



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120209159 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 27

(21) 申请号 202510202794.8

A61P 33/06 (2006.01)

(22) 申请日 2025.02.24

(71) 申请人 南京澄实生物医药科技有限公司
地址 210000 江苏省南京市江北新区探秘路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

(72) 发明人 韩悌云 徐实 李静 许梦微
费才溢

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 陆惠中

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

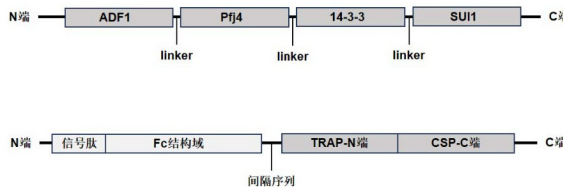
权利要求书2页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种预防疟原虫感染的融合蛋白和免疫原性组合物及应用

(57) 摘要

本发明涉及预防疟原虫感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗等。本发明提供了新的融合分子架构,其包含ADF1、Pfj4、14-3-3 protein、SUI1四种基因编码的融合蛋白,或包含TRAP抗原的N端结构域、CSP抗原的C端结构域两种基因编码的融合蛋白,进一步还提供了上述两种融合蛋白的组合物,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明的融合蛋白具有良好的免疫原性,并且能够提供针对疟原虫感染有效的免疫保护效果,具有广泛的应用前景。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,为选自以下任一项的融合蛋白:

融合蛋白A,所述融合蛋白A包含肌动蛋白解聚因子1(actin-depolymerizing factor 1,ADF1)抗原、类DNAJ热休克蛋白Pfj4(heat shock protein DNAJ-like Pfj4,Pfj4)抗原、14-3-3 protein抗原、翻译起始因子SUI1(translation initiation factor SUI1,SUI1)抗原;

融合蛋白B,所述融合蛋白B包含血凝素相关匿名蛋白(thrombospondin related anonymous protein,TRAP)抗原、环孢子蛋白(Circumsporozoite protein,CSP)抗原;优选地,所述融合蛋白还包含所述融合蛋白A和所述融合蛋白B的组合。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述抗原来自于疟原虫;优选地,所述抗原来自于恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)或诺氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*)中的一种或多种;更优选地,所述抗原来自于恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其特征在于,可选地,所述融合蛋白A或融合蛋白B在N端和/或C端增加功能性元件,用以促进融合蛋白表达或表位呈递。

4. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白A从N端到C端依次包含所述肌动蛋白解聚因子1抗原、所述类DNAJ热休克蛋白Pfj4抗原、所述14-3-3 protein抗原、所述翻译起始因子SUI1抗原;可选地,所述抗原之间通过linker连接。

5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其特征在于,对于融合蛋白A,所述肌动蛋白解聚因子1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述类DNAJ热休克蛋白Pfj4抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述14-3-3 protein抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,所述翻译起始因子SUI1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述linker的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示。

6. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,对于融合蛋白B,所述TRAP抗原为全长序列或TRAP的N端结构域,所述CSP抗原为全长序列或CSP的C端结构域;优选地,所述融合蛋白B的N端还包含信号肽和/或Fc结构域;更优选地,所述融合蛋白B的N端还依次包含信号肽和Fc结构域;最优选地,所述信号肽为人蓝啉蛋白的信号肽,所述Fc结构域为人IGHG1蛋白Fc结构域;可选地,所述TRAP抗原和所述Fc结构域之间通过间隔序列连接。

7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,对于融合蛋白B,所述TRAP抗原为TRAP的N端结构域,所述TRAP的N端结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示;所述CSP抗原为CSP的C端结构域,所述CSP的C端结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示;所述的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示;所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示。

8. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

9. 一种重组核酸分子,其特征在于,包含编码权利要求1-8任一项所述融合蛋白的核酸。

10. 一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求9所述重组核酸分子。

11. 一种重组载体,其特征在于,包含权利要求9所述重组核酸分子、或权利要求10所述

重组基因表达盒。

12. 一种重组宿主细胞,其特征在於,包含权利要求9所述重组核酸分子、或权利要求10所述重组基因表达盒、或权利要求11所述重组载体。

13. 一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在於,包含一种或多种权利要求1-8任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求9所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求10所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求11所述重组载体,和/或一种或多种权利要求12所述重组宿主细胞;优选地,所述免疫原性组合物或药物组合物还包含药理学上可接受的载体。

14. 根据权利要求13所述的免疫原性组合物或药物组合物,其特征在於,所述免疫原性组合物或药物组合物中包含所述融合蛋白A和所述融合蛋白B。

15. 一种重组疫苗,其特征在於,包含一种或多种权利要求1-8任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求9所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求10所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求11所述重组载体,和/或一种或多种权利要求12所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求13或14所述免疫原性组合物或药物组合物;优选地,所述重组疫苗为核酸疫苗或亚单位疫苗;更优选地,所述重组疫苗为核酸疫苗。

16. 一种或多种权利要求1-8任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求9所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求10所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求11所述重组载体,和/或一种或多种权利要求12所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求13或14所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种权利要求15所述重组疫苗在制备用于预防、治疗和/或接种的疫苗或生物免疫的药物中的用途。

17. 根据权利要求16所述的用途,其特征在於,所述药物用于预防和/或治疗疟原虫感染;优选地,所述疟原虫是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*) 或诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*) 中的一种或多种;更优选地,所述疟原虫是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)。

一种预防疟原虫感染的融合蛋白和免疫原性组合物及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,特别是免疫药物技术领域,具体涉及一种预防疟原虫感染的融合蛋白、免疫原性组合物及应用等。

背景技术

[0002] 疟疾是一种由疟原虫 (*Plasmodium*) 引起的传染病,主要通过按蚊 (*Anopheles mosquito*) 传播。疟原虫是一种单细胞寄生虫,广泛存在于热带和亚热带地区,尤其是撒哈拉以南非洲、南亚和南美洲。当前,主要的致病性疟原虫种类包括:恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*) 和三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)。其中,恶性疟原虫是最致命的疟原虫种类,能够引起严重的疟疾症状,如高热、贫血、脑疟疾和多器官衰竭,每年导致数十万人死亡,尤其是儿童和孕妇。

[0003] 疟原虫的致病性主要来源于其在宿主体内的复杂生命周期和多种毒力因子。疟原虫通过蚊虫叮咬进入人体后,首先在肝脏中扩增,随后侵入红细胞,引发红细胞破裂和免疫反应,导致疟疾的典型症状。疟原虫的毒力因子包括表面蛋白(如裂殖子表面蛋白 MSP1)、抗原变异蛋白(如PfEMP1)和免疫逃逸机制,这些因子使疟原虫能够逃避宿主的免疫系统,并在宿主体内长期存活。

[0004] 针对疟疾的治疗,传统方法主要依赖于抗疟药物,如氯喹、青蒿素及其衍生物。然而,疟原虫对抗疟药物产生了广泛的耐药性,尤其是恶性疟原虫对青蒿素的耐药性在东南亚地区已经出现,并逐渐向其他地区扩散,给全球疟疾防控带来了严峻挑战。接种疫苗是预防疟疾的更为有效的解决方案。与药物治疗相比,疫苗可以通过激活宿主的免疫系统,产生针对疟原虫的特异性抗体和免疫细胞,从而提供长期的保护效果,预防感染的发生。此外,有效的疫苗可以减少对抗疟药物的依赖,抑制耐药疟原虫的出现和传播,缓解全球疟疾防控的压力。然而,由于疟原虫的复杂生命周期和强大的免疫逃逸机制,开发有效的疟疾疫苗面临巨大挑战。目前,唯一获得批准的疟疾疫苗是RTS,S/AS01(商品名Mosquirix),但其保护效果有限,且持续时间较短。RTS,S/AS01在中国并未上市,目前在中国缺乏商业化可购疟疾疫苗。

[0005] 目前,已有多种基于疟原虫主要抗原的疫苗进入临床试验阶段。例如,RTS,S/AS01疫苗基于恶性疟原虫的环子孢子蛋白(CSP),已在非洲多个国家推广使用,但其保护效果有限,且持续时间较短。PfSPZ疫苗是一种基于减毒活疟原虫的疫苗,目前正在进行临床试验,初步结果显示其具有较高的保护效果,但活疫苗的生产成本较高,风险大,难以推广。CIS43LS 和 L9LS是两种单克隆抗体靶向恶性疟原虫的环子孢子蛋白(CSP),能够阻断疟原虫在肝脏中的感染。CIS43LS在I期临床试验中显示出高效的保护效果,单次注射后保护效果可持续数月;L9LS是CIS43LS的改进版本,具有更强的中和能力和更长的半衰期,目前正在进行II期临床试验。初步结果显示,L9LS在疟疾流行地区对恶性疟原虫感染的保护效果超过80%。然而,CIS43LS和L9LS的保护效果持续时间都比较短,并且生产成本高,同样面对

难以大规模推广的问题。

[0006] 尽管已有多种疟疾疫苗进入临床试验,但大多数疫苗仍面临无法提供长期保护和无法实现交叉免疫保护等问题。研究表明,疟原虫感染后的长期保护效果依赖于T细胞介导的免疫反应。然而,传统疫苗(如亚单位疫苗RTS,S/AS01和抗体疫苗CIS43LS、L9LS)主要依赖诱导体液免疫反应,难以有效激活T细胞免疫,因此无法解决长期保护的问题。此外,由于当前研究大多基于恶性疟原虫的CSP抗原进行疫苗设计,而CSP蛋白在不同疟原虫种类间存在显著差异,这些疫苗虽然能够提供针对恶性疟原虫的特异性保护,但无法预防或治疗由间日疟原虫、三日疟原虫等其他种类疟原虫引起的感染。

[0007] 综上所述,尽管已有多种疟疾疫苗进入研发和临床试验阶段,但本领域仍亟需一种具有交叉免疫原性、能够提供长期保护效果的疟疾疫苗。核酸疫苗通过精密的分子设计,能够融合表达多种有效抗原,突破交叉免疫保护的难点。同时,核酸疫苗通过细胞内表达抗原蛋白,能够同时激活体液免疫和T细胞免疫反应,为疟疾疫苗的开发提供了新的方向。因此,核酸疫苗作为一种新兴技术,有望克服传统疫苗的局限性,为疟疾防控提供新的解决方案。

发明内容

[0008] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种新的预防疟原虫感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗以及分子架构设计和应用。本发明提供了新的融合分子架构,其包含ADF1、Pfj4、14-3-3 protein、SUI1四种基因编码的融合蛋白,或包含TRAP抗原的N端结构域、CSP抗原的C端结构域两种基因编码的融合蛋白,以及上述两种融合蛋白的组合物,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供针对疟原虫感染有效的免疫保护效果,且在部分个体中几乎完全抑制疟原虫扩增。本发明还提供相应的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、药物组合物、疫苗、用途等。

[0009] 本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,为选自以下任一项的融合蛋白:

(1) 融合蛋白A,所述融合蛋白A包含肌动蛋白解聚因子1(actin-depolymerizing factor 1, ADF1)抗原、类DNAJ热休克蛋白Pfj4(heat shock protein DNAJ-like Pfj4, Pfj4)抗原、14-3-3protein抗原、翻译起始因子SUI1(translation initiation factor SUI1, SUI1)抗原;

(2) 融合蛋白B,所述融合蛋白B包含血凝素相关匿名蛋白(thrombospondin related anonymous protein, TRAP)抗原、环孢子蛋白(Circumsporozoiteprotein, CSP)抗原。

[0010] 进一步地,所述融合蛋白还包含所述融合蛋白A和所述融合蛋白B的组合。

[0011] 进一步地,所述抗原来自于疟原虫。

[0012] 进一步地,所述抗原来自于恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)或诺氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*)中的一种或多种。

[0013] 进一步地,所述抗原来自于恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)。

[0014] 进一步地,所述融合蛋白A或融合蛋白B在N端或C端增加功能性元件,用以促进融

合蛋白表达或表位呈递。

[0015] 进一步地,所述融合蛋白A从N端到C端依次包含所述肌动蛋白解聚因子1抗原、所述类DNAJ热休克蛋白Pfl4抗原、所述14-3-3 protein抗原、所述翻译起始因子SUI1抗原;可选的,所述抗原之间通过linker连接。

[0016] 进一步地,对于融合蛋白A,所述肌动蛋白解聚因子1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述类DNAJ热休克蛋白Pfl4抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述14-3-3 protein抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,所述翻译起始因子SUI1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述linker的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示。

[0017] 进一步地,对于融合蛋白B,所述TRAP抗原为全长序列或TRAP的N端结构域,所述CSP抗原为全长序列或CSP的C端结构域。

[0018] 进一步地,所述融合蛋白B的N端还包含信号肽和/或Fc结构域;更优选地,所述融合蛋白B的N端还依次包含信号肽和Fc结构域。

[0019] 进一步地,所述信号肽为人蓝啉蛋白的信号肽,所述Fc结构域为人IGHG1蛋白Fc结构域;可选地,所述TRAP抗原和所述Fc结构域之间通过间隔序列连接。

[0020] 进一步地,对于融合蛋白B,所述TRAP抗原为TRAP的N端结构域,所述TRAP的N端结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示;所述CSP抗原为CSP的C端结构域,所述CSP的C端结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示;所述的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示;所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示。

[0021] 进一步地,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

[0022] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,包含编码本发明任一项所述融合蛋白的核酸。

[0023] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子。

[0024] 进一步地,所述重组基因表达盒还包括启动子、终止子、调控序列中的一种或多种。

[0025] 本发明的另一方面提供一种重组载体,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或本发明所述重组基因表达盒。

[0026] 进一步地,所述重组载体包含原核载体或真核载体。

[0027] 进一步地,所述原核载体包含大肠杆菌载体。

[0028] 进一步地,所述大肠杆菌载体包含但不限于pET载体、pGEX载体、pMAL载体、pBAD载体、pUC载体、pBR载体。

[0029] 进一步地,所述真核载体包含但不限于酵母表达载体、昆虫表达载体、哺乳动物细胞表达载体。

[0030] 进一步地,所述酵母表达载体包含但不限于pPICZ载体、pGAPZ载体、pYES载体、pGAP载体、pA0815载体、pPIC9载体。

[0031] 本发明的另一方面提供一种重组宿主细胞,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或本发明所述重组基因表达盒、或本发明所述重组载体。

- [0032] 进一步地,所述重组宿主细胞包含真核细胞或原核细胞。
- [0033] 进一步地,所述真核细胞包含哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞。
- [0034] 进一步地,所述酵母细胞包含但不限于酿酒酵母、毕赤酵母、汉逊酵母。
- [0035] 进一步地,所述原核细胞包含但不限于大肠杆菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、假单胞菌细胞。
- [0036] 进一步地,所述大肠杆菌细胞包含但不限于BL21 (DE3)、DH5 α 、TOP10、Rosetta。
- [0037] 本发明的另一方面提供一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞。
- [0038] 进一步地,所述免疫原性组合物或药物组合物还包含药学上可接受的载体。
- [0039] 进一步地,所述免疫原性组合物或药物组合物中包含所述融合蛋白A和所述融合蛋白B。
- [0040] 本发明的另一方面提供一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物。
- [0041] 进一步地,所述重组疫苗为核酸疫苗或亚单位疫苗。
- [0042] 进一步地,所述重组疫苗为核酸疫苗。
- [0043] 本发明的另一方面提供一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗在制备用于预防、治疗和/或接种的疫苗或生物免疫的药物中的用途。
- [0044] 进一步地,所述药物用于预防和/或治疗疟原虫感染。
- [0045] 进一步地,所述疟原虫是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)或诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*)中的一种或多种。
- [0046] 进一步地,所述疟原虫是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)。
- [0047] 本发明的另一方面提供一种疾病的预防和/或治疗方法,其特征在于,包括向受试者给予一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗。
- [0048] 进一步地,所述疾病为疟原虫感染。
- [0049] 进一步地,所述疟原虫是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)或诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*)中的一种或多种。
- [0050] 进一步地,所述疟原虫是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)。

[0051] 本发明的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗等具有如下有益技术效果：

1. 本发明从反向疫苗学的角度出发,逐步进行筛选排除,最终优选地获得ADF1、Pfj4、14-3-3 protein、SUI1四个抗原,用于构建新的融合蛋白。

[0052] 2. 现有技术表明,单纯截选CSP的RTS结构域不能提供足够的保护效力,本发明基于RTS,S/AS01疫苗中对于CSP抗原的设计策略,进行进一步的优化设计,重新截选CSP的C端结构域,并且增加TRAP抗原的N端结构域,组成另一种新的融合蛋白,在保证分子构象稳定的基础上,提供更多的有效表位。

[0053] 3. 本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供免疫保护效果,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明的免疫原性组合物,可针对疟原虫的感染提供有效的免疫保护。

[0054] 4. 本发明还发现新的融合分子能够在真核细胞中高水平表达,提供正确、充足的免疫表位,提供良好的免疫保护效果,为疟原虫多价疫苗的免疫药物设计领域提供新技术。

[0055] 5. 本发明实施例6表明,基于本发明设计的疫苗A和疫苗B,均能够在真核细胞中正确表达,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递。

[0056] 6. 本发明实施例7表明,在小鼠感染模型中,基于本发明的疫苗A、疫苗B以及疫苗A和疫苗B的组合,均能够提供良好的免疫保护效果,无论是细胞免疫还是体液免疫,都能够显著抑制疟原虫在肝期的扩增。

[0057] 7. 本发明实施例7还表明,疫苗A和疫苗B的组合使用,能够提供叠加的免疫保护效果,取得了预料不到的技术效果。这一结果也表明疟疾疫苗的开发需要同时兼顾体液免疫和细胞免疫。

[0058] 8. 本发明实施例6、实施例7共同表明,基于本发明的疫苗能够诱导模式动物小鼠产生有效的免疫,针对疟原虫感染有良好的预防效果。本发明能够应用于人和动物免疫药物的生产和研发,填补当前疟疾疫苗研发领域的空白,具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

附图说明

[0059] 图1A-图1D为本发明筛选的四个细胞免疫靶点在不同疟原虫中的同源性分析;图1A为ADF1细胞免疫靶点在不同疟原虫中的同源性分析;图1B为Pfj4细胞免疫靶点在不同疟原虫中的同源性分析;图1C为14-3-3细胞免疫靶点在不同疟原虫中的同源性分析;图1D为SUI1细胞免疫靶点在不同疟原虫中的同源性分析。

[0060] 图2为本发明TRAP抗原N端结构域和CSP抗原C端结构域的截选策略示意图。

[0061] 图3为本发明疫苗A、B的非限制性分子示意图。

[0062] 图4A-图4B分别为本发明疫苗A、B的质量控制结果图。

[0063] 图5A-图5B分别为本发明疫苗A、B体外转染HEK293细胞后的表达情况。

[0064] 图6为本发明疫苗免疫小鼠的日程示意图。

[0065] 图7为本发明疫苗免疫小鼠,攻毒后42h,肝脏组织寄生虫载量的qPCR相对定量检测结果。

[0066] 图8为本发明疫苗免疫小鼠,攻毒后42h,血清中CSP特异性IgG抗体的ELISA检测结果。

具体实施方式

[0067] 术语和定义

术语“疟原虫”指属于疟原虫属 (*Plasmodium*) 的单细胞寄生虫, 主要包括恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*) 和诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*) 等。疟原虫通过蚊媒传播, 感染哺乳动物 (包括人类) 的红细胞和肝细胞, 引起疟疾。

[0068] 术语“疟疾感染”指由疟原虫属寄生虫引起的感染, 包括由恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫和诺氏疟原虫等物种感染哺乳动物 (优选人类宿主) 所导致的疾病。疟疾感染通常通过受感染的按蚊叮咬传播, 其特征包括周期性发热、贫血、肝脾肿大以及严重时可导致器官衰竭或死亡。

[0069] 术语“ADF1”指来自疟原虫的肌动蛋白解聚因子1 (actin-depolymerizing factor 1, ADF1) 抗原。包含疟原虫的分离的野生型 ADF1 多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对疟原虫 ADF1 蛋白的免疫应答的变体。优选地, ADF1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

[0070] 术语“Pfj4”指来自疟原虫的类 DNAJ 热休克蛋白 Pfj4 (heat shock protein DNAJ-like Pfj4) 抗原。包含疟原虫的分离的野生型 Pfj4 多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对疟原虫 Pfj4 蛋白的免疫应答的变体。优选地, Pfj4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

[0071] 术语“14-3-3 protein”指来自疟原虫的 14-3-3 蛋白抗原, 也称为“14-3-3”。包含疟原虫的分离的野生型 14-3-3 多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对疟原虫 14-3-3 蛋白的免疫应答的变体。优选地, 14-3-3 protein 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

[0072] 术语“SUI1”指来自疟原虫的翻译起始因子 SUI1 (translation initiation factor SUI1) 抗原。包含疟原虫的分离的野生型 SUI1 多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对疟原虫 SUI1 蛋白的免疫应答的变体。优选地, SUI1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

[0073] 术语“TRAP 的 N 端结构域”指来自疟原虫的血凝素相关匿名蛋白 (thrombospondin related anonymous protein, TRAP) 抗原的 N 端结构域。包含疟原虫的分离的野生型 TRAP 的 N 端多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对疟原虫 TRAP 蛋白的免疫应答的变体。优选地, TRAP 的 N 端结构域氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

[0074] 术语“CSP 的 C 端结构域”指来自疟原虫的环孢子蛋白 (Circumsporozoite protein, CSP) 抗原的 C 端结构域。包含疟原虫的分离的野生型 CSP C 端多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对疟原虫 CSP 蛋白的免疫应答的变体。优选地, CSP 的 C 端结构域氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

[0075] 术语“免疫应答”指有机体中的体液应答、细胞应答或体液和细胞应答两者。免疫应可以通过测定进行测量, 所述测定包括但不限于测量特异性识别蛋白质或细胞表面蛋白的抗体的存在或量的测定、测量 T 细胞活化或增殖的测定和/或测量一种或更多种细胞因子活性调节或表达调节的测定。

[0076] 术语“给药”或“接种”指基于本发明核酸疫苗或疫苗组合物优选地经肌内的或皮下的途径给予, 尽管其他的给药途径也能被使用, 例如, 口服、鼻内 (例如气雾剂或其他非针剂给药)、淋巴结内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药, 或通过联用的途径。在动物的颈部肌内的给药是优选的。可采用加速方案 (boosting regimens) 将给药方案调节为提供最佳免疫。

[0077] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0078] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多核苷酸可包括在合适的载体中,且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0079] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括,例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合,例如启动子和增强子;(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列;以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建、可以使用任何载体,包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列,例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体,来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。包括自复制型载体和非自复制型载体。

[0080] 术语“mRNA”,指信使RNA、Messenger RNA,中文译名“信使核糖核酸”,是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

[0081] 术语“5' -UTR”,指“5' 非翻译区”或“5' UTR”,为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物,包含内含子和外显子,由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此,mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中,5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0082] 术语“3' -UTR”,指“3' -非翻译区”或“3' UTR”,涉及位于基因的3' 端,在蛋白质编码区的终止密码子下游,并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域,或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复,可以折叠产生茎环结构,所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如,RNA结合蛋白)相互作用。

[0083] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生基于本发明的重组疫苗的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞。

[0084] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,猪、牛、羊、猫、狗和马等),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),以及啮齿类动物(例如,兔、小鼠和大鼠等)。

[0085] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思,即将外源性的DNA、RNA导入宿主的过程。

[0086] 术语“药物组合”或“药物组合物”是指包含在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物,还在于提供一种方法,以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以是具有惰性的填充剂,也可以是为药用组合提供某种功能(例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解)的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂(或填充剂)、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0087] 术语“治疗”是指在罹患疾病之后,使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比使该疾病的症状减轻,并不意味着必需完全抑制疾病的症状。罹患疾病是指身体出现了疾病症状。

[0088] 术语“预防”是指在罹患疾病之前,通过使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比减轻罹患疾病后的症状,并不意味着必需完全抑制患病。

[0089] 除非另外定义或由背景清楚指示,否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0090] 本发明公开了一种可预防疟原虫感染的融合分子架构、基于该架构的重组疫苗制备方法及应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,都被视为包括在本发明以内。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0091] 本发明提供的融合蛋白和编码核酸及其元件,制备方法及应用中,所用原料及试剂均可由市售获得。根据本领域常规的分子克隆、表达构建、疫苗制备、免疫等基础知识,本领域技术人员均可以实施实现本发明的实施例方法。

[0092] 下面结合实施例,进一步阐明本发明。其中,作为一种优选,选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗。

[0093] 实施例1细胞免疫抗原筛选及融合蛋白构建

为了能够筛选能够用于细胞免疫的抗原,本发明从反向疫苗学的角度出发,从NCBI数据库中下载了恶性疟原虫、伯氏疟原虫、三日疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫的转录组数据,通过技术分析,获得转录水平较高的一系列候选抗原。这些候选抗原在不同疟原虫中具有以下特征:转录水平高、不同疟原虫来源的序列同源性在80%以上。由于疟疾疫苗最终应用于人的免疫,因此需要排除掉候选抗原中和人类蛋白同源性较高的抗原。同时,考虑到疫苗设计时,分子量过小的蛋白提供的免疫表位有限,而分子量过大的蛋白在表达时有困难,且在生产制备过程中都存在一定的难度,因此,需要逐步进行筛选排除,最终,优选地获得ADF1(actin-depolymerizing factor 1)、Pfj4(heat shock protein DNAJ-like Pfj4)、14-3-3 protein、SUI1(translation initiation factor SUI1)四个抗原。

[0094] 如图1A所示,ADF1抗原在五种疟原虫中同源性>86%;如图1B所示,Pfj4抗原在五种疟原虫中同源性>88%;如图1C所示,14-3-3 protein(也称14-3-3)抗原在五种疟原虫中

同源性>98%;如图1D所示,SUI1抗原在五种疟原虫中同源性>93%。此外,四个优选抗原的氨基酸长度范围处于100-300,是用于构建融合蛋白的优选长度。

[0095] 实施例2 TRAP抗原、CSP抗原筛选及融合蛋白构建

根据已有研究,特异性结合恶性疟原虫CSP抗原的抗体已被证实可用于阻断疟原虫感染,保护率约为80%,但由于保护时间短,且无法诱导长期免疫保护,使用场景有限,难以大范围推广。从预防性疫苗的角度考虑,体液免疫疫苗仍旧是不可或缺的。当前RTS,S/AS01疫苗采用CSP抗原作为免疫原,临床效果显示,免疫四针后,保护率在30%左右。这证明单纯筛选CSP的RTS结构域不能提供足够的保护效力,需要增添其他体液免疫抗原,提高保护效果。

[0096] 本发明基于RTS,S/AS01疫苗中对于CSP抗原的设计策略,进行进一步的优化设计。如图2所示,本发明重新筛选CSP的C端结构域,并且增加TRAP抗原的N端结构域,组成融合蛋白,在保证分子构象稳定的基础上,提供更多的有效表位。

[0097] 实施例3本发明重组核酸疫苗的构建

为了制备包含本发明抗原的重组核酸疫苗,本发明的核酸疫苗非限制性架构示意图如图3所示,示例性的图3为本发明疫苗A、疫苗B所表达融合蛋白的分子结构示意图。为了制备能够产生如图3所示的分子结构的重组核酸疫苗,首先构建一个基因表达盒,用于表达本发明所述的抗原序列。表达盒从5'端到3'端依次包含:5' UTR、CDS区、3' UTR、PolyA,其中,CDS区包含本发明所述的融合分子架构。随后,基于密码子简并性对完整的基因表达盒序列做优化,通过基因合成的方式直接获得DNA序列(委托金斯瑞公司合成)。最后,将合成的基因表达盒DNA序列插入至可用于体外RNA转录的表达载体中,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒。

[0098] 根据上述方法,制备用于后续实施例的载体:

(1) 基于本发明的重组核酸疫苗A制备载体

步骤a:合成“ADF1-Pfj4-[14-3-3]-SUI1”四基因的融合片段,基因之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示的linker序列连接,ADF1-Pfj4-[14-3-3]-SUI1融合基因编码的融合蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示。其中,ADF1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,Pfj4抗原的氨基酸如SEQ ID NO: 2所示,14-3-3抗原的氨基酸如SEQ ID NO: 3所示,SUI1抗原的氨基酸如SEQ ID NO: 4所示。

[0099] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0100] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0101] 步骤c:制备重组质粒。

[0102] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗A制备载体。

[0103] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体

步骤a:合成“人信号肽-人IGHG1的Fc结构域-TRAP抗原N端结构域-CSP抗原C端结构域”基因片段。其中,人信号肽为人的Azurocidin蛋白信号肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示,人IGHG1的Fc结构域的氨基酸如SEQ ID NO: 10所示,TRAP抗原N端结构域的氨基酸如SEQ ID NO: 5所示,CSP抗原C端结构域的氨基酸如SEQ ID NO: 6所示,人IGHG1的Fc

结构域与TRAP抗原N端结构域之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示的间隔序列连接，“TRAP抗原N端结构域-CSP抗原C端结构域”融合基因编码的融合蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

[0104] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0105] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0106] 步骤c:制备重组质粒。

[0107] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体。

[0108] 表1本发明所涉及架构元件的蛋白氨基酸序列

	氨基酸序列以及序列编号
ADF1抗原	GIRVNDNCVTEFNNMKIRKTCGWII FVIQNCEI IIHSGASTTLELVQSIDKNNEIQCAYVVFDA VSKIHFFMYARESSNSRDRMTYASSKQAILKKI EGVNVLTSVIESAQDVADLK (SEQ ID NO: 1)
Pf j4抗原	SRRVNYEVLGVPQDADLTVIKKSYRTLAMKWH PDKNPNNKAEATERFKQISEAYEVLSDPKRRRK YDLYGTDENYMADEDEFNSNFHKNFGFNDAQRI FEMFFGDSSPFGNDSFFSDVMGSSSFVDKRRGRV PRSNDFDNFFGSSFNVSFGSSFDNFMDGGS (SEQ ID NO: 2)
14-3-3 protein抗原	KDELTVEERNLLSVAYKNAVARRASWRISSV EQKEMSKANVHNKNVAATYRKKVEEELNNICQD ILNLLTKKLIPNTSESESKVFYYKMGDYRYI SEFSCDEGKKEASNCAQEAYQKATDIAENELPS THPIRLGLALNYSVFFYEILNQPHQACEMAKRA FDDAITEFDNVSEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLW TSDLQGDQTEEKSKDEGLE (SEQ ID NO: 3)
SUI1抗原	NATNLHIRNQQRNGRKSVTTVQGLGKTFDLKK MVRALKKEFNCGTIIEDIEHGSIIQLQGDKRN NVKEFLIREGICALHIRIHGA (SEQ ID NO: 4)

TRAP抗原的N端结构域	RDVQNNIVDEIKYREEVCNDEVLDLYLLMDCSGS IRRHNVVNHAVPLAMKLIQQNLNENAIHLYAN VFSNNAREIIRLHSDASKNKEKALIIKSLST NLPYGRNTLDALLQVRKHLNDRINRENANQLV VILTDGIPDSIQDSLKESRKLNDRGVKIAVFGI GQGINVAFNRFLVGCHPSDGKCNLYADSAWENV KNVIGPPFMKAVCVEVEKTASCGVWDEWSPCSVT CGKGTRSRKREILHEGCTSELQEQQEEERCPK REPLDVPD (SEQ ID NO: 5)
CSP抗原的C端结构域	DPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANP NANPNANPNKNNQNGGQGHNMPNDPNRNVDENA NANSAVKNNNEEPSDKHIKEYLNKIQNSLSTE WSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPKDEL DYAND IEKKICKMEKCSSV (SEQ ID NO: 6)
融合蛋白A	GIRVNDNCVTEFNMKIRKTCGWIIFVIQNC E I IIHSGASTTTELVSIDKNNEIQCAYVVFDA VSKIHFFMYARESSNSRDRMTYASSKQAILKKI EGVNVLT SVIESAQDVADLKGSGGGGGSGGSRR VNYEVLGVPQDADLTVIKKSYRTLAMKWHPDK NPNNKAEATERFKQISEAYEVLSDPKRRRKYDL YGTDENYMADENDEFSNFHKNFGFNDAQRIFEM FFGDSSPFGNDSFFSDVMGSSFVDKRRGRVPRS NDPFDNFFGSSFNVSFGSSFDNFMGGSGGGSGG GGSGGKDEL TVEERNLLSVAYKNAV GARRASWR IISSVEQKEMSKANVHNKNVAATYRKKVEEELN NICQDILNLLTKKLIPNTSESESKVFYKMKGD YYRYISEFSCDEGKKEASNCAQEAYQKATDIAE NELPSTHPIRLGLALNYSVFFYEILNQPHQACE MAKRAFDDAITEFDNVEDSYKDSTLIMQLLRD NLTWTS DLQGDQTEEKSKDEGLEGGSGGGSGG GNATNL IHIRNQRNGRKSVTTVQGLGKTFDLK KMVRALKKEFNCGTIIEDIEHGSIIQLQGDKR NNVKEFLIREGICALEHIRIHGA (SEQ ID NO: 7)

融合蛋白B	MTRLTVLALLAGLASSRAEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSGRDV QNNIVDEIKYREEVCNDEVDLYLLMDCSGSIRR HNWVNHAVPLAMKLIQQLNLNENAIHLYANVFS NNAREIIRLHSDASKNKEKALIIKSLSTNLP YGRNTLTDALLQVRKHLNDRINRENANQLVVIL TDGIPDSIQDSLKESRKLNDRGVKIAVFGIGQG INVAFNRFLVGCHPSDGKCNLYADSAWENVKNV IGPFMKAVCVEVEKTASCGVWDEWSPCSVTGCK GTRSRKREILHEGCTSELQEQQEEERCPPKREP LDVPDDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNKNNQNGQGHNMPNDPNRN VDENANANSVKNNNNEEPSDKHIKEYLNKIQN SLSTEWSPCSVTGNGIQVRIKPGSANKPKDEL DYANDIEKKICKMEKCSSV (SEQ ID NO: 8)
人蓝啖蛋白的信号肽	MTRLTVLALLAGLASSRA (SEQ ID NO: 9)
人IGHG1蛋白Fc结构域	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)
间隔序列	GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 11)
linker序列	GGSGGGGGSGG (SEQ ID NO: 12)

实施例4本发明重组核酸疫苗制备

(1) 加帽mRNA疫苗制备

步骤a:将实施例1中用于生产加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0109] 步骤b:将线性化的质粒进行体外共转录加帽反应,将7-甲基化鸟苷酸帽结构加至转录的mRNA的5'端,并对模板DNA进行降解。

[0110] (2) 非加帽mRNA疫苗制备

步骤a:将实施例1中用于生产非加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0111] 步骤b:将线性化的质粒进行体外非加帽的转录反应,并对模板DNA进行降解。

[0112] (3) DNA疫苗制备

步骤a:将实施例1中用于生产DNA疫苗的载体质粒进行扩增,获得大量用于纯化的目的质粒。

[0113] 步骤b:用去内毒素质粒提取及纯化试剂盒对目的质粒进行提取纯化。

[0114] 实施例5本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

以实施例4中的加帽mRNA疫苗制备的方法制备获得疫苗A(基于本发明的重组核酸疫苗A)、疫苗B(基于本发明的重组核酸疫苗B)。对生产的重组核酸进行纯度检测,用于实验的重组核酸纯度均大于80%,基于本发明的重组核酸质量控制峰图如图4A、图4B所示。具体描述为:(1)基于本发明的重组核酸疫苗A,纯度为83.9%;(2)基于本发明的重组核酸疫苗B,纯度为86.8%。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

[0115] 实施例6本发明重组核酸的体外表达效果

通过细胞转染试剂,将实施例5中的疫苗A、B转染至HEK293T细胞中,收集蛋白进行Western blot检测。图5A、图5B展示了疫苗A、B转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果,其中疫苗A所表达的抗原为细胞免疫抗原,理论上能够在细胞裂解物中检测到显著表达;疫苗B所表达的抗原为体液免疫抗原,理论上能够在上清中检测到显著表达。含有多个细胞免疫抗原的疫苗能够在细胞裂解物中检测到蛋白显著表达;含有多个体液免疫抗原的疫苗能够在上清中检测到蛋白显著表达。

[0116] 疫苗A、B的蛋白分子量如表2所示。其中,疫苗A能够在细胞内显著表达,证明本发明所提供的促使抗原融合表达的分子架构可以使多个抗原在真核细胞中顺利翻译、正确折叠,并且结构稳定、半衰期长。疫苗B能够在上清中显著表达,证明本发明提供的促进融合蛋白分泌表达的分子架构能够使多个抗原在真核细胞中顺利翻译、正确折叠、分泌到胞外。因此,基于本发明设计的疫苗,无论是细胞免疫抗原融合蛋白还是体液免疫抗原融合蛋白,均能够在真核细胞中正确表达,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递。

[0117] 表2 疫苗A、B的蛋白分子量

名称	蛋白分子量(kDa)
疫苗A	81.9
疫苗B	81.3

实施例7基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠感染模型中的预防效果

为了验证细胞免疫抗原融合分子、体液免疫抗原融合分子是否具备免疫保护效果,以及验证二者共同免疫是否有叠加协同保护效果,本实施例用疫苗A、疫苗B、疫苗A和疫苗B的组合物进行免疫治疗实验。

[0118] 由于本实验使用的疟原虫为伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*),该虫种几乎不感染人类,因此本发明采用了经过基因改造的伯氏疟原虫突变品系,该品系能够表达恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的环子孢子蛋白(CSP)。CSP是恶性疟原虫的主要致病蛋白,也是疫苗设计的关键靶点,因此该突变品系为验证疟疾疫苗效力提供了理想的实验模型。

[0119] 此外,疟原虫在感染后48小时会从肝期发育阶段转化为红内期(血细胞期),此时无法对肝期疟原虫进行准确定量检测。因此,本发明在攻毒后42小时进行解剖并采集样本,以确保在疟原虫完全进入红内期之前完成定量检测。这一时间点的选择能够更准确地反映疫苗对肝期疟原虫的抑制效果,从而更真实地评估疫苗的保护效力。

[0120] 实验选用6周龄的Ba1b/c品系小鼠共20只,具体免疫分组及治疗流程如表3所示,本表以及下文中剂量指活性成分量(即本发明的重组核酸疫苗)。免疫及取样流程如图6所示。

[0121] 表3 实施例7实验动物的免疫及攻毒日程

组别	疫苗	动物数量	免疫剂量	免疫程序	攻毒处理
1	基于本发明的重组核酸疫苗 A	5	5 μ g (100 μ L) /只/次	Day0, Day21 左腹股沟皮下接种	Day35 尾静脉注射感染: 每只小鼠
2	基于本发明的重组核酸疫苗 B	5	5 μ g (100 μ L) /只/次	Day0, Day21 左腹股沟皮下接种	5000 个疟原虫子孢子
3	基于本发明的重组核酸疫苗 A+B	5	5 μ g 疫苗 A+5 μ g 疫苗 B (200 μ L) /只/次	Day0, Day21 左腹股沟皮下接种	
4	PBS (对照组)	5	100 μ L/只/次	Day0, Day21 左腹股沟皮下接种	

[0122] 注:PBS指用PBS溶液替代疫苗,为对照组(非治疗组),作为免疫治疗实验的对照组。

[0123] 将各组小鼠按照表3所示的免疫流程进行两次免疫治疗,并于第35天进行攻毒实验。攻毒后42h的小鼠断颈处死,取整个肝组织于Trizol中,机械研磨至呈糊状,Trizol法提取肝组织总RNA,Nanodrop测浓度。用RNase-free水将总RNA浓度调整至500 ng/ μ l,取1 μ g总RNA进行逆转录,获得cDNA。取1 μ l cDNA进行qPCR,检测肝脏组织疟原虫18S相对表达水平,用来评估肝脏组织中的疟原虫载量。qPCR实验所用引物如表4所示。

[0124] 表4 实施例7qPCR实验所用引物

18S上游引物	AAGCATTAATAAAGCGAATACATCCTTAC (SEQ ID NO: 13)
18S下游引物	GGAGATTGGTTTTGACGTTTATGTG (SEQ ID NO: 14)
内参基因上游引物	GTTGTCTCCTGCGACTTCA (SEQ ID NO: 15)
内参基因下游引物	GGTGGTCCAGGGTTTCTTA (SEQ ID NO: 16)

[0125] 注:表4中的内参基因为GapDH。

[0126] 检测结果如图7所示,疫苗A、疫苗B单独免疫,或者疫苗A和疫苗B混合免疫,都能够提供显著的保护效果。其中,疫苗B单独免疫的效果优于疫苗A单独免疫,疫苗A和疫苗B混合免疫的效果最佳,在2/5个体中几近于完全抑制。

[0127] 攻毒后42h取小鼠血清,检测血清中的CSP特异性IgG抗体滴度。用体外表达的恶性疟原虫CSP全长蛋白作为抗原,包被ELISA检测平板,1%酪蛋白封闭。一抗为攻毒后的小鼠血清(1%酪蛋白1:100稀释),每个样品2个复孔。二抗为羊抗鼠IgG-HRP(1%酪蛋白1:100稀释)。检测结果如图8所示,疫苗A为细胞免疫疫苗,且不含有CSP抗原,因此诱导的CSP抗体滴度最低;疫苗B为体液免疫疫苗,且含有CSP抗原的C端结构域,诱导了高水平的特异性IgG抗体;疫苗A和疫苗B混合免疫,同样诱导了高水平抗体滴度。

[0128] 上述两项实验结果表明,本发明的体液免疫疫苗B能够诱导小鼠产生高水平的特异性抗体,从而在疟原虫感染初期发挥显著的保护作用;而本发明的细胞免疫疫苗A则能够有效激活小鼠的细胞免疫反应,尽管其在感染初期无法完全抑制疟原虫的增殖,但与体液免疫疫苗B联合使用时,能够产生显著的协同效应,实现保护效力的叠加。

[0129] 此外,由于疫苗设计所采用的抗原序列完全来源于恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*),而攻毒实验使用的是经过基因改造的伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*, 表达恶性疟原虫CSP蛋白),细胞免疫疫苗所展现的抑制效果进一步证明,本发明的疫苗能够提供良好的交叉免疫保护。这一特性为开发“一苗多防”的广谱疟疾疫苗奠定了重要基础,具有重要的参考价值和应用前景。

[0130] 综上所述,本发明提供的抗原和融合分子架构,能够诱导模式动物小鼠产生有效的免疫,针对疟原虫感染有良好的预防效果。因此,本发明能够应用于动物免疫药物的生产和研发,填补当前疟疾疫苗研发领域的空白,具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

[0131] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例,而并非是对本公开的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。

Percent Identity Matrix

<input type="checkbox"/> ADF1-伯氏疟原虫-A0A509ALW6	100.00%	86.89%	86.07%	88.52%	89.34%
<input type="checkbox"/> ADF1-恶性疟原虫-W7JQW3	86.89%	100.00%	89.34%	90.16%	90.16%
<input type="checkbox"/> ADF1-三日疟原虫-A0A1C3KB42	86.07%	89.34%	100.00%	94.26%	94.26%
<input type="checkbox"/> ADF1-间日疟原虫-A0A0J9SAE7	88.52%	90.16%	94.26%	100.00%	98.36%
<input type="checkbox"/> ADF1-卵形疟原虫-A0A1C3KF85	89.34%	90.16%	94.26%	98.36%	100.00%

ADF1-伯氏疟原虫-A0A509ALW6 M I S G I R V N D N C V T E F N N M K I R K T C R W I I F V I E N C E I I I H S K G E T T S L K D L V D S I D K N N N I Q C A Y V V F D A 69
 ADF1-恶性疟原虫-W7JQW3 M I S G I R V N D N C V T E F N N M K I R K T C G W I I F V I O N C E I I I H S K G A S T T L T E L V Q S I D K N N E I Q C A Y V V F D A 69
 ADF1-三日疟原虫-A0A1C3KB42 M I S G I R V N D T C I T E F N N M K I R K T C R W I I F V I E N C E I I I H S K G A T T T L T E L V E S I D K N E Q I Q C A Y V V F D A 69
 ADF1-间日疟原虫-A0A0J9SAE7 M I S G I R V N D T C I T E F N N M K I R K T C R W I I F V I E N C E I I I H S K G A T T T L T E L V E S I D K N D K I Q C A Y V V F D A 69
 ADF1-卵形疟原虫-A0A1C3KF85 M I S G I R V N D T C I T E F N N M K I R K T C R W I I F V I E N C E I I I H S K G A T T T L T E L V E S I D K N S N I Q C A Y V V F D A 69

W7JQW3:Domain

ADF1-伯氏疟原虫-A0A509ALW6 V N K I H F F M Y A R E T S N S R D R M T Y A S S K Q A L L K K I E G V N V L T S V I E S A L D V A D F K 122
 ADF1-恶性疟原虫-W7JQW3 V S K I H F F M Y A R E S S N S R D R M T Y A S S K Q A I L K K I E G V N V L T S V I E S A Q D V A D L K 122
 ADF1-三日疟原虫-A0A1C3KB42 V S Y F L F F M Y A R E S S N S R D R M T Y A S S K Q A L L K K I E G V N V L T S V I E S A Q D V A D F K 122
 ADF1-间日疟原虫-A0A0J9SAE7 V N K I H F F M Y A R E S S N S R D R M T Y A S S K Q A L L K K I E G V N V L T S V I E S V Q D V A D F K 122
 ADF1-卵形疟原虫-A0A1C3KF85 V N K I H F F M Y A R E S S N S R D R M T Y A S S K Q A L L K K I E G V N V L T S V I E S V Q D V A D F K 122

W7JQW3:Domain

图1A

Percent Identity Matrix

<input type="checkbox"/> Pjf4-伯氏疟原虫-A0A509AH07	100.00%	90.61%	88.52%	90.20%	91.84%
<input type="checkbox"/> Pjf4-间日疟原虫-A0A0J9S6U6	90.61%	100.00%	90.57%	91.43%	92.24%
<input type="checkbox"/> Pjf4-恶性疟原虫-A0A2I0BYA4	88.52%	90.57%	100.00%	92.21%	93.85%
<input type="checkbox"/> Pjf4-卵形疟原虫-A0A1C3KWW2	90.20%	91.43%	92.21%	100.00%	94.29%
<input type="checkbox"/> Pjf4-三日疟原虫-A0A1A8WC37	91.84%	92.24%	93.85%	94.29%	100.00%

Pjf4-伯氏疟原虫-A0A509AH07 M P N R V N Y Y E V L G V P Q D A D I S V I K K S Y R T L A M K W H P D K N P N N K A E A T E R F K Q I S E A Y E V L S D P K R R R K Y D 69
 Pjf4-间日疟原虫-A0A0J9S6U6 M S K R V N Y Y E V L G V P Q D A D L S I I K K S Y R T L A M K W H P D K N P N N K A E A T E K F K Q I S E A Y E V L S D P K R R R K Y D 69
 Pjf4-恶性疟原虫-A0A2I0BYA4 M S R R V N Y Y E V L G V P Q D A D L T V I K K S Y R T L A M K W H P D K N P N N K A E A T E R F K Q I S E A Y E V L S D P K R R R K Y D 69
 Pjf4-卵形疟原虫-A0A1C3KWW2 M S R R V N Y Y E V L G V P Q D A D I A V I K K S Y R T L A M K W H P D K N P N N K A E A T E R F K Q I S E A Y E V L S D P K R R R K Y D 69
 Pjf4-三日疟原虫-A0A1A8WC37 M S K R V N Y Y E V L G V P Q D A D I S V I K K S Y R T L A M K W H P D K N P N N K A E A T E R F K Q I S E A Y E V L S D P K R R R K Y D 69

A0A2I0BYA4:Domain

Pjf4-伯氏疟原虫-A0A509AH07 L Y G T D E G Y A M G D N D E F S N F H K N F G F N D A Q R I F E M F F G D S T P F G N D S F F G E V M G S S F G D K R R G R M G R S T D 138
 Pjf4-间日疟原虫-A0A0J9S6U6 L Y G T D E N Y L P D E N D E F S N F H K N F G F N D A Q R I F E M F F G D S T P F G N E S F F F S E V M G S S F G D K R R G R M A R S N D 138
 Pjf4-恶性疟原虫-A0A2I0BYA4 L Y G T D E N Y M A D E N D E F S N F H K N F G F N D A Q R I F E M F F G D S S P F G N D S F F S D V M G S S F V D K R R G R V P R S N D 138
 Pjf4-卵形疟原虫-A0A1C3KWW2 L Y G T D E N Y M P D E N D E F S N F H K N F G F N D A Q R I F E M F F G D S T P F G G D S F F S D V M G S T F S D K R R G R A G R S N D 138
 Pjf4-三日疟原虫-A0A1A8WC37 L Y G T D E N Y M A G D N D E F S N F H K N F G F N D A Q R I F E M F F G D S T P F G N D S F F S D V M G S S F V D K R R G R A G R S N D 138

A0A2I0BYA4:Domain

Pjf4-伯氏疟原虫-A0A509AH07 P F D N F F G S S F N I S F G S P S S F D N F M D G G S C F T S V E T S T S N G G K F K N R V V K T S T S K T T S I I N G K R V T R I E T V 207
 Pjf4-间日疟原虫-A0A0J9S6U6 P F D S F F G S S F N I S F G S S N F D N F M D G G S C F T S V E T S T S N G G K F K N R F V K T S T S K T T S I V N G K R V T R I E T V 207
 Pjf4-恶性疟原虫-A0A2I0BYA4 P F D N F F G S S F N V S F G S - S F D N F M D G G S C F T S V E T S T S N G G K F K N R V V K T S T S K S T S I I N G K R V T R I E T V 206
 Pjf4-卵形疟原虫-A0A1C3KWW2 P F D N F F G S S F N I S F G S S S F D N F M D G G S C F T S V E T S T S N G G S F K N R V V K T S T S K T T S I V N G K R V T R I E T V 207
 Pjf4-三日疟原虫-A0A1A8WC37 P F D N F F G S S F N I S F G S P S F D N F M D G G S C F T S V E T S T S N G G K F K N R V V K T S T S K T T S I V N G K R V T R I E T V 207

A0A2I0BYA4:Domain

Pjf4-伯氏疟原虫-A0A509AH07 K T L P N G T I E R T V T E K E E D G R G N V N V R O L P S Y E M R K N K R 245
 Pjf4-间日疟原虫-A0A0J9S6U6 K T L P N G T I E R T V T E R E E D G R G N V N V R O L P A H E M R R N K R 245
 Pjf4-恶性疟原虫-A0A2I0BYA4 K T L P N G T V E R T V T E R E E D D R G N I N I R O L P A H E L R R N K R 244
 Pjf4-卵形疟原虫-A0A1C3KWW2 K T L P N G T V E R T V T E R E D D G R G N V N V R O L P S H E I R R N K R 245
 Pjf4-三日疟原虫-A0A1A8WC37 K T L P N G T V E R T V T E R E E D G R G N V N V R O L P A H E L K R N K R 245

A0A2I0BYA4:Domain

图1B

Percent Identity Matrix

14-3-3-间日疟原虫-CAI7718852.1	100.00%	98.47%	98.85%	98.47%	98.85%
14-3-3-恶性疟原虫-KAF4330247.1	98.47%	100.00%	98.85%	98.47%	98.85%
14-3-3-卵形疟原虫-SCA48630.1	98.85%	98.85%	100.00%	98.85%	99.24%
14-3-3-伯氏疟原虫-SCO59334.1	98.47%	98.47%	98.85%	100.00%	99.24%
14-3-3-三日疟原虫-XP_028860477.1	98.85%	98.85%	99.24%	99.24%	100.00%

14-3-3-间日疟原虫-CAI7718852.1	MATSEELKQLRSDCTYRSKLA	EQAERYDEMADAMRTLVEQC	VNNDKDEL	TV	EERNLLSVAYKNAV	GARR	69	
14-3-3-恶性疟原虫-KAF4330247.1	MATSEELKQLRSDCTYRSKLA	EQAERYDEMADAMRTLVEQC	VNNDKDEL	TV	EERNLLSVAYKNAV	GARR	69	
14-3-3-卵形疟原虫-SCA48630.1	MATSEELKQLRSDCTYRSKLA	EQAERYDEMADAMRTLVEQC	VNNDKDEL	TV	EERNLLSVAYKNAV	GARR	69	
14-3-3-伯氏疟原虫-SCO59334.1	MATPEELKQLRSDCTYRSKLA	EQAERYDEMADAMRTLVEQC	VNNDKDEL	TV	EERNLLSVAYKNAV	GARR	69	
14-3-3-三日疟原虫-XP_028860477.1	MATPEELKQLRSDCTYRSKLA	EQAERYDEMADAMRTLVEQC	VNNDKDEL	TV	EERNLLSVAYKNAV	GARR	69	
14-3-3-间日疟原虫-CAI7718852.1	ASWR	ISSVEQKEMSKANVHNKN	IAATYRKKV	EEFELN	ICQD	LNLLTKKL	IPNTSESESKVFYKMKG	138
14-3-3-恶性疟原虫-KAF4330247.1	ASWR	ISSVEQKEMSKANVHNKN	IAATYRKKV	EEFELN	ICQD	LNLLTKKL	IPNTSESESKVFYKMKG	138
14-3-3-卵形疟原虫-SCA48630.1	ASWR	ISSVEQKEMSKANVHNKN	IAATYRKKV	EEFELN	ICQD	LNLLTKKL	IPNTSESESKVFYKMKG	138
14-3-3-伯氏疟原虫-SCO59334.1	ASWR	ISSVEQKEMSKANVHNKN	IAATYRKKV	EEFELN	ICQD	LNLLTKKL	IPNTSESESKVFYKMKG	138
14-3-3-三日疟原虫-XP_028860477.1	ASWR	ISSVEQKEMSKANVHNKN	IAATYRKKV	EEFELN	ICQD	LNLLTKKL	IPNTSESESKVFYKMKG	138
14-3-3-间日疟原虫-CAI7718852.1	DYYRY	SEFSCDEGKKEASNFAQEA	YQKATDIAENELPSTHP	IRLGLALNYSVFFYE	ILNQPHQACEMA		207	
14-3-3-恶性疟原虫-KAF4330247.1	DYYRY	SEFSCDEGKKEASNFAQEA	YQKATDIAENELPSTHP	IRLGLALNYSVFFYE	ILNQPHQACEMA		207	
14-3-3-卵形疟原虫-SCA48630.1	DYYRY	SEFSCDDGKKEASNFAQEA	YQKATDIAENELPSTHP	IRLGLALNYSVFFYE	ILNQPHQACEMA		207	
14-3-3-伯氏疟原虫-SCO59334.1	DYYRY	SEFSCDEGKKEASNFAQEA	YQKATDIAENELPSTHP	IRLGLALNYSVFFYE	ILNQPHQACEMA		207	
14-3-3-三日疟原虫-XP_028860477.1	DYYRY	SEFSCDEGKKEASNFAQEA	YQKATDIAENELPSTHP	IRLGLALNYSVFFYE	ILNQPHQACEMA		207	
14-3-3-间日疟原虫-CAI7718852.1	KRAFD	DAITFDNVS	EDSYKDSTL	IMQLLRDNL	LWTS	DLQGDQTEEEKSKDEGLE	262	
14-3-3-恶性疟原虫-KAF4330247.1	KRAFD	DAITFDNVS	EDSYKDSTL	IMQLLRDNL	LWTS	DLQGDQTEEEKSKDEGLE	262	
14-3-3-卵形疟原虫-SCA48630.1	KRAFD	DAITFDNVS	EDSYKDSTL	IMQLLRDNL	LWTS	DLQGDQTEEEKSKDEGLE	262	
14-3-3-伯氏疟原虫-SCO59334.1	KRAFD	DAITFDNVS	EDSYKDSTL	IMQLLRDNL	LWTS	DLQGDQTEEEKSKDEGLE	262	
14-3-3-三日疟原虫-XP_028860477.1	KRAFD	DAITFDNVS	EDSYKDSTL	IMQLLRDNL	LWTS	DLQGDQTEEEKSKDEGLE	262	

图1C

Percent Identity Matrix

<input type="checkbox"/> SUI1-恶性疟原虫-W7KC28	100.00%	93.91%	95.65%	93.91%	94.78%
<input type="checkbox"/> SUI1-间日疟原虫-A0A0J9S3X4	93.91%	100.00%	96.52%	93.91%	96.52%
<input type="checkbox"/> SUI1-卵形疟原虫-A0A1D3UAR2	95.65%	96.52%	100.00%	94.78%	97.39%
<input type="checkbox"/> SUI1-伯氏疟原虫-A0A509ASY6	93.91%	93.91%	94.78%	100.00%	97.39%
<input type="checkbox"/> SUI1-三日疟原虫-A0A1D3TFN6	94.78%	96.52%	97.39%	97.39%	100.00%

<input type="checkbox"/> SUI1-恶性疟原虫-W7KC28	MNLAIQNLG	INDPFTNEN	IVDKGNGKSN	TNLI	HIRNQQRNGRKS	VTTVQGLGKT	FDLKKMVRAL	KKKF	69
<input type="checkbox"/> SUI1-间日疟原虫-A0A0J9S3X4	MNLAIQNLG	INDPFTNEN	IVDKGNGKPN	TNLI	HIRNQQRNGRKS	VTTVQGLGKT	YDLKKMVRAL	KKKF	69
<input type="checkbox"/> SUI1-卵形疟原虫-A0A1D3UAR2	MNLAIQNLG	INDPFTNEN	IVDKGNGKSN	TNLI	HIRNQQRNGRKS	VTTVQGLGKT	YDLKKMVRAL	KKKF	69
<input type="checkbox"/> SUI1-伯氏疟原虫-A0A509ASY6	MNLAIQNLG	INDPFTNEN	IVDKGNGKSN	TNLI	HIRNQQRNGRKS	VTTVQGLGKT	YDLKKMVRAL	KKKF	69
<input type="checkbox"/> SUI1-三日疟原虫-A0A1D3TFN6	MNLAIQNLG	INDPFTNEN	IVDKGNGKSN	TNLI	HIRNQQRNGRKS	VTTVQGLGKT	YDLKKMVRAL	KKKF	69

W7KC26:Domain

<input type="checkbox"/> SUI1-恶性疟原虫-W7KC28	NCNGT	I	E	D	I	E	H	G	S	I	I	Q	L	Q	G	D	K	R	N	V	K	E	F	L	R	E	G	I	C	A	L	E	H	I	R	I	H	G	A	115	
<input type="checkbox"/> SUI1-间日疟原虫-A0A0J9S3X4	NCNGT	I	E	D	S	E	H	G	S	I	I	Q	L	Q	G	D	K	R	N	V	K	D	F	L	R	E	G	I	C	A	G	D	H	I	R	I	H	G	A	115	
<input type="checkbox"/> SUI1-卵形疟原虫-A0A1D3UAR2	NCNGT	I	E	D	I	E	H	G	S	I	I	Q	L	Q	G	D	K	R	N	V	K	D	F	L	R	E	G	I	C	A	L	D	H	I	R	I	H	G	A	115	
<input type="checkbox"/> SUI1-伯氏疟原虫-A0A509ASY6	NCNGT	I	E	D	I	E	H	G	S	I	I	Q	L	Q	G	D	K	R	S	N	V	K	D	F	L	R	E	G	I	C	S	V	D	H	I	R	I	H	G	A	115
<input type="checkbox"/> SUI1-三日疟原虫-A0A1D3TFN6	NCNGT	I	E	D	I	E	H	G	S	I	I	Q	L	Q	G	D	K	R	S	N	V	K	D	F	L	R	E	G	I	C	A	V	D	H	I	R	I	H	G	A	115

W7KC26:Domain

图1D

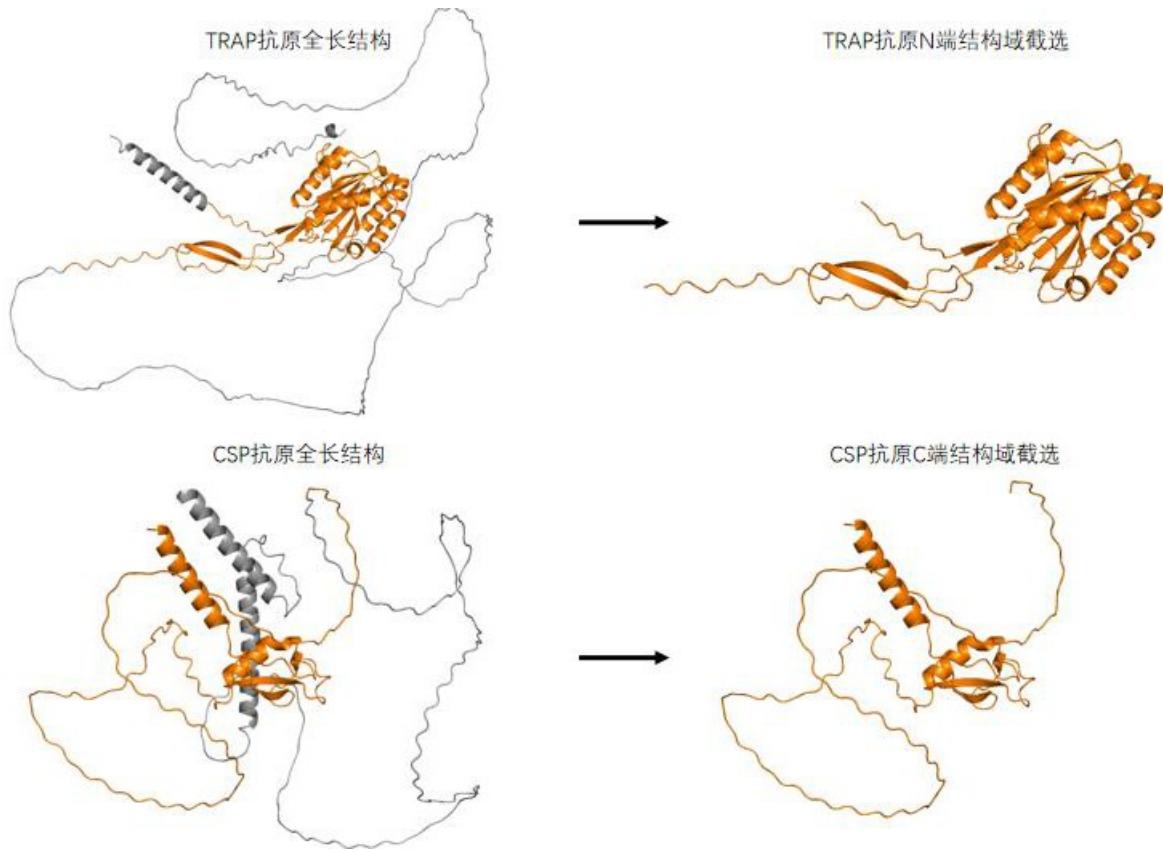


图2

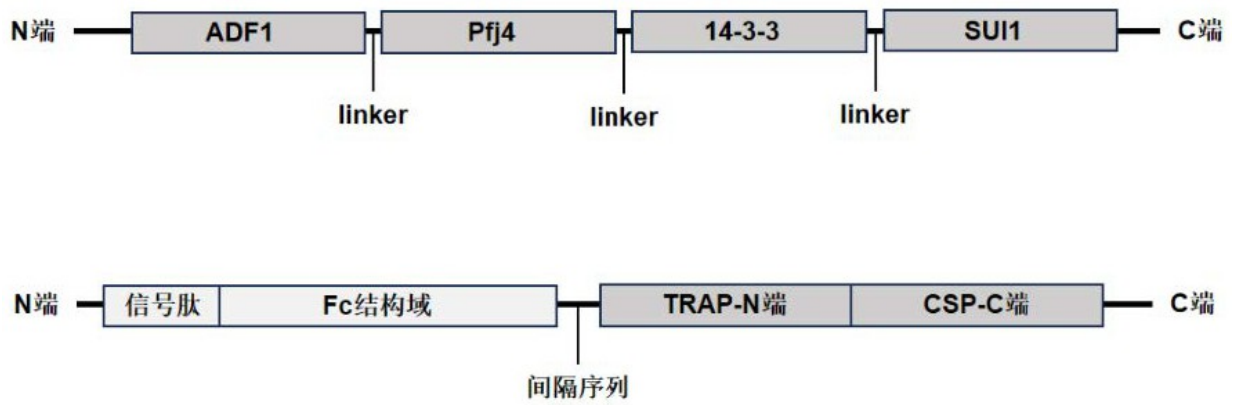


图3

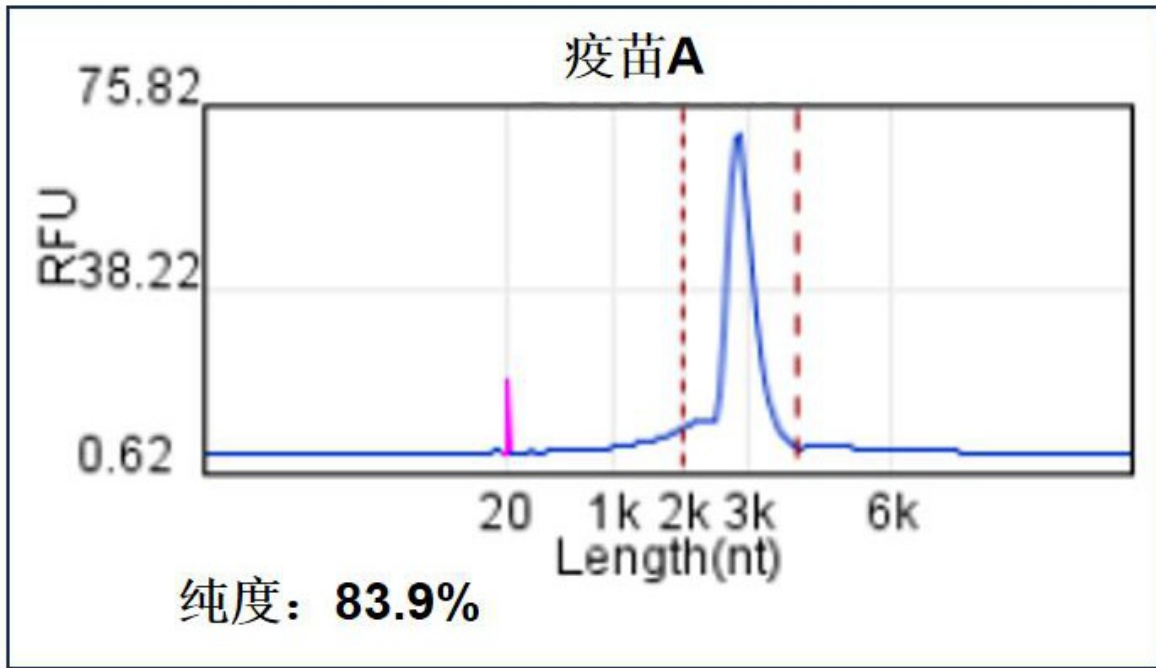


图4A

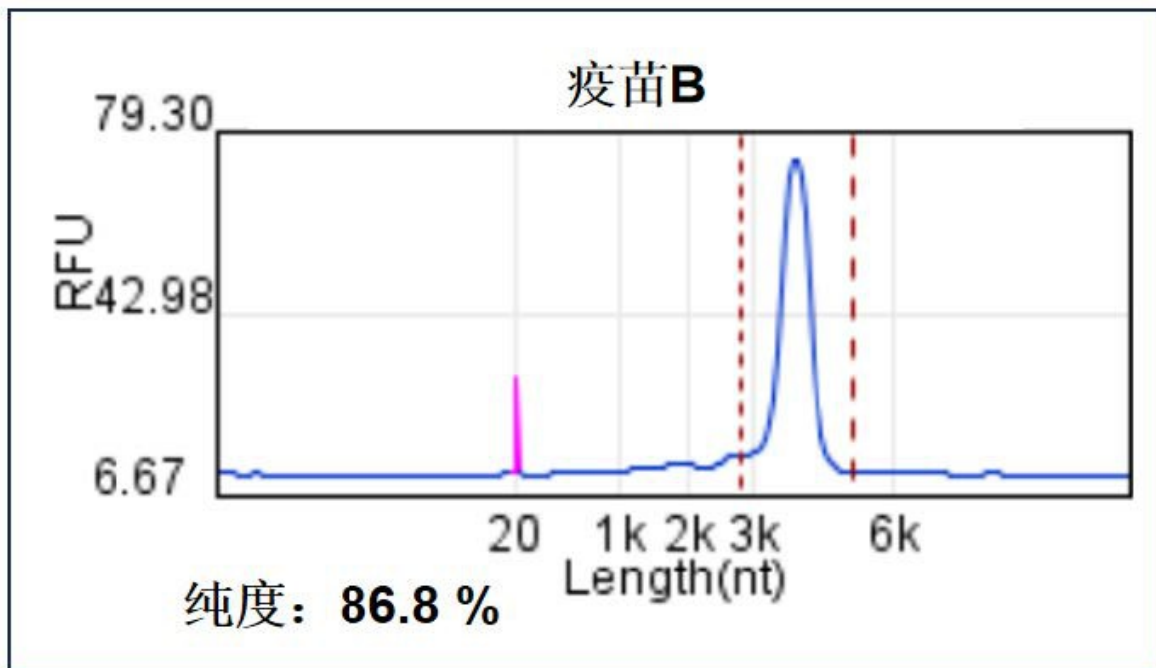


图4B

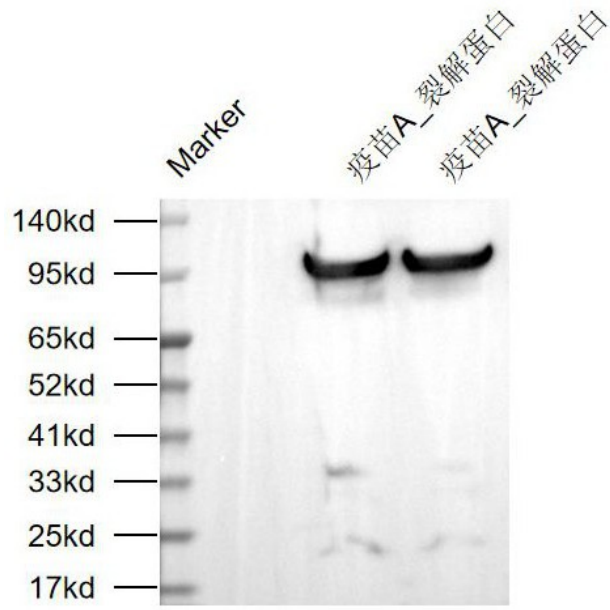


图5A

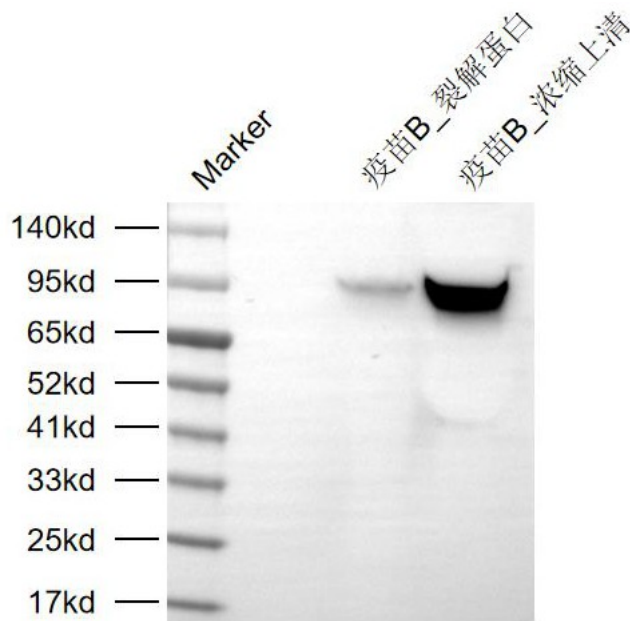


图5B

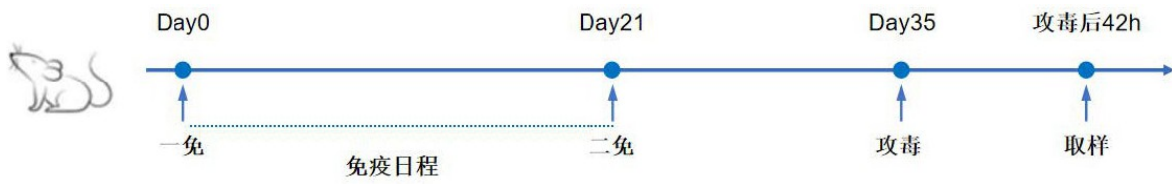


图6

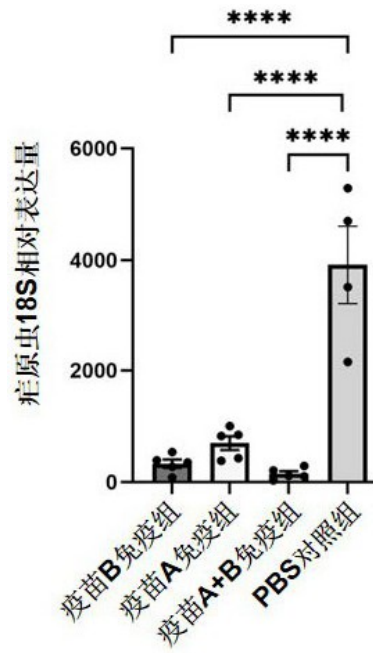


图7

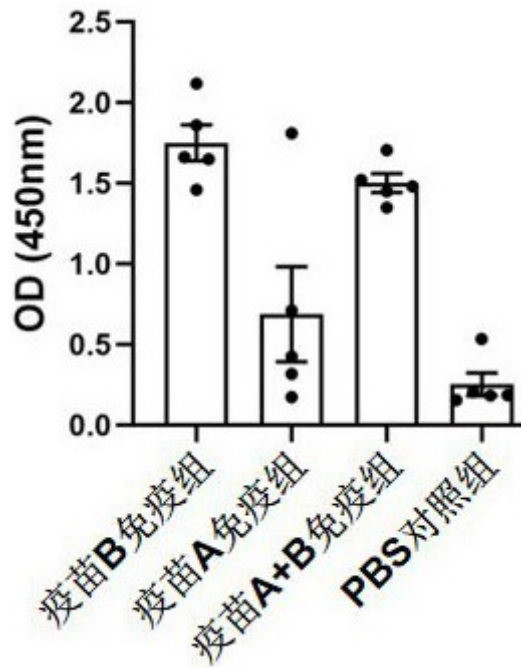


图8