(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118308379 A
(43)申请公布日 2024.07.09

(21)申请号 202410465677.6
(22)申请日 2018.12.14
(30)优先权数据
62/608038 2017.12.20 US
(62)分案原申请数据
201880089867.5 2018.12.14
(71)申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司
地址 比利时里克森萨特
(72)发明人 S·卡彭 A·富尔戈里 A·拉姆 B·维塞尔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李唐 彭昶
(51)Int.Cl.
C12N 15/38(2006.01)
C07K 14/05(2006.01)
A61K 39/245(2006.01)
A61K 39/295(2006.01)
A61P 31/22(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

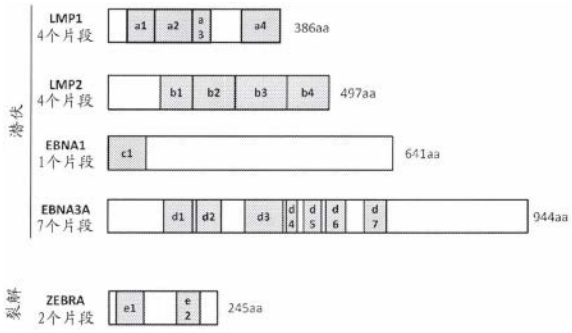
权利要求书3页 说明书36页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体

(57)摘要

本发明涉及爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体。本发明提供了爱泼斯坦-巴尔病毒抗原多核苷酸、多肽和载体;以及包含其的免疫原性组合物。其包括使用爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体来产生疫苗用于治疗和预防爱泼斯坦-巴尔病毒感染和爱泼斯坦-巴尔病毒-相关的疾病,诸如多发性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。



CN 118308379 A

1.编码多肽的多核苷酸,其中所述多肽由免疫原性片段组成,所述免疫原性片段由以下序列组成:

(a)SEQ ID NO:2-5的一个或多个作为LMP1片段;

(b)SEQ ID NO:7-10的一个或多个作为LMP2片段;

(c)SEQ ID NO:11的至少40个氨基酸的一个或多个序列作为EBNA1片段;

(d)SEQ ID NO:14-20的一个或多个作为EBNA3A片段;和

(b)SEQ ID NO:22-23的一个或多个作为ZEBRA片段;

其中所述多核苷酸可操作连接至一个或多个指导所述多肽在宿主细胞中的表达的序列,并且其中所述多肽与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性。

2.权利要求1的多核苷酸,其中所述编码的多肽由以下组成:

(a)SEQ ID NO:2-5的两个或更多个作为LMP1片段;

(b)SEQ ID NO:7-10的两个或更多个作为LMP2片段;

(c)SEQ ID NO:11的至少40个氨基酸的两个或更多个序列作为EBNA1片段;

(d)SEQ ID NO:14-20的两个或更多个作为EBNA3A片段;或

(b)SEQ ID NO:22和23作为ZEBRA片段。

3.权利要求2的多核苷酸,其中所述编码的多肽由以下组成:

彼此不相邻的LMP1的免疫原性片段,

彼此不相邻的LMP2的免疫原性片段,

彼此不相邻的EBNA1的免疫原性片段,

彼此不相邻的EBNA3的免疫原性片段,和/或

彼此不相邻的ZEBRA的免疫原性片段。

4.权利要求1-3中任一项的多核苷酸,其中所述编码的多肽由以下组成:

(a)LMP1的第一和第二片段,其中所述LMP1的第一和第二片段选自SEQ ID NO:2-5,且其中所述LMP1的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻,

(b)LMP2的第一和第二片段,其中所述LMP1的第一和第二片段选自SEQ ID NO:7-10,且其中所述LMP2的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻,

(c)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的片段,和

(d)EBNA3A的第一和第二片段,其中所述EBNA3A的第一和第二片段选自SEQ ID NO:14-20,且其中所述EBNA3A的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻。

5.权利要求1-3中任一项的多核苷酸,其中所述编码的多肽由以下组成:

(a)由SEQ ID NO:2组成的LMP1的第一片段,

(b)由SEQ ID NO:3组成的LMP1的第二片段,

(c)由SEQ ID NO:4组成的LMP1的第三片段,

(d)由SEQ ID NO:5组成的LMP1的第四片段,

(e)由SEQ ID NO:7组成的LMP2的第一片段,

(f)由SEQ ID NO:8组成的LMP2的第二片段,

(g)由SEQ ID NO:9组成的LMP2的第三片段,

(h)由SEQ ID NO:10组成的LMP2的第四片段,

(i)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的第一片段,

(j)由SEQ ID NO:14组成的EBNA3A的第一片段,

(k)由SEQ ID NO:15组成的EBNA3A的第二片段,

(l)由SEQ ID NO:16组成的EBNA3A的第三片段,

(m)由SEQ ID NO:17组成的EBNA3A的第四片段,

(n)由SEQ ID NO:18组成的EBNA3A的第五片段,

(o)由SEQ ID NO:19组成的EBNA3A的第六片段,

(p)由SEQ ID NO:20组成的EBNA3A的第七片段;

(q)由SEQ ID NO:22组成的ZEBRA的第一片段,和

(r)由SEQ ID NO:23组成的ZEBRA的第二片段;

其中第一、第二、第三和第四LMP1片段彼此不相邻;第一、第二、第三和第四LMP2片段彼此不相邻;第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七EBNA3A片段彼此不相邻;且

第一和第二ZEBRA片段彼此不相邻。

6.权利要求1-3中任一项的多核苷酸,其中所述编码的多肽与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26相同。

7.载体,其包含权利要求1-6中任一项的多核苷酸。

8.多肽,其由权利要求1-6中任一项的多核苷酸编码,所述多肽与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26相同。

9.免疫原性组合物,其包含权利要求1-6中任一项的多核苷酸、权利要求7的载体或权利要求8的多肽;和药学上可接受的赋形剂。

10.免疫原性组合物,其包含编码含有免疫原性片段的一个或多个多肽的一个或多个多核苷酸,其中由所述组合物编码的免疫原性片段由以下序列组成:

(a)SEQ ID NO:2-5的一个或多个作为LMP1片段;

(b)SEQ ID NO:7-10的一个或多个作为LMP2片段;

(c)SEQ ID NO:11的至少40个氨基酸的一个或多个序列作为EBNA1片段;

(d)SEQ ID NO:14-20的一个或多个作为EBNA3A片段;和

(e)SEQ ID NO:22-23的一个或多个作为ZEBRA片段;

其中所述多核苷酸可操作连接至一个或多个指导所述多肽在宿主细胞中的表达的序列。

11.权利要求10的免疫原性组合物,其中由所述组合物编码的免疫原性片段由以下组成:

(a)SEQ ID NO:2-5的两个或更多个作为LMP1片段;

(b)SEQ ID NO:7-10的两个或更多个作为LMP2片段;

(c)SEQ ID NO:11的至少40个氨基酸的两个或更多个序列作为EBNA1片段;

(d)SEQ ID NO:14-20的两个或更多个作为EBNA3A片段;和

(b)SEQ ID NO:22和23作为ZEBRA片段。

12.权利要求10或11的免疫原性组合物,其中由所述组合物编码的免疫原性片段由以下组成:

(a)SEQ ID NO:2-5作为LMP1片段;

(b)SEQ ID NO:7-10作为LMP2片段;

(c)SEQ ID NO:11的至少40个氨基酸的三个或更多个序列作为EBNA1片段;

(d)SEQ ID NO:14-20作为EBNA3A片段:和

(b)SEQ ID NO:22和23作为ZEBRA片段。

13.权利要求9-11中任一项的免疫原性组合物,其进一步包含佐剂。

14.权利要求1-3中任一项的多核苷酸、权利要求7的载体、权利要求8的多肽或权利要求9-11中任一项的免疫原性组合物,其用于治疗或预防由爱泼斯坦-巴尔病毒感染引起的疾病。

15.权利要求1-6中任一项的多核苷酸、权利要求7的载体、权利要求8的多肽或权利要求9-13中任一项的免疫原性组合物在制备用于诱导受试者中的免疫应答的方法的药物中的用途,所述药物用于预防EBV感染以及治疗EBV-相关的疾病,其中所述方法包括将权利要求1-6中任一项的多核苷酸、权利要求7的载体、权利要求8的多肽或权利要求9-13中任一项的免疫原性组合物施用于所述受试者,其中所述EBV-相关的疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、胃癌、鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤和伯基特氏淋巴瘤。

16.权利要求15的用途,其中所述受试者是爱泼斯坦-巴尔病毒血清阴性的。

17.权利要求15的用途,其中所述受试者是爱泼斯坦-巴尔病毒血清阳性的。

18.权利要求1-6中任一项的多核苷酸、权利要求7的载体、权利要求8的多肽或权利要求9-13中任一项的免疫原性组合物在制备用于治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法的药物中的用途,所述方法包括将权利要求1-6中任一项的多核苷酸、权利要求7的载体、权利要求8的多肽或权利要求9-13中任一项的免疫原性组合物施用于所述受试者,其中所述EBV-相关的疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、胃癌、鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤和伯基特氏淋巴瘤。

爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体

[0001] 本申请是申请日为2018年12月14日的中国专利申请201880089867.5“爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体”的分案申请。

政府利益的声明

本发明是在与美国国立卫生研究院(卫生与人类服务部的一个机构)的合作研究和开发协议的执行中创造的。美国政府在本发明中具有某些权利。

[0002] 序列表

本申请含有已经以ASCII形式电子提交且在此以其整体通过引用并入的序列表。所述ASCII拷贝,在2018年12月5日创建,命名为VU66487_WO_SL.txt,且大小为419,960字节。

技术领域

[0003] 本发明在治疗和预防病毒感染的领域中。具体而言,本发明涉及爱泼斯坦巴尔病毒抗原构建体。其包括使用爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体用于治疗和预防爱泼斯坦-巴尔病毒感染和爱泼斯坦-巴尔病毒相关疾病。

背景技术

爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV),也称为人疱疹病毒4(HHV-4),是人类中最常见的病毒之一,感染至少90%的成人。EBV在大多数受感染的个体中建立无症状的潜伏感染,但也被称为感染性单核细胞增多症的主要病原体。

[0005] 更重要的是,EBV感染与某些类型的恶性肿瘤(例如,胃癌、鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤)以及多发性硬化症(MS)、系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)和肖格伦氏综合征的风险增加相关。

[0006] 像疱疹病毒科的其他成员一样,EBV含有约192千碱基的双链DNA基因组,其编码约85个基因。EBV基因组被包裹在由病毒外壳包围的蛋白核衣壳中。外包膜层包含脂质和表面糖蛋白,其被认为参与将病毒靶向至其主要宿主细胞、B淋巴细胞和上皮细胞。

[0007] EBV病毒复制周期被良好表征。在初始感染宿主细胞后,EBV进入活跃产生感染性病毒粒子的阶段,称为裂解复制阶段(或裂解阶段)。在裂解阶段期间,EBV基因表达的特征在于表达一种或多种裂解基因产物,包括ZEBRA、BRLF1、BNLF2、BCRF1和病毒衣壳抗原(VCA);以及包膜糖蛋白,诸如gp350和gp110。

[0008] 在裂解复制的时段后,EBV进入持续性病毒感染的状态,而没有活跃的病毒产生,称为潜伏期(或潜伏阶段)。潜伏EBV感染伴随着特征性基因表达程序,包括一种或多种潜伏基因产物(诸如EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C、EBNA前导蛋白(EBNA-LP)、LMP1和/或LMP2)的表达。潜伏感染的细胞可以通过尚未理解的触发因素重新活化至裂解病毒产生。

[0009] 已经在动物模型和人试验中评估了许多EBV候选疫苗。大多数预防性疫苗候选物已经聚焦于主要的EBV包膜糖蛋白gp350作为免疫原。Gu等人报道,表达EBV gp350的重组活牛痘病毒在儿童中引发EBV中和抗体和适度的保护,但在成人中却没有。Gu等人,

Dev.Biol.Stand.1995;84:171-177。发现重组gp350疫苗不针对EBV感染进行保护,但减少感染性单核细胞增多症的发生。Sokal等人,J.Infect.Dis.2007;196(12):1749-1753。

[0010] 治疗性EBV疫苗候选物已经主要靶向EBV核抗原-1(EBNA1)和LMP2的T-细胞表位。例如,Taylor等人已经描述了修饰的牛痘病毒安卡拉(MVA)载体,其表达与全长LMP2蛋白融合的EBNA1的肽片段。据报道,在早期的临床试验中,所谓的MVA-EL疫苗诱导抗原特异性CD4+和CD8+T细胞应答。Taylor等人,J.Virol.Jan.2004,p.768-778。类似地,据报道,表达全长LMP2蛋白的重组人腺病毒载体在体外和小鼠中诱导抗原特异性T-细胞应答。Pan等人,Biochem Biophys Res Commun.2006Sep 1;347(3):551-7。

[0011] 尽管在本领域中有明确的需求,但尚未批准EBV疫苗用于人类中。因此,仍然需要用于预防EBV感染以及治疗EBV-相关的恶性肿瘤和EBV-相关的疾病、诸如多发性硬化症的EBV疫苗。

发明内容

本发明人提供了可用作用于在受试者中诱导针对爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)感染的免疫应答的免疫原性组合物的组分的EBV抗原多肽、多核苷酸和载体;其用于预防和治疗EBV感染和EBV-相关疾病的方法;及其制备方法。

[0013] 提供了编码EBV抗原多肽的多核苷酸,所述EBV抗原多肽包含:

(a)至少一个SEQ ID NO:1的至少8个氨基酸的片段,

(b)至少一个SEQ ID NO:6的至少8个氨基酸的片段,

(c)至少一个SEQ ID NO:11的至少8个氨基酸的片段,和

(d)至少一个SEQ ID NO:13的至少8个氨基酸的片段;

其中所述多核苷酸可操作连接至一个或多个指导所述多肽在宿主细胞中的表达的序列。在一些实施方案中,所述多肽进一步包含至少一个SEQ ID NO:21的至少8个氨基酸的片段。

[0014] 还提供了编码EBV抗原多肽的多核苷酸,所述EBV抗原多肽包含:

(a)至少两个SEQ ID NO:1的至少8个氨基酸的LMP1片段,其中所述LMP1片段彼此不相邻,

(b)至少两个SEQ ID NO:6的至少8个氨基酸的LMP2片段,其中所述LMP2片段彼此不相邻,

(c)至少两个SEQ ID NO:11的至少8个氨基酸的EBNA1片段,其中所述EBNA1片段彼此不相邻,

(d)至少两个SEQ ID NO:13的至少8个氨基酸的EBNA3A片段,其中所述EBNA3A片段彼此不相邻,和/或

(e)至少两个SEQ ID NO:21的至少8个氨基酸的ZEBRA片段,其中所述ZEBRA片段彼此不相邻;

其中所述多核苷酸可操作连接至一个或多个指导所述多肽在宿主细胞中的表达的序列。

[0015] 还提供了如上所述的多核苷酸,其中所述EBV抗原多肽包含:

(a)由SEQ ID NO:2组成的LMP1的第一片段,

(b)由SEQ ID NO:3组成的LMP1的第二片段,

(c)由SEQ ID NO:4组成的LMP1的第三片段,

(d)由SEQ ID NO:5组成的LMP1的第四片段,

(e)由SEQ ID NO:7组成的LMP2的第一片段,

(f)由SEQ ID NO:8组成的LMP2的第二片段,

(g)由SEQ ID NO:9组成的LMP2的第三片段,

(h)由SEQ ID NO:10组成的LMP2的第四片段,

(i)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的第一片段,

(j)由SEQ ID NO:14组成的EBNA3A的第一片段,

(k)由SEQ ID NO:15组成的EBNA3A的第二片段,

(l)由SEQ ID NO:16组成的EBNA3A的第三片段,

(m)由SEQ ID NO:17组成的EBNA3A的第四片段,

(n)由SEQ ID NO:18组成的EBNA3A的第五片段,

(o)由SEQ ID NO:19组成的EBNA3A的第六片段,和

(p)由SEQ ID NO:20组成的EBNA3A的第七片段;

其中第一、第二、第三和第四LMP1片段彼此不相邻;第一、第二、第三和第四LMP2片段彼此不相邻;且第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七EBNA3A片段彼此不相邻。任选地,所述多肽进一步包含:(a)由SEQ ID NO:22组成的ZEBRA的第一片段,和(b)由SEQ ID NO:23组成的ZEBRA的第二片段;其中第一和第二ZEBRA片段彼此不相邻。

[0016] 还提供了如上所述的多核苷酸,其中所述EBV抗原多肽与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性。

[0017] 还提供了包含如本文所述的多核苷酸的载体,包括,例如,腺病毒载体(例如,非人猿猴腺病毒载体)和牛痘病毒载体(例如,修饰的牛痘安卡拉(MVA)载体)。

[0018] 还提供了由如本文所述的多核苷酸和载体编码的EBV抗原多肽,诸如与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性的多肽。

[0019] 还提供了组合物,其包含本文所述的多核苷酸、载体和多肽;和药学上可接受的赋形剂。此类组合物任选地包含一种或多种佐剂。

[0020] 还提供了如本文所述的多核苷酸、载体、多肽和组合物在制备用于治疗或预防由爱泼斯坦-巴尔病毒感染引起的疾病的药物中的用途。

[0021] 还描述了诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括将如本文所述的多核苷酸、载体、多肽和组合物施用于所述受试者。

[0022] 还提供了治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法,其包括将如本文所述的多核苷酸、载体、多肽和组合物施用于所述受试者。EBV相关的疾病包括,例如,EBV-相关的疾病(例如,多发性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮)。

[0023] 还提供了如本文所述的多核苷酸、载体、多肽和组合物,其用于治疗或预防由爱泼斯坦-巴尔病毒感染引起的疾病。

[0024] 还提供了诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括:

(a)施用包含编码如本文所述的EBV抗原多肽的多核苷酸的腺病毒,和

(b)施用包含编码如本文所述的EBV抗原多肽的多核苷酸的牛痘病毒;

其中步骤(a)和(b)以任一顺序进行。

[0025] 还提供了治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法,其包括:

(a)施用包含编码如本文所述的EBV抗原多肽的多核苷酸的腺病毒,和

(b)施用包含编码如本文所述的EBV抗原多肽的多核苷酸的牛痘病毒;

其中步骤(a)和(b)以任一顺序进行。

附图说明

图1:EBV潜伏蛋白(LMP1、LMP2、EBNA1和EBNA3A)和裂解蛋白(ZEBRA)的示意图。编号区域表指示用于构建多价EBV抗原多肽的免疫原性片段。字母数字标识符(例如,a1、a2、b1、b2)对应于图2A-B中显示的多价构建体中代表的片段。

[0027] 图2A-B:多价EBV抗原构建体的示意图。A)EBV潜伏抗原构建体(EBV-L),其包含衍生自LMP1(标识为a1至a4)、LMP2(标识为b1至b4)、EBNA1(标识为c1)和EBNA3A(标识为d1至d7)的免疫原性片段。B)EBV潜伏+裂解抗原构建体(EBV-LLy),其包含衍生自LMP1、LMP2、EBNA1、EBNA3A(都在图2A中标识)和ZEBRA(标识为e1至e2)的免疫原性片段。具有相同字母前缀(即a、b、c、d、e)的多价抗原区域衍生自相同的EBV蛋白。

[0028] 图3:CalHV3潜伏蛋白(C1、C7和ORF39)和裂解蛋白(ORF43)的示意图。编号区域表指示用于构建多价CalHV3抗原多肽的免疫原性片段。字母数字标识符(例如,a1、a2、b1、b2)对应于图4A-C中显示的多价构建体中代表的片段。选择C1、C7、ORF39和ORF43抗原,因为它们分别是EBV蛋白LMP1、LMP2、EBNA1和ZEBRA的假定狨猴(普通狨(Callithrix jacchus))疱疹病毒直系同源物。

[0029] 图4A-C:多价CalHV3抗原构建体的示意图。A)CalHV3潜伏抗原构建体(CalHV3-L),其包含衍生自C1、C7和ORF39的免疫原性片段。B)CalHV3潜伏+裂解抗原构建体(CalHV3-LLy),其包含衍生自C1、C7、ORF39和ORF43的免疫原性片段。C)来自(B)的CalHV3-LLy构建体,其与狨猴MHC II类相关的恒定链(Ii)融合。具有相同字母前缀(即a、b、c、d)的多价抗原区域衍生自相同的CalHV3蛋白。

[0030] 图5A:用编码EBV抗原构建体的腺病毒载体以10^6、10^7和10^8个病毒颗粒(vp)的剂量免疫的小鼠中的T-细胞应答。ChAd155-EBV-L和ChAd155-EBV-LLy以剂量依赖性方式引发来自脾细胞的干扰素γ(IFNγ)分泌。在EBV-L和EBV-LLy免疫小鼠中,对于每种EBV潜伏抗原均观察到响应于用覆盖LMP1、LMP2、EBNA1和EBNA3A的肽合并物的刺激的T-细胞活化。仅在EBV-LLy免疫的小鼠中检测到对EBV裂解蛋白ZEBRA的T-细胞应答。没有检测到对EBV接合肽(Ej)或用作阴性对照的DMSO(二甲基亚砜)(肽合并物稀释液)的应答。

[0031] 图5B:用编码CalHV3抗原构建体的腺病毒载体以10^6、10^7和10^8vp的剂量免疫的小鼠中的T-细胞应答。ChAd155-CalHV3-L和ChAd155-CalHV3-LLy以剂量依赖性方式引发来自脾细胞的IFNγ分泌。在CalHV3-L和CalHV3-LLy免疫的小鼠中均检测到对覆盖CalHV3潜伏抗原C1、C7和ORF39的肽合并物的T-细胞应答。然而,仅在CalHV3-LLy免疫的小鼠中检测到对CalHV3裂解蛋白ORF43的T-细胞应答。没有检测到对CalHV3接合肽(Cj)或阴性对照DMSO的应答。

[0032] 图6A-B:引发-加强给药对小鼠中的EBV-LLy免疫原性的影响。与未加强的小鼠或接受编码EBV-无关的抗原的MVA载体的“加强”注射的小鼠相比,在第0天用ChAd155-EBV-

LLy免疫、随后在第21天(第3周)用MVA-EBV-LLy加强免疫产生EBV-特异性干扰素γ释放的显著增加。图6A呈现对所有抗原(LMP1、LMP2、EBNA1、EBNA3A和ZEBRA)的累积T-细胞应答,且图6B显示对单独抗原和阴性对照DMSO的应答。

[0033] 图7:引发-加强给药对小鼠中的CalHV3-LLy免疫原性的影响。与未加强的小鼠或接受编码CalHV3-无关的抗原的MVA载体的"加强"注射的小鼠相比,在第0天用ChAd155-CalHV3-LLy免疫("引发")、随后在第42天(第6周)用相同的抗原构建体(ChAd155-CalHV3-LLy)或MVA-CalHV3-LLy加强免疫产生在第7周测量的CalHV3-特异性IFNγ释放的显著增加。

[0034] 图8:用恒定链-CalHV3-LLy融合蛋白(ChAd155-Ii-CalHV3-LLy)免疫后两周小鼠中的累积T-细胞应答。在较低剂量的抗原($5x10^6$vp)下,与ChAd155-CalHV3-LLy相比,ChAd155-Ii-CalHV3-LLy引发显著更大的IFNγ释放和更高比例(100%)的应答小鼠。在测试的较高抗原剂量($5x10^7$vp)下未观察到差异。

[0035] 图9:CalHV3-感染的狨猴中累积的T-细胞应答。在免疫前(w0),动物表现出基线CalHV3-特异性T-细胞应答,与动物是病毒携带者的事实一致。ChAd155-CalHV3-LLy免疫后三周(w3 pp),CalHV3-免疫的动物表现出预先存在的CalHV3-特异性T-细胞应答的显著扩增。用MVA-CalHV3-LLy加强后1周(w1 pb),T-细胞应答继续升高高于基线,并且在加强后7周,在收缩后,T-细胞应答仍然高于基线。

[0036] 图10:确定图9中显示的对hAd155-CalHV3-LLy的增强的累积T-细胞应答是多特异性的,即针对CalHV3-LLy抗原C1、C7、ORF39和ORF 43。

[0037] 图11:对应于由ChAd155和MVA潜伏+裂解EBV疫苗编码的抗原的EBV肽合并物引发来自人健康供体的PBMC中的IFNγ释放。

[0038] 序列描述

SEQ ID NO:1 EBV LMP1蛋白(Genbank No.P03230)
SEQ ID NO:2 EBV LMP1蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:3 EBV LMP1蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:4 EBV LMP1蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:5 EBV LMP1蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:6 EBV LMP2蛋白(Genbank No.P13285)
SEQ ID NO:7 EBV LMP2蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:8 EBV LMP2蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:9 EBV LMP2蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:10 EBV LMP2蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:11 EBV EBNA1蛋白(Genbank No.P03211)
SEQ ID NO:12 EBV EBNA1蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:13 EBV EBNA3A蛋白(Genbank No.YP401669)
SEQ ID NO:14 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:15 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:16 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段
SEQ ID NO:17 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:18 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:19 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:20 EBV EBNA3A蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:21 EBV ZEBRA蛋白(Genbank No.P03206)

SEQ ID NO:22 EBV ZEBRA蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:23 EBV ZEBRA蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:24 EBV-L抗原多肽

SEQ ID NO:25 编码EBV-L抗原多肽的DNA

SEQ ID NO:26 EBV-LLy抗原多肽

SEQ ID NO:27 编码EBV-LLy抗原多肽的DNA

SEQ ID)NO:28 CalHV3 C1蛋白(Genbank No.NP_733852)

SEQ ID NO:29 CalHV3 C1蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:30 CalHV3 C1蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:31 CalHV3 C1蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:32 CalHV3 C7蛋白(Genbank No.NP_733851)

SEQ ID NO:33 CalHV3 C7蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:34 CalHV3 C7蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:35 CalHV3 C7蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:36 CalHV3 ORF39(Genbank No.NP_733892)

SEQ ID NO:37 CalHV3 ORF39的免疫原性片段

SEQ ID NO:38 CalHV3 ORF39的免疫原性片段

SEQ ID NO:39 CalHV3 ORF39的免疫原性片段

SEQ ID NO:40 CalHv3 ORF43蛋白(Genbank No.NP_733896)

SEQ ID NO:41 CalHv3 ORF43蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:42 CalHv3 ORF43蛋白的免疫原性片段

SEQ ID NO:43 狨猴恒定链多肽

SEQ ID NO:44 CalHv3_L抗原多肽

SEQ ID NO:45 编码CalHV3_L抗原多肽的DNA

SEQ ID NO:46 CalHV3_LLy抗原多肽

SEQ ID NO:47 编码CalHV3_LLy抗原多肽的DNA

SEQ ID NO:48 Ii_CalHV3_LLy抗原多肽

SEQ ID NO:49 编码Ii_CalHV3_LLy抗原多肽的DNA

SEQ ID NO:50 pChAd155(ΔE1,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-EBV-L表达载体

SEQ ID NO:51 pChAd155(ΔE1,ΔE3,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-EBV-LLy表达载体

SEQ ID NO:52 pChAd155(ΔE1,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-CalHV3-L表达载体

SEQ ID NO:53 pChAd155(ΔE1,ΔE3,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-CalHV3-LLy表达载体

SEQ ID NO:54 pChAd155(ΔE1,ΔE3,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-mIi-CalHV3-

LLy表达载体

发明详述

爱泼斯坦-巴尔病毒抗原多肽

本发明的EBV抗原多肽包括包含一种或多种EBV潜伏和/或裂解蛋白的免疫原性片段的多肽。EBV潜伏蛋白包括,例如,潜伏膜蛋白(LMP1和LMP2);和EBV核抗原(EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B和EBNA3C)。EBV裂解蛋白包括,例如,ZEBRA(由BZLF1基因编码)。

[0039] 如本文所用的EBV蛋白的"免疫原性片段"意指小于全长EBV蛋白的片段,其能够诱导免疫应答,例如体液(例如,抗体)和/或细胞-介导的(例如,细胞毒性T细胞)应答。免疫原性片段包括全长蛋白的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90和至少100个氨基酸的片段。在一些实施方案中,免疫原性片段由全长蛋白的约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90和约100个氨基酸组成。本发明的一个方面是提供能够诱导针对携带潜伏EBV感染的B-细胞的T-细胞应答的EBV抗原多肽。因此,在一些实施方案中,EBV蛋白的免疫原性片段包含能够诱导抗原-特异性T-细胞应答的一个或多个T-细胞表位。

[0040] 免疫原性片段相对于衍生所述片段的全长蛋白可以具有一个或多个取代、缺失或插入。因此,免疫原性片段包括与全长蛋白的相应区域具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的片段。

[0041] 在一个实施方案中,本发明的EBV抗原多肽包含潜伏膜蛋白1(LMP1)抗原。LMP1是在EBV病毒生命周期的潜伏期期间表达的386个氨基酸的蛋白。适用于本发明的EBV抗原多肽中的LMP1的免疫原性片段包括SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90和至少100个氨基酸的片段。在一些实施方案中,LMP1的免疫原性片段由SEQ ID NO:1的约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90和约100个氨基酸组成。在一些实施方案中,LMP1的免疫原性片段包括与SEQ ID NO:1的相应区域具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的片段。

[0042] 在一些实施方案中,LMP1的免疫原性片段包含一个或多个T-细胞表位。在优选实施方案中,LMP1的免疫原性表位包括,但不限于,SEQ ID No:2-5和与SEQ ID No:2-5具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的片段。

[0043] 在一个实施方案中,本发明的EBV抗原多肽包含潜伏膜蛋白2(LMP2)抗原。LMP2是在EBV病毒生命周期的潜伏期期间表达的497个氨基酸的蛋白。适用于本发明的EBV抗原多肽中的LMP2的免疫原性片段包括SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90和至少100个氨基酸的片段。在一些实施方案中,LMP2的免疫原性片段由SEQ ID NO:6的约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90和约100个氨基酸组成。在一些实施方案中,LMP2的免疫原性片段包括与SEQ ID NO:6的相应区域具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的片段。

[0044] 在一些实施方案中,LMP2的免疫原性片段包含一个或多个T-细胞表位。在优选实施方案中,LMP2的免疫原性表位包括,但不限于,SEQ ID No:7-10和与SEQ ID No:7-10具有

至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0045] 在一个实施方案中,本发明的EBV抗原多肽包含爱泼斯坦-巴尔核抗原1(EBNA1)抗原。EBNA1是在EBV病毒生命周期的潜伏期期间表达的641个氨基酸的蛋白。适用于本发明的EBV抗原多肽中的EBNA1的免疫原性片段包括SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90和至少100个氨基酸的片段。在一些实施方案中,EBNA1的免疫原性片段由SEQ ID NO:11的约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90和约100个氨基酸组成。在一些实施方案中,EBNA1的免疫原性片段包括与SEQ ID NO:11的相应区域具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0046] 在一些实施方案中,EBNA1的免疫原性片段包含一个或多个T-细胞表位。在优选实施方案中,EBNA1的免疫原性表位包括,但不限于,SEQ ID No:12和与SEQ ID No:12具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0047] 在一个实施方案中,本发明的EBV抗原多肽包含爱泼斯坦-巴尔核抗原3A(EBNA3A)抗原。EBNA3A是在EBV病毒生命周期的潜伏期期间表达的944个氨基酸的蛋白。适用于本发明的EBV抗原多肽中的EBNA3A的免疫原性片段包括SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90和至少100个氨基酸的片段。在一些实施方案中,EBNA3A的免疫原性片段由SEQ ID NO:13的约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90和约100个氨基酸组成。在一些实施方案中,EBNA3A的免疫原性片段包括与SEQ ID NO:13的相应区域具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0048] 在一些实施方案中,EBNA3A的免疫原性片段包含一个或多个T-细胞表位。在优选实施方案中,EBNA3A的免疫原性表位包括,但不限于,SEQ ID No:14-20和与SEQ ID No:14-20具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0049] 在一个实施方案中,本发明的EBV抗原多肽包含ZEBRA抗原。ZEBRA是在EBV病毒生命周期的裂解期期间表达的245个氨基酸的蛋白。适用于本发明的EBV抗原多肽中的ZEBRA的免疫原性片段包括SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90和至少100个氨基酸的片段。在一些实施方案中,ZEBRA的免疫原性片段由SEQ ID NO:21的约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90和约100个氨基酸组成。在一些实施方案中,ZEBRA的免疫原性片段包括与SEQ ID NO:21的相应区域具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0050] 在一些实施方案中,ZEBRA的免疫原性片段包含一个或多个T-细胞表位。在优选实施方案中,ZEBRA的免疫原性表位包括,但不限于,SEQ ID No:22-23和与SEQ ID No:22-23具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性的片段。

[0051] 在一些实施方案中,EBV抗原多肽是多价EBV抗原多肽。“多价”意指包含两种、三种、四种、五种或更多种EBV蛋白的免疫原性片段的多肽。“片段”意指全长蛋白的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0052] 因此,在一个实施方案中,提供了多肽,其包含:

(a)至少一个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少一个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少一个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,和

(d)至少一个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0053] 任选地,所述多肽进一步包含至少一个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0054] 在一些实施方案中,多价EBV抗原多肽包含一种或多种EBV蛋白的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个片段。因此,在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽:

(a)至少两个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少两个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少两个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少两个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少两个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0055] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽:

(a)至少三个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少三个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少

14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少三个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少三个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少三个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0056] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽：

(a)至少四个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(b)至少四个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少四个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少四个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少四个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0057] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽：

(a)至少五个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(b)至少五个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少五个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少五个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个

氨基酸的片段,或

(e)至少五个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0058] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽:

(a)至少六个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少六个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少六个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少六个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少六个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0059] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽:

(a)至少七个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少七个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少七个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少七个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少七个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0060] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽:

(a)至少八个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个

氨基酸的片段，

(b)至少八个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少八个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少八个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少八个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0061] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽：

(a)至少九个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(b)至少九个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少九个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少九个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少九个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0062] 在一个实施方案中,多价EBV抗原是包含以下的多肽：

(a)至少十个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(b)至少十个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少十个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少十个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少十个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

[0063] 在一些实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含至少两个衍生自相同EBV蛋白的免疫原性片段,其中所述至少两个免疫原性片段在所述多价EBV抗原多肽中彼此不相邻。"不相邻"意指至少两个免疫原性片段在所述EBV抗原多肽中不形成连续氨基酸序列。不相邻的免疫原性片段彼此分开至少一个、两个、三个、四个、五个、十个或更多个氨基酸,所述氨基酸不与所述免疫原性片段来自相同的EBV蛋白。

[0064] 例如,在一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个LMP1(SEQ ID NO:1)的片段,其中LMP1的片段彼此不相邻。

[0065] 在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个LMP2(SEQ ID NO:6)的片段,其中LMP2的片段彼此不相邻。

[0066] 在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个EBNA1(SEQ ID NO:11)的片段,其中EBNA1的片段彼此不相邻。

[0067] 在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个EBNA3A(SEQ ID NO:13)的片段,其中EBNA3A的片段彼此不相邻。

[0068] 在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个ZEBRA(SEQ ID NO:21)的片段,其中ZEBRA的片段彼此不相邻。

[0069] 在一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含:

(a)LMP1的第一和第二片段,其中所述LMP1的第一和第二片段选自SEQ ID NO:2-5,且其中所述LMP1的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻,

(b)LMP2的第一和第二片段,其中所述LMP1的第一和第二片段选自SEQ ID NO:7-10,且其中所述LMP2的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻,

(c)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的片段,和

(d)EBNA3A的第一和第二片段,其中所述EBNA3A的第一和第二片段选自SEQ ID NO:14-20,且其中所述EBNA3A的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻。

[0070] 任选地,所述多价EBV抗原进一步包含:

(a)由SEQ ID NO:22组成的ZEBRA的第一片段,和

(b)由SEQ ID NO:23组成的ZEBRA的第二片段;

其中所述第一和第二ZEBRA片段彼此不相邻。

[0071] 在一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽包含:

(a)由SEQ ID NO:2组成的LMP1的第一片段,

(b)由SEQ ID NO:3组成的LMP1的第二片段,

(c)由SEQ ID NO:4组成的LMP1的第三片段,

(d)由SEQ ID NO:5组成的LMP1的第四片段,

(e)由SEQ ID NO:7组成的LMP2的第一片段,

(f)由SEQ ID NO:8组成的LMP2的第二片段,

(g)由SEQ ID NO:9组成的LMP2的第三片段,

(h)由SEQ ID NO:10组成的LMP2的第四片段,

(i)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的第一片段,

(j)由SEQ ID NO:14组成的EBNA3A的第一片段,

(k)由SEQ ID NO:15组成的EBNA3A的第二片段,

(l)由SEQ ID NO:16组成的EBNA3A的第三片段,

(m)由SEQ ID NO:17组成的EBNA3A的第四片段,

(n)由SEQ ID NO:18组成的EBNA3A的第五片段,

(o)由SEQ ID NO:19组成的EBNA3A的第六片段,和

(p)由SEQ ID NO:20组成的EBNA3A的第七片段;

其中第一、第二、第三和第四LMP1片段彼此不相邻;第一、第二、第三和第四LMP2片段彼此不相邻;且第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七EBNA3A片段彼此不相邻。任选地,所述多价EBV抗原进一步包含:

(a)由SEQ ID NO:22组成的ZEBRA的第一片段,和

(b)由SEQ ID NO:23组成的ZEBRA的第二片段;

其中所述第一和第二ZEBRA片段彼此不相邻。

[0072] 为了便于清楚地描述本文所述的多肽和多核苷酸,特定的序列组分被称为“第一”多肽或多核苷酸序列、“第二”多肽或多核苷酸序列等。应理解,第一、第二等序列可以以任何期望的顺序或取向出现,并且词语“第一”、“第二”等并不意指特定的顺序或取向。

[0073] 在一些实施方案中,所述多价EBV抗原不含定位至人(即自身)蛋白的接合新表位。免疫原性接合新表位是引发对两个异源蛋白序列的接合处的免疫应答的表位,其中所述表位不存在于异源蛋白序列本身中的任一种中。可以使用本领域中已知的方法,例如,使用覆盖待使用的所有接合处的肽合并物的免疫测定法,鉴定对接合新表位的T细胞应答,如实施例4中所述。

[0074] 在一个实施方案中,所述多价EBV抗原是图2A中举例说明的“EBV-L”构建体。在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽是与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的多肽。

[0075] 在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原是图2B中举例说明的“EBV-LLy”构建体。在另一个实施方案中,所述多价EBV抗原多肽是与SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的多肽。

[0076] 在优选实施方案中,与野生型EBV蛋白相比,本发明的EBV抗原多肽包含至少一个氨基酸插入、缺失和/或取代。

[0077] 在另一个实施方案中,所述EBV抗原多肽是由本文所述的多核苷酸编码的多肽。

[0078] 多核苷酸还提供了编码本文所述的EBV抗原多肽的多核苷酸和表达盒。“表达盒”意指选择的异源基因(编码EBV抗原多肽的“转基因”)和驱动基因产物在宿主细胞中翻译、转录和/或表达所必需的其他调节元件的组合。

[0079] 本发明提供了编码本发明的EBV抗原多肽的多核苷酸。

[0080] 在一个实施方案中,提供了多核苷酸,其编码与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的多肽。在一个实施方案中,所述多核苷酸与SEQ ID NO:25具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性。

[0081] 在一个实施方案中,提供了多核苷酸,其编码与SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的多肽。在一个实施方案中,所述多核苷酸与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性。

[0082] 合适地,本发明的多核苷酸是重组的。重组意味着,所述多核苷酸是克隆、限制、重组或连接步骤或其他程序中的至少一个的产物,所述其他程序产生不同于在自然界中发现的多核苷酸的多核苷酸。重组病毒是包含重组多核苷酸的病毒。重组载体是包含重组多核苷酸的载体。重组病毒包括原始重组病毒的后代。“重组载体”包括原始重组载体的复制品。“重组多核苷酸”包括原始重组多核苷酸的复制品。与野生型EBV基因组相比,本发明的重组多核苷酸包含至少一个核酸取代。

[0083] 在一些实施方案中,本发明的编码EBV抗原的多核苷酸以允许其在用所述多核苷酸转染或感染的细胞中的转录、翻译和/或表达的方式可操作连接至一个或多个控制元件。如本文所用,“可操作连接的”序列包括与目标基因邻接的表达控制序列和以反式或在一定距离处起作用以控制目标基因的表达控制序列两者。因此,在一个实施方案中,多核苷酸可操作连接至一个或多个指导所述多肽在宿主细胞中的表达的序列。在一些实施方案中,所述表达控制序列与编码EBV抗原的多核苷酸异源。

[0084] 表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号诸如剪接和聚腺苷酸化(聚腺苷酸)信号,包括兔β-珠蛋白聚腺苷酸;稳定胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(例如,Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;和当期望时,增强编码的产物的分泌的序列。在其他序列中,可以使用嵌合的内含子。

[0085] “启动子”是允许RNA聚合酶的结合并指导基因的转录的核苷酸序列。通常,启动子位于基因的5′非编码区,在所述基因的转录起始位点的近侧。在转录的起始中发挥功能的启动子内的序列元件经常特征在于共有核苷酸序列。启动子的实例包括、但不限于来自细菌、酵母、植物、病毒和哺乳动物(包括人类)的启动子。大量表达控制序列(包括内部的、异源的、天然的、组成性的、可诱导的和/或组织特异性的启动子)是本领域中已知的且可以利用。

[0086] 在一个实施方案中,所述多核苷酸可操作连接至异源表达控制序列,诸如启动子。通常,“异源”是指源自与进行对比的其他实体在基因型上不同的实体。异源核酸序列是指并非分离自、源自或基于腺病毒载体的天然存在的核酸序列的任何核酸序列。

[0087] 组成型启动子的实例包括但不限于,TBG启动子、逆转录病毒劳斯肉瘤病毒LTR启动子(任选地与增强子一起)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地与CMV增强子一起,参见,例如,Boshart等人,Cell,41:521-530(1985))、CASI启动子(WO2012/115980)、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、p-肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1a启动子

(Invitrogen)。

[0088] 诱导型启动子允许基因表达的调节,且可以通过外源地提供的化合物、环境因素诸如温度或特定生理学状态(例如,急性期)的存在、细胞的特定分化状态或仅在复制中的细胞中被调节。诱导型启动子和诱导型系统可得自多种商业来源,包括、但不限于,Invitrogen、Clontech和Ariad。许多其他系统已经被描述,且可以由本领域技术人员容易地选择。例如,诱导型启动子包括锌-诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子和地塞米松(Dex)-诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子。其他诱导型系统包括T7聚合酶启动子系统;蜕皮激素昆虫启动子,四环素可抑制的系统,和四环素-诱导型系统。其他系统包括FK506二聚体、VP16或p65(使用甘珀二醇(castradiol)、联苯酚米乐甾酮(diphenol murislerone))、RU486-诱导型系统和雷帕霉素-诱导型系统。一些诱导型启动子的有效性随时间增加。在此类情况下,可以通过插入多个串联阻遏物(例如,通过IRES与TetR连接的TetR)增强此类系统的有效性。

[0089] 在另一个实施方案中,可以使用天然EBV启动子。当期望转基因的表达应当模拟天然表达时,所述天然启动子可以是优选的。当转基因的表达必须在时间上或在发育上调节或以组织特异性的方式调节或响应于特定转录刺激而调节时,可以使用所述天然启动子。在一个进一步实施方案中,其他天然表达控制元件(诸如增强子元件、聚腺苷酸化位点或Kozak共有序列)也可以用于模拟天然表达。

[0090] 可以将转基因可操作连接至组织特异性的启动子。例如,如果在骨骼肌中的表达是期望的,则应当使用在肌肉中有活性的启动子。这些包括来自编码骨骼β-肌动蛋白、肌球蛋白轻链2A、肌养蛋白、肌肉肌酸激酶的基因的启动子,以及具有高于天然存在的启动子的活性的合成肌肉启动子。组织特异性的启动子的实例已知针对肝的;乙型肝炎病毒核心;甲胎蛋白,骨骨钙素;骨唾液蛋白、淋巴细胞;免疫球蛋白重链;T细胞受体链),神经元启动子,诸如神经元特异性的烯醇化酶(NSE)启动子,神经丝轻链基因和神经元特异性的vgf基因,以及其他。

[0091] 载体

还提供了含有编码如本文所述的EBV抗原构建体的多核苷酸的载体。此类载体将适用于递送至宿主细胞并在宿主细胞中表达。载体可以呈复制型载体或复制缺陷载体(诸如病毒载体)的形式。适用于将免疫原性核酸引入受试者的许多病毒载体是本领域中已知的,并且包括DNA和RNA病毒两者。适用于编码本文所述的EBV抗原的载体的实例包括:腺病毒载体(复制型或复制缺陷),痘病毒载体,包括牛痘病毒载体,诸如修饰的牛痘安卡拉病毒(MVA),NYVAC,禽痘载体,金丝雀痘(ALVAC)和禽痘病毒(FPV),α病毒载体(诸如辛德毕斯病毒,塞姆利基森林病毒(SFV),罗氏河病毒和委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒),嵌合体及其复制子,疱疹病毒载体(例如,巨细胞病毒(CMV)-衍生的载体),沙粒病毒载体,诸如淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)载体,麻疹病毒载体,水疱性口炎病毒载体,假狂犬病毒,腺相关病毒,逆转录病毒,慢病毒,病毒样颗粒和许多其他。

[0092] 在一个实施方案中,所述载体是腺病毒。腺病毒载体的产生和使用是本领域普通技术人员众所周知的。在此处公开的免疫原性组合的背景下,表达疫苗抗原的腺病毒载体的设计、生产和使用的公开内容的实例可见于例如,美国公开申请号2014/0141042(WO 2012/089833);美国专利号8,216,834(WO 2005/071093);美国公开申请号US 2012/

0027788(WO 2010/086189);和美国公开申请号US 2005/0214323。

[0093] 通常,设计腺病毒载体,使得所述表达盒位于这样的核酸分子中:所述核酸分子在选择的腺病毒基因的天然区域中含有其他腺病毒序列。如果期望,可以将表达盒插入现存的基因区域中以破坏该区域的功能。或者,可以将表达盒插入部分地或完全地缺失的腺病毒基因的位点。例如,所述表达盒可以位于使选自E1A、E1B、E2A、E2B、E3和E4的基因组区域的至少一个基因无功能的突变、插入或缺失的位点。术语"使……无功能"意味着,将足够量的基因区域除去或以其他方式破坏,使得所述基因区域不再能够产生基因表达的功能产物。如果期望,可以将整个基因区域除去(和合适地用表达盒替换)。合适地,腺病毒的E1基因被缺失并被由选择的启动子、目标基因的cDNA序列和聚A信号组成的表达盒替换,产生复制缺陷的重组病毒。

[0094] 用于本发明中的腺病毒载体可以源自一定范围的哺乳动物宿主。已经分离超过100种不同的腺病毒血清型,其感染各种哺乳动物物种,其中51种是人来源的。因此,所述腺病毒载体中的一种或多种可以源自人腺病毒。此类人来源的腺病毒的实例是Ad1、Ad2、Ad4、Ad5、Ad6、Ad11、Ad24、Ad26、Ad34、Ad35、Ad48,特别是Ad5、Ad11和Ad35。基于许多生物学、化学、免疫学和结构标准,人和非人腺病毒血清型已被分为六个亚属(A-F)。

[0095] 尽管基于Ad5的载体已广泛用于许多基因疗法试验中,但由于因天然感染在一般群体中存在先前存在的免疫力,所以Ad5和其他人C组腺病毒载体的使用可能存在限制。Ad5和其他人C组成员倾向于是最血清阳性的血清型。由于在治疗期间暴露于载体,可发展对现有载体的免疫力。这些类型的预先存在或发展的对血清阳性载体的免疫力可限制基因疗法或接种疫苗努力的有效性。因此,替代的腺病毒血清型构成了追求能够逃避宿主免疫应答的基因递送系统中非常重要的靶标。

[0096] 替代血清型的一个这种领域是源自非人灵长类动物的那些,特别是分离自黑猩猩、倭黑猩猩和大猩猩的腺病毒。参见美国专利号US 6,083,716,其描述两种黑猩猩腺病毒的基因组。

[0097] 已经显示非人猿猴腺病毒载体与人腺病毒载体一样有效地诱导对转基因产物的强烈免疫应答(Fitzgerald等人(2003)J.Immunol.170:1416;Colloca等人(2012)Science Translational Medicine 4:1-9;Roy等人(2004)Virology 324:361-372;Roy等人(2010)J.of Gene Medicine 13:17-25)。

[0098] 可以从动物的肠系膜淋巴结或粪便分离非人猿猴腺病毒,并且可以在HEK 293细胞中体外复制。尽管有这些相似性,但非人猿猴腺病毒在系统发育和免疫学上与更常见的人血清型(Ad2和Ad5)不同。

[0099] 因此,在一个实施方案中,所述腺病毒载体中的一种或多种可以源自非人灵长类动物腺病毒,例如黑猩猩腺病毒,诸如选自血清型ChAd3、ChAd63、ChAd83、ChAd155、Pan5、Pan6、Pan 7(也称为C7)和Pan9的腺病毒。具体地,所述病毒可以是非人腺病毒,诸如猿猴腺病毒,且特别是黑猩猩腺病毒,诸如ChAd155、Pan 5、6、7或9。此类毒株的实例描述于US 20040241181(WO03/000283)中,并且可得自美国典型培养物保藏中心,10801University Boulevard,Manassas,Va.20110-2209和其他来源。期望的黑猩猩腺病毒毒株包括Pan 5[ATCC VR-591]、Pan 6[ATCC VR-592]和Pan 7[ATCC VR-593]。或者,腺病毒载体可以衍生自源自倭黑猩猩的非人猿猴腺病毒,诸如PanAd1、PanAd2或PanAd3。本文描述的此类载体的

实例可见于例如US 20110217332(WO2005/071093)、US 2012/0027788(WO2010/086189)和WO2016/198621。

[0100] 使用非人猿猴腺病毒被认为优于使用人腺病毒血清型,因为在靶标群体中对腺病毒的预先存在的免疫力低且不常见,特别是缺乏交叉中和抗体。黑猩猩腺病毒与预先存在的中和抗体应答的交叉反应仅存在于2%的靶标群体中,相比之下,在某些候选人腺病毒载体的情况下为35%。Pan 6与Pan 5、7和9的关系不太紧密。

[0101] 本发明的腺病毒可以是复制缺陷的。这意味着与野生型病毒相比,其在非互补细胞中复制的能力降低。这可以通过突变病毒、例如通过缺失参与复制的基因、例如缺失E1a、E1b、E3或E4基因来实现。

[0102] 根据本发明的腺病毒载体可以衍生自包含功能性E1缺失的复制缺陷的腺病毒。因此,由于缺乏表达腺病毒E1a和E1b的能力,根据本发明的腺病毒载体可以是复制缺陷的,即在E1a和E1b中功能性缺失。重组腺病毒还可以承受其他基因中的功能性缺失[参见,例如,US 20040241181(WO 03/000283)],例如,E3或E4基因中的缺失。可以从形成重组病毒的一部分的腺病毒序列中消除腺病毒延迟早期基因E3。E3的功能对于重组腺病毒颗粒的产生不是必需的。因此,为了包装可用于本发明中的重组腺病毒而替换该基因产物的功能是不必要的。在一个具体实施方案中,所述重组腺病毒具有功能缺失的E1和E3基因。此类载体的构建描述于Roy等人,(2004)Human Gene Therapy 15:519-530。

[0103] 也可以构建具有E4基因的功能缺失的重组腺病毒,尽管可能期望保留E4 ORF6功能。根据本发明的腺病毒载体还可以含有延迟的早期基因E2a中的缺失。也可以在腺病毒基因组的晚期基因L1至L5中的任一种中进行缺失。类似地,中间基因IX和IVa中的缺失可能是有用的。

[0104] 可以在其他结构或非结构腺病毒基因中进行其他缺失。上述缺失可以单独使用,即,用于本发明中的腺病毒序列可以仅含有E1的缺失。或者,可以以任何组合使用有效地破坏其生物活性的整个基因或其部分的缺失。例如,在一种示例性载体中,腺病毒序列可以具有E1基因和E4基因的缺失,或E1、E2a和E3基因的缺失,或E1和E3基因的缺失(诸如E1a和E1b中的功能缺失,和E3的至少一部分的缺失),或E1、E2a和E4基因的缺失,其有或没有E3的缺失等等。此类缺失可以是这些基因的部分或全部缺失,并且可以与其他突变(例诸如温度敏感的突变)组合使用以实现期望的结果。用于本发明中的腺病毒载体包括PanAd3(WO 2010/086189)和ChAd155(WO 2016/198621)。

[0105] 在另一个实施方案中,所述病毒载体是痘病毒载体。在一个具体实施方案中,所述痘病毒载体是牛痘病毒载体,诸如修饰的牛痘安卡拉病毒(MVA)载体。(MVA)载体在人和其他哺乳动物中是复制缺陷的。其最初被开发来通过将牛痘病毒在鸡胚成纤维细胞(CEF)细胞中传代超过570次来提高天花接种疫苗的安全性,导致多次、完全表征的缺失,此后该病毒在人和其他哺乳动物中高度减毒且复制缺陷。复制缺陷发生在病毒粒子组装的晚期,使得病毒和重组基因表达不受损,使MVA成为不能引起哺乳动物中的感染的有效的单轮表达载体。

[0106] MVA随后已被广泛用作病毒载体,以在动物模型和人两者中诱导针对转基因的抗原-特异性免疫力。MVA的描述可见于Mayr A,等人“The smallpox vaccination strain MVA:marker,genetic structure,experience gained with the parenteral

vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism. “Abstammung,Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA.”Zentralbl Bakteriol B.1978 Dec;167(5-6):375-90和Mayr,A.,Hochstein-Mintzel,V.& Stickl,H.(1975).Infection 3,6-14。

[0107] 在一个实施方案中,MVA源自从牛痘病毒在CEF细胞上的第571代获得的病毒种子批次460MG。在一个进一步实施方案中,MVA在1978年12月31日之前衍生或产生,并且没有朊病毒污染。

[0108] MVA载体和产生此类载体的方法描述于例如美国专利号6,761,893(WO02/042480);美国专利号7,964,395;美国专利号7,964,396;美国公开申请号US 2013/0183335(WO2012/048817);和美国公开申请号2015/0209421(WO2014/019718)。前述各自对于合适的MVA载体和方法的教导都通过引用并入本文。

[0109] 在另一个实施方案中,所述病毒载体是α病毒载体,诸如α病毒复制子或其他自复制RNA载体。适用于本文公开的免疫原性组合的上下文中的示例性α病毒载体及其产生和递送方法描述于例如US20090104226(WO2006078294);US20110300205(WO2011005799);US20130195968(WO 2012/006376);US20130177639(WO2012006377);WO2013006838;和WO2013006842,其各自对于其适合于公开的免疫原性组合的上下文中的示例性自复制RNA载体的公开内容并入本文。

[0110] 还提供了产生表达本发明的EBV抗原的重组病毒颗粒的方法,其包括在宿主细胞中表达本文所述的载体。病毒颗粒可以在其中病毒载体能够复制的任何合适的细胞系中产生。

[0111] 腺病毒载体可以在其中病毒能够复制的任何合适的细胞系中产生。具体而言,可以使用互补细胞系,其提供从病毒载体缺失的因子,其导致其复制特性受损(诸如E1和/或E4)。没有限制,这种细胞系可以是HeLa[ATCC登录号CCL 2],A549[ATCC登录号CCL 185],HEK 293,KB[CCL 17],Detroit[例如,Detroit 510,CCL 72]和WI-38[CCL 75]细胞等等。这些细胞系都可得自美国典型培养物保藏中心,10801 University Boulevard,Manassas,Va.20110-2209。其他合适的亲本细胞系可以获得自其他来源,诸如如由在应用微生物学和研究中心(CAMR,UK)的欧洲动物细胞培养物保藏中心(ECACC)以ECACC no.96022940保藏的细胞代表的PER.C6细胞,或Her 96细胞(Crucell)。

[0112] 一种特别合适的互补细胞系是Procell 92细胞系。Procell 92细胞系是基于表达腺病毒E1基因(在人磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子的控制下用Tet阻遏物转染)和G418-抗性基因的HEK 293细胞(Vitelli等人.PLOS One(2013)8(e55435):1-9)。Procell 92.S适用于在悬浮条件中生长,且也可用于生产表达毒性蛋白的腺病毒载体(www.okairos.com/e/inners.phpm=00084,在2015年4月13日最后一次登录)。

[0113] 牛痘载体可以根据本领域中描述的方法产生。例如,MVA载体的制备和使用描述于Ourmanov等人,J.Virol.(2009)83:5388-5400;和Martinon等人Vaccine(2008)26:532-545。

[0114] 组合物

可以将本文描述的EBV抗原多肽、多核苷酸或载体在免疫原性组合物中施用。如本文所述的免疫原性组合物是包含一种或多种重组多肽、多核苷酸和/或载体的组合物,所述

重组多肽、多核苷酸和/或载体能够在递送给哺乳动物(合适地人)后诱导免疫应答,例如体液(例如,抗体)和/或细胞介导的(例如,细胞毒性的T细胞)应答。

[0115] 本文公开的免疫原性组合物通常含有一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂。药学上可接受的载体和赋形剂是众所周知的,并且可以由本领域技术人员选择。形容词“药学上可接受的”表明指示物适用于施用于受试者(例如,人或动物受试者)。Remington's Pharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,第15版(1975)描述了适用于药物递送治疗性和/或预防性组合物的组合物和制剂(包括稀释剂),包括免疫原性组合物。

[0116] 例如,所述载体或赋形剂可以有利地包括缓冲剂。任选地,所述载体或赋形剂也含有至少一种稳定溶解度和/或稳定性的组分。增溶剂/稳定剂的实例包括去污剂,例如月桂肌氨酸和/或tween。替代的增溶剂/稳定剂包括精氨酸和玻璃形成的多元醇(诸如蔗糖、海藻糖等)。许多药学上可接受的载体和/或药学上可接受的赋形剂是本领域中已知的,并且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,第5版(1975)。

[0117] 因此,本领域技术人员可以选择合适的赋形剂和载体以产生适用于通过选择的施用途径递送给受试者的制剂。

[0118] 合适的赋形剂包括,但不限于:甘油、聚乙二醇(PEG)、山梨糖醇、海藻糖、N-月桂酰肌氨酸钠盐、L-脯氨酸、非去污剂磺基甜菜碱、盐酸胍、尿素、三甲胺氧化物、KCl、Ca2+、Mg2+、Mn2+、Zn2+和其他二价阳离子相关的盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇和13-巯基乙醇。其他赋形剂可以是去污剂(包括:Tween80、Tween20、Triton X-00、NP-40、Empigen BB、辛基葡糖苷、月桂酰麦芽糖苷、Zwittergent 3-08、Zwittergent 3-0、Zwittergent 3-2、Zwittergent 3-4、Zwittergent 3-6、CHAPS、脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、十六烷基三甲基溴化铵)。

[0119] 任选地,可以将本发明的免疫原性组合物配制成含有其他组分,包括、例如,佐剂、稳定剂、pH调节剂、防腐剂等。在下面在‘佐剂’下提供了合适的佐剂的实例。

[0120] 使用方法

本文所述的EBV抗原多肽、多核苷酸、载体可用于预防和/或治疗EBV感染和EBV-相关的疾病,例如,作为用于诱导免疫应答的疫苗。如本文所用,免疫应答的诱导是指蛋白诱导针对该蛋白的T细胞和/或体液免疫应答的能力。

[0121] 如本文所用,免疫应答的诱导是指蛋白(也称为“抗原”或“免疫原”)诱导针对该蛋白的T细胞和/或体液免疫应答的能力。例如,免疫原性组合物可以在用该组合物免疫后相对于未治疗的受试者诱导记忆性T和/或B细胞群,特别是在其中该组合物包含编码EBV抗原多肽的序列的核酸的那些实施方案中。在一些实施方案中,所述受试者是脊椎动物,诸如哺乳动物,例如人或兽医哺乳动物。

[0122] 可以通过本领域中已知的方法,包括具体目标淋巴细胞类型(例如,B细胞、T-细胞、T细胞系和T细胞克隆)的增殖或效应子功能的诱导的测定法,来测量免疫应答。

[0123] 因此,在一个实施方案中,提供了诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括将本发明的多核苷酸、多肽、载体或免疫原性组合物施用于所述受试者。在一个实施方案中,所述受试者是爱泼斯坦-巴尔病毒血清阴性的。如果受试者没有过去或当前EBV感染的血清学证

据,则所述受试者是“血清阴性的”。在另一个实施方案中,所述受试者是爱泼斯坦-巴尔病毒血清阳性的。如果受试者具有过去或当前EBV感染的血清学证据,则所述受试者是“血清阳性的”。

[0124] 还提供了治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法,其包括将本发明的多核苷酸、多肽、载体或免疫原性组合物施用于所述受试者。在一个实施方案中,所述EBV-相关的疾病是EBV-相关的恶性肿瘤或EBV-相关的自身免疫性疾病。EBV相关的疾病包括,例如,多发性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

[0125] 还提供了经设计以使本发明的多核苷酸、多肽、载体和免疫原性组合物的免疫原性最大化的给药方案。因此,在一个实施方案中,提供了诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括将两个或更多个剂量的本发明的多核苷酸、多肽、载体和/或免疫原性组合物施用于所述受试者。在某些实施方案中,所述剂量间隔一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多周。在另一个实施方案中,所述剂量间隔一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多个月。或者,剂量可以间隔一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多个年。

[0126] 在一个实施方案中,提供了诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括:

(a)施用包含本发明的多核苷酸的腺病毒载体;和

(b)施用包含本发明的多核苷酸的牛痘病毒载体;

其中步骤(a)和(b)以任一顺序进行。在一个实施方案中,所述腺病毒载体是ChAd155。在另一个实施方案中,所述牛痘病毒载体是MVA。在一个实施方案中,步骤(b)在步骤(a)之后一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多周实施。在一个实施方案中,步骤(b)在步骤(a)之后一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多个月实施。

[0127] 在一个实施方案中,提供了治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法,其包括:

(a)施用包含本发明的多核苷酸的腺病毒载体;和

(b)施用包含本发明的多核苷酸的牛痘病毒载体;

其中步骤(a)和(b)以任一顺序进行。在一个实施方案中,所述腺病毒载体是ChAd155。在另一个实施方案中,所述牛痘病毒载体是MVA。在一个实施方案中,步骤(b)在步骤(a)之后一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多周实施。在一个实施方案中,步骤(b)在步骤(a)之后一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二或更多个月实施。

[0128] 还提供了本发明的多核苷酸、载体、多肽或免疫原性组合物在制备用于治疗或预防由爱泼斯坦-巴尔病毒感染引起的疾病的药物中的用途。

[0129] 佐剂

如本文所用的“佐剂”是指增强对免疫原的免疫应答的组合物。包含佐剂的根据本发明的组合物可以用作疫苗,例如用于人受试者。与施用单独的抗原相比,佐剂加速、延长和/或增强对抗原/免疫原的免疫应答的质量和/或强度,因此减少任何给定疫苗中必需的抗原/免疫原的量,和/或为了生成对目标抗原/免疫原的足够免疫应答所必需的注射频率。

[0130] 可以在本发明的组合物的上下文中使用的佐剂的实例包括无机佐剂(例如无机金属盐,诸如磷酸铝或氢氧化铝),氢氧化铝的凝胶样沉淀(明矾);$AlPO_4$;水凝胶;来自革兰氏阴性细菌的外膜的细菌产物,特别是单磷酰脂质A(MPLA),脂多糖(LPS),胞壁酰二肽及其衍

生物;弗氏不完全佐剂;脂质体,特别是中性脂质体,含有该组合物和任选细胞因子的脂质体;AS01B,AS01E,AS02;非离子嵌段共聚物;ISCOMATRIX佐剂;包含CpG二核苷酸(CpG基序)的未甲基化DNA,特别是具有硫代磷酸酯(PTO)主链的CpG ODN(CpG PTO ODN)或具有磷酸二酯(PO)主链的CpG ODN(CpG PO ODN);合成脂肽衍生物,特别是Pam_3Cys;脂质阿拉伯甘露聚糖;肽聚糖;酵母聚糖;热休克蛋白(HSP),特别是HSP 70;dsRNA及其合成衍生物,特别是聚I:聚C;聚阳离子肽,特别是聚-L-精氨酸;紫杉醇;纤连蛋白;鞭毛蛋白;咪唑喹啉;具有佐剂活性的细胞因子,特别是GM-CSF,白介素-(IL-2、IL-6、IL-7、IL-18、I和II型干扰素,特别是干扰素-γ、TNF-α;25-二羟基维生素D3(骨化三醇);和合成的寡肽,特别是MHCII-呈递的肽。含有聚氧乙烯(POE)和聚氧丙烯(POP)的非离子嵌段聚合物,诸如POE-POP-POE嵌段共聚物,可以用作佐剂。

[0131] 佐剂的额外实例包括无机佐剂(例如无机金属盐诸如磷酸铝或氢氧化铝)、有机佐剂(例如皂苷,诸如QS21或角鲨烯)、基于油的佐剂(例如弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂)、细胞因子(例如IL-1β、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、GM-CFS和INF-γ)、微粒佐剂(例如免疫刺激性复合物(ISCOMS)、脂质体、可生物降解的微球、病毒体、细菌佐剂(例如单磷酰脂质A,诸如3-脱-O-酰化的单磷酰脂质A(3D-MPL)或胞壁酰基肽)、合成的佐剂(例如单磷酰脂质A(MPL),特别是3-脱-O-酰化的单磷酰脂质A(3D-MPL),和胞壁酰基肽类似物或合成的脂质A,和合成的多核苷酸佐剂,例如聚精氨酸或聚赖氨酸。

[0132] 皂苷也是合适的佐剂,例如,皂苷Quil A(源自南美洲皂树Molina的树皮)及其级分。Quil A的纯化级分也被称作免疫刺激剂,诸如角鲨烯、QS21、QS17和QS7(Quil-A的非溶血级分)。QS21和聚山梨酯或环糊精的组合也是合适的。

[0133] 佐剂的另一种实例是含有存在于DNA中的未甲基化的胞嘧啶-鸟苷二核苷酸基序(“CpG”)的免疫刺激性的寡核苷酸。当通过全身和粘膜途径施用时,CpG被称作佐剂。当配制在疫苗中时,其可以与游离抗原一起在游离溶液中施用,或共价地缀合至抗原,或与载体诸如氢氧化铝一起配制。

[0134] 特定受体的活化可以刺激免疫应答。此类受体是技术人员已知的,并且包括例如细胞因子受体,特别是I型细胞因子受体,II型细胞因子受体,TNF受体;和充当转录因子的维生素D受体;和Toll-样受体1(TLR1)、TLR-2、TLR 3、TLR4、TLR5、TLR-6、TLR7和TLR9。此类受体的激动剂具有佐剂活性,即是免疫刺激性的。其他合适的佐剂包括烷基氨基葡糖苷磷酸酯(AGP)或AGP的药学上可接受的盐。一些AGP是TLR4激动剂,且一些是TLR4拮抗剂。本发明的组合物的佐剂可以是一种或多种Toll-样受体激动剂。在一个更优选实施方案中,所述佐剂是Toll-样受体4激动剂。在一个尤其优选的实施方案中,所述佐剂是Toll-样受体9激动剂。

[0135] 佐剂诸如上述的那些可以与载体诸如脂质体、水包油乳剂和/或金属性盐(包括铝盐诸如氢氧化铝)一起配制。例如,可以将3D-MPL与氢氧化铝或水包油乳剂一起配制;可以将QS21与含有胆固醇的脂质体、水包油乳剂或明矾一起配制;可以将CpG与明矾一起或与其他阳离子载体一起配制。

[0136] 可以在本发明中利用佐剂的组合,特别是单磷酰脂质A和皂苷衍生物的组合,更特别是QS21和3D-MPL的组合,或其中将QS21在含有胆固醇的脂质体(DQ)中淬灭的组合物。或者,CpG+皂苷(诸如QS21)的组合是适合用在本发明中的佐剂,如同包含在水包油乳剂中的

QS21、3D-MPL和生育酚的有效佐剂制剂一样。可以将皂苷佐剂配制在脂质体中,并与免疫刺激性的寡核苷酸组合。因而,合适的佐剂系统包括,例如,单磷酰脂质A(优选3D-MPL)与铝盐一起的组合。另一种示例性的佐剂包含QS21和/或MPL和/或CpG。可以将QS21在含有胆固醇的脂质体中淬灭。

[0137] 如果将MHC II类恒定链(也称为CD74)与用于接种疫苗的表达系统所包含的抗原的融合体与病毒载体、例如腺病毒一起施用,则其增加针对所述抗原的免疫应答。因此,在本发明的一个实施方案中,所述免疫原性的转基因可以与重组ChAd155病毒载体中的恒定链一起共表达。

[0138] 在另一个实施方案中,本发明提供了通过将ChAd155衣壳递送给受试者将ChAd155的衣壳(任选地使用完整或重组病毒颗粒或空衣壳)用于诱导免疫调节应答或增强或辅助对另一种活性剂的细胞毒性T细胞应答的用途。可以将ChAd155衣壳单独递送,或在组合方案中与活性剂一起递送以增强对所述活性剂的免疫应答。有利地,在不用腺病毒感染宿主的情况下,可以实现期望的效应。

[0139] 序列同一性

关于序列的同一性在本文中被定义为在比对序列并引入空位(如果必要)以达到最大百分比序列同一性之后,候选序列中与参考氨基酸序列相同的氨基酸残基的百分比,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分。

[0140] 可以通过通常用于比较两个多肽的氨基酸位置的相似性的标准方法来确定序列同一性。使用计算机程序诸如BLAST或FASTA,对两个多肽进行比对以使其各自的氨基酸最佳匹配(沿着一个或两个序列的全长或沿着一个或两个序列的预定部分)。所述程序提供默认开放罚分和默认空位罚分,以及评分矩阵,诸如PAM 250(标准评分矩阵可以与计算机程序结合使用。例如,同一性百分比可以计算为相同匹配的总数乘以100,且然后除以匹配跨度内较长序列的长度与引入较短序列以比对两个序列的空位数目的总和。

[0141] 在本公开通过提及UniProt或Genbank登录号来提及序列时,提及的序列是截至本申请的申请日的当前版本。

[0142] 技术人员将认识到,改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸的对蛋白的单独取代、缺失或添加是这样的“免疫原性的衍生物”:其中所述改变导致在功能上类似的氨基酸对氨基酸的取代或者不会实质上影响免疫原性功能的残基的取代/缺失/添加。

[0143] 提供在功能上类似的氨基酸的保守取代表是本领域中众所周知的。一般而言,此类保守取代将落入下文指定的氨基酸分组之一中,尽管在一些情况下,其他取代是可能的,而不实质上影响所述抗原的免疫原性特性。以下八个组各自含有通常为彼此保守取代的氨基酸:

1)丙氨酸(a)、甘氨酸(G);
2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);
3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);
4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);
5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);
6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);
7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和

8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0144] 合适地,此类取代不发生在表位区域,且因此对所述抗原的免疫原性特性不具有显著影响。

[0145] 免疫原性的衍生物还可以包括与参考序列相比在其中插入额外氨基酸的那些。合适地,此类插入不发生在表位区域中,且因此对所述抗原的免疫原性特性不具有显著影响。插入的一个实例包括辅助目标抗原的表达和/或纯化的组氨酸残基的短段(例如,2-6个残基)。

[0146] 免疫原性的衍生物包括与参考序列相比其中已经缺失氨基酸的那些。合适地,此类缺失不发生在表位区域中,且因此对所述抗原的免疫原性特性不具有显著影响。

[0147] 技术人员将认识到,特定的免疫原性的衍生物可以包含取代、缺失和添加(或它们的任何组合)。

[0148] 通用

除非另有解释,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该/所述”包括复数对象,除非上下文另有清楚指出。类似地,词语“或”意欲包括“和”,除非上下文另有清楚指示。术语“多个/种”是指两个/种或更多个/种。此外,关于物质的浓度或水平给出的数值限值,诸如溶液组分浓度或其比率,和反应条件诸如温度、压力和循环时间,意欲是近似的。本文使用的术语“约”意指量±10%。

[0149] 术语“包含”意指“包括”。因此,除非上下文另有要求,否则词语"包含(comprises)"和变型诸如"包含(comprise)"和"包含(comprising)"将被理解为暗示包括所述化合物或组合物(例如,核酸,多肽,抗原)或步骤,或一组化合物或步骤,但不排除任何其他化合物、组合物、步骤或其组。缩写“例如(e.g.)”衍生自拉丁语例如(exempli gratia),并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”是同义的。

具体实施方式

本发明还涉及以下实施方案:

1.编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:

(a)至少一个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少一个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少一个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,和

(d)至少一个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个

氨基酸的片段;

其中所述多核苷酸可操作连接至一个或多个指导所述多肽在宿主细胞中的表达的序列。

2.实施方案1的多核苷酸,其中所述多肽进一步包含至少一个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

3.实施方案1或2的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少两个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少两个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少两个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少两个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少两个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

4.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少三个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少三个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少三个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少三个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少三个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

5.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少四个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少四个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少四个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少四个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少四个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

6.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少五个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少五个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少五个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少五个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少五个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

7.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少六个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少六个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少六个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少

14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少六个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，或

(e)至少六个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

8.前述实施方案中任一项的多核苷酸，其中所述多肽包含：

(a)至少七个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(b)至少七个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少七个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少七个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，或

(e)至少七个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

9.前述实施方案中任一项的多核苷酸，其中所述多肽包含：

(a)至少八个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(b)至少八个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(c)至少八个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，

(d)至少八个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段，或

(e)至少八个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个

氨基酸的片段。

10.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少九个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少九个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少九个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少九个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少九个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

11.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)至少十个SEQ ID NO:1的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(b)至少十个SEQ ID NO:6的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(c)至少十个SEQ ID NO:11的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,

(d)至少十个SEQ ID NO:13的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段,或

(e)至少十个SEQ ID NO:21的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的片段。

12.实施方案3-11中任一项的多核苷酸,其中SEQ ID NO:1的片段彼此不相邻。

13.实施方案3-12中任一项的多核苷酸,其中SEQ ID NO:6的片段彼此不相邻。

14.实施方案3-13中任一项的多核苷酸,其中SEQ ID NO:11的片段彼此不相邻。

15.实施方案3-14中任一项的多核苷酸,其中SEQ ID NO:13的片段彼此不相邻。

16.实施方案3-15中任一项的多核苷酸,其中SEQ ID NO:21的片段彼此不相邻。

17.实施方案1-16中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)LMP1的第一和第二片段,其中所述LMP1的第一和第二片段选自SEQ ID NO:2-5,且其中所述LMP1的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻,

(b)LMP2的第一和第二片段,其中所述LMP1的第一和第二片段选自SEQ ID NO:7-10,且其中所述LMP2的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻,

(c)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的片段,和

(d)EBNA3A的第一和第二片段,其中所述EBNA3A的第一和第二片段选自SEQ ID NO:14-20,且其中所述EBNA3A的第一和第二片段在所述多肽中彼此不相邻。

18.实施方案1-17中任一项的多核苷酸,其中所述多肽包含:

(a)由SEQ ID NO:2组成的LMP1的第一片段,

(b)由SEQ ID NO:3组成的LMP1的第二片段,

(c)由SEQ ID NO:4组成的LMP1的第三片段,

(d)由SEQ ID NO:5组成的LMP1的第四片段,

(e)由SEQ ID NO:7组成的LMP2的第一片段,

(f)由SEQ ID NO:8组成的LMP2的第二片段,

(g)由SEQ ID NO:9组成的LMP2的第三片段,

(h)由SEQ ID NO:10组成的LMP2的第四片段,

(i)由SEQ ID NO:12组成的EBNA1的第一片段,

(j)由SEQ ID NO:14组成的EBNA3A的第一片段,

(k)由SEQ ID NO:15组成的EBNA3A的第二片段,

(l)由SEQ ID NO:16组成的EBNA3A的第三片段,

(m)由SEQ ID NO:17组成的EBNA3A的第四片段,

(n)由SEQ ID NO:18组成的EBNA3A的第五片段,

(o)由SEQ ID NO:19组成的EBNA3A的第六片段,和

(p)由SEQ ID NO:20组成的EBNA3A的第七片段;

其中第一、第二、第三和第四LMP1片段彼此不相邻;第一、第二、第三和第四LMP2片段彼此不相邻;且第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七EBNA3A片段彼此不相邻。

19.实施方案17或18的多核苷酸,其中所述多肽进一步包含:

(a)由SEQ ID NO:22组成的ZEBRA的第一片段,和

(b)由SEQ ID NO:23组成的ZEBRA的第二片段;

其中第一和第二ZEBRA片段彼此不相邻。

20.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述多肽与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性。

21.前述实施方案中任一项的多核苷酸,其中所述片段是免疫原性片段。

22.载体,其包含前述实施方案中任一项的多核苷酸。

23.实施方案22的载体,其中所述载体是腺病毒载体或牛痘病毒载体。

24.实施方案22或23的载体,其中所述载体是非人猿猴腺病毒载体。

25.实施方案24的载体,其中所述非人猿猴腺病毒载体是黑猩猩腺病毒载体。

26.实施方案22或23的载体,其中所述载体是修饰的牛痘安卡拉载体。

27.实施方案22-25的载体,其为ChAd155-EBV-L表达载体,其包含与SEQ ID NO:50

具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的核酸序列。

28.实施方案22-25的载体,其为ChAd155-EBV-LLy表达载体,其包含与SEQ ID NO:51具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的核酸序列。

29.由实施方案1-21中任一项的多核苷酸或实施方案22-28中任一项的载体编码的多肽。

30.实施方案29的多肽,其与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一性。

31.免疫原性组合物,其包含实施方案1-21中任一项的多核苷酸、实施方案22-28中任一项的载体或实施方案29-30中任一项的多肽;和药学上可接受的赋形剂。

32.实施方案31的免疫原性组合物,其进一步包含佐剂。

33.实施方案1-21中任一项的多核苷酸、实施方案22-28中任一项的载体、实施方案29-30中任一项的多肽或实施方案31-32中任一项的免疫原性组合物在制备用于治疗或预防由爱泼斯坦-巴尔病毒感染引起的疾病的药物中的用途。

34.实施方案1-21中任一项的多核苷酸、实施方案22-28中任一项的载体、实施方案29-30中任一项的多肽或实施方案31-32中任一项的免疫原性组合物,其用于治疗或预防由爱泼斯坦-巴尔病毒感染引起的疾病。

35.产生能够表达EBV抗原的重组病毒颗粒的方法,其包括在宿主细胞中表达实施方案22-28中任一项的载体。

36.诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括将实施方案1-21中任一项的多核苷酸、实施方案22-28中任一项的载体、实施方案29-30中任一项的多肽或实施方案31-32中任一项的免疫原性组合物施用于所述受试者。

37.实施方案36的方法,其中所述受试者是爱泼斯坦-巴尔病毒血清阴性的。

38.实施方案36的方法,其中所述受试者是爱泼斯坦-巴尔病毒血清阳性的。

39.治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法,其包括将实施方案1-21中任一项的多核苷酸、实施方案22-28中任一项的载体、实施方案29-30中任一项的多肽或实施方案31-32中任一项的免疫原性组合物施用于所述受试者。

40.实施方案39的方法,其中所述EBV-相关的疾病是EBV-相关的自身免疫性疾病或EBV-相关的恶性肿瘤。

41.实施方案39的方法,其中所述EBV-相关的疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

42.诱导受试者中的免疫应答的方法,其包括:

(a)施用包含实施方案1-21中任一项的多核苷酸的腺病毒载体,和

(b)施用包含实施方案1-21中任一项的多核苷酸的牛痘病毒载体;

其中步骤(a)和(b)以任一顺序进行。

43.治疗或预防受试者中的EBV-相关的疾病的方法,其包括:

(a)施用包含实施方案1-21中任一项的多核苷酸的腺病毒载体,和

(b)施用包含实施方案1-21中任一项的多核苷酸的牛痘病毒载体;

其中步骤(a)和(b)以任一顺序进行。

44.实施方案42或43的方法,其中步骤(b)在步骤(a)之后一、二、三、四、五、六、七、

八、九、十、十一、十二或更多周实施。

[0150] 本发明将通过参考以下非限制性实施例和附图进一步描述。

实施例

[0151] 实施例1:抗原设计

a.EBV抗原设计

合理设计多价爱泼斯坦-巴尔病毒抗原构建体,考虑以下设计目标:

1)通过在设计中包括多种潜伏期抗原和任选地包括裂解期抗原来广泛靶向在EBV-相关的多发性硬化症(EBV-MS)中表达的EBV抗原;

2)通过排除已知有问题的区域、在多价抗原构建体中将EBV蛋白抗原片段化和改组来降低致癌和免疫干扰的风险;

3)通过在多价抗原构建体中包括T-细胞表位,将诱导的免疫应答集中于EBV-特异性T-细胞活化;和

4)排除最终抗原序列中不想要的抗自身新表位的存在。

[0152] 设计满足这些标准的两种多价EBV抗原构建体。第一多价抗原构建体(EBV-L;图2A)包括潜伏期EBV蛋白LMP1、LMP2、EBNA1和EBNA3A的免疫原性片段。第二构建体(EBV-LLy;图2B)含有与EBV-L相同的潜伏抗原片段,并且还包括EBV裂解蛋白ZEBRA的免疫原性片段。已经报道,选择用于包括在抗原构建体中的EBV潜伏蛋白在多发性硬化症患者的死后脑组织中由B细胞表达(Serafini等人,J.Exp.Medicine(2007)204(12):2899;Serafini等人,J.Neuropathol.Exp.Neurol.(2010)69(7):677。包括裂解抗原ZEBRA(EBV从潜伏期转变至裂解期的关键调节子)目的在于控制病毒的再活化,并且限制EBV的进一步扩增和传播。

[0153] 全长EBV蛋白具有转化免疫细胞的潜能。因此,为了提高抗原构建体的安全性,排除有问题的区域,并且仅选择EBV蛋白的剩余片段用于构建体设计。图1举例说明每种EBV蛋白中选择的免疫原性片段的位置。如图2A-B中所举例说明,将选择的片段改组以产生包含16(EBV-L)或18(EBV-LLy)免疫原性片段的多蛋白,将其组装,使得衍生自同一EBV蛋白的片段彼此不相邻。

[0154] 最后,为了降低通过将两个免疫原性片段连接在一起而形成不想要的接合表位的风险,进行生物信息学筛选,以鉴定候选抗原构建体的接合区域处的潜在的抗自身新表位。简而言之,从疫苗多肽序列提取跨越每对两个连续抗原片段之间的边界(接合)区域的十六个氨基酸长的肽(来自每个抗原片段的8个氨基酸)。接合区域的16个氨基酸的长度保证接合区域内的每个9聚体序列都含有来自两种抗原的氨基酸。然后,对于每个16聚体接合肽,将所有9聚体肽与代表完整人蛋白组的9聚体肽的集合(从NCBI RefSeq肽数据库生成)进行比较。在任何情况下均未发现人蛋白中存在来自疫苗多肽序列的接合区域的9聚体肽。

[0155] b.CalHV3抗原设计

CalHV3是一种从普通狨猴(普通狨(Callithrix jacchus))分离的γ疱疹病毒。基于序列和结构、病毒繁殖周期和发病机理的相似性,CalHV3被认为是人EBV的狨猴等效物。参见,例如,Cho等人,PNAS 98(3):1224-1229(2001)。CalHV3是在生命早期获得的,并且据报道在天然以及圈养狨猴群落中高度流行。

[0156] 为了评估类似疫苗在狨猴模型中的γ-疱疹病毒潜伏感染的个体中再次扩增对潜伏性和裂解性病毒抗原的功能性T细胞应答的能力,开发直系同源的CalHV3抗原构建体。简

而言之,从蛋白C1(SEQ ID NO:28)、C7(SEQ ID NO:32)和ORF39(SEQ ID NO:36)(其分别是EBV LMP1、LMP2和EBNA1的CalHV3直系同源物)的免疫原性片段构建CalHV3潜伏抗原构建体(CalHV3-L;在图4A中举例说明)。如在EBV-L抗原构建体中一样,CalHV3-L构建体中包括的抗原性区域被片段化和改组,使得来自相同CalHV3蛋白的片段彼此不相邻。最终CalHV3-L抗原构建体的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:44(由SEQ ID NO:45中显示的多核苷酸编码)中。

[0157] 还构建CalHV3潜伏/裂解抗原构建体(CalHV3-LLy;图4B中举例说明)。除了含有潜伏蛋白C1、C7和ORF39的片段以外,CalHV3-LLy还含有ORF43(EBV ZEBRA蛋白的CalHV3直系同源物)的片段。最终CalHV3-LLy抗原构建体的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:46(由SEQ ID NO:47中显示的多核苷酸编码)中。

[0158] 最后,通过将狨猴MHC II类相关的恒定链多肽(SEQ ID NO:43)融合至CalHV3-LLy的N-末端来构建CalHV3-LLy的基因佐剂化版本(Ii-CalHV3-LLy)。最终Ii-CalHV3-LLy抗原构建体的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:48(由SEQ ID NO:49中显示的多核苷酸编码)中。

[0159] 实施例2:载体构建

根据WO2016/198621中描述的方法,将编码EBV-L(SEQ ID NO:25)和EBV-LLy(SEQ ID NO:27)的多核苷酸克隆至含有tetOhCMV启动子和牛生长激素聚腺苷酸化信号(BGH pA)的质粒pvjTetOhCMV-bghpolyA中。然后通过大肠杆菌BJ5183感受态细胞中的同源重组将EBV-L和EBV-LLy表达盒转移至ChAd155载体主链中,以产生pChAd155(ΔE1,ΔE4_Ad5E4 off6)TetO hCMV-EBV-L(和EBV-LLy)载体。载体pChAd155(ΔE1,ΔE4_Ad5E4orf6)TetO hCMV-EBV-L的核酸序列显示于SEQ ID NO:50中。编码抗原的区域在SEQ ID NO:50的核苷酸1348-4806处。载体pChAd155(ΔE1,ΔE3,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-EBV-LLy表达载体的核酸序列显示于SEQ ID NO:51中。编码抗原的区域在SEQ ID NO:51的核苷酸1348-5157处。通过转基因测序和限制性分析来证实ChAd155-EBV载体构建。基于如例如WO2016/198621中所述的替代的修饰的ChAd155主链,相同方法可用于制备EBV腺病毒载体。

[0160] 遵循相同方法以制备载体ChAd155-CalHV3-L、ChAd155-CalHV3-LLy和ChAd155-Ii-CalHV3-LLy(分别编码CalHV3抗原CalHV3-L、CalHV3-LLy和Ii-CalHV3-LLy)。载体pChAd155(ΔE1,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-CalHV3-L的核酸序列显示于SEQ ID NO:52(在核苷酸1348-4482处的编码抗原的区域)中。载体pChAd155(ΔE1,ΔE3,ΔE4_Ad5E4orf6)TetO hCMV-CalHV3-LLy的核酸序列显示于SEQ ID NO:53(在核苷酸1348-5238处的编码抗原的区域)中。载体pChAd155(ΔE1,ΔE3,ΔE4_Ad5E4 orf6)TetO hCMV-Ii-CalHV3-LLy的核酸序列显示于SEQ ID NO:54(在核苷酸1348-5883处的编码抗原的区域)中。

[0161] 根据本领域中已知的方法,还制备编码EBV-LLy和CalHV3-LLy抗原构建体的MVA载体。参见,例如,Ourmanov等人,J.Virol.(2009)83:5388-5400;和Martinon等人Vaccine(2008)26:532-545。

[0162] 实施例3:病毒颗粒产生

将ChAd155_EBV-L和ChAD155_EBV-LLy载体用限制性核酸内切酶PmeI线性化,并且转染至HEK293-衍生的细胞系(Procell92.S)中,如Vitelli等人,PLOS One(2013)8(e55435):1-9中所述。将这些细胞基因修饰以组成型表达TetO阻遏物,以阻遏病毒生成期

间的转基因表达。以小规模(摇瓶)进行病毒扩增,并以双CsCl梯度从1升规模悬浮培养物纯化ChAd155-EBV病毒颗粒。通过靶向tetOhCMV启动子的QPCR测定ChAd155-EBV病毒颗粒。遵循相同的方法从ChAd155-CalHV3-L、ChAd155-CalHV3-LLy和ChAd155-Ii-CalHV3-LLy制备病毒颗粒。

[0163] 使用标准方法获得表达EBV-LLy和CalHV3-LLy抗原构建体的重组MVA。简而言之,用MVA-EBV和MVA-CalHV3病毒种子以定义的感染复数感染鸡胚胎成纤维细胞(CEF)在定义的细胞密度下的原代细胞培养物。通过分级梯度离心纯化MVA-EBV和MVA-CalHV3病毒收获物。

[0164] 实施例4:ChAd155-EBV和ChAd155-CalHV3抗原在小鼠中的免疫原性

a.ChAd155-EBV

使用表1中显示的实验设计,在小鼠中评估从表达潜伏或潜伏+裂解抗原的载体产生的ChAd155-EBV病毒颗粒的免疫原性。简而言之,向CB6F1小鼠(每组6只)施用单剂量(10^6、10^7或10^8个病毒颗粒,肌肉内)的载体ChAd155-EBV-L或ChAd155-EBV-LLy。

[0165] 免疫三周后,分离脾细胞,并根据标准IFNγELISpot测定法测定对EBV抗原的T-细胞应答。简而言之,用在5种合并物中排列的重叠的15聚体肽(其各自覆盖疫苗中包括的每种EBV蛋白的免疫原性片段)(LMP1、LMP2、EBNA1、EBNA3A、ZEBRA;n=19至84个单肽/合并物)刺激来自免疫动物的脾细胞。覆盖片段之间每个单个接合处的16聚体肽(EJ,n=18个肽)的第六个合并物和DMSO(肽稀释剂)也分别用作刺激剂来监测对接合表位的应答和用作阴性对照。通过经由酶联免疫斑点(ELISPOT)计数分泌IFNγ的疫苗引发的T-细胞来检测T-细胞活化。

[0166] 表1

组	载体	n	剂量(vp)
1	ChAd155 EBV-L	6	10^8
2	ChAd155 EBV-L	6	10^7
3	ChAd155 EBV-L	6	10^6
4	ChAd155 EBV-LLy	6	10^8
5	ChAd155 EBV-LLy	6	10^7
6	ChAd155 EBV-LLy	6	10^6

。

[0167] 结果显示于图5A中。ChAd155-EBV-L和ChAd155-EBV-Lly两者均以剂量依赖的方式在接种疫苗的小鼠中引发分泌IFNγ的T-细胞。在EBV-L和EBV-LLy免疫的小鼠中,检测到对每种EBV潜伏抗原(LMP1、LMP2、EBNA1和EBNA3A)的T-细胞应答。然而,仅在EBV-LLy免疫的小鼠中检测到对EBV裂解蛋白ZEBRA的T-细胞应答。没有检测到对EBV接合肽(Ej)或DMSO阴性对照的应答。

[0168] 结果表明,由ChAd155-EBV-L和ChAd155-EBV-LLy载体产生的病毒颗粒能够引发对抗原构建体内含有的免疫原性片段的抗原特异性T-细胞应答。此外,对EBV-L和EBV-LLy抗原构建体的主要免疫应答并不针对接合表位。

[0169] b.ChAd155-CalHV3

遵循上述针对ChAd155-EBV病毒颗粒的相同方法评价ChAd155-CalHV3病毒颗粒的

免疫原性。接种疫苗后3周,用4种合并物中排列的重叠的15聚体肽(其各自覆盖疫苗中包括的免疫原性片段)(C1、C7、ORF39、ORF43,n=58至96个单肽/合并物)实施脾细胞的抗原刺激。覆盖片段之间每个单个接合处的16聚体肽(C_J,n=12个肽)的第五个合并物和DMSO(肽稀释剂)也分别用作刺激剂来监测对接合表位的应答和用作阴性对照。实验设计概述于表2中。

[0170] 表2

组	载体	n	剂量(vp)
1	ChAd155 CalHV3-L	6	10^8
2	ChAd155 CalHV3-L	6	10^7
3	ChAd155 CalHV3-L	6	10^6
4	ChAd155 CalHV3-LLy	6	10^8
5	ChAd155 CalHV3-LLy	6	10^7
6	ChAd155 CalHV3-LLy	6	10^6

[0171] 结果显示于图5B中。ChAd155-CalHV3-L和ChAd155-CalHV3-LLy两者均以剂量依赖的方式在接种疫苗的小鼠中引发分泌IFNγ的T细胞。在CalHV3-L和CalHV3-LLy免疫的小鼠中均检测到对覆盖CalHV3潜伏抗原C1、C7和ORF39的肽合并物的T-细胞应答。然而,仅在CalHV3-LLy免疫的小鼠中检测到对CalHV3裂解蛋白ORF43的T-细胞应答。没有检测到对CalHV3接合肽(Cj)或阴性对照DMSO的应答。

[0172] 结果表明,由ChAd155-EBV-L和ChAd155-EBV-LLy载体产生的病毒颗粒能够引发对抗原构建体内含有的免疫原性片段的抗原特异性T-细胞应答。此外,对CalHV3-L和CalHV3-LLy抗原构建体的主要免疫应答并不针对接合表位。

[0173] 实施例5:小鼠中的引发-加强的影响

a.EBV-LLy引发-加强

使用表3中概述的实验设计评估第二剂EBV-LLy抗原加强第一剂EBV-LLy抗原的免疫应答的能力。简而言之,将数组CB6F1小鼠(n=5/组)在第0天用$5x10^7$个Chad155-EBV-LLy病毒颗粒肌肉内免疫。在第21天(第3周),第2组接受用10^7个噬菌斑形成单位(PFU)的MVA-EBV-LLy的第二次免疫。对照小鼠不接受额外的免疫(第3组:"未加强")或接受用编码EBV无关的抗原的MVA载体的加强免疫(第1组:MVA-无关的)。

[0174] 表3

组	引发(w0)	加强(w3)	n	剂量(vp或pfu)
1	ChAd155 EBV-LLy	MVA-无关的	5	10^7vp/10^7pfu
2	ChAd155 EBV-LLy	MVA EBV-LLy	5	10^7vp/10^7pfu
3	ChAd155 EBV-LLy	未加强	5	10^7vp

。

[0175] 第一次免疫后四周,从小鼠分离脾细胞,并使用实施例4中所述的方法评价抗原特异性T-细胞应答。

[0176] 如图6中所示,与未加强的小鼠或接受无关的抗原的"加强"注射的小鼠相比,用ChAd155-EBV-LLy免疫、随后用MVA-EBV-LLy加强免疫产生EBV-特异性干扰素γ释放的显著增加。图6A呈现对所有抗原(LMP1、LMP2、EBNA1、EBNA3A和ZEBRA)的累积T-细胞应答,且图6B显示对单独抗原的应答。

[0177] b.CalHV3-LLy引发-加强

使用表4中概述的实验设计评价加强对CalHV3抗原的免疫应答的能力。简而言之，将数组CB6F1小鼠(n＝6/组)在第0天用5x10^{7}个Chad155-CalHV3-LLy病毒颗粒肌肉内免疫。在第42天(第6周)，第4组接受用相同ChAd155-CalHV3-LLy抗原构建体的第二次免疫，而第3组接受MVA-CalHV3-LLy的加强免疫。对照小鼠不接受加强(第1组)或接受用编码CalHV3-无关的抗原的MVA的加强(MVA-无关的)。

[0178] 表4

组	引发(w0)	加强(w6)	n	剂量(vp或pfu)
1	ChAd155 CalHV3-LLy	未加强	6	5x10^{7}vp
2	ChAd155 CalHV3-LLy	MVA-无关的	6	5x10^{7}vp/10^{7}pfu
3	ChAd155 CalHV3-LLy	MVA CalHV3-LLy	6	5x10^{7}vp/10^{7}pfu
4	ChAd155 CalHV3-LLy	ChAd155 CalHV3-LLy	6	5x10^{7}vp/5x10^{7}vp

。

[0179] 第一次免疫后七周，从小鼠分离脾细胞，并使用实施例4中所述的方法评价抗原特异性T-细胞应答。

[0180] 如图7中所示，与未加强的小鼠或接受无关的抗原的“加强”注射的小鼠相比，用ChAd155-CalHV3-LLy免疫、随后用相同的抗原构建体(ChAd155-CalHV3)或MVA-CalHV3-LLy加强免疫在第7周产生CalHV3-特异性干扰素γ释放的显著增加。

[0181] 这些结果表明使用引发-加强方案增强对EBV和CalHV3抗原构建体的免疫应答的能力。

[0182] 实施例6:恒定链-CalHV3-LLy融合蛋白

据报道，将抗原融合至主要组织相容性复合体(MHC)II类相关的恒定链(Ii)增强抗原特异性T-细胞应答。参见，例如，Capone等人，Mol Ther.2014 May;22(5):1039-1047。因此，根据表5中概述的研究设计，在CB6F1小鼠中评价表达与CalHV3-LLy抗原多肽的N-末端融合的狨猴恒定链(Ii)的病毒颗粒的免疫原性。抗原特异性T-细胞应答使用实施例4中所述的IFNγ测定法来评价。

[0183] 表5

组	引发(w0)	n	剂量(vp)
1	ChAd155 CalHV3-LLy	6	5x10^{7}vp
2	ChAd155 CalHV3-LLy	6	5x10^{6}vp
3	ChAd155狨猴Ii CalHV3-LLy	6	5x10^{7}vp
4	ChAd155狨猴Ii CalHV3-LLy	6	5x10^{6}vp

。

[0184] 图8概述免疫后两周观察到的对所有CalHV3-LLy抗原(C1、C7、ORF39和ORF43)的累积T-细胞应答。在较低剂量的抗原(5x10^{6}个病毒颗粒)下，与ChAd155-CalHV3-LLy相比，ChAd155-Ii-CalHV3-LLy在免疫的小鼠中引发显著更大的IFNγ释放。在测试的较高抗原剂量(5x10^{7}个病毒颗粒)下未观察到差异。

[0185] 这些结果表明，CalHV3-LLy抗原多肽与MHC II类相关的恒定链多肽的融合增强对CalHV3潜伏和裂解抗原的T-细胞免疫应答。

[0186] 实施例7:CalHV3抗原在非人灵长类动物中的免疫原性在CalHV3血清阳性狨猴(普通狨(Callithrix jacchus))(新大陆灵长类动物属)中评估CalHV3抗原构建体的免疫原性。已知CalHV3感染在狨猴中流行。参见,例如,Cho等人,PNAS 98(3):1224-1229(2001)。由于CalHV3和EBV之间的结构和病理学相似性,CalHV3-阳性狨猴可以充当人EBV感染和病理学的有价值模型。同上。

[0187] 使用ChAd155引发/MVA加强接种疫苗时间表免疫动物。简而言之,由四只成年动物(3只雄性和1只雌性)构成的组在第0天接受ChAd155-CalHV3-LLy($5x10^{10}$vp)的引发免疫,并且在第56天(第8周)接受MVA-CalHV3-LLy($2x10^{8}$)的加强免疫。引发注射前2周,引发注射后3周以及加强注射后1、4和7周,抽取血液样品。使用实施例4中描述的方法评价外周血单核细胞(PBMC)中的抗原特异性T-细胞应答。

[0188] 图9显示在基线(w0);在引发后三周(w3 pp);和在加强后1、4和7周(w1、w4、w7pb)观察到的个体动物中对所有CalHV3-LLy抗原(C1、C7、ORF39和ORF43)的累积T-细胞应答。免疫前,动物表现出基线CalHV3-特异性T-细胞应答,与动物是病毒携带者的事实一致。ChAd155-CalHV3-LLy免疫后三周,动物表现出预先存在的CalHV3-特异性T细胞应答的显著扩增。用MVA-CalHV3-LLy加强后1周,T细胞应答继续升高,并且在随后的2个月内收缩,在大多数动物中仍然保持高于基线水平。如图10中所示,对CalHV3-LLy的增强的T-细胞应答是持续的并且是多特异性的(即,对C1、C7、ORF39和ORF43)。

[0189] 这些结果表明,编码CalHV3-LLy抗原的ChAd155和MVA载体可以有效地重新扩增和维持CalHV3-阳性狨猴中预先存在的抗原特异性T-细胞应答,并且由γ疱疹病毒引发的循环T细胞功能不受损或耗竭。

[0190] 实施例8:人PBMC对由ChAd155和MVA潜伏性+裂解性EBV疫苗编码的EBV片段的识别为了验证疫苗中包括的EBV潜伏(EBNA1、EBNA3A、LMP1和LMP2)和裂解(ZEBRA)抗原片段的选择,在其他方面健康的人EBV携带者中测量对相应肽合并物的T细胞应答。

[0191] 简而言之,将冷冻的来自8个健康人供体的外周血单核细胞(PBMC)解冻,并根据标准IFNγELISpot测定法测定对EBV抗原的T-细胞应答。将PBMC以$2x10^{5}$个细胞/孔一式三份铺板,并用在5种合并物中排列的重叠的15-聚体肽(其各自覆盖来自疫苗中包括的每种EBV蛋白的免疫原性片段)(LMP1、LMP2、EBNA1、EBNA3A、ZEBRA;n=19至84个单肽/合并物)刺激过夜。用DMSO(肽稀释剂)刺激用作阴性对照。通过经由酶联免疫斑点(ELISPOT)计数分泌IFNγ的T细胞来检测T-细胞活化。

[0192] 如图11中所示,结果表明,可以在健康的EBV携带者中容易地检测到对EBV Lly抗原构建体内含有的免疫原性片段的抗原特异性T-细胞应答,其中EBNA3A和ZEBRA最常被识别并且引发最高的应答,与先前的报道(例如,Taylor等人Ann.Rev.Immunol.33:787-821,2015)一致。

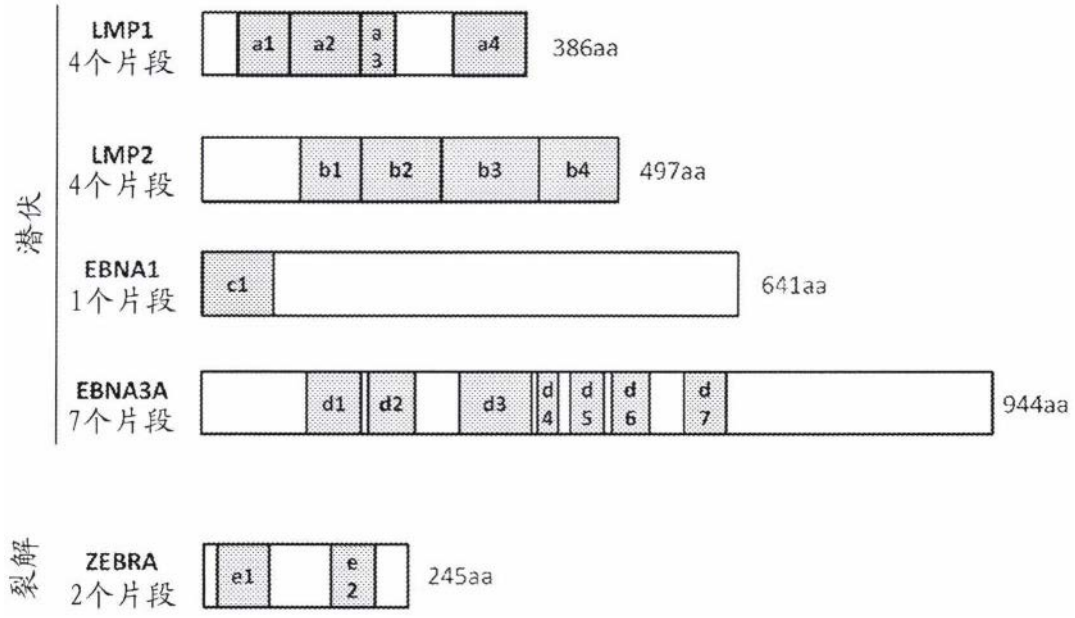

潜伏
裂解
LMP1
4个片段
a1
a2
a3
a4
386aa
LMP2
4个片段
b1
b2
b3
b4
497aa
EBNA1
1个片段
c1
641aa
EBNA3A
7个片段
d1
d2
d3
d4
d5
d6
d7
944aa
ZEBRA
2个片段
e1
e2
245aa

图1

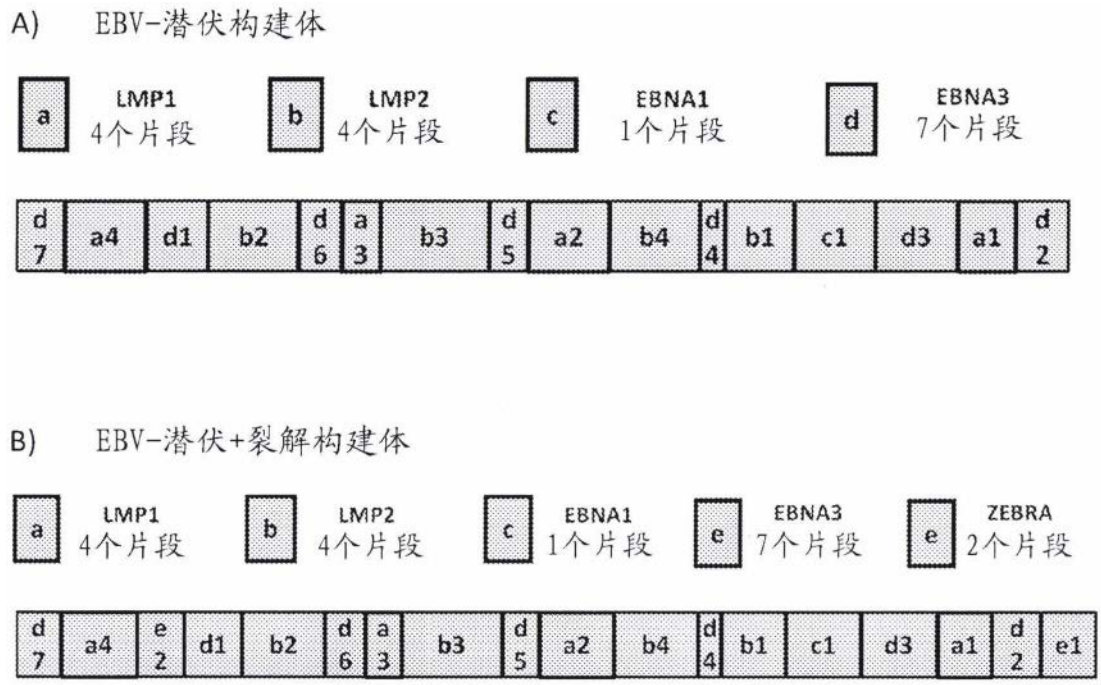

A) EBV-潜伏构建体
a
LMP1
4个片段
b
LMP2
4个片段
c
EBNA1
1个片段
d
EBNA3
7个片段
d7
a4
d1
b2
d6
a3
b3
d5
a2
b4
d4
b1
c1
d3
a1
d2
B) EBV-潜伏+裂解构建体
a
LMP1
4个片段
b
LMP2
4个片段
c
EBNA1
1个片段
e
EBNA3
7个片段
e
ZEBRA
2个片段
d7
a4
e2
d1
b2
d6
a3
b3
d5
a2
b4
d4
b1
c1
d3
a1
d2
e1

图2

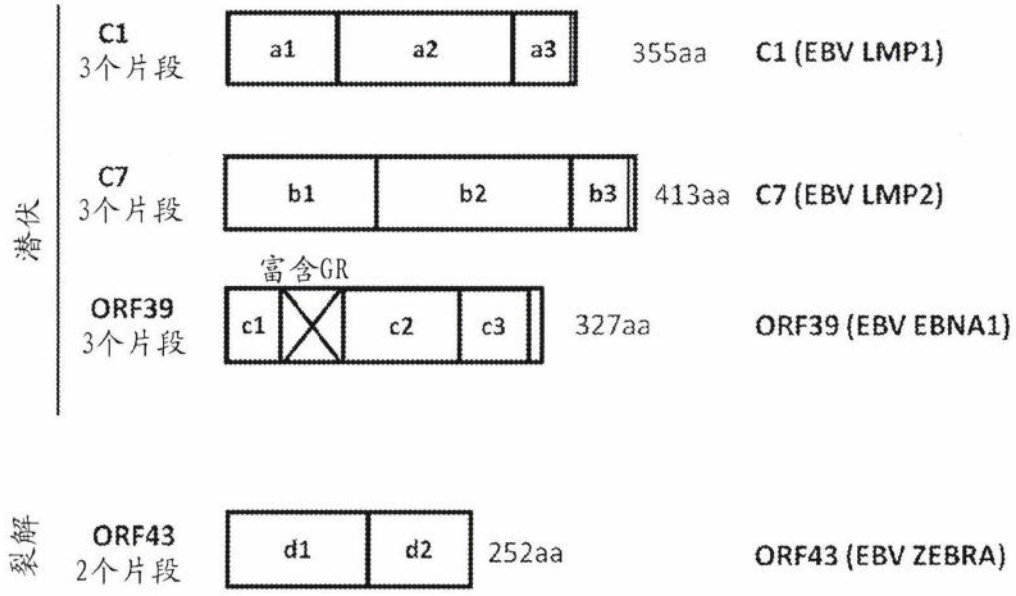

潜伏
裂解
C1
3个片段
a1
a2
a3
355aa
C1 (EBV LMP1)
C7
3个片段
b1
b2
b3
413aa
C7 (EBV LMP2)
富含GR
ORF39
3个片段
c1
c2
c3
327aa
ORF39 (EBV EBNA1)
ORF43
2个片段
d1
d2
252aa
ORF43 (EBV ZEBRA)

图3

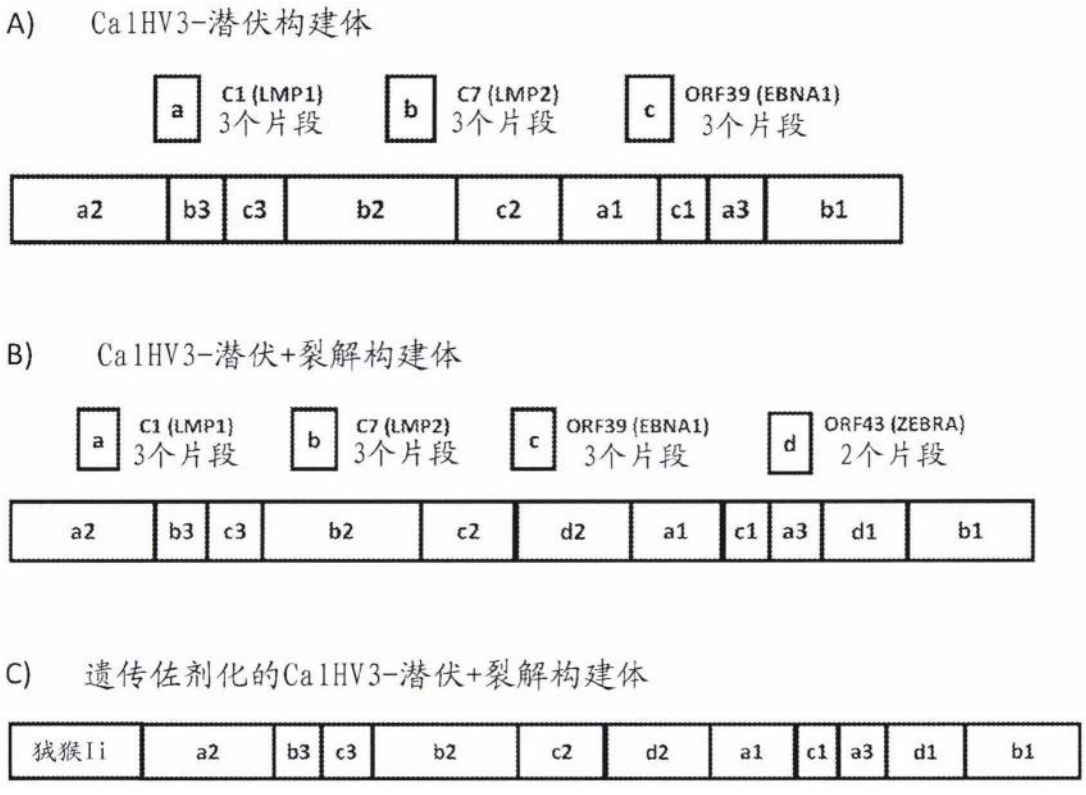
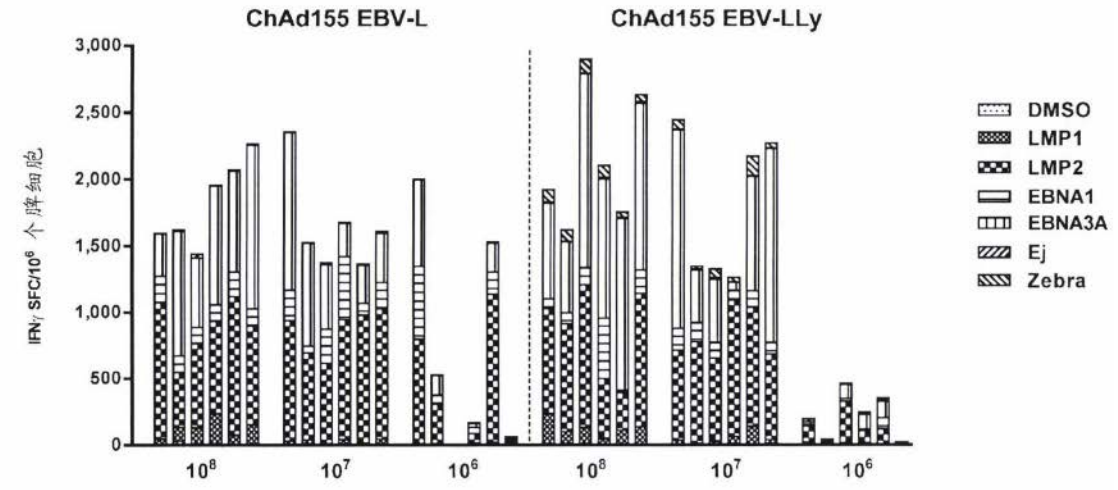

A) CalHV3-潜伏构建体
a
C1 (LMP1)
3个片段
b
C7 (LMP2)
3个片段
c
ORF39 (EBNA1)
3个片段
a2
b3
c3
b2
c2
a1
c1
a3
b1
B) CalHV3-潜伏+裂解构建体
a
C1 (LMP1)
3个片段
b
C7 (LMP2)
3个片段
c
ORF39 (EBNA1)
3个片段
d
ORF43 (ZEBRA)
2个片段
a2
b3
c3
b2
c2
d2
a1
c1
a3
d1
b1
C) 遗传佐剂化的CalHV3-潜伏+裂解构建体
狨猴Ii
a2
b3
c3
b2
c2
d2
a1
c1
a3
d1
b1

图4

A) 小鼠中对EBV构建体的T-细胞应答



B) 小鼠中对CalHV3构建体的T-细胞应答

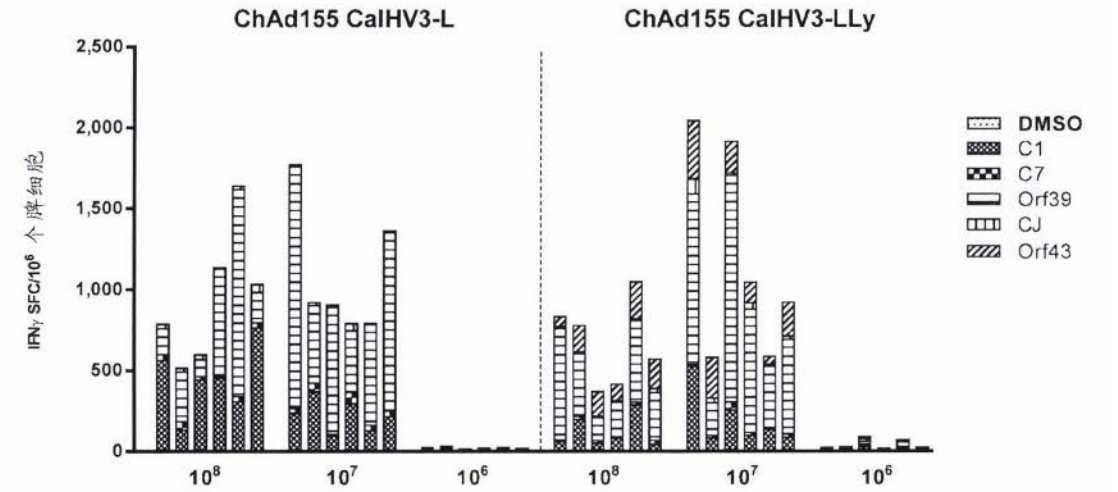
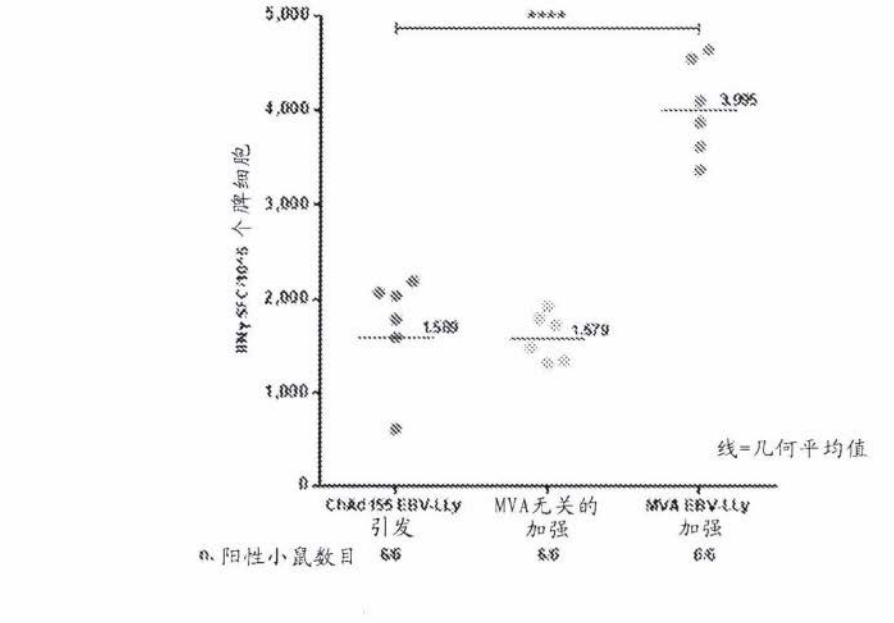


图5

A) 对EBV-LLy抗原的累积应答



B) 对单一EBV-LLy抗原的应答

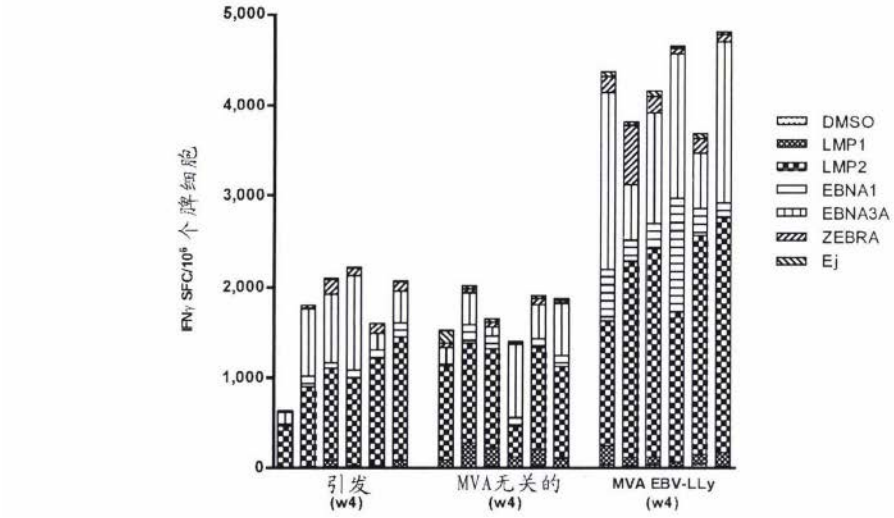


图6

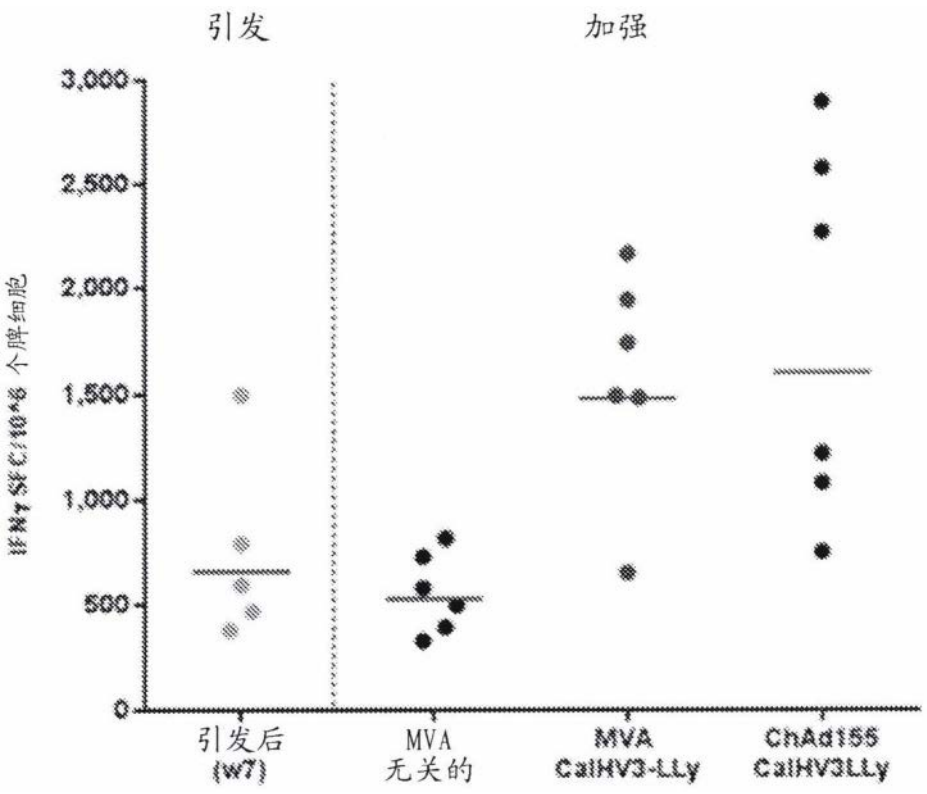

引发
加强
IFN-γ SFC/10^6 个脾细胞
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
引发后
(w7)
MVA
无关的
MVA
CalHV3-LLy
ChAd155
CalHV3LLy

图7

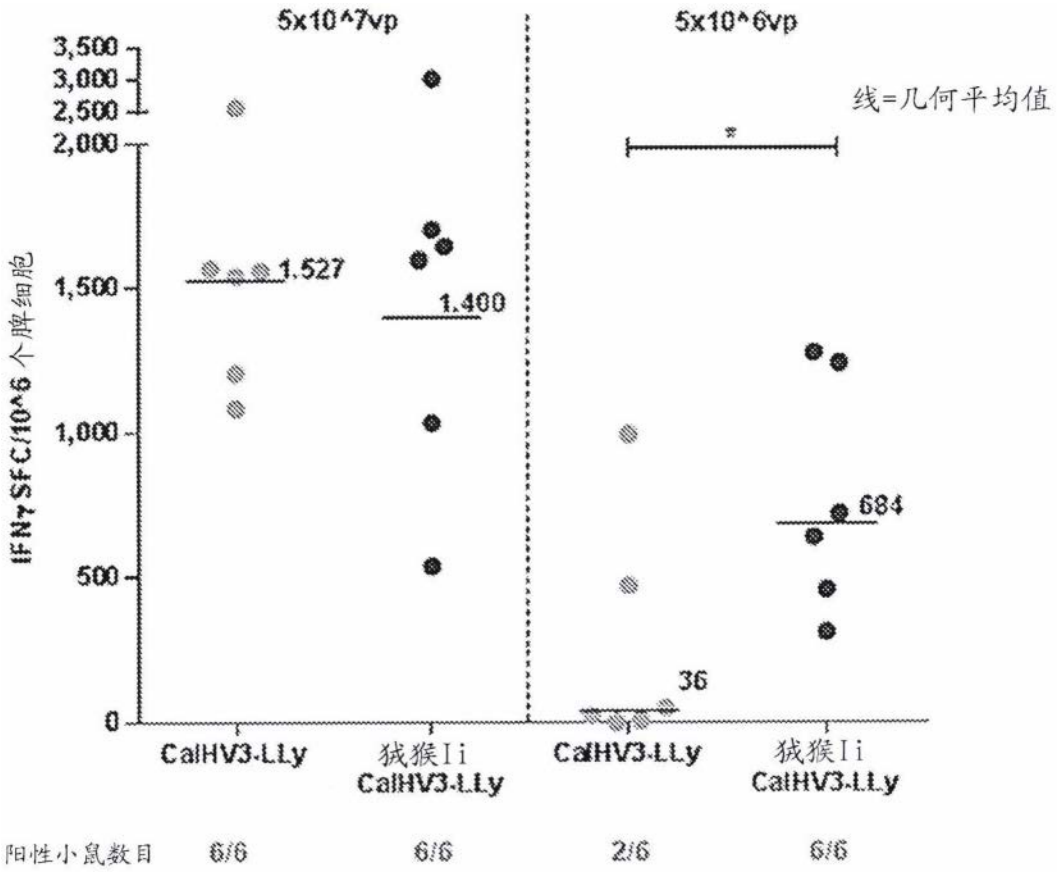

5x10^7vp
5x10^6vp
线=几何平均值
IFNγSFC/10^6个脾细胞
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
1,527
1,400
684
36
*
CalHV3-LLy
狨猴Ii CalHV3-LLy
CalHV3-LLy
狨猴Ii CalHV3-LLy
阳性小鼠数目
6/6
6/6
2/6
6/6

图8

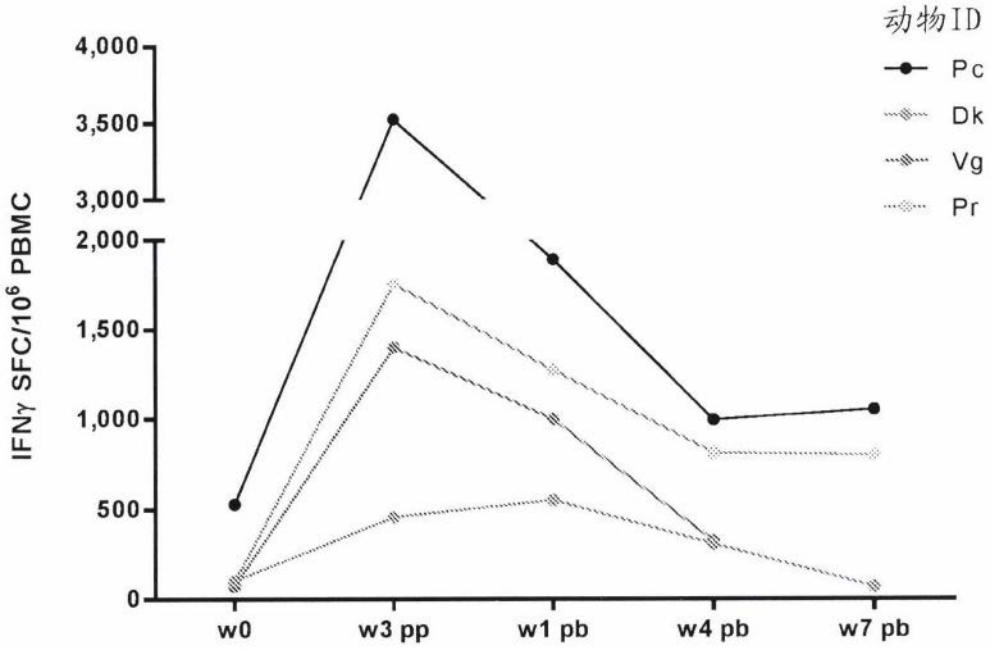

动物ID
Pc
Dk
Vg
Pr
IFNγ SFC/10^6 PBMC
4,000
3,500
3,000
2,000
1,500
1,000
500
0
w0
w3 pp
w1 pb
w4 pb
w7 pb

图9

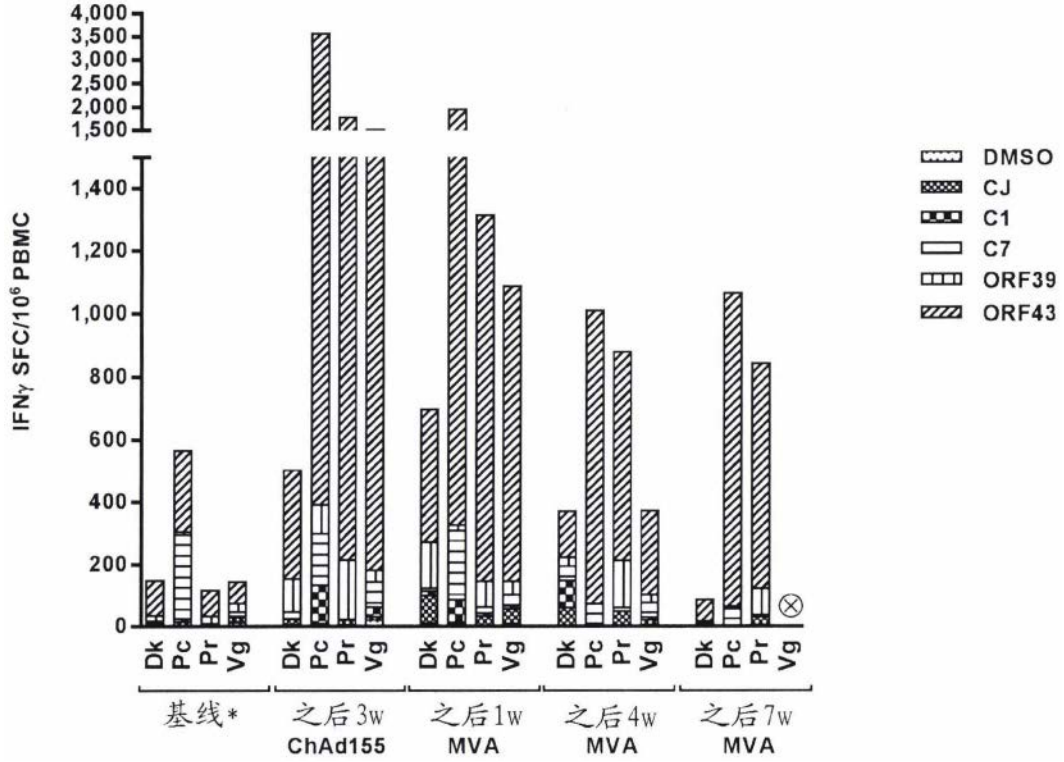

IFNγ SFC/10⁶ PBMC
4,000
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
DMSO
CJ
C1
C7
ORF39
ORF43
Dk Pc Pr Vg
基线*
之后3w ChAd155
之后1w MVA
之后4w MVA
之后7w MVA

图10

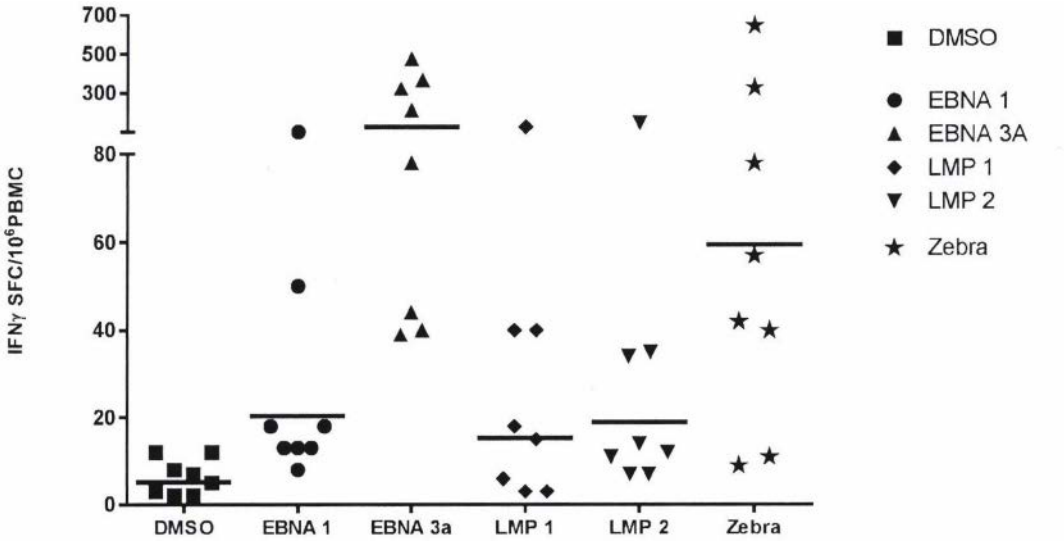

IFNγ SFC/10⁶PBMC
700
500
300
80
60
40
20
0
DMSO
EBNA 1
EBNA 3A
LMP 1
LMP 2
Zebra
DMSO
EBNA 1
EBNA 3a
LMP 1
LMP 2
Zebra

图11