



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107001435 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580065253.X

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

(22)申请日 2015.11.27

代理人 吕琳 朴秀玉

(30)优先权数据

2014-241420 2014.11.28 JP

(51)Int.Cl.

G07K 14/445(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.27

A61K 38/00(2006.01)

A61P 33/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/083437 2015.11.27

A61P 37/04(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/084944 JA 2016.06.02

C12N 9/88(2006.01)

(71)申请人 国立研究开发法人日本医疗研究开发机构

地址 日本东京

(72)发明人 奥浩之 狩野繁之 矢野和彦

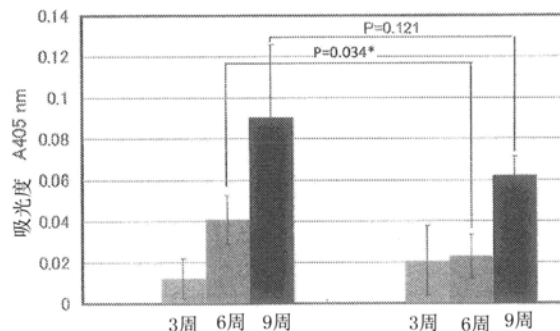
权利要求书3页 说明书24页
序列表8页 附图10页

(54)发明名称

使用了恶性疟原虫的烯醇化酶蛋白质的部分序列的人工抗原及其制造方法

(57)摘要

本发明提供一种生理活性肽,其带有恶性疟原虫烯醇化酶的部分氨基酸序列,具有与GMP制造时的标准设定对应的分子结构。所述肽具有如下结构:具有(i)A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02(序列号1)或(ii)A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04(序列号2)的氨基酸序列的2个肽通过各自的羧基末端与(iii)Lys-A05-Cys-A06所示连接肽的Lys的2个氨基之间的酰胺键排列成2分支状。优选地,所述肽具有通过该肽内的连接肽序列的Cys残基间的S-S键而二聚化的结构。(i)、(ii)、(iii)中,A01至A06是包含0的任意数目的氨基酸残基。

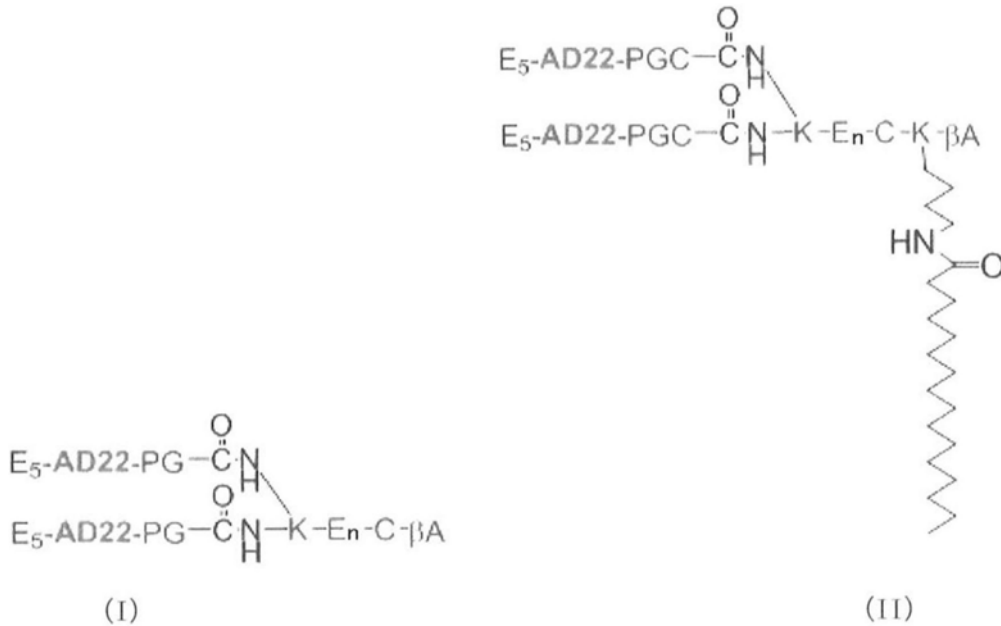


1. 一种肽,其具有如下结构:具有 (i) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02 (序列号1) 或 (ii) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 (序列号2) 的氨基酸序列的2个肽通过各自的羧基末端与下述 (iii) 所示的连接肽的Lys的两个氨基之间的酰胺键排列成2分支状,

(iii) Lys-A05-Cys-A06

(i)、(ii)、(iii) 中,A01至A06表示包含0的任意数目的氨基酸残基。

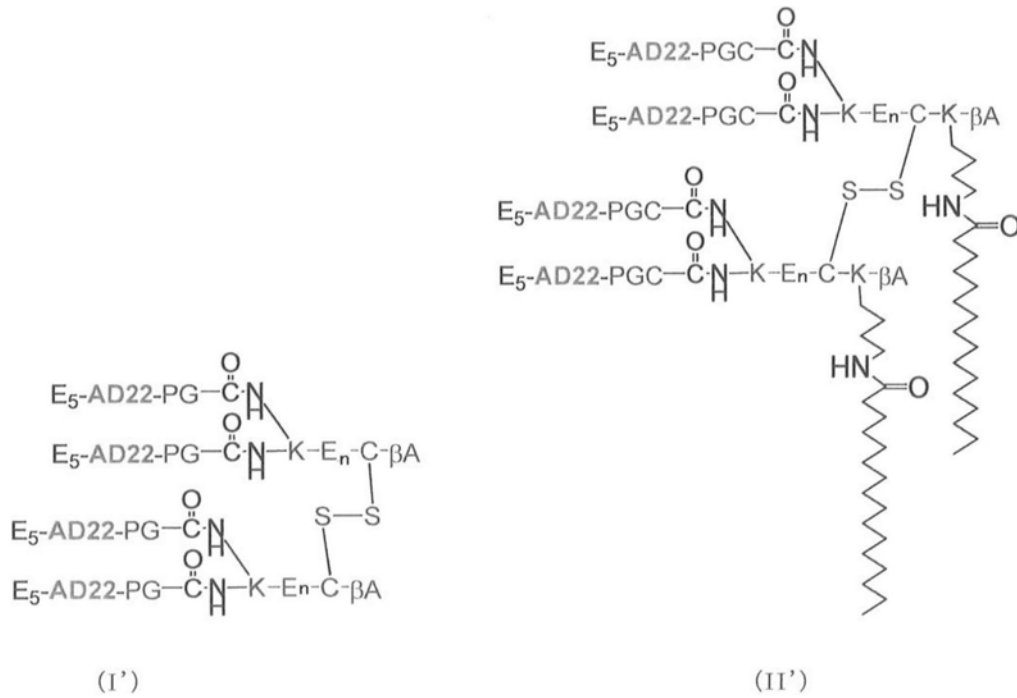
2. 根据权利要求1所述的肽,其由下述 (I) 或 (II) 所示,



其中,AD22表示序列号1的氨基酸序列;n表示4或5的整数。

3. 根据权利要求1或2所述的肽,其具有通过该肽内的所述 (iii) 所示的连接肽序列的Cys残基间的S-S键而二聚化的结构。

4. 根据权利要求3所述的肽,其由下述 (I') 或 (II') 所示,



其中,AD22表示序列号1的氨基酸序列;n表示4或5的整数。

5.一种用于对疟疾诱发免疫学应答的疫苗,其含有权利要求1~4中任一项所述的肽。

6.根据权利要求5所述的疫苗,其用于诱发阻止或阻碍由疟疾引起的烯醇化酶与血纤维蛋白溶酶原的相互作用的免疫学应答。

7.根据权利要求5或6所述的疫苗,其中,疟疾是由人或猴疟原虫的感染引起的疟疾。

8.根据权利要求5或6所述的疫苗,其中,疟疾是由恶性疟原虫的感染引起的疟疾。

9.根据权利要求5或6所述的疫苗,其中,疟疾是由恶性疟原虫以及其他人或猴疟原虫的混合感染引起的疟疾。

10.一种含有抗原的微粒,其通过如下工序制造:将权利要求1~4中任一项所述的肽的溶液与含有生物降解性高分子的挥发性有机溶剂混合而制作出乳液,将所得的乳液与带负电荷的聚合物水溶液混合。

11.根据权利要求10所述的含有抗原的微粒,其特征在于,生物降解性高分子是聚乳酸-羟基乙酸共聚物。

12.根据权利要求10所述的含有抗原的微粒,其特征在于,生物降解性高分子是聚(α -羟基酸/ α -氨基酸)。

13.一种用于疟原虫感染症的预防或治疗的药物组合物,其含有权利要求10~12中任一项所述的含有抗原的微粒、和药学上能接受的载体。

14.一种物质,其使权利要求1~4中任一项所述的肽结合于膜、乳胶颗粒、金属超微粒或塑料板的固相表面而形成。

15.一种血清或血浆中的疟疾抗体效价的检查方法,其包含使用权利要求14所述的物质来检查血清或血浆中的疟疾抗体效价的工序。

16.一种权利要求1~4中任一项所述的肽的免疫学应答的解析方法,其包含使用权利要求14所述的物质来测定针对权利要求1~4中任一项所述的肽的抗体的工序。

17.一种施用了权利要求1~4中任一项所述的肽的个体的抗体效价测定方法,其包含

使用权利要求14所述的物质来测定针对权利要求1~4中任一项所述的肽的抗体的工序。

使用了恶性疟原虫的烯醇化酶蛋白质的部分序列的人工抗原及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型生理活性肽及其用途。另外，本发明还涉及一种利用了与人及其他动物的免疫反应、抑制疟原虫增殖的免疫用抗原、药物组合物以及抗体效价检查材料，其特征在于具有源自疟原虫的烯醇化酶的部分氨基酸序列。

背景技术

[0002] [现有技术及其问题点]

[0003] (1) 作为感染症の疟疾的现状：

[0004] WHO世界卫生组织在最新的报告中推定：疟疾在世界上103个国家流行，2012年有2.07亿人患病并有62.7万人死亡(非专利文献1)。据报道，几乎所有的病例(80%)和死亡者(90%)都来自非洲地区。进一步，死亡者的77%为不满5岁的儿童。通过近年来全球规模下应对措施的推进，与2000年相比，2012年的患病人数(29%)和死亡人数(45%)已经大幅减少。这被评价为是WHO、Global Fund等国际机关、以日本为首的政府组织和非政府组织发放有效药和蚊帐等积极活动的成果。但是，即使在经济持续增长的印度、巴西、泰国、马来西亚、中国等国家，仍存在流行地区。进而，全世界正在面临耐药性疟原虫的出现和扩散这一课题。因此，目前疟疾仍是最主要的感染症之一。

[0005] 在日本，疟疾被指定为有义务全数申报的4类感染症。以1959年的彦根市为终点，日本国内的本土疟疾被消灭。但是，随着日本的经济增长，人口移动日渐旺盛，日本人出境者在流行地区感染的病例、从流行地区到日本的入境者在日本国内发病的“外来疟疾”的病例从20世纪80年代开始骤增(非专利文献2)。然后，在2000年报道了史上最多的154例，但目前随着出境者的疟疾预防知识的普及等，每年以50~60个病例发展。

[0006] 另外，在作为邻国的韩国，曾经被消灭的“本土疟疾”在1993年再次流行，2000年增加至4000个病例，但在2012年减少至394个病例(非专利文献3)。也报道过从韩国到日本的外来疟疾病例(非专利文献4)。在韩国传播间日疟的蚊虫的主要种类是与日本相同的中华按蚊，若考虑到日本与韩国之间的出境者和物流的往来频繁、韩国20多年都没消灭掉本症的现状，则后果是非常担心韩国的疟原虫和作为媒介的蚊虫进入到日本。因此，对于疟疾的应对措置不仅在其流行地区，从日本的防疫角度来说也是极为重要的课题。

[0007] 另外，疟疾不仅关系到健康问题，也是造成非洲各国经济活动停滞和社会不稳定的原因之一。近年在流行地区的感染者的增加也被指出与热带雨林开发及全球变暖相关，根据International Panel on Climate Change(政府间气候变化专门委员会)的报告(1996&1998)，预测在全球变暖的情况下温度每上升2℃就会增加5000-8000万名患者。因此，即使在第二次世界大战后通过喷洒DDT和卫生应对措施而原本已经根绝此症的包含日本在内的温带区域，仍然有可能再次流行疟疾。

[0008] (2) 疟原虫的种类和生活史：

[0009] 疟疾是以疟原虫属(Plasmodium属)为原因的寄生虫感染症，会感染给人的疟原虫

有恶性疟原虫 (*P. falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、三日疟原虫 (*P. malariae*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*) 这4种。其中,恶性疟原虫的病原性最高,会引起重度贫血和脑型疟疾等重症化症状,有时还会造成患者死亡。

[0010] 另外,2004年有报道称,猴疟疾的1种 (*P. knowlesi*) 在东南亚的广泛地区感染给人类,开始被认为是第5号感染给人类的疟原虫(非专利文献5)。另外,也报道过在日本国内的外来感染病例(非专利文献6)。近年来的热带雨林开发也被认为是感染猴疟疾的原因之一。另外,将疟原虫传播给人类的按蚊 (*Anopheles* 属) 已知有约60种。

[0011] (3) 疟疾的感染途径、原虫的生命周期

[0012] 疟疾是由雌性按蚊的叮咬致使疟原虫侵入体内而患病。疟原虫的生命周期分为蚊虫体内和人体内这2个阶段。人被携带有疟原虫的蚊虫吸血后,存在于蚊虫的唾液腺的感染性孢子体(肝内型)侵入人的血液中,并迅速移动到肝脏。孢子体在肝细胞内迅速分裂,产生多核的裂殖体。从成熟的裂殖体向血液中释放出大量的裂殖子(红血球内型),并侵入红血球。裂殖子在红血球内一边变为环形(环状体)、滋养体(成熟滋养体)、裂殖体(分裂体)形态一边进行分裂,根据原虫的种类不同,在48~72小时内由1个裂殖子产生8~32个新的裂殖子。在该阶段,其成熟后会破坏红血球并释放至血液中,侵入新的红血球。然后,重复该红血球期循环。感染者受红血球破坏及裂殖子释放的刺激而出现发热、发冷等疟疾症状。另外,释放出的裂殖子的一部分分化为雌雄异株的配子体(生殖母体),在血液中长期生存。

[0013] 该感染者被蚊虫吸血后,配子体侵入蚊虫体内,在其中肠内变态为雌雄生殖体(配子),雌雄结合后,由动合子分化为卵囊。然后,在卵囊内迅速增殖的几千个孢子体随着卵囊的破坏而从蚊虫的中肠壁释放出来并移动至唾液腺,随着蚊虫的吸血而重新感染给人类,感染周而复始。在间日疟和卵形疟中,还具有如下特征:在人的肝脏内形成休眠子(休眠体),经过1个月至几个月、有时为1年后,会再次复发。

[0014] (4) 各种治疗药和耐药性疟疾:

[0015] 现有的抗疟药几乎都在血中期发挥作用。氯喹在第二次世界大战期间和战后长期作为疟疾特效药被施用。但是,从20世纪50年代后期开始,耐氯喹性恶性疟原虫向世界各地广泛蔓延,作为药剂的有用性大幅降低。特别是在泰国及其周边各国、大洋洲、巴西的亚马逊河流域、东非检测到高度耐受性的恶性疟原虫。另外,乙胺嘧啶作为与磺胺多辛的复方制剂被使用,但在亚马逊河流域、东南亚检测到高度耐受性病例。甲氟喹耐受性在泰国与柬埔寨、缅甸的边境地带较多,在亚马逊河流域、非洲也有报道。以往,奎宁在多药耐受性疟疾治疗中是有效的,但从东南亚和巴西报道过敏感性降低。即使间日疟也出现了氯喹耐受性。进而,即使对杀灭间日疟在肝内的休眠原虫休眠子的药品伯氨喹,也报道过治疗抗性的病例(非专利文献7)。

[0016] (5) 疟疾的标准治疗药:

[0017] 如果对恶性疟的治疗延误,则会导致重症化(除了流行地区居民),因此必须迅速且利用适当的抗疟药进行治疗。在标准治疗方法中,进行以杀灭寄生于外周血中的红血球的疟原虫、抑制急性期的发热来改善临床症状为目的的治疗。但是,在日本被批准上市的抗疟药仅有4种。即,目前能够买到且容易使用的(1)盐酸甲氟喹、(2)阿托伐醌/盐酸氯胍的复方制剂、目前尚未流通的(3)磺胺多辛/乙胺嘧啶的复方制剂、处方协议复杂的(4)奎宁口服药这4种。在报道有上述说明过的耐药性疟原虫的地区,对被认为患病的恶性疟患者,可施

用(5)蒿甲醚/本芴醇的复方制剂、(2)阿托伐醌/氯胍的复方制剂。

[0018] 在间日疟和卵形疟中,(6)氯喹可作为首选药,但进而需要防止复发的根治药。即,潜伏在患者的肝细胞内的被称为休眠子的阶段的原虫对于红血球期的药剂没有反应,需要追加施用能够特异性杀灭肝内型原虫的伯氨喹。巴布亚新几内亚周边的南半球的间日疟对伯氨喹敏感性较低的报告多,推荐施用2倍药量。另外,伯氨喹对G6PD缺乏症的人引起血管内溶血的副作用强烈,因此用药前需要检查G6PD酶活性。

[0019] (6)疫苗的的必要性和疫苗开发的问题:

[0020] 如上所述,新型疟疾治疗药存在无法摆脱耐药性原虫的发生和扩散的问题。因此,作为预防疟疾传染的最后王牌,期望进行疫苗的开发。特别是对于恐怕会导致重症化和致死的恶性疟的疫苗研发在世界范围内开展起来。疫苗的开发从20世纪80年代开始,但达到实用化的成果尚未实现。对于其原因之一,证实了疟原虫回避人的防御免疫的寄生适应机制非常发达,可知与通过施用疫苗或感染过一次而使人能够获得防御免疫的“没有第二次的感染症”的麻疹和水痘大不相同。对于回避免疫机构的机制,除了引起各种形态变化(靶抗原也发生变化)的原虫的复杂生活史之外,证实了也与多基因家族的形成和基因多态性呈现等有关(非专利文献8)。

[0021] 作为多基因家族的例子,在恶性疟原虫感染红血球的表面形成的“knob”中存在的PfEMP1蛋白质是众所周知的,一个原虫携带有非常多的复制体(非专利文献9、10)。即,每个原虫的红血球内循环过程中都会在红血球表面出现不同的复制体,因此,作为免疫系统的攻击目标,难以界定目标。作为基因多态性的例子,有裂殖子表面存在的膜蛋白质MSP1(非专利文献11、12)。这是由于,虽然1个原虫仅携带有一个复制体,但每个原虫分别携带有不同的序列,因此第1次感染中对MSP1建立的防御免疫机制在下次感染中不起作用。

[0022] (7)目前为止进行的疟疾疫苗开发:

[0023] 通过传播原虫的按蚊的叮咬而进入体内的“孢子体”从血液中迅速侵入肝细胞,在那里首先进行分裂/增殖(肝内阶段)。然后,释放至血液中的“裂殖子”侵入红血球内并重复分裂增殖(红血球内阶段),增殖后的原虫的一部分为雌雄同株的“配子体”,通过按蚊对其他人吸血而传播下去(蚊虫阶段)。以该疟原虫的生活史中的各阶段为目标,开展疫苗的研发(非专利文献13、14)。

[0024] 世界上首次进行的疟疾疫苗的临床研究中,哥伦比亚的Patarroyo等人使用被称为SPf66的44个残基的化学合成肽抗原来进行(非专利文献15)。但是,在亚洲和非洲的流行地区也试用了SPf66,但并未确认到充分的有效性。

[0025] 在那之后,也实施了各种备选疫苗的临床试验,但目前开发最有进展的是GlaxoSmithKline(GSK)公司的RTS,S/AS01疫苗,已经进行了世界上首次大规模的Phase III临床试验。作为中间成果,2010年10月有报道称本疫苗使非洲1~5岁的婴幼儿的感染风险减半,成为很大的新闻(非专利文献16)。但是,在2012年11月的最终报道中,做出了对于3200名婴幼儿的疟疾感染的有效率为31%,对重症疟疾的有效率为37%的结论。即,证实了即使是最先进的RTS,S/AS01疫苗也仅获得30%左右的有效率(非专利文献17)。

[0026] 在日本,大阪大学的堀井等人进行的SE36/AHG疫苗的临床试验在日本国内(2005年)和乌干达流行地区(2010年4月-2011年2月)得到实施(非专利文献18)。

[0027] 在目前为止的疟疾疫苗的临床开发(非专利文献19)中,几乎都是直接施用对人的

免疫系统形成抗体的重组蛋白质抗原的方法。作为抗体的靶,存在:(1)孢子体表面抗原(CSP)(阻止原虫向肝脏细胞侵入)、(2)裂殖子表面抗原(M SP1)(阻止原虫向红血球侵入)、(3)感染红血球表面抗原(PfEMP1、SERA5)(阻碍红血球内的原虫增殖)、(4)传播阻止抗原(在蚊虫体内阻止原虫向中肠侵入和阻碍增殖)等。另外,还存在如下例子:在体内出现抗原的(5)使用了减毒腺病毒的DNA疫苗、(6)放射线照射、基因工程上减毒后的原虫(活疫苗)的例子。进而还存在:(7)多个原虫抗原连接在一起的“多阶段疫苗”、(8)多个备选疫苗人工组合在一起的“初免-加强疫苗(prime boost Vaccine)”。

[0028] (8)作为使用了烯醇化酶的疟疾疫苗的药物组合物的开发现状:

[0029] 据疟疾的流行病学调查,已知多数死亡者为“流行地区的婴幼儿”和“日本人等来自非流行地区的外来者”。另一方面,“流行地区的成人”即使感染了疟疾也容易恢复,这被认为是由于流行地区的居民“通过不断感染疟疾已经获得并维持对疟疾的免疫”。因此,对于疫苗开发,证实了必须考虑到免疫状态的个人差异。

[0030] 在流行病学研究的过程中,群馬大学医学部的铃木和狩野根据南美和东南亚的流行地区的野外调查,作为急性期的恶性疟患者参与病情恢复的共同抗原分子,发现了源自原虫的糖酵解酶/烯醇化酶(非专利文献20)。即,发现了感染给人的恶性疟原虫所产生的糖酵解酶、烯醇化酶作为对恶性疟的防御免疫分子发挥作用,并开始研发利用它们的疫苗(非专利文献21、22)。

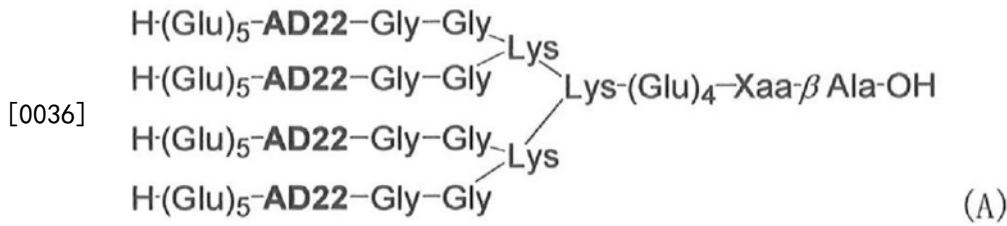
[0031] 利用烯醇化酶的疫苗抗原作为考虑到免疫状态的个人差异的疫苗,与以往仅依靠实验室得到的数据得到的疫苗的理念有着很大的差异。因此,虽然使用原虫烯醇化酶为抗原的疫苗研究最近已经开始进行(非专利文献23),但容易理解的是本发明人等的想法的开端与目前为止的疫苗抗原的开发在研究方向上有很大差异。

[0032] 本发明人等在开始疫苗开发时,首先对使用了具有源自恶性疟原虫的氨基酸序列的重组型烯醇化酶和部分氨基酸序列的抗原肽的分子设计和化学合成进行了研究。例如,AD22序列(Ala256-Asp277)(序列号1)和AT28序列(Ala256-Thr283)(序列号2)。根据使用了这些烯醇化酶和人工抗原肽序列进行的免疫学研究,通过对兔子进行免疫施用,证实了所制作的抗烯醇化酶抗体、抗肽抗体会抑制恶性疟原虫的体外(in vitro)增殖(专利文献1)。

[0033] 接着,使用源自恶性疟原虫的烯醇化酶和AD22部分序列肽作为抗原,通过13只夜猴进行了疫苗试验。绘制出夜猴外周血中的、疟原虫向红血球的寄生率的变化图。其结果是,证实了:对于施用了疫苗的夜猴,抑制了寄生率的急剧上升,其作为疫苗的效果优异。另外,也证实了:无论通过哪种抗原,都在血清中产生了与原虫烯醇化酶发生免疫学反应的抗体。

[0034] 使夜猴产生免疫的抗原是具有将22个残基的肽(AD22)排列了4条的串联结构的化学合成肽抗原,具有下述(A)的结构。抗原的结构式(A)中的X aa为任意残基,此处,使用了将侧链通过乙酰氨基甲基(acetamidomethyl基)保护的Cys(Acm)残基。

[0035] [化1]



[0037] 另外,从化学合成的观点考虑,随着AD22抗原肽的工艺研究的推进,适于大量合成的片段缩合法被成功开发(专利文献2)。即,发现了如下方法:通过将5个短链肽片段缩合而形成1条保护肽链,大规模进行作为目标产物的带有疟原虫烯醇化酶的部分序列的肽或其类似物的合成。

[0038] 而且,作为基于流行病学知识的疫苗,发明人等所在的研究团队着手开发新型药物组合物。即,已知疟疾流行地区的居民在重复感染原虫后维持了防御性免疫状态。因此,为了在材料化学上再现流行地区的免疫状态,开发了持续性缓释抗原的人工抗原材料。即,发现了:使AD22抗原肽内包于生物降解性微粒中的抗原纳米微粒的制备法及其免疫学上优异的性质(专利文献3)。另外,也有报道在聚合物中导入了抗原肽的肽呈现微粒(专利文献4)。

[0039] 如此,通过发明人等的多年努力,终于弄清楚了原虫烯醇化酶的部分序列及AD22序列作为疫苗抗原的有用性。作为接下来的问题点,在使用该AD22序列作为肽抗原的情况下,需要合成满足作为药品的基准的抗原肽。

[0040] (9) AD22抗原肽合成法的讨论:

[0041] 为了制成能够将作为原虫烯醇化酶的部分结构的AD22序列及其类似物对人施用的药品,要求与药品所要求的GMP制造时的标准设定对应的分子结构和制造方法,特别是要求设定遵守化学合成品原料药的指导原则的品质标准(质量分析、HPLC分析、杂质和类似物的分析等)。

[0042] 首先,对于具有上述(A)的结构肽抗原,通过考虑到药品制备的合成法进行了制造。通常,从C末端开始逐步进行Fmoc保护氨基酸的缩合反应是容易的。但是,如下述图解所示,本发明人等进行了如下合成:将利用Fmoc法形成的含有AD22抗原的直链序列部位(E5-AD22-G2:序列号5)与Lys分支部位通过酰胺键进行片段缩合。该方法在充分精制了各个肽片段后再进行合成,由此具有容易进行原料药中的杂质和类似物的解析的优点。

[0043] [化2]

[0044]



[0045] 本发明人等为了得到1个批次50mg的目标产物进行了3次合成,得到了与目标产物相当的物质。但是,发现了利用质量分析、GPC分析等针对所合成的抗原肽的确认试验比较困难(图1)。即,为了制成能够将作为原虫烯醇化酶的部分结构的AD22序列及其类似物对人施用的药品,证实了需要将肽抗原的分子结构变更为适于GMP制造时所使用标准设定(分析

方法)的全新分子结构。

[0046] (10)由感染症引起的血纤维蛋白溶酶原作用

[0047] 烯醇化酶是糖酵解中的第9号酶,负责在细胞内产生能量。另一方面,在肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)等病原微生物中,通过在细胞表面与人的纤维溶解蛋白质(血纤维蛋白溶酶原、组织血纤维蛋白溶酶原活性因子tPA)结合促进了对宿主细胞的感染受到了广泛注目(非专利文献24)。

[0048] 也有报道称,感染疟疾时,在媒介蚊虫体内的被称为动合子的原虫形态中,细胞表面烯醇化酶能够促进向蚊虫的中肠细胞侵入(非专利文献25)。

[0049] 通常,血纤维蛋白溶酶原含于血浆中,通过与受体蛋白质结合而活化。血纤维蛋白溶酶原是包含791个残基的蛋白质,1个血纤维蛋白溶酶原由5个Kringle域(三环结构域)和丝氨酸蛋白酶区域组成。Kringle域由约80个氨基酸组成,具有3组利用S-S交联形成的特征2级结构。通过该Kringle域与受体蛋白质结合而引起血纤维蛋白溶酶原激活剂部位的水解,由此出现血纤维蛋白溶酶活性。近年来,有报道称,在各种病原微生物中,细胞表面的烯醇化酶作为受体蛋白质发挥作用,与促进对宿主细胞的感染相关(非专利文献26)。

[0050] 现有技术文献

[0051] 专利文献

[0052] 专利文献1:日本特开2002-371098号公报

[0053] 专利文献2:W02006/035815公报

[0054] 专利文献3:日本特开2009-256324号公报

[0055] 专利文献4:日本特开2012-240940号公报

[0056] 非专利文献

[0057] 非专利文献1:WHO.Impact of malaria control.World Malaria Report 2013.Geneve:WHO Press,2013:55-68.

[0058] 非专利文献2:Kano S.and Kimura M.,Acta Tropica,89 (3):271-278,2004.

[0059] 非专利文献3:WHO.Country Profiles (Republic of Korea).World Malaria Report 2013.Geneve:WHO Press,2013:165-166.

[0060] 非专利文献4:Iwagami M,Itoda I,Hwang SY,Kho WG,Kano S.Plasmodium vivax PCR genotyping of the first malaria case imported from South Korea into Japan.J Infect Chemother.15 (1):27-33,2009.

[0061] 非专利文献5:Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet. 363 (9414):1017-1024, 2004.

[0062] 非专利文献6:Tanizaki R,Ujiie M,Kato Y,Iwagami M,Hashimoto A,KutsunaS,Takeshita N,Hayakawa K,Kanagawa S,Kano S,Ohmagari N.First case of Plasmodium knowlesi infection in a Japanese traveller returning from Malaysia.Malaria J.12:128,2013.

[0063] 非专利文献7:狩野繁之.我国(日本)的疟疾-当前如何诊断并治疗-(How we can diagnose and treat imported malaria patients in Japan).现代媒体57卷,pp.299-308,2011年.

- [0064] 非专利文献8:Stanisic DI,Barry AE,Good MF.Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge.Trends Parasitol.29(12):612-22,2013.
- [0065] 非专利文献9:Mercereau-Puijalon O,Fandeur T,Guillotte M,Bonne foy S.Parasite features impeding malaria immunity:antigenic diversity,antigenic variation and poor immunogenicity.Res Immunol.142(8):690-697,1991.
- [0066] 非专利文献10:Craig A,Scherf A.Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion.Mol Biochem Parasitol.115(2):129-143,2001.
- [0067] 非专利文献11:Tanabe K,Sakihama N,Kaneko A.Stable SNPs in malaria antigen genes in isolated populations.Science.2004,303,493.
- [0068] 非专利文献12:Snounou G,Viriyakosol S,Zhu XP et al.High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.Mol Biochem Parasitol.61(2):315-320,1993.
- [0069] 非专利文献13:奥浩之,狩野繁之.疟疾的基础和疫苗.生物医学科学与生物安全学报.26(1):31-35,2014.
- [0070] 非专利文献14:奥浩之,狩野繁之.疟疾疫苗.医疗产品监管科学.2(2):159-165,2012.
- [0071] 非专利文献15:Patarroyo ME,Amado R,Clavijo P,Moreno A,Guzman F,Romero P,et al.A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria.Nature.332(6160):158-161,1988.
- [0072] 非专利文献16:RTS,S Clinical Trials Partnership.First results of phase 3trial of RTS,S/AS01malaria vaccine in African children.New Engl J Med.365(20):1863-1875,2011.
- [0073] 非专利文献17:RTS,S Clinical Trials Partnership.A phase 3trial of RTS,S/AS01malaria vaccine in African infants.New Engl J Med.367(24):2284-2295,2012.
- [0074] 非专利文献18:Palacpac NM,Arisue N,Tougan T,Ishii KJ,Horii T.Plasmodium falciparum serine repeat antigen 5(SE36)as a malaria vaccine candidate.Vaccine.29(35):5837-5845,2011.
- [0075] 非专利文献19:Crompton PD,Pierce SK,Miller LH.Advances and challenges in malaria vaccine development.J Clin Invest.120(12):4168-4178,2010.
- [0076] 非专利文献20:Kano S,El Gaddal AA,Suzuki M.Clinical and epidemiological studies on a 47kD Plasmodium falciparum antigen.Jpn J Trop Med Hyg.18(4):317-324,1990.
- [0077] 非专利文献21:Norazmi MK,Kano S,Alias A Abdullah MS,Suzuki M.Reactivity of sera from patients with acute Plasmodium falciparum and P.vivax infections with an antigen Preparation from a P.falciparum isolate: mutually exclusive reactivity with a 47kD and 29kD band respectively.Jpn J

Trop Med Hyg.24(4):237-239,1996.

[0078] 非专利文献22:Kano S,Onda T,Matsumoto Y,Buchachart K,Krudsood S,Looareesuwan S,Aikawa M,Suzuki M.Serological evaluation of malaria patients in Thailand:antibody response against electrophoresed antigenic polypeptides of Plasmodium falciparum.Southeast Asian J Trop Med Public Health.29(2):341-343,1998.

[0079] 非专利文献23:Pal-Bhowmick I,Mehta M,Coppens I,Sharma S,Jarori GK.Protective properties and surface localization of Plasmodium falciparum enolase.Infect Immun.75(11):5500-5508,2007.

[0080] 非专利文献24:Cork AJ,Ericsson DJ,Law RH,Casey LW,Valkov E,Bertozzi C,Stamp A,Jovceviski B,Aquilina JA,Whisstock JC,Walker MJ,Kobe B.PLoS One.2015, vol.10,pp.e0121764.

[0081] 非专利文献25:Ghosh AK,Coppens I,Gardsvoll H,Ploug M,Jacobs-Lorena M.Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut.Proc Natl Acad Sci U S A.2011,vol.108,pp.17153-17158.

[0082] 非专利文献26:Raymond BB,Djordjevic S.Veterinary Microbiology.2015, vol.178,pp.1-13.

发明内容

[0083] 发明所要解决的问题

[0084] 本发明的课题在于,提供一种能够与GMP制造对应的新的疟疾疫苗用抗原肽的分子结构。特别是,本发明的课题还在于,提供一种含有能够诱发利用了与人及其他动物的免疫反应的、对疟原虫的免疫学应答的肽及其类似物的微粒、适于含有抑制恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)增殖的免疫用抗原的微粒的制造方法的方法。

[0085] 用于解决问题的方案

[0086] 本发明人等为了开发能够与GMP制造对应的新的疟疾疫苗用抗原肽而进行了全新的AD22抗原肽分子结构及其制备方法的开发。重复了各种条件和实验,其结果是,通过使含有AD22抗原序列的肽分别与Lys残基上的2个氨基结合,成功合成了全新的2分支状结构的抗原肽。

[0087] 尽管该2分支状肽是分子量超过了15000的合成肽,但非常意外的是,证实了该物质解决了一般的肽抗原所存在的问题,即溶解性(>1mg/mL的水溶性)、HPLC分析(ODS、GPC色谱柱下的峰分离)、质量分析(m/z±5以内的半峰宽)。即,证实了本发明的肽化合物以良好的可再现性获得能够在药品的标准设定中使用的高精度分析数据。

[0088] 通过建立这些制备方法,终于成功发现了能够与GMP制造对应的新的疟疾疫苗用抗原肽的分子结构及其制造方法。

[0089] 即、本发明提供了如下方案。

[0090] [1]一种肽,其具有如下结构:具有(i) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02(序列号1)或(ii) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-

Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 (序列号2) 的氨基酸序列的2个肽通过各自的羧基末端与下述 (iii) 所示的连接肽的Lys的两个氨基之间的酰胺键排列成2分支状。

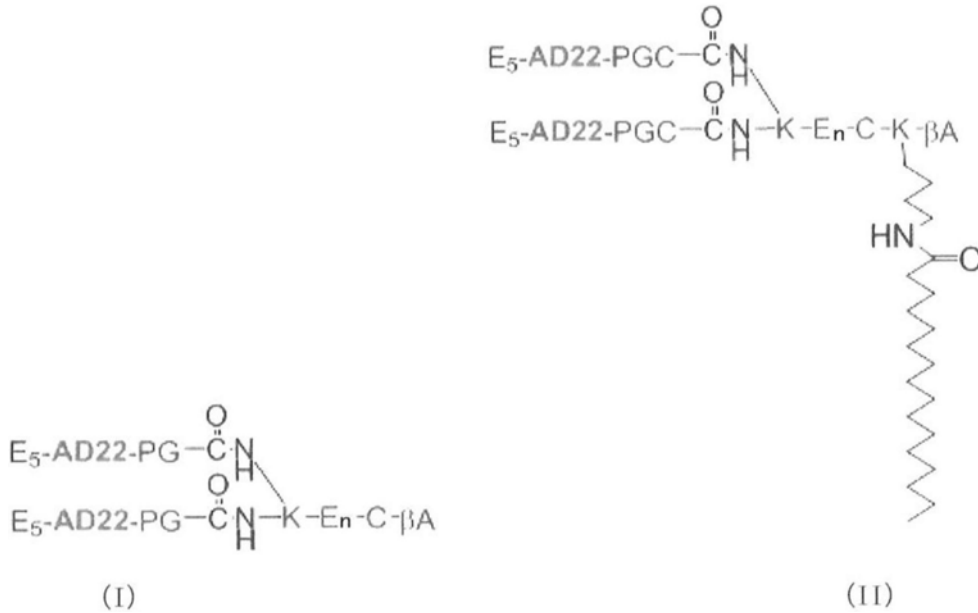
[0091] (iii) Lys-A05-Cys-A06

[0092] ((i)、(ii)、(iii) 中,A01至A06表示包含0的任意数目的氨基酸残基。)

[0093] [2] 根据[1]所述的肽,其由下述 (I) 或 (II) 所示。

[0094] [化3]

[0095]



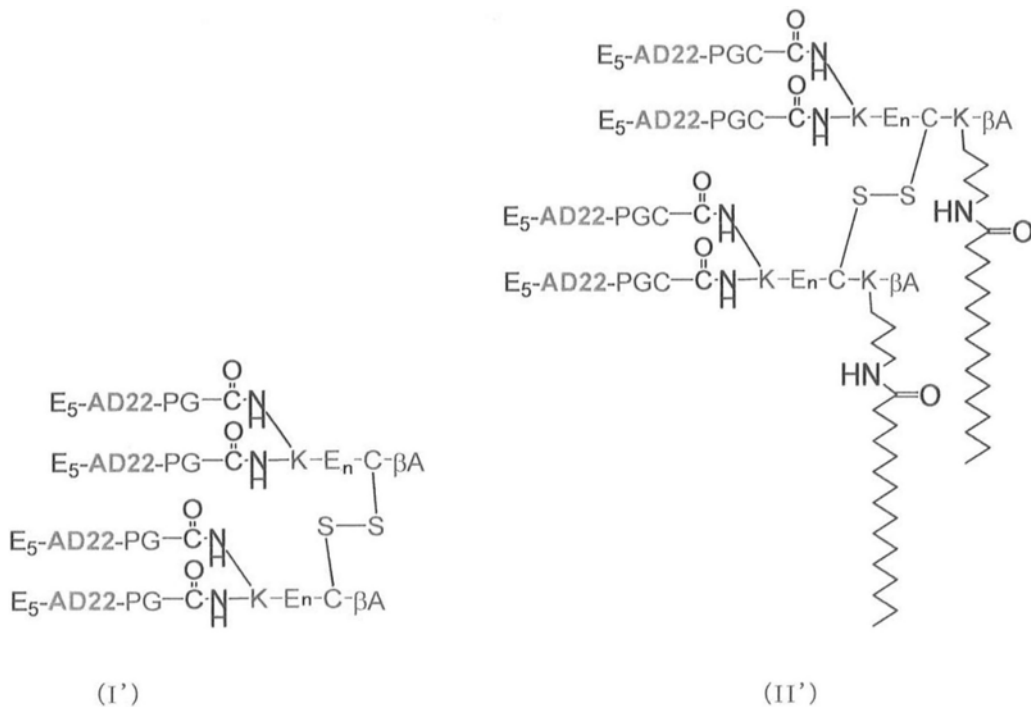
[0096] (AD22表示序列号1的氨基酸序列;n表示4或5的整数。)

[0097] [3] 根据[1]或[2]所述的肽,其具有通过该肽内的所述 (iii) 所示的连接肽序列的Cys残基间的S-S键而二聚化的结构。

[0098] [4] 根据[3]所述的肽,其由下述 (I') 或 (II') 所示。

[0099] [化4]

[0100]



- [0101] (AD22表示序列号1的氨基酸序列;n表示4或5的整数。)
- [0102] [5]一种用于对疟疾诱发免疫学应答的疫苗,其含有[1]~[4]中任一项所述的肽。
- [0103] [6]根据[5]所述的疫苗,其用于诱发阻止或阻碍由疟疾引起的烯醇化酶与血纤维蛋白溶酶原的相互作用的免疫学应答。
- [0104] [7]根据[5]或[6]所述的疫苗,其中,疟疾是由人或猴疟原虫的感染引起的疟疾。
- [0105] [8]根据[5]或[6]所述的疫苗,其中,疟疾是由恶性疟原虫的感染引起的疟疾。
- [0106] [9]根据[5]或[6]所述的疫苗,其中,疟疾是由恶性疟原虫以及其他人或猴疟原虫的混合感染引起的疟疾。
- [0107] [10]一种含有抗原的微粒,其通过如下工序制造:将[1]~[4]中任一项所述的肽的溶液与含有生物降解性高分子的挥发性有机溶剂混合而制作出乳液,将所得的乳液与带负电荷的聚合物水溶液混合。
- [0108] [11]根据[10]所述的含有抗原的微粒,其特征在于,生物降解性高分子是聚乳酸-羟基乙酸共聚物。
- [0109] [12]根据[10]所述的含有抗原的微粒,其特征在于,生物降解性高分子是聚(α -羟基酸/ α -氨基酸)。
- [0110] [13]一种用于疟原虫感染症的预防或治疗的药物组合物,其含有[10]~[12]中任一项所述的含有抗原的微粒、和药学上能接受的载体。
- [0111] [14]一种物质,其使[1]~[4]中任一项所述的肽结合于膜、乳胶颗粒、金属超微粒或塑料板的固相表面而形成。
- [0112] [15]一种血清或血浆中的疟疾抗体效价的检查方法,其包含使用[14]所述的物质来检查血清或血浆中的疟疾抗体效价的工序。
- [0113] [16]一种[1]~[4]中任一项所述的肽的免疫学应答的解析方法,其包含使用[14]所述的物质来测定针对[1]~[4]中任一项所述的肽的抗体的工序。
- [0114] [17]一种施用了[1]~[4]中任一项所述的肽的个体的抗体效价测定方法,其包含使用[14]所述的物质来测定针对[1]~[4]中任一项所述的肽的抗体的工序。
- [0115] [18]一种含有抗原的微粒的制备方法,其包含:将[1]~[4]中任一项所述的肽的溶液与含有生物降解性高分子的挥发性有机溶剂混合而制作出乳液的工序、以及将所得的乳液与带负电荷的聚合物水溶液混合的工序。
- [0116] [19]根据[18]所述的含有抗原的微粒的制备方法,其特征在于,生物降解性高分子是聚乳酸-羟基乙酸共聚物。
- [0117] [20]根据[18]所述的含有抗原的微粒的制备方法,其特征在于,生物降解性高分子是聚(α -羟基酸/ α -氨基酸)。
- [0118] [21]一种用于疟原虫感染症的预防或治疗的药物组合物的制备方法,其包含:通过[18]~[20]中任一项所述的制备方法制备含有抗原的微粒的工序、以及配合该含有抗原的微粒和药学上能接受的载体而制备药物组合物的工序。
- [0119] 发明效果
- [0120] 根据本发明,可提供一种生理活性肽,其带有恶性疟原虫烯醇化酶的部分氨基酸序列,具有与GMP制造时的标准设定对应的分子结构。特别是,其特征在于,能够容易地实施原料药的确证试验(质量分析、HPLC分析)。本发明的肽可以通过使其与患者血清反应而用

作恶性疟感染的诊断材料、以及产生抑制恶性疟原虫增殖的抗体的免疫用抗原。即,可以作为对恶性患者而言产生主动免疫的症状改善药、以及作为对非感染者而言使用了防御免疫的疫苗发挥作用。

附图说明

[0121] 图1是表示以往的方法中得到的式(A)的抗原肽的分析结果(GPC色谱和MALDI-TOF-MS谱)的图。

[0122] 图2是表示恶性疟原虫烯醇化酶的分子结构、以及35个残基序列(序列号3的氨基酸号254~288:序列号21)所位于的环状结构(虚线部分)。

[0123] 图3是抗原肽(I') (AD22map2-SS)的HPLC色谱。

[0124] 图4是抗原肽(I') (AD22map2-SS)的ESI-MS数据。

[0125] 图5是抗原肽(II') (AD22map2pa1-SS)的HPLC色谱。

[0126] 图6是抗原肽(II') (AD22map2pa1-SS)的ESI-MS数据。

[0127] 图7是免疫施用所使用的含有抗原的微粒的光学显微镜照片(代替附图的照片)。

[0128] 图8是免疫后的采血(第3周、第6周、第9周)时的、免疫群(实验区1、图中的左侧)和非免疫群(实验区2、图中的右侧)中针对肽抗原的IgG抗体效价的变化。在本图中,使用ELISA法中的250倍稀释下的吸光度,通过从各周时的吸光度值减去0周时的吸光度来绘制出图。

[0129] 图9是免疫后的采血(第3周、第10周)时的、免疫群(实验区1、图中的左侧)和非免疫群(实验区2、图中的右侧)中针对肽抗原的IgG抗体效价的变化。在本图中,使用ELISA法中的250倍稀释下的吸光度,通过从各周时的吸光度值减去0周时的吸光度来绘制出图。

[0130] 图10是恶性疟原虫烯醇化酶(*P.falciparum* enolase、GenBank注册号AB0 26051)(序列号3)与源自人的 α 烯醇化酶(Human alpha enolase、GenBank注册号M14328)(序列号4)的氨基酸序列的对比。AD22是用下划线标记出的地方,AT28是用下划线和虚线标记出的地方。

[0131] 图11是检测出肽1~肽8与血纤维蛋白溶酶的结合的、Dot-Blot测定中的利用DAB试剂显色后的照片(代替附图的照片)。图中的1至8的号码为点样了肽1至肽8的肽溶液的地方,P是点样了血纤维蛋白溶酶原溶液的地方(阳性对照)。

[0132] 图12是检测出肽1~肽8与血纤维蛋白溶酶原的结合的、ELISA测定中的利用TMB试剂显色后的酶标板的照片(代替附图的照片)。在酶标板内的各孔中使肽1~肽8固相化后与血纤维蛋白溶酶原发生反应。结合检测通过HRP修饰-抗血纤维蛋白溶酶原抗体与TMB试剂的显色来进行。

[0133] 图13是检测出肽1~肽8与血纤维蛋白溶酶原的结合的、ELISA测定中的利用TMB显色后的吸光度数据(450nm)(血纤维蛋白溶酶原浓度为1 μ g/well)。

[0134] 图14是目前为止报道的参与烯醇化酶分子中的血纤维蛋白溶酶原结合的部分序列结构。恶性疟原虫的部分肽(序列号18)、肺炎球菌烯醇化酶(*Streptococcus pneumoniae* enolase)的部分肽(序列号19)、源自人的 α 烯醇化酶的部分肽(序列号20)。

具体实施方式

[0135] 以下,对本发明进一步进行详细说明。

[0136] 本发明涉及以源自疟原虫的蛋白质的部分序列为基础的下述肽。

[0137] 本发明的肽具有如下结构:具有 (i) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02 (序列号1) 或 (ii) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 (序列号2) 的氨基酸序列的2个肽通过各自的羧基末端与下述 (iii) 所示的连接肽的Lys的两个氨基之间的酰胺键排列成2分支状。

[0138] (iii) Lys-A05-Cys-A06

[0139] ((i)、(ii)、(iii)中,A01至A06表示包含0的任意数目的氨基酸残基。)

[0140] 对序列表中示为序列号1的肽而言,在(i)的序列中,A01和A02为0。

[0141] 对序列表中示为序列号2的肽而言,在(ii)的序列中,A03和A04为0。

[0142] A01和A03优选为0~10个氨基酸残基,此序列只要对抗原肽的免疫应答性没有影响就没有特别限制,但为了提高整个肽的溶解性,更优选为3~10个连续的酸性氨基酸残基(谷氨酸或天门冬氨酸)或碱性氨基酸残基(赖氨酸、精氨酸或组氨酸)。

[0143] A02和A04优选为0~10个的氨基酸残基,更优选为1~5个氨基酸残基。此序列只要对抗原肽的免疫应答性没有影响就没有特别限制,但优选为能够确保烯醇化酶肽与连接的结合自由度的序列,例如,可列举出Pro-Yaa或Lys-Yaa(Yaa是Gly或Pro等自由度高的氨基酸残基)。也可以是Pro-Yaa-Cys或Lys-Yaa-Cys。

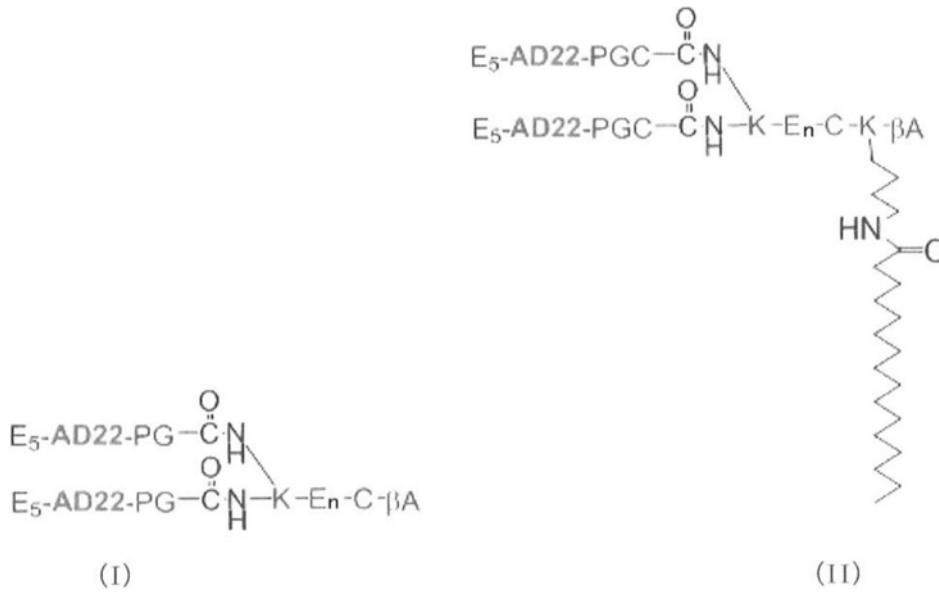
[0144] A05优选为0~10个的氨基酸残基,此序列只要对抗原肽的免疫应答性没有影响就没有特别限制,但为了提高肽的溶解性,更优选为3~10个连续的酸性氨基酸残基或碱性氨基酸残基。

[0145] A06优选为0~10个的氨基酸残基,此序列只要对抗原肽的免疫应答性没有影响就没有特别限制,但在树脂上进行固相合成的情况下,作为空间位阻低的第1氨基酸,优选为羧基末端含有 β A(β -丙氨酸)的氨基酸残基。A06也可以仅为 β A。但是,如果不妨碍肽合成反应的进行,则也可以使用其他残基进行代替。另外,也可以在A06的一部分的氨基酸上附加用于提高棕榈酰基等的脂溶性的修饰基团。例如,可以将A06设为Lys- β A,在Lys的侧链氨基上附加修饰基团。附加脂溶性的修饰基团的优点在于,可期待提高与制剂时使用的非离子性表面活性剂(Tween(吐温)、Span(司盘)等)的相溶性、以及提高自组装形成的抗原性等。作为适于代替棕榈酰基的其他基团的修饰基团,可以通过使脂溶性高的羧酸形成酰胺键来用作修饰基团。例如,可以举例示出硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸、油酸、亚油酸、胆酸等。

[0146] 作为本发明的肽的优选形态,可举例示出下述(I)或(II)的肽。

[0147] [化5]

[0148]



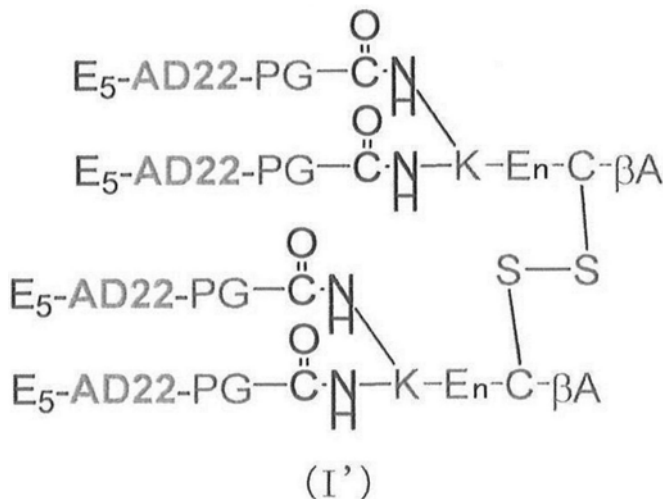
[0149] E₅分别表示5个Glu残基连续的序列,AD22分别表示序列号1的氨基酸序列。另外,PG是指Pro-Gly序列,G表示从Gly残基除去羧基后的部分。进而,分支部的K表示Lys残基除去2个氨基的部分,该2个Lys残基的氨基分别与E₅-AD22-PG-序列或E₅-AD22-PGC-序列结合。En表示4个或5个Glu残基连续的序列,优选为4个Glu残基连续的序列E₄,即n为4。C是Cys残基。C末端表示βAla残基或侧链氨基被棕榈酰基化的Lys残基和βAla残基的序列。N末端是无保护的氨基,C末端是无保护的羧基,但也可以具有保护基。

[0150] 本发明的优选形态为,上述肽具有通过肽内的 (iii) 所示的连接肽序列的Cys残基间的S-S键而二聚化的结构。即,优选的是,(i) 或 (ii) 的肽通过 (iii) 的肽而二聚化,进而,通过Cys残基的S-S键而四聚化。

[0151] 作为具体例子,可列举出下述2种肽结构体。

[0152] [化6]

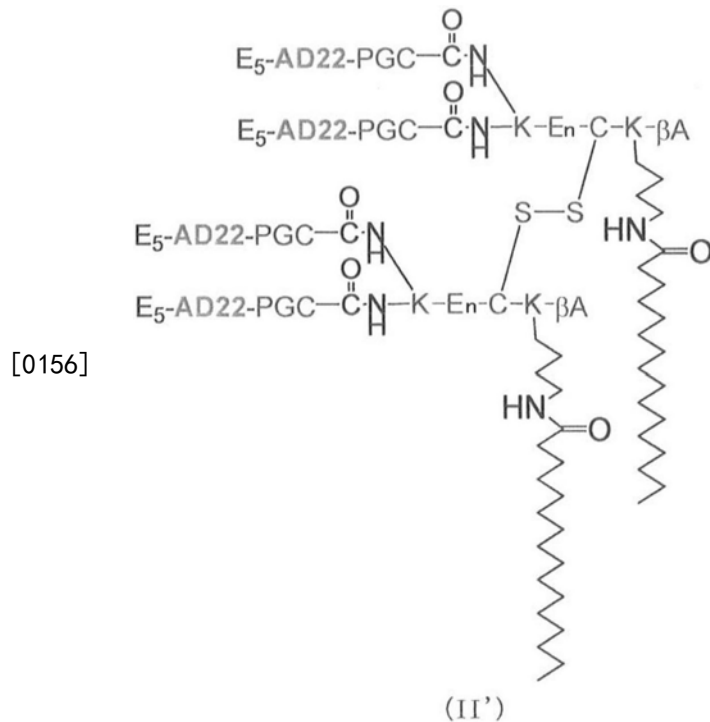
[0153]



[0154] E₅分别表示5个Glu残基连续的序列,AD22分别表示序列号1的氨基酸序列。另外,PG是指Pro-Gly序列,G表示从Gly残基除去羧基后的部分。进而,分支部的K表示Lys残基除去两个氨基的部分,该2个Lys残基的氨基分别与E₅-AD22-PG-序列结合。En表示4个或5个Glu残基连续的序列,优选为4个Glu残基连续的序列E₄,即n为4。C是从Cys残基除去巯基的

部分,图示了在侧链中形成二硫键(-S-S-)的情况。C末端的 β A表示 β A1a残基。N末端是无保护的氨基,C末端是无保护的羧基,但也可以具有保护基。

[0155] [化7]



[0157] E_5 分别表示5个Glu残基连续的序列,AD22分别表示序列号1的氨基酸序列。另外,PGC是指Pro-Gly-Cys序列,G表示从Gly残基除去羧基后的部分。进而,分支部的K表示Lys残基除去两个氨基的部分,该2个Lys残基的氨基分别与 E_5 -AD22-PGC-序列结合。En表示4个或5个Glu残基连续的序列,优选为4个Glu残基连续的序列 E_4 ,即n为4。C是从Cys残基除去巯基的部分,图示了在侧链中形成二硫键(-S-S-)的情况。C末端侧的-K- β A表示侧链氨基被棕榈酰基化的Lys残基和 β A1a残基的序列。N末端是无保护的氨基,C末端是无保护的羧基,但也可以具有保护基。

[0158] 这些肽结构体可以基于通常的肽合成法来制造。更具体而言,可以通过下述的实施例所述的方法来制造。

[0159] 根据本发明,还提供含有上述肽的微粒及其制造方法。微粒的粒径没有特别限制,可以根据用途适当调整,但优选100nm~50 μ m。

[0160] 作为微粒,是如日本特开2009-256324中公开的含有生理活性物质和生物降解性高分子的微粒,可以举例示出通过如下工序制备的微粒:将含有生理活性物质的挥发性有机酸水溶液或生理活性物质的挥发性有机酸溶液与含有生物降解性高分子的挥发性有机溶剂混合而制备出乳液的工序、以及将所得的乳液与带负电荷的聚合物的水溶液混合的工序。此处,作为用于制作微粒的生物降解能高分子,可以优选使用聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚(α -羟基酸/ α -氨基酸) (polydepsipeptide)。作为挥发性有机酸,可以选自常温下为液体的具有羧酸基团的有机化合物,可举例示出醋酸、甲酸,除此之外,还可列举出作为除羧酸以外的官能基具有羟基的乳酸;具有多个羧酸基团的富马酸、丙二酸、苹果酸等。作为挥发性有机溶剂,可使用能够溶解生物降解性高分子、有挥发性且难以与水混合的有机溶剂,但优选使用二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、二乙醚等。作为带负电荷的聚合物,可列举出含有

氧原子的聚合物,优选使用聚乙烯醇、羧甲基纤维素、聚乙二醇。作为通过上述制造方法制造的微粒的一个例子,可列举出:最外层含有带负电荷的聚合物,中间层含有生物降解性高分子,内层为含有本发明的肽的W/O/W型乳液或该乳液的干燥微粒;或者,外层含有带负电荷的聚合物,内层为含有生物降解性高分子和本发明的肽的W/O型乳液或该乳液的干燥微粒。

[0161] 另外,还可列举出如日本特开2012-240940中公开的聚合物表面呈现出肽的微粒。

[0162] 本发明的抗原肽和含有抗原肽的微粒可以是同时使用含有铝离子的佐剂的微粒。通常使用的氢氧化铝凝胶(明矾)能够与微粒均匀地悬浮,通过佐剂的效果,可进一步促进抗原肽的抗原性。例如,这可以参考Lindblad、Vaccine 2004年、22卷、3658-3668页的引用文献,进行最佳铝盐的选择和微粒的设计。

[0163] 除此之外,本发明还可以使用铝离子以外的佐剂。佐剂可以与抗原一起含在微粒中,或者也可以含在生理盐水中。通过含有佐剂,可进一步促进抗原肽的抗原性。例如,这可以参考Guy、Nature Reviews Microbiology 2007年、5卷、505-51页的引用文献,进行最佳佐剂的选择和微粒的设计。

[0164] 另外,本发明的抗原肽和含有抗原肽的微粒可以与药学上能接受的载体组合制成药物组合物。载体可以与抗原一起含在微粒中,或者也可以含在生理盐水中。此处,作为药学上能接受的载体,可列举出缓冲剂、冻结干燥助剂、稳定助剂、增溶助剂、抗菌剂等制剂过程中能接受的成分。作为缓冲剂,例如可列举出磷酸盐、柠檬酸盐、磺基水杨酸盐以及醋酸盐等。作为冻结干燥助剂,可列举出甘露醇、乳糖、山梨醇、葡聚糖、聚蔗糖(Ficoll)、以及聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。作为稳定助剂,可列举出抗坏血酸、半胱氨酸、硫代甘油、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、龙胆酸、肌醇等。作为增溶助剂,可列举出乙醇、甘油、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯、山梨醇酐单油酸酯、聚山梨醇酯类、聚(聚乙烯)聚(氧丙烯)聚(氧乙烯)嵌段共聚物(Pluronic:普流罗尼)以及卵磷脂等。作为抗菌剂,可列举出苯甲醇、苯扎氯铵、聚丁醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯等。

[0165] 药物组合物的剂型没有特别限制,可以列举出注射剂、口服剂、涂抹剂等,优选注射剂。注射剂可以通过如下方法制造:将微粒溶解于稀释剂等中,根据需要添加稳定剂、防腐剂、缓冲剂等。

[0166] 作为施用对象,可列举出感染了疟疾的哺乳类、或者有感染的危险性或感染的嫌疑的哺乳类,具体而言,可列举出人、猴、小鼠、大鼠等,优选为人。

[0167] 作为疟疾症,可举例示出:由恶性疟原虫的单独感染引起的疟疾、由人或猴疟原虫的感染引起的疟疾、进一步由它们的混合感染引起的疟疾。

[0168] 本发明的药物组合物对人的施用量根据施用对象的年龄、性别、体重、免疫状态、施用方法、或该药物组合物中所含的生理活性的比例等而不同,但1次施用优选 $1\mu\text{g}$ ~200mg。

[0169] 施用次数没有特别限制,在一定期间内多次施用,可以期待利用加强效果实现的抗体效价的上升和维持。所说的一定期间优选2周至6个月,更优选3周至3个月。所说的多次优选2次至20次,更优选2次至4次。

[0170] 施用方法没有特别限制,但例如可举例示出如下施用方法:使抗原肽、含有抗原肽的微粒或者微粒状的药物组合物悬浮于生理盐水中,通过向上臂部的肌肉内注射、皮下注

射或皮内注射来施用。可预测：通过该施用方法，微粒向施用部位的肌肉组织、皮内或皮下渗透，抗原肽或其制剂被免疫系统的细胞吸收，最终引起体液免疫、细胞免疫。虽然该方法是传统的方法，但由于其可靠，因此可认为未来仍会被广泛应用。

[0171] 作为其他施用方法，还可举例示出利用生理盐水形成的悬浮物向鼻腔施用的方法。向鼻腔的施用方法可以举例示出利用喷雾器或滴管进行的方法，但不限于此。可认为：通过向鼻腔的施用方法，抗原肽渗透至鼻腔粘膜，被免疫系统的细胞吸收，最终引起免疫应答。可认为：该方法与利用皮下注射进行的方法相比，在安全性方面更优异。另外，可预测：与皮下施用不同之处是，通常会大量促进粘膜中的分泌型抗体IgA的产生。因此，可认为：对于疟疾之类的在红血球内增殖的原虫感染症而言，作为皮下施用方法的补充施用方法比较适合。

[0172] 进而，作为其他施用方法，还可举例示出使用粘贴在上臂部的皮肤局部而使用的被称为贴布剂和泥敷剂的剂型的向皮下或皮内的施用方法。可预测：通过这些施用方法，抗原肽向施用部位的皮内或皮下渗透，被免疫系统的细胞吸收，最终引起体液免疫或细胞免疫。可认为：该方法与利用皮下注射进行的方法相比，在安全性方面更优异。另一方面，与皮下注射的情况相比，制剂中所有的抗原肽是否全部向皮内或皮下渗透则作为实用方面的课题而遗留下来。

[0173] 本发明的生理活性肽或含有其的药物组合物能够作用于诱导免疫学应答的抗原、即疫苗。由此，能够预防疟疾的感染和发病，提高疟疾患者的免疫来抑制症状的发展，使症状有所改善。

[0174] 需要说明的是，在本发明中，所说的“免疫学应答”是包含细胞免疫学应答和体液免疫学应答这两者的概念。其中，细胞免疫学应答是指例如通过巨噬细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、嗜酸性细胞、T细胞等引起的免疫，作为对恶性疟原虫的细胞免疫学应答，已知有杀伤T细胞所参与的免疫学应答。另外，作为体液免疫学应答，已知有通过能够与源自恶性疟原虫的蛋白质、糖链等发生特异性结合的源自宿主的抗体引起的免疫学应答。从通过本发明制造的抗原肽角度考虑，理想的是，作为体液免疫学应答来诱导抗体。另外，作为由本发明的抗原肽引起的免疫学应答，优选的是，阻止或阻碍由疟疾引起的烯醇化酶与血纤维蛋白溶酶原的相互作用的免疫学应答。

[0175] 使本发明的生理活性肽结合于固相表面，固定化或使其吸附，由此能够提供为用于疟疾的诊断和检查的检查诊断材料。即，作为本发明的一个形态，能够提供本发明的肽结合于固相表面的、疟疾的诊断和检查用物质。此处，作为固相表面，可列举出例如膜、乳胶颗粒、塑料板或微珠等的固相表面，但不限于它们。例如，制成膜状的本发明的肽化合物可以通过旋转铸造法来制备，通过在该膜上进行试验样品的点样，能够检测出试验样品中抗体的存在。结合在乳胶颗粒上的本发明的化合物可以通过乳液聚合法、悬浮聚合法来制备，可以用于凝聚反应。向塑料板或微珠上的固定化例如可以通过如下方法进行：将50 μ g/0.1mL的本发明的化合物适量滴加至塑料板的孔中、或者将微珠浸泡在200 μ g/0.1mL的本发明的溶液中。这样的检查诊断材料被期待应用于血清或血浆中的疟疾抗体效价的检查、本发明的抗原肽的免疫学应答的解析、以及免疫施用了本发明的抗原肽的个体的抗体效价测定。

[0176] 以下，关于使上述的含有生理活性肽的微粒或微粒状的药物组合物悬浮于生理盐水来使用的制剂和制剂盒的概要，示出了特别是设想为应用于人时的一个例子，但以本发

明为基础可想到的制剂的概要及其组成/性状不限于该例子。

[0177] 例如,按照日本特开2009-256324中公开的方法,制作微粒时的抗原含量(抗原重量/微粒重量)可以在大约为0.1 μ g/mg至100 μ g/mg之间来制作。实际上,若考虑到抗体效价的持续性、以及从微粒恒定地释放出抗原的(0级释放)的理想微粒,则优选1 μ g/mg至50 μ g/mg之间,进一步优选1 μ g/mg至30 μ g/mg之间。

[0178] 一般情况下,每1个制剂盒的组成(2.0mg的微粒、0.5mL的生理盐水)通常相当于成人每一次的施用量。通常,抗原施用量的上限取决于使用了啮齿类、非啮齿类的安全性试验,但由于本剂使用了安全性比较高的肽抗原,因此可预测1次施用的抗原量能可以在1 μ g至200 μ g之间广泛地施用。实际上,若考虑到抗体效价的持续性、制造时的成本,则优选2 μ g至100 μ g,更优选4 μ g至60 μ g。

[0179] 另外,对于制剂盒的组成而言,例如,可以构成为将微粒、生理盐水密封于2个独立的管形瓶或安瓿瓶中的制剂盒,也可以以施用时的安全性和不使用防腐剂(硫柳汞等)为目的而一体型地构成为预充式注射器,但不限于这些。

[0180] [制剂和制剂盒的概要例]

[0181] (a) 制剂的概要

[0182] 本剂是作为根据在疟疾流行地区和日本国内的流行病学调查中作为参与恢复期的抗原被报道过的、使用了源自恶性疟原虫的糖酵解酶烯醇化酶的22个残基部分序列作为抗原的制剂。另外,一般情况下流行地区居民通过疟疾的持续感染而维持免疫,因此,为了模拟这种情况,使用了缓释来自PLGA(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)微粒中的抗原的智能材料。抗原被密封于PLGA(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)微球中。

[0183] 抗原是具有将4条22个残基的肽(AD22)排列了的串联结构的化学合成肽抗原,具有上述(I')的结构。使用时,本剂是将微粒悬浮于生理盐水来使用的液体制剂。在制造抗原时,通过高效液相色谱仪、氨基酸分析仪对抗原进行了分析,可确认抗原的结构式(I')。

[0184] (b) 组成

[0185] 本剂1盒(5.0mg微粒、0.5mL生理盐水)中含有下述成分。

[0186] 有效成分:AD22合成肽抗原(I') 50 μ g。

[0187] 添加剂:微粒几乎都是聚乳酸-羟基乙酸共聚物(约5.0mg),含有包覆于表面的微量聚乙烯醇。除此之外,为了使微粒悬浮,生理盐水0.50mL中含有氯化钠4.25mg。

[0188] (c) 微粒的性状

[0189] 外观/性状:无色的细粉,无臭。

[0190] 溶解性:容易分散于生理盐水和精制水中。(通常以1~10mg/0.1mL来使用。)

[0191] 吸湿性:由于通过聚乙烯醇包覆了外部,因此没有潮解性。

[0192] 熔点等:由于是高分子材料,因此大约在60 $^{\circ}$ C以上发生软化。

[0193] 其他特性值:通过电子显微镜观察,观察到0.1~40 μ m的球状微粒。

[0194] 有效成分的定量法:微粒中的抗原含量(抗原重量/微粒重量)根据溶剂提取法(氯化甲烷-水系溶剂)或通过元素分析测定的CHN组成比来定量。(本剂的含量为10 \pm 1 μ g/mg。)

[0195] (d) 使用时的性状

[0196] 使用时,本剂是将微粒5mg悬浮于生理盐水0.5mL来使用的液体制剂。悬浮并振荡混合时,是均匀的白色浑浊液体制剂。

[0197] pH:5.5~8.0

[0198] 渗透压比(相对于生理盐水之比):约为1

[0199] 接着,以下示出了给人施用时的一个例子,但施用量、施用间隔以及施用次数不限于该例子。

[0200] [功效或效果]

[0201] (e) 功效或效果/用法和用量

[0202] 疟疾感染时重症化的预防:通常,间隔4周施用2次,每次0.5mL,进而经过20~24周后,1次向皮下或肌肉内注射0.5mL。对于不满10岁的人,按照相同的施用间隔,每次向皮下注射0.25mL。

[0203] 但是,在未主动获得AD22抗体的情况下,进行追加注射。

[0204] **以第3次接种本剂1~2个月后为目标进行抗体检查,对未获得AD22抗体的被接种者考虑追加接种。

[0205] (f) 有效性

[0206] 疟疾感染时重症化的预防:以AD22抗原、源自恶性疟原虫的烯醇化酶抗体为阴性的成人、儿童为对象,经3次接种本剂0.5mL(不满10岁时为0.25mL)后,可预测几乎所有的受试者均为AD22抗体阳性。进而,可期待在疟疾流行地区受到了疟疾感染的情况下延迟重症化,可期待能够阻止因治疗开始的延误所造成的死亡。

[0207] (g) 安全性

[0208] 从一般情况考虑,可预测接受了接种的受试者中约有10%会发生副反应。可想到主要的副反应为局部疼痛、肿胀、热感、疲倦感、头痛/头重感、发热等。可想到,由于组成成分的不同,因此关于本剂,在现有的疫苗中经常使用的明矾(Alum)佐剂所常见的硬结很少发生。

[0209] (h) 药效药理

[0210] 通过传播原虫的蚊虫的叮咬而进入体内的疟原虫从血液中迅速侵入肝细胞,在肝细胞内经过潜伏期后,在肝细胞内进行分裂/增殖,从而作为称作裂殖子的原虫的一个形态释放至血液中,并侵入至红血球内。在红血球内进行分裂/增殖,从而再次作为裂殖子释放至血液中后,再次侵入红血球中,由此重复分裂增殖。由疟疾引起的发热症状是通过红血球内循环引起的。恶性疟与其他三种疟疾相比,若治疗延误,则会带来重症化和死亡的危险。特别是已知没有免疫的流行地区的婴幼儿和来自非流行地区的旅行者等容易发生重症化。

[0211] 但是,在裂殖子侵入红血球内的同时,抗体也被吸收。吸收的抗体通过阻断原虫增殖时产生能量的糖酵解的烯醇化酶的酶反应来抑制或阻碍原虫的增殖。但是,由于还已知烯醇化酶局部存在于裂殖子的表面,因此也可认为抗体与其抗原决定基发生反应来抑制或阻碍原虫侵入红血球。通过这些作用机制,能够在受到了疟疾感染的情况下延迟重症化,能够阻止因治疗开始的延误所造成的死亡。

[0212] 实施例

[0213] 以下示出实施例,对本发明更加详尽地加以说明。只要不超出本发明的要旨,就不限定于这些实施例。

[0214] 疟原虫感染时烯醇化酶和血纤维蛋白溶酶原的作用:

[0215] 近年来,开始有报道称疟原虫经由人血液中的血纤维蛋白溶酶原和原虫表面的烯

醇化酶结合后进入宿主 (Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, vol. 108, pp. 17153-17158.; Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. 49 (2): 411-423, 2003.; Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106 (Suppl 1): 85-90, 2011.)。即,可推断原虫表面中的血纤维蛋白溶酶活性也就是蛋白质水解活性促进了向宿主细胞的侵入。详细的报道仅有原虫动合子向蚊虫的中肠侵入的情况,除此之外所预测的向肝脏细胞、红血球侵入时并未得到直接确认。

[0216] 如上所述,本发明人等在进行流行病学调查时发现:源自疟原虫的醇化酶分子与对恶性疟具有一定免疫力的患者血清发生强烈反应,因此作为备选疫苗抗原开展了研究。最初,预测是IgG抗体阻止了在细胞内的能量产生系统中发挥作用的酶,但无法说明IgG进入了细胞内,因此产生了很大的矛盾。即,无法说明流行病学上观察到的疟疾流行地区居民的高抗烯醇化酶抗体效价是如何能抑制疟原虫寄生率的。

[0217] 在初期的研究中,还发现了在裂殖子表面出现烯醇化酶 (Kano S, Nakamura N, Murakami T, Ishikawa H, Suzuki M. Localization of 47kD antigenic polypeptides in malaria parasites by confocal laser scanning microscopy. Bioimages. 3 (1): 13-17, 1995.) ,但当时无法说明为什么会在原虫表面观察到糖酵解的酶。通过本发明人等的多年研究,终于开始认为可能是下述原理:流行病学上观察到的疟疾流行地区居民的高抗烯醇化酶抗体阻碍了裂殖子原虫表面的烯醇化酶与人血纤维蛋白溶酶原的结合(进而,阻碍了动合子、裂殖子向宿主细胞侵入)。

[0218] 疟原虫烯醇化酶上的血纤维蛋白溶酶原结合部位:

[0219] 血纤维蛋白溶酶原通常含于血浆中,通过与受体蛋白质结合而活化。血纤维蛋白溶酶原是包含791个残基的蛋白质,1个血纤维蛋白溶酶原由5个Kringle域和丝氨酸蛋白酶区域构成。Kringle域由约80个氨基酸组成,具有3组利用S-S交联形成的特征2级结构。有报道称通过该Kringle域与受体蛋白质结合而引起血纤维蛋白溶酶原激活剂部位的水解,由此出现血纤维蛋白溶酶活性,实现向动合子蚊虫的中肠侵入。(Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, vol. 108, pp. 17153-17158.; Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. 2003, 49, 411-423.; Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011, 106 (Suppl 1), 85-90.)

[0220] 烯醇化酶上的血纤维蛋白溶酶原结合部位与其他病原微生物上的烯醇化酶的报道等中的序列相比较,换算成疟原虫的氨基酸序列,可认为大概在第260号至第285号的范围。令人非常意外的是,这与本发明人等研究与患者血清的反应性时的肽抗原的AD22序列

(Ala256-Asp277) 和AT28序列 (Ala256-Thr283) 非常一致 (Nonaka R, Oku H., Sato K, Kano S., Suzuki M, Katakai R. Synthesis of Small Domain Peptides of Glycolytic Enzyme Enolase. Peptide Science 2000, T. Shioiri, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka; pp. 301-304 (2001) .)。

[0221] 如上, 在现有技术中, 无法说明流行病学上观察到的疟疾流行地区居民的高抗烯醇化酶抗体效价是如何能抑制疟原虫的寄生率的机制。但是, 若结合最近的报道例和本发明人等的研究来思考, 终于可以认为可能是下述原理: 抗烯醇化酶抗体阻碍了裂殖子原虫表面的烯醇化酶与人血纤维蛋白溶酶原的结合 (进而, 阻碍了动合子、裂殖子向宿主细胞侵入)。因此, 需要确认本发明人等所研究的抗原序列中是否有血纤维蛋白溶酶原结合部位。

[0222] <参考例1>

[0223] 使用原虫烯醇化酶的氨基酸序列中分割第254号至第288号这35个残基序列 (图2) 而得到的肽库即肽1~8 (序列号10~17), 利用Dot-Blot法和ELISA法使其与血纤维蛋白溶酶原反应, 由此探索了血纤维蛋白溶酶原所识别的氨基酸序列。

[0224] 利用Dot-Blot法测定的肽库与血纤维蛋白溶酶原的反应性:

[0225] 对8种肽1~肽8的10%乙腈溶液, 按照如下顺序进行了Dot-Blot测定: (a) 固定于硝化纤维素膜 (孔径0.45 μ m), (b) 接着, 在血纤维蛋白溶酶原溶液中反应, (c) 与HRP标记的抗血纤维蛋白溶酶原抗体反应, (d) DAB显色。将DAB显色后的硝化纤维素膜的照片在图11、12中示出。根据测定结果, 对于肽2、3、7、8, 观察到了肽链与血纤维蛋白溶酶原的结合。

[0226] 利用ELISA法测定的肽库与血纤维蛋白溶酶原的反应性:

[0227] 接着, 以对肽库与血纤维蛋白溶酶原的反应情况进行数值化/定量化为目的, 利用ELISA法进行了结合检测。其结果在图13中示出。根据该结果, 在10个残基肽序列中, 针对肽3、5, 观察到比较强的反应。另外, 针对作为25个残基肽序列的肽7、作为35个残基肽序列的肽8, 也观察到强反应。在10个残基库中, 可知肽3显示出与血纤维蛋白溶酶原的反应最强。

[0228] Dot-Blot法和ELISA法数据的讨论:

[0229] 根据ELISA测定, 可知10个残基库中的肽3产生最强的反应。若与以往研究中报道的阻碍血纤维蛋白溶酶原结合或结合的序列相比较, 则肽3序列的后半部分、YDLDFKT序列与其他种类具有较高的相同性, 可认为是共同的血纤维蛋白溶酶原结合部位。另一方面, 肽3的起始部分、NKT序列在其他种别中缺失, 可认为是疟原虫中固有的血纤维蛋白溶酶原结合部位 (图14)。

[0230] 一般情况下, (位于肽3)NKT序列根据生物种别是N型糖链的结合序列, 会产生需要确认有无原虫酶中的糖链修饰的疑问。但是, 根据对疟原虫所做的SDS-PAGE (446个残基、47kD) 和western-blotting的解析, 未观察到对烯醇化酶的糖链修饰。实际上, 有报道称疟原虫的N型糖链和O型糖链为几乎没有或非常低的水平 (Dieckmann-Schuppert A, Bender S, Odenthal-Schnittler M, Bause E, Schwarz RT. Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of Plasmodium falciparum. Eur J Biochem. 1992, 205, 815-825.; Gowda DC, Davidson EA. Reply. Parasitol Today. 2000, 16, 39-40.)。因此, 疟原虫的蛋白质中观察到的糖链修饰为GPI锚 (Gowda DC, Davidson EA. Protein glycosylation in the malaria parasite. Parasitol Today. 1999, 15, 147-152.; von Itzstein M, Plebanski M, Cooke BM, Coppel RL. Hot, sweet and sticky: the

glycobiology of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol. 2008, 24, 210-218.)。可认为裂殖子、动合子表面的烯醇化酶也通过经由位于蛋白质C末端附近的第432号的Asn残基的GPI锚而呈现。

[0231] 如上,根据本发明人等的研究,开始认为可能是下述原理:流行病学上观察到的疟疾流行地区居民的高抗烯醇化酶抗体的作用例如在于,阻碍了裂殖子原虫表面的烯醇化酶与人血纤维蛋白溶酶原的结合(进而,阻碍了动合子、裂殖子向宿主细胞侵入)。

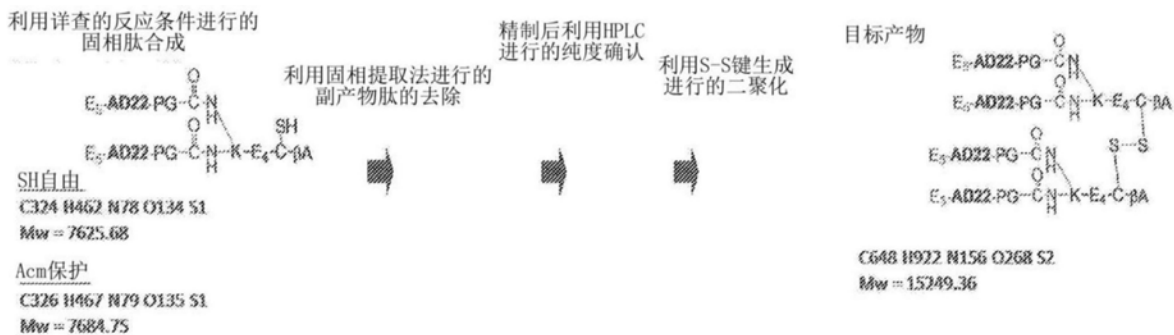
[0232] 以下是本发明的实施方式。关于抗原肽(I')和抗原肽(II')的制造方法的详细内容示于实施例1,抗原肽(I')和抗原肽(II')的分析数据示于实施例2和实施例3,含有抗原的微粒的制作方法详细内容示于实施例3,关于含有抗原的微粒的免疫施用示于实施例4。但是,下述的具体例并不限定本发明,理所当然的是,可以进行如下适当变更,例如关于高分子,可以替换成其他已知的生物降解性高分子,可以调整溶液量或浓度等,另外,例如关于含有抗原的微粒,可以替换成其他抗原或微粒,可以调整施用量、溶液量或浓度等。

[0233] (实施例1) 抗原肽(I')和抗原肽(II')的合成法合成图解如下所示。(E₅-AD22-PG:序列号6;E₅-AD22-PGC:序列号7;K-E₄-C:序列号8;K-E₄-CK:序列号9)

[0234] [化8]

[0235] 新型抗原肽(I') (AD22map2-SS) 制造图解的例子

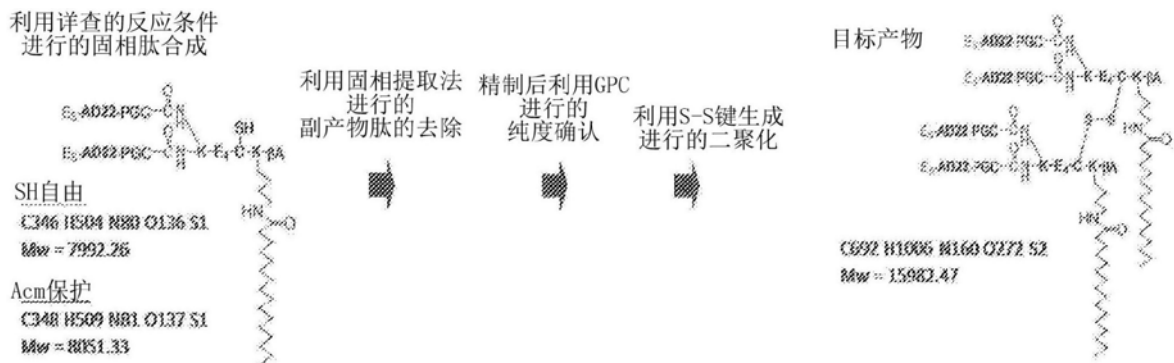
[0236]



[0237] [化9]

[0238] 新型抗原肽(II') (AD22map2pa1-SS) 制造图解的例子

[0239]



[0240] 最初,关于各抗原肽(I')和抗原肽(II')的单体(分别为AD22map2和AD22map2pa1),按照通常的Fmoc肽合成法进行了合成。在Fmoc肽合成法中,使用了按照常规方法预先导入有第1氨基酸的树脂Fmoc-betaAla-PEGresin(将此处对树脂的Fmoc氨基酸导入量设为1eq)。在Fmoc基的脱保护中使用了2%DBU/DMF(或30%piperidine/DMF),在缩合中

使用了Fmoc氨基酸(10eq)、HCTU, HOBt(10eq)、DIEA(20eq),以缩合时间30分钟进行了肽链的延长。

[0241] 所有氨基酸延长后,向负载肽的树脂中加入了作为干净的米色混合物(clean beige cocktail)的TFA:水:TIS:乙二硫醇(ethanedithiol)=95:2.5:2.5:2.5,从树脂中洗脱出。回收滤液并进行减压浓缩,用二乙醚(Diethyl ether)使其粉末化后得到粗产物。

[0242] 对该粗产物,利用HPLC、ESI-MS进行定性,通过利用Sep-Pak Vac 20cc(5g)(Waters制)进行的固相提取法进行精制。即,将试样制成10%MeCNaq(0.1%TFA)溶液后,装载至Sep-Pak柱,然后使用MeCN水溶液(0.1%TFA)作为洗脱溶剂进行固相提取,从20%到30%使用洗脱溶剂各50mL。

[0243] 通过HPLC对目标产物的成分进行确认后,经冻结干燥得到目标产物。随后,使目标产物的溶液经碘氧化生成二硫键并再次精制,最终能够得到抗原肽。

[0244] (实施例2)抗原肽(I')(AD22map2-SS)的分析数据

[0245] 外观:白色冻结干燥体

[0246] 氨基酸分析值:(水解条件:6M HCl aq.(with Phenol) 110°C, 22hrs)

[0247] Asp(28) 28.00, Thr(8) 7.78, Ser(8) 7.21, Glu(36) 35.62, Gly(4) 4.02, Ala(4) 4.00, Cys(2) 1.36, Leu(4) 4.03, Tyr(8) 8.00, Lys(10) 10.07, NH₃(16) 18.08, Pro(8) 8.18, Phe(8) +β-Ala(2) 10.01.

[0248] 纯度(HPLC):96.3%(图3)

[0249] 分析条件:柱(Column), Zorbax 300SB-C18(4.6x150mm);洗脱液(Eluent), 10-60%MeCN/0.1%TFA(25分钟);温度(Temp.) 50°C;流速(Flow rate):1.0ml/min;检测器(Detector), 220nm;装载量(Load), 4μL(0.28mg/0.560mL 50%AcOH)。

[0250] ESI-MS:MW=15249.3(理论值15249.3)(图4)

[0251] 测定条件装置:Agilent Technologies公司制HP 1100series LC/MSD

[0252] 样品浓度:1nmol/5micro-L

[0253] 稀释溶剂:50%MeCN/H₂O:1N NH₃aq.=95:5

[0254] (实施例3)抗原肽(II')(AD22map2pal-SS)的分析数据

[0255] 外观:白色冻结干燥体

[0256] 氨基酸分析值:(水解条件:6M HCl aq.(苯酚) 110°C, 22hrs)

[0257] Asp(28) 27.96, Thr(8) 7.75, Ser(8) 7.21, Glu(36) 35.70, Gly(4) 4.01, Ala(4) 4.00, Cys(2) 1.90, Leu(4) 4.04, Tyr(8) 7.81, Lys(12) 11.99, NH₃(16) 17.21, Pro(8) 8.20, Phe(8) +β-Ala(2) 9.98

[0258] 纯度(HPLC):96.4%(图5)

[0259] 分析条件:柱(Column), Zorbax 300SB-C18(4.6x150mm);洗脱液(Eluent), 30-80%MeCN/0.1%TFA(25分钟);温度(Temp.) 50°C;流速(Flow rate), 1.0ml/min;检测器(Detector):220nm;装载量(Load), 8μL(0.32mg/0.320mL 50%AcOH)。

[0260] ESI-MS:MW=15982.2(理论值15982.5)(图6)

[0261] 测定条件装置:Agilent Technologies公司制HP 1100series LC/MSD

[0262] 样品浓度:1nmol/5micro-L

[0263] 稀释溶剂:50%MeCN/H₂O:1N NH₃aq.=95:5

[0264] (实施例4) 含有抗原的微粒的制作

[0265] 在该实验中,作为抗原使用了抗原肽(I') (AD22map2-SS),含有抗原的微粒可以通过日本特开2009-256324中公开的方法来制备,即,将含有抗原物质的溶液或含有抗原物质的悬浮液与含有生物降解性高分子的挥发性有机溶剂混合,进而将该混合液与带负电荷的聚合物的水溶液混合(图7)。其中,作为生物降解性高分子使用了平均分子量为2万的聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(乳酸-羟基乙酸组成比为75:25,和光纯药公司制PLGA7520),作为带负电荷的聚合物的水溶液使用了0.5%聚乙烯醇水溶液。微粒的单位重量的抗原量根据利用元素分析法测定的CHN重量比来计算,确定为24micro-g/mg。

[0266] (实施例5) 含有抗原的微粒的免疫施用

[0267] 此处详细记载了对Balb/c小鼠免疫施用了含有抗原的微粒时的效果。即,使用了10只小鼠(Balb/c小鼠、雌性)进行了1次免疫施用,施用后第3、6、9周,对从各小鼠采血的血清进行了抗体效价的测定。

[0268] 分成下述2个实验区(Balb/c小鼠、雌性,各5只)进行了免疫实验。关于免疫施用,对抗原施用组的5只小鼠施用了实施例4中制作出的含有抗原的微粒,每只小鼠施用的抗原量经换算为10 μ g,为皮下施用。

[0269] [实验区1]对每只小鼠施用了使含有10 μ g抗原的微粒(0.41mg)悬浮于200 μ L生理盐水的物质(免疫组)。

[0270] [实验区2]对每只小鼠仅施用了生理盐水溶液200 μ L(非免疫组)。

[0271] 在图8和图9中,图示了免疫后的采血(第3、6、9、10周)时免疫组和非免疫组的对抗原肽(I') (AD22map2-SS)的IgG抗体效价的变化。绘制出ELISA法中的250倍稀释下的吸光度图。可知吸光度图与抗体重量的对数图几乎成比例。

[0272] 根据图8和图9所示的结果,在本实施例中,尽管是1次免疫的施用方法,但令人惊讶的是免疫组与非免疫组相比较时观察到了统计学上有意义的IgG抗体的上升。因此,本方法中由微粒抗原引起的抗体效价的持续上升和由原虫感染引起的免疫效果相加,从而观察到了对肽抗原的IgG抗体效价的上升。可知吸光度图与抗体重量的对数图几乎成比例。

[0273] 进而,作为追加的实验例,对实施例5中得到的小鼠的抗血清,例如通过按照10倍、20倍、200倍稀释添加至恶性疟原虫的培养系,能够查验体外(in vitro)的原虫增殖抑制效果。可预测提高此时血清稀释率而导致增殖抑制效果下降。实际上这是一般情况下使用的方法,在本实施例中也能够容易地实施。

[0274] 另外,作为进一步追加的实验例,对实施例5中得到的小鼠,例如通过腹腔施用小鼠疟原虫的致死株疟原虫(*Plasmodium berghei* ANKA、 1×10^6 个原虫)进行感染实验,能够查验体外(in vivo)的原虫增殖抑制效果及延迟或阻止小鼠由疟疾感染引起的重症化和死亡的效果。可预测提高此时的抗体效价而抑制了增殖率。实际上这是一般情况下使用的方法,在本实施例中也能够容易地实施。

[0275] 根据这些实施例,通过从抗原肽的制造到抗原微粒的制造、进而利用了小鼠的免疫反应的动物实验可以发现,通过使用本发明的抗原肽来延迟或阻止人由疟疾感染引起的重症化和死亡的方法。进而,以这些实施例和本发明人等的研究成果为基础,还能够想到生理活性肽对人的免疫反应的应用方法,其在以往是不可能的,能够诱发人对疟原虫的免疫学应答。

[0276] 产业利用上的可能性

[0277] 本发明可应用于药物、试剂等。

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

355	360	365
Ala Cys Leu Leu Ser Gln Lys Asn Asn Trp Gly Val Met Val Ser His		
370	375	380
Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Val Phe Ile Ala Asp Leu Val Val Ala		
385	390	395
Leu Arg Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg Ser Glu Arg		
405	410	415
Asn Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu Ser Leu Gly Asn		
420	425	430
Asn Ala Val Phe Ala Gly Glu Lys Phe Arg Leu Gln Leu Asn		
435	440	445
<210> 4		
<211> 434		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
Met Ser Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly		
1	5	10
Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Phe Thr Ser Lys Gly Leu Phe Arg		
20	25	30
Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu		
35	40	45
Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Tyr Met Gly Lys Gly Val Ser Lys		
50	55	60
Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys		
65	70	75
Lys Leu Asn Val Thr Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Leu Met Ile Glu		
85	90	95
Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu		
100	105	110
Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Glu Lys Gly Val		
115	120	125
Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Ser Glu Val Ile		
130	135	140
Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly		
145	150	155
Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ala		
165	170	175
Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu		

	180		185		190
Lys Asn Val	Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr	Asn Val Gly			
	195		200		205
Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Gly Leu					
	210		215		220
Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Val					
225		230		235	240
Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly Lys					
	245		250		255
Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Ser					
	260		265		270
Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro					
	275		280		285
Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp					
	290		295		300
Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu					
305		310		315	320
Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser					
	325		330		335
Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu					
	340		345		350
Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ala Asn Gly Trp Gly Val Met					
	355		360		365
Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu					
	370		375		380
Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg					
385		390		395	400
Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu Glu					
	405		410		415
Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Asn Phe Arg Asn Pro Leu					
	420		425		430

Ala Lys

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial antigen

<400> 5

<220>
 <223> Artificial antigen
 <400> 9
 Lys Glu Glu Glu Glu Cys Lys
 1 5
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 10
 Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Asn Ser Glu Lys
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 11
 Phe Tyr Asn Ser Glu Asn Lys Thr Tyr Asp Lys
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 12
 Asn Lys Thr Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Thr Lys
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 13
 Leu Asp Phe Lys Thr Pro Asn Asn Asp Lys
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 14
 Pro Asn Asn Asp Lys Ser Leu Val Lys Thr Lys

<400> 19

Cys Ala Ser Ser Glu Phe Tyr Asp Lys Glu Arg Lys Val Tyr Asp Tyr
 1 5 10 15
 Thr Lys Phe Glu Gly Glu Gly Ala Ala Val Arg Thr
 20 25

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly Lys Tyr Asp Leu Asp Phe
 1 5 10 15
 Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Ser Pro Asp Gln Leu Ala
 20 25 30

<210> 21

<211> 35

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 21

Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Asn Ser Glu Asn Lys Thr Tyr Asp Leu
 1 5 10 15
 Asp Phe Lys Thr Pro Asn Asn Asp Lys Ser Leu Val Lys Thr Gly Ala
 20 25 30

Gln Leu Val
 35

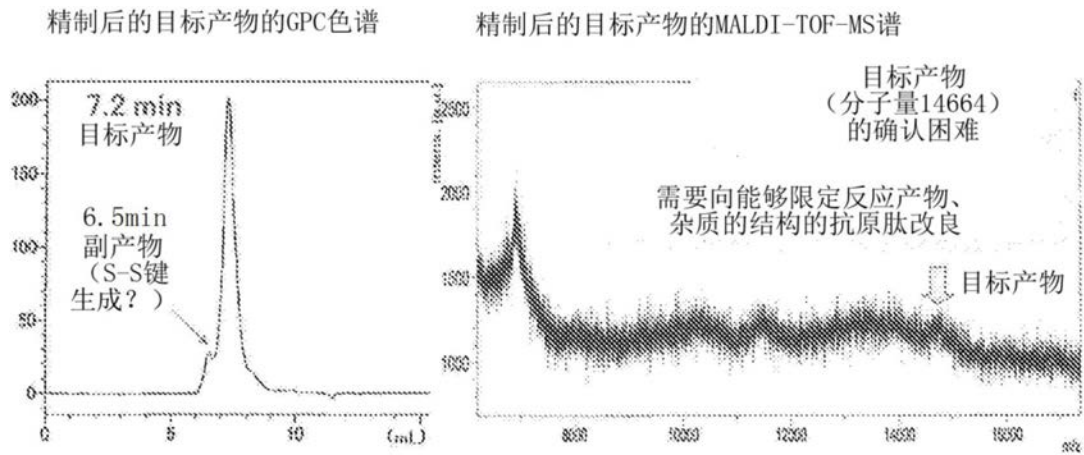


图1

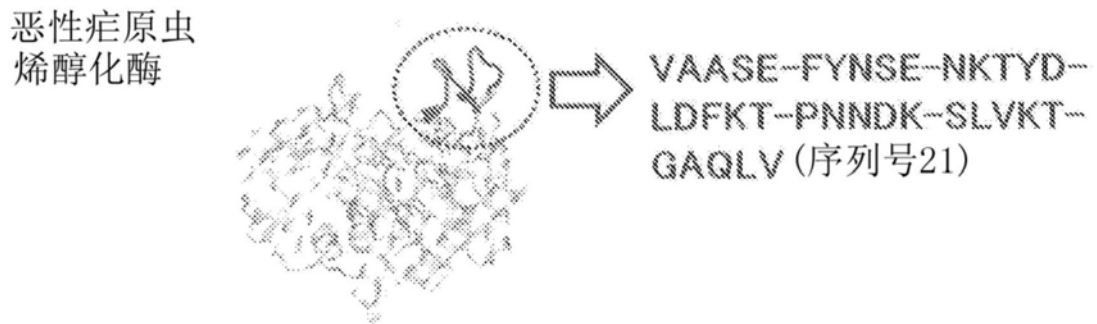


图2

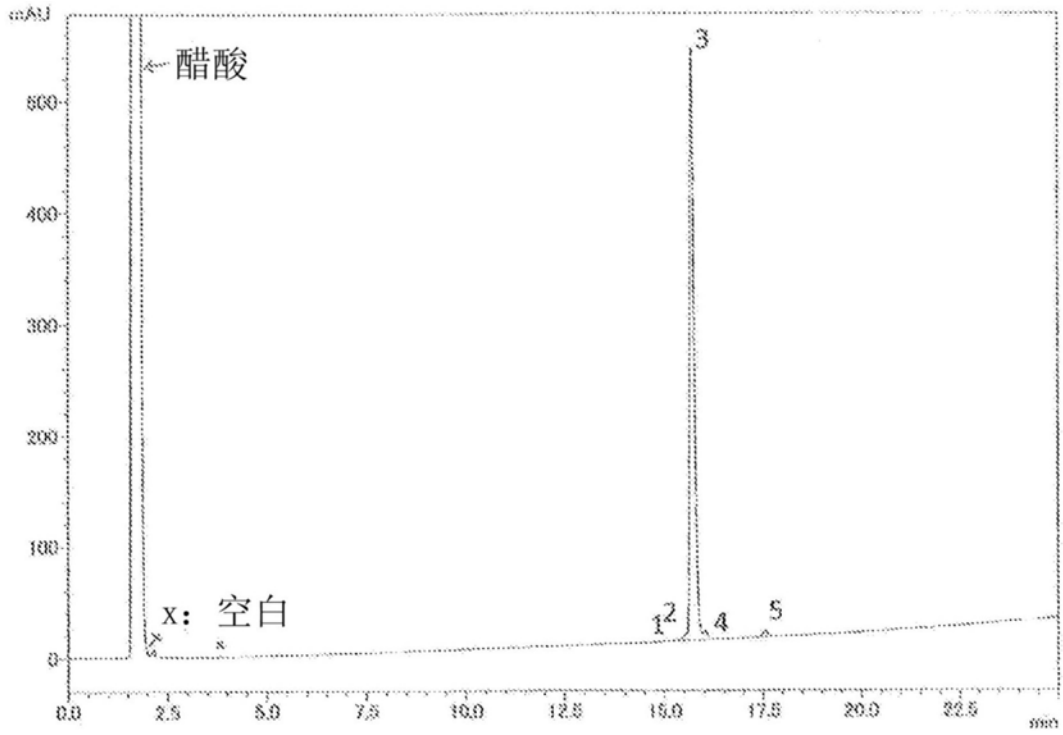


图3

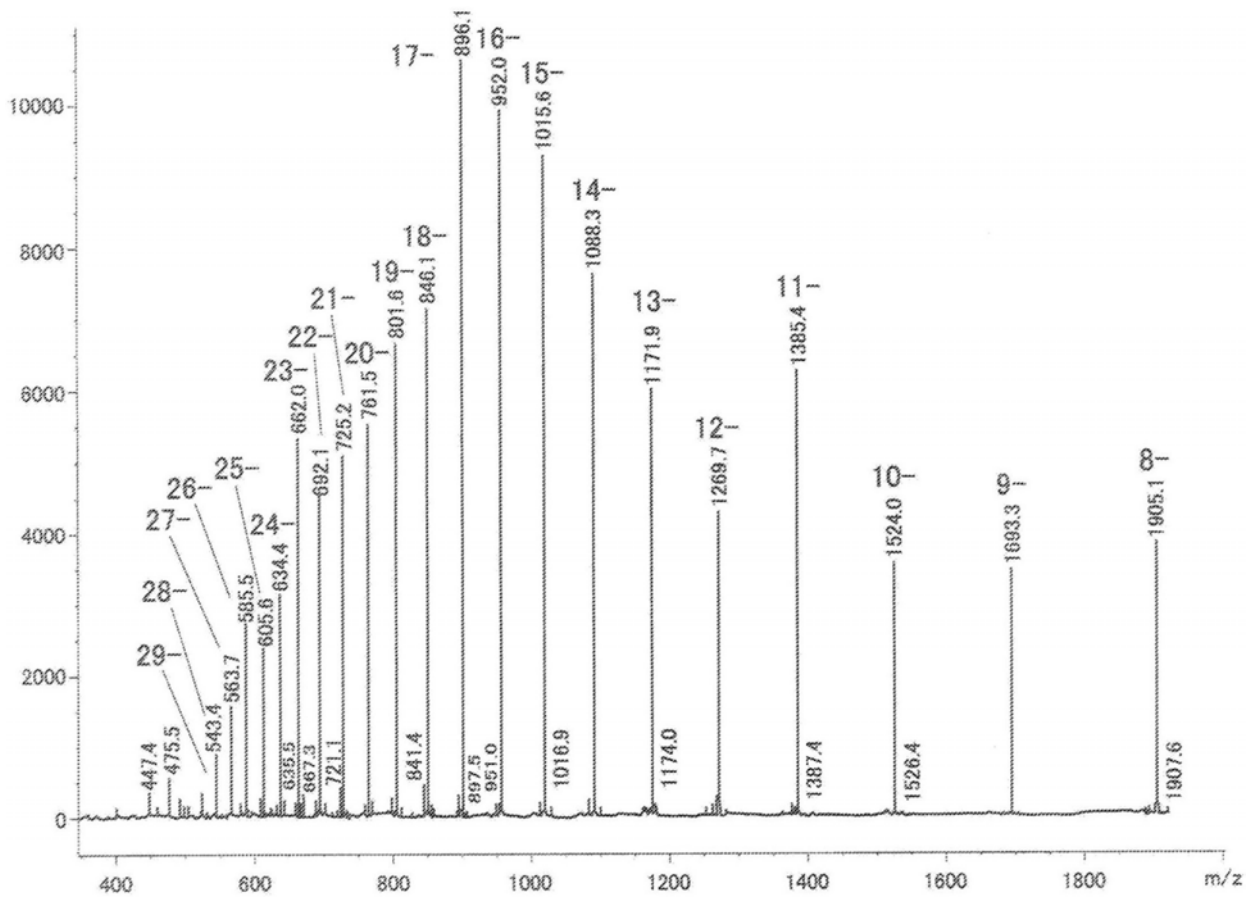


图4

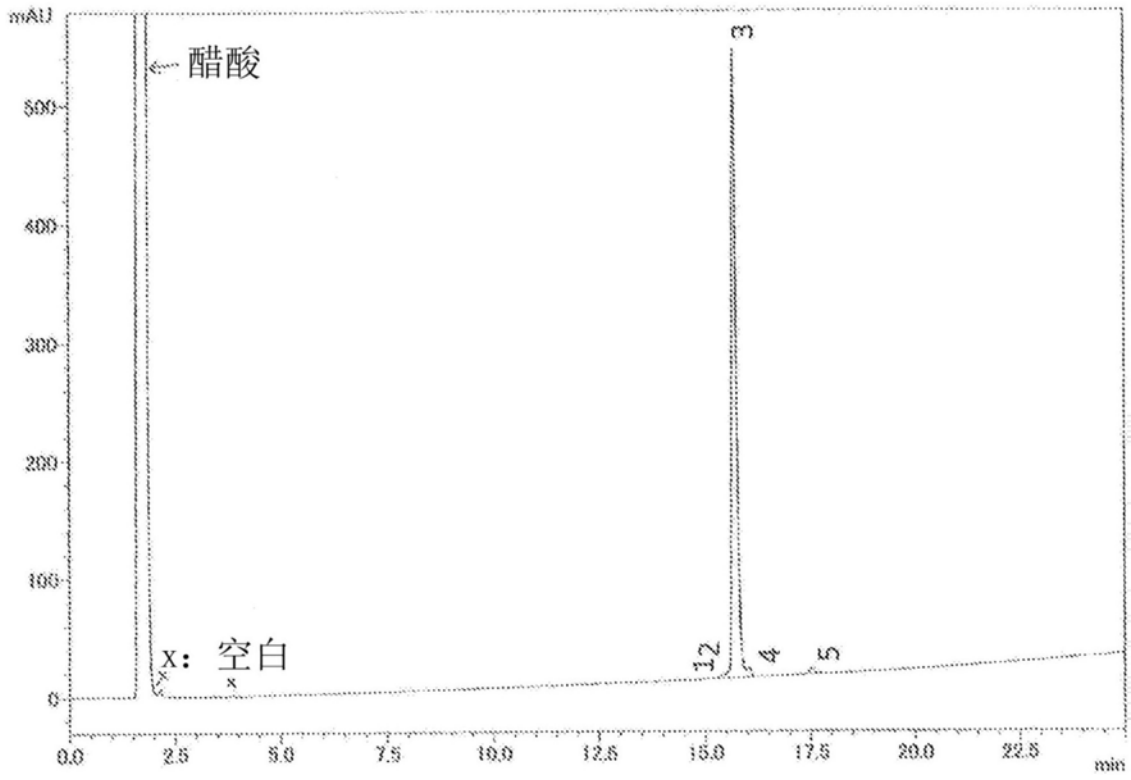


图5

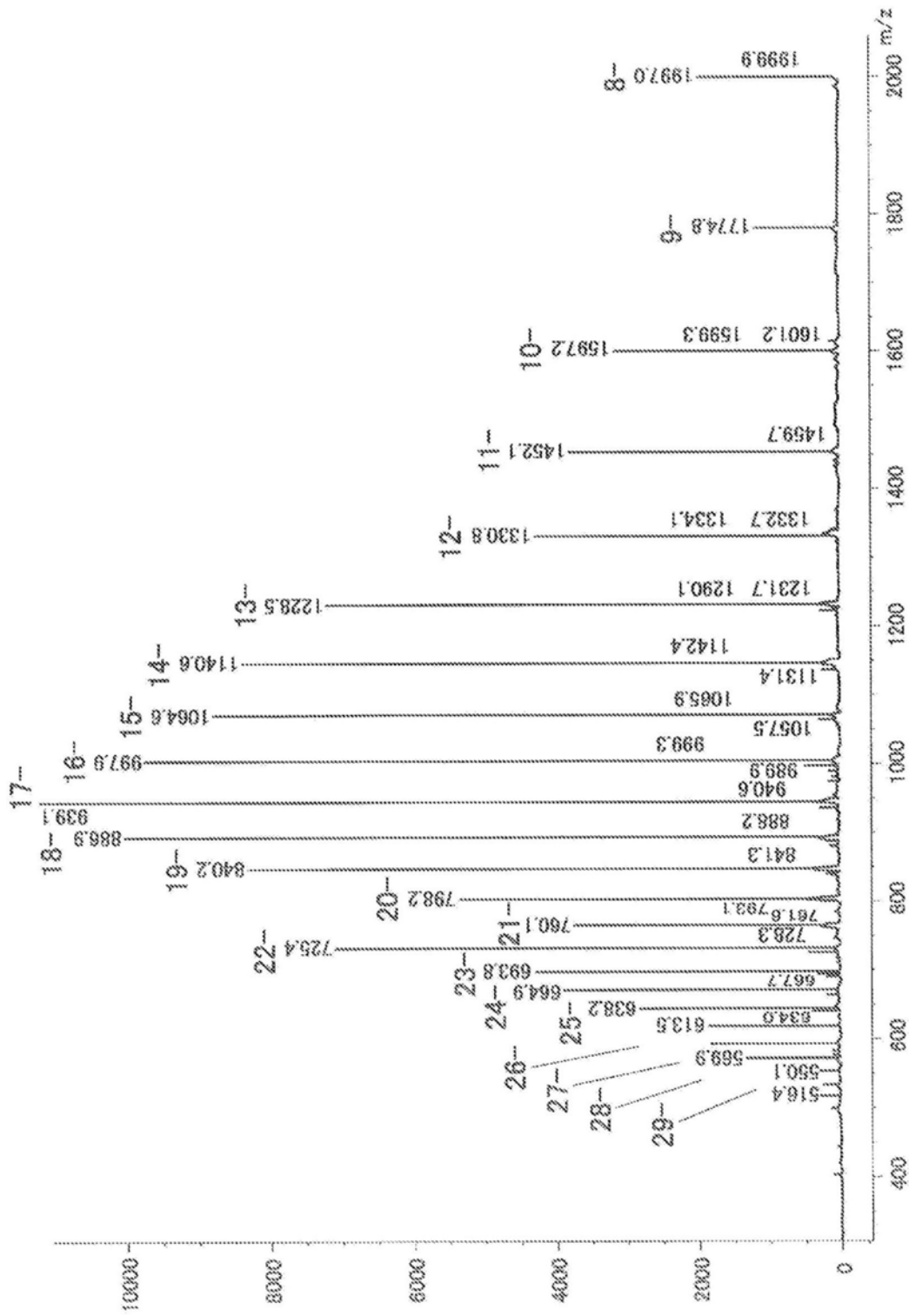


图6

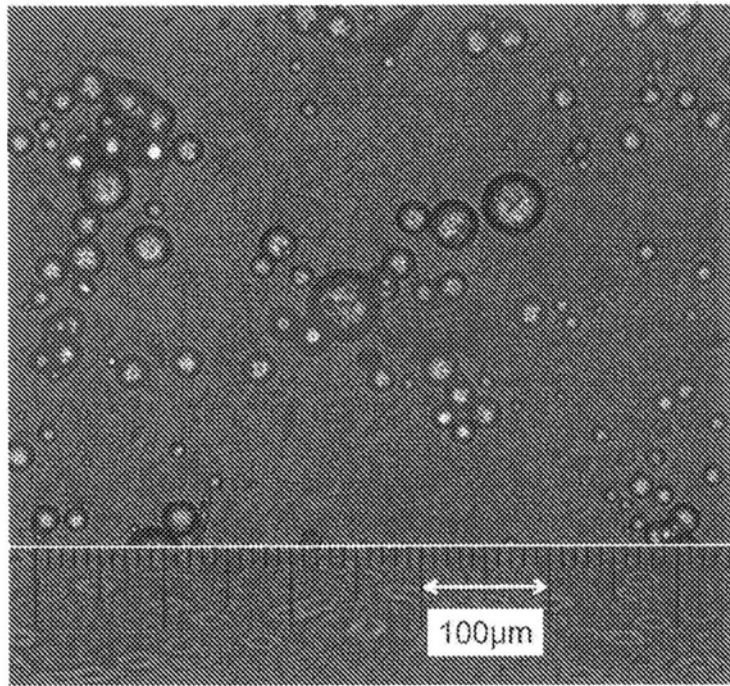


图7

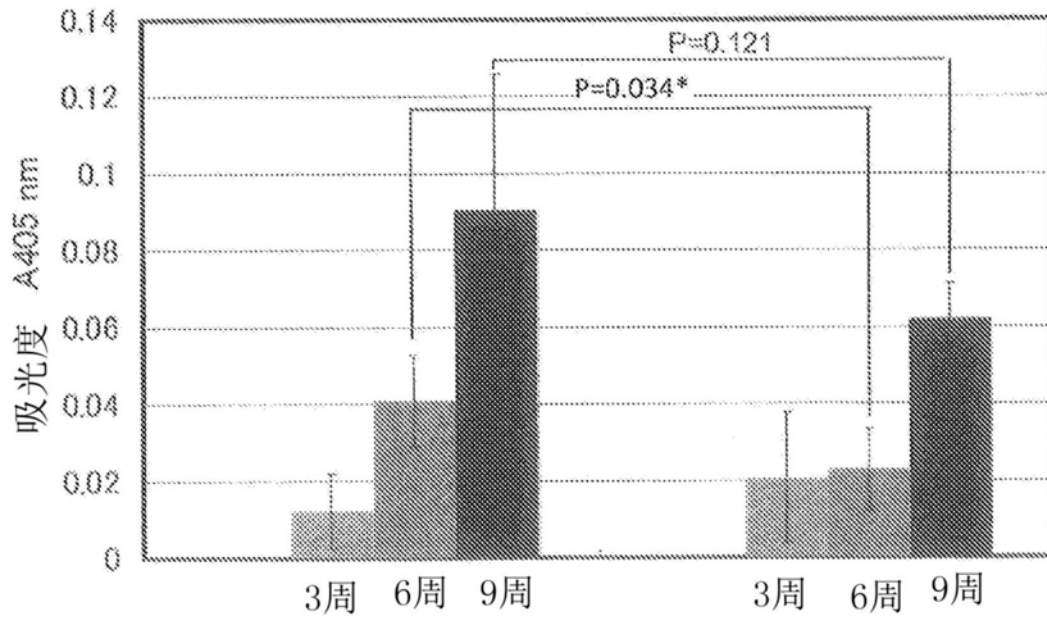


图8

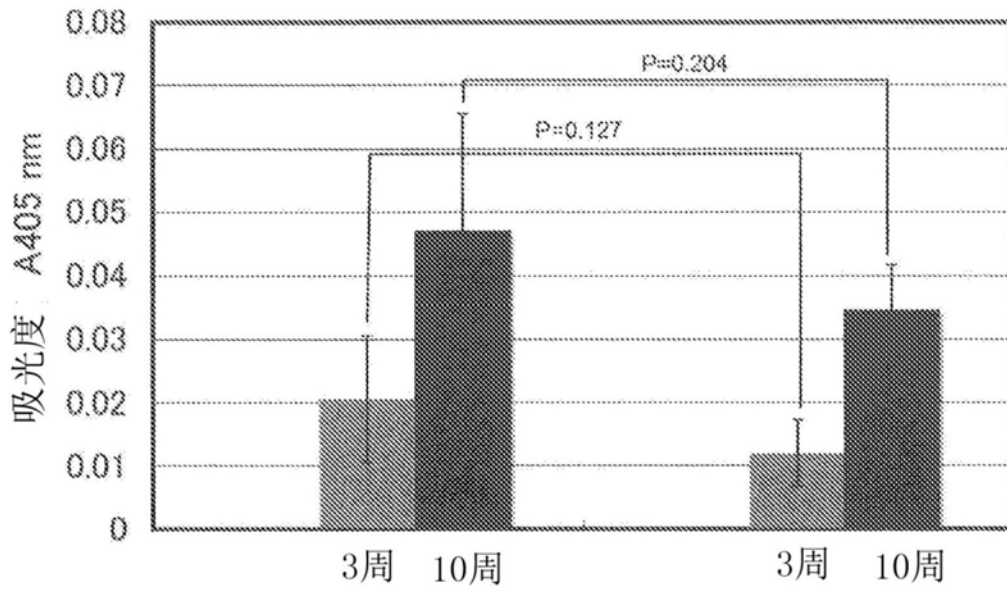


图9

人 α 烯醇化酶（序列号4）

恶性疟原虫烯醇化酶（序列号3）

（下划线部表示烯醇化酶部分序列、AD22。）

```

1  MSILKIH---AREIFDSRCNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTR 56
1  MAHVITRINAREILDSRCDPTEVDLETNLGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKSR 58

57  YMGKGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLNVTQEKEIDKLMIE--MDGTEN-----KSKFGA 109
59  YLGKGVQKATKNINEI LAPKLI---GMNCTEQKKIDNLMVEELDGSKNEWGWSKSLGA 114

110  NAILGVSLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGN--SE-VILPVPAFNV INGGSHAGNKLA 165
115  ANILAISMAVCRAGAAPNKVSLYKYLAQLAGKKSSDQMVLPVPCLNV INGGSHAGNKKS 172

166  MQEFMILPVGAANFREAMRIGAEVYHNLNKNIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKE 223
173  YEQYMIVPVGAPSYKEALRYGAEVTHTLKSEIKKKYGIDATNVGDEGGFAPNILNANE 230

224  GLELLKTAIGKAGYTDKVVIGMDVAASEFFRSG--K-YDLDFKSPD--DPSRYISPDQLA 279
231  ALDLLVTAIKSAGYEGKVKIAMDVAASEFYNSENKTYDLDFKTPNNDKSLVKTGAQLV 288
                                     AD22                               AT28
280  DLYKSFIKDYPVVSIEDPFDQDDWGAWQKFTASAGI---QVVGDDLTVTNPKRIAKAVN 335
289  DIYIDLVKKYPIVSIEDPFDQDDWENYAKLTAAIGKDVQIVGDDLLVTNPTRITLALE 346

336  EKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTG 393
347  KNACNALLLKVNQIGSITGATEACLLSQKNNWGMVSHRSGETEDVFIADLVVALRTG 404

394  QIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIFEEELGSKAKFAGRNFRNPLAK 436
405  QIKTGAPCRSERNAKYNQLLRIFESLGNNAVFAGEKFRLQLN 446

```

图10

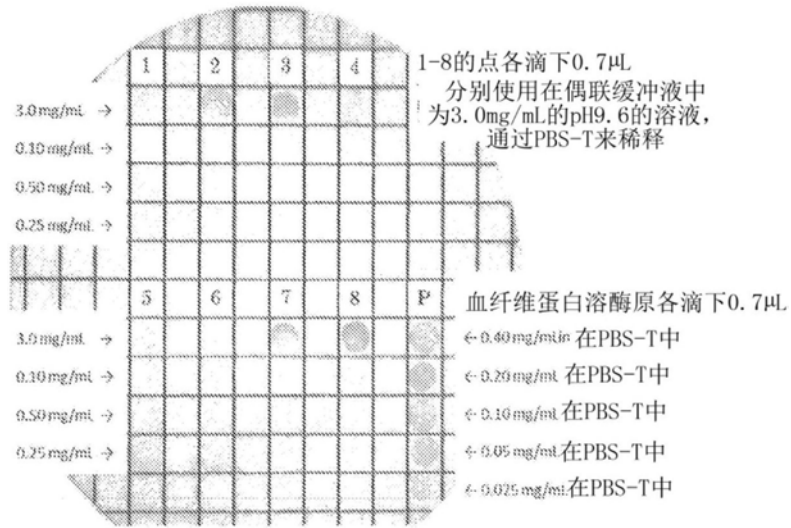


图11

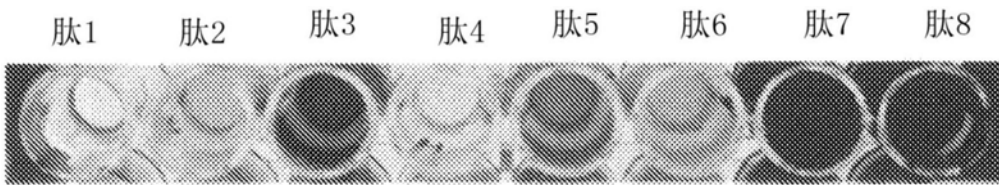


图12

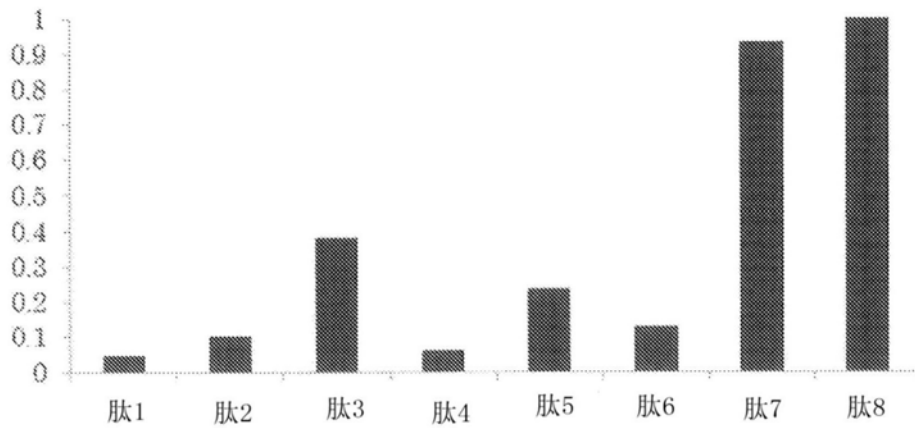


图13

比较结合序列的相同性

本发明人等的见解	恶性疟原虫 (肽8强结合) (序列号17)	恶性疟原虫 (肽3强结合) (序列号12)
	VAASEFYNSENKTYDLDFKTFPNNDKSLVKTGAQLVK	NKTYDLDEKTK
以往的报道		
恶性疟原虫 (肽、阻碍) (序列号18) (Proc Natl Acad Sci USA. 2011, vol. 108, pp. 17153-17158.)		KSLVK
肺炎球菌 (肽、阻碍) (序列号19) (Mol Microbiol. 2003, vol. 49, pp. 411-423.)	CASSEF-----YDKERKVVYDYTKFEFEGEAAVRT	
人 (噬菌体展示、结合) (序列号20) (Thromb Haemost. 1997, vol. 78, pp. 1097-103.)	VAASEFFRSG-K-YDLDFKSPD--DPSRYISPDOLA	

图14

专利名称(译)	使用了恶性疟原虫的烯醇化酶蛋白质的部分序列的人工抗原及其制造方法		
公开(公告)号	CN107001435A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580065253.X	申请日	2015-11-27
[标]发明人	奥浩之 狩野繁之 矢野和彦		
发明人	奥浩之 狩野繁之 矢野和彦		
IPC分类号	C07K14/445 A61K38/00 A61P33/06 A61P37/04 G01N33/53 C12N9/88		
CPC分类号	A61P33/06 A61P37/04 A61K38/00 C12Y402/01011 C07K14/445 C12N9/88 G01N33/53 A61K9/1647 A61K9/1658 A61K9/1682 A61K39/015 A61K47/646 A61K2039/575 A61K2039/6068 G01N33/543 G01N33/56905 G01N33/6854 G01N2333/445 G01N2333/988 G01N2800/52		
代理人(译)	吕琳		
优先权	2014241420 2014-11-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种生理活性肽，其带有恶性疟原虫烯醇化酶的部分氨基酸序列，具有与GMP制造时的标准设定对应的分子结构。所述肽具有如下结构：具有(i)

A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02(序列号1)或(ii)

A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04(序列号2)的氨基酸序列的2个肽通过各自的羧基末端与(iii)Lys-A05-Cys-A06所示连接肽的Lys的2个氨基之间的酰胺键排列成2分支状。优选地，所述肽具有通过该肽内的连接肽序列的Cys残基间的S-S键而二聚化的结构。(i)、(ii)、(iii)中，A01至A06是包含0的任意数目的氨基酸残基。

