (채워진 기호)에 대한 양성 반응은 음성 대조군 (DMSO 자극된) 샘플들의 평균으로부터 2개의 표준 편차를 초과하는 것으로 확인되었다.

도 15는 PVX_081555 (PvE140)가 상대적으로 플라스모디움 비박스 포자소체에서 풍부함을 나타낸다. 다-차원-단백질-확인-기술 (MudPIT)을 이용하여 서열분석된 256개의 플라스모디움 비박스 포자소체 단백질을, 그들의 정량 값에 의해 정의된 그들의 상대적 풍부도에 기초하여 그래프로 나타내었다. 플라스모디움 비박스 포자소체 단백질 (circumsporozoite protein) 및 플라스모디움 비박스 E140 (PVX_081555)의 위치는 그래프에서 검정 화살표로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

본 발명자는 말라리아에 대한 보호 면역을 부여하는데 전-적혈구기 단백질이 대단히 중요함을 확인하였다. 말라리아 기생충 계놈의 서열분석에 따라 식별된 상대적으로 많은 수의 말라리아 유전자에도 불구하고, 백신 후보의 식별은 말라리아 기생충의 비교적 복잡한 생활 주기에 의해 크게 제한되어 왔다. 나아가, 말라리아 기생충의 많은 유전자는 기능적으로뿐만 아니라 항원적으로도 잘 정의되어 있지 않다.

[0027]

이러한 상황에서, 본 발명자는 잠재적인 보호 반응을 확인하기 위하여 많은 유전자에 의해 코딩되는 항원의 고속 대량 스크리닝 (high-throughput screening)을 수행하기로 결정하였다. 본 발명자는 선행 문헌에서 나타난 난점을 극복한 잠재적인 말라리아 항원을 확인하고 시험하기 위한 신규한 전략을 개발하였다. 상기 신규한 접근법은 발명자가 잠재적인 인간 백신 후보의 지표가 될 것으로 판단한 특정한 특성을 확인하는 것을 포함하였다. 이후 본 발명자는 이러한 특성을 가질 것으로 여겨지는 플라스모디움 팔시파룸 유전자의 146개의 플라스모디움 요엘리 종분화적 상동체의 목록을 편집하였다. 본 발명자는 이후 클로닝 프라이머를 설계하고, 유전자 클로닝과 형질감염 ELISpot에 의한 스크리닝을 위한 전략을 수립하였다. 형질감염 ELISpot은 A20 세포주를 VR1020 백신 컨스트럭트로 형질감염시키는 단계, 항원을 발현시키는 단계, 및 이러한 형질감염된 세포를 이용하여 ELISpot 어세이에 항원을 나타내는 단계를 포함하였다. 이러한 ELISpot의 사용은 항원을 스크리닝하는 신규한 전략이었다. 우선적인 항원이 큰 패널의 플라스모디움 팔시파룸 단백질로부터 확인되었다. 우선적인 항원은 발명자에 의해 말라리아에 대한 보호와 관련이 있다고 판단되는 여러 기준에 기초하여 평가되었다. 이 중 하나의 기준은 말라리아 기생충의 포자소체 및 간 단계에서 발현되는 항원, 즉 전-적혈구기 항원을 선택하는 것이었다. 상기 기준에 기초하여 선택된 항원 중 특정 항원은 마우스에서 보호적 반응을 보였는데, 이는 이들 유전자의 종분화적 상동체가 인간에서 잠재적인 백신 제제로 유용한 인간 항원을 코딩함을 나타낸다. 특히 하나의 유전자 PY06306은 이후에 PY17X 0210400로 정리되었는데, 이는 본 명세서의 주제로, 놀랍게도 그의 종분화적 상동체가 주요한 백신 제제로 유용한 항원을 코딩하는 것임을 시사하는 극적이고 일관성 있는 보호 반응을 보였다.

[0028]

그러나 PY06306 유전자에 대해 기록된 서열은 일부에 불과하며 (479 aa) 초기 계놈 주석 (annotation)으로부터 유래하였다. 본 명세서에서 개시된 보호 실험을 전장 항원 (816 aa)을 이용하여 수행하기 위하여, 본 발명자는 유전자를 재-클로닝할 필요가 있었다. 유사한 상황이 플라스모디움 팔시파룸 (인간 상동체 (homolog))에서도 나타났으며, 이 또한 당업계에서 알려진 것으로부터 재-클로닝될 필요가 있다. 본 명세서에서 제공된 리스트에 개시되고, 모든 실시예에서 사용되며, 모든 데이터 실시예에서 반영된 서열은 이전에 당업계에서 관련된 서열로 여겼던 버전이 아니라, 발명자가 수정한 유전자의 버전과 일치한다.

[0029]

본 발명은 플라스모디움 팔시파룸 및 플라스모디움 비박스 재조합 단백질을 코딩하는 DNA 및 아미노산 서열에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 말라리아 백신에 사용하기 위한, 고도로 보호하기 위한 전-적혈구기 플라스모디움 요엘리 및 그의 플라스모디움 팔시파룸 및 플라스모디움 비박스 종분화적 상동 항원에 관한 것이다. 관련 서열은 서브유닛 면역원성 항원으로 사용하기 위한 코딩된 단백질을 발현하기 위해 사용될 수 있거나, 면역원성 반응을 유도하기 위하여 숙주 생체내 (*in vivo*) 발현에 적합한 벡터 내로 포함될 수 있다. 항원은 면역원성 제제 내에 조합되어 또는 단독으로 이용될 수 있다.

[0030]

일 실시양태에서, 면역원성 조성물은 DNA-계 백신이다. DNA는 본 명세서의 면역원성 조성물을 전달하기 위한 성공가능한 플랫폼으로 확인되었다. DNA-계 백신은 변형 백시니아 앙카라 (Modified Vaccinia Ankara, MVA) 약독 (attenuated) 수두바이러스, 수포성 구내염 (Vesicular Stomatitis) 바이러스 (VSV), 또는 GC46 (고릴라 아데노바이러스) 바이러스와 같은 재조합 바이러스에 의해 전달될 수 있다. 배콜로바이러스와 같이, 이와 같은 기타

인간 아데노바이러스 대체물이 또한 사용될 수 있다.

[0031] 다른 실시양태에서, 조성물은 면역원성 단백질을 포함한다. 본 실시양태에서, 단백질은 적합한 발현 시스템에서 단백질을 코딩하는 DNA의 제1 삽입에 의해 제조될 수 있다. 이는 예를 들어 아데노바이러스 기반 시스템, 수두 바이러스 기반 시스템, 또는 DNA 플라스미드 시스템을 포함한다. 발현되어 정제된 단백질은 이후 1 또는 복수의 복용량으로 인간과 같은 포유류에 투여될 수 있다. 본 실시양태에서, 정제된 단백질은 개별적으로 발현될 수 있거나, 특정 단백질을 코딩하는 DNA가 단일 면역원성 조성물을 형성하기 위해 재조합적으로 연관될 수 있다. 이러한 면역원성 조성물은 이후 면역원성 반응을 유도하기 위해 1 또는 복수의 복용량으로 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시양태는 이종 발현 시스템에 의해 전장 또는 단편으로 발현되는 재조합 폴리펩티드에 관한 것이다. 이러한 시스템의 예는: 에세리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 효모 (사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피키아 패스토리스 (*Pichia pastoris*)), 포유류 세포 (HEK293 또는 CHO 세포), 배콜로바이러스-감염된 곤충 세포, 및 초파리 (*Drosophila*) S2 안정 세포이다. 재조합 단백질은 면역 반응을 유도하기 위하여 면역원성 제제에 포함될 수 있다. 본 실시양태에서, 폴리펩티드는 개별적으로 또는 조합하여 포함될 수 있다. 본 발명의 면역원성 조성물은 폴리펩티드에 의해 유도된 면역 반응을 개선 또는 향상시키기 위하여 항원보강제를 또한 포함할 수 있다. 적합한 항원보강제는 사포닌과 함께 모노포스포릴 지질 A-함유 리포좀 조성물을 포함하는 비-독성 제제인 ALFQ를 포함한다.

[0033] 항원보강제는 전통적으로 그들의 성분 기원, 생리화학적 특성 또는 작용 기작에 따라 대략 2가지 주요 종류로 분류되어 왔는데, 즉: (i) 직접적으로 면역계에 작용하여 항원에 대한 반응을 증가시키는 TLR 리간드, 사이토카인, 사포닌 및 세균성 외독소와 같은 면역자극제 및 (ii) 백신 항원 및 최적의 방식으로 면역계에 공-투여되는 면역자극제를 제시하는 무기염류, 에멀젼, 리포좀, 비로좀 및 생분해성 폴리머 마이크로스피어와 같은 운반체 (vehicle)이다. 최근 이러한 많은 운반체가 면역계에 직접적인 효과를 또한 나타내며 면역자극제로 고려될 수 있음이 분명해졌다.

[0034] 말라리아 백신 내 포함되도록 허용가능한 항원보강제의 예로는 ALF, ALFA (및 알루미늄), 및 ALFQ (및 QS21)와 같은 아미 리포좀 제제 (Army Liposome Formulation, ALF) 유도체가 포함된다. 다른 옵션은 QS21 및 3D- 모노포스포릴 지질 A (리포폴리사카라이드의 비-독성 유도체)와 같은 리포좀 제제 내의 지질 A 유도체 및 사포닌, LPS, MPL, 또는 3D-MPL, 아실화 모노사카라이드, 사포닌 유도체 (Quil-A, ISCOM, QS-21, AS02 및 AS01), 가용성 트리테르펜 글리코시드, Toll-유사 수용체 4 (TLR4) 아고니스트, 몬타니드 (montanide) (ISA51, ISA720), 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 및 이미다조퀴놀린과 구조가 유사한 기타 면역자극제를 포함한다. 항원보강제는 콜레스테롤-함유 리포좀 담체 내로 제조될 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는, 용어 “폴리펩티드”는 아미노산 폴리머를 나타내며, 산물의 특정 길이를 나타내는 것이 아니다. 단백질은 폴리펩티드의 정의에 포함된다. 15-mer와 같이 숫자와 함께 하는 용어 “mer”는 많은 아미노산에서 폴리펩티드의 길이를 나타낸다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는, 단백질은 플라스미드 또는 바이러스 시스템과 같은 다른 발현 시스템으로부터의 발현인 분자적 방법에 의해 적절한 유전자 단편을 먼저 발현시킴으로써, 본 명세서에서 기술된 유효한 양의 1 이상의 폴리펩티드를 면역원성 조성물에 포함시키기 위하여 제조된 후 분리될 수 있다. 본 발명의 추가적인 양태는 단백질이 체액성 및/또는 T-세포 면역 반응을 유도시키는 능력이다.

[0037] 본 발명의 실시양태는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 벡터 발현 시스템 내로의 통합으로, 상기 시스템은 인간과 같은 포유류 숙주 세포 내 1 이상의 폴리펩티드의 발현이 면역 반응을 유도하도록 한다. 발현 시스템은 DNA 플라스미드 또는 바이러스 시스템일 수 있다. 플라스모디움 단백질을 발현하는 DNA 백신을 제조하고 투여하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0038] 다른 실시양태에서, 단백질의 유도체가 면역원성 조성을 내에 사용될 수 있다. 본 실시양태의 변형에서, 플라스모디움 팔시파룸 및 플라스모디움 비박스 단백질의 면역원성 유도체는 본 명세서에서 개시된 아미노산 서열을 포함하는 전장 폴리펩티드 아미노산 서열과 적어도 10개의 인접한 아미노산을 포함한다. 폴리펩티드의 면역원성 유도체는 적절한 유전자 단편의 발현에 의해 또는 웨პ티드 합성과 같은 기타 방법에 의해 제조될 수 있다. 나아가, 유도체는 본 명세서에서 개시된 플라스모디움 팔시파룸 폴리펩티드의 1 이상의 에피토프를 코딩하는 추가 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드일 수 있다. 이들 실시양태에서, 단백질은 면역원성 제제에 직접적으로 포함될 수 있거나 DNA 플라스미드 또는 바이러스 발현 시스템으로부터 발현될 수 있다.

[0039] 일부 실시양태에서, 플라스모디움 팔시파룸 및 플라스모디움 비박스 폴리펩티드는 본 명세서에 개시된 서열과

80% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 면역원성 유도체를 포함한다. 이러한 맥락에서, 용어 “동일성 (identity)”은 최대 관련성을 갖도록 정렬했을 때 동일하거나 특정 비율의 동일한 아미노산 잔기를 갖는 2 이상의 서열 또는 서브서열을 나타낸다. 서열이 보존적 치환, 즉, 동일한 특성을 갖는 잔기의 치환에서 상이한 경우, 백분율 서열 동일성은 치환의 보존적 특성에 대한 수정을 위해 위로 조정될 수 있다.

[0040] 조성물이 투여를 위해 제조되는 경우, 이는 약학 제제 또는 유닛 복용 형태를 형성하기 위해 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 바람직하게 조합된다. “약학적으로 허용가능한 담체”는 제제의 다른 성분과 양립될 수 있으며 그의 수용자에게 유해하지 않은 담체, 희석제, 부형제, 및/또는 염이다. 투여를 위한 활성 성분은 건조 분말로 또는 과립으로; 용액, 혼탁액 또는 에멀젼으로 존재할 수 있다. 조성물은 액상 담체에 재구성 되기 전에 건조 분말로 존재한다.

[0041] 본 발명의 면역원성 조성물을 포함하는 약학 제제는 잘 알려지고 쉽게 입수가능한 성분을 이용하여 당업계에 잘 알려져 있는 절차에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 치료제는 또한 비경구 투여, 예를 들어 근육내, 피하 또는 정맥내 경로에 적합한 용액으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 치료제의 약학 제제는 또한 수용성 또는 무수 용액 또는 분산액의 형태, 또는 에멀젼 또는 혼탁액의 형태를 떨 수 있다.

[0042] 따라서, 면역원성 조성물은 비경구 투여 (예: 주사, 예를 들어, 한 회 분 주사 또는 지속 주입에 의해)를 위해 제형화될 수 있고 앰플, 미리-충전된 주사기, 소용량 주입 컨테이너, 또는 첨가된 보존제를 갖는 다-복용량 컨테이너 내에 유닛 복용량으로 존재할 수 있다. 조성물은 정맥내, 피하, 또는 근육내 주입하기에 적합할 수 있다. 활성 성분은 유성 또는 수성 운반체 내 혼탁액, 용액, 또는 에멀젼과 같은 형태를 나타낼 수 있고, 혼탁제, 안정화제, 및/또는 분산제와 같은 제형화 물질을 포함할 수 있다. 또는, 활성 성분은 사용 전에 적합한 운반체, 예를 들어 멸균된, 발열원-없는 물과 함께 구성하기 위한, 멸균 고체의 무균성 단리물에 의해 또는 용액으로부터의 동결 건조에 의해 얻어지는, 분말 형태일 수 있다.

[0043] 나아가, 면역원성 조성물은 웨티드가 발현되는 세포 환경에서 자연적으로 발생하지 않는 제형화 물질을 포함할 수 있다. 이러한 제형화 물질은 웨티드가 발현되는 세포 환경에서 자연적으로 발생하지 않으나 그럼에도 불구하고 포유류에 투여되기 전, 후, 또는 투여 중에 웨티드의 면역원성 조성물 내 생체적합성, 효과, 전달, 저장, 투여, 흡수, 안정성, 안전성, 또는 기능을 인공적으로 항상시키기 위해 제공되는, 임의의 계면활성제, 희석제, 가용화제, 유화제, 완충제, 점증제, 보존제, 계면활성제, 항원보강제, 부형제, 및 항균제를 포함한다.

[0044] 또는, 면역원성 조성물은 건조 분말로 제공될 수 있다. 건조 분말 조성물은 본 명세서에서 기술된 폴리웨티드를 포함하는 용액 또는 혼탁액을 동결 건조, 분무 건조, 및 동결 분무 건조하여 제조될 수 있으며, 분쇄 또는 분쇄와 함께 동결 건조하는 단계를 선택적으로 포함할 수 있다. 건조 분말은 예를 들어 흡입 또는 캡슐 섭취를 통한 환자에 대한 직접 투여에 적합할 수 있거나, 유체 담체 내 혼탁액 또는 재구성에 적합할 수 있다. 건조 분말 제형은 부형제, 분산제, 안정화제, 습윤제, 고화방지제, 또는 기타 첨가제와 같은 생리적으로 허용가능한 담체 분말을 포함할 수 있다.

[0045] 건조 분말 그리고 유체 실시양태의 본 발명의 면역원성 조성물은 선택적인 성분으로서 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 가용화제, 또는 유화제, 및 당업계에서 잘 알려진 형태의 염류를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제형에 유용한 담체 및/또는 희석제의 구체적인 비제한적 예로는 물 및 인산 완충 식염수 (pH 7.0-8.0)와 같은 생리학적으로 허용가능한 완충된 식염수가 포함된다. 본 명세서의 조성물은 또한 희석제와 같은 기타 물질의 조합을 포함할 수 있으며, 물, 염분, 글리세롤 또는 기타 적합한 알코올, 습윤 또는 유화제; 완충제; 예를 들어 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유도체와 같은 점증제; 보존제; 계면활성제; 항균제 등을 포함할 수 있다.

[0046] 면역원성 조성물이 백신으로 사용되는 경우, 조성물은 본 명세서에서 기술된 면역학적으로 유효한 양의 웨티드를 포함한다. 항원의 “면역학적으로 유효한 양”은 단일 용량 또는 일련의 용량으로 개체에게 투여될 때 말라리아 감염 치료 또는 예방에 효과적인 양이다. 상기 양은 치료될 개체의 건강과 신체 상태 그리고 항원에 따라 변화한다. 유기체에 투여하기 위한 면역원성 또는 백신 조성물의 유효한 양을 결정하는 것은 당업자의 능력 내이다.

[0047] 본 발명에 따른 조성물은 경구, 전신, 비경구, 국소, 점막, 근육내, 정맥내, 복강내, 피내, 피하, 비강내, 질내, 직장내, 경피, 설하, 흡입 또는 분무 투여될 수 있다. 조성물은 단일 용량 또는 복수회 투여 스케줄의 일부로 투여되기 위해 마련될 수 있다. 복수회 용량은 1 이상의 증강 예방 주사로 이어지는 일차 면역 (primary immunization)으로서 투여될 수 있다. 일차 면역은 바이러스 (GC46) 또는 DNA 백신과 같은 단일 제형을 포함할

수 있으며, 기타 바이러스 (MVA 등) 또는 재조합 단백질과 같은 단일 또는 복수 제제를 이용한 1 이상의 중강 예방 주사가 이어진다. 일차 면역과 중강 예방 주사 사이의 적합한 시기는 관례에 따라 결정될 수 있다. 본 명세서에 따른 조성물은 별개로 사용될 수 있거나, 1 이상의 다른 면역원성 또는 백신 조성물과 함께, 및/또는 1 이상의 다른 치료 요법과 함께 조합될 수 있다.

[0048] 따라서 본 명세서는 본 명세서에 기술된 조성물을 인간 또는 비-인간 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 또는 비-인간 포유류를 말라리아 감염의 영향으로부터 보호하는 방법을 제공한다. 조성물은 백신일 수 있다. 본 명세서는 본 명세서에 기술된 약학 조성물을 인간 또는 비-인간 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 또는 비-인간 포유류에서 면역 반응을 증가시키는 방법을 추가로 제공한다. 면역 반응은 바람직하게는 보호적이다. 상기 방법은 이미 일차 면역된 환자에서 중강 반응을 증가시킬 수 있다. 면역 반응은 예방적 또는 치료적일 수 있다.

실시예

실시예 1: E140의 확인

[0051] 신규한, 매우 보호적인 전-적혈구기 (PE) 플라스모디움 요엘리 (*Plasmodium yoelii*, Py) 항원, 인간 말라리아 백신에 사용하기 위해 확인된 인간 종분화적 상동체. 상기 항원은 사용된 명명법에 따라 PlasmoDB ID: PY06306, 또는 PY17X_0210400, PYYM_0211900 또는 ID: 2121.m00052으로 식별된다. 상기 항원은 또한 본 명세서에서 개시된 실험 검사에서 약칭으로서 E140 또는 Py E140로도 나타내어진다. 신규한 항원은 기생충의 포자소체, 간 단계, 및 혈액기 (blood stage)에서 크게 발현되며 플라스모디움 요엘리 방사선-약독 포자소체 (RAS)로 면역화된 마우스에서 CD8⁺ T 세포 반응을 유도한다. 이는 항원-특이적 백신 면역 시 강한 항체와 세포 반응을 발생시키며, 단독 그리고 마우스의 다른 항원과 조합하여 감염성 플라스모디움 요엘리 포자소체 및 혈액기 도발로부터 71% 내지 100% 멸균 보호 (sterilely protect)한다. 먼저, 백신 개발을 위한 항원을 찾기 위하여, 플라스모디움 요엘리 전-적혈구기 항원에 대해 플랫폼으로서 RAS-면역화된 마우스로부터의 T 세포에 대한 반응성을 스크리닝하였다. 상기 과정은 DNA 플라스미드 (VR1020)의 확인, 클로닝, 생성, Py 항원의 스크리닝 및 마우스 보호능에 대한 평가를 포함한다. 마우스 모델이 인간 종분화적 상동체의 성공을 가능할 수 있게 한다는 것이 잘 알려져 있다. PY06306 항원을 코딩하는 유전자가 백신 개발을 위한 전-적혈구기 표적으로 확인되었고 일부 유전자를 클로닝하였다. 이후 실험은 상기 단백질이 플라스모디움 요엘리 RAS로 면역화된 마우스에서 나타난 비장세포로부터의 사이토카인 (IFN-γ) 반응을 기억할 수 있음을 밝혔다. 이러한 결과는 PY06306 항원이 RAS 면역 반응 및 보호에 관여한다는 강한 증거를 제공하며, 따라서 인간에서 전-적혈구기 백신의 중요성을 보여준다.

실시예 2: E140 보호 확인

[0052] 마우스에서의 보호 연구를 위하여 PY06306 항원을 발현하는 2개의 백신 시약을 제조하였다. 이 시약들은 전장 유전자를 이용하여 제조하였다: VR1020 플라스미드 (PY06306-E140) 및 아데노바이러스 혈청형 5 (AdE1(t.PY06306)E3(10X)E4(TIS1)) 내의 DNA 백신. PY06306 항원에 대한 백신으로서의 가능성에 대한 증거는, 감염성 Py 포자소체 도발로부터 마우스를 멸균 보호할 수 있는 면역 반응을 유도하는 항원의 능력을 평가하도록 의도된 2개의 독립적인 동물 매트릭스 연구에서 나타났다. 멸균 보호는 포자소체 도발 후 14 또는 17일까지 마우스의 혈액 내 기생충이 없는지에 의해 측정하였다. 이중 교배 CD1 마우스는 먼저 DNA 백신 (100 μg, IM)으로 이루어진 일차 면역과 6주 후의 아데노바이러스 혈청형 5 컨스트럭트 (10^{10} PU, IM)를 이용한 부스팅으로 이루어지는 요법을 이용하여 면역하였다. 플라스모디움 요엘리 포자소체 단백질 (PyCSP)과 함께 그리고 PyCSP 없이 PY06306 항원 및 다른 새로운 Py 전-적혈구기 항원을 테스트하기 위하여 3-항원 조합 전략 (매트릭스로 불리움)을 취하였다.

[0053] 도 1에 나타난 제1 매트릭스 동물 연구는 유의한 보호를 나타내는 2개의 PY06306-함유 항원 조합 (그룹)을 보여준다. 제1 조합은 단독 그리고 PyCSP와 함께 각각 64% 그리고 86%의 멸균 보호를 유도하였다. 상기 제1 조합의 항원 성분은 E140 (PY06306), E137 (PY05693) 및 E057 (PY03396)이었다. PyCSP와 조합된 3-항원 혼합물에 의한 86%의 보호는 PyCSP 단독 그룹 (43%)에 비해 2배 높았는데, 이는 상기 최적 표준의 백신의 효능이 유의하게 향상되었음을 나타낸다. 제2 3-항원 조합은 단독 그리고 PyCSP와 함께 각각 14% 그리고 71%의 멸균 보호를 나타내었다. 상기 제2 조합은 백신 가능성을 갖는 2개의 추가적인 항원인 Py325 (PY00232) 및 PyCeITOS (PY17X_1434600)와 조합된 E140 (PY06306)으로 이루어졌다. 대응되는 도면에 나타난 것과 같이 이들 5개의 항원 (PY06306, PY05693, PY03396, PY325, 및 PyCeITOS) 중 임의의 것 또는 모두가 보호능에 기여하나, PY06306만이

3개 항원 조합 모두에 공통적인 유일한 항원이었으며, 이에 따라 이들 항원 조합의 디콘볼루션 (deconvolution)을 위한 제2 실험이 필요하다.

[0055] 실시예 3: 포자소체 도발

PY06306을 공통 분모 항원으로 갖는 여러 항원 조합을 평가하기 위하여 제2 연구 (매트릭스 디콘볼루션 실험 2)를 설계하였다. 실험 형식 및 면역화는 제1 매트릭스 실험에 대해 기술된 것과 동일한 요법을 따랐다. 도 1 및 도 2는 보호된 마우스의 범위가 71% 내지 100%로, PY06306 (E140) 항원을 포함하는 모든 항원 조합의 현저히 높은 효능을 보여준다. 전반적으로, PY06306-면역화된 마우스의 89% (137/154)가 말라리아 감염으로부터 보호되었다. PY06306 백신 단독은 71%의 보호능을 나타냈으며, 이는 PyCSP 단독 그룹 (36%)과 비교할 때 유의하게 높았다. 나아가, 도 3에 나타난 것과 같이 비-보호된 마우스에서 기생충혈증 (parasitaemia) 개시에 상당한 지연이 있었다. PY06306-면역화된 그룹의 혈액 도말 데이터에 대한 세밀한 분석 결과, 비-보호된 마우스 4마리 중 3마리는 포자소체 도발 7, 10 및 12일 후 말라리아에 양성을 나타내었다. 이는 PyCSP, 4X Null, 및 미경험 (Naive) 그룹의 기생충혈증 개시와 비교할 때 유의미한 것이며, 비보호된 마우스 모두가 포자소체 도발 후 5일째에 말라리아에 양성을 나타내었다.

[0057] 실시예 4: 항체 역가

PY06306 항원은 개별 마우스에 따라 플라스모디움 요엘리 포자소체 단계에 대해서는 높은 항체 역가를, 혈액기에 대해서는 낮은 항체 수준을 유도하였다. 이러한 증거는 매트릭스 디콘볼루션 실험 2에서 마우스로부터 수집된 혈청에서 측정된 포자소체 및 혈액기 기생충에 대한 면역 형광 (IFA) 항체 역가를 나열한 도 4 (PYQ6306 그룹)에 나타났다. 요약하면, 항-포자소체 항체는 조합을 포함하여 PY06306으로 면역화된 모든 그룹에서 검출되었으며, 이는 PY06306 항원의 면역원성을 뒷받침한다. 역가는 1:5,120 내지 1:20,480 범위이다. 플라스모디움 요엘리 PY06306 면역화에 의해 유도된 항체는 플라스모디움 베르게이 포자소체에 대해 교차 반응한다. PY06306 단독으로 면역화한 마우스에서의 높은 항원 역가 (1:5,120)의 검출은 PY06306 항원이 포자소체에 대한 항체를 유도함을 보여준다.

[0059] 상기 데이터를 검토한 결과를 토대로 한 2가지 중요한 발견은: (i) 도 2에서 PY06306 (PY03396 및 PY05693)이 없는 항원 그룹에 대해 보호가 나타나지 않았고 (0%) 항체 반응이 없다는 것이다. 이는 PY06306이 보호를 유도하는 이러한 조합에서 유일한 성분이 아니라면, 그의 주요 성분임을 확인해준다. 다른 하나는 (ii) 항-포자소체 항체 반응이 PY06306 항원에 의해 특이적으로 유도되었다는 것이다. 보호된 마우스와 비-보호된 마우스에 대한 항-포자소체 IFA 역가의 비교 결과는, 이러한 마우스에서 검출된 항체가 보호 결과와 연관성이 있음을 강하게 시사한다. 모든 보호 연구는 동물 프로토콜 D02-09 및 14-IDD-13 하에서 수행하였다. 상기 보호 연구에 대한 결과는 PY06306 종분화적 상동체가 말라리아 백신에서 중요한 성분으로서 역할을 함을 입증한다.

[0060] 실시예 5: 비장 및 간 분석

[0061] 추가적인 연구는 PY06306-면역화된 마우스의 비장에서 IFN γ 를 발현하는 10% 초파의 CD8+ T 세포 및 더 적은 (0.6% 미만의) CD4+ T 세포를 보여주었다. 간에서는 5% 내지 16.2% 범위로 관측되었다. 2번쩨 포자소체 도발 이후 11주 동안 높은 보호 효능이 유지되었다. T 세포의 감소는, 높은 수준의 E140-특이적 T 세포가 마우스에서 보호에 요구되지 않음을 나타낸다. 나아가, PY06306 면역화는 비장과 간에서 IFN γ 를 발현하는 높은 수준의 CD8+ T 세포를 유도한다. CD1 및 BALB/c 마우스로의 항-PY06306 혈청 전달은 기생충혈증의 개시를 유의하게 지연시켰다. 또한 E140-혈청을 받은 마우스는 PY06306으로 면역화된 보호된 마우스와 비교할 때 유의하게 낮은 IFA 역가를 보였다. 포자소체 도발 전에 수집된 PY06306 혈청은 포자소체 단독에 반응하였다. 그러나, 도발 후에는 보호된 마우스 중 일부가 IFA에 의해 혈액기에 양성인 항체를 발달시켰다.

[0062] PY06306은 최대 100%의 CD1 및 BALB/c 마우스를 혈액기 도발로부터 멸균 보호한다 (도 11). PY06306에 의한 면역화는 88% (30/34)의 비-보호된 마우스에서 패혈증 (blood infection)을 방지하며 검출가능한 기생충혈증의 개시를 지연시킨다. 나아가, 항-PY06306 항체의 미경험 마우스로의 전달은 감염을 유의하게 지연시킨다. IFN γ 를 발현하는 높은 수준의 CD8+ T 세포가 PY06306-면역화된 마우스의 비장과 간에서 발견된다. 이의 감소는 멸균 보호를 감소시키지 않았다. PY06306-특이적 IFA 항체 역가는 보호와 관련이 있다.

[0063] 실시예 6: 생체내 (In vivo) T 세포 감소

[0064] 도 9는 생체내 T 세포 감소에 대한 연구 결과를 보여준다. 여러 그룹의 이종 교배 CD1 마우스를 면역화하였다. T 세포 감소를 표준 프로토콜에 따른 T 세포-특이적 단일클론 항체 주입에 의해 수행하였다. 이후 마우스를 300개의 플라스모디움 요엘리 포자소체에 의해 도발하였고, 보호능은 도발 후 19일째까지 박막 혈액 도말에서 기생

충이 없는지에 의해 평가하였다. T 세포가 감소된 모든 PY06306-면역화된 마우스가 보호되었는데, 이는 CD4+ 그리고 CD8+ T 세포 모두가 PY06306 보호에 필요하지 않음을 확인시키는 것이다. 포자소체 도발 후 13일째에 CD4/CD8 그룹 중 하나의 비-보호된 마우스의 혈액에서 말라리아가 검출된 반면, 다른 모든 마우스는 5일째에 도 말 표본 양성을 나타내었다. 70마리 중 총 68마리의 보호된 마우스가 면역화되어, 97%의 종합적인 효능을 보였다. 상기 연구는 포자소체 도발에 대응하여 전-적혈구기 항원에 의해 유도된 보호가 T 세포에 의존하지 않는다는 놀라운 매커니즘을 보여준다.

[0065] 실시예 7: 혈청 전달 연구

도 10A 및 10B는 CD1 및 BALB/c 마우스에서의 혈청 전달 연구를 보여준다. 상기 연구는 PY06306 (E140)에 의해 유도된 보호에서의 항체의 역할을 보여주었다. 연구 설계는 PY06306-면역화된 CD1 및 BALB/c 마우스로부터의 혈청을 수집하고 미경험 동물에 전달한 후 (1:1 비율), 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발시키는, 표준 혈청 전달 프로토콜을 따랐다. 포자소체로 도발하기 전 2일; 24시간, 및 6시간 동안 혈청 전달이 일어났다. 보호 결과가 CD1 마우스에 대해서는 도 10A에, BALB/c 마우스에 대해서는 도 10B에 도시된다. 도 10A 및 10B는 PY06306 백신으로 면역화된 마우스로부터의 혈청으로 멸균 보호가 전달되지 않았음 (CD1의 7% (14 중 1마리) 및 BALB/c의 0% (14 중 0마리))을 보여준다. 동일한 연구의 다른 임의의 그룹과 비교할 때 PY06306 혈청 수령자 (점선)로부터 모든 비-보호된 마우스에서 기생충혈증의 개시에 통계적으로 유의한 지연이 있었다 (Mantel-Cox ***, p=0.0001). 이는 항-PY06306 항체가 혈액 내 기생충 전개에 효과적인 영향을 미쳐 보호에 역할을 한다는 것을 보여준다. 공여자 CD1 (1:7,994) 및 BALB/c (1:18:549) 마우스와 비교할 때 수령자 CD1 (1:2,560) 및 BALB/c (1:575) 마우스의 유의하게 더 낮은 항체 역가는 이들 마우스가 왜 도발로부터 보호되지 않았는지를 설명한다.

[0067] 실시예 8: 비장 및 간에서 PY06306-특이적 CD8 T 세포의 검출

PY06306-특이적 CD8 T 세포는 PY06306-면역화된 마우스 및 미경험 마우스의 비장 및 간에서 발견된다. PY06306이 고분자라는 사실 때문에, 15mer 오버랩핑 웨티드는 전체 단백질에 걸쳐 2가지 풀 (pool)로 나누어진다; N-말단으로부터 웨티드를 포함하는 풀 A와 PY06306의 C-말단으로부터의 풀 B. T 세포를 인터페론 감마 (IFN γ)를 발현하는 CD8+ 세포에 대해 지정된 유세포 분석법으로 측정하고, 전체 T 세포 군집의 비율로 표시하였다. 데이터는 풀 A로부터의 웨티드만이 IFN γ CD8 세포를 기억할 수 있었음을 보여주며, 이는 PY06306 T 세포 에피토프가 항원의 N-말단에 한정되기 쉬움을 확인시켜 준다. IFN γ 를 발현하는 매우 높은 수준의 CD8+ T 세포가 PY06306-면역화된 마우스의 비장 (평균 18%)과 간 (평균 11%)에서 검출되었다. 세포내 사이토카인 염색의 경우, 비장세포 및 간-존재 T 세포를 PY06306-면역화된 마우스와 면역화되지 않은 (Null) 마우스로부터 표준 프로토콜을 이용하여 제조하고, 이어 최종 농도 2 μ g/ml의 PY06306 (E140) 웨티드 풀 A 및 B로 6시간 동안 자극하였다. 데이터는 LSRII 유세포 분석기 (BD Biosciences)를 이용하여 얻었고 FlowJo (Tree Star Inc.)를 이용하여 분석하였다.

[0069] 실시예 9: PY06306은 BALB/c 마우스에서 보호를 유도한다

PY06306 항원은 포자소체 도발에 대항하여 BAB/c 마우스 주를 효과적으로 보호한다. 그룹 당 14마리의 BALB/c 마우스를 1회분의 DNA로 면역화하고 PY06306, PYQ6306 + PyCSP, 및 PyCSP를 코딩하는 아데노바이러스 5로 증강시켰다. 면역화되지 않은 마우스와 미경험 마우스를 마우스 음성 대조군으로 사용하였다. 모든 마우스를 100개의 감염성 플라스모디움 요엘리 포자소체로 도발하고, 도발 후 17일 동안 기생충혈증을 검사 (Giemsa)-염색된 박막 도말법에 의해 모니터링하였다. 도발 시 모든 (100%) PY06306-면역화된 마우스가 멸균 보호된 반면 (PY06306 및 PY06306+PyCSP), PyCSP의 경우 57%가 보호되었다. 따라서 PY06306은 동종 교배 마우스 주를 보호 할 수 있으며, PyCSP 항원과 혼합하는 것이 PY06306의 보호를 저해하는 것은 아니다.

[0071] 실시예 10: PY06306은 혈액기 도발에 대해 보호를 유도한다

도 11은 혈액기 도발에 대한 PY06306 보호를 보여준다. PY06306 항원 단독 및 PyFalstatin과의 조합은 10,000 개의 혈액기 기생충을 이용한 긴급한 도발로부터 마우스를 보호한다. 본 연구에서, 마우스는 PY06306 단독 및 PyFalstatin과의 조합으로 면역화되고 플라스모디움 요엘리-감염된 적혈구로 도발되었다. 두 그룹의 마우스는 모두 100% 멸균 보호되었다 (검정 및 회색 막대). PyFalstatin 항원은 또한 PY03424로도 알려져 있다. 혈액기 도발에 대한 보호는 말라리아 백신의 중요한 특성으로, PY06306 백신에 의해 유도되는 제2 단계의 방어를 제공한다.

[0073] 실시예 11: 보다 적은 단일 용량의 코돈-최적화된 PY06306 Ad5를 이용한 보호

[0074]

도 12는 코돈-최적화된 아데노바이러스 5를 이용한 보호를 보여준다. 상기 연구는 포유류 세포에서의 발현을 위해 설계된, 코돈-최적화된 (co) PY06306 유전자를 이용하여 제조된 아데노바이러스 5 컨스트럭트를 평가하였다. PY06306 본래의 코돈 서열의 변화는 Ad5 바이러스에 의해 발현되는 아미노산 서열을 변화시키지 않는다. 연구는 본래의 (na) 그리고 코돈-최적화된 (co) 아데노바이러스 5 컨스트럭트에 의해 발현되는 PY06306 단백질의 시험관내 (*in vitro*) 발현을 검사하고 비교하였다. 마우스 다클론성 혈청으로 탐침한 후, coPY06306 Ad5는 본래의 컨스트럭트와 비교할 때 훨씬 더 높은 수준의 PY06306 단백질을 발현하였다. 마우스 제1 그룹에서, 증강 용량을 본래의 (na) 그리고 코돈-최적화된 (co) PY06306 Ad5에 대하여 용량 당 10^1 , 10^2 , 10^3 및 10^4 PU의 범위로 적정하였다. 이들 8개 그룹의 모든 마우스는 동일한 coPY06306 DNA 백신 용량 (100 μ g)으로 일차 면역하고 다양한 용량의 naPY06306 (검정색 막대)과 coPY06306 (회색 막대) Ad5 컨스트럭트로 근육내 (IM) 증강시켰다. 전반적인 효능은, 동일한 Ad5 용량에 대하여 CD1 마우스에서 na PY06306이 보다 낮은 보호를 나타낸 것 (86%, 93%, 86% 및 71%)과 비교할 때, co PY06306 Ad5 백신은 보다 높은 보호를 유도함 (100%, 100%, 86% 및 93%)을 보여준다. 상기 연구는 또한 Ad5 투여에 대해 피하 (SC) 그리고 정맥내 (IV) 경로를 비교하였다. SC 경로는 na 와 co PY06306 백신에서 유사한 보호 수준을 나타내었다 (각각 50 그리고 57%). co PY06306 Ad5에 대한 IV 경로는 100% 멸균 보호를 야기한 반면, na는 79%를 나타내었다. na PY06306 Ad5에 대한 IV 경로는 79% 멸균 보호를 야기한 반면, 피하 경로는 50% 보호를 야기하였다. 단일 용량의 coPY06306 Ad5로 면역화한 마우스 그룹은 naPY06306 백신의 경우 29%인 것과 비교할 때, 93% 멸균 보호를 유도하였다. 이들 마우스는 DNA 백신 일차 면역을 하지 않았다. 모든 보호 연구는 동물 프로토콜 D02-09 및 14-IDD-13 하에서 수행하였다.

[0075]

실시예 12: 인간 플라스모디움 팔시파룸은 면역원성을 가진다

[0076]

도 13은 플라스모디움 팔시파룸 PFA0205w (E140 종분화적 상동체)이 마우스에서 면역원성을 가짐을 보여준다. 4 개의 백신 시약을 PFA0205w (PF3D7_0104100로도 알려짐)에 대해 생성하였다: VR1020 DNA 백신 컨스트럭트, 인간 아데노바이러스 5 컨스트럭트, 단백질 발현 플라스미드 pEU-E01-GST, 및 pEU-E01-His. DNA 백신과 Ad5는 마우스 면역을 위해 대량으로 제조하였다. 재조합 단백질을 NMRC에서 맥아 무세포 시스템에 의해 소규모로 생산하였다. 도 13에 도시된 것과 같이 CD1 그리고 BALB/c 마우스를 다양한 일차 면역-증강 요법을 이용하여 면역화시켰다. Ad5 일차 면역 및 재조합 단백질 증강은 가장 면역원성이 큰 요법으로, 플라스모디움 팔시파룸 혈액 및 포자소체 단계의 기생충에 대한 IFA 역가를 1:4,000까지 유도한다. 단일 용량의 PFA0205w 아데노바이러스 5는 기생충에 대해 항체를 유도한다. 이는 PFA0205w가 단일 용량의 재조합 바이러스 (아데노바이러스 5)로서 또는 Ad5-단백질 요법을 이용한 일차 면역-증강으로서, 백신 제제로의 성공 가능성이 있음을 보여준다.

[0077]

실시예 13: 인간에서 플라스모디움 팔시파룸 E140 (PFA0205w)은 면역원성을 가진다

[0078]

도 14는 플라스모디움 팔시파룸 E140 (PFA0205w)이 인간에서 면역원성을 가짐을 보여준다. 방사선-약독 포자소체 (RAS)로 면역화된 개별 개체로부터의 T 세포는 PFA0205w 웨티드 풀 (A)에 의한 자극에 반응할 수 있었다. 웨티드 혼합물은 PFA0205w 단백질 중 대부분의 N-말단 영역을 아우르는 15mer 오버랩핑 웨티드를 포함하였다. 단백질이 크기 때문에, 웨티드는 2개의 풀로 나누어진다; PFA0205w 단백질의 N-말단에 결친 풀 A 그리고 C-말단에 결친 풀 B. 두 그래프의 데이터는 약독 포자소체 백신을 이용한 면역화가 인간에서 CD4 및 CD8 T 세포 모두를 유도함을 나타내었다. CD4+ 및 CD8+ T 세포는 전-적혈구기 기생충에 대항하여 PFA0205w-유도된 보호에서 역할을 한다. E140-면역화된 마우스의 비장과 간에서 높은 수준의 플라스모디움 요엘리 E140 반응이 나타난다.

[0079]

실시예 14: PFA0205w는 열충에서 발현되며 포자소체의 표면 및 세포 기질에 편재화된다

[0080]

PFA0205w 항원은 플라스모디움 팔시파룸의 포자소체 및 열충 단계에서 모두 발현된다. IFA 반응성은, PFA0205w 아데노바이러스 5로 일차 면역하고 재조합 PFA0205w 단백질로 증강하여 생성된 CD1 마우스 혈청을 이용하여 얻었다. 상기 혈청은 36-시간의 플라스모디움 팔시파룸 적혈구기 열충에 대해 양성을 나타내었고, 초기 환 단계 및 영양체에 대해서는 음성을 나타내었다. 포자소체에서 PFA0205w 항원의 세포 내 편재화가 면역 전자 현미경법 (EM)에 의해 확인되었다. 전자 현미경 사진의 분석 결과 PFA0205w 항원이 플라스모디움 팔시파룸 포자소체의 표면과 세포 기질 모두에 편재화된 것으로 나타났다. 면역 형광 및 면역 전자 현미경법은 PFA0205w 아데노 5로 면역화되고 재조합 PFA0205w 단백질로 증강된 CD1 마우스로부터의 혈청의 반응성을 보여주었다. 자연건조된 IFA 슬라이드를 적혈구 세포 공격 이후 약 36시간 동안 NF54 플라스모디움 팔시파룸 기생충을 이용하여 제조하였다. IFA를 1:500 혈청 희석액으로 수행하고 FITC-표지된 염소 항-마우스 Ig로 전개하였다. 면역 EM의 경우, 플라스모디움 팔시파룸 포자소체-포함 침샘을 감염된 모기로부터 분리하였다. 고정된 침샘을 삽입, 절단하여, 전자 현미경 격자 상에 올리고 동일한 혈청과 콜로이드성 금-표지된 항-마우스 항체를 사용하여 염색하였다. 현미경 사진은 PFA0205w 항원이 플라스모디움 팔시파룸 포자소체의 표면과 세포 기질 모두에 편재화되었음을 보여주었다.

[0081]

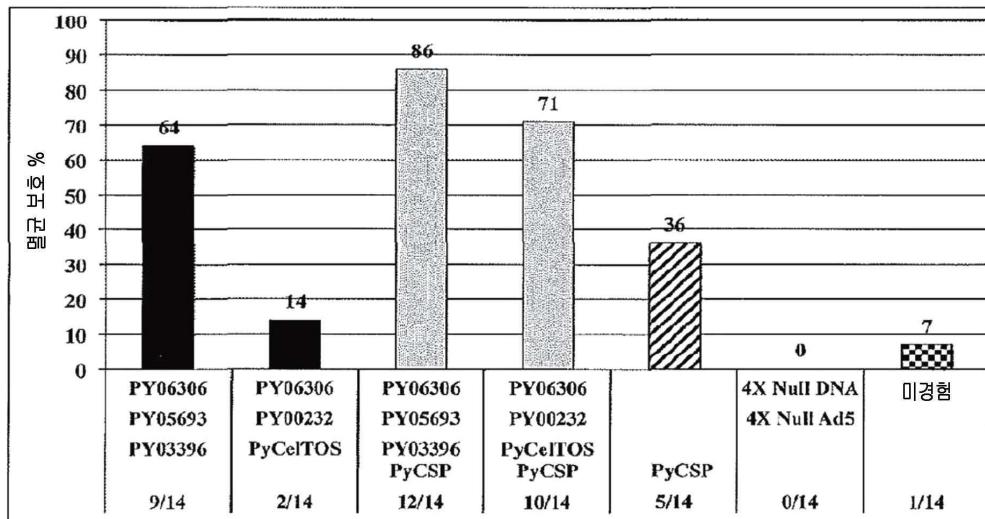
실시예 15: PVX_081555 (PvE140)는 플라스모디움 비박스 포자소체에서 발현된다

[0082]

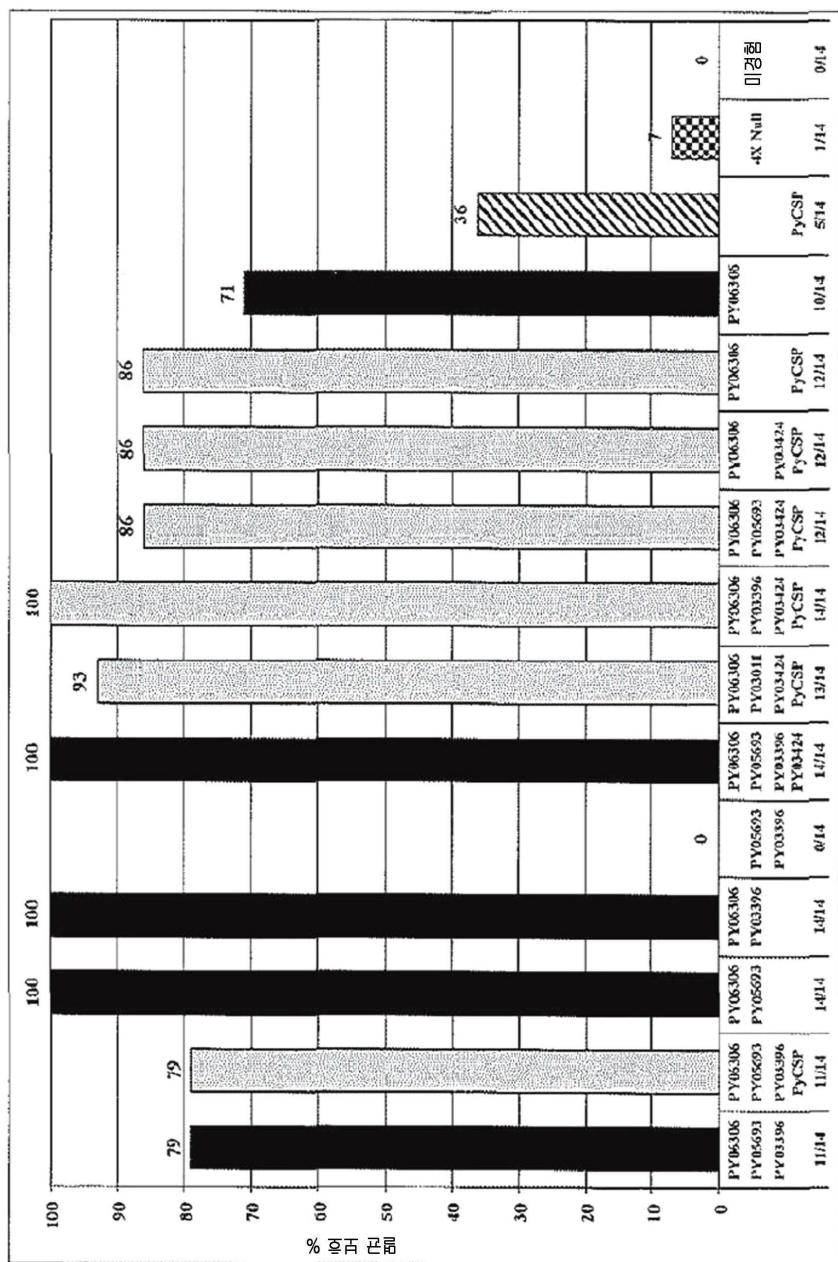
도 15는 PVX_081555 (PvE140)가 플라스모디움 비박스 포자소체에서 발현됨을 보여준다. 아노펠레스 디루스 (*Anopheles dirus*) 모기에 플라스모디움 비박스 말라리아에 감염된 환자의 혈액을 막 공급장치를 통해 공급하였다. 막 공급한지 14일 후, 모기 침샘을 100마리의 모기로부터 추출하였다. 침샘을 인산-완충된 염류를 포함하는 마이크로원심분리 퓨브에서 막자를 이용하여 부수고, 플라스모디움 비박스 포자소체를 유리시켰다. 이후 침샘 파편-포자소체 혼합물을 원심분리하여 모기 침샘 파편을 제거하고, 상등액으로부터 플라스모디움 비박스 포자소체를 새로운 마이크로원심분리 퓨브로 이동시켰다. 추출된 플라스모디움 비박스 포자소체를 계수하고 1×10^6 의 포자소체를 1 ug의 분자 생물학 수준의 트립신을 이용하여 섭씨 37도에서 18시간 동안 분해하였다. 분해 이후, 트립신 분해 포자소체 웨티드를 C8 역상 컬럼으로 탈염하고 동결건조하였다. 백신 후보가 될 수 있는 플라스모디움 비박스 포자소체 단백질을 확인하기 위해 상기 동결건조된 트립신 분해 웨티드에 다-차원-단백질-확인 기술 (MudPIT)을 가하였다. 조합된 아노펠레스-플라스모디움 비박스 단백질 서열 데이터베이스에 대해, Sequest 알고리즘을 이용하여 플라스모디움 비박스 포자소체로부터 생성된 탄뎀 질량 스펙트럼을 조사하였다. Sequest 조사로부터의 결과 파일을 스캐폴드 단백질 뷰어에 로딩하였다. 아노펠레스 단백질체에 매칭시킨 서열을, 플라스모디움 비박스 단백질체에 특히 매치되는 단백질을 강조하기 위하여 스캐폴드 프로그램을 이용하여 제외하였다. MudPIT에 의해 확인된 각 플라스모디움 비박스 포자소체 단백질의 풍부도를 비교하기 위하여 스캐폴드 소프트웨어를 사용하였다. 단백질의 풍부도는, 지정된 단백질을 그 단백질의 분자량에 대해 매칭시키는 질량 스펙트럼의 풍부도를 정규화하는 스캐폴드 "정량 값"에 의해 정의되었다. 256개의 고-신뢰 플라스모디움 비박스 단백질이 본 MudPIT 실험에서 확인되었다. 플라스모디움 비박스 E14Q (PVX_081555)는 플라스모디움 비박스 포자소체 단백질 중 39번째로 풍부하며, 서열분석된 막-연관 단백질 중 5번째로 풍부하였다. 비교해보면, 기생충 막에 역시 연관되어 있는 CSP 백신 항원은 전체적으로 5번째로 가장 풍부한 단백질이며, 샘플 내에서 가장 풍부한 막-연관 단백질이었다. 상기 결과는 플라스모디움 비박스 E140가 기생충 내에서 가장 풍부한 막-연관 단백질임을 보여준다. 따라서 E140의 막 연관 및 풍부함으로 인해 E140이 체액성 반응의 두드러진 표적이 된다.

도면

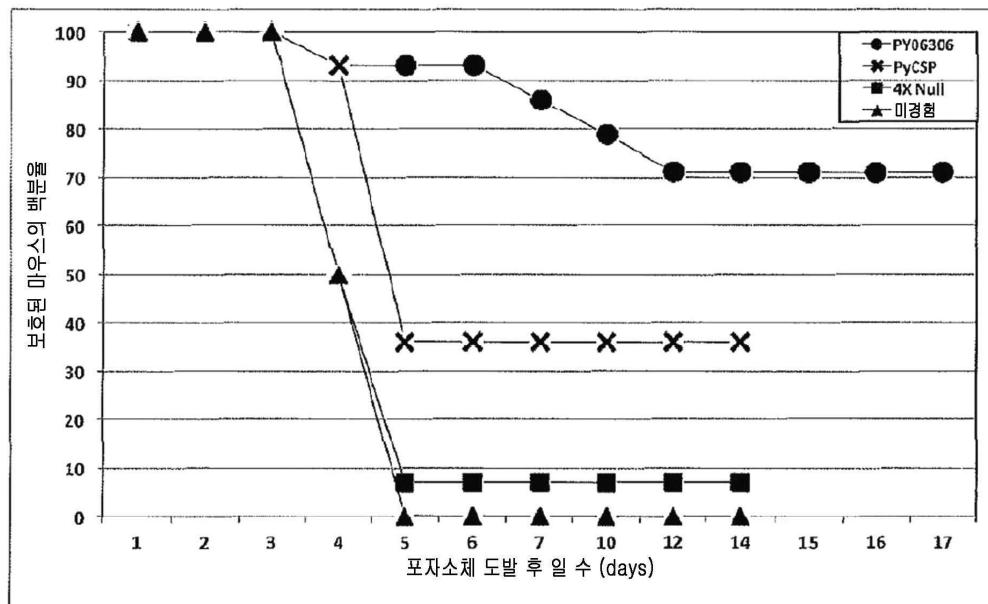
도면1



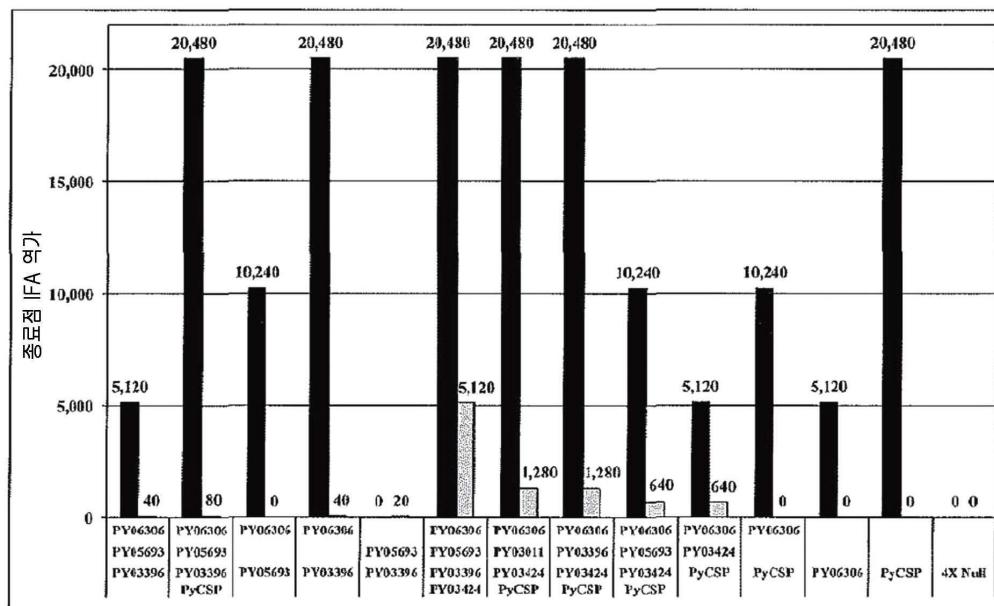
도면2



도면3



도면4



도면5

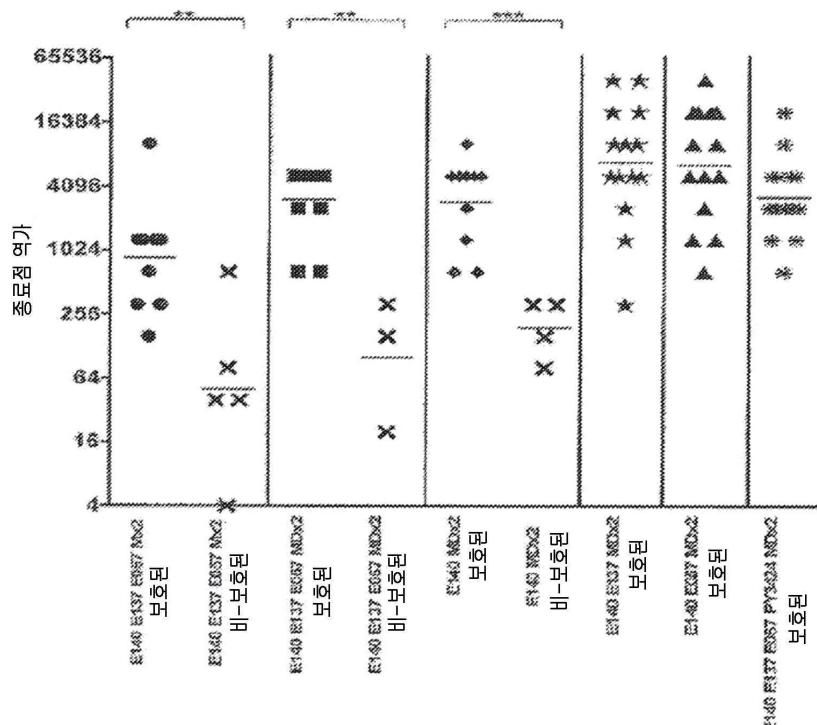
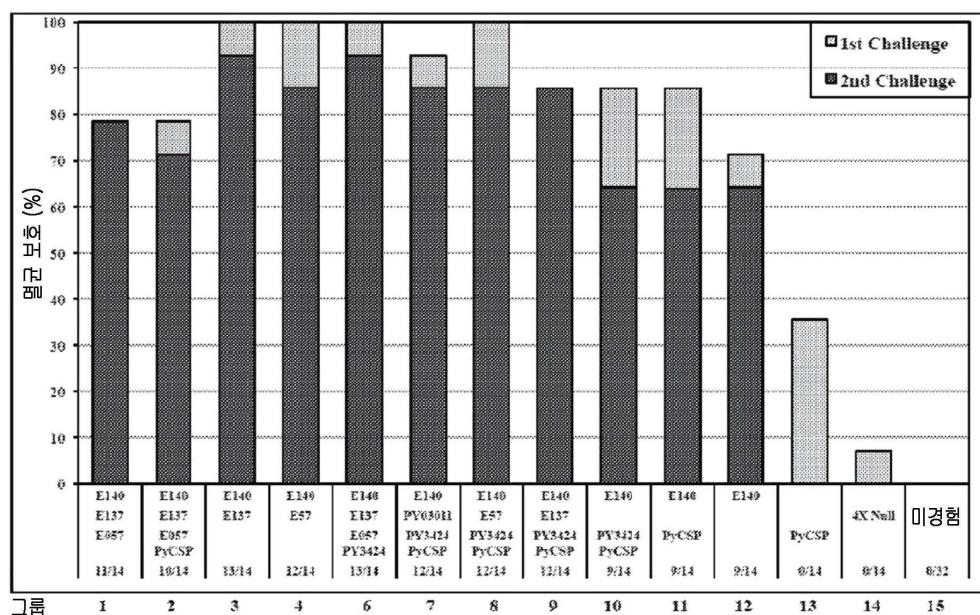


FIG. 5

도면6

E140은 오래 지속되는 보호를 유도한다 (11주차)
디콘볼루션 연구 - 2번의 도발로부터 조합된 보호



도면7

플라스모디움 종 중의 E140 항원 상동성

| | Pf E140 | Pv E140 | Py E140 | Pb E140 | Pc E140 | Pk E140 | Pr E140 | Pg E140 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Pf E140 | --- | | | | | | | |
| Pv E140 | 43% | --- | | | | | | |
| Py E140 | 35% | 37% | --- | | | | | |
| Pb E140 | 36% | 36% | 86% | --- | | | | |
| Pc E140 | 37% | 37% | 67% | 67% | --- | | | |
| Pk E140 | 43% | 78% | 36% | 36% | 34% | --- | | |
| Pr E140 | 92% | 43% | 35% | 35% | 37% | 43% | --- | |
| Pg E140 | 81% | 44% | 34% | 35% | 35% | 43% | 82% | --- |

Pf - 플라스모디움 팔시파룸
 Pv - 플라스모디움 비박스
 Py - 플라스모디움 요엘리
 Pb - 플라스모디움 베르게이
 Pc - 플라스모디움 카바우디
 Pk - 플라스모디움 노우레시
 Pr - 플라스모디움 라이호노위
 Pg - 플라스모디움 가보니

도면8

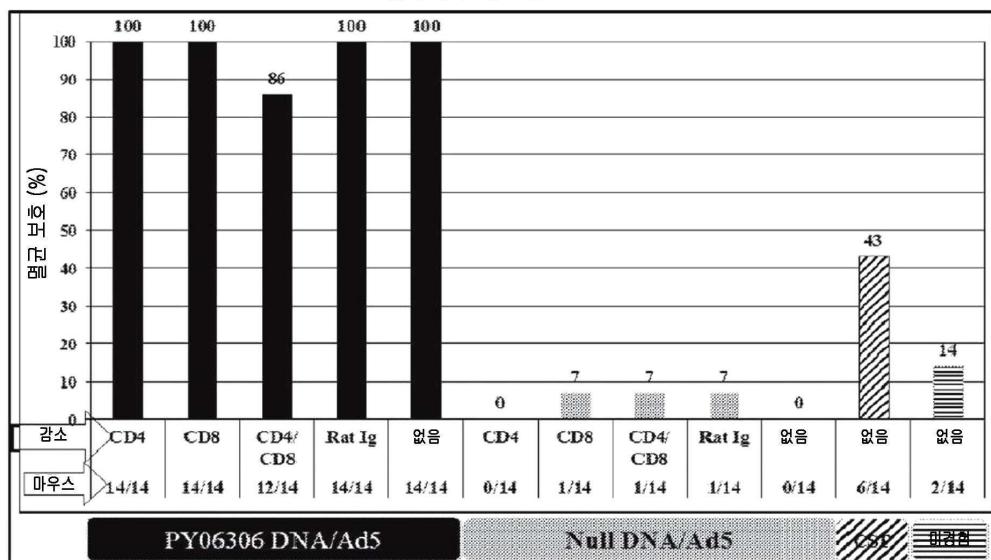
E140 항원은 플라스모디움 팔시파룸 주에서 매우 보존되었다

| | 3D7 | UGT5.1 | 7G8 | 말리 | UGPA | HB3 | 산타 루치아 | IGH-CR14 | FCH/4 | NFI35/S. C10 | 탄자니아 | FVO |
|---------------------------|-----|--------|-----|-----|------|-----|--------|----------|-------|--------------|------|-----|
| 3D7* | --- | | | | | | | | | | | |
| UGT5.1** | 98% | — | | | | | | | | | | |
| 7G8 (Brazil) | 97% | 97% | --- | | | | | | | | | |
| Mali PS096 | 97% | 99% | 96% | --- | | | | | | | | |
| UGPA*** | 97% | 97% | 97% | 98% | --- | | | | | | | |
| HB3 (온두라스) | 97% | 97% | 98% | 98% | 98% | --- | | | | | | |
| 산타 루치아**** | 97% | 97% | 97% | 98% | 98% | 98% | — | | | | | |
| IGH-CR14 ⁵ | 97% | 96% | 96% | 97% | 97% | 97% | 97% | — | | | | |
| FCH/4 ⁶ | 97% | 98% | 97% | 98% | 97% | 98% | 99% | 96% | — | | | |
| NFI35/S. C10 ⁷ | 97% | 98% | 97% | 99% | 98% | 98% | 99% | 96% | 99% | — | | |
| Tanzania | 93% | 93% | 94% | 92% | 93% | 93% | 93% | 92% | 93% | 93% | — | |
| FVO (베트남) | 96% | 96% | 95% | 97% | 96% | 96% | 98% | 95% | 98% | 98% | 95% | — |
| Dd2 (인도차이나) | 97% | 96% | 97% | 94% | 96% | 96% | 96% | 94% | 96% | 96% | 98% | 96% |

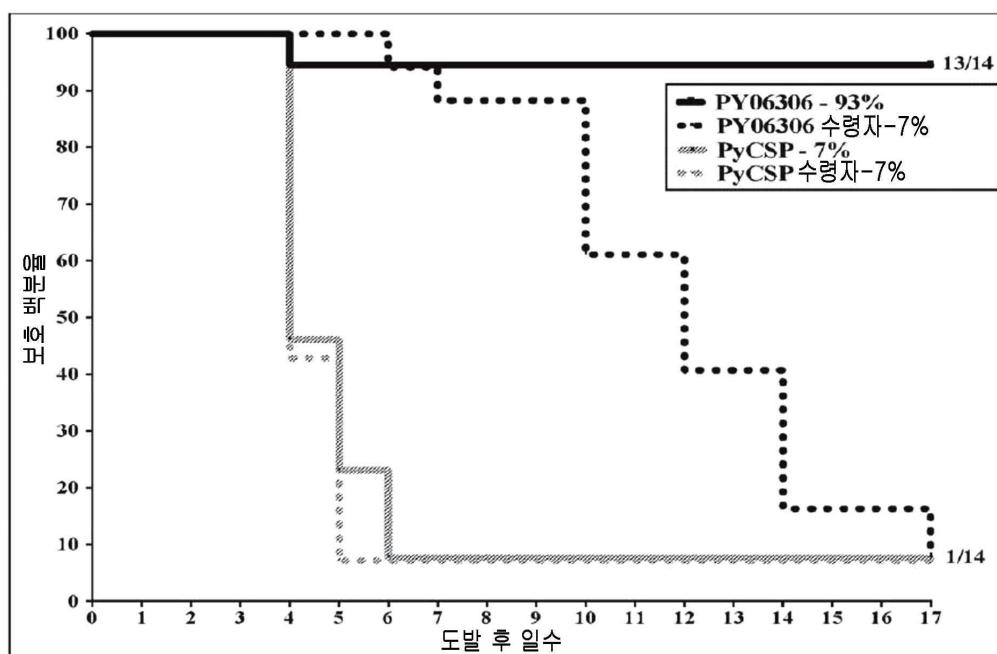
* - 네덜란드
 ** - 우간다
 *** - 우간다/팔로알토
 **** - 엘살바도르
 Ⓜ - 인도 (로우르길라, 오리사)
 Ⓝ - 필리핀
 Ⓞ - 캄보디아 (CHMI)

도면9

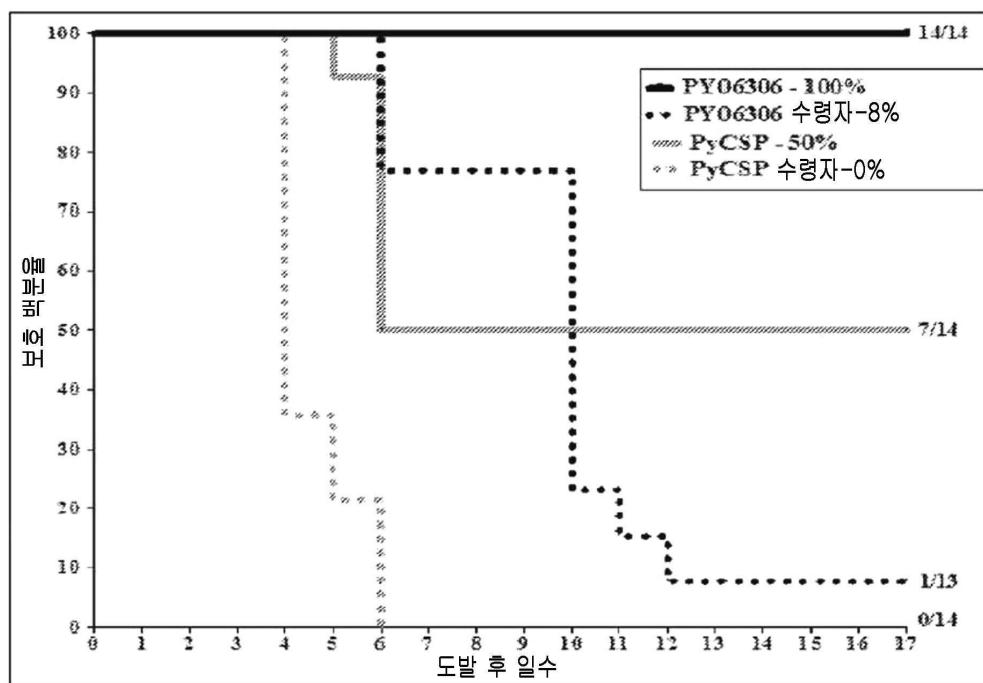
생체내 T 세포 감소



도면10a

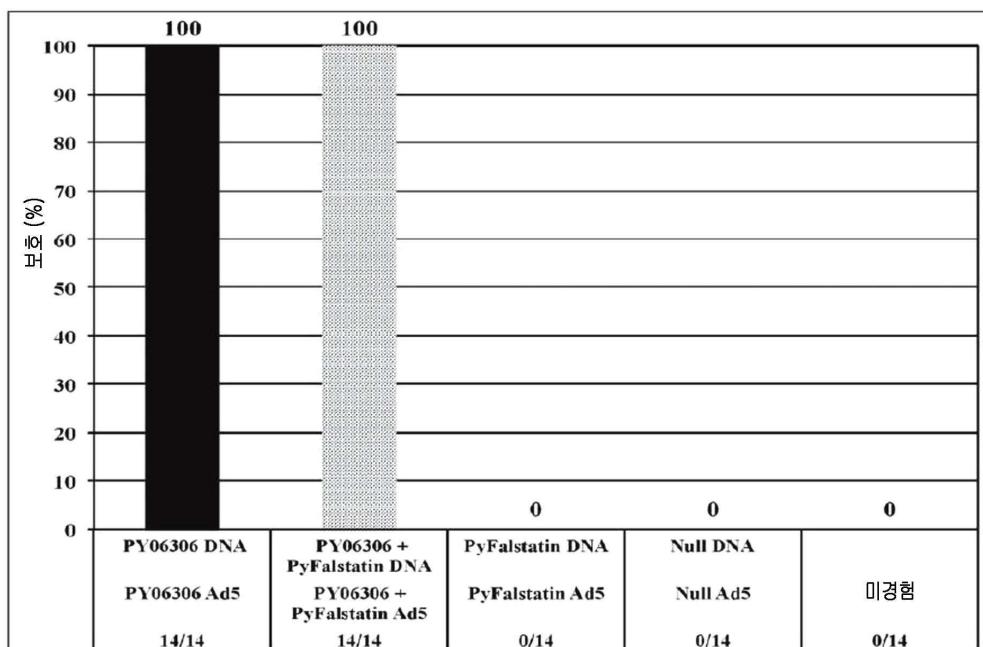


도면10b



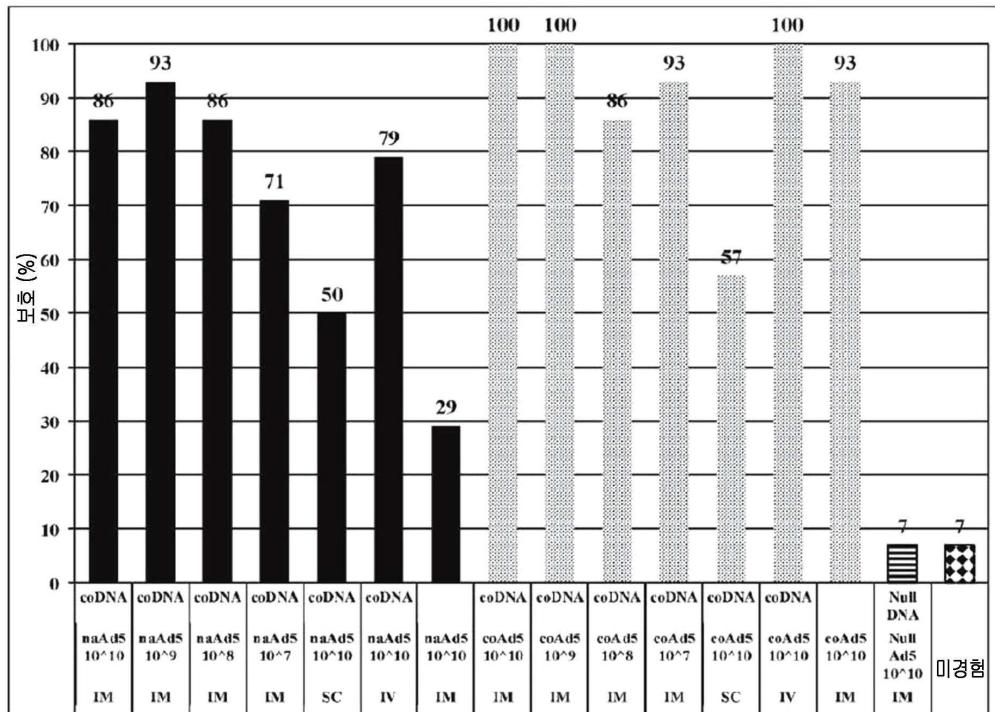
도면11

PY06306는 혈액기 도발에 대해 보호를 유도한다



도면12

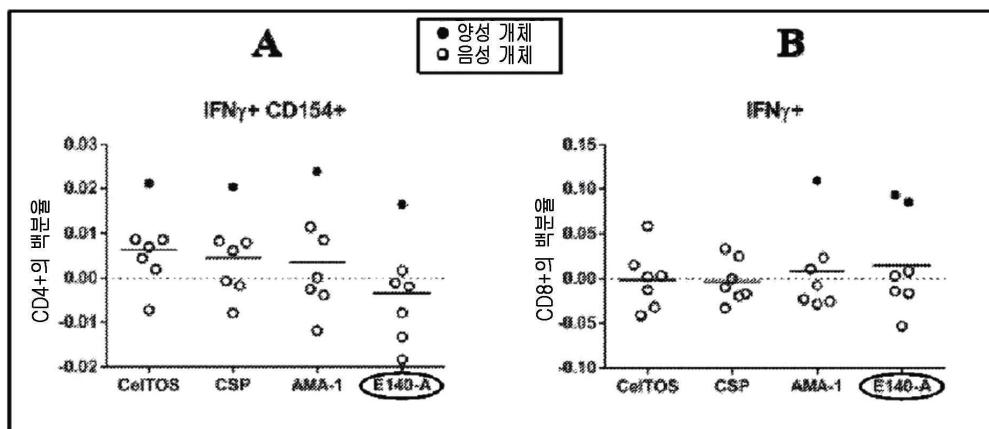
보다 적은 단일 용량의 PY06306 코돈-최적화된 Ad5를 이용한 보호

**도면13**

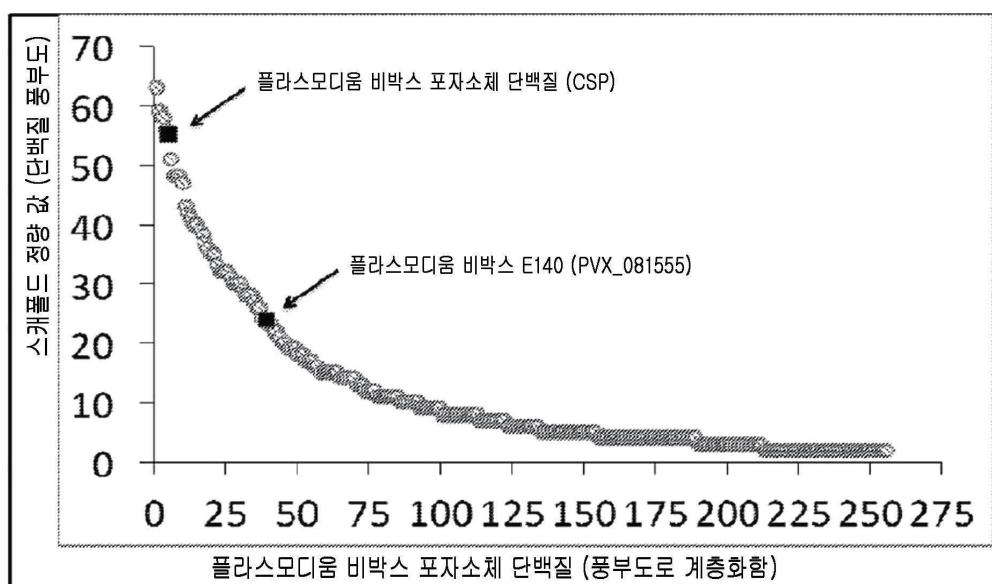
플라스모디움 팔시파룸 PFA0205w (pfE140)는 마우스에서 면역원성을 가진다

| 백신 | CD1 IFA 역가 | | BALBc IFA 역가 | |
|----------------------|------------|------|--------------|-----|
| | 포자소체 | 혈액기 | 포자소체 | 혈액기 |
| PFA0205w DNA/Ad5 | 음성 | 음성 | 250 | 음성 |
| PFA0205wDNA/Ad5 | 20 | 음성 | 250 | 음성 |
| PFA0205w Ad5/GST 단백질 | 1000 | 500 | 1000 | 250 |
| PFA0205w Ad5/GST 단백질 | 2000 | 4000 | 500 | 음성 |
| PFA0205w DNA x3 | 음성 | 음성 | 250 | 음성 |
| PFA0205w DNA x3 | 음성 | 음성 | 250 | 비첨가 |
| PFA0205w His 단백질 | 음성 | 음성 | 비첨가 | 음성 |
| PFA0205w His 단백질 | 음성 | 음성 | 비첨가 | 음성 |
| PFA0205w GST 단백질 | 음성 | 20 | 250 | 20 |
| PFA0205w GST 단백질 | 음성 | 20 | 음성 | 250 |

도면14



도면15



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CAMRIS INTERNATIONAL, INC.

<120> NOVEL ANTIGEN FOR USE IN MALARIA VACCINE

<130> IPA180945-US

<140> PCT/US2017/017722

<141> 2017-02-13

<150> US 62/296,464

<151> 2016-02-17

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 816

<212> PRT

<213> Plasmodium yoelii

<400> 1

Met Gly Asp Val Asp Asn Val Leu Ile Ser Ile Lys Lys Ile Glu Ser

1 5 10 15

Ile Lys Ser Gln Leu Asn Gln Leu Asn Lys Ile Ile Gln Asn Glu Phe

20 25 30

Gly Ser Tyr Cys Gly Arg Lys Asn Arg Ser Ile Asn Leu Glu Ile His

35 40 45

His Asn Glu Phe Asp Lys Ser Ile Phe Lys Arg Leu Tyr Ser Ser Trp

50 55 60

Arg Met Glu Asp Leu Asn Asn Phe Asn Gly Lys Ser Val Ile Lys Ile

65 70 75 80

Met Glu Arg Asn Pro Tyr Val Ile Phe Phe Phe Phe Ile Met Ile

85 90 95

Phe Ile Ile Val Tyr Leu Ile Ser Phe Ile Leu Tyr Thr Lys Trp Phe

100 105 110

Lys Lys Leu Leu Lys Lys Phe Ser Asn Ser His Lys Asn Asn Lys Asp

115 120 125

Lys Glu Glu Asp Trp Val Lys Lys Asn Lys Ala Tyr Arg Asn Ser Asn

130 135 140

Ser Thr His Gly Thr Ile Asn Lys Asp Asn Tyr Asn Gln Glu Leu Asp

145 150 155 160

Glu Leu His Asn Ser Asp Glu Asn Glu Glu Asn Ser Asn Val Ile Asn

165 170 175

Ile Val Lys Lys Arg Ala Tyr Asn Leu Val Ile Asn Leu Ile Val Cys

180 185 190

Ser Phe Leu Ile Cys Leu Ile Phe Leu Gly Ile Trp Thr Ile Phe Ile

195 200 205

Phe Ala Asp Thr Gln Lys Gly Ile Asn Met Asn Ile Cys Gly Leu Ser

| | | |
|---|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
| Lys Thr Val Glu Gln Phe Leu Ile Asp Lys Cys Pro Asp Thr Lys Asn | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Val Asn Pro Gln Cys Tyr Ser Leu Glu His Val Ile Asn Asp Ala Val | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Ser Val Met Asn Gln Tyr Gln Leu Thr Lys Glu Phe Val Lys Asn Lys | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Thr Asn Leu Asn Lys Asn Lys Gly Leu Pro Ile Val Leu Lys Tyr Gln | | |
| | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Gly Phe Asn Met Leu Ala Lys Leu Arg Asp Asn Ile Asp Lys Asn | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Val Lys Lys Leu Glu Asn Gly Tyr Leu His Thr Tyr Pro Val Leu Thr | | |
| 305 | 310 | 315 |
| 320 | | |
| Lys Leu Arg Phe Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Gly Glu Asn Leu | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Leu Asn Gln Ala Glu Ser Ile Ile Asp Ser Ser Lys Glu Glu Ile Gly | | |
| | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Ile Phe Asn Asn Val Asp Asn Ala Ile Ala Asn Thr Val His Asn | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Asn Val Pro Ser Leu Ser Ser Lys Ile Ser Gly Leu Gly Ile Tyr Ile | | |
| 370 | 375 | 380 |
| 385 | | |
| Lys Lys Gln Asp Glu Asn Leu Lys Ile Arg Tyr Ile Leu Asn Lys Phe | | |
| 390 | 395 | 400 |
| Thr Val Thr Met Ile Ile Leu Ser Ile Val Ile Leu Leu Phe Ser Leu | | |
| | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Val Leu Ile Gly Met Leu Ser Tyr Met Tyr Phe Leu Ile Arg Gly | | |
| 420 | 425 | 430 |
| His Ser Ile Asn Glu Lys Phe Phe Ser Lys Leu Leu Gly Phe Phe Ser | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Gly Thr Phe Gly Phe Leu Ala Ile Ile Leu Ile Ile Gly Thr Ala | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 450 | 455 | 460 |
| Leu Leu Ser Leu Ser Val Leu Gly Gly Thr Ser Cys Ile Ile Ser Asp | | |
| | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Arg Ile Leu Lys Asn Glu Phe Thr Phe Asp Phe Leu Ser Glu Asn Lys | | |
| | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Ile Gly Tyr Cys Leu Gln Asn Pro Asp Glu Ser Ile Ile Asn Lys Asn | | |
| | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Ile Val Lys Tyr Ala Asn Thr Leu Asp Ser Leu Asn Thr Asn Asp | | |
| | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Tyr Asn Ser Val Glu Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Lys Ile Lys | | |
| | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Asp Glu Tyr Lys Gln His Ser Lys Ile Ile Asn Glu Asn Met Trp Ile | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Ile Ile Pro Thr Asp Asn Asn Lys Tyr Val Lys Asn Val Lys Ser Asp | | |
| | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Ile Ile Lys Lys Ser Leu Leu Gly Thr Cys Leu Thr Lys Glu Ser Ala | | |
| | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Gln Phe Glu Glu Tyr His Leu Met Gly Thr Asp Ala Tyr Met Lys Tyr | | |
| | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Ile Asn Lys Phe Gly Leu Leu Asn Asn Tyr Glu Met Cys Phe Glu Asp | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Pro Ser Cys Glu Asn Asn Asp Arg Lys Tyr Asn Ile Asn Tyr Asn Ser | | |
| 625 | 630 | 635 |
| Lys Val Thr Asp Pro Lys Tyr Leu Asp Val Lys Arg Asn Arg Val Met | | |
| | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Phe Asp Asn Val Leu Glu Val Phe Ile Leu | | |
| | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Lys Ser Lys Ile Asn Asn Asp Lys Ile Phe Asn Ile Ser Asp Leu Asp | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ile Thr Trp Arg Glu Tyr Thr Pro Lys Asn | | |
| 690 | 695 | 700 |

Gly Ala Gly Glu Asn Lys Lys Ser Ile Val Gln Thr Tyr Phe Glu Lys

705 710 715 720

Ala Ile Glu Tyr Met Lys Phe Glu Asn Val Leu Thr Leu Leu Lys Glu

725 730 735

Val Asn Asn His Ile Asn Ser Phe Lys Asn Val Ile Ile Glu Lys Ala

740 745 750

Asn Ser Leu Val Asp Asn Thr Asn Cys Ser Arg Phe Ile Asn Val Leu

755 760 765

Thr Asn Ile Arg His Asn Tyr Cys Asp Asn Gly Ile Leu Lys Leu Thr

770 775 780

Arg Leu Ser Val Ile Leu Ile Ser Cys Gly Phe Val Ser Phe Cys Leu

785 790 795 800

Trp Tyr Leu Phe Leu Phe Phe Trp Ile Tyr His Gln Met Lys Ile Ile

805 810 815

<210> 2

<211> 2451

<212> DNA

<213> Plasmodium yoelii

<400> 2

| | |
|---|-----|
| atgggagacg ttgacaatgt gttataagt atcaaaaaaa tagaatcaat aaaaagccaa | 60 |
| ttaaaccagt taaacaaaat tatacaaaat gaatttgggt cttattgtgg gcgaaaaaat | 120 |
| agaagtataa atttgaaat acatcataat gaatttgata aaagtatatt caaacgttta | 180 |
| tattcatcat ggagaatgga agatcttaat aatttaacg ggaaaagtgt tataaaaata | 240 |

| | |
|---|-----|
| atggaaagaa atccatatgt tatattttt tttttttta taatgatttt tattattgtt | 300 |
| tattaattt catttatttt gtatactaaa tggttaaaaa aattttaaaa aaaattttcg | 360 |
| aattcacaca aaaataataa agataaagaa gaagattggg taaaaaaaaa taaagcttat | 420 |
| agaaattcta atagcacaca tggtactatt aataaggata attataatca ggaacttgat | 480 |
| gagcttcata atagtgtatga aatgaagaa aatagtaatg ttataaatat tgaaaaaaag | 540 |
| agagctata attagtaat taatttgata gtttgtctt ttcttatttg tcttattttt | 600 |
| ttggaaattt ggacaatatt tattttgca gatacacaaa aaggaattaa tatgaatatc | 660 |

| | |
|--|-----|
| tgtggattat caaaaacagt tgaacagttt cttattgata aatgcccgaa cacaaaaat | 720 |
|--|-----|

| | |
|---|------|
| gtaaatccac aatgttattc tttagagcat gttataatg atgctgttc agtaatgaat | 780 |
| cagtatcaac tcaccaaaga atttgtaaa aataaaacga atttgaacaa gaataaggc | 840 |
| ttgcctattg tttaaagta ccaaaccgga ttcaacatgc tagcaaaact tagagacaac | 900 |
| atagataaaa atgttaaaaa attagagaac ggatatctc acacatatcc agttiaaca | 960 |
| aaacttagat ttacttgga taaaattgtt tcgaaggag agaatctatt aaatcaggct | 1020 |
| gaatctatta ttgattcttc aaaagaagaa attggaaaaa tattcaataa tgtagataat | 1080 |
| | |
| gctatacgta atactgtaca taataatgtt ccgtctttat catcaaaaat aagtggatta | 1140 |
| ggaatatata taaaaaaaca agacgaaaat taaaaatac gatatatatt aaataaattt | 1200 |
| acagttacaa tgataatttt aagtatagtc atattattat tticattact tgtgttaata | 1260 |
| ggaatgttat ctatatgta ttttaata agaggccatt caataaatga aaaattttt | 1320 |
| tcaaaattac ttggaaaa tagtggaca ttggatttt tagcaattat aatttaata | 1380 |
| ataggtacgg cattattaag ttatctgtt ttgggtggaa caagttgtat tatactgtat | 1440 |
| cgaatattaa aaaatgaatt tactttgtat ttttaagcg aaaataaaaat tggttattgt | 1500 |
| | |
| ttacagaatc cagatgaatc tattttat aaaaatattt taaaaaaaata tgcaaacact | 1560 |
| cttgactctt taaatacaaa tgatatatat aatagtgtt aaggctatag tggttatttt | 1620 |
| gataaaatta aggtgaata taaacaacat tctaaaatta taaatgaaaa tatgtggata | 1680 |
| attattccta cagataataa taaatatgta aaaaatgtt aatcagatata tattaaaaaa | 1740 |
| tcattattag gaacatgtt aacaaaagaa agtgc当地 ttgaagagta tcatcttgc | 1800 |
| ggaacagatg ctatatgaa atatataat aaatttggtt tgctaaataa ttatgagatg | 1860 |
| tgtttgaag acccatcatg tgaaaataac gacagaaaa acaatatcaa ttataactct | 1920 |
| | |
| aaagttacag accaaaata tttgtatgtt aaacgtataa gagtcataat ttatcaagat | 1980 |
| agcgattttg ataatgtact tgaagtgttc atattaaaat caaaaattaa taatgataaa | 2040 |
| attttaata ttagcgattt agatgaaaca aagaagggaa atataacatg gagagaatata | 2100 |
| acaccaaaaa atggagccgg agaaaataaa aatctattt ttcaacataa ttttgagaaaa | 2160 |
| gctattgaat atatgaaatt tggaaatgtt ttaacttac ttaaagaagt taataatcat | 2220 |
| ataaattcat taaaaatgt tattttgaa aaagctaatt cattagtaga taatacaat | 2280 |
| tgttagat ttatcatgt actaactaat ataagacata attattgtga caatgaaatt | 2340 |
| | |
| ttaaaaattaa ctcgatttac agtcataactt atttcataatg gattttttc cttttgtctt | 2400 |
| tggcacctt tcctttttt ttggatatac catcaatga agatttttg a | 2451 |

<210> 3

<211> 791

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 3

Met Val Asp Phe Asn Asp Leu Ser Val Glu Leu Lys Lys Thr Glu Leu

1 5 10 15

Ile Lys Glu Asp Leu Arg Asn Leu Ser His Ile Ile Asn Asn Glu Phe

20 25 30

Ser Tyr Phe Cys Gln Asn Glu Asn Lys Asn Val Ser Phe Asn Asn Asn

35 40 45

Ile Ser Ser Tyr Tyr Asn Asp Asp Ile Phe Ser Lys Ser Thr Leu Asn

50 55 60

Asn Leu Tyr Thr Ser Trp Lys Leu Glu Asp Phe Ser His Phe Asp Phe

65 70 75 80

Ser Ser Ile Leu Asp Ile Leu Lys Arg Asn Gln Tyr Val Met Cys Ser

85 90 95

Ile Tyr Phe Leu Leu Ile Phe Ser Cys Ile Tyr Phe Leu Thr Leu Leu

100 105 110

Leu Tyr Thr Lys Cys Ile Lys Thr Thr Leu Lys Lys Trp Phe Cys Arg

115 120 125

Tyr Cys Ser Glu Asn Ile Asn Glu Asn Asn Ser Asn His Asn Glu Gln

130 135 140

Arg Thr Val Leu Gln Asn Val Ile Asn Lys Ser Cys Tyr Phe Ile Thr

145 150 155 160

Tyr Ser Ser Ile Ile Cys Leu Leu Leu Phe Leu Leu Ser Gly Ile

165 170 175

Thr Tyr Met His Tyr Phe Ile Lys Thr Lys Lys Gly Ile His Ser Asn

180 185 190

Ile Cys Asn Ile Tyr Thr Arg Leu Asp Lys Phe Leu Leu Asn Lys Cys

195 200 205

Leu Asp Pro Lys Lys Val Asp Thr Ser Cys Tyr Ser Ala Glu His Ile

210 215 220

Leu Asn Asp Leu Ser Ser Ile Leu Glu Glu Tyr Lys Lys Val Lys Gln
 225 230 235 240
 Gln Ala Lys Asp Asp Thr Leu Leu Asp Glu Asn Thr Pro Phe Pro Leu
 245 250 255
 Leu Glu Arg Tyr Ile Thr Thr Phe Asn Lys Leu Asn Val Leu Lys Asn
 260 265 270
 Asn Ile Asn Lys Asn Asn Thr Thr Leu Glu Asn Glu Tyr Phe His Thr
 275 280 285
 Tyr Pro Ala Leu Lys Gly Ile Ser Glu Thr Leu Thr Thr Ile Ile Ser
 290 295 300
 Glu Gly Asn Lys Asn Phe Gly Asn Ala Arg Asn Val Ile Lys Glu Val
 305 310 315 320
 Lys Ser Thr Ile Lys Tyr Ser Phe His Thr Val Asp Glu Thr Ile Arg
 325 330 335
 Asn Val Phe Lys Asp Ser Val Pro Lys Ile Thr Gly Leu Ile Thr Gln
 340 345 350
 Ala Gly Lys Ser Ile Lys Gly Ile Asn Asn Lys Tyr Lys Ile Lys Glu
 355 360 365
 Arg Ile Pro Lys Tyr Thr Asn Ile Ile Leu Leu Thr Asn Ile Ile Leu
 370 375 380
 Leu Leu Pro Pro Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Ile Ile Phe Met Ile
 385 390 395 400
 Phe Ile Leu Met Gly Tyr Ile Gln Lys Asn Asn Asn Phe Phe Ile Lys
 405 410 415
 Leu Phe Gly His Phe Ser Ala Tyr Phe Gly Leu Leu Thr Ile Ile Ile
 420 425 430
 Leu Ser Phe Gly Ile Leu Phe Leu Ser Thr Ser Val Ile Gly Gly Thr
 435 440 445
 Ser Cys Ile Leu Ser Glu Arg Ile Leu Lys Asn Glu Leu Arg Phe Asp
 450 455 460
 Ile Leu Asn Asn Thr Leu Ile Asp Tyr Cys Ile Lys Asn Glu Ser Ala

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Pro Leu Ile Asp Asp Asp Ile Thr Thr Ser Phe Val Ala Lys Ile Asn | | | |
| | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Ser Phe Asp Thr Gly His Ile Asp His Asn Ile Asn Glu Tyr Glu Lys | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| His Phe Thr Ile Leu Lys Glu Ser Phe Phe His Lys Ser Leu Lys Phe | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Met Asp Tyr Ile Trp Ile Val Ile Met Lys Arg Glu Asn Asn Thr Phe | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Leu Asn Arg Ile Arg Thr Glu Gln Val Lys Lys Ser Leu Leu Ile Thr | | | |
| | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Gly Ile Ile Asn Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Asn Met Glu Ala Ile Gly | | | |
| 565 | 570 | 575 | |
| Ile Arg Ser Tyr Leu Thr Thr Leu Asn Lys Ile Ile Phe Pro Glu Asn | | | |
| 580 | 585 | 590 | |
| Asn Gly Lys Ile Cys Phe Asn Asp Ile Ile Cys Glu Lys Glu Asn Asn | | | |
| 595 | 600 | 605 | |
| Thr Tyr Asn Ile Thr Glu Asn Ser Lys Thr Thr Asp Gln Lys Tyr Arg | | | |
| | | | |
| 610 | 615 | 620 | |
| Asn Ile Arg Asp Gly Met Asp Glu His Leu Arg Asn Asp Leu Asp Ala | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| Ile Val Gln Leu Phe Val Tyr Lys Ala Arg Ile Leu Lys Glu Asn Ile | | | |
| 645 | 650 | 655 | |
| Phe Asp Ile Asn Asp Leu Asp Ser Asn Glu Lys Asn Lys Ile Gly Trp | | | |
| 660 | 665 | 670 | |
| Ser Glu Tyr Thr Pro Arg Asn Ile Asn Gly Thr Gln Lys Lys Ser Ile | | | |
| | | | |
| 675 | 680 | 685 | |
| Ile Asn Thr Phe Leu Val Asn Val Ile Glu Ser Ile Asn Phe Ser Glu | | | |
| 690 | 695 | 700 | |
| Ile Ile Asn Phe Phe Asp Lys Met Arg Asp Gln Phe Asn Val Leu Lys | | | |
| 705 | 710 | 715 | 720 |

Asp Leu Ile Leu Leu Lys Ile Asp Thr Leu Thr Glu Asn Thr Lys Cys

725 730 735

Asn Lys Leu Val Lys Glu Leu Ile Asn Val Arg Lys Asp Tyr Cys Asn

740 745 750

Asn Val Val Leu Asn Leu Ser Thr Leu Ser Val Tyr Leu Ile Ile Phe

755 760 765

Ser Ile Thr Ser Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Phe Leu Phe Leu Trp Phe

770 775 780

Tyr Tyr Asn Ile Lys Pro Ser

785 790

<210> 4

<211> 2375

<212> DNA

<213> Plasmodium falciparum

<400> 4

| | |
|--|----|
| atggtagact tcaacgattt aagcggtgaa ctaaaaaaaaaa cagaatataat aaaagaggac | 60 |
|--|----|

| | |
|---|-----|
| ctgagaaaatc taagccatat aataaataat gaattttagtt acttttgtca aaatgaaaac | 120 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| aagaacgtat cttaacaaca taatattatgt agttattata atgatgatat atttctaaa | 180 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| agtacattaa ataattata tacatcttgg aaattagaag attttctca ttttgatttc | 240 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| agtagtattt tagatatattt aaaaagaaat caaatgtta tgtgttagtat atatttcctc | 300 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| ctaattttt ctgttatcta ttttttaaca ttattattat atacaaaatg tataaaaaca | 360 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| acgttaaaaa aatggttctg tagatattgt agtggaaata taaatgaaaa taatagtaat | 420 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| cataatgaac aaagaacagt attacaaaat gttataaata aatcatgtta ttttattact | 480 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| tattcatctta taatctgtct ttattttttt cttctacttt ctggattac atatatgcat | 540 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| tattttataa aaacaaaaaa aggaatacat tctaataattt gtaatattta tacaaggctt | 600 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| gataaattct tattaaataa atgtcttagat ccaaaaaaag ttgataacctc gtgttattca | 660 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| gctgaacata tattgaatga tctttttcc atattggaag aatataaaaa ggtgaagcaa | 720 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| caagcaaagg acgacacgtt gcttgacgag aacactccct tccccctact cgaaagatac | 780 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| attacaacgt tcaataagct aatgtacta aaaaacaata taaataaaaa taacacaaca | 840 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| ctcgaaaaacg aatacttcca cacatatcca gccctcaaaag gaatcagcga aacactaaca | 900 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| accattatta gtgaaggcaa taaaaatttc ggaaatgccaa gaaatgttat taaagaagtt | 960 |
|--|-----|

| | |
|--|--|
| aaaagcaca aaaaatattc gttcatact gttgacgaaa ccataagaaa tgtat taaa gatagtgtac ctaaaattac aggattaata acacaagctg gggaaatctat caaaggata aataacaat ataaaattaa agagcgtatt cctaaatata caaatattat tttattaact aatatattt tattgttacc accattctt aatatttag gtatcataat tttatgata tttattctt tgggatatac aaaaaaaat aataatttct tcataaaatt atttggcat ttcagtgtt acttggtt actcactata attat tttat ctttggaa actattctt | 1020 1080 1140 1200 1260 1320 |
| agtacttcag tcataggagg cacatcttgc attttatcag aaagaatttt aaaaatgaa ttacgtttt atatattaaa taatactttt atagattttt gtattaaaaa tgaaagcgca ccattaattt acgtgtat aacaacaagg ttgtcgcta aaattaattt tttcgataca ggacatatacg atcataatataa aacgaatataa gaaaaacatt ttacaattttt aaaagaatct tttttccata agtcattaaa atttatggat tatatatggaa ttgttataat gaaacgagaa aataatacat tttaaatat aataagaact gaacaagtca aaaaatcgat attaataaca ggtattataa acgaaaatataa taaatatgaa aatatggaa ctataggtat cagatcctat | 1380 1440 1500 1560 1620 1680 1740 |
| ttaactacgt tgaacaaaat tattttcctt gaaaataatg gtaaaatatg tttatgat atcatatgtt aaaaaggagaa taatacatat aatattactt agaattcaaa aacaaccat cagaaatataa gaaatatacg tgatggatg gatgaacatc tttagaaacgaa tttggatgct tttgtcaact ctttgtttt aaagcacgtt ttctaaaaga aaatatattt gatattaacg atcttgatag taacgaaaaa aacaaaatag gatggagcga atatacacc aaaaatataa atggAACACA aaaaaatca atcattaataa ctttcctagt aaatgttattt gaaagtattt acttttcaga aataataat ttcttgata aatggagaga tcaattttat gtacttaag | 1800 1860 1920 1980 2040 2100 2160 |
| acctaatttctt attaaaaattt gatacattaa cagaaaatatac aaaaatgtat aaattatgtaa aagaacttat taatgtcaga aaagattttt gtaataacgt cgtttgaat ttatctactt tatctgtata tttaattataa tttccatca cttcattttt attatgtat ctatttctat tcttggtt ctattataat attaaaccat catag | 2220 2280 2340 2375 |
| <210> 5 | |
| <211> 2370 | |
| <212> DNA | |
| <213> Plasmodium vivax | |
| <400> 5 | |
| atgagcgacg agtacaacct gagcatcgac ctgaagaaga cggagctgct gaaggagcac ttgaaagcca ttgccaaagt tatgcacaat gagttcggtt actttgcac cagtgggttga | 60 120 |

| | |
|---|------|
| gtgaagggcc cgcaggacca ccccaatgaa ttctcagaaga ccatatggag catccttac | 180 |
| acgtcctgga gnatggaaga tttacgagg ctgaatttaa aaagcgaaa gaacatcctc | 240 |
| aagaggaacc cctacgtat ggggtgtgt tacttcctca tcatctcac gtgtgtat | 300 |
| ctgttaacgt tatttcgtat taccaagtg tttcgagggt tgattaaagc cattcgttgc | 360 |
| aaaacgtgt a gggaaagaa acagaagcga gaacaacagg agagtaaaa taaagattt | 420 |
| attgaaaatg tgaagaagcg attcttaac atcatgacgt acgtgtttt gagttcgctt | 480 |
| ctgtgtgttc tgattgggtt gggcatctgg tatatgattt ctttttcaa aacgaggaat | 540 |
| | |
| gggatttata tgaatgtatg cagcgcgtcc acctcgattt agaacttctt caccgaccgc | 600 |
| tgctccgtgc agggccgcga ggtggactcg tcgtgtact ccctggagca catcgtagc | 660 |
| gacgcggtgtt ccatcggtt gcatcggtt gacatcaagc tgcatcgataaa ggcggacac | 720 |
| ctgggtggacg aggacaggcc ggttccgtt ctcacaggctt tcctcaccgtt gttcgagaa | 780 |
| ctgaagaagc tgcagcagaa cgtggcgccg aacaaccaca tcctggagga gcagttactt | 840 |
| cacacgttacc ccgtgtgtt gaggctggcc agagcgctcg acgcgttcat ccaggaggga | 900 |
| gaggcgaacc tccagcaggc gacaggcacc ctgcgttcatgccaagcaggc agtcaaagga | 960 |
| | |
| gccttcgaag aaatcgacca agttctggga gcaaccttta aagaaaatat ggaaaaggta | 1020 |
| aatgacaaaa ttacgctttt caataagtct ataaatagaa taatacacca gtataagata | 1080 |
| aagcaaaatt tgaagaagta cacgatttca attttggattt tgaagttgggt tttgtctt | 1140 |
| cctcccccttc tcattctaat tgggttagtg ctttcatat tcttttgggtt gaaagggac | 1200 |
| attggaaaca gcagtcattt tttttggac ctcttggag ttttcagcgc ctactttgg | 1260 |
| tttttggacgc tcttcattttt gtaatcggtt atagcaatgc tgagtgcgtt catcttgggg | 1320 |
| gggacgaccc gcatcatcgcc cgatagggtt ttaaaaaatg agctgaactt tgacgtgtt | 1380 |
| | |
| aatgataccc tggatcgatca ctgcctgaaatg aatgaggagt cgccccccttctt ctcggaggac | 1440 |
| atcaccaagg ggctttaga caacatgaaatg tctttggaca ccaccgaaat ggagaggagg | 1500 |
| gtgaatgaat acgattccta tttcaacgtt atgaagagaa cttccgcga aaatacaaga | 1560 |
| aattttgtca actacatgtt ggtgggtt accaagccga acaacaacctt gtatgtggat | 1620 |
| cgaattcggc taaacactctt gaaaaagtcc ctccttagcga ccagcatcac tcgggacaat | 1680 |
| atcaaatttgc taaaattcaatg cctctggggaa acagatgaat actttggaaa tctgaatgc | 1740 |
| cactatttttgc gggcaccatc gtttgccttc tgcttggaaa atgaagaatgc cgacaggag | 1800 |
| | |
| gaggacaagt ttaacatcaa cttaggtcc tccataatg accccaagta ccagaggatg | 1860 |
| aggaaccacc tcaggaataa tggatcttaga gaggaccttag acaacgtgggt ggagcttattc | 1920 |
| atttacaagt cttaggttag gaccgaaaatg atattctctg tggacgactt ggatagcgc | 1980 |

| | |
|---|------|
| atgacggaca aaatagggtg gagtgagtac acgccgagga ttaacaaaag ggaggggggg | 2040 |
| aaagaacaaa cttcatttt gaggaagtac ctgcgtgggg acattaaaaa tttgaacttc | 2100 |
| aaagacgtgg tttagttctt cgagaaaatt aaacagaaat tcaacaccct cagagacacg | 2160 |
| atcatiacga aggtgcagat gctcgtaag aacaccaact gcagcagact cgttggcag | 2220 |

| | |
|---|------|
| atgcacaatt taaaacacat ctactgcgac cgagtcgtgc tgaacatgac catcctctcc | 2280 |
| gtcgcgctcg tctcctctc catcatttcg ttcttcctct ggtactgctt tttttttttt | 2340 |
| tggctgtact accagatgaa gatgatgtga | 2370 |

<210> 6

<211> 789

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 6

Met Ser Asp Glu Tyr Asn Leu Ser Ile Asp Leu Lys Lys Thr Glu Leu

1 5 10 15

Leu Lys Glu His Leu Lys Ala Ile Ala Lys Val Met His Asn Glu Phe

20 25 30

Gly Tyr Phe Cys Pro Ser Gly Gly Val Lys Val Pro Gln Asp His Pro

35 40 45

Asn Glu Phe Ser Lys Thr Ile Trp Ser Ile Leu Tyr Thr Ser Trp Arg

50 55 60

Met Glu Asp Phe Thr Arg Leu Asn Leu Lys Ser Val Leu Asn Ile Leu

65 70 75 80

Lys Arg Asn Pro Tyr Val Met Gly Cys Val Tyr Phe Leu Ile Ile Phe

85 90 95

Thr Cys Val Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Leu Tyr Thr Lys Cys Phe Arg

100 105 110

Arg Leu Ile Lys Ala Ile Arg Cys Lys Thr Cys Arg Arg Lys Lys Gln

115 120 125

Lys Arg Glu Gln Gln Glu Ser Glu Asn Lys Asp Leu Ile Glu Asn Val

130 135 140

Lys Lys Arg Phe Phe Asn Ile Met Thr Tyr Val Phe Leu Ser Ser Leu

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
|-----|-----|-----|-----|

Leu Cys Val Leu Ile Gly Leu Gly Ile Trp Tyr Met Ile Ser Phe Phe

| | | |
|-----|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
|-----|-----|-----|

Lys Thr Arg Asn Gly Ile Tyr Met Asn Val Cys Ser Ala Ser Thr Ser

| | | |
|-----|-----|-----|
| 180 | 185 | 190 |
|-----|-----|-----|

Ile Glu Asn Phe Leu Thr Asp Arg Cys Ser Val Gln Gly Gly Glu Val

| | | |
|-----|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
|-----|-----|-----|

Asp Ser Ser Cys Tyr Ser Leu Glu His Ile Val Ser Asp Ala Val Ser

| | | |
|-----|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
|-----|-----|-----|

Ile Val Glu Gln Tyr Gln Asp Ile Lys Leu Gln Ile Lys Ala Asp Leu

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
|-----|-----|-----|-----|

Leu Val Asp Glu Asp Arg Ala Val Pro Leu Leu Thr Gly Phe Leu Thr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 245 | 250 | 255 |
|-----|-----|-----|

Val Phe Glu Asn Leu Lys Lys Leu Gln Gln Asn Val Ala Arg Asn Asn

| | | |
|-----|-----|-----|
| 260 | 265 | 270 |
|-----|-----|-----|

His Ile Leu Glu Glu Gln Tyr Phe His Thr Tyr Pro Val Leu Thr Arg

| | | |
|-----|-----|-----|
| 275 | 280 | 285 |
|-----|-----|-----|

Leu Gly Arg Ala Leu Asp Ala Val Ile Gln Glu Gly Glu Ala Asn Leu

| | | |
|-----|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
|-----|-----|-----|

Gln Gln Ala Thr Gly Thr Leu Asp Glu Ala Lys Gln Ala Val Lys Gly

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
|-----|-----|-----|-----|

Ala Phe Glu Glu Ile Asp Gln Val Leu Gly Ala Thr Phe Lys Glu Asn

| | | |
|-----|-----|-----|
| 325 | 330 | 335 |
|-----|-----|-----|

Met Glu Lys Val Asn Asp Lys Ile Thr Leu Phe Asn Lys Ser Ile Asn

| | | |
|-----|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 |
|-----|-----|-----|

Arg Ile Ile His Gln Tyr Lys Ile Lys Gln Asn Leu Lys Tyr Thr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
|-----|-----|-----|

Ile Ser Ile Leu Ile Val Lys Leu Val Leu Leu Ile Pro Pro Leu Leu

| | | |
|-----|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 |
|-----|-----|-----|

Ile Leu Ile Gly Leu Val Leu Phe Ile Phe Phe Leu Val Lys Gly Asp

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 385 | 390 | 395 | 400 |
|-----|-----|-----|-----|

Ile Gly Asn Ser Ser His Phe Phe Leu Asp Leu Phe Gly Val Phe Ser

405 410 415

Ala Tyr Phe Gly Phe Leu Thr Ile Val Ile Leu Leu Ile Gly Ile Ala

420 425 430

Met Leu Ser Ala Ser Ile Leu Gly Gly Thr Thr Cys Ile Ile Ala Asp

435 440 445

Arg Val Leu Lys Asn Glu Leu Asn Phe Asp Val Leu Asn Asp Thr Leu

450 455 460

Ile Asp Tyr Cys Leu Lys Asn Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ser Glu Asp

465 470 475 480

Ile Thr Lys Gly Leu Val Asp Asn Met Lys Ser Leu Asp Thr Thr Glu

485 490 495

Met Glu Arg Arg Val Asn Glu Tyr Asp Ser Tyr Phe Asn Asp Met Lys

500 505 510

Arg Thr Phe Arg Glu Asn Thr Arg Asn Phe Val Asn Tyr Met Trp Val

515 520 525

Val Ile Thr Lys Pro Asn Asn Asn Leu Tyr Val Asp Arg Ile Arg Leu

530 535 540

Asn Thr Leu Lys Lys Ser Leu Leu Ala Thr Ser Ile Thr Arg Asp Asn

545 550 555 560

Ile Lys Phe Gly Lys Phe Asn Leu Trp Gly Thr Asp Glu Tyr Phe Glu

565 570 575

Asn Leu Asn Arg His Tyr Phe Arg Gly Thr Gln Phe Ala Leu Cys Phe

580 585 590

Glu Asn Glu Glu Cys Asp Arg Glu Glu Asp Lys Phe Asn Ile Asn Phe

595 600 605

Arg Ser Ser Ile Asn Asp Pro Lys Tyr Gln Arg Met Arg Asn His Leu

610 615 620

Arg Asn Asn Asp Leu Arg Glu Asp Leu Asp Asn Val Val Glu Leu Phe

625 630 635 640

Ile Tyr Lys Ser Arg Val Arg Thr Glu Lys Ile Phe Ser Val Asp Asp

| | | |
|---|-----|-----|
| 645 | 650 | 655 |
| Leu Asp Ser Ser Met Thr Asp Lys Ile Gly Trp Ser Glu Tyr Thr Pro | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Arg Ile Asn Lys Arg Glu Gly Gly Lys Glu Gln Thr Phe Ile Leu Arg | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Lys Tyr Leu Val Glu Asp Ile Glu Asn Leu Asn Phe Lys Asp Val Val | | |
| 690 | 695 | 700 |
| Ser Phe Phe Glu Lys Ile Lys Gln Lys Phe Asn Thr Leu Arg Asp Thr | | |
| 705 | 710 | 715 |
| Ile Ile Thr Lys Val Gln Met Leu Val Lys Asn Thr Asn Cys Ser Arg | | |
| 725 | 730 | 735 |
| Leu Val Gly Glu Met His Asn Leu Lys His Ile Tyr Cys Asp Arg Val | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Val Leu Asn Met Thr Ile Leu Ser Val Ala Leu Val Ser Phe Ser Ile | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Ile Ser Phe Phe Leu Trp Tyr Cys Phe Leu Phe Phe Trp Leu Tyr Tyr | | |
| 770 | 775 | 780 |
| Gln Met Lys Met Met | | |
| 785 | | |
| <210> 7 | | |
| <211> 413 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Plasmodium falciparum | | |
| < | | |
| 400> 7 | | |
| Met Asn Leu Leu Val Phe Phe Cys Phe Phe Leu Leu Ser Cys Ile Val | | |
| 1 | 5 | 10 |
| His Leu Ser Arg Cys Ser Asp Asn Asn Ser Tyr Ser Phe Glu Ile Val | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Asn Arg Ser Thr Trp Leu Asn Ile Ala Glu Arg Ile Phe Lys Gly Asn | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Ala Pro Phe Asn Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Ser | | |

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

Leu Ile Asp Pro Ser Asn Phe Pro Thr Lys Arg Val Thr Gln Ser Tyr
 305 310 315 320

Val Ser Pro Asp Ile Ser Val Thr Asn Pro Val Pro Ile Pro Lys Asn
 325 330 335

Ser Asn Thr Asn Lys Asp Asp Ser Ile Asn Asn Lys Gln Asp Gly Ser
 340 345 350

Gln Asn Asn Thr Thr Asn His Phe Pro Lys Pro Arg Glu Gln Leu
 355 360 365

Val Gly Gly Ser Ser Met Leu Ile Ser Lys Ile Lys Pro His Lys Pro
 370 375 380

Gly Lys Tyr Phe Ile Val Tyr Ser Tyr Tyr Arg Pro Phe Asp Pro Thr
 385 390 395 400

Arg Asp Thr Asn Thr Arg Ile Val Glu Leu Asn Val Gln
 405 410

<210> 8

<211> 397

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 8

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr

20 25 30

Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr
 35 40 45

Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser
 50 55 60

Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn
 65 70 75 80

Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Leu Lys Gln

85 90 95

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Ile Gly Leu Ile Met Val Leu Ser Phe Leu Phe Leu Asn | | |
| 385 | 390 | 395 |
| <210> 9 | | |
| <211> 229 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Plasmodium falciparum | | |
| <400> | | |
| > 9 | | |
| Met Lys Val Ser Lys Leu Val Leu Phe Ala His Ile Phe Phe Ile Ile | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asn Ile Leu Cys Gln Tyr Ile Cys Leu Asn Ala Ser Lys Val Asn Lys | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Lys Gly Lys Ile Ala Glu Glu Lys Lys Arg Lys Asn Ile Lys Asn Ile | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asp Lys Ala Ile Glu Glu His Asn Lys Arg Lys Lys Leu Ile Tyr Tyr | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Leu Ile Ala Ser Gly Ala Ile Ala Ser Val Ala Ala Ile Leu Gly | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Leu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Lys Lys Ser Arg Glu Asp Asp Leu Tyr Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Asn Lys Tyr Leu Glu Tyr Arg Asn Gly Glu Tyr Asn Ile Lys Tyr Gln | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Asp Gly Ala Ile Ala Ser Thr Ser Glu Phe Tyr Ile Glu Pro Glu Gly | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ile Asn Lys Ile Asn Leu Asn Pro Ile Ile Glu Asn Lys Asn Asn | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Asp Val Ser Ile Lys Arg Tyr Asn Asn Phe Val Asp Ile Ala Arg | | |
| 145 | 150 | 155 |
| 160 | | |

Leu Ser Ile Gln Lys His Phe Glu His Leu Ser Asn Asp Gln Lys Asp

165

170

175

Ser His Val Asn Asn Met Glu Tyr Met Gln Lys Phe Val Gln Gly Leu

180

185

190

Gln Glu Asn Arg Asn Ile Ser Leu Ser Lys Tyr Gln Glu Asn Lys Ala

195

200

205

Val Met Asp Leu Lys Tyr His Leu Gln Lys Val Tyr Ala Asn Tyr Leu

210

215

220

Ser Gln Glu Glu Asn

225